

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

O PAPEL DA PROTEÍNA ASTROCÍTICA S100B NA AGREGAÇÃO DO PEPTÍDEO β
AMILÓIDE

Bárbara Carolina Federhen

Porto Alegre, dezembro de 2019.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

O PAPEL DA PROTEÍNA ASTROCÍTICA S100B NA AGREGAÇÃO DO PEPTÍDEO β
AMILÓIDE

Trabalho apresentado pela aluna Bárbara
Carolina Federhen como requisito parcial
para aprovação na disciplina de Trabalho de
Conclusão do Curso de Farmácia da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Gonçalves

Porto Alegre, dezembro de 2019.

“Eu **sonho** minha pintura, e então eu pinto o meu **sonho**.”

Vicent van Gogh

APRESENTAÇÃO

Este trabalho foi elaborado na forma de artigo científico seguindo as normas da revista *Journal of Biological Chemistry* na qualidade de “Artigo Original”, cujas regras de formatação encontram-se em anexo. Para melhor compreensão do leitor, o artigo está escrito em língua portuguesa e, após as devidas correções da banca, será traduzido para língua inglesa para posterior submissão do mesmo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à minha família, especialmente ao meu pai João Egon e minha mãe Sônia, que sempre me apoiaram durante esses anos de faculdade e sempre acreditaram na chegada de dias melhores. Vocês são as pessoas mais importantes da minha vida e os meus maiores exemplos de dedicação, superação, humildade e trabalho. Obrigada por incentivarem a busca por mim e pela Natália por estudo, ele tem um papel transformador na vida que eu só pude compreender, graças à vocês.

Agradeço também à minha irmã Natália pela cumplicidade e companheirismo. Obrigada por me ouvir, por me entender, por compartilhar dos mesmos sonhos e por me ajudar em diversos aspectos da vida.

Ao meu namorado, Lucas, pelo amor e pela paciência. Obrigada por iniciar essa caminhada junto comigo, desde a inscrição no vestibular e por concluí-la também, ao meu lado. A tua ajuda e o teu incentivo deixaram esses anos de faculdade mais leves e tranquilos. Obrigada, também, por entender a minha ausência durante alguns finais de semana com “matéria acumulada” e por todas as palavras de conforto que me devolveram o ânimo nos momentos difíceis.

Aos amigos que tive o prazer de conhecer na faculdade. Compartilhar esses anos e aprender essa linda profissão com vocês foi muito enriquecedor e prazeroso. Obrigada por trazerem alegria aos meus dias, por mostrarem que mesmo a química orgânica pode ser mais simples, descomplicada e por tornarem essa caminhada tão feliz. Aqui, agradeço especialmente à Gabriele, à Pricilla e à Rebecca pela parceria até os últimos dias, por serem amigas tão queridas e estarem sempre tão dispostas a ajudar no que for preciso. Fico muito orgulhosa de compartilhar da mesma profissão que vocês.

Agradeço aos meus amigos do laboratório 33 do Departamento de Bioquímica da UFRGS por me acolherem e me ensinarem tanto durante todos esses anos de iniciação científica. Não tenho palavras para descrever o quanto cresci e o quanto a convivência com vocês tornou meus dias na UFRGS ainda mais felizes e alegres. Ir para o laboratório, fazer experimentos e discutir ciência sempre foi a melhor parte da faculdade, obrigada por me apresentarem esse mundo.

Especialmente, agradeço a Krista pelo conhecimento compartilhado, é uma excelente professora e pesquisadora, que me inspira todos os dias! Obrigada por me orientar desde a minha chegada ao Lab 33 e por proporcionar a construção deste trabalho junto comigo.

Agradeço, também, à Letícia que sempre foi muito atenciosa, paciente e me ajudou tanto durante a realização deste trabalho, desde a construção da ideia até as idas ao Campus do Vale. Obrigada por encarar esse desafio comigo!

Ao Nicholas agradeço pela amizade e pelo constante apoio. O teu jeito de ver o mundo e a tua esperança em dias melhores me deu a calma que eu precisava pra chegar onde cheguei e me ajuda a projetar novos caminhos, obrigada.

Por fim, agradeço ao meu orientador CA pela confiança em mim depositada e por permitir construir essa ideia.

O PAPEL DA PROTEÍNA ASTROCÍTICA S100B NA AGREGAÇÃO DO PEPTÍDEO
BETA AMILÓIDE

THE ROLE OF THE ASTROCYTIC S100B PROTEIN IN β AMYLOID
AGGREGATION

Bárbara Carolina Federhen ^{1,2}, Krista Minéia Wartchow ², Leticia Rodrigues ², Carlos
Alberto Gonçalves ^{2*}

¹ Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

² Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

*Autor correspondente: Carlos Alberto Gonçalves, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

Resumo

A doença de Alzheimer é o tipo de distúrbio neurológico com maior incidência na população em envelhecimento. O principal marcador fisiopatológico da doença é a placa amiloide, caracterizada pelo depósito de fibrilas formadas pela polimerização do peptídeo β amiloide. Além disso, há de se relatar a importância dos astrócitos na fisiopatologia da doença, sendo um dos principais marcadores celulares a proteína S100B, a qual acredita-se interagir com o peptídeo. No nosso trabalho, demonstramos que a própria S100B possui a capacidade de agregar-se, em condições extremas, quando em elevadas concentrações (μM). A mesma parece possuir a capacidade de desagregar as fibrilas de β amiloide previamente formadas, sendo esta característica atribuída a proteína quando a mesma encontra-se em baixas concentrações, na ordem de nM. Esses achados levam a discussão das funções e propriedades da S100B, traçando um paralelo com a concentração em que a mesma se encontra no meio. Enquanto que em elevadas concentrações ocorre o favorecimento da agregação da mesma, em baixas concentrações e em contato com fibrilas de β amiloide previamente formadas, a proteína apresenta um comportamento de chaperona, identificando estruturas mal formadas e desagregando-as.

Palavras-chave: Alzheimer, astrócitos, β amiloide, agregação, chaperona.

Abstract

Alzheimer's disease is the most prevalent type of neurological disorder in the elderly population. The main disease's pathophysiological marker is the amyloid plaque, characterized by the deposition of fibrils formed by polymerization of β amyloid peptide. In addition, there are reports of the importance of astrocytes in the pathophysiology of the disease, being the S100B protein one of the main astrocytic marker, which it believes to interact with the β amyloid peptides. In our work, it has been shown that the S100B itself has an ability to aggregate under extreme conditions when at high concentration (μM). It also appears to have the ability to disaggregate the amyloid fibrils formed, which is attributed to S100B protein when it is found low concentrations, in the order of nM. These findings lead to a discussion of the functions and properties of the S100B, drawing a parallel with its concentration in the medium. While high concentration favors S100B aggregation, at low concentrations and in contact with pre-formed amyloid fibrils, the protein exhibits a chaperone behavior, identifying the misfolded forms and disaggregating them.

Key-words: Alzheimer, astrocyte, β amyloid, aggregation, chaperone.

INTRODUÇÃO

Com o aumento da expectativa de vida da sociedade global, a doença de Alzheimer (DA) tem se tornado a forma mais frequente de demência na população em envelhecimento sendo esta, até então, uma comorbidade impassível de cura ou prevenção (1). Os pacientes acometidos pela DA sofrem de uma deterioração progressiva de funções cognitivas como linguagem, personalidade e memória, acarretando em um prejuízo de convivência social e comprometimento da autonomia do indivíduo.

Fisiopatologicamente, os biomarcadores clássicos da doença encontrados no hipocampo e córtex cerebral são as placas senis extracelulares, os emaranhados neurofibrilares e a reatividade astrocítica (2). De acordo com a hipótese da cascata amilóide, o peptídeo β amilóide, que é o principal componente das placas senis, é o responsável pela fisiopatologia da DA que além de formar a placa, acreditava-se estimular a formação dos emaranhados neurofibrilares e levar à morte celular (3), resultando, desta forma, na demência característica da doença. A sua formação, em condições patológicas, se dá através da clivagem sequencial da proteína precursora amilóide, presente na membrana celular, por enzimas chamadas β e γ secretases (4). Essa clivagem inadequada gera fragmentos que possuem de 38 a 43 resíduos de aminoácidos, sendo o fragmento constituído de 42 resíduos de aminoácidos considerado com o maior potencial amiloidogênico, formando as fibrilas β amiloides que se depositam no meio extracelular na forma de placa senil (5).

Os astrócitos, por sua vez, são as células mais abundantes no sistema nervoso central, encontrando-se no córtex humano cerca de 1,4 astrócitos para cada neurônio (6). Estas células, de grande complexidade estrutural, possuem a capacidade de otimizar o ambiente celular através de diversas funções fisiológicas como a regulação do fornecimento de glicose e substratos metabólicos aos neurônios, o tamponamento do pH do meio e íons, regulação da permeabilidade da barreira hematoencefálica, secreção de moléculas neuroprotetoras e estabilização de novas sinapses (7). Na DA há um aumento de astrócitos reativos, caracterizados por uma hipertrofia do corpo celular, que se depositam ao redor e entre as placas senis cujos principais marcadores são a proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e a proteína S100B (8). Nessas condições neuropatológicas, essas células assumem um comportamento tóxico, secretando para o meio extracelular moléculas consideradas como citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio (9).

A S100B é uma proteína pertencente a classe de proteínas S100 que possui dois sítios de ligação com o íon Ca^{2+} do tipo *EF-hand*, possuindo dois motivos hélice-volta-hélice conectados por uma região central (10). No sistema nervoso central, essa proteína é produzida e secretada por astrócitos e a mesma, quando presente no meio extracelular, é capaz de modular a atividade de diversos tipos celulares como os neurônios, a microglia, as células do endotélio vascular e, inclusive, os próprios astrócitos de uma forma autócrina (11). Os efeitos decorrentes da sinalização desta proteína podem ser tróficos ou tóxicos, sendo ambos dependentes da concentração em que a mesma se encontra no meio extracelular. Experimentos utilizando cultura celular neuronal indicam que concentrações baixas, na ordem de nanomolar, são tróficas, promovendo a extensão de neuritos e sobrevivência celular. Já, em contrapartida, concentrações elevadas, na ordem de micromolar, são tóxicas para o ambiente celular, levando a produção de radicais livres e consequente morte celular (12).

O receptor multiligante para produtos finais de glicação avançada (RAGE) é um receptor presente na superfície celular no qual a S100B se liga (13). Em determinadas patologias, como na DA e no diabetes, a expressão do receptor RAGE encontra-se elevada, sendo a mesma estimulada pela concentração extracelular de seus ligantes, resultando em um aumento da resposta celular e no estabelecimento de um processo neuroinflamatório (14). Para compreender com melhor clareza a natureza dessa interação receptor-ligante, alguns estudos têm se preocupado em esclarecer essa lacuna através do estudo da estrutura tridimensional da S100B, a fim de relacioná-la com as suas funções. Sabe-se que a S100B pode formar estruturas multiméricas, sendo observado desde formas diméricas a formas octaméricas em amostras de tecido cerebral humano. Essas diferentes formas tridimensionais ativam de diferentes formas o receptor RAGE, sendo a forma tetramérica capaz de dimerizar o receptor, dissociando-se do mesmo mais lentamente e consequentemente deixando-o ativado por mais tempo (15). Além disso, estudos *in silico* demonstram que a classe de proteínas S100, incluindo a S100B, possuem regiões suscetíveis a agregação protéica, podendo esta característica se relacionar com a fisiopatologia da DA (16).

O aumento da expressão de S100B na DA que colocaliza com as placas senis, sugere que a proteína interage com o peptídeo β amilóide e/ou com os agregados fibrilares de β amilóide. Recentemente, demonstrou-se que a S100B pode interagir com monômeros β amilóide, impedindo a nucleação primária e secundária, atuando de uma forma bastante significativa no impedimento da β agregação (17). Baseado nesses achados e no fato de que

a S100B, aparentemente, possui a sua função regulada pela sua estrutura tridimensional, o objetivo deste estudo foi avaliar o possível comportamento agregante da proteína bem como avaliar se a mesma possui a capacidade de interagir com o peptídeo β amiloide, afim de retardar a sua agregação ou então, atuar na desagregação de fibrilas previamente formadas. Cada vez tem se tornado mais necessário o entendimento da natureza da interação da S100B com o β amilóide para que seja possível, futuramente, elucidar claramente o mecanismo da instalação da doença e, desta forma, traçar alvos terapêuticos que possam auxiliar no seu tratamento.

RESULTADOS

A taxa de agregação da S100B é dependente da concentração e do tempo de incubação

Ao incubarmos a S100B em concentração de 10 nM, apesar de se visualizar uma pequena agregação da S100B, não observamos diferença estatística ao longo dos tempos avaliados (Figura 1) ($p=0,5868$, $F_{(3,15)}=0,6624$). Já com a S100B em concentração de 10 μM , observamos uma agregação baixa nos primeiros tempos após incubação no meio agregante, entretanto, a agregação da mesma aumenta conforme aumenta o tempo de incubação (Figura 2) ($p=0,0003$, $F_{(3,9)}=3,542$).

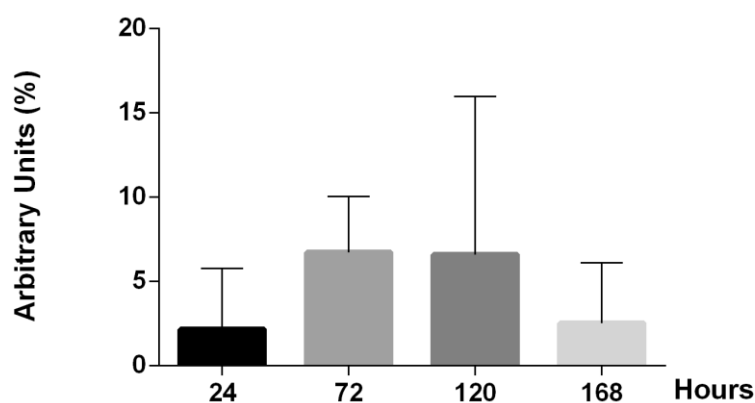


Figura 1 - Agregação da S100B - 10 nM. Análise da agregação proteica ao longo do tempo (horas) pelo método de tioflavina T (ThT). Análise estatística realizada por ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste Tuckey, sendo os dados expressos como média \pm erro padrão, assumindo $p < 0,05$.

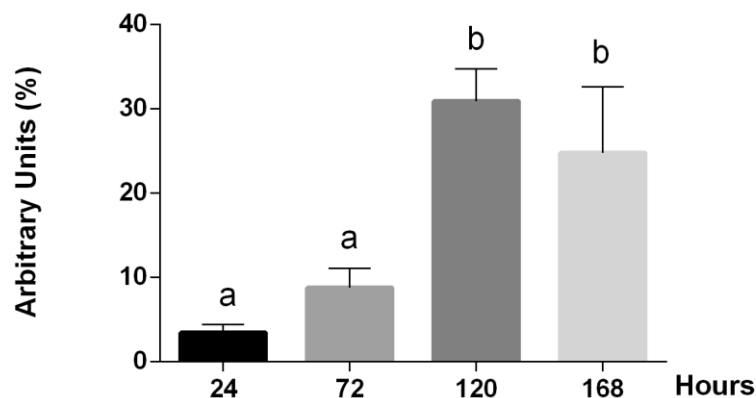


Figura 2 - Agregação da S100B - 10 μM. Análise da agregação proteica ao longo do tempo (horas) pelo método de tioflavina T (ThT). Letras indicam diferença estatística por ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste Tuckey, sendo os dados expressos como média ± erro padrão, assumindo $p < 0,05$.

Quando comparada a concentração da S100B 10 nM com a da S100B 10 μM, visualiza-se que a S100B 10 μM apresenta maior agregação que a S100B 10 nM nos tempos de 120 e 168 horas após a incubação no meio agregante (Figura 3) ($p=0,0001$, $F_{(3,25)}=10,26$).

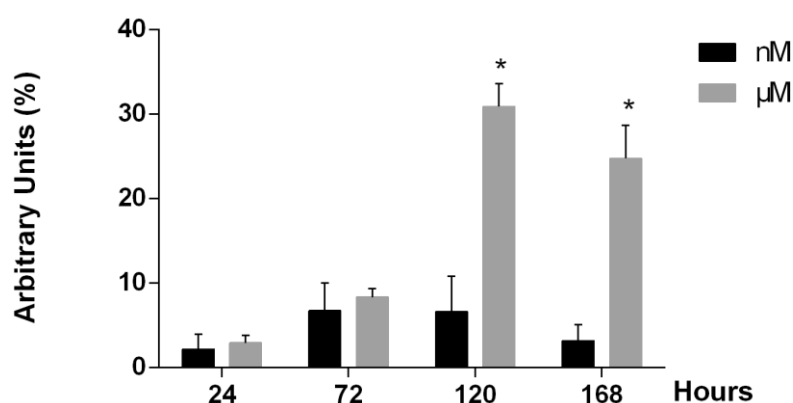


Figura 3 - Comparação da agregação da S100B nM e μM. Análise da agregação proteica ao longo do tempo (horas) pelo método de tioflavina T (ThT). * indicam diferença estatística por ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste Tuckey, sendo os dados expressos como média ± erro padrão, assumindo $p < 0,05$

Agregação do peptídeo β amiloide é dependente do pH do meio

No ensaio de agregação do peptídeo β amiloide em pH fisiológico (aproximadamente pH 7,4), observa-se um pequeno aumento da fluorescência da molécula da ThT, demonstrando, desta forma, que a produção dos agregados fibrilares de β amiloide é pequena. Já no meio ácido (pH 2,0) observa-se um aumento da fluorescência da molécula da ThT, demonstrando que, nestas condições de agregação, a formação de agregados fibrilares de β amiloide é maior nos tempos de 12 ($p=0,0408$, $n=4-5$), 24 ($p=0,0133$, $n=4-5$) e 48 ($p=0,0117$, $n=4$) horas após incubação nos meios agregantes (Figura 4).

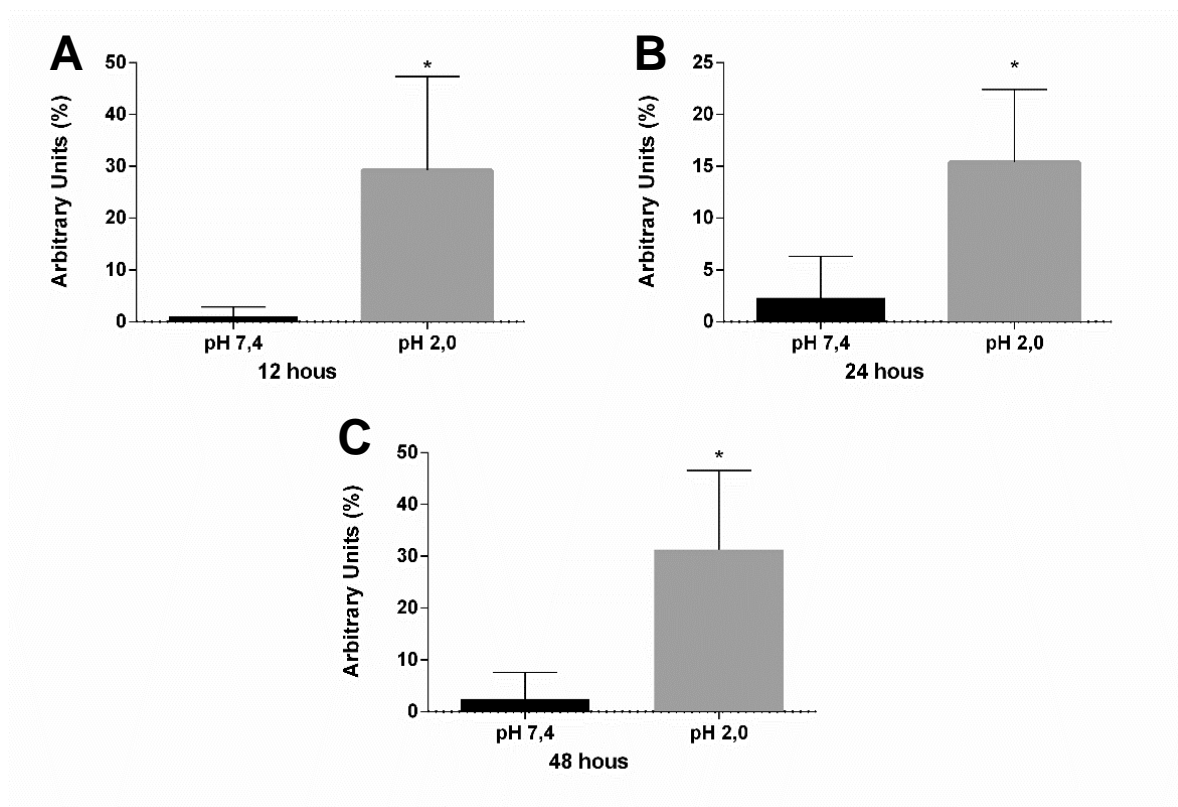


Figura 4 – Comparação da agregação do β amiloide 5 μ M em pH 7,4 e pH 2,0. A figura A representa a diferença de intensidade de fluorescência após 12 horas de incubação; a figura B representa a diferença na intensidade de fluorescência após 24 horas de incubação e, por fim, a figura C representa a diferença na intensidade de fluorescência após 48 horas de incubação. Análise da agregação proteica dos diferentes tempos (horas) pelo método de ThT. * indicam diferença estatística pelo teste t de *student*, sendo os dados expressos como média \pm erro padrão, assumindo $p < 0,05$.

Além da diferença da intensidade de fluorescência visualizada nos dois protocolos, a observação de agregados fibrilares de β amiloide por microscopia eletrônica de transmissão (MET) se dá apenas em amostras provenientes do protocolo de agregação em meio ácido (Figura 5).

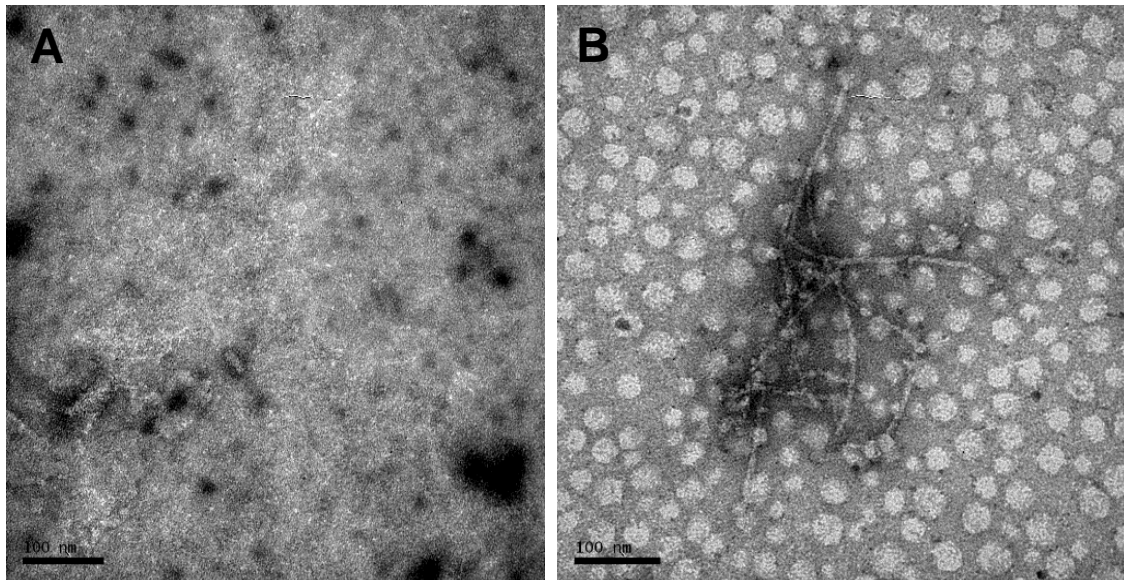


Figura 5 – Microscopia eletrônica de transmissão do β amiloide após 24 horas de agregação. Na imagem A não se observa a formação de fibrilas após realização da incubação em meio fisiológico (pH 7,4). Na imagem B, observa-se as fibrilas formadas após incubação em meio ácido (pH 2,0). Barra de escala 100 μ m.

Incubação da S100B promove a desagregação das fibrilas de β amiloide previamente formadas em meio ácido

Após 12 horas de incubação das fibrilas de β amiloide com as diferentes concentrações de S100B, observa-se que nas concentrações de 5 nM ($p= 0,0230$, $n= 4-5$), 50 nM ($p= 0,0485$, $n= 3-5$), 500 nM ($p= 0,0274$, $n= 4-5$) e 5 μ M ($p= 0,200$, $n=3-5$) a proteína S100B foi capaz de diminuir a intensidade de fluorescência detectada pelo teste da ThT que, por sua vez, é proporcional a quantidade de fibrilas presentes (Figura 6). Desta forma, demonstra-se que, em 12 horas, as diferentes concentrações de S100B são capazes de desagregar as fibrilas já formadas.

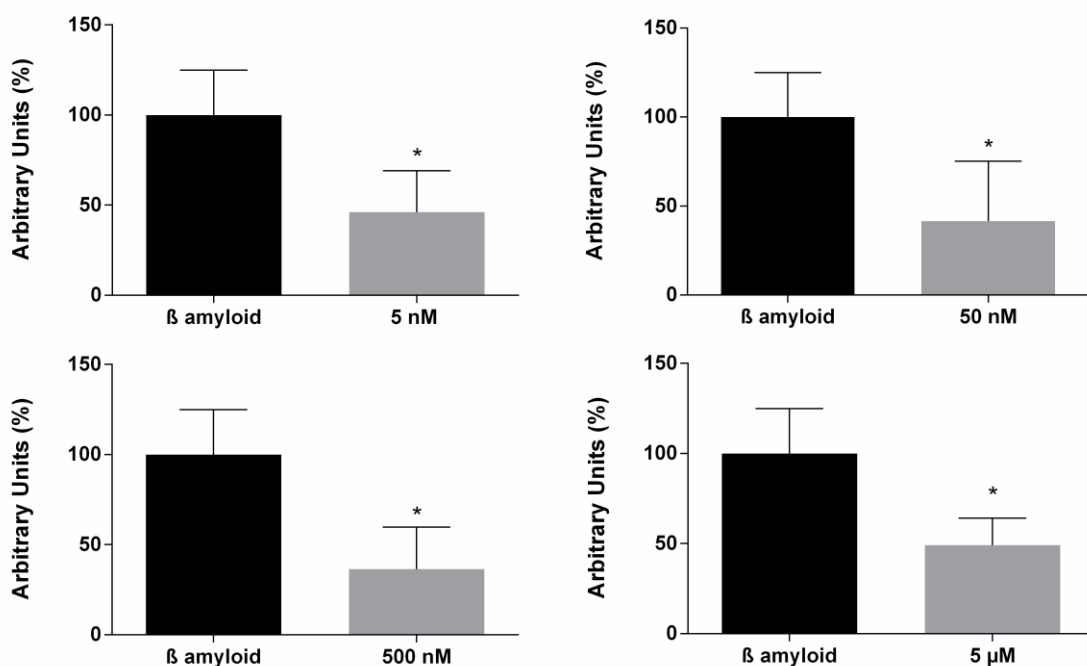


Figura 6 – Incubação durante 12h de fibrilas de β amiloide na presença de diferentes concentrações de S100B. Desagregação das fibrilas de β amiloide (formadas em pH ácido) após incubação com todas as diferentes concentrações de S100B por 12 horas. * indicam diferença estatística pelo teste t de *student*, sendo os dados expressos como média \pm erro padrão, assumindo $p < 0,05$.

Após 24 horas de incubação dos agregados fibrilares com as diferentes concentrações de S100B, observa-se que, a S100B na concentração de 5 nM preserva a capacidade de desagregar os agregados fibrilares com os quais é incubada ($p=0,0059$, $n=4-5$). A intensidade de fluorescência gerada após incubação dos agregados com a S100B na concentração de 50 nM não difere estatisticamente da gerada pelos agregados de β amiloide na ausência da proteína, indicando que, nesta concentração e tempo de incubação, não há diferença entre ambos ($p= 0,5790$, $n= 4-5$). No entanto, a intensidade de fluorescência gerada com a S100B nas concentrações de 500 nM e 5 μ M é estatisticamente maior do que a gerada pelos agregados de β amiloide isolados (500 nM: $p= 0,0209$, $n=4-5$; 5 μ M: $p=0,0404$, $n=4-5$) (Figura 7), demonstrando que, nestas condições, houve um aumento na formação de agregados.

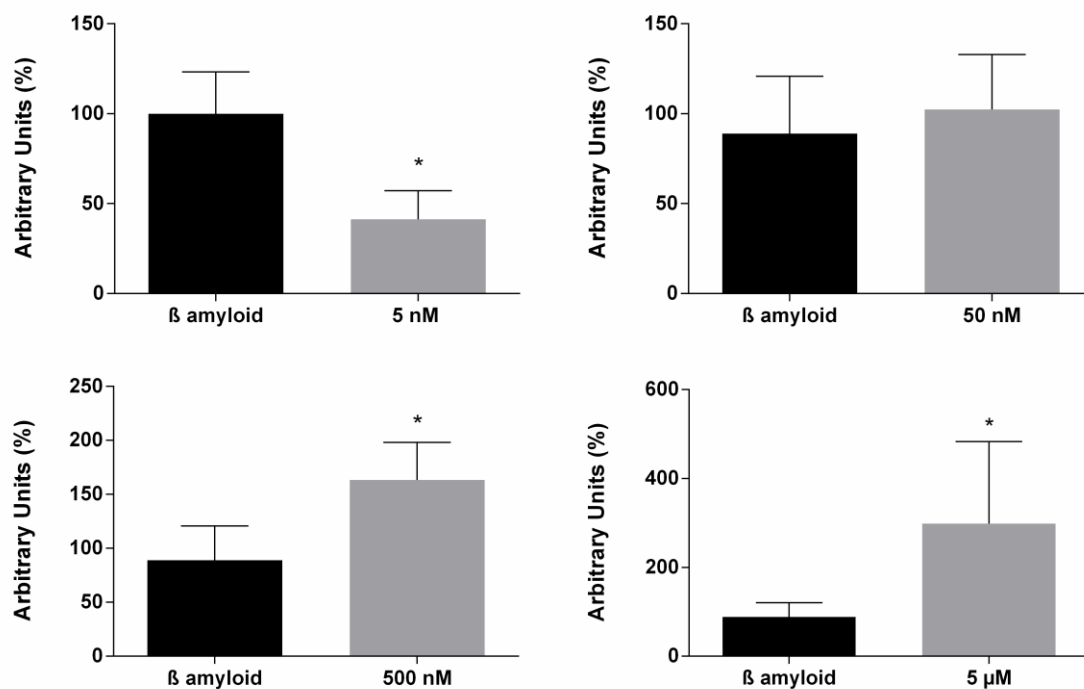


Figura 7 – Incubação durante 24h de fibrilas β amiloide na presença de diferentes concentrações de S100B. Desagregação das fibrilas de β amiloide (formadas em pH ácido) após incubação com diferentes concentrações de S100B por 24 horas. * indicam diferença estatística por teste t de *student*, sendo os dados expressos como média \pm erro padrão, assumindo $p < 0,05$.

A S100B na concentração de 5 nM, após 48 horas de incubação com as fibrilas ainda preserva a capacidade de desagrega-las ($p = 0,0169$, $n = 5$). Da mesma forma, na concentração de 50 nM, a S100B preserva o comportamento encontrado em 24 horas ($p = 0,6130$, $n = 5$), não alterando a agregação. Enquanto que, após 48 horas de incubação com a S100B nas

concentrações de 500 nM e 5 μ M, não houve alteração na agregação (Figura 8) (500 nM: $p=0,4647$, $n=4-5$; 5 μ M: $p=0,2169$, $n=4-5$).

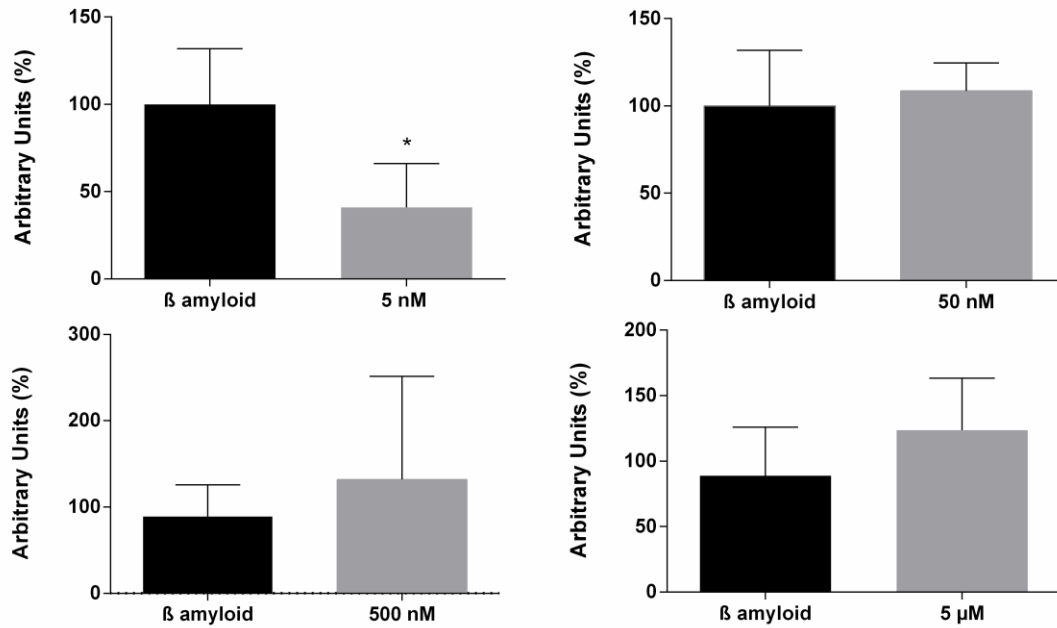


Figura 8 - Incubação durante 48h de fibrilas β amiloide na presença de diferentes concentrações de S100B. Desagregação das fibrilas de β amiloide (formadas em pH ácido) após incubação com diferentes concentrações de S100B por 48 horas. * indicam diferença estatística por teste t de *student*, sendo os dados expressos como média \pm erro padrão, assumindo $p < 0,05$.

DISCUSSÃO

Níveis elevados do conteúdo da proteína S100B são encontrados em pacientes com diferentes transtornos neurológicos como, por exemplo, no soro de pacientes esquizofrênicos (18) e no líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes em estágios iniciais da doença de Alzheimer (19). Sendo esta uma proteína de origem astrocítica, acredita-se que essas células desempenham um importante papel frente à essas patologias e outras doenças neurodegenerativas. Entretanto, ainda não é completamente compreendido o papel que os astrócitos desempenham em condições patológicas, especialmente na doença de Alzheimer, e qual o significado dos elevados níveis da S100B no LCR (19) e no soro (20) desses pacientes.

Intracelularmente, atribui-se diversas funções regulatórias a esta proteína astrocítica como, por exemplo, a intervenção da mesma na proliferação, sobrevivência e diferenciação celular (12, 21). Além disso, outra função bastante importante da S100B é a sua capacidade de regular a homeostase do íon cálcio, um importante cofator de diversas enzimas (22). Já, quando presente no meio extracelular, a funcionalidade desta proteína permanece não completamente elucidada. Além disso, todo o entendimento a respeito da estrutura tridimensional da S100B reflete do seu estado intracelular, sendo escasso o entendimento a respeito da estrutura/função da proteína no meio extracelular (15). No experimento de agregação da S100B que conduzimos, visualizamos, através do ensaio da ThT, que a S100B possui a capacidade de formar agregados de maneira tempo e concentração dependentes. A concentração de 10 μM demonstrou um comportamento mais propenso à formação destes agregados a partir do quinto dia após início da agregação (120 horas) e, experimentos em cultura neuronal já conduzidos anteriormente por outros grupos de pesquisa, atribuem um efeito citotóxico à elevadas concentrações de S100B (concentrações na faixa de μM) no meio extracelular (12).

Nas 12 horas após incubação das diferentes concentrações de S100B com os agregados β fibrilares previamente formados, as diferentes concentrações de S100B analisadas (5 nM, 50 nM, 500 nM e 5 μM) foram capazes de desagregar os agregados, diminuindo drasticamente a quantidade detectada. A menor concentração analisada de S100B frente aos agregados do peptídeo β amiloide – 5nM –, demonstrou uma capacidade de desagregar os agregados presentes, perdurando nos três diferentes tempos de coleta (12, 24 e 48 horas). Como mencionado anteriormente, experimentos prévios fazendo uso de cultura neuronal, atribuíram à concentrações baixas de S100B, na faixa de nM, um efeito

trófico (12). Entretanto, ao passo que a S100B 5 nM desagrega as fibrilas de β amiloide previamente formadas, acredita-se que o produto de desagregação sejam os oligômeros e monômeros que as compõe. A hipótese mais sustentada pela literatura atual é de que as formas oligoméricas são as formas nas quais o β amiloide apresenta sua maior toxicidade e estão relacionadas com as sinalizações celulares que desencadeiam na progressão da doença de Alzheimer (23). Desta maneira, seria contraditório que a menor concentração, 5 nM, para qual a literatura clássica atribui uma ação trófica, ser a responsável por uma maior desagregação de agregados β fibrilares, lançando para o meio formas oligoméricas, conhecidas por sua toxicidade. Este comportamento da S100B em baixas concentrações apenas foi visualizado *in vitro*, experimentos *in vivo* ainda são necessários para ver se esse comportamento se reproduz. Caso seja observado *in vivo* que a S100B em baixa concentração (5 nM) também é capaz de desagregar agregados β fibrilares previamente formados, seria interessante estudar se as formas oligoméricas estão realmente sendo formadas e lançadas para o meio extracelular, e, caso estejam, se há a possibilidade de um sistema de depuração destes oligômeros.

Após 24 horas de incubação da maior concentração de S100B com os agregados β amiloide previamente formados, houve uma maior detecção de intensidade de fluorescência pela ThT correspondendo a uma quantidade maior de agregados. Sabe-se que, ainda, o aumento da S100B extracelular, sendo a mesma detectada no LCR ou no soro, correlaciona-se negativamente com um volume cerebral normal e está associado a déficits cognitivos (24). Ainda é necessário um maior entendimento a respeito da ação da proteína nessa condição, se a mesma estimula a formação de fibrilas de β amiloide (através de oligômeros e monômeros não polimerizados) ou então se a própria, frente à esse ambiente, possui a capacidade de se agregar, formando uma estrutura cuja a sinalização e funcionalidade ainda são completamente desconhecida. Vale ressaltar que, após 48 horas, a S100B nas concentrações de 500 nM e 5 μ M diminui a quantidade de agregados, enquanto que, em 24 horas, a S100B demonstrava estimular a formação dos mesmos. Essa incoerência nos leva a questionar se a proteína está, de alguma forma, sendo degradada e/ou perdendo sua funcionalidade. Novamente, mais estudos devem ser conduzidos a fim de avaliar se esse é um comportamento aleatório ou se está relacionado com perda de funcionalidade/degradação proteica.

Com relação aos agregados de S100B, é necessário maior estudo a respeito das suas características estruturais, a fim de entender se é viável a sua real formação *in vivo*, visto que as condições de agregação empregadas no nosso estudo não são reproduzíveis por um

organismo vivo. Também é necessário avaliar se os mesmos participam da fisiopatologia de doenças de depósito proteico, especialmente, da doença de Alzheimer e, ainda, se a sua possível formação *in vivo* é influenciada pela concentração em que a S100B se encontra no meio extracelular. Neste sentido, buscamos, futuramente, elucidar a estrutura tridimensional dos agregados de S100B formados através de uma busca minuciosa por estruturas que sigam um padrão de repetição, fazendo uso da microscopia eletrônica de transmissão. Além disso, a análise da estrutura secundária dos agregados pode ser melhor compreendida através de técnicas de dicroísmo circular que faz uso da absorção diferenciada da luz polarizada nos sentidos horário e anti-horário permitindo, desta forma, detectar se há ou não presença de folhas β nestes agregados de S100B

O intuito deste trabalho foi trazer diferentes caminhos para entender a relação entre a S100B, proteína majoritariamente de origem astrocítica, com o peptídeo β amiloide, afim de compreender um pouco mais da participação dos astrócitos na fisiopatologia da DA. Ainda é necessário mais evidência científica, entretanto, através desse estudo inicial, pode-se acreditar que uma das funções que a proteína S100B apresenta é a identificação de estruturas mal formadas (como fibrilas de β amiloide) e a sua consequente desagregação atuando, desta forma, como uma possível chaperona.

PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Reagentes e proteínas

Todos os reagentes utilizados estavam em ótimo estado de conservação. Thioflavina T (ThT), β -amilóide e a proteína S100B foram adquiridos comercialmente da empresa Sigma-Aldrich (St. Lois, MO-USA).

Agregação da S100B nanomolar e micromolar

A fim de avaliar a formação de agregados de S100B, a proteína foi diluída em uma solução de 50 mM de glicina contendo 5 mM de β -mercaptoetanol, 5 mM de EDTA, 100 mM de NaCl com o pH ajustado para 2,5 (16) nas concentrações finais de 10 nM e 10 μ M. A formação dos agregados de S100B foi estimulada através da incubação da proteína em estufa à 37 °C durante 7 dias. No decorrer destes 7 dias de incubação, foram coletadas alíquotas da S100B 10 nM e 10 μ M nos tempos 24, 72, 120 e 168 horas a fim de avaliar a formação de possíveis agregados.

Agregação do peptídeo β amilóide em pH fisiológico

O peptídeo β amilóide foi dissolvido em hexafluoro-2-propanol (HFIP). O β amilóide permaneceu em HFIP durante 60 minutos em temperatura ambiente a fim de randomizar os monômeros β -amilóide. Após decorridos os 60 minutos, foi aliquoteado volume suficiente da solução de HFIP contendo o β amilóide para formação de soluções 22,15 μ M do peptídeo. Deixou-se evaporar o HFIP, formando um filme do peptídeo β -amilóide. Ao filme de β -amilóide formado, adicionou-se tampão fosfato (PBS) pH 7,4 para formação de uma solução mãe de concentração 22,15 μ M. Desta solução mãe foi retirado volume suficiente para o preparo de alíquotas contendo 5 μ M do peptídeo β amilóide, que foi submetido ao protocolo de agregação constituído de incubação a 37 °C por 48 horas. Nos tempos 12, 24 e 48 horas após a incubação foram realizadas coletas da amostra para avaliar a formação de agregados fibrilares.

Agregação do peptídeo β amilóide em pH ácido

O peptídeo β amilóide foi preparado da mesma forma como descrito no item anterior. O diferencial é que, neste protocolo, adicionou-se uma solução de HCl 10 mM para formação da solução mãe de concentração 22,15 μ M. Esta solução foi incubada a 37 °C por 24 horas, a fim de formar os agregados fibrilares. Após decorrido este tempo de incubação, foi retirado volume suficiente para o preparo de alíquotas contendo 5 μ M de fibrilas β -amilóide, cujo pH foi corrigido através da diluição com PBS, sendo novamente incubado a 37 °C por mais 48 horas. Nos tempos 12, 24 e 48 horas após a incubação foram realizadas coletas da amostra para avaliar a formação de agregados fibrilares.

Incubação das fibrilas de β amilóide com diferentes concentrações de S100B

Volume suficiente de agregados fibrilares previamente formados em pH ácido foi alíquotado e diluído em PBS (ajustando para o pH fisiológico) contendo Ca^{2+} em excesso (cerca de 0,2 mM de CaCl_2) resultando em uma concentração final de 5 μ M de agregado fibrilar. À esses agregados fibrilares foram adicionadas diferentes concentrações de S100B, sendo as concentrações finais da proteína 5 nM, 50 nM, 500 nM e 5 μ M. Essas alíquotas contendo 5 μ M de agregado fibrilar, adicionadas das diferentes concentrações de S100B, foram incubadas a 37 °C por 48 horas. Após incubação, foram realizadas coletas nos tempos 12, 24 e 48 horas, a fim de avaliar a desagregação dos agregados previamente formados.

Para a análise da intensidade de fluorescência após incubação com as diferentes concentrações de S100B nos diferentes tempos pré-estabelecidos (12, 24 e 48 horas), considerou-se 100% a intensidade de fluorescência produzida pelas fibrilas de β amiloide previamente formadas em meio ácido por 48 horas e reincubadas, por mais 48 horas, em pH fisiológico, sendo realizadas coletas para análise de fluorescência pelo método da ThT em 12, 24 e 48 horas.

Avaliação da formação de agregados pelo teste da Tioflavina T

O ensaio tem por finalidade mensurar o aumento da fluorescência da molécula da ThT quando, a mesma, se liga às fibrilas formadas. Para tal, a ThT foi diluída em PBS em uma concentração correspondente a 0,8 mg/mL sendo, posteriormente, filtrada. Esta solução é denominada solução-estoque e é armazenada ao abrigo de luz sendo, nestas condições, estável por até uma semana.

No dia do uso, a solução-estoque é diluída com PBS a fim de se obter uma solução de uso na concentração de 0,016 mg/mL. É adicionado às alíquotas contendo as amostras o volume da solução de uso correspondente à 0,8 mg de ThT. A intensidade de fluorescência é mensurada através de uma excitação com o comprimento de onda de 440 nm e absorção em comprimento de onda maior, 482 nm. Foram realizadas 10 leituras em um intervalo de tempo de 60 segundos sendo, ao final, realizado uma média das fluorescências obtidas em cada leitura (25).

Microscopia eletrônica de transmissão

Uma solução estoque de acetato de uranila na concentração de 2% foi previamente preparada, sendo essa solução estável por várias semanas. Cerca de 10 μ L das amostras foram adicionados no *grid* e o excesso de líquido é removido com o auxílio de um papel filtro. Após, adicionou-se aproximadamente o mesmo volume de acetato de uranila ao *grid* no qual foi adicionado a amostra anteriormente, removendo o excesso de líquido e deixando secar em temperatura ambiente por aproximadamente 3 dias (25).

Os *grids* foram analisados através de um microscópio eletrônico de transmissão. O escaneamento das amostras iniciou-se em uma baixa magnificação (10-12,000 x) para obter-se uma ideia da composição geral das mesmas. Após identificado uma estrutura de interesse, a fim de observar-se a mesma com maiores detalhes, aumentou-se a magnificação.

Análise estatística

Os dados obtidos foram avaliados estatisticamente através do auxílio do software GraphPad Prism 6 e estão representados como média \pm erro padrão. Os testes estatísticos utilizados foram teste t de *student* e análise de variância de uma ou duas vias (ANOVA) seguido de pós teste de Tukey.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ao Departamento de Bioquímica da mesma e a todos os colegas de laboratório que auxiliaram na realização deste trabalho.

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram não ter conflitos de interesse.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Bárbara Carolina Federhen, Krista Minéia Wartchow e Letícia Rodrigues conduziram os experimentos e escreveram o manuscrito. Carlos Alberto Gonçalves orientou a realização do trabalho e corrigiu o manuscrito.

REFERÊNCIAS

1. Abbott, A., and Wimo, A. As the number of Alzheimer's cases rises rapidly in an ageing global population, the need to understand this puzzling disease is growing.
2. Müller-Hill, B., and Beyreuther, K. (1989) Molecular Biology of Alzheimer's Disease. *Annual Review of Biochemistry*. **58**, 287–307
3. Hardy, J. A., and Higgins, G. A. (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*. [online]
<https://link.galegroup.com/apps/doc/A12207965/HRCA?sid=Ims> (Accessed December 5, 2019)
4. Chow, V. W., Mattson, M. P., Wong, P. C., and Gleichmann, M. (2010) An Overview of APP Processing Enzymes and Products. *Neuromol Med*. **12**, 1–12
5. Sengupta, U., Nilson, A. N., and Kaye, R. (2016) The Role of Amyloid- β Oligomers in Toxicity, Propagation, and Immunotherapy. *EBioMedicine*. **6**, 42–49
6. Nedergaard, M., Ransom, B., and Goldman, S. A. (2003) New roles for astrocytes: Redefining the functional architecture of the brain. *Trends in Neurosciences*. **26**, 523–530
7. Bélanger, M., Allaman, I., and Magistretti, P. J. (2011) Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metab*. **14**, 724–738
8. Li, K., Li, J., Zheng, J., and Qin, S. (2019) Reactive Astrocytes in Neurodegenerative Diseases. *Aging and disease*. **10**, 664
9. Farina, C., Aloisi, F., and Meinl, E. (2007) Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol*. **28**, 138–145
10. Gifford, J. L., Walsh, M. P., and Vogel, H. J. (2007) Structures and metal-ion-binding properties of the Ca²⁺-binding helix–loop–helix EF-hand motifs. *Biochemical Journal*. **405**, 199–221
11. Barger, S. W., Wolchok, S. R., and Van Eldik, L. J. (1992) Disulfide-linked S100 beta dimers and signal transduction. *Biochim. Biophys. Acta*. **1160**, 105–112
12. Donato, R., Sorci, G., Riuzzi, F., Arcuri, C., Bianchi, R., Brozzi, F., Tubaro, C., and Giambanco, I. (2009) S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim. Biophys. Acta*. **1793**, 1008–1022
13. Hofmann, M. A., Drury, S., Fu, C., Qu, W., Taguchi, A., Lu, Y., Avila, C., Kambham, N., Bierhaus, A., Nawroth, P., Neurath, M. F., Slattery, T., Beach, D., McClary, J., Nagashima, M., Morser, J., Stern, D., and Schmidt, A. M. (1999) RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell*. **97**, 889–901
14. Ramasamy, R., Vannucci, S. J., Yan, S. S. D., Herold, K., Yan, S. F., and Schmidt, A. M. (2005) Advanced glycation end products and RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration, and inflammation. *Glycobiology*. **15**, 16R–28R
15. Ostendorp, T., Leclerc, E., Galichet, A., Koch, M., Demling, N., Weigle, B., Heizmann, C. W., Kroneck, P. M. H., and Fritz, G. (2007) Structural and functional insights into RAGE activation by multimeric S100B. *EMBO J*. **26**, 3868–3878
16. Carvalho, S. B., Botelho, H. M., Leal, S. S., Cardoso, I., Fritz, G., and Gomes, C. M. (2013) Intrinsically Disordered and Aggregation Prone Regions Underlie β -Aggregation in S100 Proteins. *PLoS ONE*. **8**, e76629
17. Cristóvão, J. S., Morris, V. K., Cardoso, I., Leal, S. S., Martínez, J., Botelho, H. M., Göbl, C., David, R., Kierdorf, K., Alemi, M., Madl, T., Fritz, G., Reif, B., and Gomes, C. M. (2018) The neuronal S100B protein is a calcium-tuned suppressor of amyloid- β aggregation. *SCIENCE ADVANCES*

18. Rothermundt, M., Missler, U., Arolt, V., Peters, M., Leadbeater, J., Wiesmann, M., Rudolf, S., Wandinger, K. P., and Kirchner, H. (2001) Increased S100B blood levels in unmedicated and treated schizophrenic patients are correlated with negative symptomatology. *Mol Psychiatry*. **6**, 445–449
19. Peskind, E. R., Griffin, W. S. T., Akama, K. T., Raskind, M. A., and Van Eldik, L. J. (2001) Cerebrospinal fluid S100B is elevated in the earlier stages of Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*. **39**, 409–413
20. Chaves, M. L., Camozzato, A. L., Ferreira, E. D., Piazenski, I., Kochhann, R., Dall'Igna, O., Mazzini, G. S., Souza, D. O., and Portela, L. V. (2010) Serum levels of S100B and NSE proteins in Alzheimer's disease patients. *J Neuroinflammation*. **7**, 6
21. Michetti, F., D'Ambrosi, N., Toesca, A., Puglisi, M. A., Serrano, A., Marchese, E., Corvino, V., and Geloso, M. C. (2019) The S100B story: from biomarker to active factor in neural injury. *J. Neurochem*. **148**, 168–187
22. Van Eldik, L. J., and Zimmer, D. B. (1988) Mechanisms of Action of the S100 Family of Calcium Modulated Proteins. in *Calcium and Calcium Binding Proteins* (Gerday, C., Bolis, L., and Gilles, R. eds), pp. 114–127, Proceedings in Life Sciences, Springer, Berlin, Heidelberg, 10.1007/978-3-642-73042-9_9
23. Kaye, R., and Lasagna-Reeves, C. A. (2013) Molecular mechanisms of amyloid oligomers toxicity. *J. Alzheimers Dis*. **33 Suppl 1**, S67-78
24. Christl, J., Verhülndonk, S., Pessanha, F., Menge, T., Seitz, R. J., Kujovic, M., Höft, B., Supprian, T., and Lange-Asschenfeldt, C. (2019) Association of Cerebrospinal Fluid S100B Protein with Core Biomarkers and Cognitive Deficits in Prodromal and Mild Alzheimer's Disease. *JAD*. 10.3233/JAD-190550
25. Nilsson, M. (2004) Techniques to study amyloid fibril formation in vitro. *Methods*. **34**, 151–160

Anexo – Instruções para publicação de trabalho

Title

Should be intelligible to JBC readers who are not specialists in the field and should convey your essential points clearly.

Should be short (no more than 150 characters including spaces) and informative.

Should use sentence case (i.e., “Here is my scientific study” rather than “Here is My Scientific Study”).

NEW: Acronyms or abbreviations may be used without definition in the title, but authors should strive to limit abbreviations for clarity. Any abbreviations that do not appear on this list of common terms should be defined at first usage in the abstract or main text.

Authors

Should include the complete names of all authors and affiliations where the work was performed (for those authors who have since moved, please indicate their present address as a separate note).

Should include all affiliations for authors in the manuscript PDF with the understanding that JBC publishes one affiliation per author in its early version Papers in Press (PiP) HTML metadata and PubMed displays. Affiliations will appear online as provided on the manuscript PDF when the article is published in its final form.

Should identify which author will receive correspondence regarding the manuscript and include this author’s telephone number and current e-mail address.

Co-corresponding and/or co-equal authorship is not recognized in JBC’s early version, Papers in Press. If authors are listed as such on the manuscript PDF and Word file, the proof pages will show these designations and the information will appear online correctly when the article is published in its final form.

Can include non-Latin characters for author names, as long as the characters can be encoded in Unicode (e.g., Chinese, Japanese, Korean, Arabic). These characters can only be used for author names, not author affiliations or titles. Non-Latin characters should be enclosed in parentheses after the transliterated version (see example below).

Keywords

Should include at least five keywords from this list. May also include keywords that are not on the list, up to ten keywords in total.

Abstract

Should describe the background, methods used, central findings, and conclusions drawn in the manuscript.

Should avoid specialized terms and abbreviations as much as possible. Abbreviations not on the abbreviations page should be spelled out upon first usage.

Should be no more than 250 words.

References to other papers (as reference numbers or full citations) are not allowed.

Introduction

Should present the purpose of the study and its relationship to earlier work in the field; it is not meant to be an extensive review of the literature.

Results

Should describe the data collected.

Any chemical equations, structural formulas or mathematical equations should be placed between successive lines of text.

Discussion

Should focus on the interpretation of the results rather than repeating information from the Results section.

Experimental procedures

Should describe the overall experimental design briefly but with sufficient information to permit a qualified reader to repeat the experiments; truly new procedures should be described in detail.

Previously published procedures should be referenced, and modifications given in detail where necessary to repeat the work.

If the study characterizes the activity of new compounds, compound structures and the protocol for obtaining the compound must be provided.

Must include all relevant information regarding data collection and analysis (sample sizes, quantification methods, etc.). Learn more about the types of information that are needed here.

If the manuscript includes human or animal studies, authors must include a statement in the Experimental Procedures that the studies were approved and by which review board. For human subjects, authors must further state that the studies abide by the Declaration of Helsinki principles. Authors who are providing any identifying information about a human subject must complete this consent form and upload it as additional Supporting Information for review only. Learn more about what counts as identifying information and who can consent here.

NEW: When an experimental procedure described in a manuscript would benefit from a step-by-step protocol, JBC encourages authors to submit detailed protocols for peer review and publication in Bio-protocol or to deposit them at protocols.io.

Acknowledgments

Corresponding authors of NIH-supported papers must include this disclaimer in a footnote after the conflict of interest statement:

“The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the National Institutes of Health.”

Should include database names and accession codes if applicable; see below.

Can include any brief note(s) of thanks to people who helped with the study.

Conflict of interest

Must include a statement disclosing whether there are any actual or perceived conflicts of interest on the part of any author, as described in JBC’s editorial policies.

If there are no conflicts of interest for any author, the following statement should be inserted:

“The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.”

Author contributions

Note change: An explicit statement describing each author’s contributions to the manuscript is no longer required in the manuscript document; this information is collected

during the submission process following CRediT taxonomy. JBC's policies related to authorship criteria can be found here.

References

The example formats provided below should be followed.

References should be cited by number only and in order of appearance.

DOIs should be added for any articles that do not have designated volume and page numbers (such as JBC's Papers in Press; see example 3).

Accession numbers for previously deposited/published data should be provided in the main text.

Preprints may be cited in the reference list of the article (see example 5).

Examples:

1. Back, C. R., Sztukowska, M. N., Till, M., Lamont, R. J., Jenkinson, H. F., Nobbs, A. H., and Race, P. R. (2017) The *Streptococcus gordonii* adhesin CshA protein binds host fibronectin via a catch-clamp mechanism. *J. Biol. Chem.* 292, 1538-1549
2. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
3. Carden, T., Singh, B., Mooga, V., Bajpai, P., and Singh, K.K. (October 24, 2017) Epigenetic modification of miR-663 controls mitochondria-to-nucleus retrograde signaling and tumor progression. *J. Biol. Chem.* 10.1074/jbc.M117.797001
4. Farrell, C. (1992) *The Role of SecB during Protein Export in Escherichia coli*. Ph.D. thesis, The Johns Hopkins University
5. Nikitina, T., Norouzi, D., Grigoryev, S. A., and Zhurkin, V. B. (2017) DNA topology in chromatin is defined by nucleosome spacing. bioRxiv 10.1101/104083

Note EndNote versions 5 and earlier do not contain the current JBC reference style with titles. The current EndNote style may be downloaded from this site and saved to your EndNote so that it replaces your existing JBC style. Find EndNote installation instructions here.

Abbreviations and nomenclature

Should be defined in the one-column paragraph Footnotes section, after References.

NEW: Abbreviations in the title do not need to be defined within the title; define them if necessary (see next) at their first appearance in the abstract or main text.

Some terms and units need not be spelled out; please review the abbreviations page and units page to learn more.

Numerical data should be reported with the number of significant digits that corresponds to the magnitude of experimental uncertainty.

Compounds: The rules and recommendations of IUPAC should be used for abbreviation of chemical names, nomenclature of chemical compounds, isotopic compounds, optically active isomers, and spectroscopic data; more information can be found here.

Enzymes: The trivial and systematic names of enzymes should be those recommended by the Nomenclature Committee of the IUBMB and not abbreviated except in terms of the substrates for which there are accepted abbreviations — e.g., ATPase and RNase.

Organisms: Nomenclature should follow the guidelines developed by the American Society for Microbiology.

Lipids: The use of the classification, nomenclature and structural representation of lipids used by the LIPID MAPS Initiative should be used whenever possible (see Fahy et al. (2005) *J. Lipid Res.* 46, 839–862 and Fahy et al. (2009) *J. Lipid Res.* 50, S9–S14). Lipid structures can be downloaded directly from the “Lipid Classification” section of the LIPID MAPS Web site or structures drawn de novo from the “Tools” section of the website, and then inserted into the manuscript.

Glycans: All figures that depict glycans using symbols for monosaccharides should follow the shapes and colors presented in the current version of the Symbol Nomenclature for Glycans (SNFG). The original citation is Varki et al. (2015) *Glycobiology* 25, 1323–1324. Additional links to nomenclature recommendations can be found [here](#).

Unpublished observations and personal communications

Must be cited using footnotes.

Written approval for all personal communications, exactly as written in the text, should be available upon request.

Tables

Should have an overall title and each column within the table must have a heading.

Should contain sufficient experimental detail to be understood without reference to the text.

Abbreviations, when necessary, should be defined in the legend.

Complex tables, such as sequence alignments, should be submitted as figures. Very large tables that cannot fit on a single page should be submitted as Supporting Information in an appropriate format such as Excel.

Figures and figure legends

Legends should contain sufficient detail to make the figure easily understood.

Legends should appear underneath the figures to which they refer.

Should be numbered in the order in which they are mentioned in the text.

All symbols should be defined and all equations used to plot lines and curves should be provided.

See below for more instructions on preparing figures.

Should contain all appropriate permissions statements for reuse of content from previous publications. If you are not sure whether you need permissions for any figures, please [click here](#) for a simple guide.