

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
BIOQUÍMICA

INTERAÇÃO DA PROTEÍNA S100B COM FIBRILAS  $\beta$  AMILOIDES: POSSÍVEL  
PAPEL DESAGREGANTE DA S100B *IN VITRO*

BÁRBARA CAROLINA FEDERHEN

Porto Alegre

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
BIOQUÍMICA

INTERAÇÃO DA PROTEÍNA S100B COM FIBRILAS  $\beta$  AMILOIDES: POSSÍVEL  
PAPEL DESAGREGANTE DA S100B *IN VITRO*

BÁRBARA CAROLINA FEDERHEN

Orientador Prof. Carlos Alberto Gonçalves

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas: Bioquímica, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como  
requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre

2022

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos meus colegas de laboratório, em especial, à Krista e Letícia por me auxiliarem na condução de todas as etapas deste trabalho.

Agradeço ao meu orientador, Carlos Alberto, por ter me proporcionado toda a estrutura do laboratório para a execução desta pesquisa.

Aos meus familiares e namorado, por me apoiarem nesta etapa tão importante.

## SUMÁRIO

PARTE I.....	5
RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
INTRODUÇÃO.....	9
1. Demência.....	9
1.1 Doença de Alzheimer.....	11
2. Amiloidose.....	11
2.1 Envolvimento do peptídeo $\beta$ -amiloide na Doença de Alzheimer.....	11
2.2 Ensaio da Tioflavina (ThT) para detecção de fibrilas amiloides.....	13
3. Astrócitos.....	14
3.1 S100B.....	15
3.2 Interação da S100B com o peptídeo $\beta$ -amiloide.....	15
OBJETIVOS.....	17
Objetivo geral.....	17
Objetivos específicos.....	17
PARTE II.....	18
PARTE III.....	41
DISCUSSÃO.....	42
1. Resumo dos resultados.....	42
1.1 Intensidade de fluorescência obtida após incubação por 12 horas de fibrilas de $\beta$ amiloide com diferentes concentrações de S100B.....	42
1.2 Intensidade de fluorescência obtida após incubação por 24 horas de fibrilas de $\beta$ amiloide com diferentes concentrações de S100B.....	42
1.3 Intensidade de fluorescência obtida após incubação por 48 horas de fibrilas de $\beta$ amiloide com diferentes concentrações de S100B.....	44
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	45
LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	48
REFERÊNCIAS.....	50

## PARTE I

## RESUMO

A doença de Alzheimer é o tipo de demência com a maior prevalência na população idosa, afetando drasticamente a memória e a autonomia dos indivíduos acometidos. Patológica e bioquimicamente, a doença é identificada através da presença de emaranhados neurofibrilares e o depósito extracelular de placas insolúveis, compostas por fibrilas provenientes da polimerização do peptídeo  $\beta$  amiloide. Muitos marcadores astrogliais estão alterados na doença e podem contribuir no metabolismo  $\beta$  amiloide. Dados sugerem a interação da S100B, uma proteína produzida e secretada por astrócitos, com o peptídeo  $\beta$  amiloide. A fim de estudar essa possível interação entre ambos, conduzimos experimentos a fim de avaliar se a S100B teria a capacidade de desagregar/despolimerizar as fibrilas  $\beta$  amiloide previamente formadas *in vitro*, visto que se observa a proteína co-localizada com as placas amiloides. Avaliamos concentrações baixas, na ordem de nM, e concentrações elevadas, na ordem de  $\mu$ M, de S100B a fim de identificar se o papel trófico e tóxico atribuídos a essas ordens de concentrações poderia estar relacionado a capacidade da mesma de desagregar/despolimerizar as fibrilas presentes. Como resultado, identificamos que essa característica é dependente, além da concentração de S100B, do tempo de incubação com as fibrilas, sendo que a concentração de 5 nM de S100B demonstrou manter essa propriedade por mais tempo inalterada.

## ABSTRACT

Alzheimer's disease is the most prevalent type of dementia in the elderly population, drastically affecting memory and the autonomy of those individuals. Morphopathologically and biochemically, the disease is identified through the presence of neurofibrillary tangles and the extracellular deposition of fibrillary plaques, composed of fibrils resulting from the polymerization of the  $\beta$  amyloid peptide. Another marker used for the investigation of the disease is S100B protein, mostly from astrocytic origin and found elevated progressively in the disease course. Evidence suggests the interaction between S100B and  $\beta$  amyloid peptide. In order to evaluate this possible interaction, experiments were carried out to assess whether S100B would have the ability to disaggregate/depolymerize pre-formed amyloid  $\beta$  fibrils, once S100B protein is shown co-localized with senile plaques in studies *in vivo* and post mortem. Hence, we evaluate from a low range concentration to a higher order (throphic: nM; toxic:  $\mu$ m) values corresponding to a disaggregator/ depolymerizer role. As result, we identified that this feature is dependent on S100B concentration and incubation time with ab fibrils, in which the concentration of 5 nM of S100B exerted this property for a longer time.

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\beta$ A, Peptídeo  $\beta$ -amilóide

BHE, Barreira hematoencefálica

DA, Doença de Alzheimer

GFAP, Proteína Glial Fibrilar Ácida

MET, Microscopia eletrônica de transmissão

RAGE, Receptor de ligação de produtos de glicação avançada

SNC, Sistema nervoso central

## INTRODUÇÃO

### 1. Demência

Demência, uma das condições de saúde mais onerosas, pode ser conceituada como deficiência cognitiva ou declínio cognitivo que compromete a independência de um indivíduo (1) acompanhada de distúrbios no humor, comportamento e personalidade (2). Tais sintomas são consequência de uma disfunção crônica e/ou progressiva das funções corticais e subcorticais (2). Estima-se que a cada 4 segundos um novo caso de demência é diagnosticado, resultando em aproximadamente 7,7 milhões de casos por ano no mundo (3).

A demência é um dos achados clínicos de diversas doenças neurodegenerativas (4), sendo a doença de Alzheimer (DA) a condição na qual a demência mais frequentemente se manifesta, correspondendo a cerca de 50-70% dos casos (5). Além da DA, outras doenças neurodegenerativas também são caracterizadas por declínio cognitivo, sendo a demência frontotemporal o segundo maior diagnóstico (6).

Devido ao caráter incapacitante das demências, a projeção de custos para o ano de 2050 relacionados à terapia medicamentosa e ao manejo dos pacientes acometidos corresponde a cerca de 1,1 trilhão de dólares (7). Tal projeção demonstra a urgência na compreensão da fisiopatologia da doença a fim de contribuir para o desenvolvimento de alternativas terapêuticas, acarretando em um aumento da qualidade de vida dos pacientes acometidos e contribuindo na diminuição dos custos envolvidos no cuidado dos acometidos.

#### 1.1 Doença de Alzheimer

A DA, forma mais comum de manifestação das demências, pode ser classificada genericamente em dois tipos. A DA pode ser familiar (tipo I), na qual se identificam mutações em genes específicos como, por exemplo, no gene responsável pela tradução da proteína precursora amiloide (APP) e no gene que

traduz a proteína presenilina (PSEN1/2), sendo uma doença de instalação precoce (8) (9). Também pode ser classificada como esporádica (tipo II), sendo uma doença de instalação tardia e na qual se observa a influência de múltiplos fatores relacionados ao estilo de vida como, por exemplo sedentarismo, utilização excessiva de álcool, tabagismo, além de distúrbios metabólicos como hipercolesterolemia, alelo  $\epsilon$  da apolipoproteína E, obesidade e diabetes mellitus (9) (10).

Fatores genéticos vêm sendo relacionados com o desenvolvimento da DA, principalmente alterações em alguns genes que codificam proteínas chaves no metabolismo do peptídeo  $\beta$  amiloide, sendo os mais consistentes marcadores da doença o gene codificador da APP e da PSEN1 e PSEN2. Fatores ambientais acrescidos de alterações nesses genes parecem ser responsáveis pelo desenvolvimento e progressão da DA, caracterizando a doença como multifatorial e, cujas manifestações em pacientes, possuem diferentes graus de severidade (11). Outra alteração genética importante para o desenvolvimento da DA são as mutações no gene codificador do receptor de disparo presente em células mielóides (TREM2), achado que acarreta em um maior risco para desenvolvimento da patologia (12).

Patofisiologicamente, a doença é marcada por uma extensa perda neuronal e reatividade glial intensa (13) (14), possuindo como marcas fisiopatológicas os emaranhados neurofibrilares intraneuronais, formados a partir da hiperfosforilação da proteína tau, relacionada com a estabilização dos microtúbulos (15) e as placas senis, formadas a partir do depósito do peptídeo  $\beta$  amiloide insolúvel no meio extracelular (16).

A teoria da cascata amiloide postula que, as placas compostas pelas unidades monoméricas e oligoméricas de  $\beta$  amiloide polimerizados são unidades tóxicas, sendo a sua deposição a primeira manifestação da doença, antes mesmo do início dos primeiros sintomas (17). As fibrilas depositadas na forma de placas amiloides desencadeiam uma cascata neurodegenerativa. Uma das alterações bioquímicas é a hiperfosforilação da proteína tau, responsável pela estabilização dos microtúbulos, alastrando essa cadeia de hiperfosforilação

para neurônios vizinhos através dos microtúbulos, o que acaba levando a morte neuronal (18). Apesar da teoria abordar com maior afinco a hipótese da toxicidade do  $\beta$  amiloide ser devido a formação das placas em si, a neurotoxicidade dos monômeros, oligômeros e fibrilas é discutida como potencialmente mais relevante na instalação da doença, sendo a placa um reservatório dessas unidades de menor tamanho molecular (19).

## 2. Amiloidose

Amiloidose é o termo utilizado para designar uma série de patologias de ocorrência rara, cuja característica em comum é o dobramento incorreto de proteínas levando a formação de agregados instáveis, predominantemente formados por estruturas secundárias do tipo  $\beta$  folha (20). A origem do termo provém da capacidade desses agregados amiloidogênicos corarem-se com uma solução de iodo, tipicamente utilizada para coloração de soluções contendo amido (21). Nos diferentes órgãos em que podem ser formados, os agregados acabam por se depositar afetando diretamente a estrutura do tecido, bem como a sua funcionalidade (22).

Os mecanismos pelos quais ocorrem a formação desses agregados e consequente depósito em diferentes tecidos ainda não é completamente elucidada. Acredita-se que um determinado estímulo, ainda desconhecido e de natureza específica para cada tipo de amiloidose, esteja envolvido na alteração da estrutura primária dessas proteínas, desestabilizando-as ou ainda alterando a concentração na qual se encontram. Essa proteína de origem instável, pode ser de natureza hereditária ou adquirida (22).

São descritas e caracterizadas cerca de 20 diferentes proteínas que estão relacionadas com a formação de fibrilas amiloides *in vivo* e, em comum, todas apresentam um estrutura  $\beta$  central (23).

### 2.1 Envolvimento do peptídeo $\beta$ -amilóide na Doença de Alzheimer

As placas senis, clássicos biomarcadores da DA, são constituídas majoritariamente pelo acúmulo do peptídeo  $\beta$  amiloide na sua forma monomérica, oligomérica e fibrilar (24). O  $\beta$ A, por sua vez, provém da clivagem errônea da proteína neuronal transmembrana precursora amiloide (APP), gerando um fragmento monomérico insolúvel. Essa clivagem se dá através da ação consecutiva das enzimas  $\beta$  e  $\gamma$  secretase, liberando para o meio extracelular o peptídeo  $\beta$  amiloide que se polimeriza com outras unidades monoméricas resultando na formação de produtos insolúveis que culminam na formação da placa em si (25).

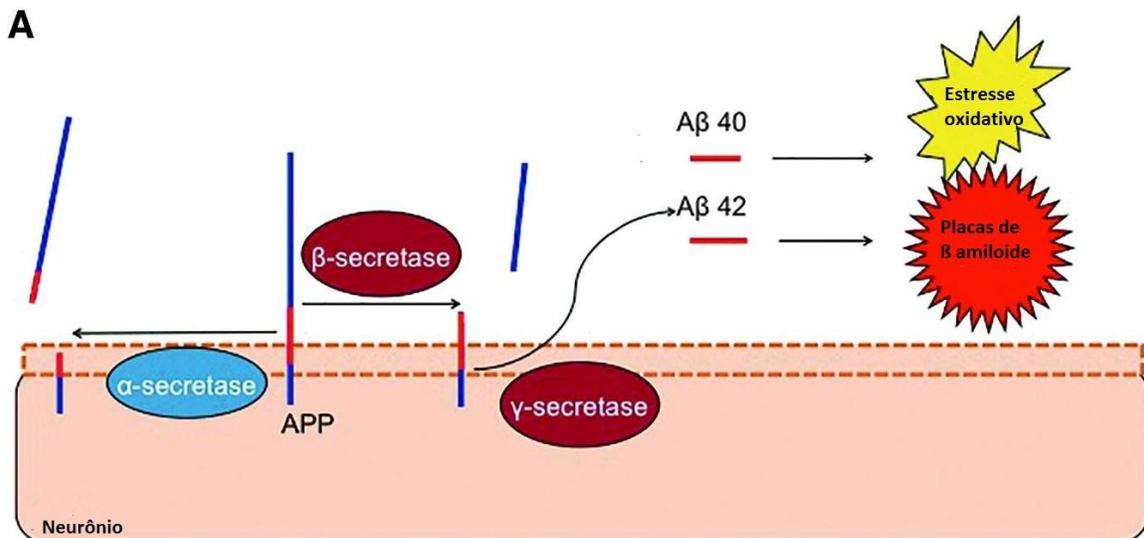


Figura 1: Mecanismo de formação do peptídeo  $\beta$ -amiloide. Adaptação de Bonet-Costa (26).

A perda de memória e disfunção cognitiva associada a doença é relacionada à deposição dessas placas insolúveis no espaço extracelular, causando uma ruptura na transmissão de sinais entre neurônios saudáveis (27). Desta forma, progressivamente, ocorre uma perda de funções cerebrais e um dano ao sistema nervoso central (SNC). Além da interrupção da transmissão sináptica, a placa exerce um papel crucial no processo de neuroinflamação, acarretando na sobreposição de mais um dano nas células adjacentes (28).

## 2.2 Ensaio da Tioflavina (ThT) para detecção de fibrilas amiloides

Atualmente, a técnica mais empregada para a identificação, quantificação e monitorização da cinética das fibrilas amiloides *in vitro* é o ensaio que se utiliza da característica fluorescente intrínseca da ThT. A técnica se baseia na capacidade da molécula de emitir fluorescência fortemente quando em contato com agregados ricos em folhas  $\beta$ . Os comprimentos de onda de excitação e emissão são, respectivamente, 440 nm e 490 nm. Por outro lado, quando em solução aquosa, a molécula demonstra uma fraca fluorescência. Desta maneira, baseando-se na diferença de fluorescência detectada quando a molécula está adicionada a amostras ricas em folhas  $\beta$ , é possível identificar e quantificar o teor de fibrilas presentes nas amostras (30).

O mecanismo pelo qual a ThT interage com as fibrilas e altera a intensidade de fluorescência emitida ainda não é totalmente compreendido. Entretanto, as hipóteses mais bem aceitas discutem que a provável interação entre a molécula e as fibrilas se dá através da intercalação das moléculas de ThT dentro de sulcos entre as cadeias laterais das fibrilas amiloides (30). Desta forma, o grande aumento na fluorescência de ThT resulta da imobilização seletiva de um subconjunto de conformémeros de ThT (31).

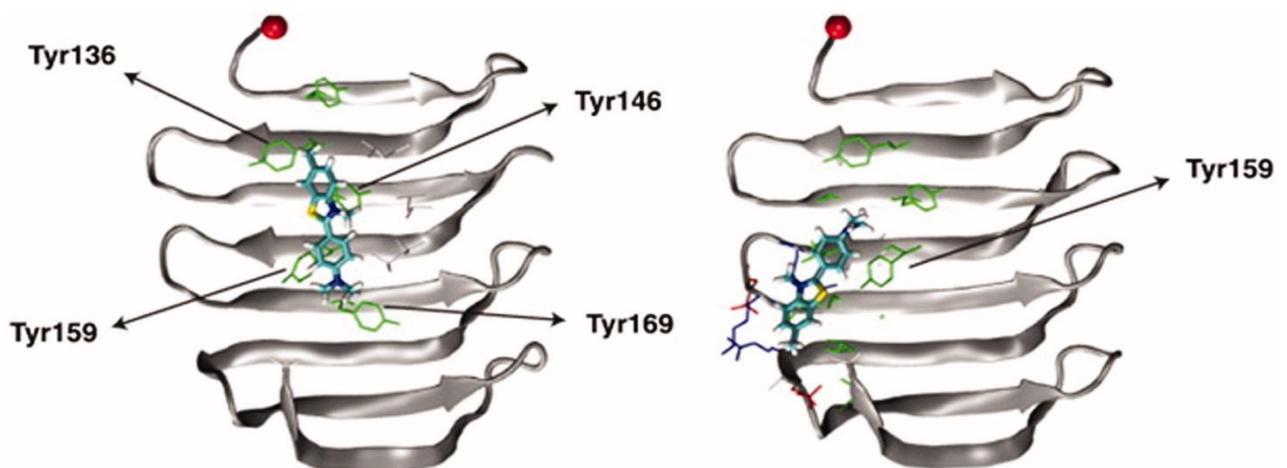


Figura 2: Representação da interação da ThT com fibrilas contendo  $\beta$  folha, adaptação de Gade Malmos (29).

### 3. Astrócitos

Os astrócitos são o tipo celular de maior abundância no SNC, assumindo diversas morfologias e sendo responsáveis por uma vasta e complexa série de funções para manutenção da homeostase cerebral (32). Dentre essas funções, podemos citar o envolvimento dos astrócitos na migração e desenvolvimento axonal de certos tipos de neuroblastos durante o desenvolvimento (33); regulação do fluxo sanguíneo cerebral, através da interação direta do astrócito com os vasos sanguíneos (34); homeostase de íons, pH, neurotransmissores e fluídos no espaço intersticial sináptico (35), (36); atuação na transmissão sináptica, lançando para o meio sináptico moléculas ativas como, por exemplo, glutamato, purinas, GABA, caracterizando a sinapse tripartida (37), (38), (39); metabolismo energético da glicose, provendo substratos energéticos para os neurônios e atuando como repositórios de grânulos de glicogênio (40) e por fim, atuação do astrócito na formação e manutenção da barreira hematoencefálica (BHE), auxiliando que determinadas moléculas acessem o parênquima cerebral, baseado na sua polaridade e tamanho (41).

A morfologia dos astrócitos e sua localização permitem classificá-los primariamente em duas categorias: protoplasmáticos, encontrados na substância cinzenta e que possuem numerosas ramificações e os fibrosos, encontrados na substância branca e que apresentam-se como longas fibras (37). Histologicamente, esse tipo celular pode ser identificado através da marcação de uma proteína de citoesqueleto, a proteína glial fibrilar ácida (GFAP), que, juntamente com a proteína vimentina, age como principal componente do citoesqueleto astrocitário. Além das proteínas que compõem o citoesqueleto astrocitário, a S100B – proteína expressa e secretada por astrócitos – também é utilizada como marcador desse tipo celular (42).

### 3.1 S100B

O termo S100B refere-se a uma proteína cuja principal característica físico-química é sua capacidade de ser 100% solúvel em uma solução saturada de sulfato de amônio em pH neutro (43). A sua estrutura quaternária é constituída de um homodímero cujos monômeros possuem cerca de 9-14 kDa de peso molecular, sendo cada monômero estruturalmente constituído de um domínio alfa helix-loop-helix (domínio *EF-hand*) com um sítio de ligação ao íon cálcio (44). A sua distribuição celular tem sido cada vez mais investigada, sendo uma proteína expressa e secretada majoritariamente por astrócitos (45).

Esta proteína está envolvida na formação do citoesqueleto e proliferação celular, além de exercer funções parácrinas e autócrinas, tanto intra como extracelularmente (45). Dentre essas funções, podemos elencar a regulação da fosforilação proteica, dinâmica do citoesqueleto, homeostase do íon cálcio, atividade enzimática de determinadas enzimas, fatores de crescimento celular, diferenciação celular, além da participação na modulação da resposta inflamatória (46).

Apesar do mecanismo não ser completamente elucidado, sabe-se que a S100B é secretada para o meio extracelular e a mesma exerce funções aos diversos tipos presentes nesse ambiente (47). Em relação aos neurônios, classifica-se a ação da S100B como tóxica ou trófica dependendo da concentração da mesma no meio extracelular. Para concentrações elevadas, na ordem de  $\mu\text{M}$  atribui-se a S100B uma ação tóxica, ao passo que concentrações mais baixas, na ordem de nM, atribui-se a proteína uma ação trófica (48).

### 3.2 Interação da S100B com o peptídeo $\beta$ -amilóide

Em análises do tecido cerebral *post-mortem* de pacientes acometidos pela DA, evidencia-se um aumento no conteúdo da proteína S100B (49). O seu aumento é, na maior parte da literatura disponível, explicado e associado à atividade pró-inflamatória da proteína através da ativação do receptor de ligação

de produtos de glicação avançada (RAGE). Alguns autores e estudos sugerem que a S100B atua como uma alarmina ou padrão molecular associado ao dano que, por sua vez, trata-se de uma sequência molecular endógena liberada por células danificadas ou mortas, a fim de sinalizar um dano tecidual e/ou celular. Essa sinalização ativa a resposta imunológica inata e, apesar dos efeitos deletérios da S100B como alarmina, a ação da mesma também está associada a efeitos benéficos (50).

Estudos recentes vêm sugerindo que a S100B encontra-se elevada no líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes acometidos pela DA já em estados iniciais (51) (52), e interage fisicamente com o peptídeo  $\beta$  amiloide a fim de impedir a sua agregação e toxicidade induzida pela formação de estruturas oligoméricas (53). Quanto a esse comportamento da proteína discute-se a possível classificação da mesma como uma proteína com propriedades do tipo chaperona, comportamento este que pode ser, em determinadas situações, considerado benéfico à manutenção da homeostase celular. A principal função de uma chaperona é, além da identificação de proteínas com suas conformações terciárias errôneas, o auxílio no correto dobramento de proteínas, impedindo que as mesmas assumam conformações espaciais incorretas.

Além da interação física da proteína com o peptídeo  $\beta$  amiloide, a S100B demonstra possuir outras características que conferem neuroproteção como a quelação e tamponamento de metais, contribuindo para a prevenção da formação de estruturas oligoméricas e conseqüentemente agregação (54).

## OBJETIVOS

### Objetivo geral

Avaliar o efeito da proteína S100B na despolimerização de agregados de peptídeo  $\beta$  amiloide previamente formados *in vitro*.

### Objetivos específicos

Submeter os agregados de peptídeo  $\beta$  amiloide pré formados a diferentes concentrações da proteína S100B (5 nM, 50 nM, 500 nM e 5  $\mu$ M) e avaliar seus possíveis impactos na despolimerização dos agregados.

Avaliar a despolimerização após 12, 24 e 48 horas de contato da S100B com os agregados.

## PARTE II

Manuscrito com intenção de submissão ao periódico Medical Hypotheses

## PARTE III

## DISCUSSÃO

### 1. Resumo dos resultados

#### 1.1. Intensidade de fluorescência obtida após incubação por 12 horas de fibrilas de $\beta$ amiloide com diferentes concentrações de S100B:

Concentração de S100B	Detecção de fluorescência através do teste da tioflavina (ThT)
Todas (5 nM, 50 nM, 500 nM, 5 $\mu$ M)	Diminuída

Através do experimento conduzido, pôde-se evidenciar uma diminuição na detecção da intensidade de fluorescência emitida pela molécula de ThT. A fluorescência emitida pela molécula se dá, pois a mesma possui a capacidade de se intercalar entre folhas  $\beta$ , mudando sua conformação espacial o que atribui a ThT a característica fluorescente. A diminuição da intensidade de fluorescência, indiretamente, indica uma diminuição no conteúdo de folhas  $\beta$  presentes no tubo de ensaio.

As 4 concentrações analisadas, 5, 50, 500 nM e 5  $\mu$ M de S100B acarretaram em uma diminuição na intensidade de fluorescência após 12 horas de incubação com as fibrilas  $\beta$  amiloide previamente formadas. Esse resultado indica a possível desagregação e/ou despolimerização das fibrilas previamente formadas na presença da proteína S100B.

#### 1.2. Intensidade de fluorescência obtida após incubação por 24 horas de fibrilas de $\beta$ amiloide com diferentes concentrações de S100B:

Concentração de S100B	Detecção de fluorescência através do teste da ThT
5 nM	Diminuída

50 nM	Sem diferença estatística
500 nM	Aumentada
5 $\mu$ M	Aumentada

A S100B na concentração de 5 nM aparenta preservar a capacidade em diminuir a intensidade de fluorescência emitida pela ThT no tempo de 24 horas, ao passo que, as demais concentrações perdem essa capacidade. Após transcorrido esse tempo de incubação, as concentrações de 500 nM e 5  $\mu$ M de S100B acarretam em uma maior detecção da fluorescência, indicando de uma forma indireta, o aumento no conteúdo de fibrilas presentes no tubo de ensaio.

Paralelamente, conduzimos um ensaio para avaliar a capacidade da S100B se agregar e formar  $\beta$  folhas, passíveis de identificação pelo teste da ThT. Utilizamos S100B nas concentrações de 10 nM e 10  $\mu$ M e detectamos uma formação de agregados em 120 horas de incubação para a concentração de 10 $\mu$ M, enquanto que para a concentração de 10 nM esses agregados foram detectados apenas após 168 horas de incubação, conforme figura 3. Desta forma, o aumento da detecção dos agregados nas condições em que a S100B estava presente nas concentrações de 500 nM e 5  $\mu$ M dificilmente será atribuída a uma polimerização da proteína.

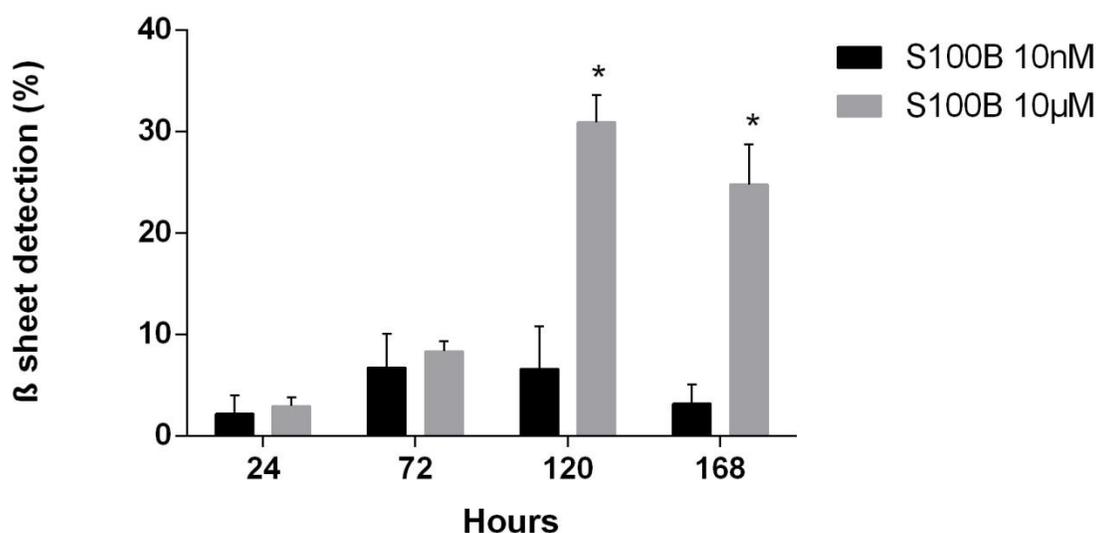


Figura 3: Detecção da agregação da S100B em diferentes concentrações (nM e µM) pela ThT em função do tempo.

1.3. Intensidade de fluorescência obtida após incubação por 48 horas de fibrilas de β amiloide com diferentes concentrações de S100B:

Concentração de S100B	Detecção de fluorescência através do teste da ThT
5 nM	Diminuída
50 nM	Sem diferença estatística
500 nM	Sem diferença estatística
5 µM	Sem diferença estatística

Após 48 horas de incubação, a concentração de 5 nM ainda mantém preservada essa função, enquanto que as demais concentrações não demonstraram diferença estatística quando comparadas ao basal. Essa perda de funcionalidade pode estar relacionada à degradação dos componentes, visto que os mesmos estão submetidos a um tempo de ensaio prolongado em um ambiente com temperatura elevada.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como já evidenciado e discutido por outros autores, a S100B encontra-se presente em níveis alterados em determinadas condições neurodegenerativas como, por exemplo, a DA (55) (56). A presença da proteína nessas condições reforça a necessidade de compreender com maior clareza a função da mesma nesse ambiente patológico, a fim de elucidar lacunas no mecanismo de instalação da doença, bem como traçar novos alvos terapêuticos. Classicamente, a literatura atribui a S100B um comportamento dualístico baseado nas concentrações extracelulares da mesma. Em concentrações elevadas, na ordem de  $\mu\text{M}$  é atribuído a mesma um efeito tóxico, ao passo que em baixas concentrações, na ordem de  $\text{nM}$ , espera-se que a mesma exerça um efeito trófico (48). Entretanto, outras abordagens para explicar e melhor compreender o envolvimento da S100B na progressão da DA vem sendo exploradas, como a comportamento *chaperona-like* da proteína: sendo a mesma capaz de identificar estruturas compostas pelo peptídeo  $\beta$ -amiloide e degradando-as (53).

Para melhor compreender essa possível função de chaperona, conduzimos experimentos a fim de evidenciar a possível interação entre a proteína e estruturas fibrilares de  $\beta$ -amiloide, previamente formadas no nosso laboratório através de metodologia validada. Utilizamos concentrações de S100B escalonadas, desta forma foi possível submeter as fibrilas às concentrações ditas na literatura clássica como tóxicas e tróficas, bem como concentrações intermediárias, para, desta forma, identificar se as diferentes escalas de concentrações e suas respectivas ações poderiam estar relacionadas com o comportamento de chaperona. Desta forma, através de um olhar diferenciado para a possível ação da proteína nesse ambiente, buscamos novas formas de explicar e compreender essa diferença de ação dependente da concentração de S100B no meio extracelular.

As fibrilas obtidas para a condução do experimento foram visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET), conforme figura 4, e as

concentrações escalonadas de S100B foram de 5, 50, 500 nM e 5  $\mu$ M. Após 12 horas de incubação das fibrilas com as diferentes concentrações de S100B, verificamos que em todas as situações houve uma diminuição drástica da intensidade de fluorescência detectada, indicando que houve uma redução no conteúdo de estruturas fibrilares presentes no meio. A menor concentração de S100B, 5 nM, preservou essa característica nos outros dois intervalos de tempo analisados: 24 e 48 horas após a incubação.

As maiores concentrações de S100B, cuja literatura atribui a um papel tóxico, resultaram em uma detecção aumentada da fluorescência emitida pela ThT após 24 horas de incubação. Indiretamente, é possível evidenciar que houve um aumento na formação de fibrilas. Entretanto, por se tratar de um ensaio inespecífico, não há como diferenciar se as fibrilas formadas são provenientes da agregação de monômeros e/ou oligômeros presentes no meio reacional ou se, estimulado pelo ambiente concentrado em moléculas, a própria S100B foi capaz de formar estruturas detectáveis pelo ensaio. Já há dados disponíveis que discutem a possibilidade da família de proteínas S100, incluindo a própria S100B, possuírem em sua estrutura regiões com propensão à agregação (57).

Após 48 horas de incubação, o comportamento anteriormente evidenciado de aumento da intensidade de fluorescência após incubação com as concentrações de 500nM e 5 $\mu$ M não se repetiu. Por se tratar de um ambiente rico em moléculas e, conseqüentemente, com maior número de colisões entre as mesmas, essa diferença estatística não encontrada poderia estar relacionada com a degradação da proteína e de todo o sistema em si. Uma maior investigação a respeito da estabilidade do experimento deverá, futuramente, ser elaborada, a fim de validar o tempo máximo para condução de estudos dessa natureza.

Dados evidenciando o papel da S100B na identificação de estruturas oligoméricas de  $\beta$  amiloide e interferindo em etapas de agregação do mesmo estão disponíveis e vem cada vez mais sendo explorados (58). Entretanto, ainda há pouco entendimento da ação *chaperona-like* da mesma frente a estruturas

fibrilares previamente formadas e a possível degradação das mesmas. Compreender esse mecanismo é de extrema importância, não apenas para elucidar a cascata de reações que culminam no depósito da placa amiloide em si, mas também a fim de disponibilizar novos alvos moleculares para que, futuramente, seja possível usar de novas estratégias terapêuticas para o tratamento da DA.

O ponto de vista levantado com esse estudo é de que, a atuação da S100B como chaperona vai além da prevenção de agregação; a proteína é capaz de reconhecer estruturas malformadas e contribuir com a sua degradação/despolimerização. Ainda é necessária uma maior investigação a respeito de como esse processo ocorre, se as estruturas fibrilas são degradadas em fragmentos desconhecidos ou se ocorre uma despolimerização dessas fibrilas e conseqüente lançamento de estruturas monoméricas e/ou oligoméricas para o meio extracelular.

## LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Compreendemos que, por se tratar de um estudo *in vitro* utilizando-se de compostos isolados, diversos componentes presentes no ambiente biológico estão ausentes e, conseqüentemente, deve-se haver muita cautela ao translacionar as observações obtidas para um ambiente biológico complexo. Entendemos que, para maior compreensão do fenômeno, bem como suas implicações e mecanismos de instalação, é necessário conduzir experimentos semelhantes fazendo uso de diferentes modelos, seja cultura celular e, futuramente, simulação dessas condições *in vivo*. Esse comportamento pode ou não ser identificado em um organismo vivo e, caso o comportamento se repita, ainda é necessário maiores investigações a respeito do significado do mesmo. Além de que, as concentrações utilizadas dificilmente serão encontradas em organismos vivos, a não ser em microambientes. O presente trabalho visa reforçar uma nova função atribuída a proteína e discutir o impacto dessa mesma função na progressão e instalação da DA, levando em consideração que a elucidação de mais um mecanismo pode ser uma aliada no possível desenvolvimento de terapias.

Ainda, para ser possível reforçar com maior convicção que a diminuição da detecção de fibrilas é devido a ação da S100B, é importante conduzir o experimento sob as mesmas condições metodológicas com diferentes proteínas. Dessa forma, podemos inferir que a ação de despolimerização é, de fato, causado pela ação da S100B e não um efeito que ocorreria independentemente da proteína adicionada ao meio.

Ainda, também seria interessante adicionar metodologias capazes de identificar o produto da despolimerização das fibrilas  $\beta$  amiloides, sua sequência molecular e classificação química. Desta forma, a discussão a respeito do possível efeito de tais fragmentos em um ambiente biológico tornar-se-ia mais plausível. Afinal, dependendo da natureza química de tais fragmentos, pode-se identificar as possíveis reações entre os fragmentos supostamente gerados e demais macro e micromoléculas presentes no meio biológico. Além de identificar

a estrutura desses fragmentos, seria interessante monitorar se a perda da capacidade da S100B em concentrações superiores (500 nM e 5  $\mu$ M) em aumentar a detecção de fibrilas em 48 horas se dá em função de uma possível degradação proteica e degradação das fibrilas. Essa confirmação seria possível através da identificação da estrutura química dos compostos no meio reacional. Caso essa perda de função se desse devido a uma degradação, as condições reacionais deveriam ser reavaliadas, a fim de garantir o mesmo ambiente a todos os tubos contendo as diferentes concentrações de S100B.

Para melhor compreender e discutir essa funcionalidade da proteína são necessários muitos dados, inclusive simulações de bioinformática. O campo é muito vasto e pouco explorado, até então. Surge na academia uma necessidade de compreender mais afundo a química por traz da geração das fibrilas  $\beta$  amiloide e sua possível despolimerização, pois, desta forma, determinados comportamentos químicos podem ser, mais facilmente, presumidos.

## REFERÊNCIAS

1. Sacuiu SF. Dementias. *Handb Clin Neurol*. 2016;138:123–51.
2. Ritchie K, Lovestone S. The dementias. *Lancet*. 30 de novembro de 2002;360(9347):1759–66.
3. Duthy B. Background Paper 6.11 Alzheimer Disease and other Dementias. *Background Paper*. 2004;74.
4. Rademakers R, Rovelet-Lecrux A. Recent insights into the molecular genetics of dementia. *Trends Neurosci*. agosto de 2009;32(8):451–61.
5. Breteler MM, Claus JJ, van Duijn CM, Launer LJ, Hofman A. Epidemiology of Alzheimer's disease. *Epidemiol Rev*. 1992;14:59–82.
6. Graff-Radford NR, Woodruff BK. Frontotemporal Dementia. *Semin Neurol*. fevereiro de 2007;27(1):48–57.
7. 2021 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*. março de 2021;17(3):327–406.
8. Qiu C, De Ronchi D, Fratiglioni L. The epidemiology of the dementias: an update. *Curr Opin Psychiatry*. julho de 2007;20(4):380–5.
9. Armstrong R. Risk factors for Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol*. 2019;57(2):87–105.
10. de la Monte SM, Longato L, Tong M, Wands JR. Insulin resistance and neurodegeneration: roles of obesity, type 2 diabetes mellitus and non-alcoholic steatohepatitis. *Curr Opin Investig Drugs*. outubro de 2009;10(10):1049–60.
11. Breijyeh Z, Karaman R. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules*. 8 de dezembro de 2020;25(24):E5789.
12. Fenoglio C, Scarpini E, Serpente M, Galimberti D. Role of Genetics and Epigenetics in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease and Frontotemporal Dementia1. *J Alzheimers Dis*. 62(3):913–32.
13. Itagaki S, McGeer PL, Akiyama H, Zhu S, Selkoe D. Relationship of microglia and astrocytes to amyloid deposits of Alzheimer disease. *J Neuroimmunol*. outubro de 1989;24(3):173–82.
14. Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, et al. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is

the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol.* outubro de 1991;30(4):572–80.

15. Iqbal K, Liu F, Gong C-X. Tau and neurodegenerative disease: the story so far. *Nat Rev Neurol.* janeiro de 2016;12(1):15–27.
16. Guo T, Zhang D, Zeng Y, Huang TY, Xu H, Zhao Y. Molecular and cellular mechanisms underlying the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener.* 16 de julho de 2020;15(1):40.
17. Bateman RJ, Xiong C, Benzinger TLS, Fagan AM, Goate A, Fox NC, et al. Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 30 de agosto de 2012;367(9):795–804.
18. Pooler AM, Polydoro M, Wegmann S, Nicholls SB, Spires-Jones TL, Hyman BT. Propagation of tau pathology in Alzheimer's disease: identification of novel therapeutic targets. *Alzheimers Res Ther.* 2013;5(5):49.
19. Mucke L, Selkoe DJ. Neurotoxicity of Amyloid  $\beta$ -Protein: Synaptic and Network Dysfunction. *Cold Spring Harb Perspect Med.* julho de 2012;2(7):a006338.
20. Cibeira MT, Sancherawala V, Seldin DC, Quillen K, Berk JL, Dember LM, et al. Outcome of AL amyloidosis after high-dose melphalan and autologous stem cell transplantation: long-term results in a series of 421 patients. *Blood.* 20 de outubro de 2011;118(16):4346–52.
21. Sipe JD, Cohen AS. Review: history of the amyloid fibril. *J Struct Biol.* junho de 2000;130(2–3):88–98.
22. Kyle RA, Gertz MA. Primary systemic amyloidosis: clinical and laboratory features in 474 cases. *Semin Hematol.* janeiro de 1995;32(1):45–59.
23. Pepys MB. Pathogenesis, diagnosis and treatment of systemic amyloidosis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 28 de fevereiro de 2001;356(1406):203–11.
24. Gallardo G, Holtzman DM. Amyloid- $\beta$  and Tau at the Crossroads of Alzheimer's Disease. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1184:187–203.
25. Ashrafian H, Zadeh EH, Khan RH. Review on Alzheimer's disease: Inhibition of amyloid beta and tau tangle formation. *Int J Biol Macromol.* 15 de janeiro de 2021;167:382–94.
26. Bonet-Costa V, Pomatto LC-D, Davies KJA. The Proteasome and Oxidative Stress in Alzheimer's Disease. *Antioxidants & Redox Signaling.* 1º de dezembro de 2016;25(16):886–901.

27. Salehi A, Delcroix J-D, Swaab DF. Alzheimer's disease and NGF signaling. *J Neural Transm (Vienna)*. março de 2004;111(3):323–45.
28. Sigurdsson EM, Knudsen E, Asuni A, Fitzer-Attas C, Sage D, Quartermain D, et al. An attenuated immune response is sufficient to enhance cognition in an Alzheimer's disease mouse model immunized with amyloid-beta derivatives. *J Neurosci*. 14 de julho de 2004;24(28):6277–82.
29. Gade Malmos K, Blancas-Mejia LM, Weber B, Buchner J, Ramirez-Alvarado M, Naiki H, et al. ThT 101: a primer on the use of thioflavin T to investigate amyloid formation. *Amyloid*. 2 de janeiro de 2017;24(1):1–16.
30. Hudson SA, Ecroyd H, Kee TW, Carver JA. The thioflavin T fluorescence assay for amyloid fibril detection can be biased by the presence of exogenous compounds. *The FEBS Journal*. 2009;276(20):5960–72.
31. Biancalana M, Koide S. Molecular Mechanism of Thioflavin-T Binding to Amyloid Fibrils. *Biochim Biophys Acta*. julho de 2010;1804(7):1405–12.
32. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. janeiro de 2010;119(1):7–35.
33. Powell EM, Geller HM. Dissection of astrocyte-mediated cues in neuronal guidance and process extension. *Glia*. março de 1999;26(1):73–83.
34. Koehler RC, Roman RJ, Harder DR. Astrocytes and the regulation of cerebral blood flow. *Trends Neurosci*. março de 2009;32(3):160–9.
35. Seifert G, Schilling K, Steinhäuser C. Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nat Rev Neurosci*. março de 2006;7(3):194–206.
36. Simard M, Nedergaard M. The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience*. 2004;129(4):877–96.
37. Halassa MM, Fellin T, Haydon PG. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends Mol Med*. fevereiro de 2007;13(2):54–63.
38. Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA. New roles for astrocytes: Redefining the functional architecture of the brain. *Trends in Neurosciences*. 1º de outubro de 2003;26(10):523–30.
39. Perea G, Navarrete M, Araque A. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci*. agosto de 2009;32(8):421–31.

40. Deitmer JW, Theparambil SM, Ruminot I, Noor SI, Becker HM. Energy Dynamics in the Brain: Contributions of Astrocytes to Metabolism and pH Homeostasis. *Frontiers in Neuroscience*. 2019;13:1301.
41. Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nat Rev Neurosci*. janeiro de 2006;7(1):41–53.
42. Barcia C, Sanderson NSR, Barrett RJ, Wawrowsky K, Kroeger KM, Puntel M, et al. T Cells’ Immunological Synapses Induce Polarization of Brain Astrocytes In Vivo and In Vitro: A Novel Astrocyte Response Mechanism to Cellular Injury. *PLoS One*. 20 de agosto de 2008;3(8):e2977.
43. Michetti F, D’Ambrosi N, Toesca A, Puglisi MA, Serrano A, Marchese E, et al. The S100B story: from biomarker to active factor in neural injury. *J Neurochem*. janeiro de 2019;148(2):168–87.
44. Grzybowska EA. Calcium-Binding Proteins with Disordered Structure and Their Role in Secretion, Storage, and Cellular Signaling. *Biomolecules*. 19 de junho de 2018;8(2):E42.
45. Ludwin SK, Kosek JC, Eng LF. The topographical distribution of S-100 and GFA proteins in the adult rat brain: an immunohistochemical study using horseradish peroxidase-labelled antibodies. *J Comp Neurol*. 15 de janeiro de 1976;165(2):197–207.
46. Donato R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech*. 15 de abril de 2003;60(6):540–51.
47. Davey GE, Murmann P, Heizmann CW. Intracellular Ca<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> levels regulate the alternative cell density-dependent secretion of S100B in human glioblastoma cells. *J Biol Chem*. 17 de agosto de 2001;276(33):30819–26.
48. Donato R, Sorci G, RiuZZi F, Arcuri C, Bianchi R, Brozzi F, et al. S100B’s double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim Biophys Acta*. junho de 2009;1793(6):1008–22.
49. Van Eldik LJ, Griffin WS. S100 beta expression in Alzheimer’s disease: relation to neuropathology in brain regions. *Biochim Biophys Acta*. 29 de setembro de 1994;1223(3):398–403.
50. Bertheloot D, Latz E. HMGB1, IL-1 $\alpha$ , IL-33 and S100 proteins: dual-function alarmins. *Cell Mol Immunol*. janeiro de 2017;14(1):43–64.
51. Peskind ER, Griffin WST, Akama KT, Raskind MA, Van Eldik LJ. Cerebrospinal fluid S100B is elevated in the earlier stages of Alzheimer’s disease. *Neurochemistry International*. novembro de 2001;39(5–6):409–13.

52. Christl J, Verhülsdonk S, Pessanha F, Menge T, Seitz RJ, Kujovic M, et al. Association of Cerebrospinal Fluid S100B Protein with Core Biomarkers and Cognitive Deficits in Prodromal and Mild Alzheimer's Disease. *JAD*. 29 de outubro de 2019;1–9.
53. Cristóvão JS, Morris VK, Cardoso I, Leal SS, Martínez J, Botelho HM, et al. The neuronal S100B protein is a calcium-tuned suppressor of amyloid- $\beta$  aggregation. *SCIENCE ADVANCES*. 2018;13.
54. Cristóvão JS, Figueira AJ, Carapeto AP, Rodrigues MS, Cardoso I, Gomes CM. The S100B Alarmin Is a Dual-Function Chaperone Suppressing Amyloid- $\beta$  Oligomerization through Combined Zinc Chelation and Inhibition of Protein Aggregation. *ACS Chem Neurosci*. 2 de setembro de 2020;11(17):2753–60.
55. Steiner J, Bogerts B, Schroeter ML, Bernstein H-G. S100B protein in neurodegenerative disorders. *Clin Chem Lab Med*. março de 2011;49(3):409–24.
56. Yardan T, Erenler AK, Baydin A, Aydin K, Cokluk C. Usefulness of S100B protein in neurological disorders. *J Pak Med Assoc*. março de 2011;61(3):276–81.
57. Carvalho SB, Botelho HM, Leal SS, Cardoso I, Fritz G, Gomes CM. Intrinsically Disordered and Aggregation Prone Regions Underlie  $\beta$ -Aggregation in S100 Proteins. Gasset M, organizador. *PLoS ONE*. 1º de outubro de 2013;8(10):e76629.
58. Rodrigues FEP, Figueira AJ, Gomes CM, Machuqueiro M. Computational Analysis of the Interactions between the S100B Extracellular Chaperone and Its Amyloid  $\beta$  Peptide Client. *Int J Mol Sci*. 31 de março de 2021;22(7).