

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

“Mapeamento do Processo de Nucleação e Crescimento do Peptídeo Beta Amilóide pelo Complexo Luminescente *cis*-[Ru(phen)₂(Apy)₂]²⁺”

Mariana Pigozzi Cali*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA INORGÂNICA.

Orientadora: Prof. Dra. Rose Maria Carlos

* Bolsista CAPES

São Carlos – 2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Mariana Pigozzi Cali, realizada em 24/09/2018:

Rose Maria Carlos

Profa. Dra. Rose Maria Carlos
UFSCar

[Signature]

Prof. Dr. Roberto Santana da Silva
USP

Tiago Venâncio

Prof. Dr. Tiago Venâncio
UFSCar

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Antonio e Sandra, pelo apoio e
carinho incondicional.

*“Sometimes science is more art than science, Morty. A
lot of people don’t get that.”*

Rick Sanchez

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus pais, Antonio e Sandra, e à minha irmã Laura pela paciência, carinho e apoio nesses dois anos de mestrado. Amo vocês!

À Prof. Dra. Rose Maria Carlos por toda ajuda, carinho, paciência e orientação durante o mestrado.

Aos meus colegas de laboratório Rafael, Isabele, Marlon, Beatriz, Van e Yasmin, obrigada pela ajuda tanto científica como emocional. Obrigada pelas risadas, choros, pipocas e bolos durante esses anos.

Aos meus amigos e amigas Kaline, Gabi, Adriana, Lucas e Mari obrigada pelo apoio e pela ajuda sempre!

Ao Professor Amando Ito da FFCLRP – USP e ao técnico Adriano Batista da Costa pelo uso do microscópio FLIM e auxílio na interpretação dos resultados.

Ao Professor Otaciro Rangel Nascimento e ao Grupo de Biofísica Molecular “Sérgio Mascarenhas” pelas medidas de dicroísmo circular.

Ao Prof. Tiago Venâncio pelas medidas de RMN.

Ao Ademir e aos técnicos Luciana e Paulo pelas ajudas e apoio durante esses anos.

Ao Laboratório Nacional de Nanotecnologia – LNNano/CNPEM (Processos TEM-20515/TEM-21480/ME-22280) pela receptividade e apoio durante as medidas de TEM. Em especial, gostaria de agradecer ao Dr. Alexandre Cassago pelo treinamento de operação do microscópio e pela ajuda com os experimentos.

À CAPES pela bolsa concedida.

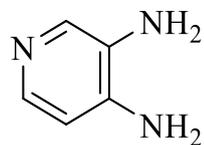
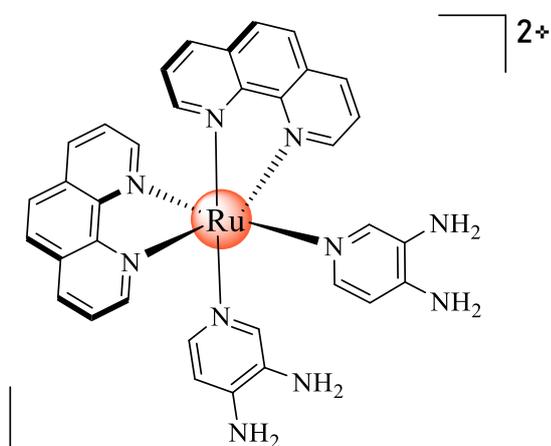
À FAPESP (processo 2017/00839-1) a qual viabilizou a realização do projeto.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A β	Peptídeo Beta Amilóide
APP	Proteína Precursora do Amilóide
Apy	Aminopiridina
DA	Doença de Alzheimer
DC	Dicroísmo Circular
ENF	Emaranhados Neurofibrilares
FLIM	Microscopia de Imagem for Tempo de Vida de Fluorescência
PS	Placas Senis
SNC	Sistema Nervoso Central
phen	1,10-fenantrolina
PET	Tomografia por Emissão de Pósitron
RMI	Ressonância Magnética por Imagem
RuApy	<i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ (3,4-Apy) ₂] ²⁺
TCSPC	Contagem de Fótons Únicos Correlacionados por Tempo
TEM	Microscopia de Transmissão Eletrônica
ThT	Tioflavina T

LISTA DE FÓRMULAS E ESTRUTURAS DE COMPOSTOS

3,4 -diaminopiridina

 cis -[Ru(phen)₂(3,4-Apy)₂]²⁺

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - Desenhos das alterações histopatológicas encontradas na autópsia de Auguste D feitos por Alzheimer onde (A) representa os emaranhados neurofibrilares e (B) as placas senis. Fonte Adaptada: ALZHEIMER, 1911.....	1
FIGURA 1.2 - Proteólise do APP. Fonte Adaptada: O'BRIEN; <i>et al</i> , 2011.....	5
FIGURA 1.3 - Representação das estruturas em α hélice e folhas β possíveis para o peptídeo A β . Fonte Adaptada: THE CELL, quarta edição.....	7
FIGURA 1.4 - Representação das folhas β de uma fibrila.....	9
FIGURA 1.5 - Possíveis interações deletérias de diferentes formas de A β com o neurônio. Fonte Adaptada: < https://www.arigobio.com/news/beta-amyloid-peptide-alzheimer > Acesso em 05/07/18.....	13
FIGURA 4.1 - Espectros de RMN ^1H 400 MHz em DMSO- d_6 para o complexo <i>cis</i> -[Ru(phen) $_2$ (3,4Apy) $_2$] $^{2+}$ (azul) e 3,4-diaminopiridina (verde)	27
FIGURA 4.2 - Espectros de absorção UV-vis do complexo precursor <i>cis</i> -[Ru(phen) $_2$ Cl $_2$] (roxo) e do complexo <i>cis</i> -[Ru(phen) $_2$ (3,4Apy) $_2$] $^{2+}$ (vermelho) em acetonitrila.....	29
FIGURA 4.3 - Espectros de emissão do complexo precursor <i>cis</i> -[Ru(phen) $_2$ Cl $_2$] (roxo) e do complexo <i>cis</i> -[Ru(phen) $_2$ (3,4Apy) $_2$] $^{2+}$ (vermelho) em acetonitrila com excitação em 480 nm.....	30
FIGURA 4.4- Espectros de emissão (preto) e excitação (azul) do complexo <i>cis</i> -[Ru(phen) $_2$ (3,4Apy) $_2$] $^{2+}$ em tampão fosfato pH 7,4 com emissão em 655 nm.....	31

- FIGURA 4.5 - Espectros de emissão em tampão fosfato pH 7,4 (150mM NaCl) da interação ThT-A β na proporção 2:1 (ThT:A β) (A) e gráfico intensidade de emissão normalizado vs. tempo da incubação em minutos (B)..... 33
- FIGURA 4.6 - Estrutura da Tioflavina T..... 33
- FIGURA 4.7 - Espectros de emissão em tampão fosfato pH 7,4 (150mM NaCl) obtidos da interação complexo-A β na proporção 1:10 complexo-A β (C) e gráfico intensidade de emissão em 450 nm normalizado vs. tempo da incubação em minutos (D)..... 34
- FIGURA 4.8 - Imagens de FLIM do processo de agregação do A β ₁₋₄₀ em tampão fosfato pH 7,4 (150 mM NaCl) em diferentes tempos de incubação na ausência de complexo. Excitação em 470 nm e leitura de emissão acima de 488 nm..... 36
- FIGURA 4.9 - Imagens de FLIM do processo de agregação do A β ₁₋₄₀ em tampão fosfato pH 7,4 (150 mM NaCl) nos tempos (A) 0 min e (B) 240 min de incubação obtidas com excitação em 470 nm e leitura de emissão acima de 488nm. A contagem de fótons para a imagem em 0 min é de 488 enquanto a de 240 min é de 3354..... 38
- FIGURA 4.10 - Imagens de FLIM do processo de agregação do A β ₁₋₄₀ em tampão fosfato pH 7,4 (150 mM NaCl) em diferentes tempos de incubação na presença de complexo (3 A β :1 complexo). Excitação em 470 nm e emissão acima de 488 nm..... 39
- FIGURA 4.11 - Imagens de FLIM do processo de agregação do A β ₁₋₄₀ em tampão fosfato pH 7,4 (150 mM NaCl) em 360 min de agregação onde (A) foi incubado sem complexo e (B) foi incubado com complexo (3 A β :1 complexo). A contagem de fótons para a imagem em (A) é de 2376 enquanto a contagem da imagem com complexo (B) é de 22712. Excitação em 470 nm e emissão acima de 488 nm..... 40

FIGURA 4.12 - Fragmentos $A\beta_{1-28}$, $A\beta_{11-22}$ e $A\beta_{29-40}$ destacados em verde.....	42
FIGURA 4.13 - Imagens de TCSPC-FLIM do processo de agregação do $A\beta_{1-28}$ em tampão fosfato pH 7,4 (150 mM NaCl) sem complexo (A) e (B) e com complexo na proporção 3 $A\beta$:1 complexo (C) e (D) em 120 e 240 min de incubação. As imagens foram obtidas com excitação em 470 nm e leitura de emissão acima de 488 nm.....	44
FIGURA 4.14 - Imagens de TCSPC-FLIM do processo de agregação do $A\beta_{11-22}$ em tampão fosfato pH 7,4 (150 mM NaCl) sem complexo (A) e (B) e com complexo na proporção 3 $A\beta$:1 complexo (C) e (D) em 120 e 240 min de incubação. As imagens foram obtidas com excitação em 470 nm e leitura de emissão acima de 488 nm.....	47
FIGURA 4.15 - Imagens de TCSPC-FLIM do processo de agregação do $A\beta_{29-40}$ em tampão fosfato pH 7,4 (150 mM NaCl) sem complexo (A) e (B) e com complexo na proporção 3 $A\beta$:1 complexo (C) e (D) em 120 e 240 min de incubação. As imagens foram obtidas com excitação em 470 nm e leitura de emissão acima de 488 nm.....	51
FIGURA 4.16 - Espectro de dicroísmo circular acompanhando o processo de agregação do $A\beta_{1-40}$ em tampão fosfato pH 7,4 (150 mM NaCl).....	53
FIGURA 4.17 - Espectros comparativos de dicroísmo circular acompanhando o processo de agregação do $A\beta_{1-40}$ em tampão fosfato pH 7,4 (150 mM NaCl) para os tempos de incubação (A) 0 minutos e (B) 360 minutos na ausência e na presença de complexo (5 $A\beta_{1-40}$: 1 complexo).....	54
FIGURA 4.18 - Imagens de TEM por contrastação negativa do fragmento $A\beta_{1-40}$ em tampão fosfato pH 7,4 (150 mM NaCl) na ausência de complexo nos tempos de incubação 15 (A), 60 (B), 120 (C) e 240 (D) minutos.....	57

- FIGURA 4.19 - Imagens de TEM por contrastação negativa de oligômeros e protofibrila do fragmento $A\beta_{1-40}$ em tampão fosfato pH 7,4 (150 mM NaCl) observados em 240 minutos de incubação..... 57
- FIGURA 4.20 - Imagens de TEM por contrastação negativa de uma fibrila do fragmento $A\beta_{1-40}$ em tampão fosfato pH 7,4 (150 mM NaCl) em forma de hélice..... 58
- FIGURA 4.21 - Imagens de TEM por contrastação negativa do fragmento $A\beta_{1-40}$ do fragmento $A\beta_{1-40}$ em tampão fosfato pH 7,4 (150 mM NaCl) na presença de complexo na proporção 5:1 amilóide:complexo nos tempos de incubação 15 (A), 60 (B), 120 (C) e 240 (D) minutos.....60
- FIGURA 4.22 - Imagens de TEM por contrastação negativa de uma fibrila do fragmento $A\beta_{1-40}$ em tampão fosfato pH 7,4 (150 mM NaCl) do tipo *belt*..... 60
- FIGURA 4.23 - Comparativo entre os oligômeros observados em 240 minutos de incubação para as amostras do fragmento $A\beta_{1-40}$ em tampão fosfato pH 7,4 (150 mM NaCl) com complexo na proporção 5:1 e sem complexo..... 61
- FIGURA 4.24 - Imagens de TEM por contrastação negativa do fragmento $A\beta_{1-40}$ em tampão fosfato pH 7,4 (150 mM NaCl) na presença de complexo na proporção 1:1 amilóide:complexo nos tempos de incubação 15 (A), 60 (B), 120 (C) e 240 (D) minutos..... 62
- FIGURA 4.25 - Comparativo entre os três grupos de amostras do peptídeo $A\beta_{1-40}$ em tampão fosfato pH 7,4 (150 mM NaCl) e seus respectivos tempos de incubação..... 64
- FIGURA 4.26 - Imagens de TEM por contrastação negativa do fragmento $A\beta_{1-28}$ em tampão fosfato pH 7,4 (150 mM NaCl) nos tempos de incubação 15 (A) e 240 min (B) na ausência de complexo e 15 (B) e 240 (D) minutos na presença de complexo na proporção 1:1 amilóide:complexo..... 66

- FIGURA 4.27– Imagens de TEM por contrastação negativa fibrila e oligômeros em tampão fosfato pH 7,4 (150 mM NaCl) do fragmento $A\beta_{1-28}$ 66
- FIGURA 4.28 - Imagens de TEM por contrastação negativa do fragmento $A\beta_{11-22}$ em tampão fosfato pH 7,4 (150 mM NaCl) nos tempos de incubação 15 (A) e 240 min (B) na ausência de complexo e 15 (B) e 240 (D) minutos na presença de complexo na proporção 1:1 amilóide:complexo..... 68
- FIGURA 4.29 – Imagens de TEM por contrastação negativa de uma fibrila em tampão fosfato pH 7,4 (150 mM NaCl) do fragmento $A\beta_{11-22}$ 68
- FIGURA 4.30 - Imagens de TEM do fragmento $A\beta_{29-40}$ em tampão fosfato pH 7,4 (150 mM NaCl) nos tempos de incubação 15 (A) e 240 min (B) na ausência de complexo e 15 (B) e 240 (D) minutos na presença de complexo na proporção 1:1 amilóide:complexo..... 69

LISTA DE TABELAS

TABELA 4.1 - Análise elementar das porcentagens referentes as quantidades de C, H e N para o complexo <i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ (3,4Apy) ₂]. 2PF ₆ considerando a fórmula mínima C ₃₄ H ₃₀ F ₁₂ N ₁₀ P ₂ Ru.....	21
TABELA 4.2 - Atribuição dos sinais do espectro de RMN ¹ H para o complexo <i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ (3,4Apy) ₂] ²⁺ em DMSO-d ₆	26
TABELA 4.3 - Tempos de vida de emissão do complexo <i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ (3,4Apy) ₂] ²⁺ em tampão fosfato pH 7,4.....	32
TABELA 4.4 - Tempos de vida de emissão das imagens das amostras de Aβ ₁₋₄₀ sem complexo em tampão fosfato pH 7,4 (150 mM NaCl) obtidas com excitação em 470 nm e leitura de emissão acima de 488 nm.....	37
TABELA 4.5 - Tempos de vida de emissão das imagens obtidas das amostras de Aβ ₁₋₄₀ com complexo (3 Aβ:1 complexo) em tampão fosfato pH 7,4 (150 mM NaCl) obtidas com excitação em 470 nm e leitura de emissão acima de 488 nm.....	41
TABELA 4.6 - Tempos de vida das imagens de TCSPC-FLIM do processo de agregação do Aβ ₁₋₂₈ em tampão fosfato pH 7,4 (150 mM NaCl) sem complexo (A) e (B) e com complexo na proporção 3 Aβ:1 complexo (C) e (D) em 120 e 240 min de incubação. Os tempos de vida de emissão foram obtidos com excitação em 470 nm e leitura de emissão acima de 488 nm.....	45
TABELA 4.7 - Tempos de vida de emissão das imagens de TCSPC-FLIM do processo de agregação do Aβ ₁₁₋₂₂ em tampão fosfato pH 7,4 (150 mM NaCl) sem complexo (A) e (B) e com complexo na proporção 3 Aβ:1 complexo (C) e (D) em 120 e 240 min de incubação. As imagens foram obtidas com excitação em 470 nm e leitura de emissão acima de 488 nm.....	48

TABELA 4.8 - Tempos de vida de emissão das imagens de TCSPC-FLIM do processo de agregação do $A\beta_{29-40}$ em tampão fosfato pH 7,4 (150 mM NaCl) sem complexo (A) e (B) e com complexo na proporção 3 $A\beta$:1 complexo (C) e (D) em 120 e 240 min de incubação. As imagens foram obtidas com excitação em 470 nm e leitura de emissão acima de 488 nm..... 50

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1.1 - Sequência de aminoácidos do A β ₁₋₄₀	5
ESQUEMA 1.2 - Processo de agregação do peptídeo beta amilóide. Fonte Adaptada: SIRANGELO; et al, 2014.....	8
ESQUEMA 1.3 - Tipos de oligômeros de A β e suas ramificações.....	10
ESQUEMA 1.4 - Possíveis morfologias do amilóide segundo seu tipo de atração eletrostática. Fonte Adaptada: HU; et. al, 2015.....	11
ESQUEMA 3.1 - Esquema da metodologia utilizada no monitoramento do processo de agregação do peptídeo beta amilóide.....	22

RESUMO

MAPEAMENTO DO PROCESSO DE NUCLEAÇÃO E CRESCIMENTO DO PEPTÍDEO BETA AMILÓIDE PELO COMPLEXO LUMINESCENTE cis -[Ru(PHEN)₂(APY)₂]²⁺

O beta-amilóide (A β) é um fragmento de peptídeo altamente propenso à agregação que se deposita no meio extracelular e está diretamente associado ao desenvolvimento e progressão de uma série de doenças do sistema nervoso, em particular, a doença de Alzheimer (DA). Com isso em mente, o objetivo deste trabalho é obter um complexo de Ru (II) luminescente capaz de mapear em tempo real o processo de agregação do peptídeo beta amilóide pelo estímulo luminoso. O complexo cis -[Ru(phen)₂(Apy)₂]²⁺ foi sintetizado com esse intuito, apresentando absorção intensa e larga cobrindo a região de 350 a 600 nm com máximo em 450 nm ($\epsilon = 9800 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$) e emissão larga com máximo em 655 nm, apresentando um deslocamento de Stokes na ordem de 4800 cm^{-1} e tempo de vida de fosforescência de 129 ns. A interação do complexo com o peptídeo A β ₁₋₄₀ foi analisada pelas respostas luminescentes do complexo com o decorrer da agregação. Estudos de interação através de mudanças na intensidade de luminescência foram conduzidos. As imagens luminescentes e as alterações nos tempos de vida de luminescência durante o processo de agregação foram obtidas por microscopia confocal utilizando a técnica de FLIM (do inglês *Fluorescence Lifetime Imaging*). O complexo mostrou-se um bom marcador para o processo de agregação do peptídeo A β . Com os tempos de vida de fluorescência obtidos das imagens luminescentes foi possível avaliar a interação entre o complexo e o A β ₁₋₄₀. As imagens do A β ₁₋₄₀ sem complexo possuem um tempo de vida bi exponencial médio de 3,5 ns. Já as imagens do A β ₁₋₄₀ com complexo possuem um tempo de vida tri exponencial médio de 4,8 ns, apresentando contribuição significativa de um terceiro tempo de vida mais longo em torno de 7 ns. Uma vez confirmada a

interação entre o complexo e o $A\beta_{1-40}$, estudou-se os possíveis sítios de interação entre os mesmos. Três fragmentos do peptídeo foram investigados: $A\beta_{1-28}$, $A\beta_{11-22}$ e $A\beta_{29-40}$. As imagens de FLIM sem e com complexo mostraram-se bastante distintas, bem como seus tempos de vida. Após determinar a interação do complexo com o peptídeo, foi investigado a capacidade do complexo em influenciar o processo de agregação do peptídeo. Estudos de dicroísmo circular em diferentes estágios de agregação mostraram uma diferença significativa na elipticidade nos sinais de folha beta formados ao longo da agregação, sugerindo um possível efeito inibidor do complexo. Estudos com microscopia eletrônica de transmissão foram realizados com os fragmentos $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-28}$, $A\beta_{11-22}$ e $A\beta_{29-40}$. Os estudos $A\beta_{1-40}$ na proporção 1:5 complexo:amilóide não mostraram mudança significativa em relação ao controle. Já os estudos na proporção 1:1 complexo:amilóide apresentam agregados de tamanho muito menor ressaltando novamente a possibilidade de um efeito inibidor de agregação.

ABSTRACT

MAPPING OF NUCLEATION AND GROWTH PROCESSES OF THE AMYLOID BETA PEPTIDE THROUGH THE LUMINESCENT COMPLEX *cis*-[Ru(PHEN)₂(APY)₂]²⁺

Amyloid beta (A β) is a peptide fragment highly prone to aggregation that deposits in the extracellular medium and is directly associated with the development and progression of a number of nervous system diseases, in particular, Alzheimer's disease (AD). With this in mind, the objective of this work is to obtain a luminescent Ru(II) complex capable of mapping in real time the aggregation process of the amyloid beta peptide through light stimulus. The *cis*-[Ru(phen)₂(Apy)₂]²⁺ complex was synthesized for this purpose. The complex showed an intense and wide absorption band covering the region 350 to 600 nm with a maximum of 450 nm ($\epsilon = 9800 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$) and broad emission with maximum at 655 nm, exhibiting a Stokes shift in the order of 4800 cm^{-1} and phosphorescence lifetime of 129 ns. The interaction of the complex with the A β ₁₋₄₀ peptide was analyzed by the luminescent responses of the complex throughout the course of aggregation. Interaction studies through changes in luminescence intensity were conducted. Luminescent images and changes in luminescence lifetimes during the aggregation process were obtained by confocal microscopy using the FLIM technique (Fluorescence Lifetime Imaging). The complex proved to be a good marker for the A β peptide aggregation process. With the fluorescence lifetimes obtained from the luminescent images, it was possible to evaluate the interaction between the complex and A β ₁₋₄₀. A β ₁₋₄₀ images, with samples being prepared without the complex, have an average bi exponential lifetime of 3.5 ns. On the other hand, the images of the complex A β ₁₋₄₀ have an average tri exponential lifetime of 4.8 ns, with a significant contribution of a third long

lifetime of around 7 ns. Once the interaction between the complex and A β ₁₋₄₀ was confirmed, the possible sites of interaction were investigated. Three fragments of the peptide were studied: A β ₁₋₂₈, A β ₁₁₋₂₂ and A β ₂₉₋₄₀. The images of FLIM without and with complex proved to be quite different, as well as their lifetimes. After determining the interaction of the complex with the peptide, the ability of the complex to influence the peptide aggregation process was investigated. Studies of circular dichroism at different stages of aggregation showed a significant difference in the ellipticity of the beta-sheet signals formed throughout the aggregation, suggesting a possible inhibitory effect by the complex. Studies with transmission electron microscopy were also performed with the fragments A β ₁₋₄₀, A β ₁₋₂₈, A β ₁₁₋₂₂ and A β ₂₉₋₄₀. Studies with A β ₁₋₄₀ in the 1:5 complex:amyloid ratio did not show significant change over the control group. On the other hand, studies in the 1:1 complex:amyloid ratio show smaller aggregates, again highlighting the possibility of an inhibitory effect of aggregation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A Doença de Alzheimer	1
1.1.1. O Custo da Doença de Alzheimer	3
1.2. O Peptídeo Beta Amilóide	4
1.2.1. O Processo de Agregação	7
1.2.3. Toxicidade do Peptídeo Beta Amilóide	11
1.3. Diagnóstico de Doença de Alzheimer	13
1.4. Proposta de Trabalho	15
1.5. Justificativa	15
2. OBJETIVOS	18
2.1. Objetivos Gerais	18
2.2. Objetivos Específicos	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1. Reagentes	18
3.2. Síntese dos Complexos	19
3.2.1. Síntese do precursor <i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ Cl ₂]	19
3.2.2. Síntese do complexo <i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ (3,4Apy) ₂]. 2PF ₆	20
3.3. Equipamentos e Metodologia	20
3.3.1. Análise Elementar	20
3.3.2. Espectroscopia de UV-vis	20
3.3.3. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	20
3.3.4. Espectroscopia de Luminescência	21
3.3.5. Tempo de Vida de Emissão	21
3.3.6. Estudo do processo de agregação do A β	21
3.3.7. Dicroísmo Circular	23

3.3.8. Microscopia de Imagem por Tempo de Vida de Fluorescência (TCSPC-FLIM).....	23
3.3.9. Microscopia de Transmissão Eletrônica (TEM).....	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1. Caracterização do complexo <i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ (3,4Apy) ₂]. 2PF ₆	24
4.1.1. Análise Elementar	24
4.1.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	25
4.1.3. Espectroscopia de UV-vis	28
4.1.4. Luminescência e Tempo de Vida.....	29
4.2. Estudos de Luminescência com Aβ ₁₋₄₀	32
4.2.1. Estudos de Emissão	32
4.2.2. Estudo de tempo de vida de emissão através de Imagens de TCSPC-FLIM.....	35
4.3. Estudos de Interação com Fragmentos.....	42
4.3.1. Fragmento Aβ ₁₋₂₈	42
4.3.2. Fragmento Aβ ₁₁₋₂₂	46
4.3.3. Fragmento Aβ ₂₉₋₄₀	49
4.4. O Complexo <i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ (3,4Apy) ₂] ²⁺ como Marcador Biológico Luminescente	51
4.5. Estudos de Influência Estrutural do Complexo <i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ (3,4Apy) ₂] ²⁺ no Processo de Agregação do Peptídeo Beta Amilóide.....	52
4.5.1. Dicroísmo Circular	53
4.5.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão	55
4.5.2.1. Aβ ₁₋₄₀	55
4.5.2.2. A influência do complexo <i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ (3,4Apy) ₂] ²⁺ na morfologia do Aβ ₁₋₄₀	62
4.5.2.3 - Aβ ₁₋₂₈	65
4.5.2.4 - Aβ ₁₁₋₂₂	67
4.5.2.5 - Aβ ₂₉₋₄₀	69
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	70

6. CONCLUSÃO	71
7. PLANOS FUTUROS	72
8. REFERÊNCIAS	73
9. ANEXO	81

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Doença de Alzheimer

O primeiro caso de Doença de Alzheimer (DA) foi diagnosticado em 1906 pelo médico e neuropatologista alemão Alois Alzheimer.¹ Em 1901, a paciente Auguste D de 51 anos foi admitida no hospital de Frankfurt, onde trabalhava Alzheimer, apresentando uma série de sintomas psicossomáticos tais como perda de compreensão e memória, desorientação, paranoia e habilidades psicossociais comprometidas. Alzheimer acompanhou o caso de Auguste durante os quatro anos em que ela esteve internada até 1906 quando a mesma veio a óbito.

Na autópsia de Auguste, Alzheimer encontrou alterações histopatológicas, reportando mudanças peculiares no interior dos neurônios e presença de placas no meio extracelular.^{1,2} Após anos de estudo, essas alterações foram atribuídas a dois tipos distintos de lesões neuronais: os emaranhados neurofibrilares (ENF) e as placas senis (PS). A Figura 1.1 mostram uma série de desenhos que ilustram as alterações histológicas encontradas na autópsia de Auguste feitos por Alzheimer e publicados em 1911. Concomitantemente, outros casos de pacientes que apresentaram os mesmos sintomas e patologia foram reportados na literatura.¹

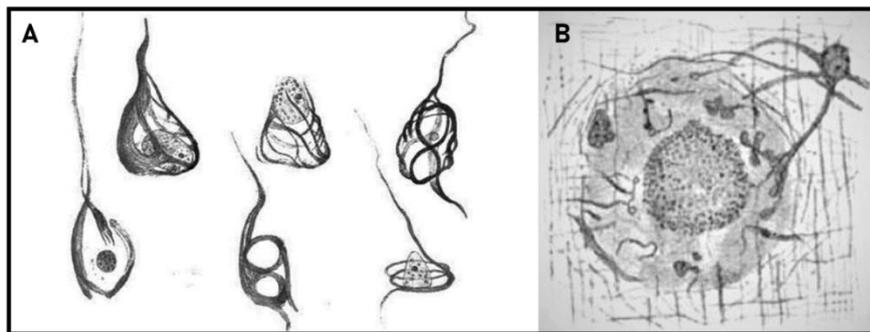


FIGURA 1.1 - Desenhos das alterações histopatológicas encontradas na autópsia de Auguste D feitos por Alzheimer onde representam (A) emaranhados neurofibrilares e (B) placas senis. Fonte Adaptada: ALZHEIMER, 1911.

Anos após a publicação deste estudo por Alzheimer, concluiu-se que a causa destas lesões neuronais observadas nos pacientes de DA podem ser atribuídas a deposições patológicas de proteínas normalmente encontradas no cérebro.³ As placas senis são constituídas pelo acúmulo do peptídeo beta amilóide (A β), o qual se deposita no meio extracelular, enquanto os emaranhados neurofibrilares são depósitos intracelulares da proteína tau hiperfosforilada.^{1,4} Vale ressaltar que as placas senis podem estar presentes nos cérebros de pacientes até 15 anos antes da manifestação dos primeiros sintomas.⁴ Apesar disso, vários estudos demonstram que os emaranhados neurofibrilares são de fato os responsáveis majoritários pelos sintomas da Doença de Alzheimer.^{3,4,5}

Entretanto, uma das teorias mais aceitas em relação à DA, denominada hipótese da cascata, afirma que as placas senis, apesar de assintomáticas, iniciam uma série de processos bioquímicos que induzem à fosforilação da proteína tau seguido pela degeneração progressiva dos processos neuronais.^{6,7,8,9} Estudos demonstram que as kinases GSK3 β e CDK5, responsáveis pela fosforilação da proteína tau *in vitro*, podem ser ativadas em resposta à deposição do beta amilóide fibrilar.^{10,11}

Estudos mais recentes apresentam evidências de que as formas oligoméricas do A β induzem estresse celular e ruptura de membrana, causando toxicidade celular.^{12,13,14} Assim, os indícios mostram que, a presença do peptídeo beta amilóide solúvel, bem como seus depósitos, estão relacionados à toxicidade, o surgimento nos ENF e, conseqüentemente, ao desenvolvimento dos sintomas.¹² Estes resultados estimularam as pesquisas relacionadas ao processo de agregação do peptídeo beta amilóide.

A deposição patogênica de formas fibrilares de diferentes proteínas, tais como o beta amilóide, é denominada amiloidogênese.¹² A presença de depósitos de amilóide é comum para uma série de doenças neurodegenerativas além da DA, tais como Doença de Huntington, Esclerose Lateral Amiotrófica e

Doença de Parkinson, sendo todas essas doenças classificadas como formas de demência.^{15,16}

1.1.1. O Custo da Doença de Alzheimer

A população idosa do mundo é composta por cerca de 900 milhões de pessoas.¹⁶ A taxa de mortalidade entre os idosos vem decaindo devido ao desenvolvimento da medicina moderna e, conseqüentemente, a expectativa de vida a partir dos 60 anos continua aumentando em todas as regiões do mundo.¹⁶ A medida em que a expectativa de vida aumenta, doenças crônicas se tornam mais comuns, devido a mudanças em estilo de vida, tais como alterações na dieta, sedentarismo e tabagismo.¹⁶ A maioria dessa população reside em países relativamente pobres. De acordo com a *World Bank*, 70% da população mundial de idosos residem em países de baixa e média renda.¹⁶

A incidência de demência aumenta exponencialmente com a idade. De acordo com a *Alzheimer's Society*, o termo demência descreve um conjunto de sintomas, tais como perda de memória ou dificuldade com linguagem, causado por doenças neurodegenerativas, sendo a DA a forma mais comum de demência.¹⁷ Enquanto a expectativa de vida dos pacientes com demência é diminuída, o maior impacto é na qualidade de vida, tanto do paciente como de seus familiares e cuidadores. São estimados 9,9 milhões de novos casos de demência a cada ano no mundo, totalizando um novo caso a 3,2 segundos.¹⁸ O custo global com o tratamento da doença aumentou de US\$ 604 bilhões em 2010 para US\$ 818 bilhões em 2015, valor este que representa 1,09% do GDP global.¹⁶ Aplicando o fator anual de inflação, o custo em 2030 será próximo de US\$ 2 trilhões e a marca de US\$ 1 trilhão será atingida ainda em 2018. No entanto, os custos referentes ao tratamento e gerenciamento da doença permanecem concentrados em países de alta renda.¹⁶

Estudos mostram que a maioria das pessoas vivendo com demência não receberam um diagnóstico formal.¹⁸ Em países ricos, somente 20-50% dos

casos de demência são reconhecidos e documentados como tal, sendo que em países em desenvolvimento o número de casos registrados é muito menor, com estimativas de que 90% dos mesmos permanecem não diagnosticados.^{16,19}

Apesar do número significativo de estudos relacionados à DA, atualmente não existe uma forma de diagnóstico definitivo para a mesma.¹⁹ Em geral, o diagnóstico é realizado através de testes de memória, de atenção e cognição, juntamente com exames clínicos afim de eliminar outras possíveis causas dos sintomas observados.^{17,19}

O diagnóstico definitivo da DA só pode ser feito após a morte, fazendo uso dos exames clínicos realizados em vida e um exame do tecido cerebral na autópsia.¹⁹

1.2. O Peptídeo Beta Amilóide

O peptídeo beta amilóide ($A\beta$) é proveniente da clivagem da Proteína Precursora do Amilóide (APP), a qual é uma proteína transmembrana com um grande domínio extracelular.²⁰ O APP possui 8 isoformas distintas, sendo as isoformas com 695, 751 e 770 aminoácidos mais comuns.^{20,21,22,23} O APP com 695 é expressado predominantemente no sistema nervoso central enquanto as isoformas com 751 e 770 aminoácidos são expressadas em vários tipos de células em diversas partes do corpo.²⁴ No sistema nervoso central (SNC), o APP atua, a nível celular, em vários processos, tais como transporte axonal, metabolismo do colesterol e transcrição de genes.²⁴

A proteólise amiloidogênica do APP ocorre sequencialmente pelas enzimas β -secretase e γ -secretase (FIGURA 1.2).^{20,21} O sítio de clivagem da β -secretase ocorre entre os aminoácidos 596 e 597 do APP₆₉₅.^{20,25} A clivagem pela β -secretase determina o final N-terminal do peptídeo $A\beta$ e libera o sAPP β , o qual é hidrossolúvel. A γ -secretase é responsável por clivar o APP na parte C-terminal,

o qual está localizado dentro do domínio transmembrana do APP, liberando o peptídeo A β para o meio extracelular.^{20,25}

O A β é um peptídeo cujo monômero possui 4.2 kDa e possui de 39 a 42 aminoácidos, sendo as isoformas com 40 e 42 aminoácidos as mais comuns (ESQUEMA 1.1).^{23,24} O monômero do A β é intrinsicamente desordenado, sendo que sua principal característica é sua alta propensão à agregação.²⁵ A função biológica, fisiológica e patológica do A β em condições normais ainda é desconhecida.^{26,27,28,29} No entanto, existem exemplos em bactérias, fungi e mamíferos onde sua agregação é um processo natural e funcional.²⁴

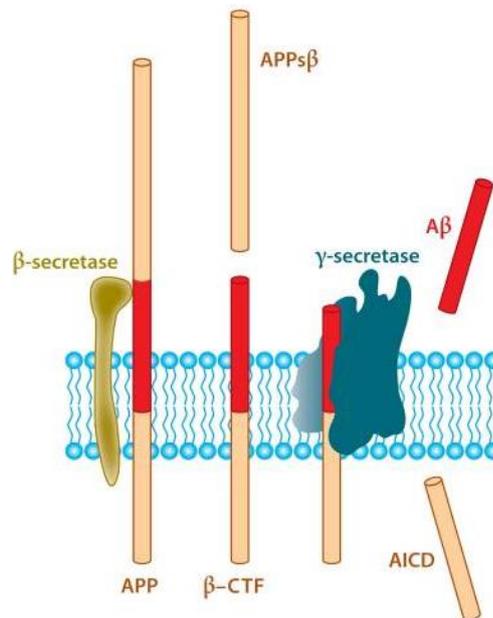


FIGURA 1.2 – Proteólise do APP. Fonte Adaptada: O'BRIEN; *et al*, 2011.



ESQUEMA 1.1 – Sequência de aminoácidos do A β_{1-40}

Vale ressaltar que, apesar da clivagem do APP gerar o A β , o sítio de clivagem da γ -secretase leva a variações no final C-terminal do mesmo.³⁰ Assim, observa-se a liberação de peptídeos A β contendo 27 a 49 aminoácidos.³¹ Variações adicionais nos comprimentos do peptídeo surgem de mutações no próprio domínio do A β , como por exemplo, as mutações do tipo Flemish (Ala21 até Gly29), Dutch (Glu3 até Gln15), Italian (Glu22 até Lys28), Arctic (Glu22 até Gly29), Iowa (Asp23 até Asn27) e Tottori (Asp7 até Asn27).³²

Essas alterações são responsáveis pela heterogeneidade dos oligômeros do A β gerados, os quais, apresentam estrutura, morfologia e funções diversificadas.¹⁴ Por isso, a formação das placas de amilóide não envolve apenas a agregação de espécies monoméricas simples, ao contrário, sua formação envolve uma série de espécies intermediárias que se formam antes da conversão para fibrilas maduras. A transformação dos oligômeros solúveis em fibrilas maduras, por exemplo, ocorre pela adição de monômeros ao núcleo oligomérico por um mecanismo cinético rápido. Nesse processo a maturação das estruturas oligoméricas produz filamentos intermediários individuais denominados protofibrilas.³³ A associação entre protofibrilas ocorre de maneira ordenada, gerando as fibrilas maduras.^{34,35,36}

Comparada as fibrilas maduras, as protofibrilas são caracterizadas pela falta de periodicidade: são estruturas em geral curvilíneas e finas (menos que 10 nm de diâmetro) e mais curtas (menos que 400 nm em comprimento). Os oligômeros podem também se agregar em formato de anéis, formando um interior hidrofílico e exterior hidrofóbico.³⁷ Agregados anelares e estruturas globulares não estão restritos ao A β , podendo ser formados por diferentes tipos de proteínas.^{38,39} Apesar do número significativo de trabalhos descrevendo a estrutura das fibrilas maduras, pouco se conhece sobre as estruturas oligoméricas.⁴⁰ A maior dificuldade para a caracterização estrutural surge da natureza heterogênea destas espécies.^{41,42,43}

1.2.1. O Processo de Agregação

A sequência monomérica do A β possui caráter anfifílico, onde o segmento N-terminal possui caráter hidrofílico e os 12 a 14 aminoácidos terminais possuem caráter hidrofóbico.^{44,45}

Em soluções aquosas, a estrutura secundária do A β depende do número de aminoácidos do fragmento monomérico, onde os fragmentos A β_{1-40} e A β_{1-39} apresentam estrutura secundária aleatória enquanto o A β_{1-42} adota estrutura rica em folhas β (FIGURA 1.3).⁴⁵

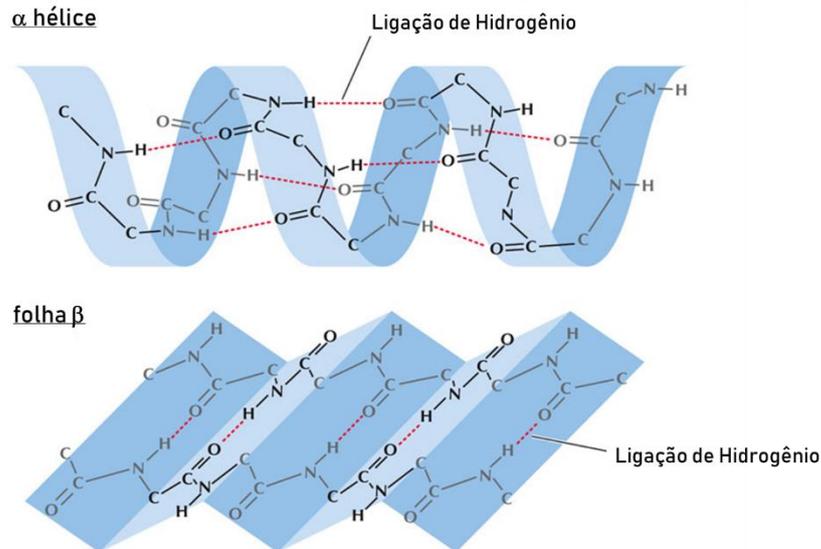
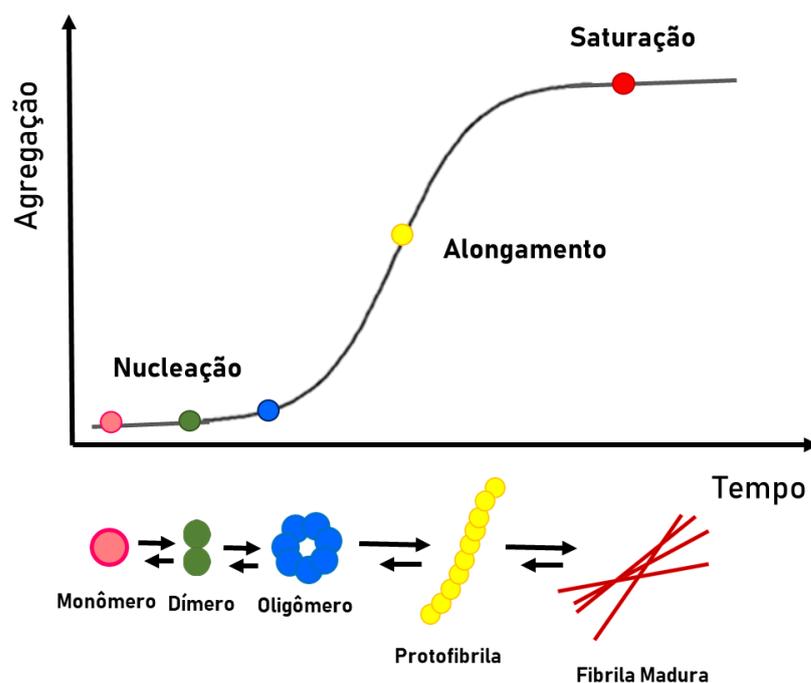


FIGURA 1.3 - Representação das estruturas em α hélice e folhas β possíveis para o peptídeo A β . Fonte Adaptada: THE CELL, quarta edição.

O processo de agregação do A β é dividido em três fases distintas, as quais são ilustradas no Esquema 1.2.



ESQUEMA 1.2 – Processo de agregação do peptídeo beta amilóide. Fonte Adaptada: SIRANGELO; et al, 2014.

A fase de nucleação do Aβ consiste na transição do monômero para dímero, trímero, tetrâmero e, em sequência, oligômero.⁴⁵

A forma oligomérica é formada de 3 a 50 subunidades de Aβ monoméricas.^{20,25,45} Em geral, oligômeros formam estruturas globulares e não possuem estrutura secundária definida. Além disso, os tamanhos e conformações dos oligômeros são bastante variáveis.^{45,46} Existem estudos que mostram tanto oligômeros pequenos e esféricos com 5 nm de diâmetro com massas molares entre 20 a 50 kDa como oligômeros esféricos com diâmetros em torno de 15 nm e massa molar de aproximadamente 1000 kDa.^{45,46,47}

Na fase de alongamento ocorre a união dos oligômeros ou oligômeros e monômeros formando protofibrilas, que por sua vez se tornam fibrilas maduras. As protofibrilas são solúveis e possuem estruturas mais lineares, variando de 8 a 200 nm de comprimento com 4 a 11 nm de diâmetro.^{45,46} Protofibrilas permanecem em equilíbrio dinâmico com oligômeros de baixa ordem e se alongam pela associação de protofibrilas menores, com a velocidade

de associação dependendo da concentração de A β , pH, força iônica e temperatura.^{45,46}

As fibrilas de A β são definidas como agregados de proteína termodinamicamente estáveis, organizados estruturalmente, sendo insolúveis e filamentosos, compostos por unidades repetitivas de folhas β alinhadas perpendicularmente ao eixo da fibra (Figura 1.4), possuindo um alto conteúdo de folhas β .^{45,46}

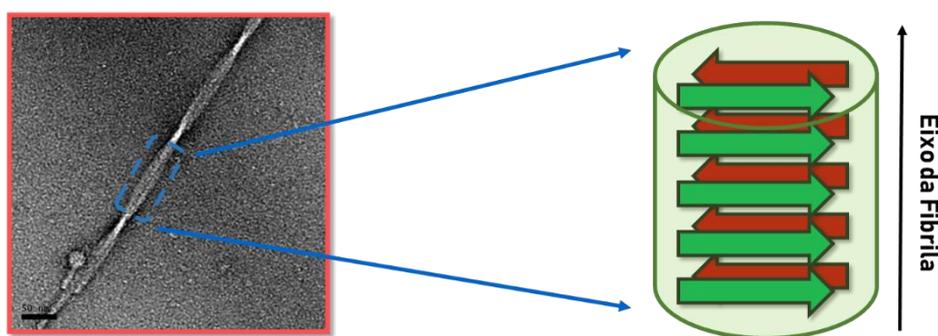


FIGURA 1.4 - Representação das folhas β de uma fibrila

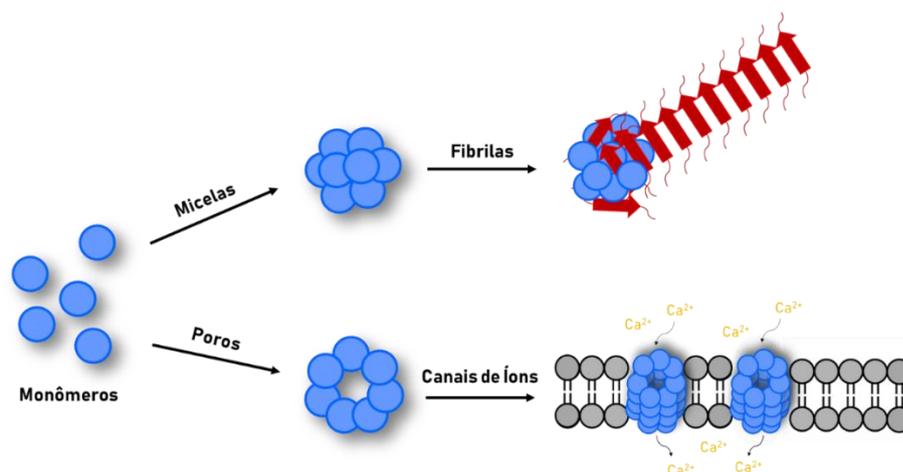
Apesar da elucidação estrutural do processo de agregação do A β , os mecanismos e a toxicidade dos diferentes estágios de agregação do A β ainda não foram elucidados. Uma das hipóteses mais estudadas dos últimos anos propõe que as espécies intermediárias de agregação, ao invés das fibrilas maduras, são espécies responsáveis pela toxicidade celular associada à presença de agregados de A β .⁴⁸ Caso essa hipótese esteja correta, então o mapeamento dos estágios iniciais do processo de formação dos agregados é de extrema importância para o entendimento da doença e para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas baseado nos mecanismos de associação.

1.2.2. Estruturas Oligoméricas e Fibrilares

Existem dois tipos de oligômeros – oligômeros micelares e oligômeros tipo poro (ESQUEMA 1.3).⁴⁹ Apresentando um segmento N-terminal

e outro C-terminal, o peptídeo beta amilóide é anfifílico e medidas de tensão superficial demonstraram a habilidade do A β em formar micelas.^{50,51,52} As micelas aceleram o processo de agregação, formando oligômeros de alta ordem, ocasionando processos de agregação divergentes. No peptídeo A β ₁₋₄₀, a presença de micelas favorece a formação de oligômeros não tóxicos, os quais podem ocasionar a formação de fibrilas maduras.^{50,51}

Já os oligômeros tipo poro, como o próprio nome indica, se arranjam afim de formar estruturas que se assemelham a poros. Estes oligômeros se inserem nas membranas dos neurônios, atuando como canais iônicos secundários, influenciando a homeostase dos íons Ca²⁺, que levam a perda sináptica e toxicidade.^{54,55,56,57,58,59}

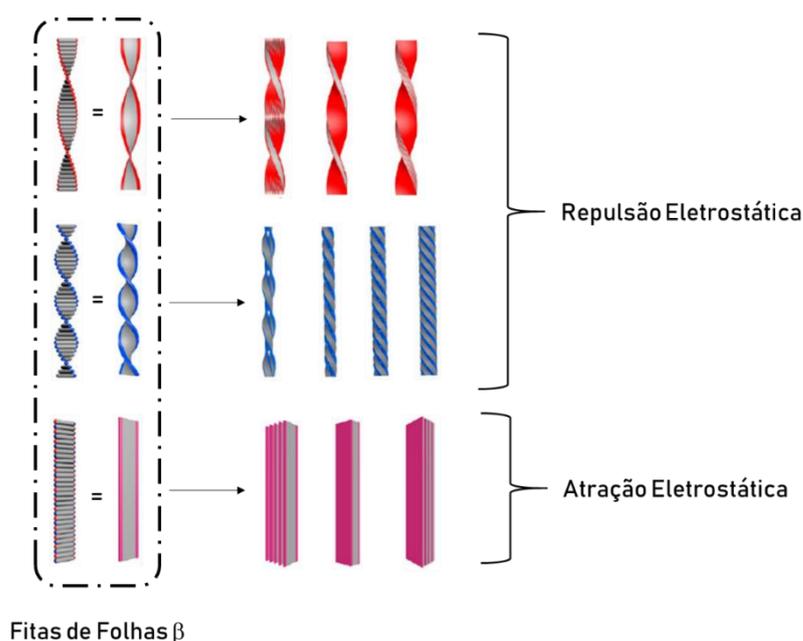


ESQUEMA 1.3 - Tipos de oligômeros do A β e suas ramificações.

Em geral, a morfologia de proteínas propensas à fibrilação depende de uma série de fatores, tais como interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio, cristalização, interações eletrostáticas, efeito estérico e interações π - π stacking.⁶⁰

As ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas são, em especial, de suma importância para o A β uma vez que são responsáveis pela formação das folhas β que caracterizam as estruturas do amilóide.

A carga dos aminoácidos terminais de um peptídeo são fundamentais na definição da morfologia do peptídeo, uma vez que definem as interações eletrostáticas.⁶⁰ As fitas de folha beta possuem uma tendência intrínseca de se torcerem, devido à quiralidade dos aminoácidos. No entanto, essa tendência é influenciada pela repulsão ou atração eletrostática ocasionada pelos aminoácidos terminais. Caso os aminoácidos terminais possuam a mesma carga, tanto negativa como positiva, as fibrilas formadas apresentam *twists* devido à repulsão eletrostática.⁶⁰ Caso os aminoácidos terminais possuam cargas opostas, as fibrilas formadas não apresentam *twists* e sim uma morfologia denominada *belt*, devido à atração eletrostática.⁶⁰ O Esquema 1.4 apresenta as possíveis morfologias do amilóide.



ESQUEMA 1.4 - Possíveis morfologias do amilóide segundo seu tipo de atração eletrostática. Fonte Adaptada: HU; et. al, 2015.

1.2.3. Toxicidade do Peptídeo Beta Amilóide

Diversas linhas de estudo indicam que o acúmulo progressivo de $A\beta$ tem uma importância significativa na gênese da Doença de Alzheimer.^{61,62} Durante muito tempo assumiu-se que o amilóide necessitava formar depósitos fibrilares no meio extracelular para possuir efeitos citotóxicos.⁶³ Na última

década, a partir do uso de beta amilóide sintético, modelos de cultura celular, APP em camundongos transgênicos e tecidos cerebrais humanos forneceram o embasamento necessário para avaliar a proposta de que indicam que as formas pré-fibrilares e solúveis de A β também são deletérias.^{61,63,64} Vários estudos indicam que as formas oligoméricas são de fato responsáveis pela perda sináptica e danos neuronais.^{63,64}

Oligômeros são capazes de perturbar a integridade das bicamadas lipídicas das células, bem como causar a separação entre os espaços intracelulares e extracelulares.^{54,55} Com arquitetura da membrana comprometida, a homeostase de íons é perturbada, levando a morte celular. Além disso, intermediários oligoméricos podem se ligar à superfície das células, formando poros, causando um influxo de íons Ca²⁺.^{56,57,58} Um aumento na concentração de íons cálcio afeta um número de enzimas reguladas pelos mesmos, causando degeneração sináptica e morte celular. Em células neuronais, perturbações de Ca²⁺ são associadas à excitotoxicidade, um processo patológico o qual é frequentemente causado pela superestimulação de neurotransmissores.^{56,57} Outros efeitos associados à presença de oligômeros incluem apoptose mediada por caspases, estresse oxidativo e disfunções mitocondriais.^{56,57,58} A Figura 1.5 ilustra as possíveis interações deletérias de diferentes formas de A β com o neurônio.

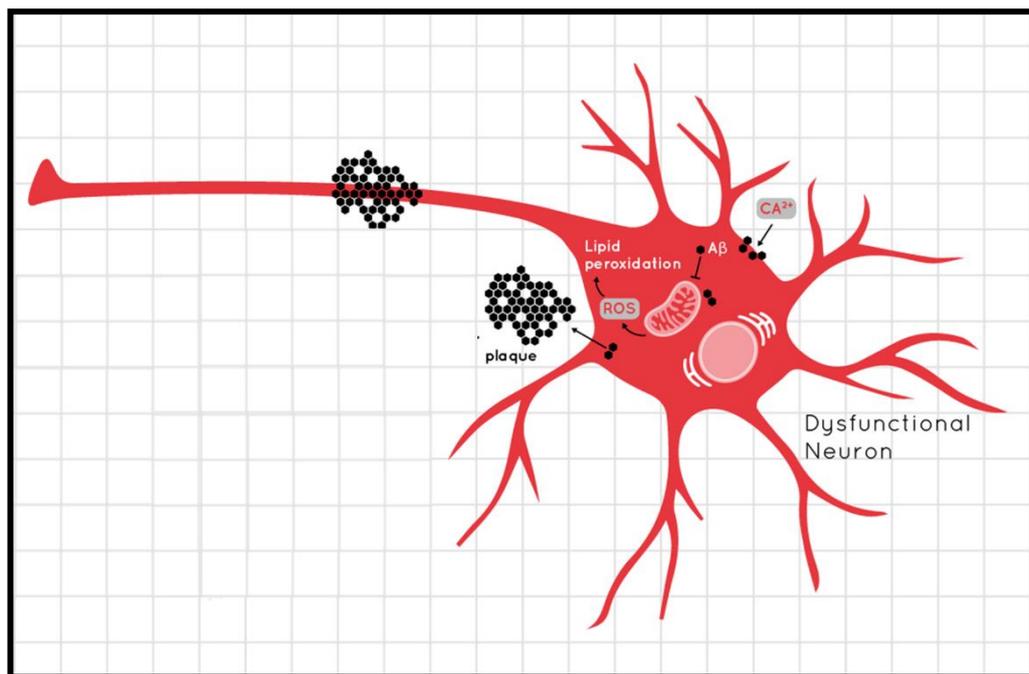


FIGURA 1.5 - Possíveis interações deletérias de diferentes formas de A β com o neurônio. Fonte Adaptada: <<https://www.arigobio.com/news/beta-amyloid-peptide-alzheimer>> Acesso em 05/07/18.

1.3. Diagnóstico de Doença de Alzheimer

Atualmente, não existe cura para a Doença de Alzheimer. No entanto, existem tratamentos sintomáticos, sendo que todos atuam contrabalanceando disfunções nos neurotransmissores.⁶⁵ Mesmo com tratamento, a doença não para de progredir, mas o faz mais lentamente. Isso provavelmente se deve ao fato de que, como não há uma forma definitiva de diagnóstico, os tratamentos são instituídos quando a DA já está em estágios mais avançados e o paciente já exibe sintomas devido à degeneração dos neurônios, o qual é um processo irreversível.⁶⁵ Como os depósitos de amiloide podem ser encontrados muitos anos antes do desenvolvimento dos sintomas da doença, marcadores sensíveis ao A β podem ser utilizados para o diagnóstico precoce.

1.3.1. Sondas Biológicas para DA

Durante a última década, houve um grande avanço no desenvolvimento de sondas biológicas por imagem para detecção de acúmulos de beta amiloide.^{66,67} As técnicas mais estudadas foram PET (do inglês *positron emission tomography*) e RMI (ressonância magnética por imagem), ambas técnicas não invasivas. Em particular, uma série de sondas PET mostraram-se eficazes como sonda para A β em cérebros de pacientes com AD. Algumas das sondas disponíveis comercialmente são o Florbetapir (¹⁸F) e o Flutemetamol (¹⁸F) lançados em 2012 e 2014, respectivamente.⁶⁶ No entanto, as técnicas de RMI e PET apresentam limitantes como baixa sensibilidade, alto custo e pouca disponibilidade de isótopos, os quais acabam restringindo seu uso clínico. Atualmente, exames de imagem por PET requerem equipamentos caros, trabalhadores treinados e exposição à radiação. Isso faz com que o custo de um único exame seja muito alto, limitando seu uso em países em desenvolvimento.

Assim, tecnologias alternativas de diagnóstico por imagem não invasivas de baixo custo e fácil aplicabilidade vem sendo cada vez mais estudadas.^{66,67,68,69,70,71} Imagens óticas por fluorescência, em especial na região do infravermelho próximo, quando comparadas as técnicas de imagens obtidas por PET e RMI, são promissoras uma vez que as medidas podem ser realizadas em tempo real, além de não serem radioativas.⁶⁶ A região do infravermelho próximo, a qual abrange comprimentos de onda entre 650 e 900 nm, é a mais pesquisada para detecções *in vivo*, uma vez que facilita a diferenciação da fluorescência de fundo de tecidos biológicos, os quais possuem uma autofluorescência entre 600 e 650 nm.⁶⁶ Algumas das sondas luminescentes atualmente utilizadas para estudos *in vitro* de A β são a Tioflavina T e o Congo Red, ambos corantes orgânicos.^{72,73} A ThT é usada para reconhecer as fibrilas do A β *in vitro*, *ex-situ* e em amostras histológicas. A ThT interage com as fibrilas do A β pelos canais formados entre as cadeias laterais adjacentes e em paralelo ao eixo de formação da fibrila. Esta

interação impede a rotação no anel da ThT levando a um aumento da fluorescência deste corante orgânico.⁷³ Apesar de amplamente utilizada, é reconhecido que a intensidade de emissão da ThT varia significativamente entre amostras de amilóide.⁷⁴ Além disso, este corante apresenta emissão em 480 nm, região onde muitas biomoléculas absorvem luz.

Um marcador luminescente ideal para A β deve possuir uma série de requisitos, dentre eles: facilidade de síntese com alto rendimento e solubilidade em meio aquoso, alta estabilidade metabólica e baixa toxicidade. O mesmo deve apresentar emissão acima de 450 nm para detecção *in vitro* e, preferencialmente, acima de 650 nm para detecção *in vivo*, alto rendimento quântico de emissão e um deslocamento de Stokes que impeça a reabsorção da luz.^{66,69} Além disso, um candidato à marcador deve também apresentar alta seletividade e afinidade de ligação com o peptídeo, apresentando alteração significativa na sua luminescência ao interagir com o amilóide.⁶⁹

1.4. Proposta de Trabalho

Neste trabalho pretendemos usar a luminescência do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4Apy)₂]²⁺ e a técnica TCSPC-FLIM (do inglês *Time Correlated Single Photon Counting-Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*) em combinação com as técnicas de TEM (Microscopia de Transmissão Eletrônica) e DC (Dicroísmo Circular) para obter em tempo real imagens das alterações estruturais produzidas nos estágios iniciais de agregação do peptídeo A β ₁₋₄₀ e de seus fragmentos A β ₁₋₂₈ (N-terminal), A β ₂₉₋₄₀ (C-terminal) e A β ₁₁₋₂₂ (região central).

1.5. Justificativa

Atualmente não existem marcadores biológicos luminescentes seletivos ao A β que mapeie todas suas fases de agregação. A técnica de

luminescência é ideal para diagnóstico por imagem, uma vez que a mesma é sensível e de baixo custo. A maioria dos compostos luminescentes estudados são corantes orgânicos, os quais, apesar de apresentarem absorção e emissão intensas na região do visível, possuem absorção e emissão muito próximas, o que promove a reabsorção da luz emitida limitando as imagens fluorescentes em tempo real. Além disso, como descrito anteriormente para a ThT, esses corantes orgânicos absorvem e emitem luz na mesma região de uma série de biomoléculas. Isso faz com que essa classe de compostos não seja ideal para ser utilizada em detecção *in vivo*, pois haveria influência da fluorescência do tecido biológico. Afim de obter uma emissão no infravermelho próximo, vários trabalhos propõem novas moléculas orgânicas com um maior número de anéis aromáticos conjugados. No entanto, a maioria das moléculas propostas apresentam baixa solubilidade em água e são difíceis de sintetizar.

O Laboratório de Fotoquímica Inorgânica e Bioinorgânica vem trabalhando com complexos de Ru(II) luminescentes para aplicação no meio biológico e, particularmente, para o diagnóstico e tratamento da Doença de Alzheimer.^{75,76} Estudos previamente conduzidos no laboratório envolviam a síntese de complexos de rutênio com dois ligantes bidentados 1,10-fenantrolina (phen) e dois ligantes monodentados aminopiridina (Apy). O trabalho desenvolvido com o complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4Apy)₂], em especial, apresentou resultados bastante interessantes para aplicação em diagnóstico por imagem luminescente, tais como absorção na região do visível e emissão larga alcançando a região do infravermelho próximo. O complexo apresentou deslocamento de Stokes de 4800 cm⁻¹, o que impede a reabsorção da luz emitida. Além disso, a fosforescência com tempo de vida longo, da ordem de 129 ns, permite obter imagens luminescentes em tempo real sem interferência da emissão de biomoléculas. Este complexo apresentou também propriedades terapêuticas como atividade antioxidante frente aos radicais hidroxila e inibição das enzimas acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE) humanas.⁷⁵ Os

complexos preparados interagiram com o $A\beta_{1-40}$ na forma monomérica sem perda da luminescência, o que permitiu acompanhar o processo de agregação pela resposta luminescente do complexo. Neste estudo foi demonstrado que este complexo é uma sonda sensível para os estágios iniciais de agregação do $A\beta$, o que permitiu obter imagens luminescentes em tempo real da formação das fibrilas para o $A\beta_{1-40}$, estruturas em forma de U e protofibrilas para o fragmento $A\beta_{15-21}$. Concomitantemente, nenhuma interação foi observada para o fragmento $A\beta_{25-35}$. Estes estudos indicaram que este complexo pode ser uma sonda luminescente sensível e específica para determinados fragmentos do $A\beta$, podendo abrir novas frentes de pesquisa, tanto do ponto de vista fundamental, no conhecimento do processo bioquímico de agregação do $A\beta$, quanto à aplicação prática deste complexo como agente teranóstico.

Como descrito anteriormente, apesar do número significativo de trabalhos que descrevem o processo de agregação do $A\beta_{1-40}$ e sobre a estrutura das fibrilas maduras, pouco se conhece sobre o processo de agregação de fragmentos do $A\beta_{1-40}$ e as alterações estruturais decorrentes deste processo. Estes resultados são de suma importância uma vez que muitos trabalhos indicam que estas alterações conformacionais estão diretamente associadas à toxicidade neuronal.

Se esta propriedade for confirmada, este complexo poderia ser usado para detectar e diferenciar superfícies características do $A\beta$. Além disso, esta informação é importante, particularmente se considerarmos a proposta vigente de nucleação secundária de monômeros onde os depósitos de placas já formados catalisam a formação de novas placas por um processo de amplificação autocatalítico.^{77,78}

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

O objetivo geral deste trabalho foi demonstrar que o complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4Apy)₂]²⁺ é um marcador biológico sensível as diferentes sequências nos resíduos de aminoácidos do Aβ, podendo ser usado para detectar e diferenciar diferentes superfícies características do Aβ.

2.2. Objetivos Específicos

- Acompanhar o processo de agregação em tempo real do peptídeo beta amilóide Aβ₁₋₄₀ e dos fragmentos Aβ₁₋₂₈ (N-terminal), Aβ₂₉₋₄₀ (C-terminal) e Aβ₁₁₋₂₂ (região aromática central do Aβ) por luminescência no estado estacionário e resolvida no tempo, obtendo-se os tempos de vida de emissão das imagens fluorescentes. Analisar a morfologia do Aβ através de medidas de dicroísmo circular e microscopia eletrônica de transmissão;

- Acompanhar o processo de agregação em tempo real do peptídeo beta amilóide Aβ₁₋₄₀ e dos fragmentos Aβ₁₋₂₈ (N-terminal), Aβ₂₉₋₄₀ (C-terminal) e Aβ₁₁₋₂₂ (região aromática central do Aβ) incubado com diferentes concentrações do complexo por luminescência no estado estacionário e resolvida no tempo, obtendo-se os tempos de vida de emissão das imagens fluorescentes. Analisar a influência do complexo na morfologia do Aβ através de medidas de dicroísmo circular e microscopia eletrônica de transmissão;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes

Os reagentes usados nas sínteses dos complexos - RuCl₃.3H₂O, 1,10-fenantrolina (phen), cloreto de lítio (LiCl), 3,4-diaminopiridina (3,4Apy) e

hexafluorofosfato de amônio (NH_4PF_6) - foram todos de procedência Sigma-Aldrich. Na preparação das soluções tampão foram usados fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) e fosfato de potássio bibásico (K_2HPO_4) e cloreto de sódio (NaCl) de procedência Synth. Todos os solventes orgânicos usados nas sínteses possuem grau de pureza HPLC. Água MilliQ foi usada para a preparação de todas as soluções aquosas deste trabalho.

Os peptídeos beta amilóide foram adquiridos da empresa GenScript liofilizados e com 99% de pureza. Os fragmentos usados neste trabalho foram $\text{A}\beta_{1-40}$, $\text{A}\beta_{1-28}$, $\text{A}\beta_{11-22}$ e $\text{A}\beta_{29-40}$. O hidróxido de sódio (NaOH) usado foi de procedência Synth e o DMSO para biologia molecular foi de procedência Sigma-Aldrich.

3.2. Síntese dos Complexos

3.2.1. Síntese do precursor *cis*-[Ru(phen)₂Cl₂]

O complexo precursor foi sintetizado seguindo o procedimento previamente descrito na literatura.⁷⁹ 0,38 mmols de $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0,76 mmols de 1,10-fenantrolina e 2,6 mmols de cloreto de lítio foram solubilizados em 15 mL de dimetilformamida previamente desaerado. A mistura reacional foi mantida em refluxo por 8 horas em atmosfera de nitrogênio, agitação constante e ausência de luz. Após o término do tempo de reação, a mistura foi resfriada a temperatura ambiente. Na sequência adicionou-se 200 mL de acetona previamente destilada e resfriada. A mistura foi mantida sob refrigeração durante uma noite para garantir total precipitação. O sólido obtido foi filtrado a vácuo e lavado com água destilada até que a água mãe ficasse incolor. O complexo de coloração roxa foi seco e o rendimento obtido foi de 61%.

3.2.2. Síntese do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4Apy)₂]. 2PF₆

O complexo foi preparado a partir de 0,1 mmol do precursor *cis*-[Ru(phen)₂Cl₂] e 0,2 mmol do ligante 3,4-diaminopiridina solubilizados em 12 mL de uma mistura etanol/água (1:1) previamente desaerada e sob agitação contínua. O sistema foi mantido sob refluxo por oito horas sob atmosfera de nitrogênio puro, agitação e ausência de luz. A mistura foi filtrada ainda quente e o sistema foi então resfriado a temperatura ambiente. Uma vez resfriado, foram adicionados 0,2 mmols do contra íon hexafluorofosfato de amônio. A mistura permaneceu sob refrigeração durante uma noite para a precipitação completa do complexo. Este foi filtrado a vácuo e lavado com água gelada. O complexo vermelho foi filtrado e o rendimento obtido foi de 65%.

3.3. Equipamentos e Metodologia

3.3.1. Análise Elementar

Para a determinação da porcentagem de carbono, nitrogênio e hidrogênio foi utilizado um analisador de C, H e N modelo EA 1108 da FISONs, na central analítica do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

3.3.2. Espectroscopia de UV-vis

Os espectros de absorção eletrônica na região UV-vis foram obtidos utilizando um espectrofotômetro Agilent 8453A. Foram utilizadas celas de quartzo de caminho ótico 10 mm e volume 3,5 mL para as análises do complexo e celas de caminho ótico 10 mm e volume 1,5 mL para as análises com o Aβ.

3.3.3. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear foram obtidos em um espectrômetro BRUKER DXR 400 MHz e 600 MHz pertencentes ao

Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

3.3.4. Espectroscopia de Luminescência

Os espectros de emissão e excitação foram obtidos no espectrofluorímetro Shimadzu modelo RF-5301 PC - lâmpada de alta pressão de xenônio de 150 W e fotomultiplicadora do tipo R928. Foram utilizadas celas de quartzo de quatro lados de caminho ótico 10 mm e volume 3,5 mL.

3.3.5. Tempo de Vida de Emissão

Os experimentos de tempo de vida foram realizados no Laboratório de Fotobiofísica da FFCLRP – USP junto ao grupo do Prof. Dr. Amando Siuiti Ito. A fonte de excitação é um laser pulsado Tsunami 3950 (Spectra Physics) de titânio-safira (Ti:sapphire) bombeado por laser de estado sólido Millenia Xs (Spectra Physics), de Nd:YVO₄, que tem saída com potência máxima de 10 W no comprimento de onda 350 nm. O método de contagem de fótons únicos correlacionado pelo tempo (TCSPC) foi utilizado para determinar o tempo de vida de emissão. O software F900 foi utilizado para o ajuste dos dados experimentais de decaimento a funções multiexponenciais, baseado no método de ajustes de funções não lineares dos mínimos quadrados. A qualidade do ajuste realizado pelo software foi avaliada pelo parâmetro χ^2 .

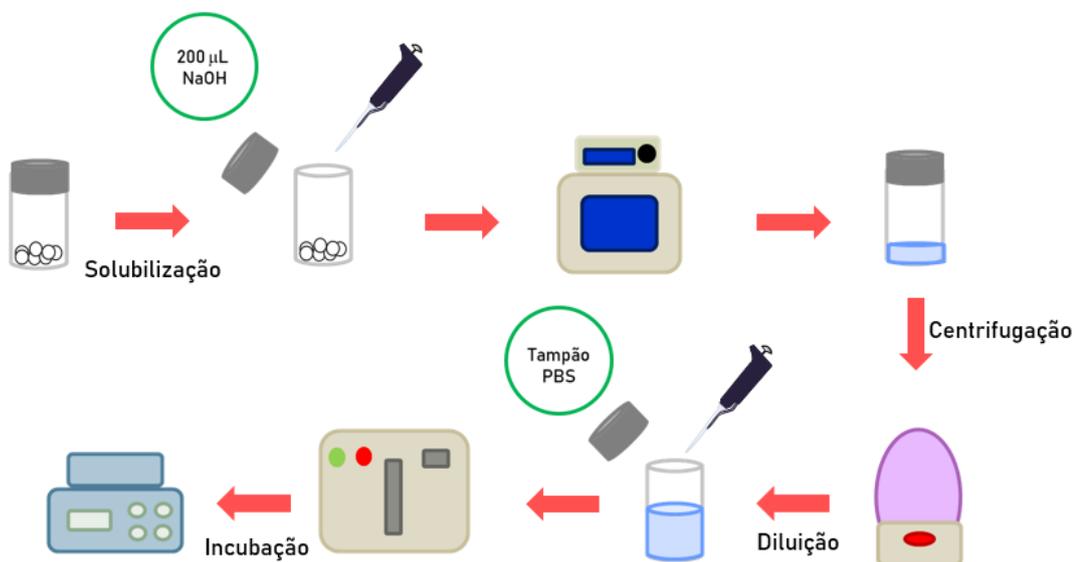
3.3.6. Estudo do processo de agregação do A β

O primeiro passo no preparo da solução estoque do peptídeo beta amilóide é a solubilização do liofilizado e a eliminação de possíveis agregados pré-existentes. Para isso, o liofilizado foi solubilizado em 200 μ L de NaOH (150 μ L de uma solução 2 μ M e 50 μ L de uma solução 100 μ M). Essa solução foi sonicada por 2 minutos em um banho de ultrassom e, em seguida, filtrada em filtros de centrífuga (VWR) de porosidade 0,2 μ m. A solução foi então diluída em

tampão PBS (100 mM; pH 7,4. 150 mM de NaCl). É importante ressaltar que, uma vez em solução, a solução estoque de A β foi mantida em banho de gelo.

A solução estoque foi então diluída para a concentração desejada para cada um dos experimentos. Quando os mesmos foram conduzidos incubando o peptídeo com o complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4Apy)₂]. 2PF₆ ou outro padrão luminescente, o mesmo procedimento foi seguido, no entanto o volume da solução do complexo foi levado em consideração. A solução de complexo para estes experimentos foi preparada utilizando a mesma solução tampão utilizada na diluição do peptídeo e uma quantidade mínima de DMSO para biologia molecular. O dimetilsulfóxido é adicionado para garantir a total solubilização do complexo em solução. Sua porcentagem na solução estoque de complexo foi de 10%.

O Esquema 3.1 ilustra a metodologia utilizada no monitoramento do processo de agregação do peptídeo beta amilóide.



ESQUEMA 3.1 - Esquema da metodologia utilizada no monitoramento do processo de agregação do peptídeo beta amilóide.

3.3.7. Dicroísmo Circular

Os espectros de dicroísmo circular foram obtidos utilizando o espectrômetro Jasco J-815 pertencente ao Grupo de Biofísica Molecular “Sérgio Mascarenhas” do Departamento de Física da Universidade de São Paulo – Campus II São Carlos com a colaboração do Prof. Dr. Otaciro Rangel Nascimento. Para as medidas foi utilizada uma cubeta despolarizada de caminho ótico 5 mm e volume 500 μL .

3.3.8. Microscopia de Imagem por Tempo de Vida de Fluorescência (TCSPC-FLIM)

As imagens por tempo de vida de fluorescência foram obtidas em um sistema de medidas de fluorescência com resolução temporal acoplado à microscopia confocal MT-200 – PicoQuant, microscópio invertido de detecção Olympus junto ao grupo do Prof. Dr. Amando Siuiti Ito. Para excitar a amostra foi empregado o laser de diodo pulsado de 450 nm (LDH-D-C-450) e para a emissão foi utilizado o filtro BLP-488R. As amostras, em solução, foram analisadas em lamínulas Deckgläser 20x20 mm. As imagens foram adquiridas e processadas pelo software operacional do microscópio, SymPhoTime, e as resoluções foram mantidas em 256x256 pixels.

3.3.9. Microscopia de Transmissão Eletrônica (TEM)

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão foram realizadas no Laboratório Nacional de Nanotecnologia – LNNano/CNPEM junto ao Laboratório de Microscopia Eletrônica (Processos TEM-20515/TEM-21480/ME-22280). Para a obtenção das imagens foi utilizado o microscópio JEOL-1400 PLUS, tensão de 120 kV e filamento LaB₆. As imagens foram adquiridas por uma câmera Gatan CCD com resolução 4K x 4K. As amostras foram preparadas pela técnica de contrastação negativa (*negative staining*) em grades de cobre 400 mesh tipo Lacey recobertas por filme ultrafino de carbono. As grades foram carregadas negativamente por uma corrente de -15 mA pelo

equipamento PELCO EasiGlow. 3 μL da amostra foram colocados sobre a grade por 60 segundos e a mesma foi subsequentemente seca com papel de filtro. Logo após, 3 μL de água MilliQ foram adicionados e secos logo em seguida. Para recobrir as grades foram adicionados 3 μL de acetato de uranila 2% por 30 segundos. A análise das imagens foi realizada utilizando o programa ImageJ e o tratamento estatístico foi realizado utilizando Excel.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4Apy)₂]. 2PF₆

A caracterização do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4Apy)₂]. 2PF₆, bem como suas propriedades biológicas, já foram realizadas e estudadas previamente pelo grupo.⁷⁵ Os resultados de caracterização abaixo foram reproduzidos afim de confirmar a obtenção do complexo e sua pureza.

4.1.1. Análise Elementar

A Tabela 4.1 apresenta os dados referentes à porcentagem em massa de C, N e H para o complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4Apy)₂]. 2PF₆ obtidos por análise elementar. Os resultados experimentais estão em concordância com os resultados teóricos, conforme a fórmula mínima proposta C₃₄H₃₀F₁₂N₁₀P₂Ru.

TABELA 4.1 - Análise elementar das porcentagens referente as quantidades de C, H e N para o complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4Apy)₂]. 2PF₆ considerando a fórmula mínima C₃₄H₃₀F₁₂N₁₀P₂Ru.

M.M. (g/mol)	Análise Elementar Experimental		
	(Teórica) %		
	C	H	N
969,67	40,61 (42,11)	3,07 (3,12)	13,15 (14,44)

4.1.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN de ¹H para o complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4Apy)₂]²⁺ e ligante 3,4-diaminopiridina obtidos em DMSO-d₆ são apresentados na Figura 4.1. Os sinais referentes aos ligantes 1,10-fenantrolina estão na região de 7,45 e 9,45 ppm enquanto os sinais referentes aos ligantes 3,4-diaminopiridina estão na região entre 4,68 e 7,48 ppm. A atribuição de todos os sinais é apresentada na Tabela 4.2. Os resultados obtidos são consistentes com a geometria octaédrica proposta, contendo dois ligantes 1,10-fenantrolina bidentados e dois ligantes 3,4-diaminopiridina monodentados. A ausência de sinais referentes ao precursor e ligante livre indica a pureza do complexo, a qual também pode ser observada pela análise elementar. É importante ressaltar que os estudos de caracterização por RMN foram feitos em DMSO-d₆ afim de atribuir os sinais referentes aos hidrogênios dos grupos amino das aminopiridinas, atribuição essa a qual não pode ser realizada em D₂O.

TABELA 4.2 - Atribuição dos sinais do espectro de RMN ^1H para o complexo *cis*- $[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{Apy})_2]^{2+}$ em DMSO- d_6 .

H	δ_{H} (ppm); <i>mult.</i> (J em Hz); H
d,d'	4,68; s; 4
c,c'	5,88; s; 4
b,b'	6,25; d (6,2); 2
a,a'	7,31; 7,31 d (6,2); 2
e,e'	7,48; s; 2
7,7'	7,58; m; 2
8,8'	7,97; dd (5,3/1,2); 2
5,5'	8,20; d (8,8); 2
2,2'	8,27; m; 2
4,4'	8,31; d (8,8); 2
6,6'	8,48; dd (8,2/1,2); 2
3,3'	8,85; dd (8,2/1,2); 2
1,1'	9,45; dd (5,3/1,2); 2

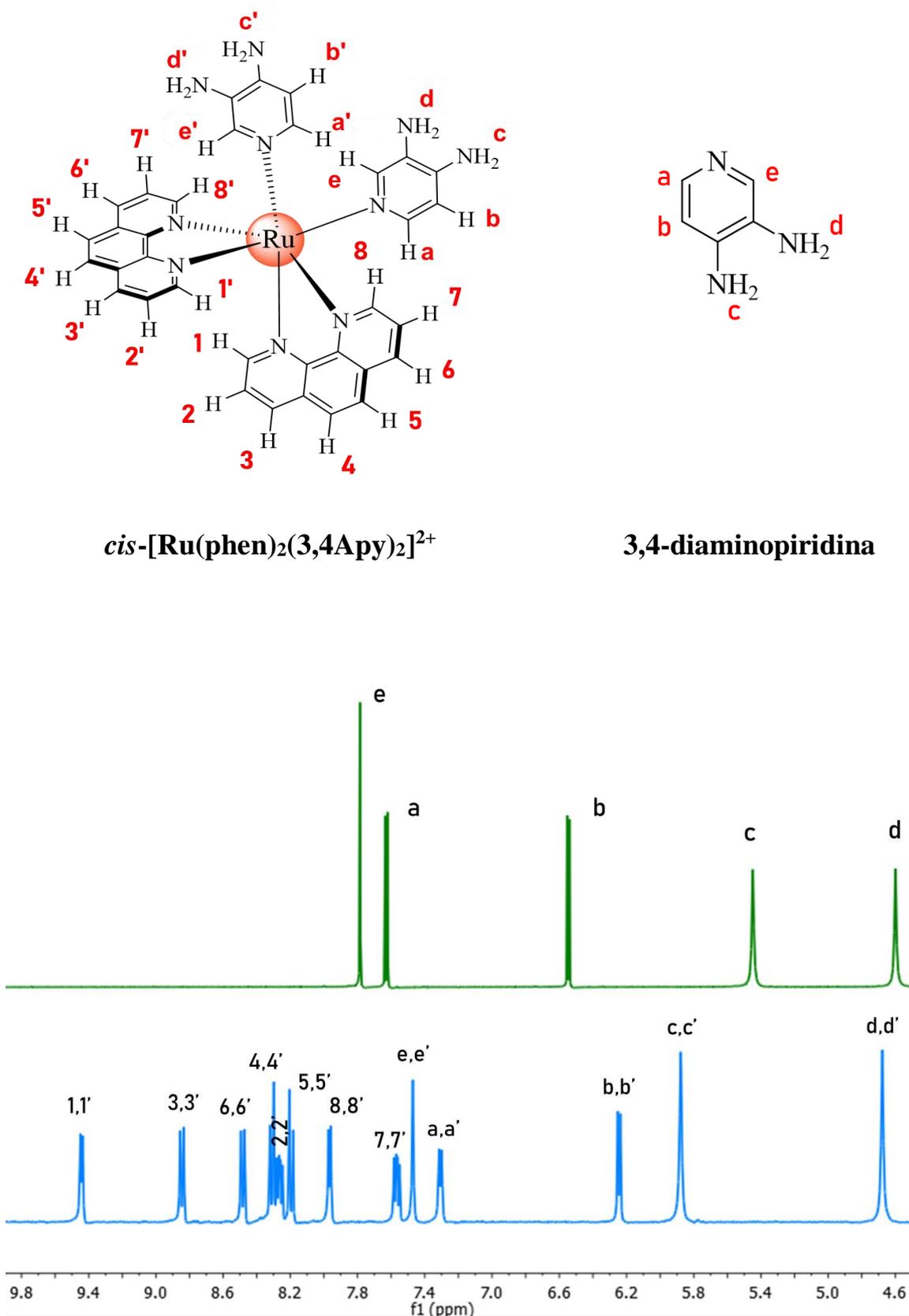


FIGURA 4.1 - Espectros de RMN ^1H 400 MHz em DMSO- d_6 para o complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{Apy})_2]^{2+}$ (azul) e 3,4-diaminopiridina (verde).

4.1.3. Espectroscopia de UV-vis

A Figura 4.2 apresenta os espectros de absorção UV-vis do complexo precursor *cis*-[Ru(phen)₂Cl₂] e do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4Apy)₂]²⁺. O precursor apresenta duas bandas de absorção, uma em 270 nm referente à transição de transferência de carga entre os ligantes fenantrolina (transição ILCT), e outra em 555 nm referente a transição de transferência de carga metal-ligante que ocorre entre os orbitais dπ do metal Ru(II) e os orbitais π* dos ligantes fenantrolina (transição MCLT). A Figura 4.2 mostra o deslocamento do máximo de absorção para menor comprimento de onda com a troca dos íons cloreto (doador-π) pelos ligantes aminopiridinas (receptor-π). Isto ocorre devido à estabilidade adicional conferida pelos ligantes 3,4-diaminopiridina ao substituir os ligantes cloreto. Os ligantes cloretos são doadores σ e π, enquanto que os ligantes aminopiridina se coordenam ao metal através dos pares de elétrons não ligantes do nitrogênio do anel fazendo ligações σ. No entanto, as aminopiridinas possuem anel aromático o que confere a este ligante características π receptoras, estabilizando a ligação.

A obtenção de uma banda de absorção com características de MLCT é, para este trabalho, bastante importante, devido ao valor de absorvidade molar considerável ($\epsilon = 8200 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Isso significa que essa transição em particular é capaz de absorver uma quantidade de luz significativa, favorecendo sua aplicação ótica. Além disso, uma transição de MLCT pode favorecer a emissão de luz por fosforescência.

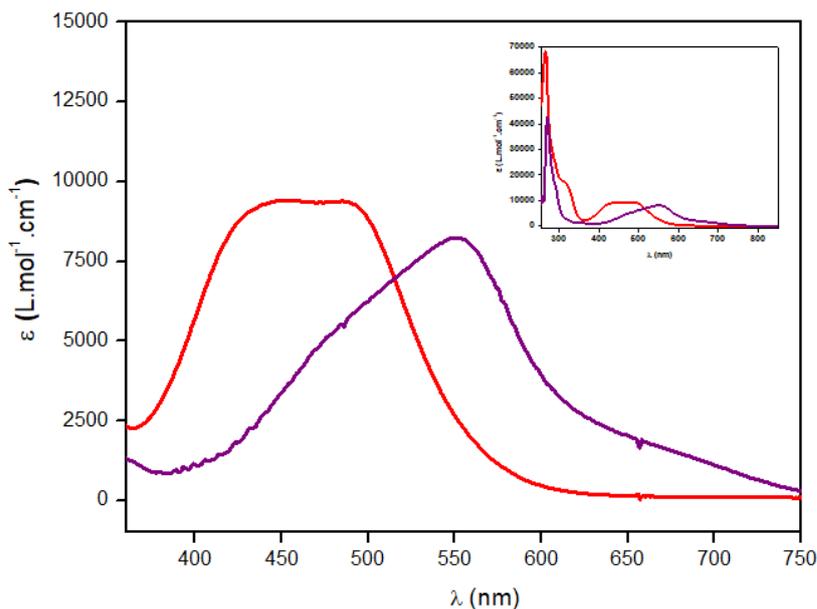


FIGURA 4.2 - Espectros de absorção UV-vis do complexo precursor *cis*-[Ru(phen)₂Cl₂] (roxo) e do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4Apy)₂]²⁺ (vermelho) em acetonitrila.

Já o complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4Apy)₂]²⁺ apresenta uma banda na região do ultravioleta em 267 nm e um ombro em 320 nm, referentes as transições entre os orbitais π - π dos ligantes. O complexo de interesse mantém sua banda de MLCT, agora uma banda larga com máximo em 480 nm, referente à transição $(d\pi)Ru^{2+} \rightarrow (\pi^*)phen$. O valor de absortividade molar para o complexo aumenta para 9400 L.mol⁻¹.cm⁻¹, e o alargamento da banda de absorção com a entrada das aminopiridinas indicam possíveis transições $Ru^{2+} \rightarrow 3,4Apy$ na mesma região da MLCT (Ru(II) \rightarrow phen).

4.1.4. Luminescência e Tempo de Vida

O complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4Apy)₂]²⁺ apresenta uma banda de emissão larga (550 a 850 nm) com máximo em 655 nm e intensidade de emissão considerável até 750 nm, enquanto o precursor *cis*-[Ru(phen)₂Cl₂] não apresenta emissão (FIGURA 4.3). Isso se deve ao fato de que a presença dos ligantes cloreto favorece os processos de decaimento para o estado fundamental de forma não

radiativa. Já a presença dos ligantes 3,4-diaminopiridina altera as energias dos estados excitados reativos, aproximando os estados excitados centrados no metal que são dissociativos aos estados da MLCT, favorecendo as transições radiativas fosforescentes.

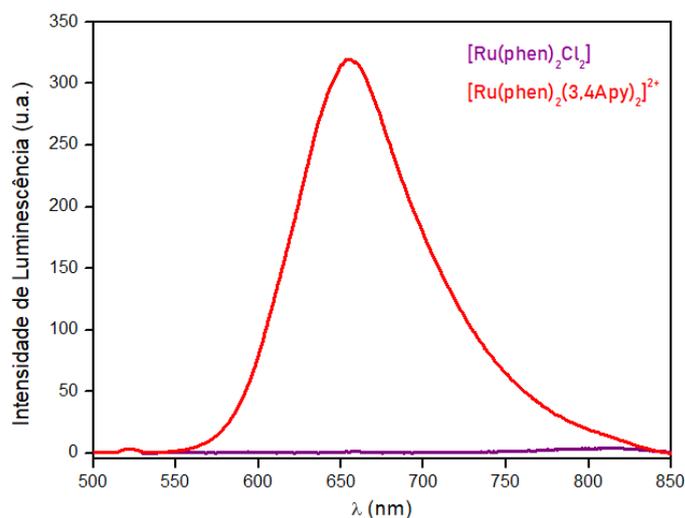


FIGURA 4.3 - Espectros de emissão do complexo precursor *cis*-[Ru(phen)₂Cl₂] (roxo) e do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4Apy)₂]²⁺ (vermelho) em acetonitrila com excitação em 480 nm.

O espectro de excitação do complexo se assemelha à banda de MLCT do complexo, indicando que a emissão é proveniente dessa transição. O complexo apresenta um deslocamento de Stokes na ordem de 4800 cm⁻¹, havendo pouca sobreposição das bandas de emissão e excitação. Isso indica que processos de autofluorescência são improváveis, não havendo reabsorção da própria luz emitida.

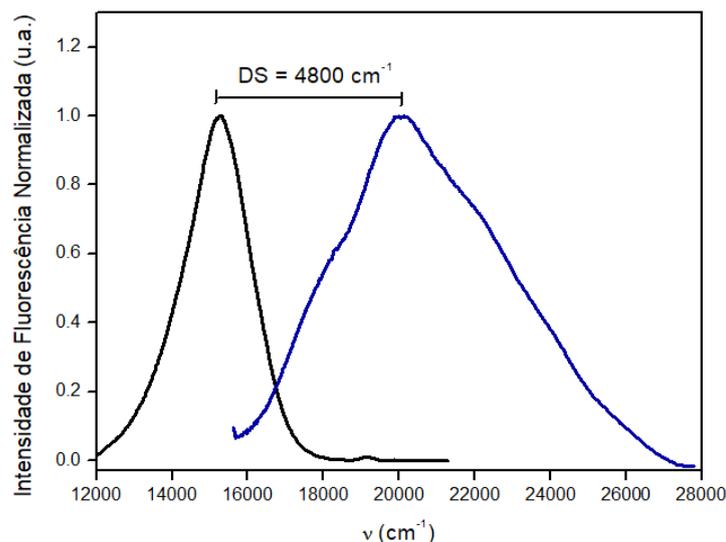


FIGURA 4.4- Espectros de emissão (preto) e excitação (azul) do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4Apy)₂]²⁺ em tampão fosfato pH 7,4 com emissão em 655 nm.

O comprimento de onda de emissão e o deslocamento de Stokes apreciável são requisitos muito importantes para um marcador biológico luminescente porque impedem a reabsorção da luz emitida. Os comprimentos de onda de emissão obtidos para o complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4Apy)₂]²⁺ são ideais tanto para aplicações *in vitro* como *in vivo*. Como o complexo absorve luz na região do visível e emite no infravermelho próximo, não existe sobreposição com a janela terapêutica da maioria das biomoléculas, as quais absorvem luz na região do ultravioleta/início do visível.

O complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4Apy)₂]²⁺ apresenta dois tempos de vida de emissão distintos: um tempo longo majoritário de 129,3 ns e um tempo mais curto de 1,23 ns (TABELA 4.3). O tempo de vida de emissão mais longo é proveniente da emissão da MLCT e indica que o estado excitado alcançado é o tripleto. Para retornar ao estado fundamental é necessária a inversão de spin, conferindo à transição um tempo de vida de emissão mais longo. O segundo tempo de vida de emissão é provavelmente proveniente de uma transição onde o estado excitado é singleto, pois o mesmo é muito curto.

TABELA 4.3 - Tempos de vida de emissão do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4Apy)₂]²⁺ em tampão fosfato pH 7,4.

	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	χ^2
Tampão (pH 7.4)	129,3 (99,7%)	1,23 (0,3%)	1,1

4.2. Estudos de Luminescência com A β ₁₋₄₀

Afim de estudar a interação do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4Apy)₂]²⁺ com o peptídeo beta amilóide foi, inicialmente, investigado o peptídeo A β ₁₋₄₀, o qual representa o monômero proveniente da clivagem do APP. Foram realizados experimentos de luminescência e TCSPC-FLIM para este fragmento.

4.2.1. Estudos de Emissão

Um dos requisitos necessários para um bom marcador biológico luminescente é interagir com o alvo em questão e apresentar mudanças em sua emissão, sejam elas em termos de intensidade de emissão ou tempo de vida de emissão. Para avaliar o complexo quanto a esse quesito foram realizados estudos de luminescência. Como controle foi usado a Tioflavina T, a qual é atualmente um padrão para ensaios *in vitro* com o peptídeo beta amilóide.

A Figura 4.5. (A) mostra os espectros de emissão da ThT em função do tempo de incubação do A β ₁₋₄₀ na presença deste corante. A Figura 4.5. (B) mostra o gráfico da intensidade de emissão da ThT (480 nm) normalizado em função do tempo de incubação A β ₁₋₄₀/ThT onde pôde-se observar um aumento na intensidade de emissão com o progresso da agregação do peptídeo. No entanto, é importante ressaltar que, nos estágios iniciais de agregação, a ThT apresenta uma baixa intensidade de emissão. Isso está diretamente correlacionado à estrutura da Tioflavina, mais especificamente ao seu eixo de rotação, o qual é livre e impede

a emissão desse corante em solução (FIGURA 4.6). A emissão da ThT nos estágios avançados da agregação do A β ocorre quando este eixo de rotação não pode mais girar, isto é, quando a ThT se liga as folhas beta do amilóide. Portanto a interação ThT-A β só é eficaz quando a estrutura secundária do A β já está definida, ou seja, os estágios finais de agregação.

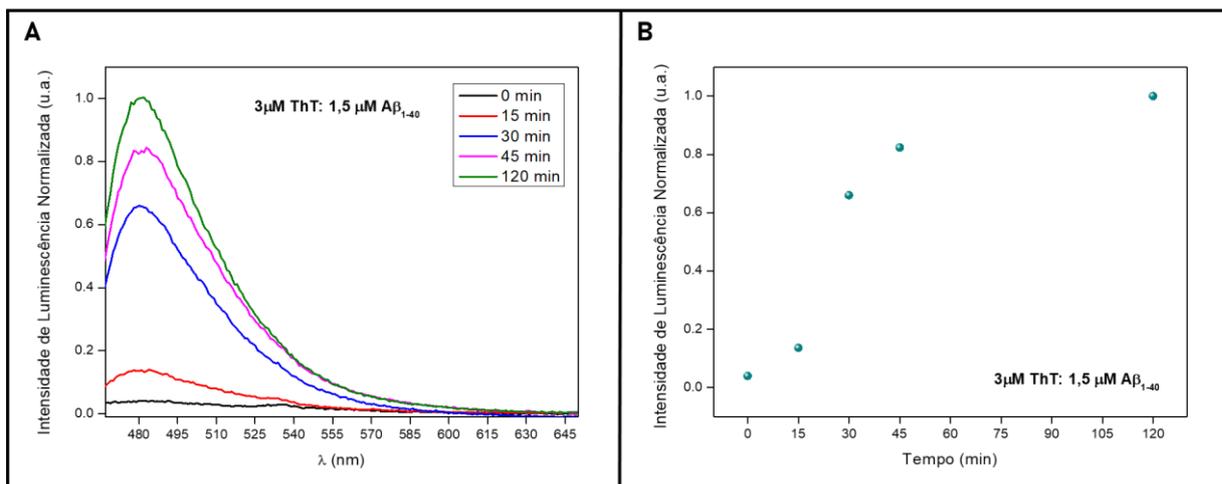


FIGURA 4.5 - Espectros de emissão em tampão fosfato pH 7,4 (150mM NaCl) da interação ThT-A β na proporção 2:1 (ThT:A β) (A) e gráfico intensidade de emissão normalizado vs. tempo de incubação em minutos (B).

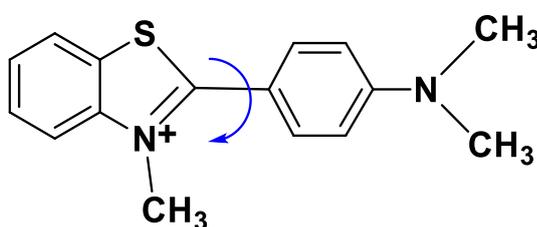


FIGURA 4.6 - Estrutura da Tioflavina T.

O complexo também apresenta um aumento na intensidade de emissão a medida que a agregação do amilóide progride. No entanto, ao contrário da ThT, o complexo aparenta ser mais sensível aos estágios iniciais de agregação

uma vez que é possível ver o aumento da intensidade em pequenos incrementos e não em grandes saltos como ocorre com a ThT (FIGURA 4.7).

O complexo também é eficaz em acompanhar a agregação do amilóide quando usado em baixas concentrações ($5 \mu\text{mol.L}^{-1}$) bem como proporções baixas de complexo: $A\beta_{1-40}$ ($5\mu\text{M}:50\mu\text{M}$), levando a conclusão de que a interação entre o complexo e o amilóide é independente da estrutura secundária apresentada pelo $A\beta_{1-40}$.

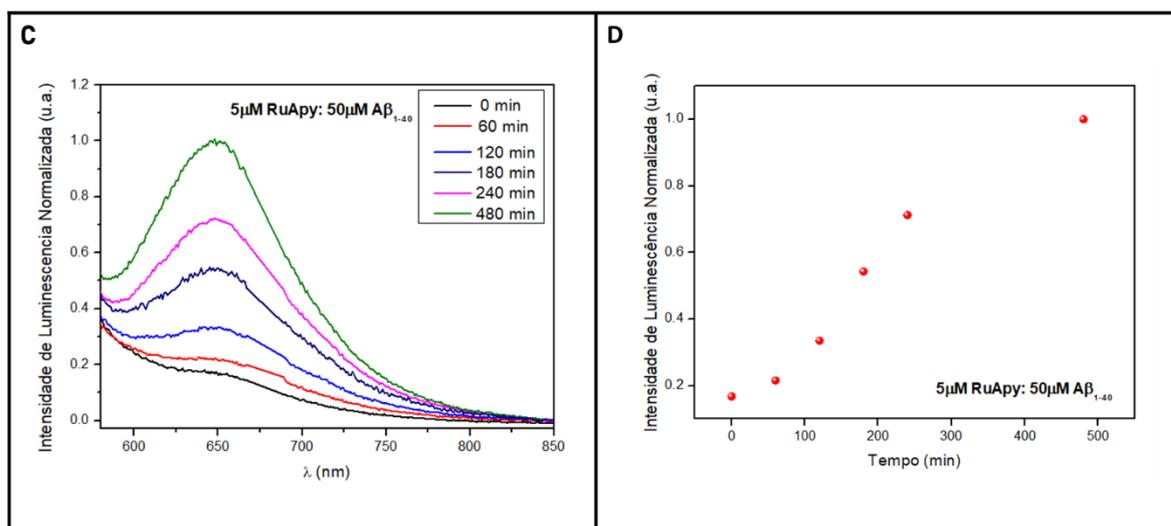


FIGURA 4.7 - Espectros de emissão em tampão fosfato pH 7,4 (150mM NaCl) obtidos da interação complexo- $A\beta$ na proporção 1:10 complexo- $A\beta$ (C) e gráfico intensidade de emissão em 450 nm normalizado vs. tempo de incubação em minutos (D).

Portanto conclui-se que o complexo apresenta características similares à Tioflavina, uma vez que é capaz de monitorar a agregação do $A\beta_{1-40}$ através do aumento da intensidade de luminescência. No entanto, ao comparar os dois sistemas, o complexo apresenta vantagens frente à ThT uma vez que consegue interagir com o $A\beta_{1-40}$ em estágios iniciais de agregação e é capaz de fazê-lo em baixas concentrações em relação à concentração do amilóide.

4.2.2. Estudo de tempo de vida de emissão através de Imagens de TCSPC-FLIM

Uma vez confirmada a interação entre o complexo e o beta amilóide, imagens por tempo de vida de emissão através da técnica de TCSPC-FLIM foram adquiridas a fim de avaliar a capacidade do complexo de atuar como marcador biológico através da luminescência do mesmo.

A técnica de FLIM (do inglês *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*) faz uso do fato de que o tempo de vida de um fluoróforo depende do seu ambiente molecular, mas não de sua concentração.⁸⁰ O método de contagem de fótons únicos correlacionados pelo tempo (TCSPC) foi utilizado para determinar o tempo de vida de emissão, método esse o qual possui alta resolução temporal, eficiência de fótons e precisão do tempo de vida. As amostras em tampão fosfato pH 7,4 (150mM NaCl) foram excitadas em 470 nm e a emissão observada a partir de 488 nm.⁸⁰

Vale ressaltar que várias biomoléculas têm em comum anéis aromáticos que absorvem e emitem luz, apresentando tempos de vida de emissão similares, como por exemplo, o triptofano, cujo tempo de vida de emissão é de 3,1 ns.⁸¹ Essa sobreposição nos tempos de vida de emissão dificulta as análises de biomoléculas em geral na região do UV-vis próximo por medidas de tempo de vida. Em relação ao A β , a excitação com luz de 270 nm alcança os estados excitados da tirosina que emite na região de 240 a 450 nm.⁸² Isto mostra a necessidade de uma sonda luminescente que absorva e emita luz em uma janela de comprimentos de onda maior que 450 nm. Por isso usamos os comprimentos de onda de excitação e emissão do complexo para conseguir, sem interferências, mapear a agregação do A β pelas respostas luminescentes do complexo.

As Figuras 4.8 e 4.10 apresentam as imagens obtidas em tempo real durante o progresso da agregação do A β_{1-40} incubado na ausência e na presença

do complexo respectivamente. Todas as amostras foram preparadas em tampão PBS pH 7,4, 150mM de NaCl.

A análise das curvas de decaimento cinético para o $A\beta_{1-40}$ sem o complexo levou a um ajuste da equação para uma função bi-exponencial com tempo de vida de emissão médio de 3,5 ns (TABELA 4.4). O peptídeo beta amilóide apresentou uma emissão de fluorescência intrínseca a partir de 488 nm. A presença dos aminoácidos aromáticos (Phe4, Tyr10, Phe19 e Phe20) e a delocalização de elétrons através das ligações de hidrogênio das folhas beta formadas na agregação podem ser responsáveis pela emissão.^{82,83}

Como mostram os dados da Tabela 4.4 não houve alterações significativas nos tempos de vida de emissão durante o processo de agregação. Entretanto a contagem de fótons das imagens aumentou consideravelmente: 488 no tempo zero para 3354 nos estágios avançados da agregação (240 min), o que corrobora com a proposta da delocalização dos elétrons por ligação hidrogênio ser responsável pela emissão do $A\beta_{1-40}$ (FIGURA 4.8).

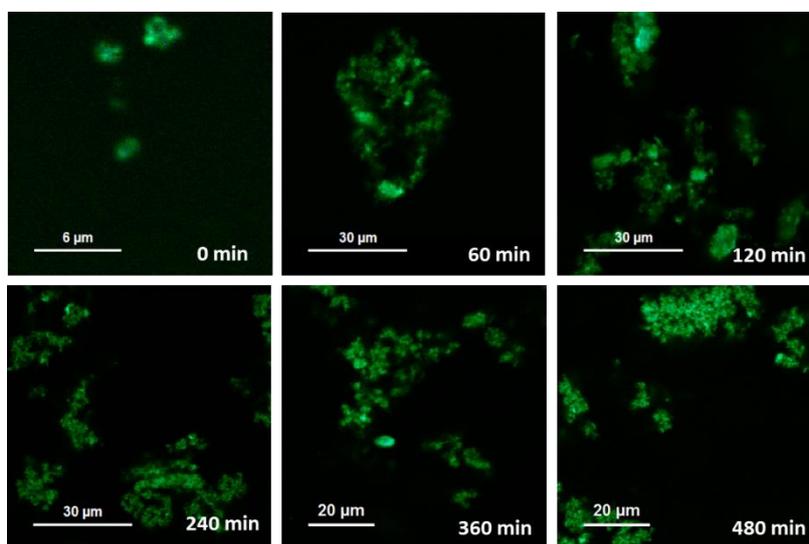


FIGURA 4.8 - Imagens de FLIM do processo de agregação do $A\beta_{1-40}$ em tampão fosfato pH 7,4 (150 mM NaCl) em diferentes tempos de incubação na ausência de complexo. Excitação em 470 nm e leitura de emissão acima de 488 nm.

TABELA 4.4 - Tempos de vida de emissão das imagens das amostras de A β_{1-40} sem complexo em tampão fosfato pH 7,4 (150 mM NaCl) obtidas com excitação em 470 nm e leitura de emissão acima de 488 nm.

Tempo de Incubação	τ (ns)	%	χ^2	τ médio (ns)
0 min	$\tau_1 = 3,81 \pm 0,03$	70,92	1,098	$3,51 \pm 0,01$
	$\tau_2 = 1,14 \pm 0,04$	29,08		
60 min	$\tau_1 = 3,90 \pm 0,01$	64,85	1,339	$3,52 \pm 0,01$
	$\tau_2 = 1,15 \pm 0,03$	35,15		
120 min	$\tau_1 = 3,85 \pm 0,02$	59,62	1,698	$3,41 \pm 0,01$
	$\tau_2 = 1,06 \pm 0,04$	40,38		
240 min	$\tau_1 = 3,88 \pm 0,01$	60,25	1,643	$3,44 \pm 0,01$
	$\tau_2 = 1,06 \pm 0,01$	39,75		
360 min	$\tau_1 = 3,93 \pm 0,02$	67,22	1,307	$3,59 \pm 0,01$
	$\tau_2 = 1,12 \pm 0,02$	32,78		
480 min	$\tau_1 = 3,87 \pm 0,01$	62,36	1,421	$3,48 \pm 0,01$
	$\tau_2 = 1,03 \pm 0,01$	37,64		

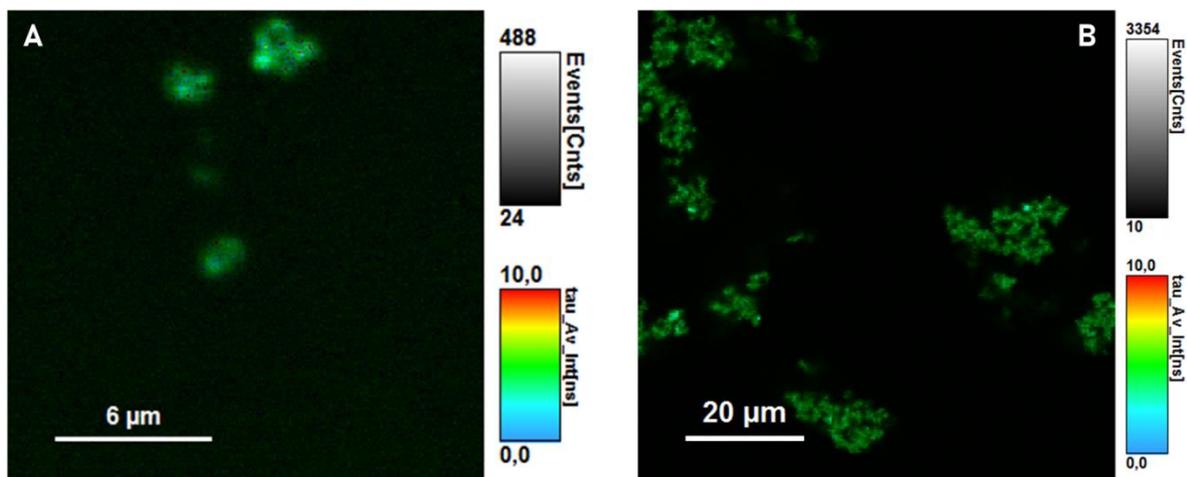


FIGURA 4.9 - Imagens de FLIM do processo de agregação do A β_{1-40} em tampão fosfato pH 7,4 (150 mM NaCl) nos tempos (A) 0 min e (B) 240 min de incubação obtidas com excitação em 470 nm e leitura de emissão acima de 488nm. A contagem de fótons para a imagem em 0 min é de 488 enquanto a de 240 min é de 3354.

A Figura 4.10 mostra as imagens obtidas durante o progresso da agregação do A β_{1-40} incubado com complexo e a Tabela 4.5 mostra os tempos de vida de emissão obtidos.

Nas imagens obtidas tanto na ausência como na presença do complexo é possível identificar claramente os depósitos de amilóide, com pequenos aglomerados globulares. Ambas as imagens com e sem complexo apresentam alta definição, atestando a sensibilidade da técnica por tempo de vida de emissão para obtenção de imagens por luminescência. No entanto, as imagens do A β_{1-40} incubado com o complexo apresentaram uma contagem de fótons muito maior. Para o tempo de 360 min de agregação, por exemplo, obteve-se uma contagem de fótons de 2376 na ausência do complexo enquanto que na presença do mesmo a contagem observada foi de 22712, (FIGURA 4.11) facilitando assim a identificação dos depósitos de amilóide por imagem.

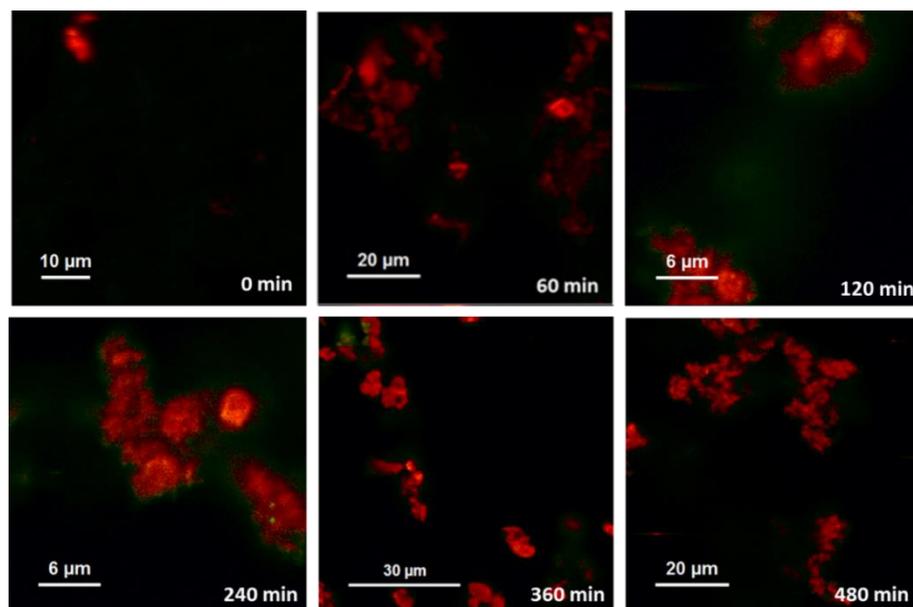


FIGURA 4.10 - Imagens de FLIM do processo de agregação do $A\beta_{1-40}$ em tampão fosfato pH 7,4 (150 mM NaCl) em diferentes tempos de incubação na presença de complexo (3 $A\beta$:1 complexo). Excitação em 470 nm e emissão acima de 488 nm.

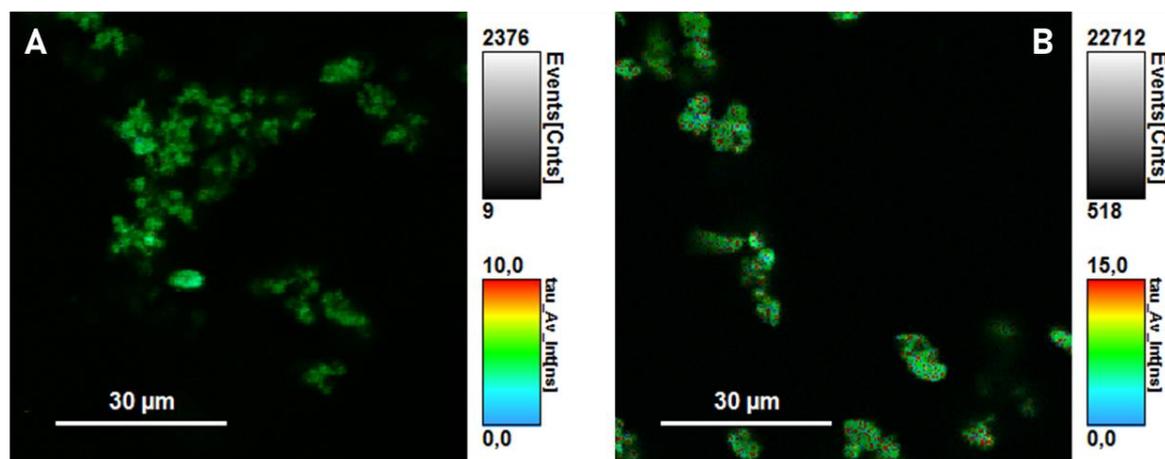


FIGURA 4.11 - Imagens de FLIM do processo de agregação do $A\beta_{1-40}$ em tampão fosfato pH 7,4 (150 mM NaCl) em 360 min de agregação onde (A) foi incubado sem complexo e (B) foi incubado com complexo (3 $A\beta$:1 complexo). A contagem de fótons para a imagem em (A) é de 2376 enquanto a contagem da imagem com complexo (B) é de 22712. Excitação em 470 nm e emissão acima de 488 nm.

As curvas de decaimento cinético do $A\beta_{1-40}$ incubado com o complexo foram melhor ajustadas para uma função tri-exponencial (TABELA 4.5). A presença deste terceiro tempo de vida de emissão resultou na diminuição da contribuição dos outros tempos de vida de emissão obtidos nas imagens. Uma vez que a proporção do $A\beta_{1-40}$:complexo neste experimento foi $50\mu\text{M}:18\mu\text{M}$, era esperado uma mistura de agregados do $A\beta_{1-40}$ sozinho e $A\beta_{1-40}$ -complexo. Vale ressaltar que mesmo nestas proporções as alterações nos tempos de vida de fluorescência são acentuadas no estágio pré-incubação indicando que o complexo interage com o peptídeo na fase de nucleação. Por exemplo, no tempo zero de incubação a nova fluorescência apresenta tempo de vida de emissão de 7,64 ns e 22% da emissão total da imagem. Essa informação é relevante, uma vez que a proposta deste trabalho é justamente obter uma sonda luminescente para os estágios iniciais da agregação. O tempo de vida mais longo para esta nova espécie também facilita a diferenciação entre outras proteínas ou biomoléculas fluorescentes.

O complexo provou, assim, possuir interação com o $A\beta_{1-40}$ podendo acompanhar seu processo de agregação por completo. O tempo de vida de emissão das imagens mostrou-se mais longo devido a interação complexo- $A\beta_{1-40}$, podendo distinguir os agregados de outras moléculas fluorescentes com tempos de vida curtos. A contagem de fótons também foi aumentada significativamente facilitando a identificação dos agregados.

TABELA 4.5 - Tempos de vida de emissão das imagens obtidas das amostras de A β ₁₋₄₀ com complexo (3 A β :1 complexo) em tampão fosfato pH 7,4 (150 mM NaCl) obtidas com excitação em 470 nm e leitura de emissão acima de 488 nm.

Tempo de Incubação	τ (ns)	%	χ^2	τ médio (ns)
0 min	$\tau_1 = 7,64 \pm 0,04$	21,89	1,100	$5,17 \pm 0,02$
	$\tau_2 = 2,82 \pm 0,01$	52,89		
	$\tau_3 = 0,53 \pm 0,01$	25,21		
60 min	$\tau_1 = 6,28 \pm 0,03$	28,61	1,097	$4,73 \pm 0,02$
	$\tau_2 = 2,51 \pm 0,01$	41,02		
	$\tau_3 = 0,50 \pm 0,01$	30,37		
120 min	$\tau_1 = 5,70 \pm 0,03$	29,47	1,114	$4,23 \pm 0,01$
	$\tau_2 = 2,02 \pm 0,02$	45,60		
	$\tau_3 = 0,47 \pm 0,01$	24,93		
240 min	$\tau_1 = 9,09 \pm 0,13$	16,89	1,112	$5,32 \pm 0,02$
	$\tau_2 = 3,16 \pm 0,02$	47,14		
	$\tau_3 = 0,71 \pm 0,02$	15,69		
	$\tau_4 = 0,22 \pm 0,02$	20,28		
360 min	$\tau_1 = 5,31 \pm 0,02$	31,65	1,294	$4,08 \pm 0,01$
	$\tau_2 = 2,95 \pm 0,02$	49,61		
	$\tau_3 = 0,62 \pm 0,01$	18,73		
480 min	$\tau_1 = 6,30 \pm 0,03$	21,07	2,507	$4,32 \pm 0,01$
	$\tau_2 = 3,21 \pm 0,01$	61,38		
	$\tau_3 = 0,70 \pm 0,01$	17,55		

4.3. Estudos de Interação com Fragmentos

Uma vez que as propriedades luminescentes do complexo se mostraram bastante sensíveis ao processo de agregação do $A\beta_{1-40}$, foi avaliada a capacidade do mesmo de atuar como marcador luminescente das cadeias N- e C-terminal do $A\beta$, permitindo a identificação estrutural dos fragmentos desse peptídeo. Para isso foram investigados três fragmentos distintos dos monômero $A\beta_{1-40}$: $A\beta_{1-28}$, $A\beta_{11-22}$ e $A\beta_{29-40}$. A sequência dos aminoácidos está ilustrada na Figura 4.12. Os estudos de interação com os fragmentos podem vir a auxiliar na elucidação do processo de agregação, na identificação destes fragmentos em solução, bem como contribuir para determinar o(s) sítio(s) de interação entre o complexo e o $A\beta$.

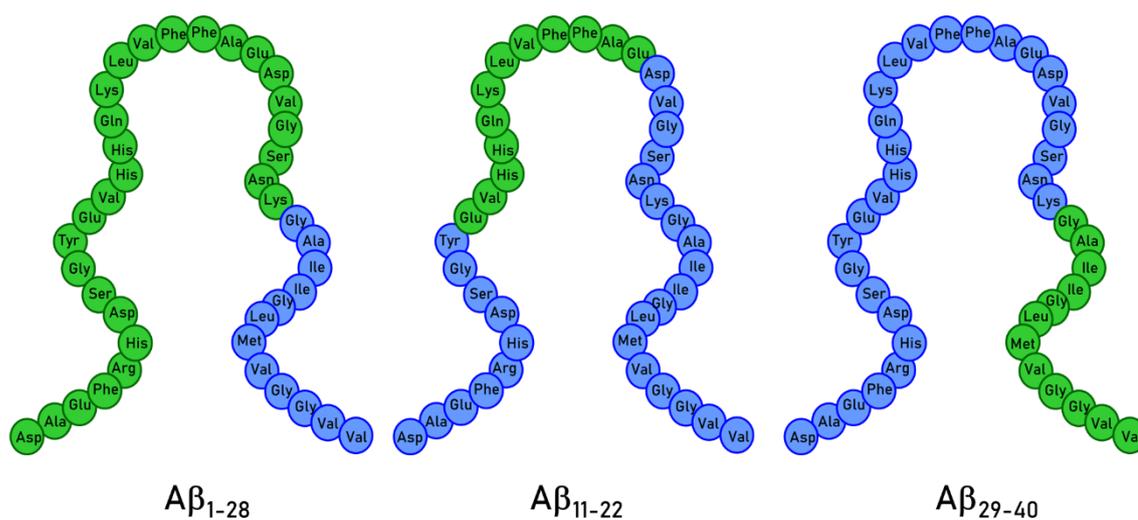


FIGURA 4.12 – Ilustração dos fragmentos do $A\beta_{1-40}$: $A\beta_{1-28}$, $A\beta_{11-22}$ e $A\beta_{29-40}$ destacados em verde.

4.3.1. Fragmento $A\beta_{1-28}$

O fragmento $A\beta_{1-28}$ é o fragmento N-terminal polar do amilóide, $A\beta_{1-40}$. Em especial, esse fragmento contém quatro aminoácidos aromáticos (Phe4, Tyr10, Phe19 e Phe20), bem como três histidinas (His6, His13 e His14).

A Figura 4.13 apresenta as imagens de TCSPC-FLIM obtidas em tempo real durante o progresso da agregação do $A\beta_{1-28}$ na ausência e na presença do complexo. A Tabela 4.6 apresenta os tempos de vida de emissão destas imagens.

Por se tratar de um fragmento mais curto, os agregados só foram identificados visualmente em tempos de incubação maiores. Por isso, as imagens mostradas na Figura 4.13 foram obtidas nos tempos de 120 e 240 minutos de incubação.

Na Figura 4.13 é possível observar que esse fragmento possui tendência à fibrilação que pode ser notada pela formação de uma fibrila em forma de *twist*. Em particular, a Figura 4.13. (C) mostrou-se bastante interessante, uma vez que a imagem mostra dois tempos de vida distintos para uma mesma fibrila: um tempo de vida curto (em azul) no interior da fibrila e outro longo (em verde) na parte externa da fibrila. Isso indica que o complexo interage com os resíduos de aminoácidos na superfície do $A\beta$ e não entrando em sua estrutura como outros compostos reportados.⁸⁴ Já com o complexo, as imagens apresentaram tempos de vida médio em torno de 16 ns, tempo muito maior do que o fragmento sozinho, bem como do fragmento $A\beta_{1-40}$.

Os decaimentos cinéticos tanto do $A\beta_{1-28}$ sem quanto com o complexo foram ajustados para uma função tri-exponencial. O tempo de vida de emissão médio observado foi de 2,8 ns, não havendo mudanças significativas com o progresso da incubação.

Já com complexo, o tempo de vida de emissão médio observado foi em torno de 16 ns, valor este muito maior do que os tempos de vida de emissão do $A\beta_{1-28}$ sem complexo e do valor obtido para o $A\beta_{1-40}$. Estes dados corroboram as observações prévias e indicam que o complexo interage com o canal hidrofóbico do fragmento $A\beta_{1-28}$ (Leu17-Val18-Phe19-Phe20), o qual contém os sítios aromáticos do $A\beta$. Estes resultados indicam que a interação complexo-

A β pode ocorrer através dos resíduos de aminoácidos aromáticos fenilalanina (Phe19 e Phe20).

Em sua estrutura, o complexo possui dois ligantes 1,10-fenantrolina, os quais podem estar interagindo com os aminoácidos aromáticos por interações de empilhamento π - π “ π - π stacking”. Uma interação com os anéis das histidinas também é possível.

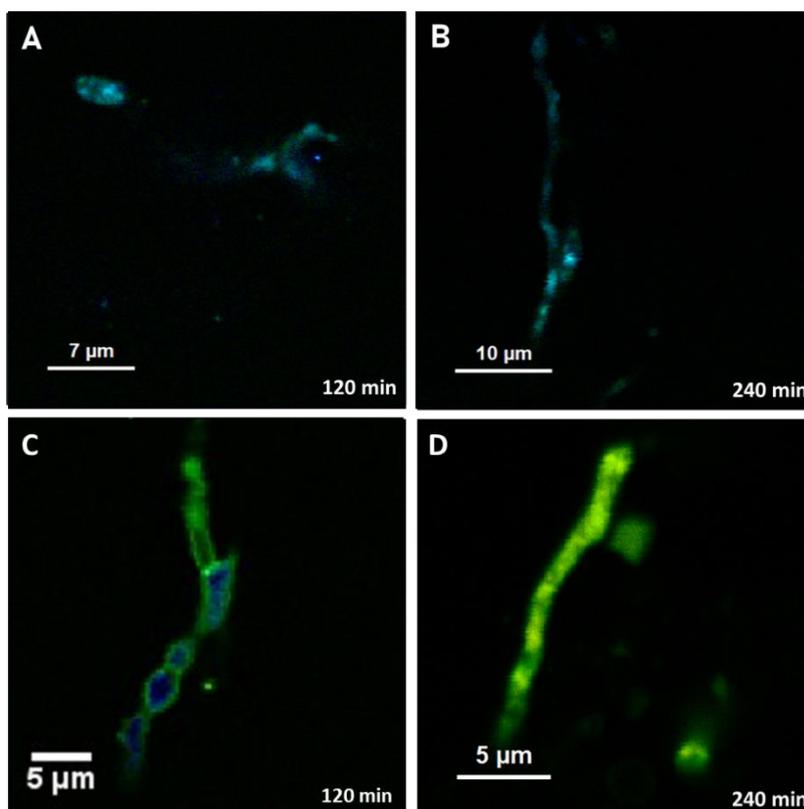


FIGURA 4.13 - Imagens de TCSPC-FLIM do processo de agregação do A β ₁₋₂₈ em tampão fosfato pH 7,4 (150 mM NaCl) sem complexo (A) e (B) e com complexo na proporção 3 A β :1 complexo (C) e (D) em 120 e 240 min de incubação. As imagens foram obtidas com excitação em 470 nm e leitura de emissão acima de 488 nm.

TABELA 4.6 - Tempos de vida das imagens de TCSPC-FLIM do processo de agregação do A β_{1-28} em tampão fosfato pH 7,4 (150 mM NaCl) sem complexo (A) e (B) e com complexo na proporção 3 A β :1 complexo (C) e (D) em 120 e 240 min de incubação. Os tempos de vida de emissão foram obtidos com excitação em 470 nm e leitura de emissão acima de 488 nm.

Figura	τ (ns)	%	χ^2	τ médio (ns)
A	$\tau_1 = 4,19 \pm 0,11$	17,84	1,076	$2,88 \pm 0,03$
	$\tau_2 = 1,40 \pm 0,10$	23,59		
	$\tau_3 = 0,34 \pm 0,01$	58,57		
B	$\tau_1 = 4,41 \pm 0,03$	16,55	1,145	$2,93 \pm 0,01$
	$\tau_2 = 1,53 \pm 0,05$	24,20		
	$\tau_3 = 0,38 \pm 0,04$	59,24		
C	$\tau_1 = 18,50 \pm 1,4$	19,83	1,008	$16,00 \pm 1,4$
	$\tau_2 = 1,73 \pm 0,13$	25,57		
	$\tau_3 = 0,32 \pm 0,01$	54,60		
D	$\tau_1 = 17,40 \pm 1,9$	22,97	1,044	$15,3 \pm 1,8$
	$\tau_2 = 1,89 \pm 0,14$	23,22		
	$\tau_3 = 0,38 \pm 0,01$	53,81		

4.3.2. Fragmento A β ₁₁₋₂₂

Neste contexto, foi investigado o fragmento A β ₁₁₋₂₂, cuja sequência de aminoácidos Glu11-Val12-His13-His14-Gln15-Lys16-Leu17-Val18-Phe19-Phe20-Ala21-Glu22 contém o mesmo canal hidrofóbico Leu17-Val18-Phe19-Phe20 do fragmento A β ₁₋₂₈. Este fragmento é considerado o segmento responsável pelo processo de agregação. Nele, os aminoácidos Phe19 e Phe20, ambos aromáticos, estão em proximidade. Este fragmento contém também os resíduos de aminoácido His13 e His14, os quais podem contribuir com interações hidrofílicas. O A β ₁₁₋₂₂, assim como o A β ₁₋₂₈, também possui tendência à fibrilação.

A Figura 4.14 mostra as imagens obtidas nos tempos de incubação 120 e 240 min para o A β ₁₁₋₂₂ na ausência e na presença do complexo e a Tabela 4.7 apresenta os tempos de vida de emissão destas imagens. Observa-se que as imagens dos agregados do A β ₁₁₋₂₂ incubado com complexo são mais definidas e apresentam uma maior contagem de fótons comparado ao A β ₁₁₋₂₂ sem complexo (8000 sem complexo e 14000 com complexo). Nestas imagens é possível observar a formação de fibrilas entrelaçadas.

Em concordância com estas observações foi observado um aumento significativo no tempo de vida de emissão destas imagens de 3,4 ns para o A β ₁₁₋₂₂ sem complexo para cerca de 22 ns com o complexo. As conformações em folhas β -entrelaçadas “*twisted*” favorecem a formação de ligações de hidrogênio, empilhamento entre as cadeias laterais e interações eletrostáticas. Consideram-se que estas conformações sejam as mais estáveis do que as conformações flexíveis.

Em acordo com as imagens obtidas, o complexo apresenta ligantes que propiciam este tipo de interação com o peptídeo. A presença dos aminoácidos Phe19 e Phe20 um ao lado do outro pode contribuir para uma interação π - π stacking mais efetiva. Os grupos amino no anel da piridina podem contribuir

com ligação de hidrogênio para os resíduos de aminoácidos hidrofílicos do A β . Além disso, o fragmento A β_{11-22} inicia e termina com dois ácidos glutâmicos, os quais, em pH 7,4, são carregados negativamente. Como o complexo é carregado positivamente, forças eletrostáticas podem contribuir na interação complexo-amilóide.

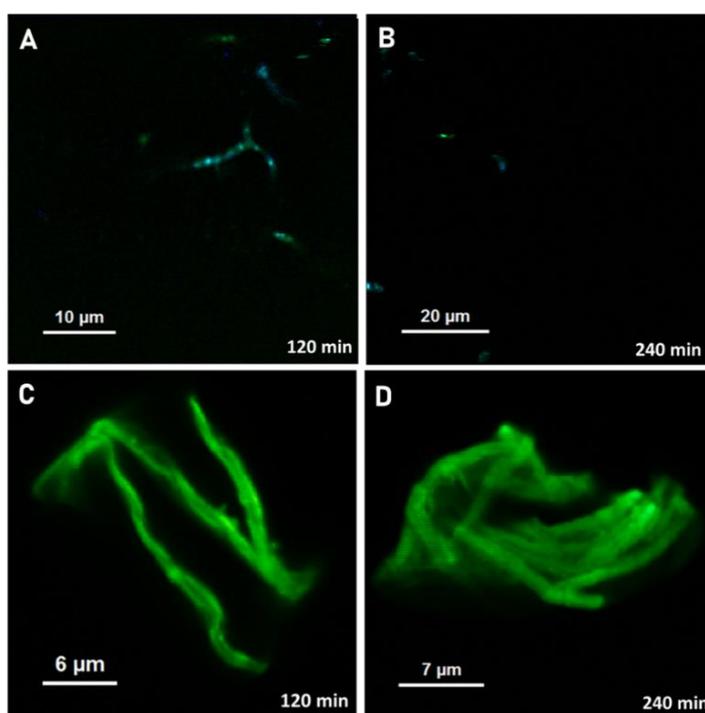


FIGURA 4.14 - Imagens de TCSPC-FLIM do processo de agregação do A β_{11-22} em tampão fosfato pH 7,4 (150 mM NaCl) sem complexo (A) e (B) e com complexo na proporção 3 A β :1 complexo (C) e (D) em 120 e 240 min de incubação. As imagens foram obtidas com excitação em 470 nm e leitura de emissão acima de 488 nm.

TABELA 4.7 - Tempos de vida de emissão das imagens de TCSPC-FLIM do processo de agregação do A β ₁₁₋₂₂ em tampão fosfato pH 7,4 (150 mM NaCl) sem complexo (A) e (B) e com complexo na proporção 3 A β :1 complexo (C) e (D) em 120 e 240 min de incubação. As imagens foram obtidas com excitação em 470 nm e leitura de emissão acima de 488 nm.

Figura	τ (ns)	%	χ^2	τ médio (ns)
A	$\tau_1 = 4,40 \pm 0,04$	32,35	1,107	$3,34 \pm 0,01$
	$\tau_2 = 2,16 \pm 0,02$	28,23		
	$\tau_3 = 0,52 \pm 0,01$	39,41		
B	$\tau_1 = 4,75 \pm 0,05$	24,97	1,140	$3,45 \pm 0,02$
	$\tau_2 = 2,32 \pm 0,05$	32,84		
	$\tau_3 = 0,55 \pm 0,01$	42,19		
C	$\tau_1 = 22,8 \pm 1,20$	22,68	1,069	$20,44 \pm 0,97$
	$\tau_2 = 1,80 \pm 0,14$	23,07		
	$\tau_3 = 0,40 \pm 0,02$	54,65		
D	$\tau_1 = 25,1 \pm 0,45$	33,44	1,034	$23,38 \pm 0,36$
	$\tau_2 = 2,05 \pm 0,14$	20,87		
	$\tau_3 = 0,46 \pm 0,02$	45,68		

4.3.3. Fragmento A β_{29-40}

O fragmento A β_{29-40} , cuja sequência de aminoácidos é Gly29-Ala30-Ile31-Ile32-Gly33-Leu34-Met35-Val36-Gly37-Gly38-Val39-Val40, não contém o canal hidrofóbico Leu17-Val18-Phe19-Phe20 como os outros dois fragmentos estudados. O fragmento A β_{29-40} é o fragmento C-terminal apolar do monômero A β_{1-40} , apresentando somente aminoácidos apolares em sua estrutura. Esse fragmento também apresenta características de fibrilação, no entanto, a grande parte das estruturas observadas são estruturas globulares. Contudo, como se trata de um peptídeo hidrofóbico em meio aquoso, é possível que as estruturas sejam influenciadas por repulsões hidrofóbicas.

A Tabela 4.8 apresenta os tempos de vida de emissão das imagens e a Figura 4.15 apresenta um comparativo entre as amostras.

Os tempos de vida de emissão das imagens sem e com complexo não apresentaram diferenças significativas. Em geral, as imagens obtidas com complexo apresentaram tempos de vida ligeiramente maiores do que as imagens sem complexo, indicando que a interação do complexo-fragmento neste caso não é apreciável. Interações hidrofóbicas fracas podem ocorrer, ocasionando o ligeiro aumento nos tempos de vida de emissão.

Os dados obtidos com o fragmento A β_{29-40} nos levam a concluir que os aminoácidos aromáticos são, de fato, de grande importância para a interação com o complexo, uma vez que, na ausência dos mesmos, não é observado mudanças nos tempos de vida de emissão.

TABELA 4.8 - Tempos de vida de emissão das imagens de TCSPC-FLIM do processo de agregação do A β ₂₉₋₄₀ em tampão fosfato pH 7,4 (150 mM NaCl) sem complexo (A) e (B) e com complexo na proporção 3 A β :1 complexo (C) e (D) em 120 e 240 min de incubação. As imagens foram obtidas com excitação em 470 nm e leitura de emissão acima de 488 nm.

Figura	τ (ns)	%	χ^2	τ médio (ns)
A	$\tau_1 = 4,20 \pm 0,06$	49,29	1,161	$3,57 \pm 0,04$
	$\tau_2 = 1,02 \pm 0,10$	50,71		
B	$\tau_1 = 3,65 \pm 0,03$	39,20	1,534	$2,88 \pm 0,01$
	$\tau_2 = 1,53 \pm 0,05$	60,80		
C	$\tau_1 = 3,78 \pm 0,01$	79,03	1,553	$3,67 \pm 0,01$
	$\tau_2 = 1,17 \pm 0,13$	20,97		
D	$\tau_1 = 4,64 \pm 0,17$	14,69	1,091	$2,85 \pm 0,01$
	$\tau_2 = 1,64 \pm 0,13$	27,48		
	$\tau_3 = 0,49 \pm 0,02$	57,83		

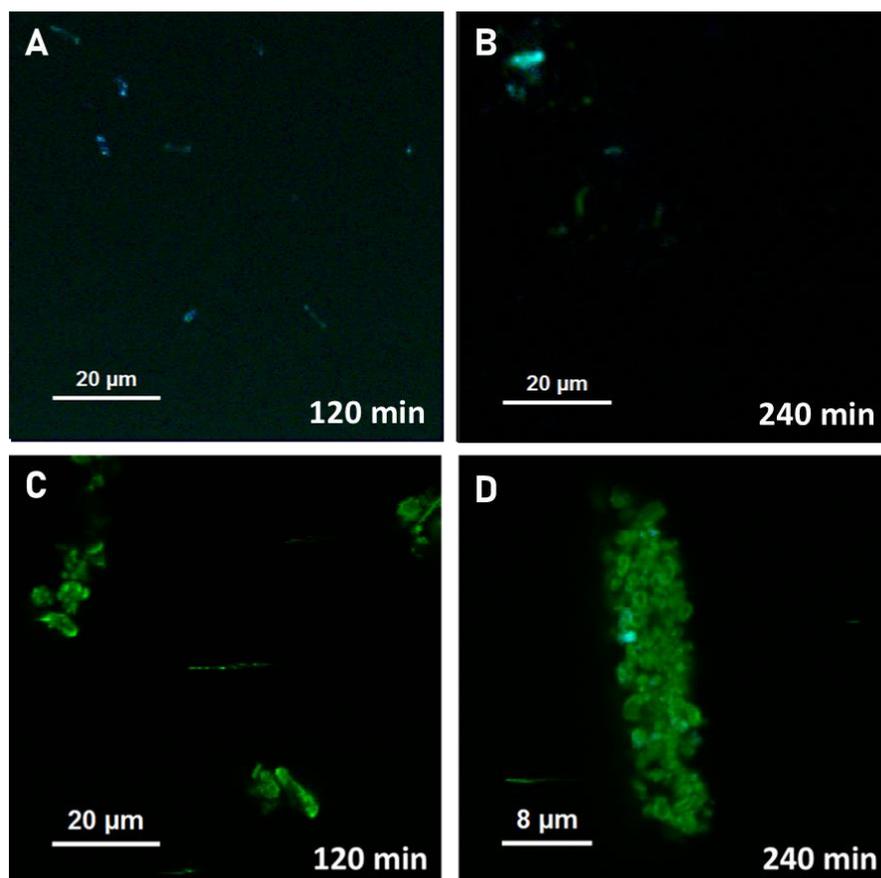


FIGURA 4.15 - Imagens de TCSPC-FLIM do processo de agregação do $A\beta_{29-40}$ em tampão fosfato pH 7,4 (150 mM NaCl) sem complexo (A) e (B) e com complexo na proporção 3 $A\beta$:1 complexo (C) e (D) em 120 e 240 min de incubação. As imagens foram obtidas com excitação em 470 nm e leitura de emissão acima de 488 nm.

4.4. O Complexo cis - $[Ru(phen)_2(3,4Apy)_2]^{2+}$ como Marcador Biológico Luminescente

A partir dos dados de luminescência apresentados conclui-se que o complexo é capaz de monitorar a agregação do peptídeo tanto por intensidade de luminescência como por tempo de vida de emissão, tornando o mesmo bastante versátil. O aumento no tempo de vida nas imagens de FLIM do monômero principal $A\beta_{1-40}$ facilitam a identificação dos agregados. Os fragmentos de $A\beta$ que possuem aminoácidos aromáticos apresentaram um aumento significativo

no tempo de vida da imagem, indicando uma interação considerável entre o complexo e o peptídeo. Assim, podemos concluir que os ligantes 1,10-fenantrolina possuem um papel importante na interação, possivelmente interagindo através de interações π - π stacking com os grupos R dos aminoácidos aromáticos. Através das imagens do fragmento $A\beta_{1-28}$ podemos concluir que o complexo interage com o exterior da fibrila e não entra na estrutura do peptídeo.

O complexo apresenta uma emissão significativa de 640 a 750 nm com máximo em 655 nm, podendo assim ser utilizado tanto para medidas *in vitro* como *in vivo*. A síntese do complexo é relativamente simples, barata e não necessita de longas etapas de purificação.

Ensaio conduzidos previamente com a linhagem neuronal Neuro2A mostraram uma viabilidade celular de 90% para concentrações de até 50 μ M.⁸⁵ Para os estudos realizados neste trabalho, a maior concentração foi de 20 μ M de complexo, fazendo com que o mesmo apresente baixa citotoxicidade.

A partir dos estudos de luminescência e das imagens por tempo de vida pode-se concluir que o complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4Apy)₂]²⁺ é um bom marcador para o peptídeo beta amilóide, sendo assim um excelente candidato à marcador biológico para o diagnóstico precoce da Doença de Alzheimer.

4.5. Estudos de Influência Estrutural do Complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4Apy)₂]²⁺ no Processo de Agregação do Peptídeo Beta Amilóide

Uma vez confirmada a interação entre o complexo e o $A\beta$, bem como sua capacidade de atuar como um marcador biológico, a possível influência estrutural do mesmo no processo de agregação natural do amilóide foi avaliada. Para tanto, o processo de agregação do $A\beta$ foi estudado na ausência e na presença do complexo.

4.5.1. Dicroísmo Circular

Afim de analisar a influência do complexo na estrutura secundária, o processo de agregação do A β foi acompanhado através da técnica de dicroísmo circular. Primeiramente, o processo de agregação do beta amilóide foi acompanhado na ausência do complexo (FIGURA 4.16). Como já esperado o peptídeo A β_{1-40} , em tempo 0 min de incubação, possui estrutura secundária aleatória uma vez que sua forma monomérica é intrinsecamente desordenada. Foi possível observar o ponto de transição entre a estrutura secundaria aleatória para folha beta que ocorre em 30 min de incubação. O aumento da elipticidade indica um maior conteúdo de folhas beta, uma vez que as mesmas vão sendo formadas juntamente com os agregados, desviando assim a luz polarizada. A elipticidade aumenta gradativamente com o tempo de incubação até a obtenção de uma curva característica de folha beta com uma banda negativa em 225 nm e uma banda positiva em 200 nm. As medidas de dicroísmo circular foram iniciadas em 200 nm, uma vez que o tampão PBS necessário para a agregação do peptídeo apresentava interferência na região entre 190 a 200 nm.

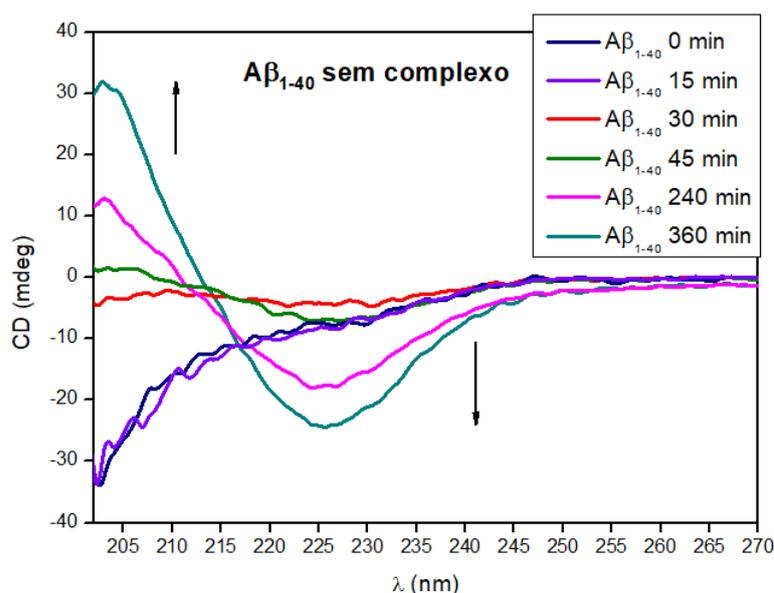


FIGURA 4.16 - Espectro de dicroísmo circular acompanhando o processo de agregação do A β_{1-40} em tampão fosfato pH 7,4 (150 mM NaCl).

Os experimentos de dicroísmo circular do processo de agregação do $A\beta_{1-40}$ na presença do complexo foram analisados nos tempos de incubação inicial (0 minutos) e final (360 minutos) (FIGURA 4.17). No tempo 0, a amostra incubada com complexo apresentou o mesmo padrão de curva da amostra sem complexo, sugerindo que o complexo não interfere na estrutura secundária do amilóide no tempo zero. Já em 360 minutos é possível observar uma diminuição no grau de elipticidade comparada ao peptídeo sozinho, indicando que o complexo, de alguma forma, influencia na estrutura secundária do amilóide.

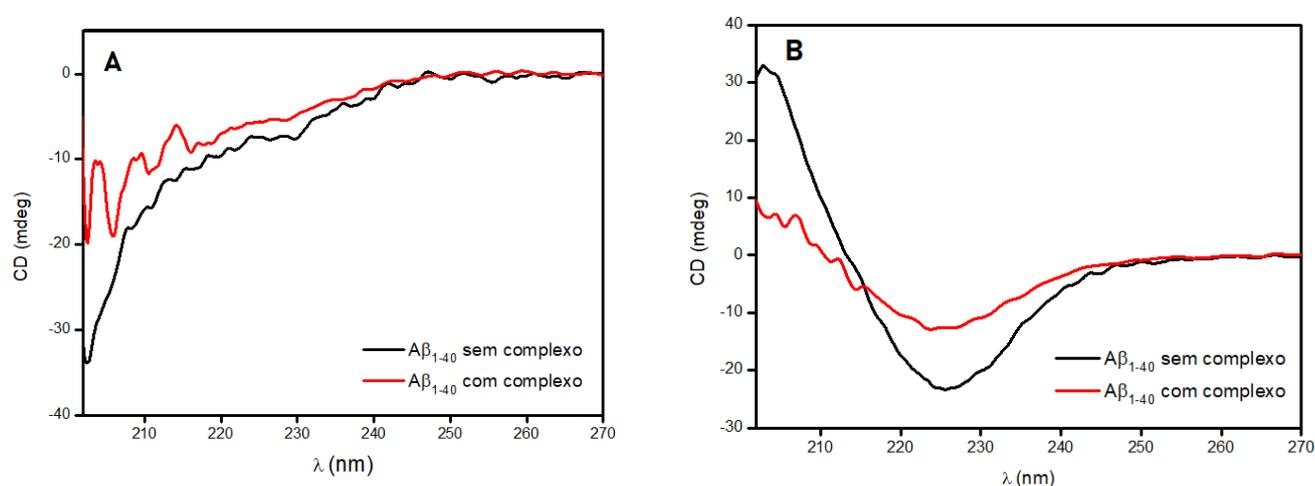


FIGURA 4.17 - Espectros comparativos de dicroísmo circular acompanhando o processo de agregação do $A\beta_{1-40}$ em tampão fosfato pH 7,4 (150 mM NaCl) para os tempos de incubação (A) 0 minutos e (B) 360 minutos na ausência e na presença de complexo (5 $A\beta_{1-40}$: 1 complexo).

Como o complexo apresenta absorção na região no UV devido às transições ILCT, não foi possível obter espectros de dicroísmo circular para os estágios intermediários de agregação. Os fragmentos de $A\beta$ apresentaram problemas referentes à concentração e experimentos de dicroísmo circular com os mesmos não puderam ser realizados.

4.5.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Afim de analisar a morfologia do processo de agregação do peptídeo beta amilóide foi utilizada a técnica de microscopia eletrônica de transmissão (TEM). Para esses experimentos, a agregação do $A\beta$ foi acompanhada na presença e na ausência de complexo para o peptídeo $A\beta_{1-40}$ nas proporções 1:5 e 1:1 complexo:amilóide e 1:1 complexo:amilóide para os fragmentos $A\beta_{1-28}$, $A\beta_{11-22}$ e $A\beta_{29-40}$. As tabelas com as análises estatísticas do tamanho dos agregados se encontra no Anexo dessa dissertação.

4.5.2.1. $A\beta_{1-40}$

Para o peptídeo $A\beta_{1-40}$ foram estudados os tempos de agregação 15, 60, 120 e 240 minutos. A agregação do peptídeo beta amilóide mostrou-se irregular, apresentando diferentes estágios de agregação em um único tempo de incubação. No entanto, cada um dos tempos mostrou uma espécie predominante.

A Figura 4.18 mostra as imagens de TEM obtidas para o $A\beta_{1-40}$ na ausência do complexo em diferentes tempos de incubação.

Em 15 minutos de incubação, não se observou a formação de grandes agregados, podendo ser observado estruturas monoméricas curvilíneas pequenas. É importante ressaltar que essas estruturas foram somente encontradas em 15 minutos de incubação, indicando que as mesmas se unem afim de formar estruturas maiores. Pequenas estruturas globulares também foram encontradas, indicando o início da presença de espécies oligoméricas com diâmetro médio de 19,65 nm (desvio padrão = 4,34 nm; erro padrão = 1,02 nm; n = 18).

Já em 60 minutos de incubação, identificou-se um maior número de oligômeros globulares e, assim como em 15 minutos, a ausência de agregados maiores. No entanto, o tamanho das espécies oligoméricas diminuiu para 10,06 nm (desvio padrão = 2,72 nm; erro padrão = 0,50 nm; n = 30). É interessante notar que neste intervalo de tempo não foram detectadas estruturas monoméricas

curvilíneas, indicando que as mesmas mudaram sua conformação afim de formar oligômeros.

Contudo, em 120 minutos observou-se as primeiras estruturas fibrilares. As fibrilas apresentaram comprimentos variáveis, com um valor médio de 121,05 nm (desvio padrão = 75,93 nm; erro padrão = 22,89 nm; n=11), sendo possível identificar fibrilas individuais. No entanto, a largura das fibrilas foi constante, com largura média de 10,98 nm (desvio padrão = 1,46 nm; erro padrão = 0,39 nm; n = 14).

Em 240 minutos de incubação, o número de fibrilas aumentou significativamente, no entanto as mesmas se agruparam lado a lado, formando pequenas placas fibrilares. Apesar da predominância de estruturas fibrilares, estruturas oligoméricas também foram identificadas em forma de poro com diâmetro médio de 16,58 nm, (desvio padrão = 4,25 nm; erro padrão = 0,13 nm; n = 62) bem como a presença de protofibrilas (FIGURA 4.19).

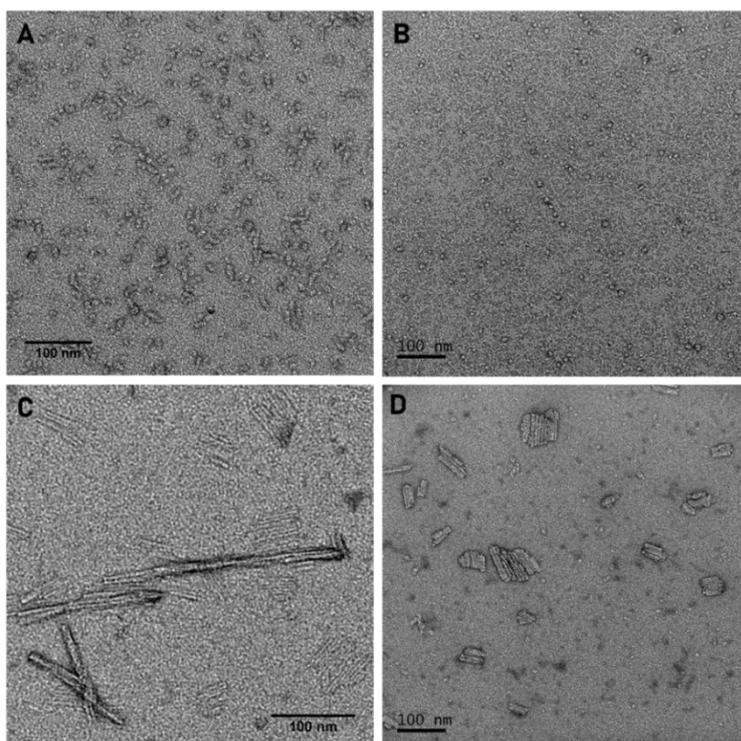


FIGURA 4.18 - Imagens de TEM por contrastação negativa do fragmento A β_{1-40} em tampão fosfato pH 7,4 (150 mM NaCl) na ausência de complexo nos tempos de incubação 15 (A), 60 (B), 120 (C) e 240 (D) minutos.

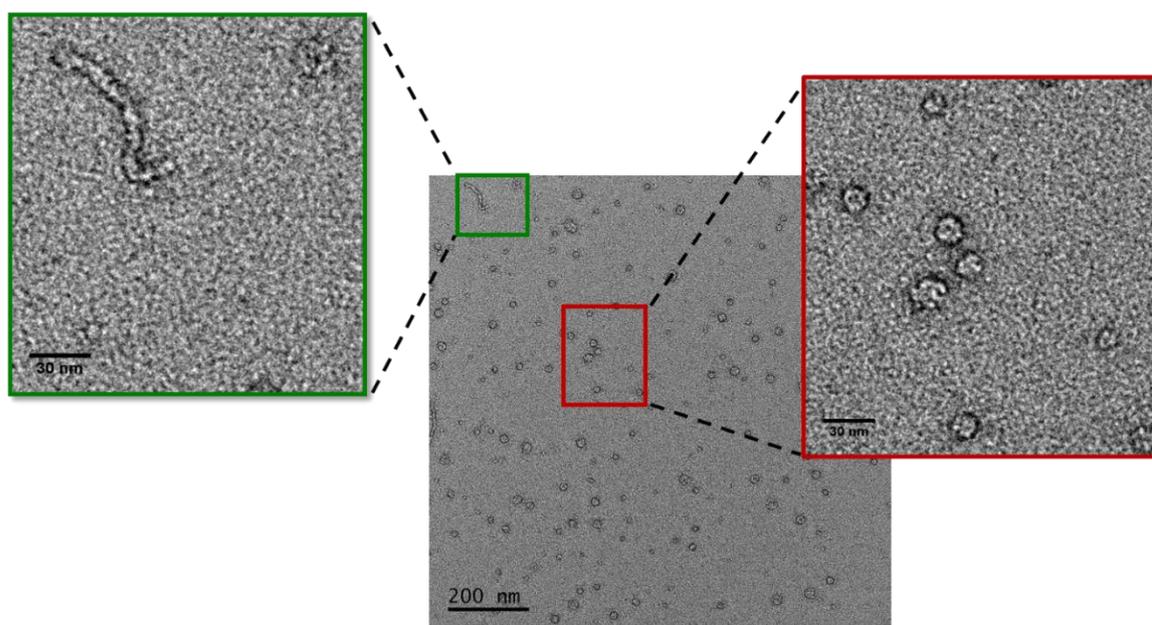


FIGURA 4.19 - Imagens de TEM por contrastação negativa de oligômeros e protofibrila do fragmento A β_{1-40} em tampão fosfato pH 7,4 (150 mM NaCl) observados em 240 minutos de incubação.

Além disso, algumas fibrilas em forma de hélice com vários *twists* foram identificadas em tempos de agregação menores (FIGURA 4.20), sugerindo repulsão eletrostática entre os aminoácidos terminais. No entanto, esse tipo de fibrila não foi predominante em nenhum dos tempos de incubação para o $A\beta_{1-40}$.

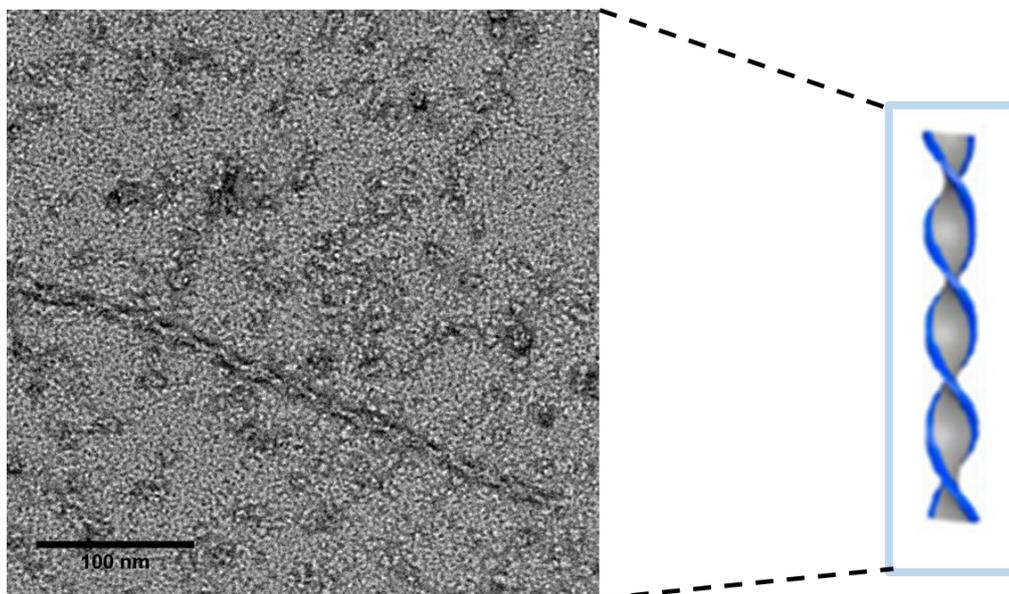


FIGURA 4.20 - Imagens de TEM por contrastação negativa de uma fibrila do fragmento $A\beta_{1-40}$ em tampão fosfato pH 7,4 (150 mM NaCl) em forma de hélice.

O mesmo processo foi repetido com a amostra de peptídeo incubada na presença do complexo na proporção 5:1 ($A\beta_{1-40}$:complexo) com intuito de avaliar a influência do complexo em baixas concentrações na morfologia do amilóide (FIGURA 4.21).

Em 15 minutos de incubação as imagens por TEM não mostraram diferenças significativas na morfologia das espécies presentes em relação as observadas para o $A\beta_{1-40}$ sem complexo. Entretanto, os oligômeros formados na presença de complexo foram menores, apresentando diâmetro médio de 14,75 nm (desvio padrão = 3,39 nm; erro padrão = 0,47 nm; n = 50), 5 nm menores que os obtidos na ausência de complexo.

Aos 60 minutos de incubação, não se observou mais a presença de monômeros. Neste estágio da agregação o número de oligômeros aumentou

significativamente. Como observado na ausência do complexo o diâmetro médio dos oligômeros identificados diminuíram para 11,37 nm (desvio padrão = 2,52 nm; erro padrão = 0,42 nm; n = 36).

Já em 120 minutos de incubação é possível identificar a presença de fibrilas e de alguns oligômeros. O comprimento das fibrilas, assim como observado para o $A\beta_{1-40}$ incubado sem o complexo, mostrou-se bastante variável. Também foram observadas fibrilas do tipo *belt*, indicando a influência de atrações eletrostáticas na formação da fibrila (FIGURA 4.22). Esse novo tipo de fibrila observado em 120 minutos de incubação apresentou comprimentos similares e largura de 8,31 nm (desvio padrão = 2,52 nm; erro padrão = 1,09 nm; n = 37).

Em 240 minutos, assim como observado para o $A\beta_{1-40}$ incubado sem o complexo, as fibrilas se agruparam lateralmente formando pequenas placas. Também foram observados oligômeros neste tempo de incubação, no entanto, a espécie oligomérica predominante foi a micelar, apresentando diâmetro médio de 14,02 nm (desvio padrão = 3,09 nm; erro padrão = 0,53 nm; n = 34). Para o $A\beta_{1-40}$ incubado sem o complexo também foi possível observar oligômeros nesse tempo de incubação, no entanto, os oligômeros observados eram majoritariamente do tipo poro (FIGURA 4.23).

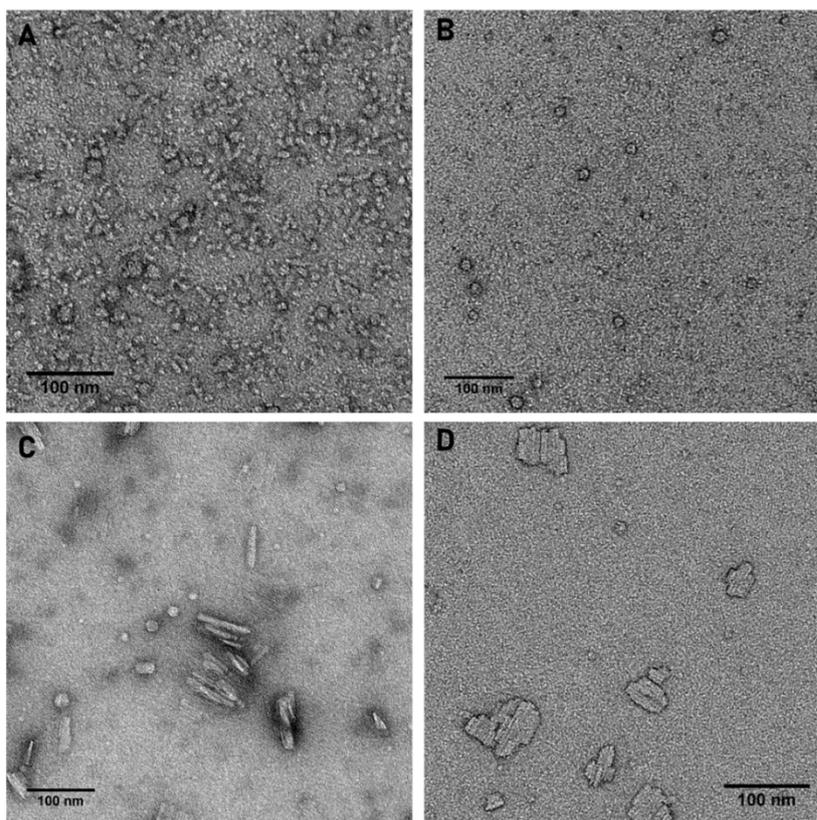


FIGURA 4.21 - Imagens de TEM por contrastação negativa do fragmento $A\beta_{1-40}$ do fragmento $A\beta_{1-40}$ em tampão fosfato pH 7,4 (150 mM NaCl) na presença de complexo na proporção 5:1 amilóide:complexo nos tempos de incubação 15 (A), 60 (B), 120 (C) e 240 (D) minutos.

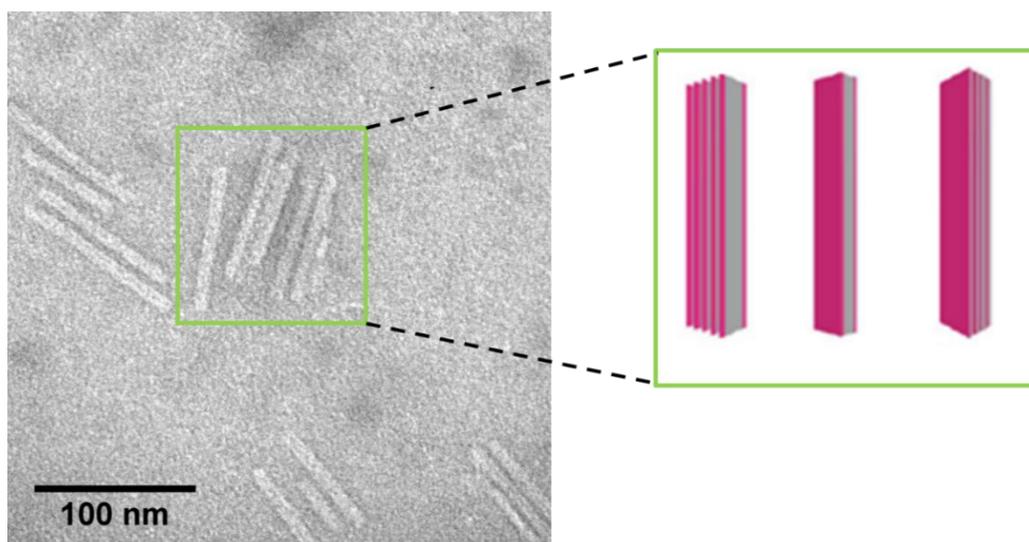


FIGURA 4.22 - Imagens de TEM por contrastação negativa de uma fibrila do fragmento $A\beta_{1-40}$ em tampão fosfato pH 7,4 (150 mM NaCl) do tipo *belt*.

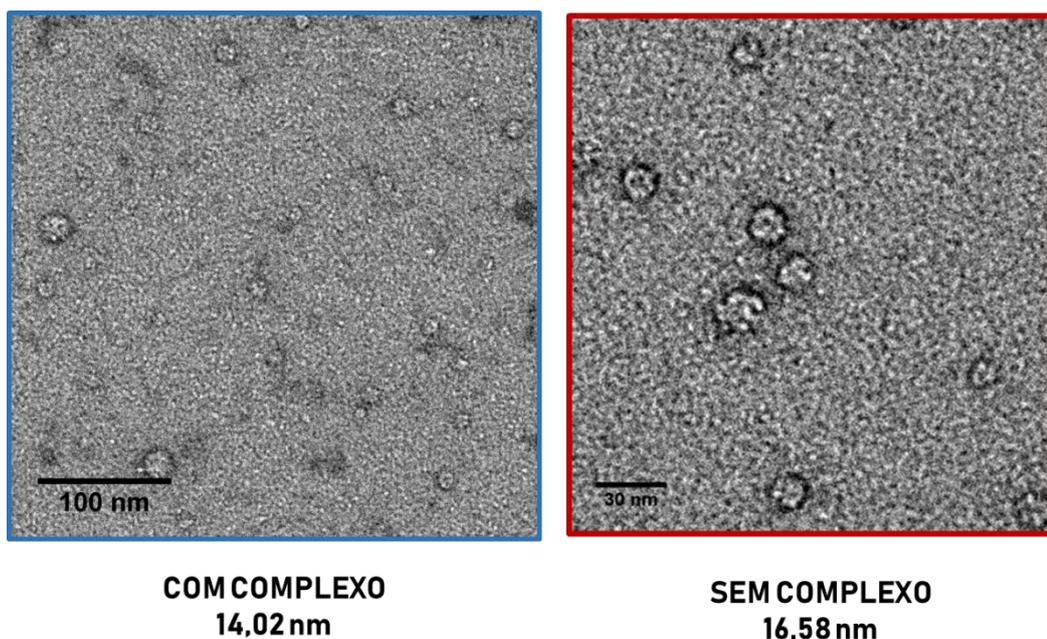


FIGURA 4.23 - Comparativo entre os oligômeros observados em 240 minutos de incubação para as amostras do fragmento $A\beta_{1-40}$ em tampão fosfato pH 7,4 (150 mM NaCl) com complexo na proporção 5:1 e sem complexo.

Para avaliar a influência e o efeito do complexo em concentrações mais altas no processo de agregação do $A\beta_{1-40}$, foram preparadas amostras na proporção 1:1 amilóide:complexo (FIGURA 4.24).

Em 15 minutos de incubação, não foi possível observar mudanças morfológicas em relação as amostras anteriores. Os oligômeros neste estágio de agregação apresentaram diâmetro de 13,69 nm (desvio padrão = 3,27 nm; erro padrão = 0,49 nm; n = 45).

Em 60 minutos, como observado anteriormente, foram observados oligômeros, cujo diâmetro médio 11,84 nm (desvio padrão = 2,39 nm; erro padrão = 0,38 nm; n = 40).

Em 120 minutos foram observadas fibrilas, em concordância com as amostras anteriores, no entanto, sua grande maioria do tipo *belt*, com diâmetro de 9,28 nm (desvio padrão = 1,18 nm; erro padrão = 0,49 nm; n = 17).

Em 240 min de incubação, no entanto, foi possível notar uma diferença significativa em tamanho de fibrilas e pequenas placas formadas.

No geral, na proporção 1:1, o tamanho das fibrilas é menor e as mesmas não se agruparam lateralmente como nos outros dois grupos de amostras.

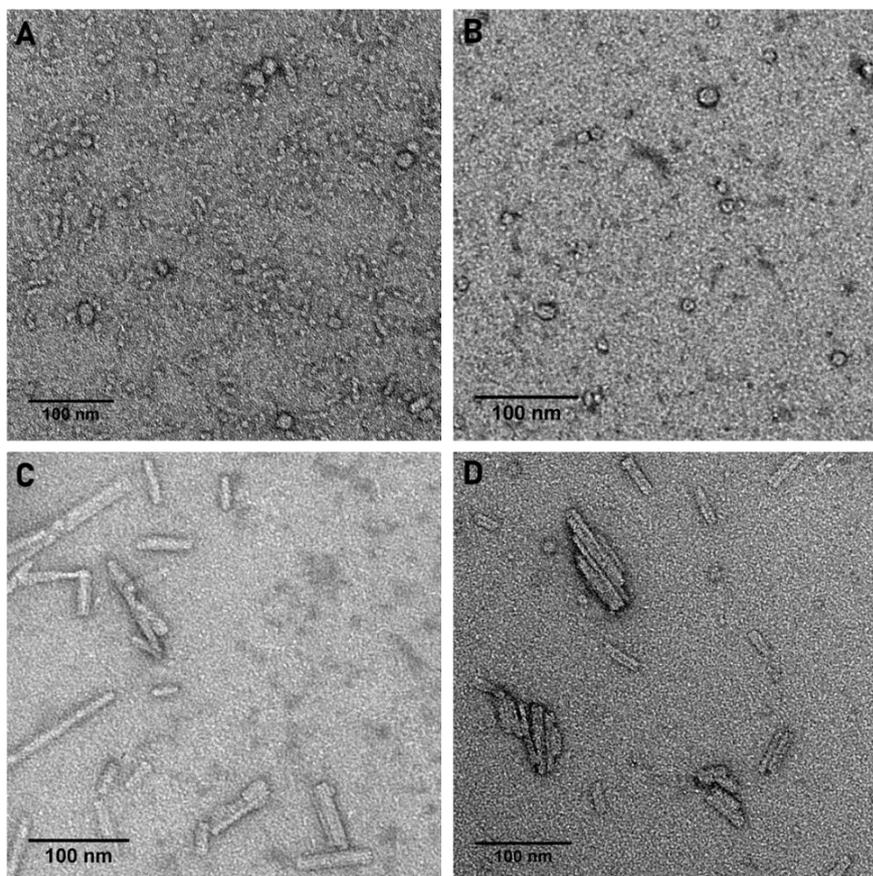


FIGURA 4.24 - Imagens de TEM por contrastação negativa do fragmento A β_{1-40} em tampão fosfato pH 7,4 (150 mM NaCl) na presença de complexo na proporção 1:1 amilóide:complexo nos tempos de incubação 15 (A), 60 (B), 120 (C) e 240 (D) minutos.

4.5.2.2. A influência do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4Apy)₂]²⁺ na morfologia do A β_{1-40}

A partir dos dados obtidos com os três grupos de amostra apresentados através da técnica de TEM, pôde-se concluir que a agregação do

A β_{1-40} se dá de forma não linear, apresentado mais de uma espécie por tempo de incubação. No entanto, existem espécies majoritárias em cada tempo.

Em 15 e 60 minutos de incubação, para as amostras sem e com complexo, não foi possível notar diferenças significativas. Há uma ligeira diferença nos diâmetros dos oligômeros, contudo, a mesma não é significativa, uma vez que os mesmos, dentro de um mesmo tempo de incubação, apresentam diferenças em tamanho.

Em 120 minutos de incubação foram observadas fibrilas para os três grupos de amostra. No entanto, a morfologia das fibrilas observadas é diferente para as amostras sem e com complexo. As amostras com complexo, tanto na proporção 5:1 como na 1:1, apresentaram fibrilas do tipo *belt*, indicando influência eletrostática na formação das fibrilas. Como o complexo possui carga 2+ é possível que a interação entre o peptídeo e o complexo, a qual foi observada pelas técnicas de fluorescência, interfira na morfologia das fibrilas formadas.

Já em 240 minutos de incubação duas mudanças puderam ser notadas. Primeiramente, a morfologia dos oligômeros na presença e na ausência do complexo foram diferentes. Na ausência de complexo, a maioria dos oligômeros observados foram do tipo poro, os quais, de acordo com a literatura, são responsáveis pela toxicidade celular, uma vez que formam canais de íons alternativos. Já na presença de complexo, como evidenciado pela amostra na proporção 5:1, os oligômeros formados são do tipo micelar, os quais embora estimulem a fibrilação, não são tóxicos para as células. A formação desse segundo tipo de oligômero seria favorável, uma vez que a toxicidade seria assim reduzida. Na amostra de proporção 1:1 foi possível observar a formação de fibrilas de tamanho menor em quantidade considerável em relação a fibrilas maiores agrupadas lateralmente, indicando que o complexo pode possuir capacidade de influenciar a fibrilação.

Assim, pode-se concluir que o complexo, dependendo de sua concentração em relação a concentração de amilóide, pode atuar apenas como marcador luminescente biológico ou atuar como um agente teranóstico, apresentando propriedades de diagnóstico por luminescência e propriedades terapêuticas influenciando na fibrilação do $A\beta_{1-40}$. A Figura 4.25 apresenta um comparativo entre os três grupos de amostras e seus respectivos tempos de incubação.

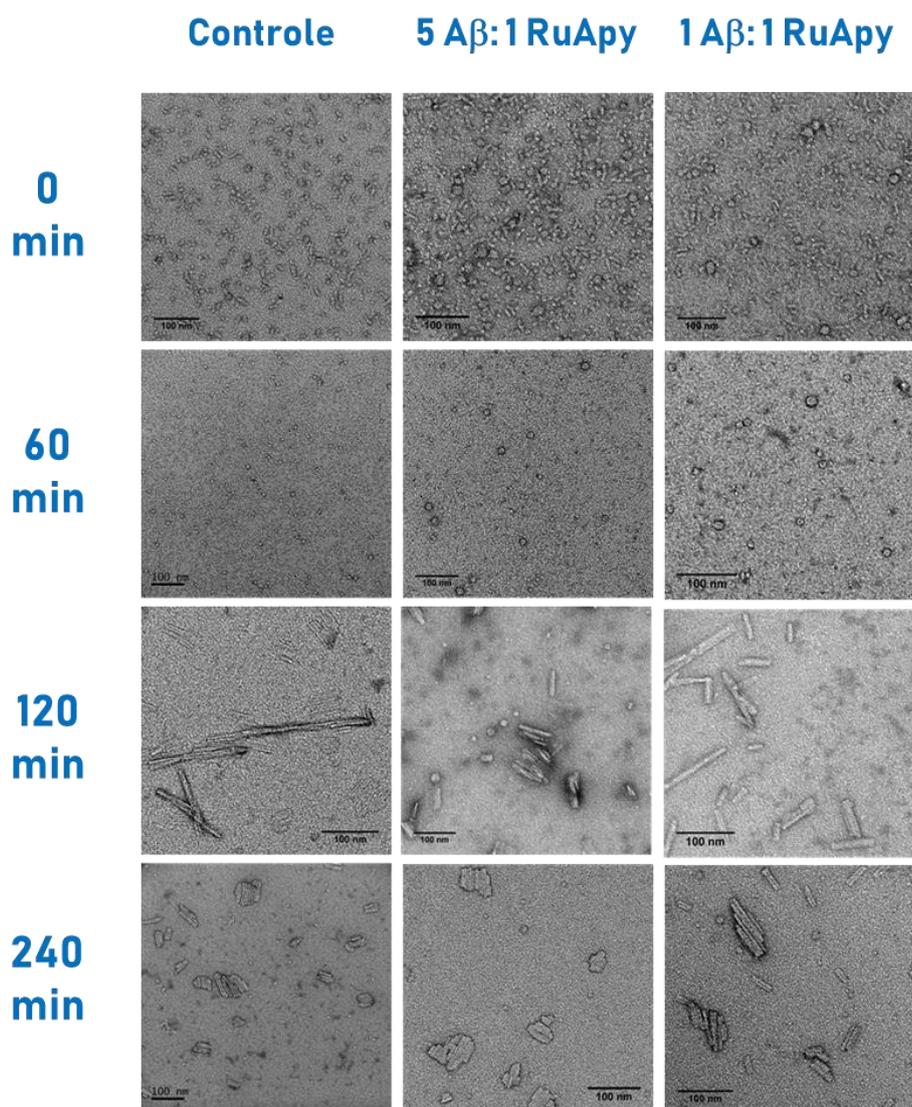


FIGURA 4.25 - Comparativo entre os três grupos de amostras do peptídeo $A\beta_{1-40}$ em tampão fosfato pH 7,4 (150 mM NaCl) e seus respectivos tempos de incubação.

4.5.2.3 - A β ₁₋₂₈

Para o fragmento A β ₁₋₂₈, assim como para os outros fragmentos menores, foram estudados os tempos de incubação 15 e 240 minutos na proporção 1:1 (A β ₁₋₂₈:complexo). Para o fragmento A β ₁₋₂₈ foram observados oligômeros em ambos os tempos de incubação. Para as amostras sem complexo, os oligômeros apresentaram um diâmetro médio de 13,62 nm (desvio padrão = 3,15 nm; erro padrão = 0,76 nm; n = 18) em 15 minutos de incubação, enquanto que para o mesmo tempo os oligômeros da amostra com complexo apresentaram diâmetro médio de 15,55 nm (desvio padrão = 7,76 nm; erro padrão = 1,41 nm; n = 30). Embora o diâmetro médio das amostras com complexo seja ligeiramente maior, as mesmas apresentaram uma maior diversidade em tamanho, apresentando um desvio padrão alto.

Já em 240 minutos de incubação os oligômeros apresentaram um aumento significativo em tamanho para a amostra sem complexo. O diâmetro médio dos oligômeros observados foi de 20,49 nm (desvio padrão = 6,43 nm; erro padrão = 1,66 nm; n = 15). No entanto, para a amostra com complexo os oligômeros apresentaram diâmetro médio de 17,28 nm (desvio padrão = 8,56 nm; erro padrão = 1,87 nm; n = 21). Pode-se inferir assim que, embora o complexo não influencie na morfologia do amilóide, o crescimento dos oligômeros foi influenciado pelo complexo, uma vez que o diâmetro dos mesmos permaneceu aproximadamente constante (FIGURA 4.26).

Fibrilas também foram observadas em 240 minutos de incubação, no entanto, não podem ser consideradas a espécie predominante desse tempo. O fragmento A β ₁₋₂₈ possui como aminoácidos terminais a asparagina, a qual é carregada positivamente, e a lisina, a qual é carregada negativamente. Assim, a repulsão eletrostática entre os aminoácidos terminais podem ser responsáveis pela formação de fibrilas tipo *belt* (FIGURA 4.27).

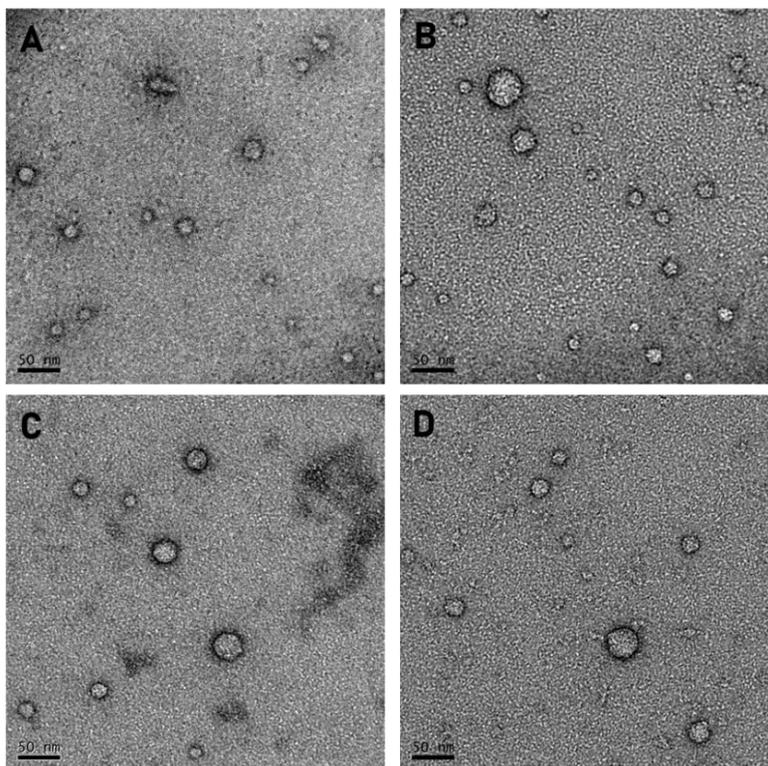


FIGURA 4.26 - Imagens de TEM por contrastação negativa do fragmento A β_{1-28} em tampão fosfato pH 7,4 (150 mM NaCl) nos tempos de incubação 15 (A) e 240 min (B) na ausência de complexo e 15 (C) e 240 (D) minutos na presença de complexo na proporção 1:1 amilóide:complexo.

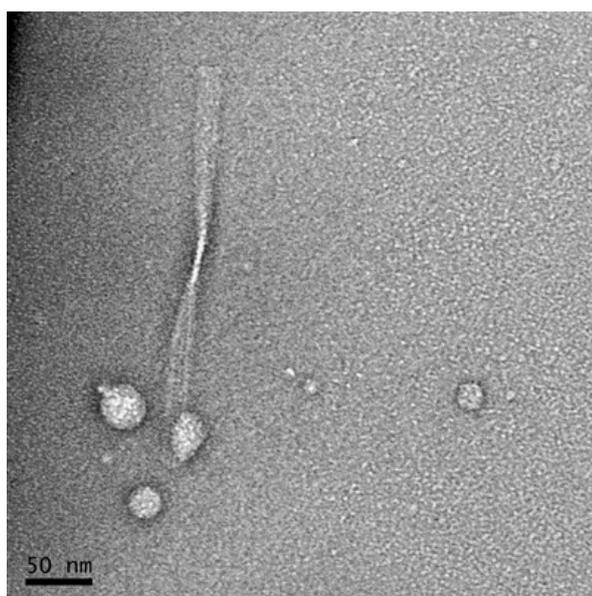


FIGURA 4.27– Imagens de TEM por contrastação negativa fibrila e oligômeros em tampão fosfato pH 7,4 (150 mM NaCl) do fragmento A β_{1-28} .

4.5.2.4 - A β ₁₁₋₂₂

Para o fragmento A β ₁₁₋₂₂ foi possível observar a formação de fibrilas tanto em 15 como em 240 minutos de incubação, indicando que este fragmento forma fibrilas rapidamente e, é responsável, mesmo que parcialmente, pelo processo de fibrilação do peptídeo beta amilóide. Em 15 minutos são observados oligômeros e fibrilas, sendo que as mesmas se apresentam em baixa quantidade em pouco tempo de incubação. Já em 240 minutos, é possível notar uma quantidade muito maior de fibrilas, indicando o contínuo processo de formação das mesmas (FIGURA 4.28).

As fibrilas formadas pelo fragmento A β ₁₁₋₂₂ apresentam vários *twists*, indicando a ação de repulsão eletrostática. Esse fragmento possui como aminoácidos terminais dois ácidos glutâmicos, sendo que os mesmos possuem grupos R carregados negativamente, causando repulsão e formando os *twists* (FIGURA 4.29). É possível notar que o complexo, assim como no fragmento A β ₁₋₂₈, não influencia na morfologia do amilóide, uma vez que as amostras com e sem complexo não apresentam diferenças significativas.

Assim, pode-se concluir que, embora o complexo interaja com este fragmento, como evidenciado pela mudança no tempo de vida das imagens por luminescência, o mesmo o faz de forma a não interferir na sua fibrilação.

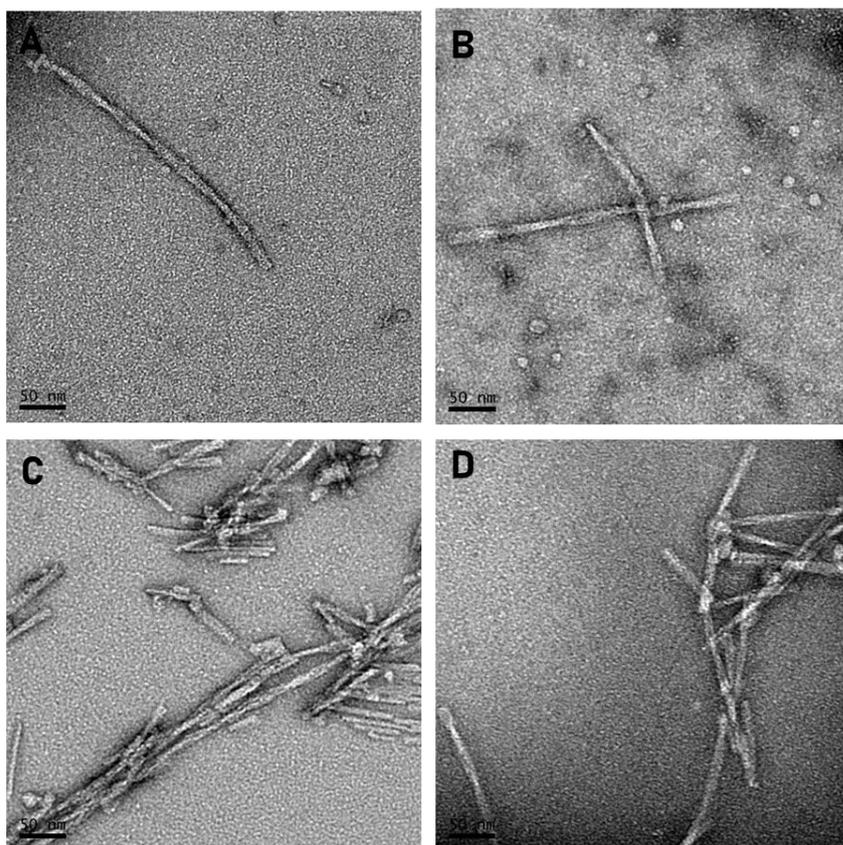


FIGURA 4.28 - Imagens de TEM por contrastação negativa do fragmento $A\beta_{11-22}$ em tampão fosfato pH 7,4 (150 mM NaCl) nos tempos de incubação 15 (A) e 240 min (B) na ausência de complexo e 15 (C) e 240 (D) minutos na presença de complexo na proporção 1:1 amilóide:complexo.

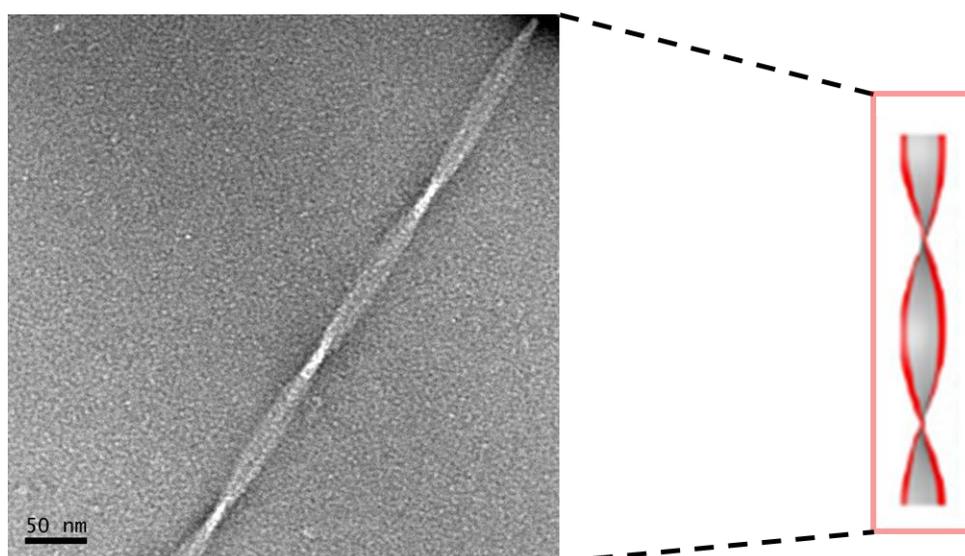


FIGURA 4.29 – Imagens de TEM por contrastação negativa de uma fibrila em tampão fosfato pH 7,4 (150 mM NaCl) do fragmento $A\beta_{11-22}$.

4.5.2.5 - A β_{29-40}

Para o fragmento A β_{29-40} foi possível observar em 15 minutos de incubação pequenas estruturas monoméricas e pequenos oligômeros, similar ao comportamento do fragmento A β_{1-40} . Em 240 minutos de incubação, foi possível observar fibrilas as quais, também como no fragmento A β_{1-40} , se agrupam lateralmente formando pequenas placas. Assim como nos outros casos, não foi possível observar diferenças entre as amostras sem e com complexo (FIGURA 4.30).

De todos os fragmentos estudados o A β_{29-40} foi o que mais se assemelhou ao comportamento do monômero A β_{1-40} , indicando que os aminoácidos 29-40 são de extrema importância para o comportamento do beta amiloide.

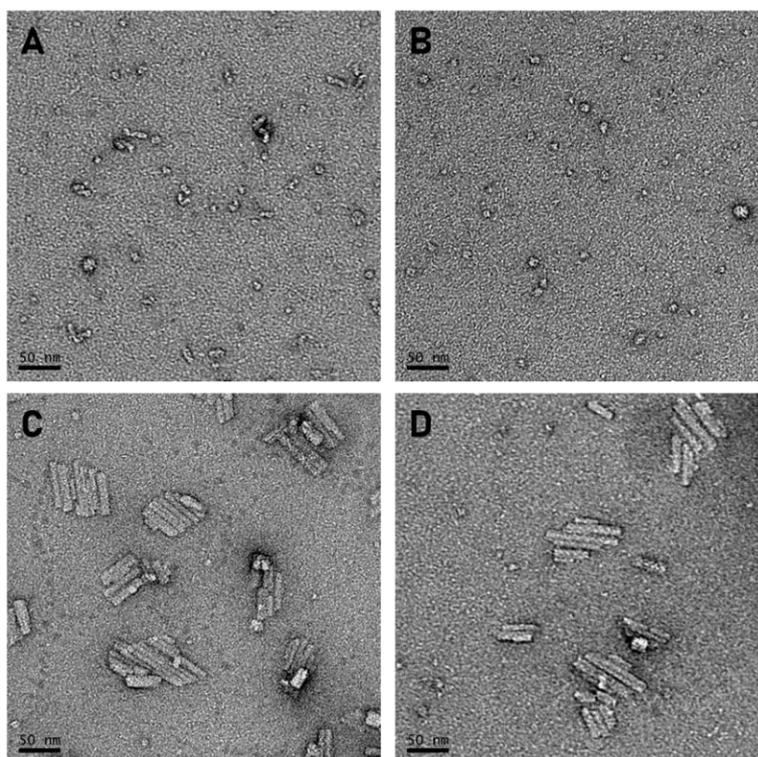


FIGURA 4.30 - Imagens de TEM do fragmento A β_{29-40} em tampão fosfato pH 7,4 (150 mM NaCl) nos tempos de incubação 15 (A) e 240 min (B) na ausência de complexo e 15 (C) e 240 (D) minutos na presença de complexo na proporção 1:1 amiloide:complexo.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Frente aos dados obtidos, observa-se que o complexo *cis*-[Ru(phen)₂(Apy)₂]²⁺:

1. Interage com o peptídeo beta amilóide em diferentes estágios de agregação, podendo contribuir, através de estudos *in vitro*, para a elucidação do mecanismo de agregação do A β ;

2. O complexo apresentou respostas significativamente distintas entre os fragmentos A β ₁₋₄₀, A β ₁₋₂₈, A β ₁₁₋₂₂ e A β ₂₉₋₄₀. Para o fragmento A β ₁₋₄₀ foi observado um terceiro tempo de vida de emissão referente à interação complexo amilóide de 7,64 ns. Já os fragmentos A β ₁₋₂₈ e A β ₁₁₋₂₂ apresentaram tempos de vida médio de emissão muito maiores (16 ns e 22 ns, respectivamente) quando incubados com complexo, indicando uma interação mais forte com esses fragmentos. Já o fragmento A β ₂₉₋₄₀ apresentou pouca ou nenhuma diferença nos tempos de vida médio de emissão das amostras sem e com complexo, indicando que a interação do complexo com esse fragmento não é significativa. As diferentes sequências de aminoácidos, menor constrição estérica e interações eletrostáticas podem contribuir com a interação entre o complexo e o amilóide, influenciando assim no tempo de vida de emissão observado para cada um deles;

3. É um marcador biológico sensível as diferentes sequências de resíduos de aminoácidos do A β , podendo ser usado para detectar e diferenciar superfícies características do A β ;

4. Apresenta influência na estrutura secundária do peptídeo e promove a formação de oligômeros micelares (“não tóxicos”).

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi demonstrado que o complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4Apy)₂]²⁺ interage com o peptídeo Aβ₁₋₄₀ e seus fragmentos Aβ₁₋₂₈, Aβ₁₁₋₂₂ e Aβ₂₉₋₄₀ na fase monomérica (pré-nucleação) o que permitiu acompanhar em tempo real o processo de agregação deste amilóides.

Os estudos planejados inicialmente para explorar as propriedades luminescentes do complexo aplicadas para monitorar o progresso da agregação do Aβ em tempo real foram ampliados para a análise da estrutura secundária do Aβ por dicroísmo circular e análise morfológica por microscopia eletrônica de transmissão com o progresso da agregação. Os resultados obtidos mostraram que o complexo não interfere na agregação, mas altera o tamanho e a quantidade das espécies geradas nas várias fases de agregação.

As respostas fluorescentes foram mais acentuadas para os peptídeos contendo resíduos de aminoácidos aromáticos que favorecem interações por empilhamento π. Isto não inviabilizou as interações eletrostáticas observadas para o peptídeo C-terminal.

Esta sensibilidade as diferentes sequências de resíduos de aminoácidos do Aβ é essencial para a identificação dos fragmentos do Aβ por luminescência.

Os resultados obtidos mostraram também que o complexo pode estar atuando como um inibidor de formação de placas fibrilares como também pode favorecer a formação de espécies oligoméricas micelares não tóxicas.

7. PLANOS FUTUROS

O trabalho realizado motiva a explorar tanto a citotoxicidade dos fragmentos investigados como o efeito e influência do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4Apy)]²⁺ no processo de agregação destes amilóides.

Os resultados também motivam a continuidade destes estudos para investigar os sítios de interação do complexo com o A β .

No conjunto, o estudo realizado vem para estimular a investigação do processo de agregação de outras proteínas amiloidogênicas e não amiloidogênicas.

8. REFERÊNCIAS

- ¹MAURER, K.; VOLK, S.; GERBALDO, H. “Auguste D and Alzheimer's disease”. *The Lancet*, 349, 9064, 1546-1549, 1997.
- ²ALZHEIMER, A. “Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters”. *Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie*, 4, 1, 356-385, 1911.
- ³RAPOPORT, M.; DAWSON, H.; BINDER, L.; VITEK, M.; FERREIRA, A. “Tau is essential to β -amyloid-induced neurotoxicity”. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 9, 6364-6369, 2002.
- ⁴SELKOE, D.; HARDY, J. “The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years”. *EMBO molecular medicine*, 8, 6, 595-608, 2016.
- ⁵TAKASHIMA, A.; NOGUCHI, K.; SATO, K.; HOSHINO, T.; IMAHORI, K. “Tau protein kinase I is essential for amyloid beta-protein-induced neurotoxicity”. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90, 16, 7789-7793, 1993.
- ⁶LORENZO, A.; YANKNER, B.; A. “Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by Congo Red”. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91, 25, 12243-12247, 1994.
- ⁷BUSCIGLIO, J.; LORENZO, A.; YEH, J.; YANKNER, B. “ β -Amyloid fibrils induce tau phosphorylation and loss of microtubule binding”. *Neuron*, 14, 4, 879-888, 1995.
- ⁸FERREIRA, A.; LU, Q.; ORECCHIO, L.; KOSIK, K. “Selective phosphorylation of adult tau isoforms in mature hippocampal neurons exposed to fibrillar A β ”. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 9, 3, 220-234, 1997.
- ⁹SHEA, T.; DERGAY, A.; EKINCI, F. “ β -amyloid induced hyperphosphorylation of tau in human neuroblastoma cells involves map kinase”. *Neuroscience Research Communications*, 22, 1, 45-49, 1998.
- ¹⁰EKINCI, F. J.; MALIK, K. M.; SHEA, T. B. “Beta-amyloid induces calcium influx and neurodegeneration by MAP kinase-mediated activation of the L voltage-sensitive calcium channel”. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 30322-30327, 1999.
- ¹¹ALVAREZ, A.; TORO, R.; CÁCERES, A.; MACCIONI, R. “Inhibition of tau phosphorylating protein kinase CDK5 prevents β -amyloid-induced neuronal death”. *FEBS letters*, 459, 3, 421-426, 1999.

- ¹²ANDREEVA, T. V.; LUKIW, W. J.; ROGAEV, E. I. “Biological basis for amyloidogenesis in Alzheimer’s disease”. *Biochemistry (Moscow)*, 82, 2, 122-139, 2017.
- ¹³BARZ, B.; LIAO, Q.; STRODEL, B. “Pathways of amyloid- β aggregation depend on oligomer shape”. *Journal of the American Chemical Society*, 140, 1, 319-327, 2017.
- ¹⁴BREYDO, L.; UVERSKY, V. “Structural, morphological, and functional diversity of amyloid oligomers”. *FEBS letters*, 589, 19, 2640-2648, 2015.
- ¹⁵“Types of dementia”. Alzheimer’s association. Disponível em: <<https://www.alz.org/alzheimers-dementia/what-is-dementia/types-of-dementia>>. Acesso em: 05 jul. 2018.
- ¹⁶PRINCE, P.; ALI, G. World Alzheimer report 2015 – the global impact of dementia: an analysis of prevalence, incidence, cost and trends. Alzheimer’s disease international, 87 páginas.
- ¹⁷“What is dementia?”. Alzheimer’s society. Disponível em: <<https://www.alzheimers.org.uk/about-dementia/types-dementia/what-dementia#content-start>>. Acesso em: 05 jul. 2018.
- ¹⁸“Dementia statistics”. Alzheimer’s disease international. Disponível em: <<https://www.alz.co.uk/research/statistics>>. Acesso em: 05 jul. 2018.
- ¹⁹“How is Alzheimer’s disease diagnosed?”. Disponível em: <<https://www.nia.nih.gov/health/how-alzheimers-disease-diagnosed>>. Acesso em: 05 jul. 2018.
- ²⁰O'BRIEN, R.; WONG, P. “Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease”. *Annual review of neuroscience*, 34, 185-204, 2011.
- ²¹EHEHALT, R.; KELLER, P.; HAASS, C.; THIELE, C.; SIMONS. K. “Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta amyloid precursor protein depends on lipid rafts”. *Journal of Cellular Biology*. 160, 113–123, 2003.
- ²²HERNANDEZ, F.; AVILA, J. “The role of glycogen synthase kinase 3 in the early stages of Alzheimer’s disease”. *FEBS Letters*, 582, 3848–3854, 2008.
- ²³LEE, M.; KWON, Y.; LI, M.; PENG, J.; FRIEDLANDER, R.; TSAI, L. “Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain”. *Nature*, 405, 360–364, 2000.
- ²⁴TURNER, P.; O’CONNOR, K.; TATE, W.; ABRAHAM, W. “Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory”. *Progress in neurobiology*, 70, 1, 1-32, 2003.

²⁵SELKOE, D.; PODLISNY, M.; JOACHIM, C.; VICKERS, E.; LEE, G., FRITZ, L.; OLTERS DORF, T. Beta-amyloid precursor protein of Alzheimer's disease occurs as 110–135 kilodalton membrane-associated proteins in neural and non-neural tissues. *PNAS*, 85, 7341–7345, 1988.

²⁶TANAKA, S.; SHIOJIRI, S.; TAKAHASHI, Y.; KITAGUCHI, N.; ITO, H.; KAMEYAMA, M.; KIMURA, J.; UEDA, K. "Tissue-specific expression of three types of beta-protein precursor mRNA: enhancement of protease inhibitor-harboring types in Alzheimer's disease brain". *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 165, 1406–1414, 1989.

²⁷VON KOCH, C.; ZHENG, H.; CHEN, H.; TRUMBAUER, M.; THINAKARAN, G.; VAN DER PLOEG, L.; PRICE, D.; SISODIA, S. "Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice". *Neurobiology of Aging*, 18, 661–669, 1997.

²⁸ZHENG, H.; JIANG, M.; TRUMBAUER, M.; SIRINATHSINGHJI, D.; HOPKINS, R.; SMITH, D.; HEAVENS, R.; DAWSON, G.; BOYCE, S.; CONNER, M. "β-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity". *Cell*, 81, 525–531, 1995.

²⁹SNYDER, S.; LADROR, U.; WADE, W.; WANG, G.; BARRETT, L.; MATAYOSHI, E.; HUFFAKER, H.; KRAFFT, G.; HOLZMAN, T.F. "Amyloid-beta aggregation: selective inhibition of aggregation in mixtures of amyloid with different chain lengths". *Biophysics Journal*, 67, 1216–1228, 1994.

³⁰ZHAO, G.; MAO, G.; TAN, J.; DONG, Y.; CUI, M. Z.; KIM, S. H.; XU, X. "Identification of a new presenilin-dependent ζ-cleavage site within the transmembrane domain of amyloid precursor protein". *Journal of Biological Chemistry*, 279, 49, 50647-50650, 2004.

³¹TAKAMI, M.; NAGASHIMA, Y.; SANO, Y.; ISHIHARA, S.; MORISHIMA-KAWASHIMA, M.; FUNAMOTO, S.; IHARA, Y. "γ-Secretase: successive tripeptide and tetrapeptide release from the transmembrane domain of β-carboxyl terminal fragment". *Journal of Neuroscience*, 29, 41, 13042-13052, 2009.

³²VAN DAM, D.; DE DEYN, P. "Model organisms: Drug discovery in dementia: the role of rodent models". *Nature reviews: Drug discovery*, 5, 11, 956, 2006.

³³SOTO-ORTEGA, D. D., MURPHY, B. P., GONZALEZ-VELASQUEZ, F. J., WILSON, K. A., XIE, F., WANG, Q., & MOSS, M. A. "Inhibition of amyloid-β aggregation by coumarin analogs can be manipulated by functionalization of the aromatic center". *Bioorganic & medicinal chemistry*, 19, 8, 2596-2602, 2011.

- ³⁴MAJI, S. K.; WANG, L.; GREENWALD, J.; RIEK, R. “Structure–activity relationship of amyloid fibrils”. *FEBS letters*, 583, 16, 2610-2617, 2009.
- ³⁵SUNDE, M.; BLAKE, C. “The structure of amyloid fibrils by electron microscopy and X-ray diffraction”. *Advances in protein chemistry*, 50, 123-159, 1997.
- ³⁶SUNDE, M.; SERPELL, L.; BARTLAM, M.; FRASER, P.; PEPYS, M.; BLAKE, C. “Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction”. *Journal of molecular biology*, 273, 3, 729-739, 1997.
- ³⁷LASHUEL, H.; HARTLEY, D.; PETRE, B.; WALZ, T.; LANSBURY, P. “Neurodegenerative disease: amyloid pores from pathogenic mutations”. *Nature*, 418, 6895, 291, 2002.
- ³⁸CAUGHEY, B.; LANSBURY JR, P. “Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders”. *Annual review of neuroscience*, 26, 1, 267-298, 2003.
- ³⁹LASHUEL, H. A., HARTLEY, D. M., PETRE, B. M., WALL, J. S., SIMON, M. N., WALZ, T., & LANSBURY JR, P. “Mixtures of wild-type and a pathogenic (E22G) form of A β 40 in vitro accumulate protofibrils, including amyloid pores”. *Journal of molecular biology*, 332, 4, 795-808, 2003.
- ⁴⁰KUROUSKI, D.; VAN DUYN, R.; LEDNEV, I. “Exploring the structure and formation mechanism of amyloid fibrils by Raman spectroscopy: a review”. *Analyst*, 140, 15, 4967-4980, 2015.
- ⁴¹DIAZ-ESPINOZA, R.; SOTO, C. High-resolution structure of infectious prion protein: the final frontier. *Nature Structural and Molecular Biology*, 19, 4, 370, 2012.
- ⁴²TYCKO, R.; WICKNER, R. “Molecular structures of amyloid and prion fibrils: consensus versus controversy”. *Accounts of chemical research*, 46, 7, 1487-1496, 2013.
- ⁴³EISENBERG, D.; JUCKER, M. “The amyloid state of proteins in human diseases. *Cell*, 148, 6, 1188-1203, 2012.
- ⁴⁴LUE, L.; KUO, Y.; ROHER, A.; BRACHOVA, L.; SHEN, Y.; SUE, L.; BEACH, T.; KURTH, J.; RYDEL, R.; ROGERS, J. “Soluble amyloid peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer’s disease”. *American Journal of Pathology*, 155, 853–862, 1999.
- ⁴⁵FINDER, V.; GLOCKSHUBER, R. “Amyloid- β aggregation”. *Neurodegenerative Diseases*, 4, 13-27, 2007.

- ⁴⁶SELKOE D. “Cell biology of protein misfolding: the examples of Alzheimer’s and Parkinson’s diseases”. *Nature Cell Biology*, 6, 1054–1061, 2004.
- ⁴⁷BARROW, C., ZAGORSKI, M. “Solution structures of beta peptide and its constituent fragments: relation to amyloid deposition”. *Science*, 253, 179-182, 1991.
- ⁴⁸KAYED, E.; HEAD, J. THOMPSON, T.; MCINTIRE, S.; MILTON, C.; COTMAN, C. GLABE, G. “Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis”. *Science*, 300, 486–489, 2003.
- ⁴⁹BARZ, B.; LIAO, Q.; STRODEL, B. “Pathways of amyloid- β aggregation depend on oligomer shape”. *Journal of the American Chemical Society*, 140, 1, 319-327, 2017.
- ⁵⁰MOREL, B., CARRASCO, M. P., JURADO, S., MARCO, C., & CONEJERO-LARA, F. “Dynamic micellar oligomers of amyloid beta peptides play a crucial role in their aggregation mechanisms”. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 20, 31, 20597-20614, 2018.
- ⁵¹YONG, W., LOMAKIN, A., KIRKITADZE, M. D., TELOW, D. B., CHEN, S. H., & BENEDEK, G. B. “Structure determination of micelle-like intermediates in amyloid β -protein fibril assembly by using small angle neutron scattering” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99,1, 150-154, 2002.
- ⁵²NOVO, M.; FREIRE, S.; AL-SOUFI, W. “Critical aggregation concentration for the formation of early Amyloid- β (1–42) oligomers”. *Scientific reports*, 8, 1, 1783, 2018.
- ⁵³MURPHY, R. “Kinetics of amyloid formation and membrane interaction with amyloidogenic proteins”. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1768, 8, 1923-1934, 2007.
- ⁵⁴LAMBERT, M.; BARLOW, A.; CHROMY, C. EDWARDS, R. FREED, M. LIOSATOS, T.; MORGAN, I.; ROZOVSKY, B.; TROMMER, K.; VIOLA, P. WALS, C. ZHANG, C.; FINCH, G.; KRAFFT, W. “Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β (1–42) are potent central nervous system neurotoxins”, *Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A*, 95, 6448–6453, 1998.
- ⁵⁵ROSS, C.; POIRIER, M. “What is the role of protein aggregation in neurodegeneration?” *Nature Review Molecular Cell Biology*, 6, 891–898, 2005.

⁵⁶DAHLGREN, K.; MANELLI, A.; STINE, W.; BAKER, L.; KRAFFT, G.; LADU, M. “Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability” *Journal of Biological Chemistry*, 277, 32046–32053, 2002.

⁵⁷KIRKITADZE, M.; BITAN, G.; TELOW, D. “Paradigm shifts in Alzheimer's disease and other neuro degenerative disorders: the emerging role of oligomeric assemblies” *Journal of Neuroscience Research*, 69, 567–577, 2002.

⁵⁸SOUSA, M.; CARDOSO, I.; FERNANDES, R.; GUIMARAES, M. “Deposition of transthyretin in early stages of familial amyloidotic polyneuropathy — Evidence for toxicity of nonfibrillar aggregates”. *American Journal of Pathology*, 159, 1993–2000, 2001.

⁵⁹HARTLEY, D.; WALSH, D.; YE, C.; DIEHL, T.; VASQUEZ, S.; VASSILEV, P. TELOW, D. SELKOE, D. “Protofibrillar intermediates of amyloid beta protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons”. *Journal of Neuroscience*, 19 8876–8884, 1999.

⁶⁰HU, Y., LIN, R., ZHANG, P., FERN, J., CHEETHAM, A. G., PATEL, K.; SCHULMAN, R.; KAN, C. & Cui, H. “Electrostatic-driven lamination and untwisting of β -sheet assemblies”. *ACS Nano*, 10, 1, 880-888, 2015.

⁶¹FÄNDRICH, M. “Oligomeric intermediates in amyloid formation: structure determination and mechanisms of toxicity”. *Journal of Molecular Biology*, 421, 4-5, 427-440, 2012.

⁶²FURUKAWA, K., BARGER, S.; BLALOCK, E.; MATTSON, M. “Activation of K^+ channels and suppression of neuronal activity by secreted β - amyloid-precursor protein” *Nature*, 379, 74–78, 1996.

⁶³ITTNER, L.; GÖTZ, J. “Amyloid- β and tau - a toxic pas de deux in Alzheimer's disease”. *Nature Review Neuroscience*, 12, 65–72, 2011.

⁶⁴FU, L., SUN, Y., GUO, Y., CHEN, Y., YU, B., ZHANG, H., WU, H. “Comparison of neurotoxicity of different aggregated forms of A β 40, A β 42 and A β 43 in cell cultures”. *Journal of Peptide Science*, 23, 3, 245-251, 2017.

⁶⁵YIANNPOULOU, K.; PAPAGEORGIU, G. “Current and future treatments for Alzheimer's disease”. *Therapeutic advances in neurological disorders*, 6, 1, 19-33, 2013.

- ⁶⁶XU, M. M., REN, W. M., TANG, X. C., HU, Y. H., & ZHANG, H. Y. (2016). “Advances in development of fluorescent probes for detecting amyloid- β aggregates”. *Acta Pharmacologica Sinica*, 37, 6, 719.
- ⁶⁷ZHOU, M., WANG, X., LIU, Z., YU, L., HU, S., CHEN, L. “Advances of molecular imaging probes for the diagnosis of Alzheimer’s disease”. *Current Alzheimer Research*, 11, 221–231, 2014.
- ⁶⁸CHANG W.; DAKANALI, M.; CAPULE, C.; SIGURDSON, C., YANG, J., THEODORAKIS, E. “ANCA: A family of fluorescent probes that bind and stain amyloid plaques in human tissue”. *ACS Chemical Neuroscience*, 2, 249–55, 2011.
- ⁶⁹WEISSLEDER, R., NTZIACHRISTOS, V. “Shedding light onto live molecular targets”. *Nature Medicine*, 9, 123–128, 2003
- ⁷⁰NESTEROV EE, SKOCH J, HYMAN BT, KLUNK WE, BACSKAI BJ, SWAGER TM. “*In vivo* optical imaging of amyloid aggregates in brain: design of fluorescent markers”. *Angewandte Chemie*, 2005; 44: 5452–5456
- ⁷¹RAN, C.; XU, X.; RAYMOND, S.; FERRARA, B.; NEAL, K.; BACSKAI, B. “Design, synthesis, and testing of difluoroboron-derivatized curcumins as near-infrared probes for *in vivo* detection of amyloid- β deposits”. *Journal of the American Chemical Society*, 131, 15257–15261, 2009.
- ⁷²LEVINE III, H. “Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease β -amyloid peptides: Detection of amyloid aggregation in solution.” *Protein Science*, 2, 3, 404-410, 1993.
- ⁷³GROENNING, M. “Binding mode of Thioflavin T and other molecular probes in the context of amyloid fibrils—current status”. *Journal of chemical biology*, 3, 1, 1-18, 2010.
- ⁷⁴ADLER, J.; SCHEIDT, H.; KRÜGER, M.; THOMAS, L.; HUSTER, D. “Local interactions influence the fibrillation kinetics, structure and dynamics of A β (1-40) but leave the general fibril structure unchanged.” *Physical Chemistry Chemical Physics*, 16, 16, 7461-7471, 2014.
- ⁷⁵SILVA, D.E.S. Complexos de metais de transição multifuncionais para o tratamento e diagnóstico da Doença de Alzheimer. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2016. Dissertação de Mestrado, 84.p

⁷⁶LIMA, M.V.S.L. Complexos de metais de transição como precursores de moléculas bioativas: aplicações na Doença de Alzheimer. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2014. Tese de Doutorado, 99 .p

⁷⁷LINSE, S. “Monomer-dependent secondary nucleation in amyloid formation”. *Biophysical reviews*, 9, 4, 329-338, 2017.

⁷⁸APRILE, F.; SORMANNI, P.; PERNI, M.; AROSIO, P.; LINSE, S.; KNOWLES, T.; VENDRUSCOLO, M. “Selective targeting of primary and secondary nucleation pathways in A β 42 aggregation using a rational antibody scanning method”. *Science advances*, 3, 6, e1700488, 2017.

⁷⁹JURIS, A.; BALZANI, V.; BARIGELLETI, F.; CAMPAGNA, S.; BELSER, P.; ZELEWSKY, A. V. “Photochemistry and photophysics of coordination compounds: ruthenium”. *Coordination Chemical Reviews*, 84, 85–277, 1988.

⁸⁰BECKER, W. “Fluorescence lifetime imaging – techniques and applications” *Journal of Microscopy*, 247, 119-136, 2012.

⁸¹SZABO, A.; RAYNER, D. “Fluorescence decay of tryptophan conformers in aqueous solution”. *Journal of the American Chemical Society*, 102, 2, 554-563, 1980.

⁸²ROLINSKI, O. J., AMARO, M., & BIRCH, D. J. “Early detection of amyloid aggregation using intrinsic fluorescence”. *Biosensors and Bioelectronics*, 25, 10, 2249-2252, 2010.

⁸³CHAN, F.; SCHIERLE, G.; KUMITA, J.; BERTONCINI, C.; DOBSON, C.; KAMINSKI, C. “Protein amyloids develop an intrinsic fluorescence signature during aggregation”. *Analyst*, 138, 7, 2156-2162, 2013.

⁸⁴COOK, N.; OZBIL, M.; KATSAMPES, C.; PRABHAKAR, R.; MARTÍ, A. “Unraveling the photoluminescence response of light-switching ruthenium (II) complexes bound to amyloid- β ”. *Journal of the American Chemical Society*, 135, 29, 10810-10816.

⁸⁵SILVA, D.; CALI, M.; PAZIN, W.; CARLOS-LIMA, E.; SALLES TREVISAN, M.; VENÂNCIO, T.; CARLOS, R. M. “Luminescent Ru (II) phenanthroline complexes as a probe for real-time imaging of A β self-aggregation and therapeutic applications in Alzheimer’s disease”. *Journal of medicinal chemistry*, 59, 19, 9215-9227, 2016.

9. ANEXO

A β ₁₋₄₀ SEM COMPLEXO

15 MINUTOS

	Área	Ângulo	Comprimento
1	6.127	45	21.918
2	7.429	45	26.614
3	7.429	45	26.614
4	6.127	45	21.918
5	5.744	45	20.352
6	6.817	45	24.266
7	5.515	45	19.569
8	6.817	45	24.266
9	6.587	45	23.483
10	4.442	45	15.656
11	5.515	45	19.569
12	5.285	45	18.787
13	3.523	45	12.524
14	5.055	45	18.004
15	4.442	45	15.656
16	3.983	45	14.09
17	4.213	45	14.873
18	4.442	45	15.656
MÉDIA	19.65638889		
DP	4.344825389		
EP	1.024085165		

60 MINUTOS

	Área	Ângulo	Comprimento
1	1.774	45	9.405
2	2.355	45	12.54
3	1.467	45	7.837
4	1.774	45	9.405
5	2.628	45	14.107
6	1.194	45	6.27
7	1.911	45	10.189
8	2.935	45	15.675
9	1.911	45	10.189
10	2.628	45	14.107
11	3.208	45	17.242
12	1.911	45	10.189
13	1.467	45	7.837
14	1.194	45	6.27
15	1.774	45	9.405
16	1.774	45	9.405
17	1.331	45	7.054
18	1.638	45	8.621
19	1.638	45	8.621
20	1.638	45	8.621
21	2.355	45	12.54
22	1.638	45	8.621
23	1.911	45	10.189
24	1.467	45	7.837
25	1.467	45	7.837
26	1.467	45	7.837
27	1.638	45	8.621

28	2.047	45	10.972
29	2.047	45	10.972
30	2.491	45	13.324
MÉDIA	10.057967		
DP	2.7234156		
EP	0.4972254		

120 MINUTOS

FIBRILAS

Comprimento

	Área	Ângulo	Comprimento
1	75.242	6.822	272.092
2	45.786	7.481	165.497
3	26.861	-70.017	97
4	14.652	-59.808	52.733
5	31.516	69.981	113.781
6	14.041	-91.878	50.58
7	10.989	-49.268	39.371
8	31.745	54.703	114.739
9	30.524	45	110.168
10	21.291	-37.117	76.907
11	66.008	23.538	238.641
MÉDIA	121.046273		
DP	75.933951		
EP	22.8949477		

Largura

	Área	Ângulo	Comprimento
1	2.671	45	9.376
2	2.976	45	10.548
3	3.51	90	12.431
4	2.366	45	8.204
5	3.434	-28.301	12.236
6	3.358	-24.775	11.866
7	3.358	50.711	11.778
8	3.587	-58.392	12.65
9	2.366	45	8.204
10	3.358	50.711	11.778
11	2.976	-45	10.548
12	3.129	116.565	11.119
13	3.129	131.987	11.149
14	3.358	77.905	11.866
MÉDIA	10.9823571		
DP	1.46028599		
EP	0.39027785		

OLIGÔMEROS

	Área	Ângulo	Comprimento
1	3.663	45	12.892
2	2.671	45	9.376
3	4.579	45	16.408
4	2.976	45	10.548
5	2.976	45	10.548
6	5.265	45	18.752
7	2.671	45	9.376
8	3.663	45	12.892
9	2.976	45	10.548
10	3.968	45	14.064
11	3.968	45	14.064
MÉDIA	12.678909		
DP	3.0026165		
EP	0.9053229		

240 MINUTOS**OLIGÔMEROS**

	Área	Ângulo	Comprimento
1	7.402	45	26.565
2	3.663	45	13.022
3	3.51	45	12.501
4	4.655	45	16.668
5	3.968	45	14.064
6	6.868	45	24.482

7	5.265	45	18.752
8	4.121	45	14.585
9	2.213	45	7.813
10	4.121	45	14.585
11	4.96	45	17.71
12	5.418	45	19.273
13	3.816	45	13.543
14	4.426	45	15.627
15	4.426	45	15.627
16	3.816	45	13.543
17	3.816	45	13.543
18	4.655	45	16.668
19	6.715	45	23.961
20	4.121	45	14.585
21	6.105	45	21.877
22	3.968	45	14.064
23	4.502	45	16.148
24	3.663	45	13.022
25	3.968	45	14.064
26	4.655	45	16.668
27	5.418	45	19.273
28	4.426	45	15.627
29	4.808	45	17.189
30	5.571	45	19.794
31	3.663	45	13.022
32	4.96	45	17.71
33	4.426	45	15.627
34	6.715	45	23.961
35	4.273	45	15.106
36	4.808	45	17.189
37	4.808	45	17.189

38	3.129	45	10.939
39	3.968	45	14.064
40	2.366	45	8.334
41	4.502	45	16.148
42	3.205	45	11.46
43	5.952	45	21.356
44	7.86	45	28.128
45	3.816	45	13.543
46	3.129	45	10.939
47	3.129	45	10.939
48	4.273	45	15.106
49	4.808	45	17.189
50	6.563	45	23.44
51	3.968	45	14.064
52	4.502	45	16.148
53	5.571	45	19.794
54	7.097	45	25.524
55	4.502	45	16.148
56	4.655	45	16.668
57	4.426	45	15.627
58	4.96	45	17.71
59	4.96	45	17.71
60	3.205	45	11.46
61	6.257	45	22.398
62	5.265	45	18.752
MÉDIA	16.5844355		
DP	4.25601049		
EP	0.13729066		

A β ₁₋₄₀ COM COMPLEXO 5:1**15 MINUTOS**

	Área	Ângulo	Comprimento
1	5.265	45	18.752
2	5.494	45	19.533
3	5.723	45	20.315
4	4.197	45	14.845
5	3.129	45	10.939
6	2.442	45	8.595
7	4.197	45	14.845
8	3.739	45	13.283
9	4.426	45	15.627
10	3.51	45	12.501
11	4.808	45	17.189
12	5.723	45	20.315
13	4.808	45	17.189
14	4.579	45	16.408
15	3.739	45	13.283
16	5.723	45	20.315
17	4.197	45	14.845
18	3.281	45	11.72
19	5.265	45	18.752
20	5.265	45	18.752
21	4.426	45	15.627
22	3.51	45	12.501
23	3.739	45	13.283
24	5.494	45	19.533
25	5.036	45	17.971

26	3.51	45	12.501
27	3.968	45	14.064
28	2.671	45	9.376
29	5.036	45	17.971
30	4.808	45	17.189
31	3.281	45	11.72
32	5.036	45	17.971
33	3.281	45	11.72
34	3.968	45	14.064
35	4.197	45	14.845
36	4.426	45	15.627
37	4.579	45	16.408
38	3.739	45	13.283
39	2.671	45	9.376
40	3.51	45	12.501
41	3.968	45	14.064
42	4.579	45	16.408
43	5.723	45	20.315
44	3.51	45	12.501
45	3.129	45	10.939
46	2.671	45	9.376
47	2.213	45	7.813
48	3.739	45	13.283
49	3.739	45	13.283
50	3.968	45	14.064
MÉDIA	14.7516		
DP	3.339805		
EP	0.47232		

60 MINUTOS

	Área	Ângulo	Comprimento
1	2.9	45	10.157
2	1.984	45	7.032
3	2.213	45	7.813
4	2.9	45	10.157
5	3.739	45	13.283
6	3.281	45	11.72
7	4.197	45	14.845
8	3.51	45	12.501
9	3.968	45	14.064
10	4.579	45	16.408
11	3.968	45	14.064
12	3.51	45	12.501
13	3.739	45	13.283
14	3.281	45	11.72
15	2.213	45	7.813
16	3.968	45	14.064
17	3.129	45	10.939
18	3.281	45	11.72
19	3.129	45	10.939
20	2.671	45	9.376
21	3.281	45	11.72
22	2.213	45	7.813
23	1.984	45	7.032
24	4.426	45	15.627
25	3.129	45	10.939
26	3.281	45	11.72
27	2.213	45	7.813

28	1.984	45	7.032
29	3.281	45	11.72
30	3.129	45	10.939
31	3.51	45	12.501
32	3.739	45	13.283
33	3.739	45	13.283
34	3.281	45	11.72
35	2.442	45	8.595
36	3.739	45	13.283
MÉDIA	11.37275		
DP	2.522871		
EP	0.420479		

120 MINUTOS

FIBRILA *BELT*

	Área	Ângulo	Comprimento
1	2.428	53.13	8.433
2	2.58	47.49	8.965
3	1.973	60.255	6.799
4	2.049	55.713	7.255
5	1.973	-13.496	6.954
6	2.277	-33.69	7.956
7	3.187	-25.942	11.314
8	1.745	-33.69	6.081
9	2.428	-11.31	8.6
10	2.049	46.548	7.156
11	2.353	45	8.349

12	2.353	43.668	8.349
13	2.884	-34.992	10.294
14	1.821	23.199	6.423
15	2.277	20.323	8.001
16	2.201	12.095	7.775
17	2.732	45	9.541
18	2.656	-64.179	9.429
19	2.428	0	8.433
20	2.504	-59.349	8.683
21	2.504	-71.565	8.805
22	2.428	-79.046	8.6
23	2.656	-95.042	9.315
24	2.277	-71.565	8.001
25	2.504	28.179	8.683
26	2.049	20.556	7.205
27	2.808	30.141	9.835
28	2.58	48.814	8.965
29	1.973	-14.036	6.954
30	2.201	-14.534	7.775
31	2.504	-28.179	8.683
32	2.049	46.548	7.156
33	2.277	30.964	7.956
34	2.504	29.055	8.683
35	2.353	-66.801	8.306
36	2.353	-66.801	8.306
37	2.656	-64.179	9.429
MÉDIA	8.309378		
DP	1.088807		
EP	0.178999		

240 MIN

OLIGÔMERO

	Área	Ângulo	Comprimento
1	5.571	45	19.924
2	5.876	45	21.096
3	3.281	45	11.72
4	3.968	45	14.064
5	4.273	45	15.236
6	2.976	45	10.548
7	2.366	45	8.204
8	4.579	45	16.408
9	5.265	45	18.752
10	5.265	45	18.752
11	3.663	45	12.892
12	3.663	45	12.892
13	2.366	45	8.204
14	4.273	45	15.236
15	3.663	45	12.892
16	2.671	45	9.376
17	4.273	45	15.236
18	4.273	45	15.236
19	3.281	45	11.72
20	3.663	45	12.892
21	4.96	45	17.58
22	3.968	45	14.064
23	3.663	45	12.892
24	2.976	45	10.548
25	4.273	45	15.236
26	3.663	45	12.892

27	3.281	45	11.72
28	4.273	45	15.236
29	3.281	45	11.72
30	4.96	45	17.58
31	4.273	45	15.236
32	3.968	45	14.064
33	3.968	45	14.064
34	3.663	45	12.892
MÉDIA	14.02953		
DP	3.08717		
EP	0.529445		

A β ₁₋₄₀ COM COMPLEXO 1:1

15 MIN

	Área	Ângulo	Comprimento
1	3.658	45	13.138
2	3.21	45	11.592
3	3.658	45	13.138
4	5.748	45	20.865
5	4.33	45	15.456
6	4.33	45	15.456
7	2.837	45	10.046
8	4.703	45	17.001
9	2.837	45	10.046
10	4.927	45	17.774
11	4.106	45	14.683
12	4.106	45	14.683

13	3.882	45	13.91
14	5.375	45	19.32
15	4.479	45	16.229
16	3.658	45	13.138
17	3.061	45	10.819
18	3.434	45	12.365
19	2.613	45	9.274
20	4.479	45	16.229
21	4.479	45	16.229
22	4.33	45	15.456
23	4.479	45	16.229
24	2.389	45	8.501
25	2.165	45	7.728
26	3.21	45	11.592
27	4.106	45	14.683
28	4.33	45	15.456
29	5.375	45	19.32
30	4.703	45	17.001
31	4.33	45	15.456
32	3.434	45	12.365
33	4.106	45	14.683
34	4.106	45	14.683
35	3.658	45	13.138
36	5.151	45	18.547
37	3.658	45	13.138
38	3.061	45	10.819
39	3.658	45	13.138
40	4.33	45	15.456
41	2.165	45	7.728
42	2.837	45	10.046
43	1.941	45	6.955

44	3.061	45	10.819
45	3.21	45	11.592
MÉDIA	13.68711		
DP	3.277099		
EP	0.488521		

60 MIN

	Área	Ângulo	Comprimento
1	1.941	45	6.698
2	3.882	45	13.91
3	3.434	45	12.365
4	2.837	45	10.046
5	2.613	45	9.274
6	3.061	45	10.819
7	3.061	45	10.819
8	3.434	45	12.365
9	3.061	45	10.819
10	3.583	45	12.88
11	5.151	45	18.547
12	3.583	45	12.88
14	3.285	45	11.85
15	4.404	45	15.971
16	3.882	45	13.91
17	2.016	45	7.213
18	3.061	45	10.819
19	3.434	45	12.365
20	2.911	45	10.304
21	3.434	45	12.365
22	3.434	45	12.365

23	3.882	45	13.91
24	2.613	45	9.274
25	2.762	45	9.789
26	3.285	45	11.85
27	2.762	45	9.789
28	2.165	45	7.728
29	4.33	45	15.456
30	3.061	45	10.819
31	3.583	45	12.88
32	3.135	45	11.334
33	3.285	45	11.85
34	3.061	45	10.819
35	3.434	45	12.365
36	4.33	45	15.456
37	4.33	45	15.456
38	3.583	45	12.88
39	3.434	45	12.365
40	2.911	45	10.304
41	3.061	45	10.819
MÉDIA	11.84318		
DP	2.387014		
EP	0.37742		

120 MIN

FIBRILA BELTS

	Área	Ângulo	Comprimento
1	2.613	-54.462	9.401
2	2.911	-71.565	10.368
3	2.463	-60.255	8.811
4	2.314	-5.711	8.238
5	2.165	12.529	7.557
6	2.911	-61.39	10.27
7	2.613	26.565	9.164
8	2.389	-73.301	8.558
9	2.463	-33.69	8.866
10	2.911	45	10.433
11	3.434	19.654	12.185
12	2.463	-41.186	8.713
13	2.911	51.34	10.497
14	2.463	-41.186	8.713
15	2.687	19.983	9.594
16	2.165	12.529	7.557
17	2.463	-68.199	8.828
MÉDIA	9.279588		
DP	1.181186		
EP	0.28648		

A β ₁₋₂₈ SEM COMPLEXO

15 MIN

	Área	Ângulo	Comprimento
1	5.993	45	13.837
2	5.266	45	11.992
3	8.353	45	19.371
4	4.54	45	10.147
5	8.353	45	19.371
6	6.537	45	14.759
7	4.54	45	10.147
8	4.54	45	10.147
10	4.54	45	10.147
11	5.993	45	13.837
12	4.903	45	11.069
13	7.445	45	16.874
14	5.811	45	13.258
15	7.445	45	16.874
16	6.901	45	15.669
17	5.811	45	13.258
18	4.721	45	10.848
MÉDIA	13.6238235		
DP	3.14509199		
EP	0.76279685		

240 MIN

	Área	Ângulo	Comprimento
1	6.356	45	14.464
2	7.808	45	18.079
3	5.266	45	12.053
4	13.075	45	30.132
5	11.985	45	27.722
6	6.356	45	14.464
7	9.988	45	22.901
8	6.901	45	15.669
9	13.619	45	31.338
10	8.353	45	19.285
11	7.808	45	18.079
12	13.075	45	30.132
13	8.898	45	20.49
14	7.445	45	16.874
15	6.901	45	15.669
MÉDIA	20.4900667		
DP	6.42637369		
EP	1.65928255		

A β ₁₋₂₈ COM COMPLEXO 1:1**15 MIN**

	Área	Ângulo	Comprimento
1	8.353	45	19.285
2	6.901	45	15.669
3	3.813	45	8.437
4	6.901	45	15.669
5	6.356	45	14.464
6	6.901	45	15.669
7	4.721	45	10.848
8	5.811	45	13.258
9	4.721	45	10.848
10	5.266	45	12.053
11	5.266	45	12.053
12	13.619	45	31.338
13	7.445	45	16.874
14	13.983	45	32.543
15	5.266	45	12.053
16	4.721	45	10.848
17	6.356	45	14.464
18	3.813	45	8.437
19	2.724	45	6.026
20	5.266	45	12.053
21	18.159	45	42.185
22	10.896	45	25.311
23	5.811	45	13.258
24	5.811	45	13.258

25	5.811	45	13.258
26	5.811	45	13.258
27	6.356	45	14.464
28	6.356	45	14.464
29	6.901	45	15.669
30	3.813	45	8.437
MÉDIA	15.5483667		
DP	7.76197704		
EP	1.41713664		

240 MIN

	Área	Ângulo	Comprimento
1	17.614	45	40.98
2	13.983	45	32.543
3	6.901	45	15.669
4	4.358	45	9.642
5	7.808	45	18.079
6	7.445	45	16.874
7	10.532	45	24.106
8	13.075	45	30.132
9	6.356	45	14.464
10	6.901	45	15.669
11	3.813	45	8.437
12	7.445	45	16.874
13	4.358	45	9.642
14	4.358	45	9.642
15	6.356	45	14.464
16	4.721	45	10.848

17	3.813	45	8.437
18	6.901	45	15.669
19	4.721	45	10.848
20	7.808	45	18.079
21	9.443	45	21.695
MÉDIA	17.2758571		
DP	8.55954742		
EP	1.86784638		