

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

**“INFLUÊNCIA DE COMPLEXOS POLIPYRIDÍNICOS DE RU(II)  
NO PROCESSO DE AGREGAÇÃO DO PEPTÍDEO BETA  
AMILOIDE”**

**Mariana Pigozzi Cali\***

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

**Orientadora: Prof. Dra. Rose Maria Carlos**

**\* bolsista CNPq**

**São Carlos - SP  
2023**



## UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

---

### Folha de Aprovação

---

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Mariana Pigozzi Cali, realizada em 27/02/2023.

#### Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Rose Maria Carlos (UFSCar)

Prof. Dr. Wallance Moreira Pazin (UNESP)

Profa. Dra. Ana Paula Ulian Araújo (USP)

Profa. Dra. Márcia Regina Corminetti (UFSCar)

Profa. Dra. Maria Fatima das Graças Fernandes da Silva (UFSCar)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

*Aos meus pais, Sandra e Antonio Carlo, e à minha irmã Laura  
pelo apoio e carinho incondicionais*

“Ser poeta é muito bom porque eu não tenho nenhuma obrigação de veracidade. Eu posso mentir à vontade, cientista é que não pode”

— Ariano Suassuna

“Se a educação sozinha não transforma a sociedade,  
sem ela tampouco a sociedade muda”

— Paulo Freire

“If your dreams do not scare you, they are not big enough”

— Ellen Johnson Sirleaf

“You cannot get through a single day without having an impact on the world around you. What you do makes a difference, and you have to decide what kind of difference you want to make.”

— Jane Goodall

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus pais, Antonio e Sandra, e à minha irmã Laura pela paciência, carinho e apoio durante toda a minha formação acadêmica, principalmente nesses quatro anos de doutorado. Amo vocês!

À Prof. Dra. Rose Maria Carlos por toda ajuda, carinho, paciência e orientação durante toda a minha trajetória na UFSCar. Muito obrigada por sempre acreditar em mim e me incentivar a crescer cada vez mais.

Aos meus colegas de LaFIB Rafael, Isabele, Marco, Lorena, Maria Laura, Denize, Dani, Victoria, Rafaela, Vitória, Bárbara e Rafaela pela ajuda, discussões, risadas e momentos de descontração durante todos esses anos. Em especial, gostaria de agradecer ao Rafael, à Isabele e à Lorena por toda a ajuda e a amizade durante esses vários anos de laboratório.

Aos meus amigos e amigas Kaline, Gabi, Mari, Adriana e Lucas o meu muito obrigada pelo constante apoio, ajuda e torcida! Em especial gostaria de agradecer à Kaline por ter sido uma companhia essencial durante o tumultuoso período da quarentena.

Ao Prof. Michele Vendruscolo por ter me aceitado em seu laboratório durante o meu estágio sanduíche e por toda orientação, ajuda e incentivo durante o meu período em Cambridge.

Aos meus colegas do CMD na Inglaterra Becky, Sam, Owen, Ewa Klimont, Sam Casford, Alessia, Valentina, Alex, Vaidehi, Monty, Xing, Oded, Alyssa, Magda, Alicia, Silene, Carola e Rob, meus eternos agradecimentos por terem me acolhido e me ajudado a desenvolver um trabalho do qual eu tenho muito orgulho. Muito obrigada pela amizade e por me fazerem sentir como se eu pertencesse ao grupo de vocês!

Às secretárias Cristina, Luciani e Ariane por toda ajuda burocrática durante a minha pós-graduação.

Aos órgãos de fomento CNPq (processo 141137/2019-3), CAPES (código de financiamento 001) e FAPESP que possibilitaram a realização dos trabalhos através do seu financiamento. Em especial gostaria de agradecer ao programa CAPES PrInt (processo 88887.569985/2020-00) por ter financiado o meu estágio sanduíche e ao técnico Roberto Kikuchi que cuidou do meu processo.

Por fim, gostaria de agradecer à UFSCar e ao Departamento de Química por todos os ensinamentos e por ter sido a minha segunda casa desde 2011. Muito obrigada!

**LISTA DE ABREVIATURAS**

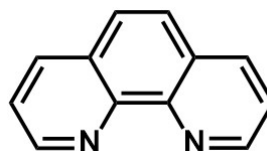
3,4Apy	3,4-diaminopiridina
4Apy	4-aminopiridina
A $\beta$	Peptídeo Beta Amiloide
ABTS	2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
DA	Doença de Alzheimer
APOE	Apoliproteína E
APP	Proteína Precursora do Amiloide
<i>C. Elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ENF	Emaranhados Neurofibrilares
EO	Estresse Oxidativo
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FRET	Transferência de Energia de Förster
ILCT	Transição de Transferência de Carga Intraligante
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LRP1	<i>Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein</i>
LTP	Potenciação de Longa Duração
m <sub>0</sub>	Concentração Monomérica Inicial

MBP	<i>Maltose Binding Protein</i>
Mephen	5,6-dimetil-1,10-fenantrolina
MLCT	Transição de Transferência de Carga do Metal para o Ligante
NMDAR	N-metil-d-aspartato
PET	Tomografia de Emissão de Póstron
Phen	1,10-fenantrolina
PSEN1	Gene Presenilina 1
PSEN2	Gene Presenilina 2
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
Ru <sub>3,4</sub> Apy	<i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (3,4Apy) <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup>
Ru <sub>4</sub> Apy	<i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (4Apy) <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup>
RuMe <sub>3,4</sub> Apy	<i>cis</i> -[Ru(Mephen) <sub>2</sub> (3,4Apy) <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup>
RuMe <sub>4</sub> Apy	<i>cis</i> -[Ru(Mephen) <sub>2</sub> (4Apy) <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup>
t <sub>1/2</sub>	Tempo de Meia-vida
TEV	<i>Tobacco Etch Virus</i>
ThT	Tioflavina T
ThS	Tioflavina S
γ	Expoente Escalar
λ <sub>em</sub>	Comprimento de onda de emissão
λ <sub>ex</sub>	Comprimento de onda de excitação

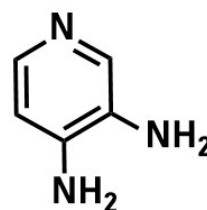


**LISTA DE FÓRMULAS E ESTRUTURAS DE COMPOSTOS**

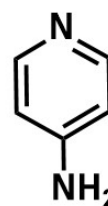
1,10-fenantrolina



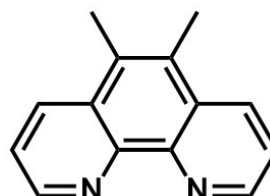
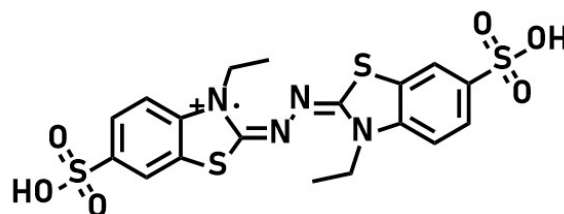
3,4-diaminopiridina



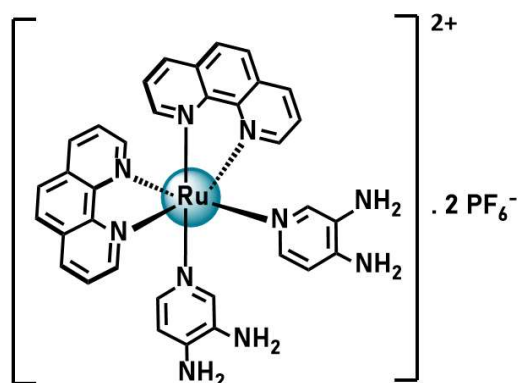
4-aminopiridina



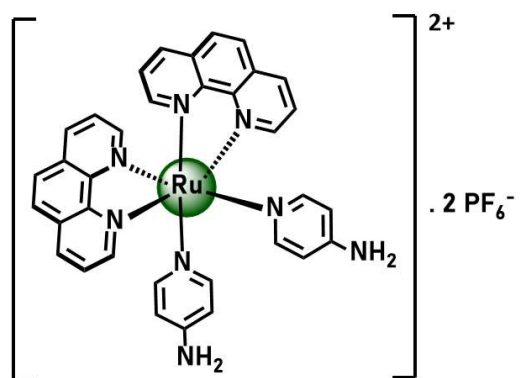
5,6-dimetil-1,10-fenantrolina

ABTS<sup>•+</sup>

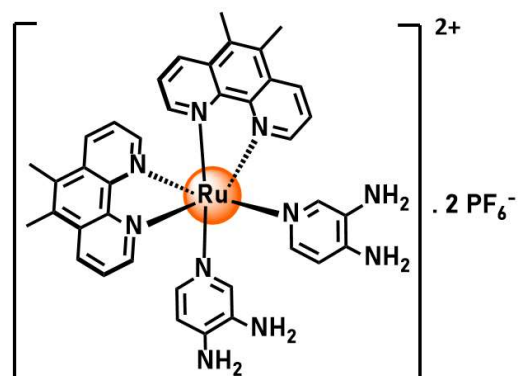
Ru3,4Apy



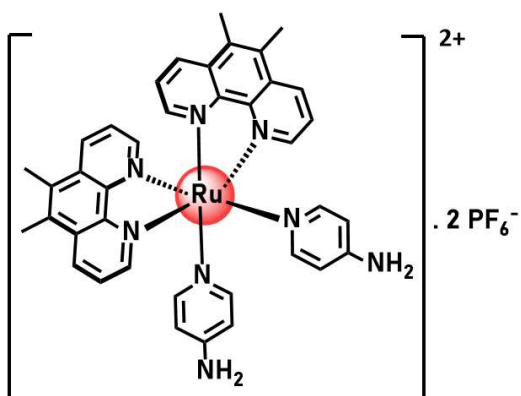
Ru4Apy



RuMe3,4Apy



RuMe4Apy



## LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1. Tempos de meia-vida da cinética de agregação dos peptídeos A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42 .....	47
TABELA 4.1. Atribuição dos sinais do espectro de RMN $^1\text{H}$ para os complexos Ru3,4Apy e Ru4Apy em DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> .....	66
TABELA 4.2. Atribuição dos sinais do espectro de RMN $^1\text{H}$ para os complexo RuMe3,4Apy e RuMe4Apy em DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> .....	68
TABELA 4.3. Valores de absortividade molar dos complexos em PBS em L.mol <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> .....	73
TABELA 4.4. Solubilidade dos complexos em PBS .....	74
TABELA 4.5. Deslocamento de Stokes dos complexos em PBS .....	75
TABELA 4.6. Tempo de vida dos complexos em PBS .....	78
TABELA 4.7. Valores de IC <sub>50</sub> do radical ABTS <sup>•+</sup> frente aos ligantes e complexos .....	83
TABELA 4.8. Valores de IC <sub>50</sub> da linhagem celular SH-SY5Y frente aos complexos de rutênio .....	84

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.1. Clivagem proteolítica da proteína precursora do amiloide (APP).** APP sofre clivagem proteolítica que pode ser tanto pelo caminho amiloidogênico como pelo caminho não amiloidogênico, dependendo da enzima que inicia o processo de clivagem. Para ambos os casos são liberados para o meio extracelular pequenos peptídeos, A $\beta$  para o caminho amiloidogênico e p3 para o caminho não amiloidogênico. Figura criada usando BioRender.com ..... 4
- FIGURA 1.2. Sequência de aminoácidos dos peptídeos A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42.** Ambas isoformas A $\beta$ 40 (A) e A $\beta$ 42 (B) apresentam a mesma sequência de aminoácidos, diferindo somente pelos últimos dois aminoácidos C-terminais. Fonte: própria ..... 6
- FIGURA 1.3. Processo de agregação do peptídeo beta amiloide é regido por processos de nucleação secundária.** O A $\beta$  monomérico passa por uma série de processos de nucleação primária formando uma população oligomérica. Os oligômeros por sua vez passam por processos de alongamento formando protofibrilas, as quais eventualmente formam fibrilas maduras. Esse processo é catalisado pela superfície das fibrilas formadas ..... 7
- FIGURA 1.4. Estruturas moleculares das fibrilas do A $\beta$ .** (A) As fibrilas adotam conformação em formato de S como determinado através de RMN de estado sólido por Colvin e colaboradores.<sup>1</sup> (B) Fibrila do A $\beta$ 42 reconstruída a partir de dados obtidos por Cryo-EM mostram as duas subunidades que constituem as fibrilas<sup>2</sup> ..... 8
- FIGURA 1.5. Tipos distintos de placas senis.** *Staining* imunohistoquímico do A $\beta$  que compõe três tipos distintos de placas senis (difusa, compacta e clássica) mostram morfologias características para cada uma delas. Figura adaptada com permissão da referência 27 ..... 9
- FIGURA 1.6. Estágios neuropatológicos da deposição do peptídeo beta amiloide em pacientes de Alzheimer.** As áreas em vermelho no Estágio 1 representam as regiões corticais com o acúmulo inicial de A $\beta$  durante o estágio pré-clínico inicial. A deposição subsequente nas mesmas áreas são indicadas em cores progressivamente mais escuras a cada um dos estágios, com novas áreas

apresentando A $\beta$  em vermelho a cada um dos estágios. Adaptado com permissão da referência 7 ..... 11

**FIGURA 1.7. Estrutura da cisplatina e complexos de rutênio em ensaios clínicos.** Estrutura dos complexos cisplatina (A), NAMI-A (B), KP1019 (C), KP1339 (D) e TLD1433 (E) ..... 20

**FIGURA 1.8. Complexos de Ru (II) utilizados como sondas luminescentes de agregao para o A $\beta$ .** Complexos polipiridínicos luminescentes estudados como sondas de agregao do A $\beta$  ..... 22

**FIGURA 1.9. Complexos de Ru (II) utilizados como moduladores de agregao para o A $\beta$ .** Complexos de platina e rutênio estudados como moduladores de agregao do A $\beta$ , incluindo complexos testados como anticancerígenos ..... 23

**FIGURA 2.1. Dogma central da biologia.** Sequências de DNA são transcritas por enzimas RNA polimerase em RNAm que são, por sua vez, traduzidas por ribossomos em sequências de aminoácidos que formam proteínas. .... 27

**FIGURA 2.2. Isolamento da proteína His<sub>6</sub>-TEV(S219V)-Arg<sub>5</sub> através de cromatografia de afinidade.** (A) Lisado celular  carregado na coluna de níquel, onde a cauda de histidina se liga ao níquel da coluna, fazendo com que a proteína de interesse fique retida. A coluna foi então lavada, eluindo todos os subprodutos não imobilizados na coluna. (B) Protease His<sub>6</sub>-TEV(S219V)-Arg<sub>5</sub>  eluída utilizando um tampão com alta concentrao de imidazol. (C) SDS-PAGE das bandas da obtidas protease His<sub>6</sub>-TEV(S219V)-Arg<sub>5</sub> (~28 kDa) e MBP (~43 kDa) na eluio do lisado celular (SN = sobrenadante, SN filt. = sobrenadante filtrado, FT = *flow through*) ..... 38

**FIGURA 2.3. Obteno da protease TEV.** (A) Cromatograma de exclusão de tamanho, onde foram separados os três componentes da soluço (B) SDS-PAGE antes e após a cromatografia por exclusão de tamanho. (C) SDS-PAGE da banda referente  protease His<sub>6</sub>-TEV(S219V)-Arg<sub>5</sub>. (D) Espectrometria de massas da protease His<sub>6</sub>-TEV(S219V)-Arg<sub>5</sub> obtida ..... 39

**FIGURA 2.4. Proteína de fusão NT\*<sub>FISp</sub>-A $\beta$  e subsequente obteno do A $\beta$ .** O peptídeo beta amilóide  expresso a partir de uma proteína de fusão maior,

melhorando a solubilidade e, ao mesmo tempo, diminuindo a propensão se agregação do peptídeo ..... 41

**FIGURA 2.5 Isolamento da proteína NT\*<sub>FISp</sub>-A $\beta$  através de cromatografia de afinidade.** (A) Lisado celular é carregado na coluna de níquel, onde a cauda de histidina se liga ao níquel da coluna, fazendo com que a proteína de interesse fique retida. A coluna foi então lavada, eluindo todos os subprodutos não imobilizados na coluna. (B) Proteína NT\*<sub>FISp</sub>-A $\beta$  é eluída utilizando um tampão com alta concentração de imidazol. (C) Eluição da proteína NT\*<sub>FISp</sub>-A $\beta$  presente no *flow through*. (D) SDS-PAGE das bandas obtidas na eluição do lisado celular. (E) SDS-PAGE das bandas obtidas na eluição do *flow through* ..... 42

**FIGURA 2.6. Clivagem da proteína NT\*<sub>FISp</sub>-A $\beta$  e obtenção do A $\beta$ .** (A) SDS-PAGE antes – A - e após – B e C - da clivagem pela protease TEV. (B) Cromatograma de exclusão de tamanho, onde foram separados os três componentes da solução. (C) Espectrometria de massas do A $\beta$ 40 obtido. (D) Espectrometria de massas do A $\beta$ 42 obtido ..... 43

**FIGURA 2.7. Cinética de agregação do A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42.** (A) Cinética de agregação do A $\beta$ 40 (azul) e A $\beta$ 42 (rosa) em diferentes concentrações. (B) Velocidades de agregação normalizada. (C) Log dos tempos de meia-vida versus log das concentrações, onde foi obtido um expoente escalar de  $\gamma = -0.8$  e  $\gamma = -1.3$  para o A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42, respectivamente. (D) Relação direta entre os tempos de meia-vida e concentrações ..... 46

**FIGURA 2.8. Determinação do mecanismo de agregação usando Amylofit.** A previsão do mecanismo de agregação de A $\beta$  usando Amylofit mostra o melhor ajuste (ERM = erro residual médio) para o mecanismo dominado por nucleação secundária multi-etapas para A $\beta$ 40 (azul) e A $\beta$ 42 (rosa) ..... 50

**FIGURA 3.1. Configuração eletrônica de complexos de Ru(II).** O íon Ru<sup>2+</sup> apresenta seis elétrons em seus orbitais d, os quais são degenerados. Com a aproximação dos ligantes, os orbitais apresentam energias distintas e os elétrons ocupam os orbitais de menor energia ..... 53

**FIGURA 3.2. Diagrama de Jablonski.** Diagrama de Jablonski mostrando os vários processos envolvidos na fluorescência e fosforescência. S<sub>0</sub> denota o estado fundamental singlete e S<sub>1</sub> e S<sub>2</sub> são os estados excitados singlete. T representa os

estados tripleto. Conversão interna e cruzamento intersistemas são processos não radiativos, indicados por flechas pontilhadas ..... 55

**FIGURA 3.3. Série de complexos polipiridínicos de Ru(II).** Complexos *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(3,4Apy)<sub>2</sub>].2PF<sub>6</sub> (Ru3,4Apy), *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4Apy)<sub>2</sub>].2PF<sub>6</sub> (Ru4Apy), *cis*-[Ru(Mephen)<sub>2</sub>(3,4Apy)<sub>2</sub>].2PF<sub>6</sub>(RuMe3,4Apy) e *cis*-[Ru(Mephen)<sub>2</sub>(4Apy)<sub>2</sub>].2PF<sub>6</sub> (RuMe4Apy) sintetizados neste trabalho ..... 57

**FIGURA 3.4. Espectros de espectro de RMN <sup>1</sup>H para os complexos Ru3,4Apy e Ru4Apy em DMSO-*d*<sub>6</sub>.** Estruturas dos ligantes 4-aminopiridina (A), 3,4-diaminopiridina (B) e 1,10-fenantrolina (C) e dos complexos Ru3,4Apy (D) e Ru4Apy (E) com as devidas atribuições. Espectros de RMN <sup>1</sup>H dos ligantes e complexos (F) ..... 67

**FIGURA 3.5. Espectros de espectro de RMN <sup>1</sup>H para os complexos RuMe3,4Apy e RuMe4Apy em DMSO-*d*<sub>6</sub>.** Estruturas dos ligantes 4-aminopiridina (A), 3,4-diaminopiridina (B) e 5,6-dimetil-1,10-fenantrolina (C) e dos complexos RuMe3,4Apy (D) e RuMe4Apy (E) com as devidas atribuições. Espectros de RMN <sup>1</sup>H dos ligantes e complexos (F) ..... 69

**FIGURA 3.6. Estabilidade do complexo Ru3,4Apy.** Espectros de RMN <sup>1</sup>H em DMSO-*d*<sub>6</sub> do complexo Ru3,4Apy mostrando sua estabilidade por 24 horas no escuro tanto à temperatura como à 37°C ..... 71

**FIGURA 3.7. Espectro de absorção dos complexos de rutênio.** Espectros de absorção de soluções 20 μM dos complexos Ru3,4Apy (azul), Ru4Apy (verde), RuMe3,4Apy (laranja) e Ru4Apy (vermelho) em tampão PBS..... 72

**FIGURA 3.8. Propriedades luminescentes dos complexos em PBS.** (A) Espectros de emissão dos complexos Ru3,4Apy, Ru4Apy, RuMe3,4Apy e RuMe4Apy. (B) Espectros demonstrativos do deslocamento de Stokes dos complexos. λ<sub>exc</sub>=480 nm e λ<sub>em</sub>=650 nm..... 74

**FIGURA 3.9. Emissão dos complexos em diferentes comprimentos de onda de excitação em PBS.** Máximos de emissão quando excitados em diferentes comprimentos de emissão dos complexos (A) Ru3,4Apy, (B) Ru4Apy, (C) RuMe3,4Apy e (D) RuMe4Apy .....76

**FIGURA 3.10. Estudo de saturação de emissão dos complexos em PBS.** Máximos de emissão em diferentes concentrações dos complexos (A) Ru3,4Apy, (B) Ru4Apy, (C) RuMe3,4Apy e (D) RuMe4Apy ..... 77

**FIGURA 3.11. Mudanças espectrais durante reação fotoquímica dos complexos.**

Mudanças nos espectros de UV-vis dos complexos  $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{Apy})_2]^{2+}$  (A) e  $[\text{Ru}(\text{Mephen})_2(\text{Apy})_2]^{2+}$  (B) e espectros de emissão dos complexos  $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{Apy})_2]^{2+}$  (C) e  $[\text{Ru}(\text{Mephen})_2(\text{Apy})_2]^{2+}$  (D) ..... 79

**FIGURA 3.12. Formação do radical ABTS<sup>•+</sup>.**

(A) Reação entre o ABTS e persulfato de potássio gerando o radical ABTS<sup>•+</sup> e sua eventual neutralização. (B) Espectros de absorção do radical ABTS<sup>•+</sup> durante a reação com o antioxidante ..... 81

**FIGURA 3.13. Atividade antioxidante dos ligantes e complexos.**

Curvas de inibição do padrão BHT (A), ligante 3,4-diaminopiridina (B), complexo Ru<sub>3,4</sub>Apy (C) e complexo RuMe<sub>3,4</sub>Apy (D) ..... 82

**FIGURA 3.14. Viabilidade celular da linhagem celular SH-SY5Y frente aos complexos de rutênio.**

Resultados do ensaio de viabilidade CTG da linhagem celular SH-SY5Y frente aos complexos (A) Ru<sub>3,4</sub>Apy, (B) Ru<sub>4</sub>Apy, (C) RuMe<sub>3,4</sub>Apy e (D) RuMe<sub>4</sub>Apy..... 84

**FIGURA 4.1. Interferência dos complexos na emissão dos corantes amilóides.**

Fibrilas pré-formadas do Aβ<sub>42</sub> (4 μM) foram incubadas com diferentes corantes amilóides à 20 μM na ausência (controle) e na presença de 10 μM de cada um dos complexos afim de determinar qualquer efeito de supressão da emissão dos corantes amilóides. Todos os complexos apresentaram interferência na emissão dos corantes testados, restringindo o uso dos mesmos em ensaios de cinética de agregação. One-way ANOVA. \*P ≤ 0.05, \*\*P ≤ 0.01, \*\*\*P ≤ 0.001, \*\*\*\*P ≤ 0.0001, ns = não significativo..... 95

**FIGURA 4.2. Interferência dos complexos na emissão dos corantes amilóides.**

Espectros de excitação e emissão dos corantes amiloides testados. Para todos, a emissão ou excitação dos corantes coincide com a emissão ou excitação dos complexos (A) ou ambos (B), facilitando assim os processos de supressão entre os corantes e os complexos ..... 96

**FIGURA 4.3. Complexos afetam o processo de agregação do Aβ<sub>42</sub>.**

Nefelometria do processo de agregação do Aβ<sub>42</sub> à 10 μM na ausência (Aβ<sub>42</sub>) e presença dos complexos (A) Ru<sub>3,4</sub>Apy, (B) Ru<sub>4</sub>Apy, (C) RuMe<sub>3,4</sub>Apy e (D) RuMe<sub>4</sub>Apy. One-way ANOVA. \*P ≤ 0.05, \*\*P ≤ 0.01, \*\*\*P ≤ 0.001, \*\*\*\*P ≤ 0.0001, ns = não significativo ..... 98



**FIGURA 4.4. Complexos influenciam a velocidade de agregação do A $\beta$ 42.** Nefelometria normalizada do processo de agregação do A $\beta$ 42 à 10  $\mu$ M na ausência (controle) e presença dos complexos (A) Ru<sub>3,4</sub>Apy, (B) Ru<sub>4</sub>Apy, (C) RuMe<sub>3,4</sub>Apy e (D) RuMe<sub>4</sub>Apy ..... 99

**FIGURA 4.5. Complexos induzem a formação de agregados amorfos de acordo com sua proporção em relação ao peptídeo.** Imagens de microscopia eletrônica de transmissão dos agregados formados após a agregação do A $\beta$ 42 (10  $\mu$ M) na ausência e na presença dos complexos quando incubados nas proporções 1:1.25 e 1:5 amiloide-complexo ..... 101

**FIGURA 4.6. Complexos RuMe<sub>3,4</sub>Apy e RuMe<sub>4</sub>Apy induzem a formação de agregados amorfos.** (A) Espectros de dicroísmo circular dos agregados de A $\beta$ 42 formados na ausência (fibrila) e presença dos complexos RuMe<sub>3,4</sub>Apy e RuMe<sub>4</sub>Apy na proporção de 1:5 (amiloide:complexo). Espectrometria de massas do peptídeo A $\beta$ 42 monomérico incubado com os complexos (B) RuMe<sub>3,4</sub>Apy e (C) RuMe<sub>4</sub>Apy ..... 103

**FIGURA 5.1. Ciclo de vida dos nematoides *C. elegans*.** Em três dias, os ovos dos *C. elegans* passam por quatro estágios larvais até chegar a fase adulta, onde são capazes de se reproduzirem ..... 107

**FIGURA 5.2. Western blot das linhagens de *C. elegans*.** Expressão de A $\beta$  pelas *C. elegans* GMC101 e ausência de A $\beta$  na linhagem N2, quando comparadas ao controle (A $\beta$  recombinante) ..... 113

**FIGURA 5.3. Layout experimental dos ensaios in vivo.** Os complexos foram administrados na fase larval L4 e seu efeito monitorado através do estudo de motilidade nos dias 4, 7 e 11 ..... 114

**FIGURA 5.4. Estudo de Motilidade.** Resultados do estudo de motilidade com a administração dos complexos RuMe<sub>3,4</sub>Apy e RuMe<sub>4</sub>Apy em três concentrações diferentes (5, 10, 20  $\mu$ M) frente ao controle (DMSO 1%) ..... 114

**FIGURA 5.5. Visualização de Agregados Amilóides em *C. elegans*.** Imagens de microscopia confocal de campo claro (*brightfield*) e fluorescência na presença de X34 dos agregados amilóides. Animais tratados com os complexos não apresentaram agregados. Barra de escala = 50  $\mu$ m..... 116

**FIGURA 5.6. Ampliação dos Agregados Amilóides em *C. elegans*.** Imagens de microscopia confocal de fluorescência na presença de X34 dos agregados amilóides no controle DMSO 1%, porém sem sinal de fluorescência para os indivíduos os quais foram administrados os complexos. Barra de escala = 50  $\mu\text{m}$ ..... 117

## RESUMO

### INFLUÊNCIA DE COMPLEXOS POLIPIRIDÍNICOS DE Ru(II) NO PROCESSO DE AGREGAÇÃO DO PEPTÍDEO BETA AMILOIDE

A maioria das doenças neurodegenerativas estão associadas à agregação anormal de proteínas. Proteínas amiloides possuem alta propensão à agregação e, conseqüentemente, se acumulam no cérebro, interrompendo sinapses e causando neurotoxicidade. A presente tese tem como objetivos otimizar a metodologia e expressão do peptídeo beta amiloide recombinante bem como investigar o potencial terapêutico de complexos polipiridínicos de Ru(II) como sondas luminescentes e agentes inibidores do processo de agregação do A $\beta$ . A expressão e purificação do A $\beta$  foi otimizada a partir do protocolo desenvolvido por Abelein e colaboradores. Com essa metodologia as isoformas A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42 foram obtidas com alto grau de pureza, alto rendimento e com propriedades cinéticas equivalentes ao A $\beta$  vendido comercialmente. O espectro de absorção eletrônica dos complexos em solução tampão PBS é caracterizado por uma banda de absorção intensa na região de ultravioleta ( $\lambda_{\text{máx}} = 265 \text{ nm}$ ,  $\epsilon \sim 72000 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) típica das transições internas de transferência de carga de ligantes aromáticos insaturados (ILCT) e por uma banda de absorção larga na região do visível ( $\lambda_{\text{máx}} = 450 \text{ nm}$ ,  $\epsilon \sim 10000 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) atribuída às transições de transferência de carga do metal para ligante (MLCT,  $\text{Ru}, d\pi \rightarrow \text{phen}, \pi^*$ ). Os complexos apresentaram máximo de emissão em 655 nm ( $\lambda_{\text{exc}} = 480 \text{ nm}$ ) apresentando deslocamento de Stokes (separação entre o máximo de emissão e de excitação) na ordem de  $5800 \text{ cm}^{-1}$ . Os complexos contendo o ligante 3,4-diaminopiridina também apresentaram alta atividade antioxidante frente ao radical ABTS $^{\cdot+}$ . O efeito dos complexos na agregação do A $\beta$  foi avaliado através da técnica de nefelometria, a qual monitora a turbidez da solução durante a agregação da proteína. Os complexos Ru3,4Apy, RuMe3,4Apy e RuMe4Apy exibiram valores de

unidades relativas de nefelometria (URNs) menores quando comparadas ao controle, indicando a formação de um menor número de agregados. Em especial, os complexos RuMe<sub>3,4</sub>Apy e RuMe<sub>4</sub>Apy apresentaram a maior diferença em relação ao controle nas proporções 1:2.5 e 1:5 A $\beta$ :complexo. A análise da morfologia das espécies formadas por microscopia de transmissão eletrônica mostrou que os complexos Ru<sub>3,4</sub>Apy e Ru<sub>4</sub>Apy não influenciam na morfologia das fibrilas formadas enquanto os complexos RuMe<sub>3,4</sub>Apy e RuMe<sub>4</sub>Apy induzem a formação de agregados amorfos, cuja ausência de estrutura secundária foi confirmada por dicroísmo circular. Os nematoides transgênicos *C. elegans* (*Caenorhabditis elegans*), nos quais A $\beta$ <sub>42</sub> humano é expresso no tecido muscular dos animais, foram utilizados para avaliar o efeito dos complexos em um modelo *in vivo* da doença de Alzheimer. Para estes estudos foram escolhidos os complexos RuMe<sub>3,4</sub>Apy e Ru<sub>4</sub>Apy, os quais apresentaram melhor resultado *in vitro*. Os complexos RuMe<sub>3,4</sub>Apy e Ru<sub>4</sub>Apy melhoraram a motilidade dos animais, indicando um efeito anti-amiloide, assim como observado *in vitro*. A visualização dos agregados amiloides foi realizada corando os nematoides *C. elegans* com o corante X34, o qual é específico para fibrilas amiloides. Os nematoides que foram tratados com os complexos não apresentam os depósitos amiloides como foi visualizado para o controle, indicando que os mesmos apresentaram efeito anti-amiloide não só *in vitro*, como também *in vivo*.

**Palavras-chave:** Doença de Alzheimer, Complexos de Rutênio, Peptídeo Beta Amilóide

## ABSTRACT

### INFLUENCE OF Ru(II) POLYPYRIDINIC COMPLEXES ON AMYLOID BETA AGGREGATION

Most neurodegenerative diseases are associated with abnormal protein aggregation. Amyloid proteins are highly prone to aggregation and, consequently, accumulate in the brain, disrupting synapses and causing neurotoxicity. The work of this thesis aims to optimize the methodology and expression of recombinant A $\beta$  as well as to investigate the theranostic potential of Ru(II) polypyridine complexes as luminescent probes and as inhibitors of the A $\beta$  aggregation process. A $\beta$  expression and purification was optimized based on the protocol developed by Abelein and collaborators. With this methodology, the A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 isoforms were obtained with a high degree of purity, high yield and with kinetic properties equivalent to the commercially available A $\beta$ . The electronic absorption spectrum of the complexes in PBS buffer is characterized by an intense absorption band in the ultraviolet region ( $\lambda_{\text{max}} = 265 \text{ nm}$ ,  $\epsilon \sim 72000 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) typical of intraligand charge transfer transitions (ILCT) from the unsaturated aromatic ligands and by a broad absorption band in the visible region ( $\lambda_{\text{max}} = 450 \text{ nm}$ ,  $\epsilon \sim 10000 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) attributed to metal to ligand charge transfer transitions (MLCT,  $\text{Ru}, d\pi \rightarrow \text{phen}, \pi^*$ ). The complexes have a maximum emission at 655 nm ( $\lambda_{\text{ex}} = 480 \text{ nm}$ ) with a Stokes shift (separation between emission and excitation maxima) in the order of  $5800 \text{ cm}^{-1}$ . The complexes containing the 3,4-diaminopyridine ligand also showed high antioxidant activity against the ABTS<sup>+</sup> radical. The effect of the complexes on A $\beta$  aggregation was evaluated using nephelometry, which monitors the turbidity of the solution during protein aggregation. The Ru<sub>3,4</sub>Apy, RuMe<sub>3,4</sub>Apy and RuMe<sub>4</sub>Apy complexes exhibited lower relative nephelometry units (URNs) values when compared to the control, indicating the formation of fewer aggregates. In particular, the RuMe<sub>3,4</sub>Apy

and RuMe<sub>4</sub>Apy complexes showed the greatest difference in relation to the control in the proportions 1:2.5 and 1:5 A $\beta$ :complex. The analysis of the morphology of the species formed by transmission electron microscopy showed that Ru<sub>3,4</sub>Apy and Ru<sub>4</sub>Apy did not influence the morphology of the fibrils formed while the RuMe<sub>3,4</sub>Apy and RuMe<sub>4</sub>Apy complexes induced the formation of amorphous aggregates, by which the absence of secondary structure was confirmed by circular dichroism. The transgenic nematodes *C. elegans* (*Caenorhabditis elegans*), in which human A $\beta$ <sub>42</sub> is expressed in their muscle tissue, were used to evaluate the effect of the complexes in an *in vivo* model of Alzheimer's disease. For these studies, RuMe<sub>3,4</sub>Apy and Ru<sub>4</sub>Apy were chosen given their *in vitro* results. The two complexes improved the motility of the animals, indicating an anti-amyloid effect, as observed *in vitro*. Visualization of amyloid aggregates was performed by staining *C. elegans* nematodes with the amyloid dye X34, which is specific for amyloid fibrils. The nematodes that were treated with the complexes do not show the amyloid deposits as seen in the control, indicating that they showed an anti-amyloid effect not only *in vitro*, but also *in vivo*.

**Keywords:** Alzheimer's Disease, Ruthenium Complexes, Amyloid Beta Peptide

## SUMÁRIO

<b>Capítulo 1 – Introdução: A Doença de Alzheimer e o Peptídeo Beta Amiloide</b> .....	<b>1</b>
1.1. Um breve histórico da doença de Alzheimer .....	2
1.2. O Peptídeo Beta Amiloide.....	3
1.3. Agregação do Peptídeo Beta Amiloide .....	6
1.4. Neuropatologia da Doença de Alzheimer .....	10
1.5. O Peptídeo Beta Amiloide e o Estresse Oxidativo.....	12
1.6. Prevenção, Diagnóstico e Tratamentos da DA.....	14
1.6.1. Prevenção.....	14
1.6.2. Diagnóstico .....	15
1.6.3. Tratamento .....	16
1.7. Complexos Metálicos como Agentes Terapêuticos .....	18
1.8. Complexos de Rutênio Aplicados à Doença de Alzheimer .....	21
1.9. Objetivo Geral da Tese .....	24
1.9.1. Objetivos Específicos .....	24
<b>Capítulo 2 - - Expressão, Purificação e Validação Cinética do Peptídeo Beta Amiloide Recombinante</b> .....	<b>26</b>
2.1. Introdução.....	27
2.2. Objetivos do Capítulo.....	29
2.3. Materiais e Métodos .....	29
2.3.2. Transformação e Cultivo de Células .....	29
2.3.3. Isolamento das Células e Sonicação.....	30
2.3.4. Purificação .....	31
2.3.5. Determinação da Concentração das Proteínas .....	31
2.3.6. SDS-PAGE .....	31
2.3.7. Transformação, expressão e purificação da protease His <sub>6</sub> -TEV(S219V)-Arg <sub>5</sub> .....	32
2.3.8. Transformação, expressão e purificação dos peptídeos A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42 ....	33
2.3.9. Espectrometria de Massas .....	35

2.3.10. Preparo do A $\beta$ 42 monomérico .....	35
2.3.11. Cinética de Agregação do Peptídeo A $\beta$ 42 .....	36
2.3.12. Análise cinética dos dados pelo AmyloFit.....	36
2.4. Resultados e Discussão .....	37
2.4.1. Expressão e Purificação da Protease TEV .....	37
2.4.2. Expressão e Purificação dos Peptídeos A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42 .....	40
2.4.3. Validação cinética dos peptídeos beta amiloide recombinantes obtidos .	44
2.5. Conclusões Parciais.....	51
<b>Capítulo 3 - - Síntese e Caracterização de Complexos Polipiridínicos de Ru(II)</b>	<b>52</b>
.....	
3.1. Introdução.....	53
3.2. Objetivos do Capítulo.....	57
3.3. Materiais e Métodos .....	58
3.3.1. Reagentes.....	58
3.3.2. Recristalização do ligante 1,10-phenantrolina .....	58
3.3.3. Síntese do complexo precursor <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ].....	58
3.3.4. Síntese do complexo precursor <i>cis</i> -[Ru(Mephen) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ] .....	59
3.3.5. Síntese do complexo <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (3,4Apy) <sub>2</sub> ].2PF <sub>6</sub> (Ru3,4Apy).....	59
3.3.6. Síntese do complexo <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (4Apy) <sub>2</sub> ].2PF <sub>6</sub> (Ru4Apy).....	60
3.3.7. Síntese do complexo <i>cis</i> -[Ru(Mephen) <sub>2</sub> (3,4Apy) <sub>2</sub> ].2PF <sub>6</sub> (RuMe3,4Apy).....	60
3.3.8. Síntese do complexo <i>cis</i> -[Ru(Mephen) <sub>2</sub> (4Apy) <sub>2</sub> ].2PF <sub>6</sub> (RuMe4Apy).....	61
3.3.9. Espectroscopia de UV-vis .....	61
3.3.10. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear .....	61
3.3.11. Espectroscopia de Luminescência.....	62
3.3.12. Tempo de Vida de Emissão.....	62
3.3.13. Solubilidade.....	62
3.3.14. Atividade Antioxidante Frente ao Radical ABTS <sup>+</sup> .....	63
3.3.15. Cultura de Células de Neuroblastoma.....	63
3.3.16. Avaliação da Toxicidade dos Complexos .....	64
3.4. Resultados e Discussão .....	65
3.4.1. Caracterização estrutural dos complexos .....	65



3.4.2. Caracterização espectroscópica dos complexos.....	71
3.4.3. Atividade Antioxidante .....	80
3.4.4. Viabilidade Celular.....	83
3.5. Conclusões Parciais .....	85
<b>Capítulo 4 - Efeito dos Complexos de Ru(II) na Agregação do Ab42 .....</b>	<b>87</b>
4.1. Introdução.....	88
4.2. Objetivos do Capítulo.....	89
4.3. Materiais e Métodos .....	89
4.3.1. Preparo do A $\beta$ 42 monomérico .....	89
4.3.2. Supressão dos Corantes Amiloides .....	89
4.3.3. Nefelometria .....	90
4.3.4. Espectrometria de Massas .....	91
4.3.5. Microscopia de Transmissão Eletrônica.....	92
4.3.6. Dicroísmo Circular .....	93
4.4. Resultados e Discussão .....	93
4.4.1. Interferência dos complexos na emissão de corantes amiloides .....	93
4.4.2. Nefelometria .....	97
4.4.3. Morfologia dos Agregados Formados.....	100
4.5. Conclusões Parciais .....	104
<b>Capítulo 5 - Influência dos Complexos de Ru(II) em um modelo in vivo da Doença de Alzheimer .....</b>	<b>106</b>
5.1. Introdução.....	107
5.2. Objetivos do Capítulo.....	108
5.3. Materiais e Métodos .....	109
5.3.1. Linhagens de <i>C. elegans</i> .....	109
5.3.2. Meio de Cultura <i>C. elegans</i> .....	109
5.3.3. Administração dos complexos a <i>C. elegans</i> .....	110
5.3.4. Ensaio fenotípico automatizado de <i>C. elegans</i> .....	110
5.3.5. <i>Staining</i> de <i>C. elegans</i> vivos para microscopia.....	110
5.3.6. Western Blot.....	111
5.4. Resultados e Discussão .....	112

5.4.1. Ensaio de Motilidade .....	112
5.4.2. Visualização dos agregados amiloides por microscopia de campo claro e fluorescência confocal .....	115
5.5. Conclusões Parciais .....	117
<b>Capítulo 6 - Conclusões .....</b>	<b>119</b>
6.1. Conclusões.....	120
6.2. Perspectivas Futuras .....	123
<b>Capítulo 7 - Referências .....</b>	<b>124</b>

# 1

## **Introdução: A Doença de Alzheimer e o Peptídeo Beta Amiloide**

*“If the human brain were so simple that we could understand it,  
we would be so simple that we couldn’t.”*

*- Emerson M. Pugh*

## 1.1. Um breve histórico da doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa progressiva e a manifestação mais comum de demência no mundo, sendo responsável por aproximadamente 60-70% dos casos de demência diagnosticados. A DA já foi denominada a “praga do século XXI” com mais de 47 milhões de pessoas afetadas diretamente pela doença, com números projetados para triplicar até 2050.<sup>3,4</sup> Sintomas típicos da DA são caracterizados pelo declínio na habilidade cognitiva, tal como perda da função motora, percepção, memória e mudanças comportamentais.<sup>5</sup> Atualmente, não existe cura para a DA e os tratamentos disponíveis são pouco efetivos, sendo que a maioria dos casos são considerados esporádicos, enquanto a minoria dos casos são decorrentes de mutações genéticas hereditárias.<sup>5</sup> A expectativa de vida média após o diagnóstico é de 3-12 anos, mas pode ser mais longa em alguns casos.<sup>5</sup>

O diagnóstico da doença de Alzheimer foi realizado pela primeira vez em 1906 pelo médico e neuropatologista alemão Alois Alzheimer.<sup>6</sup> 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, paranóia e habilidades psicossociais comprometidas.<sup>6</sup> Alzheimer acompanhou o caso de Auguste durante os quatro anos em que ela esteve internada até 1906 quando a mesma veio a óbito.

Após uma análise *post mortem* minuciosa do cérebro de Auguste D, Alzheimer reportou no estudo publicado “Sobre uma Doença Peculiar do Cortex Cerebral” as mudanças histopatológicas encontradas no cérebro da paciente: “No centro de uma célula quase normal, destacam-se uma ou várias fibrilas de espessura característica e impregnabilidade peculiar”.<sup>7</sup> Sobre as placas típicas encontradas no cérebro de Auguste, Alzheimer descreve: “Numerosos pequenos focos miliares são encontrados

nas camadas superiores. Eles são determinados pelo armazenamento de um material peculiar no córtex”. Alzheimer continuou: “Em suma, temos que enfrentar um processo de doença peculiar. Tais processos de doença peculiares foram verificados recentemente em números consideráveis”.<sup>7</sup>

Existiram dúvidas a respeito do diagnóstico de Auguste D e outros possíveis diagnósticos foram apresentados, especialmente arteriosclerose do cérebro. No entanto, ambas as descrições do caso de demência de Auguste D por Alzheimer e seu colega Gaetano Perusini confirmaram que Auguste D teve demência degenerativa e não vascular. Alzheimer menciona a presença de focos miliares (depois chamados de placas senis), os quais representam os sítios de deposição de uma substância peculiar no cortex cerebral.<sup>6,7</sup> Essa substância foi, ao decorrer dos anos, determinada como sendo acúmulos do peptídeo beta amiloide ( $A\beta$ ).<sup>8</sup> Alzheimer também mostrou aglomerados e condensados de fibrilas intracelulares e os chamou de degeneração neurofibrilar, hoje denominados emaranhados neurofibrilares (ENF). Esses emaranhados são caracterizados por acúmulos anormais de proteína tau hiperfosforilada.<sup>8</sup>

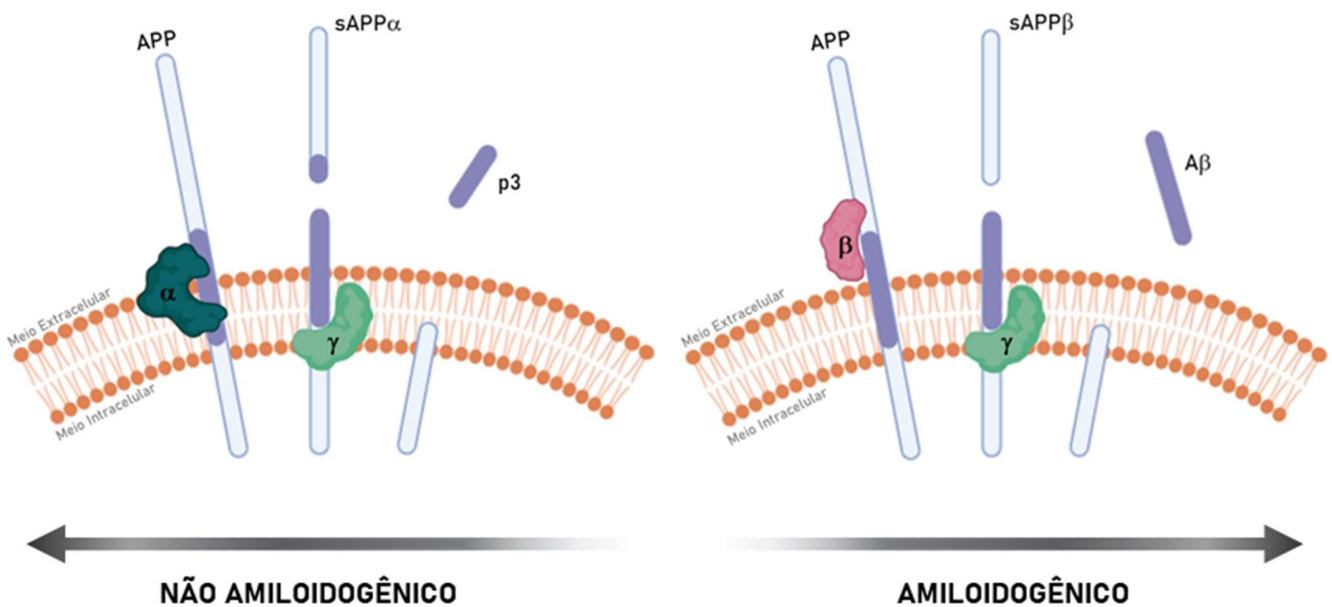
Desde então, reconhece-se a importância das proteínas amiloides nos processos bioquímicos atrelados à doença de Alzheimer, bem como em diversas doenças neurodegenerativas.

## 1.2. O Peptídeo Beta Amiloide

O peptídeo beta amiloide ( $A\beta$ ) é um fragmento de 4 kDa da proteína precursora do amiloide (APP), uma proteína transmembrana que contém 695 a 770 aminoácidos e que é produzida pelos neurônios no cérebro, por células sanguíneas e vasculares e, em menor quantidade, pelos astrócitos. Embora uma visão completa da função biológica da APP permaneça desconhecida, evidências experimentais

indicam uma potencial função de remodelagem nos dendritos, participação nos mecanismos moleculares de neurotransmissão e homeostasis sináptica.<sup>9-11</sup>

Duas clivagens proteolíticas subsequentes da APP pela  $\beta$ -secretase e  $\gamma$ -secretase produzem o peptídeo beta amiloide. A clivagem pela  $\beta$ -secretase determina o final N-terminal do peptídeo  $A\beta$  e libera o sAPP $\beta$ , o qual é hidrossolúvel. A  $\gamma$ -secretase é responsável por clivar a APP na parte C-terminal, o qual está localizado dentro do domínio transmembrana da APP, liberando o peptídeo  $A\beta$  para o meio extracelular. Alternativamente, a APP pode ser clivada pela  $\alpha$ -secretase e  $\gamma$ -secretase, onde devido ao diferente sítio de clivagem da  $\alpha$ -secretase em relação à  $\beta$ -secretase é liberado para o meio extracelular um fragmento ainda menor denominado p3, Figura 1.1.<sup>12</sup> A clivagem da APP que leva à produção do  $A\beta$  é denominada como caminho amiloidogênico, enquanto a clivagem que leva à produção do p3 é denominada como caminho não amiloidogênico.

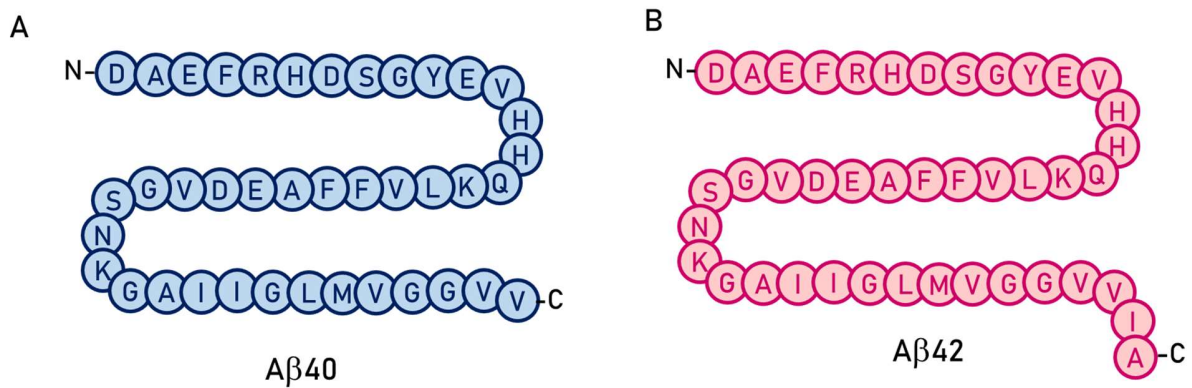


**Figura 1.1. Clivagem proteolítica da proteína precursora do amiloide (APP).** APP sofre clivagem proteolítica que pode ser tanto pelo caminho amiloidogênico

como pelo caminho não amiloidogênico, dependendo da enzima que inicia o processo de clivagem. Para ambos os casos são liberados para o meio extracelular pequenos peptídeos, A $\beta$  para o caminho amiloidogênico e p3 para o caminho não amiloidogênico. Figura criada usando BioRender.com

A clivagem da APP é um processo altamente regulado, porém, mutações genéticas conhecidas que resultam na desregulação da clivagem da APP podem resultar na forma familiar da DA, a qual predispõe indivíduos a desenvolverem a doença. Mutações no gene da APP, o qual é localizado no cromossomo 21, levam à sua clivagem pelo caminho amiloidogênico. Mutações nos genes presenilina 1 e 2 (PSEN1 e PSEN2) localizados dos cromossomos 14 e 2, respectivamente, estão relacionadas ao aumento da clivagem pela enzima  $\gamma$ -secretase.<sup>13,14</sup> Tecidos de cérebros de pacientes de DA também mostraram que o alelo  $\epsilon$ 4 da apolipoproteína E (APOE), a qual exerce função no transporte de lipídeos, está correlacionado com o acúmulo intraneuronal de agregados do A $\beta$ , formação de espécies neurotóxicas do A $\beta$  e com o acúmulo de placas na região do parênquima cerebral.<sup>15,16</sup> Casos de AD decorrentes de mutações familiares representam aproximadamente 5% de todos os casos de Alzheimer.<sup>4</sup> No entanto, a maioria dos casos de DA são considerados esporádicos, ou seja, sem pré-disposição genética.

O peptídeo A $\beta$  em sua forma monomérica é intrinsecamente desordenado podendo variar de 37-43 aminoácidos, sendo que suas isoformas mais comuns são os peptídeos A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42, diferenciando-se apenas em dois aminoácidos (isoleucina e alanina) na sua parte C-terminal, Figura 1.2.<sup>17</sup> A concentração do A $\beta$ 40 no líquido cefalorraquidiano (LCR) é muitas vezes maior do que a do A $\beta$ 42, no entanto o A $\beta$ 42 é o componente majoritário das placas senis encontradas em pessoas com Alzheimer.<sup>18,19</sup>



**Figura 1.2. Sequência de aminoácidos dos peptídeos Aβ40 e Aβ42.** Ambas isoformas Aβ40 (A) e Aβ42 (B) apresentam a mesma sequência de aminoácidos, diferindo somente pelos últimos dois aminoácidos C-terminais. Fonte: própria.

Uma das principais características do peptídeo beta amiloide é sua alta propensão à agregação. Seu processo de agregação vai das unidades monoméricas à formação de fibrilas, as quais compõem as placas senis encontradas nos cérebros dos pacientes da DA.

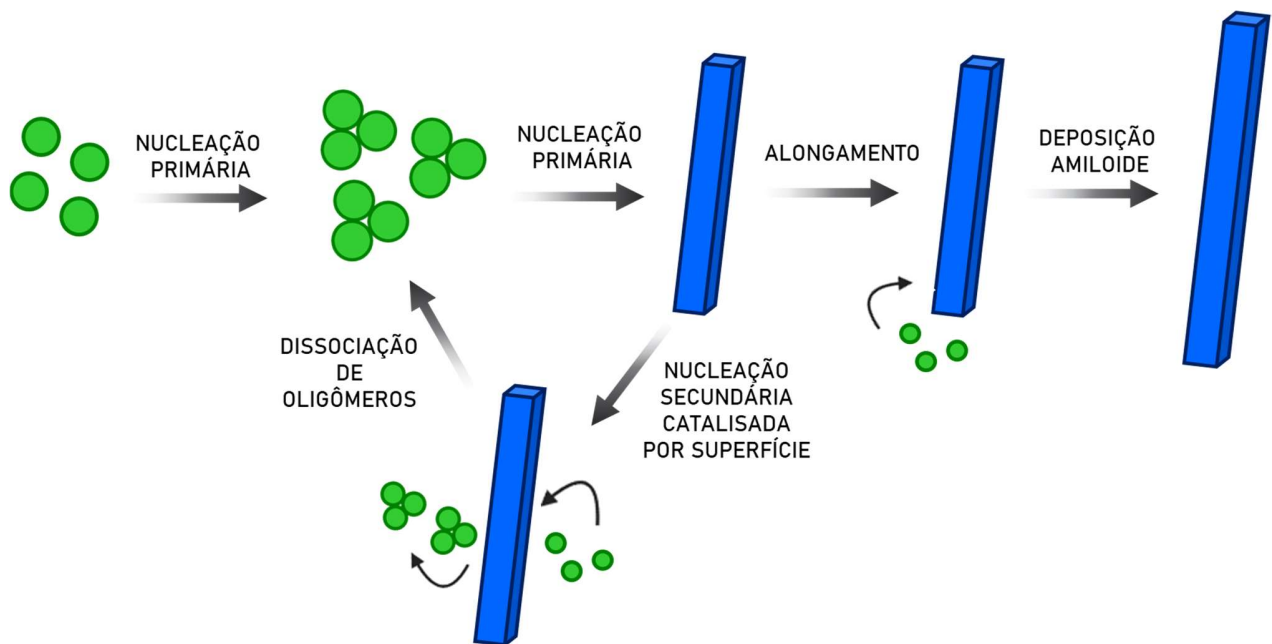
### 1.3. Agregação do Peptídeo Beta Amiloide

A transição de uma proteína do seu estado monomérico solúvel para seu estado amiloide é extremamente complexa. Essa transição é governada por uma série de processos fundamentais, pelos quais diferentes intermediários menores são gerados ao longo do caminho.<sup>3</sup> O caminho de agregação do Aβ foi extensivamente estudado, a fim de se elucidar os mecanismos dominantes por de trás do papel citotóxico desse peptídeo na DA.<sup>20,21</sup>

Uma análise cinética do processo de agregação revelou que os monômeros do Aβ se agregam através de processos de nucleação primária, formando uma população heterogênea de espécies oligoméricas. Essas espécies oligoméricas então sofrem



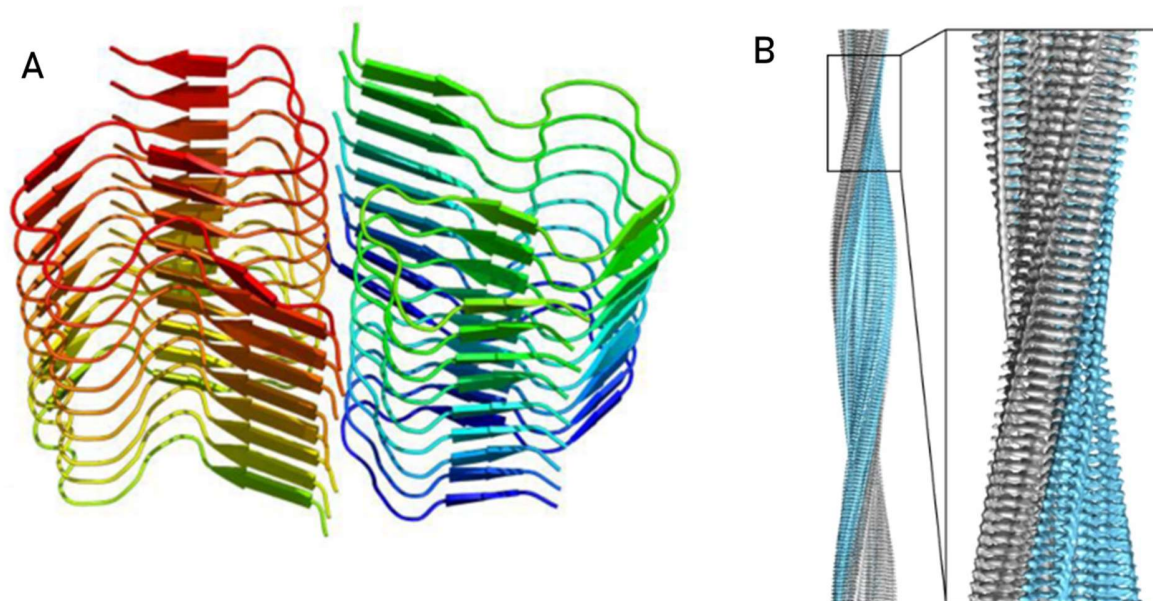
processos de alongamento formando fibrilas, as quais por sua vez, atuam como superfícies catalíticas para a formação de novas espécies oligoméricas. Esse processo envolve a adsorção de várias unidades monoméricas na superfície de fibrilas pré-existentes que passam por uma série de eventos de nucleação, os quais, por sua vez, formam espécies oligoméricas que eventualmente se dissociam da superfície da fibrila, Figura 1.3. Atualmente se assume que a nucleação secundária catalisada por superfície é o mecanismo molecular que rege a agregação do A $\beta$ .<sup>20,21</sup> As fibrilas formadas no final da agregação são insolúveis, consistindo de milhares de unidades monoméricas e podem amadurecer formando as placas amiloides observadas no cérebro de pacientes.<sup>22</sup> Essas fibrilas aparentemente são inertes no contexto de neurodegeneração e cada vez mais evidências surgem comprovando o efeito citotóxico de oligômeros de baixo peso molecular.<sup>23,24</sup>



**Figura 1.3. Processo de agregação do peptídeo beta amiloide é regido por processos de nucleação secundária.** O A $\beta$  monomérico passa por uma série de processos de nucleação primária formando uma população oligomérica. Os oligômeros por sua vez passam por processos de alongamento formando

protofibrilas, as quais eventualmente formam fibrilas maduras. Esse processo é catalisado pela superfície das fibrilas formadas.

As estruturas das fibrilas do A $\beta$  também foram alvo de estudos extensivos, nas quais as mesmas foram caracterizadas devido ao potencial desenvolvimento de terapias contra a nucleação secundária do A $\beta$ . As fibrilas de A $\beta$  adotam uma conformação em formato de S composta por segmentos curtos de folhas beta que estão ligadas entre si pelas dobras de seu formato, Figura 1.4A.<sup>25,26</sup> As moléculas se empilham diretamente uma em cima das outras na direção de crescimento da fibrila formando pilhas de subunidades de folhas beta paralelas, culminando em uma estrutura na qual as cadeias  $\beta$  de moléculas vizinhas são ligadas por pontes de hidrogênio ao longo da direção de crescimento.<sup>25</sup>

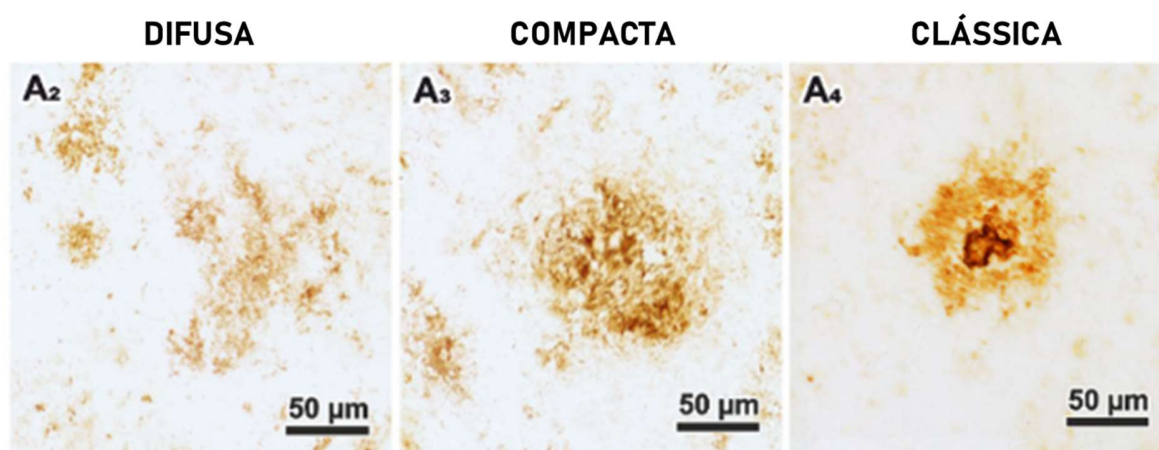


**Figura 1.4. Estruturas moleculares das fibrilas do A $\beta$ .** (A) As fibrilas adotam conformação em formato de S como determinado através de RMN de estado sólido por Colvin e colaboradores.<sup>1</sup> (B) Fibrila do A $\beta$ 42 reconstruída a partir de dados obtidos por Cryo-EM mostram as duas subunidades que constituem as fibrilas.<sup>2</sup>

Cada fibrila contém duas subunidades arranjadas de forma simétrica em relação ao eixo de crescimento da fibrila, Figura 1.4B. Vários detalhes das conformações moleculares nas estruturas fibrilares de A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42 são distintas.<sup>25</sup>

A análise estrutural indica que os resíduos hidrofóbicos estão voltados para o interior da estrutura fibrilar, enquanto os resíduos hidrofílicos, especificamente os resíduos 1-14, se mantêm intrinsecamente desordenados na superfície da fibrila, onde eles interagem com o meio aquoso que envolve o peptídeo.<sup>26</sup>

Uma vez formadas, as fibrilas se juntam em grandes emaranhados denominados placas senis. A maioria dessas placas pode ser classificadas em quatro tipos morfológicos diferentes: difusa, primitiva, clássica e compacta, Figura 1.5.<sup>27</sup>



**Figura 1.5. Tipos distintos de placas senis.** *Staining* imunohistoquímico do A $\beta$  que compõe três tipos distintos de placas senis (difusa, compacta e clássica) mostram morfologias características para cada uma delas. Figura adaptada com permissão da referência 27.

Embora algumas placas primitivas se desenvolvam a partir de placas difusas, evidências sugerem que uma combinação única de fatores está envolvida na

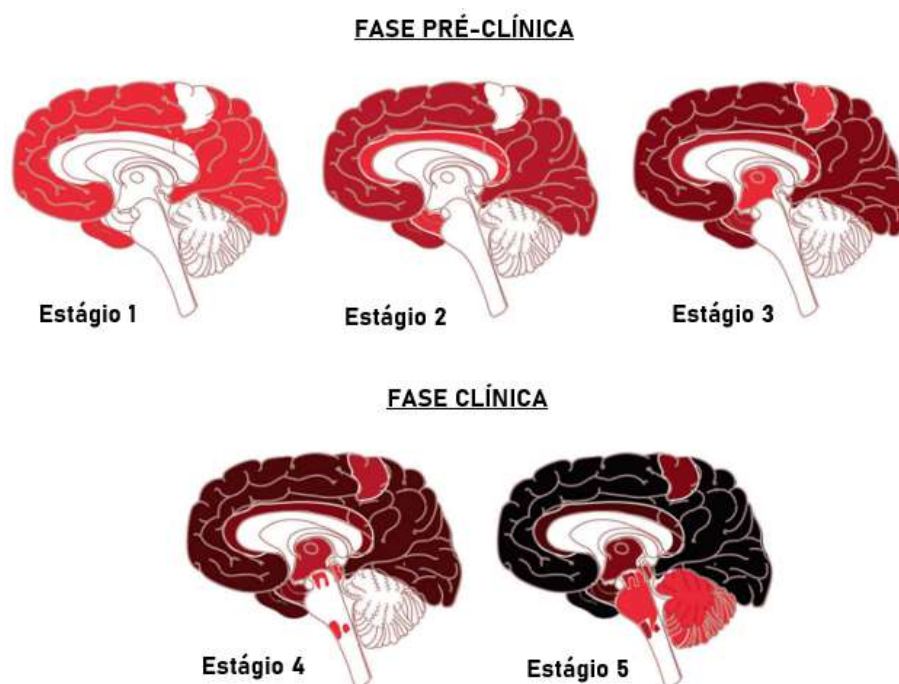
patogênese de cada tipo de placa e, portanto, suportam a hipótese que os tipos principais de placas de A $\beta$  se desenvolvem independentemente.<sup>27</sup>

#### **1.4. Neuropatologia da Doença de Alzheimer**

Nas últimas duas décadas, estudos translacionais incluindo modelos animais, bem como evidências genéticas e neuropatológicas obtidas de humanos, suportam um modelo hipotético da fisiopatologia da doença de Alzheimer. A DA é caracterizada por um acúmulo de espécies do peptídeo beta amiloide, a qual precede em aproximadamente 20 a 30 anos a disfunção e o subsequente acúmulo da proteína tau, perda neuronal e eventuais manifestações clínicas.<sup>28,29</sup> A proeminência dos efeitos do A $\beta$  na doença de Alzheimer levou ao desenvolvimento da chamada hipótese do amiloide, a qual dita que o peptídeo beta amiloide induz estresse neuronal, através de mecanismos que ainda são extensivamente estudados, acarretando degeneração neuronal e formação de filamentos intracelulares compostos de proteína tau hiperfosforilada denominados emaranhados neurofibrilares. A hipótese é que a hiperfosforilação da proteína tau é decorrente dos efeitos do A $\beta$  no córtex cerebral, quando a concentração de A $\beta$  chega à um nível crítico.<sup>29,30</sup>

O estágio pré-clínico da DA é caracterizado pelo acúmulo gradual de placas de A $\beta$  no córtex cerebral. Em 2002, Dietmar Thal e colaboradores publicaram resultados de autópsias de 51 pacientes variando de cognição normal à demência severa.<sup>31</sup> Os autores identificaram mudanças cerebrais progressivas, as quais foram classificadas em cinco estágios de  $\beta$ -amiloidose cerebral. Esses estágios foram subsequentemente denominados estágios Thal. Os estágios são baseados em um único parâmetro: a presença ou ausência de depósitos de A $\beta$  em regiões específicas do cérebro, sem considerar a quantidade de A $\beta$  presente em dada localização ou tipo de placa amiloide (difusa ou clássica), Figura 1.6.<sup>31</sup>

No Estágio 1, depósitos esparsos são identificados nos córtex frontal, parietal, temporal ou occipital (neocórtex), apresentando-se como acúmulos focais ou pequenos agregados, sendo que deposição de A $\beta$  não é observada em outras áreas. A presença de A $\beta$  neocortical mas sua ausência no hipocampo e mesencéfalo, independentemente da densidade de placas, é considerada representativa do Estágio 1. Nos Estágios 2-5 há um aumento progressivo na deposição A $\beta$  nas regiões corticais e subcorticais, começando com estruturas do lobo temporal medial. Um acúmulo adicional é observado nas regiões allocortical e mesencefálica (Estágios 2 e 3), com o cerebelo e o tronco encefálico apresentando acúmulo de A $\beta$  em estágios clínicos mais avançados (Estágios 4 e 5).



**Figura 1.6. Estágios neuropatológicos da deposição do peptídeo beta amiloide em pacientes de Alzheimer.** As áreas em vermelho no Estágio 1 representam as regiões corticais com o acúmulo inicial de A $\beta$  durante o estágio pré-clínico inicial. A deposição subsequente nas mesmas áreas são indicadas em cores progressivamente mais escuras a cada um dos estágios, com novas áreas

apresentando A $\beta$  em vermelho a cada um dos estágios. Adaptado com permissão da referência 7.

Estudos subsequentes avaliaram a densidade de placas de A $\beta$  presente em cada um dos Estágios.<sup>32</sup> Foi demonstrado que entre os Estágios 1 e 2 há um aumento pronunciado no número de placas amiloides no neocortex, sendo observada uma estabilização no número de agregados observados já no Estágio 3 na maioria das áreas do neocortex estudadas.<sup>32</sup> É importante ressaltar que pacientes com diagnósticos clínicos e patológicos de doença de Alzheimer apresentaram invariavelmente depósitos amiloides consistentes com os Estágios 3 a 5.

### 1.5. O Peptídeo Beta Amiloide e o Estresse Oxidativo

A oxidação de biomoléculas no contexto da DA está majoritariamente relacionada às biomoléculas das membranas neuronais e a ruptura da integridade das membranas. Esse processo envolve a oxidação de lipídeos (tais como o colesterol), proteínas e ácidos nucleicos, bem como o comprometimento da eliminação do A $\beta$  pela proteína LRP1 (*low density lipoprotein receptor-related protein*) devido à sua oxidação.<sup>33</sup>

Evidências sugerem que o estresse oxidativo (EO) e o estresse nitrosativo desempenham um papel importante na DA.<sup>34</sup> O EO ocorre nos estágios iniciais da DA, o qual corrobora seu papel na patogênese da doença,<sup>35</sup> sendo relacionado à presença do A $\beta$ . De fato, níveis elevados de A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42 foram associados a níveis mais altos de produtos provenientes da oxidação de proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos no hipocampo e córtex de pacientes da DA.<sup>36</sup> Por outro lado, regiões do cérebro com níveis de A $\beta$  mais baixos não apresentaram altas concentrações de marcadores de estresse oxidativo.<sup>37</sup>

Vários possíveis mecanismos do papel do A $\beta$  em danos oxidativos são descritos na literatura. O A $\beta$  pode causar disfunção mitocondrial, perturbar o metabolismo do grupo heme, causar neuroinflamação e induzir a produção de peróxido de hidrogênio através de íons metálicos.<sup>38</sup>

O A $\beta$  interfere com a atividade mitocondrial normal, causando disfunções que resultam em estresse oxidativo.<sup>39</sup> O A $\beta$  não só promove a geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) nas mitocôndrias, mas inibe, ao mesmo tempo, a remoção das EROS produzidas. Evidências mostram que o A $\beta$  é capaz de inibir a enzima mitocondrial superóxido dismutase (MnSOD), enzima essa envolvida na detoxificação do ânion superóxido e proteção contra danos peroxidativos.<sup>40,41</sup>

Outro mecanismo que se apresenta desregulado na DA é a homeostase de íons metálicos como o ferro, cobre e zinco. A barreira hematoencefálica regula firmemente a concentração desses metais no cérebro, mas seus níveis aumentam significativamente em pacientes da DA.<sup>42,43</sup> O A $\beta$  pode reduzir o Fe(III) ou o Cu(II) para induzir a produção de peróxido de hidrogênio, contribuindo para o estresse oxidativo.<sup>44</sup> Estudos *ex vivo* mostraram que oligômeros de ZnA $\beta$  inibiram a potenciação de longa duração (LTP) do hipocampo em modelos de camundongos transgênicos também através da produção de EROS.<sup>45</sup>

Outra importante molécula contendo ferro que está implicada na patogênese da DA é a proteína heme. A proteína heme é uma molécula essencial para vários mecanismos fisiológicos e patológicos.<sup>46</sup> Essa proteína pode se ligar ao A $\beta$  e é sabido que o complexo formado apresenta atividade de peroxidase e é capaz de oxidar moléculas de serotonina e dopamina.<sup>47</sup>

Outro mecanismo essencial pelo qual a presença do A $\beta$  induz o estresse oxidativo é a neuroinflamação.<sup>48</sup> A neuroinflamação é considerada como uma resposta imunológica caracterizada pela ativação de células gliais e pela produção de mediadores de inflamação.<sup>49</sup> O A $\beta$  pode se ligar a diferentes receptores de microglia,

resultando na produção não só de citocinas inflamatórias e quimiocinas,<sup>50</sup> mas também em uma grande quantidade de EROS ( $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ )<sup>51</sup> e óxido nítrico ( $\cdot\text{NO}$ )<sup>52</sup>. Portanto, o  $\text{A}\beta$  vem se mostrando um fator crucial no estresse oxidativo e inflamação associada à DA.

Danos extensivos causados por oxidação são observados em casos clínicos que apresentam comprometimento leve das habilidades cognitivas.<sup>53</sup> Isso sugere que o estresse oxidativo seja uma das primeiras ocorrências para a progressão do envelhecimento normal à patologia da DA. Baseado nisso, é provável que o aumento na produção de EROS pode atuar como um mediador importante na perda sináptica e eventualmente promover a formação de placas senis.<sup>54</sup>

## **1.6. Prevenção, Diagnóstico e Tratamentos da DA**

### **1.6.1. Prevenção**

Embora cientistas tenham conduzidos diversos estudos, com vários ainda em andamento, ainda não existe cura para a doença de Alzheimer. Contudo, pesquisadores identificaram estratégias promissoras que podem ajudar na prevenção da DA.<sup>55</sup>

A combinação de um estilo de vida saudável foi associado a um risco substancialmente menor de desenvolver a DA em um estudo conduzido com quase 3000 participantes.<sup>56</sup> Os pesquisadores avaliaram os participantes baseados em cinco fatores de um estilo de vida saudável, todos os quais apresentam importantes benefícios para a saúde. Os comportamentos avaliados foram atividade física, não tabagismo, consumo de álcool leve à moderado, dieta de alta qualidade e atividades cognitivas. Aqueles que aderiram a quatro ou todos os cinco “hábitos saudáveis” especificados apresentaram um risco 60% menor de desenvolver a doença.<sup>56</sup> A combinação de diferentes fatores se mostrou ser o mais importante para obter-se



resultados efetivos. O estudo mostrou que comparado com os participantes exercendo um ou nenhum dos hábitos saudáveis, o risco de Alzheimer era 37% menor para aqueles que praticavam dois ou três dos hábitos e 60% menor para os que praticavam quatro ou todos os cinco.

Estudos também indicam que os padrões de sono na vida adulta podem contribuir para o risco de demência na velhice.<sup>57</sup> A análise dos dados de quase 8000 participantes do estudo mostrou que pessoas nos seus 50 e 60 anos que dormiam seis horas ou menos apresentavam um risco 30% maior de desenvolver a DA comparado aos participantes que contavam com um número normal de horas de sono (7 horas).<sup>57</sup> Os autores ressaltam no entanto que embora não seja possível afirmar que dormir menos horas por noite aumenta os riscos de demência, existem várias razões para acreditar que uma boa noite de sono é benéfica ao cérebro. Vários estudos correlacionam o sono e a deposição do A $\beta$ , onde a privação de sono leva ao aumento do A $\beta$  solúvel no líquido cefalorraquidiano (LCR).<sup>58,59</sup>

### 1.6.2. Diagnóstico

Há um pouco mais de uma década, o único método definitivo de diagnóstico da doença de Alzheimer como causa de demência era através de um exame *post mortem*. Quando em vida, uma série de avaliações aos pacientes são realizadas pelos médicos, testando suas habilidades cognitivas e de memória. A condição de saúde geral do paciente também é estudada a fim de descartar quaisquer outras condições médicas que poderiam estar ocasionando os sintomas apresentados pelo paciente.

Em 2012 uma forma de diagnóstico foi redefinida pelo Instituto Nacional de Envelhecimento e pela Associação do Alzheimer.<sup>60,61</sup> O diagnóstico agora depende de uma avaliação das regiões do cérebro em relação a três marcadores patológicos da DA: placas de A $\beta$  (baseado nos estágios de Thal), emaranhados neurofibrilares

de proteína tau (baseado nos estágios de Braak) e localização de placas neuríticas e densidade (baseado no escore CERAD).<sup>60,61</sup>

A presença de placas amiloides no cérebro é, atualmente, detectada através da técnica de tomografia de emissão de pósitron (PET - *positron emission tomography*) fazendo uso de rastreadores radioativos. Todos os rastreadores disponíveis até o momento se ligam a fibrilas amiloides e, portanto, possuem afinidade com placas amiloides. No entanto, esses rastreadores também apresentam interação não específica com a massa branca do cérebro, bem como interações com vasos sanguíneos cobertos por proteínas amiloides em casos de angiopatia cerebral amiloide.<sup>62,63</sup>

O imageamento do A $\beta$  é capaz de distinguir entre a ausência (Estágios Thal 0-2) e a presença de A $\beta$  no neocortex (Estágios Thal 4-5) baseado na análise visual do sinal gerado nessa área do cérebro. Até o momento, três rastreadores de A $\beta$  foram aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*): <sup>18</sup>F-florbetapir (Amyvid; Eli Lilly/Avid Radiopharmaceuticals), <sup>18</sup>F-florbetapen (Neuraceq; Piramal Imaging) e <sup>18</sup>F-flutemetamol (Vizamyl; GE Healthcare), todos usando radioisótopos de fluor <sup>18</sup>F.<sup>64</sup>

### 1.6.3. Tratamento

Até o momento, não existe cura para a doença de Alzheimer. Porém, existem tratamentos disponíveis para aliviar os sintomas decorrentes da DA, melhorando a qualidade de vida e prolongando a independência dos pacientes. Existem dois tipos de medicamentos atualmente no mercado os quais auxiliam no tratamento da DA: os que tratam os sintomas e os que retardam a progressão da doença. É importante ressaltar que ambos tipos de medicamentos tendem a ser mais efetivos em pacientes nos estágios iniciais e moderados de Alzheimer.<sup>65</sup> O órgão regulador americano FDA aprovou dois tipos diferentes de fármacos para o tratamento dos sintomas da DA: inibidores de acetilcolinesterase e reguladores de glutamato.

Inibidores de acetilcolinesterase (AChE) inibem a enzima colinesterase de metabolizar a acetilcolina (ACh), um neurotransmissor e neuromodulador responsável por diferentes funções como o estado de alerta, memória e pensamento.<sup>66</sup> Com a inibição da AChE, o nível de acetilcolina se mantém mais alto e atuando por mais tempo. Eventualmente medicamentos baseados na inibição da AChE perdem a eficácia pois, à medida que a doença progride, há uma perda de células cerebrais e, conseqüentemente, uma menor quantidade de acetilcolina é produzida.<sup>65</sup> Inibidores de AChE comumente prescritos à pacientes são Galantamina (Reminyl ER, Janssen-Cilag) e Rivastimina (Exelon, Novartis) para quadros clínicos iniciais a moderados e Donepezil (Eranz, Wyeth-Whitehall) para quadros clínicos em qualquer estágio.<sup>65</sup>

O glutamato é o neurotransmissor excitatório mais abundante no sistema nervoso central de mamíferos, o qual está envolvido em uma série de funções cerebrais, tais como aprendizado e memória.<sup>67</sup> A neurotransmissão excitatória glutamatérgica através do receptor N-metil-d-aspartato (NMDAR) é crítica para a plasticidade sináptica e a sobrevivência dos neurônios. No entanto, a atividade excessiva do NMDAR causa excitotoxicidade e promove morte celular. Fármacos que atuam na via do glutamato regulam sua atividade afim de evitar a excitotoxicidade celular.<sup>67</sup> O fármaco Memantina (Zider, Libbs Farmacêutica) foi aprovado pelo FDA para o tratamento da DA para quadros clínicos de moderados à severos.<sup>65</sup>

Recentemente fármacos anti-amiloide baseados em anticorpos monoclonais, os quais tratariam a causa da DA e retardariam a progressão da doença, obtiveram resultados promissores em estudos clínicos.<sup>68,69,70</sup> O fármaco Aducanamab (Aduhelm, Biogen) se tornou o primeiro medicamento para a DA aprovado pelo FDA desde 2013.<sup>70</sup> Em uma decisão controversa, o FDA aprovou o medicamento mesmo com avaliações adversas do grupo de revisores que avaliaram os resultados de dois ensaios clínicos em alta escala do Aducanamab, o qual, em teoria, acarreta

uma diminuição de placas de A $\beta$  em pacientes em estágios iniciais da doença.<sup>70</sup> Os resultados apresentados mostraram-se conflitantes quanto a habilidade do fármaco em retardar o declínio cognitivo dos pacientes.<sup>71,72</sup> Lecanemab, outro anticorpo monoclonal com efeito anti-amiloide, se encontra em fase 3 de ensaios clínicos apresentando resultados promissores em pacientes nos estágios iniciais da DA, podendo estar disponível no mercado em 2023. Os pacientes participantes do estudo apresentaram melhora cognitiva em 27% em relação ao grupo controle.<sup>68</sup> No entanto, questões a respeito da segurança do fármaco ainda permanecem não respondidas.<sup>73</sup>

Contudo, fármacos anti-amiloide tem sido cada vez mais estudados como uma alternativa de tratamento da doença de Alzheimer, e a aprovação clínica pelo FDA dessa classe de fármacos abre uma nova fronteira para a cura da DA.

### **1.7. Complexos Metálicos como Agentes Terapêuticos**

Nas últimas décadas complexos metálicos com potenciais aplicações medicinais vêm sendo estudados intensivamente.<sup>74</sup> Baseado nas suas propriedades eletrônicas únicas, reatividade, e características estereoquímicas, compostos que contêm centros metálicos demonstraram ter a habilidade de interagir com biomoléculas e sistemas biológicos através de mecanismos de ação que muitas vezes não podem ser acessados por moléculas orgânicas.<sup>75</sup> Sua grande diversidade estrutural, possibilidade de troca de ligantes, atividade redox e catalítica, bem como suas atividades fotofísicas são características bastante atrativas para aplicações na medicina e na biotecnologia.<sup>75</sup>

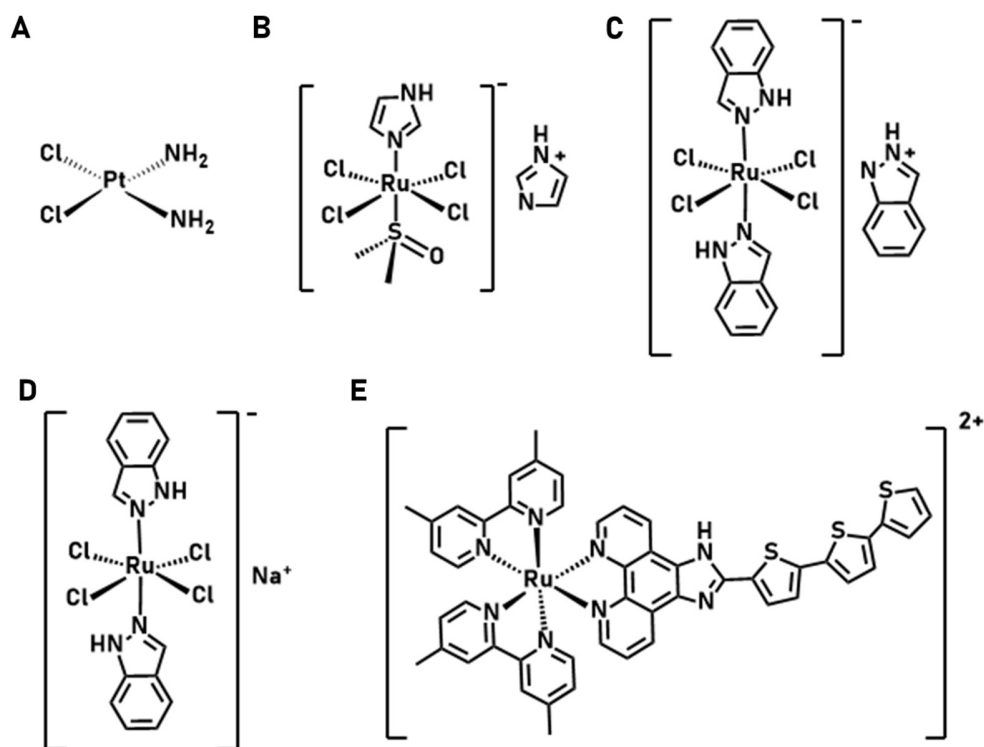
A descoberta por acaso da cisplatina por Rosenberg e colaboradores no final da década de 60 representa um marco no desenvolvimento de complexos metálicos para aplicações medicinais.<sup>76,77</sup> Hoje, fármacos a base de platina como a cisplatina, carboplatina e oxaliplatina são rotineiramente utilizados e são alguns dos maiores exemplos de metais utilizados na medicina. Um estudo recente sugere que no

contexto hospitalar, aproximadamente 50% dos tratamentos quimioterápicos envolvem um fármaco a base de platina.<sup>78,79</sup>

O uso de fármacos a base de platina é, no entanto, limitado por seus efeitos colaterais, tais como nefrotoxicidade e neurotoxicidade que acabam limitando a dosagem desses medicamentos.<sup>80,81</sup> Além disso, diferentes tipos de câncer podem desenvolver ou ser inerentemente resistentes a drogas de platina.<sup>82-84</sup> Por esses motivos, as pesquisas com complexos metálicos se expandiu para complexos com outros centros metálicos, sendo o rutênio um dos metais mais explorados como alternativa para a platina.<sup>85</sup>

Fármacos a base de rutênio são candidatos promissores os quais mostram propriedades biológicas aceitáveis para quimioterapia, sendo estudados extensivamente na área de pesquisa clínica, com seus mecanismos de ação sendo reportados na literatura.<sup>86,87</sup> Complexos de rutênio apresentam certas propriedades que os tornam atrativos para aplicações medicinais. Eles apresentam atividade frente a linhagens celulares resistentes à cisplatina, apresentam menos efeitos colaterais devido à sua maior seletividade a células cancerígenas frente a células saudáveis e mimetizam o ferro se ligando a algumas moléculas biológicas.<sup>75,88</sup>

Alguns compostos de rutênio se mostraram excelentes candidatos para desenvolvimento clínico, devido a sua baixa toxicidade, diferentes cinéticas de troca de ligante, transporte, mecanismos de ativação e alta atividade biológica.<sup>88</sup>



**Figura 1.7. Estrutura da cisplatina e complexos de rutênio em ensaios clínicos.** Estrutura dos complexos cisplatina (A), NAMI-A (B), KP1019 (C), KP1339 (D) e TLD1433 (E).

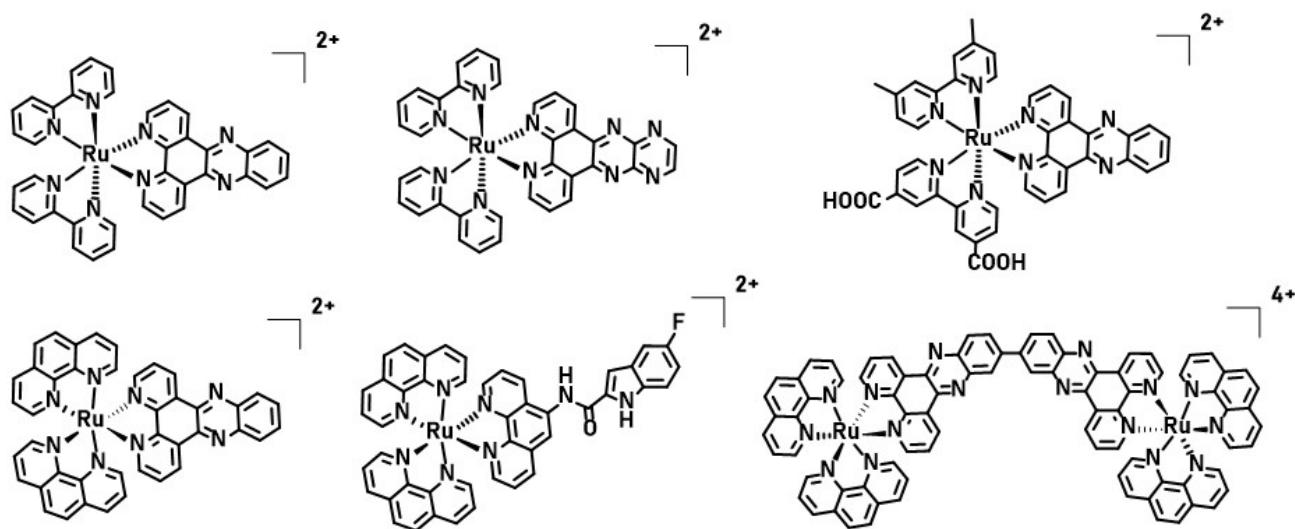
Atualmente quatro fármacos a base de rutênio estão em diferentes estágios de ensaios clínicos, Figura 1.7. O complexo de Ru(III) NAMI-A apresentou atividade antiangiogênica e antimetastática em tumores secundários enquanto o complexo KP1019 é ativo em um amplo espectro de tumores primários. O composto KP1339, estruturalmente semelhante ao KP1019, porém com um contra íon sódio, foi desenvolvido inicialmente como um precursor do KP1019 mas foi reavaliado como um candidato clínico devido a sua maior solubilidade em meio aquoso, o que permite a administração de doses maiores aos pacientes. Por fim, o complexo de Ru(II) TLD1433 entrou em estudos clínicos como tratamento para câncer de bexiga como agente de terapia fotodinâmica.<sup>88,89</sup>

## 1.8. Complexos de Rutênio Aplicados à Doença de Alzheimer

No contexto da DA, complexos de rutênio são estudados com duas funcionalidades distintas: como sondas luminescentes e como moduladores de agregação.

Uma das primeiras aplicações espectroscópicas de complexos de metais de transição com o A $\beta$  foi realizada por Man e colaboradores.<sup>90</sup> Eles desenvolveram complexos de irídio e ródio que se coordenavam aos resíduos de histidina do A $\beta$ 40 para interromper o processo de fibrilação. No entanto, não só a fibrilação foi suprimida quando incubada com os monômeros, mas um aumento significativo na resposta luminescente do complexo foi observado. Na presença de A $\beta$  monomérico e fibrilar o complexo apresentou intensidade de emissão 56 e 134 vezes maior, respectivamente.<sup>91</sup>

Diferentes complexos metálicos vêm sendo estudados desde então para monitorar o processo de agregação de proteínas amilóides, Figura 1.8. Complexos de rutênio (II) em especial, são estudados para o potencial uso como sondas luminescentes. Todos eles apresentam uma característica em comum: a transição de transferência de carga do metal para o ligante (MLCT) dos orbitais d( $\pi$ ) do rutênio para os orbitais  $\pi^*$  dos ligantes polipiridínicos, transição essa que confere aos complexos suas propriedades luminescentes. O complexo [Ru(bpy)<sub>2</sub>dppz]<sup>2+</sup> (bpy = 2,2'-bipiridina; dppz = dipirido[3,2-a:2',3'-c]-fenazina), comumente usado como intercalador de DNA<sup>92</sup>, foi um dos primeiros exemplos de complexos de metais de transição usados na detecção da agregação do A $\beta$ .<sup>93</sup>



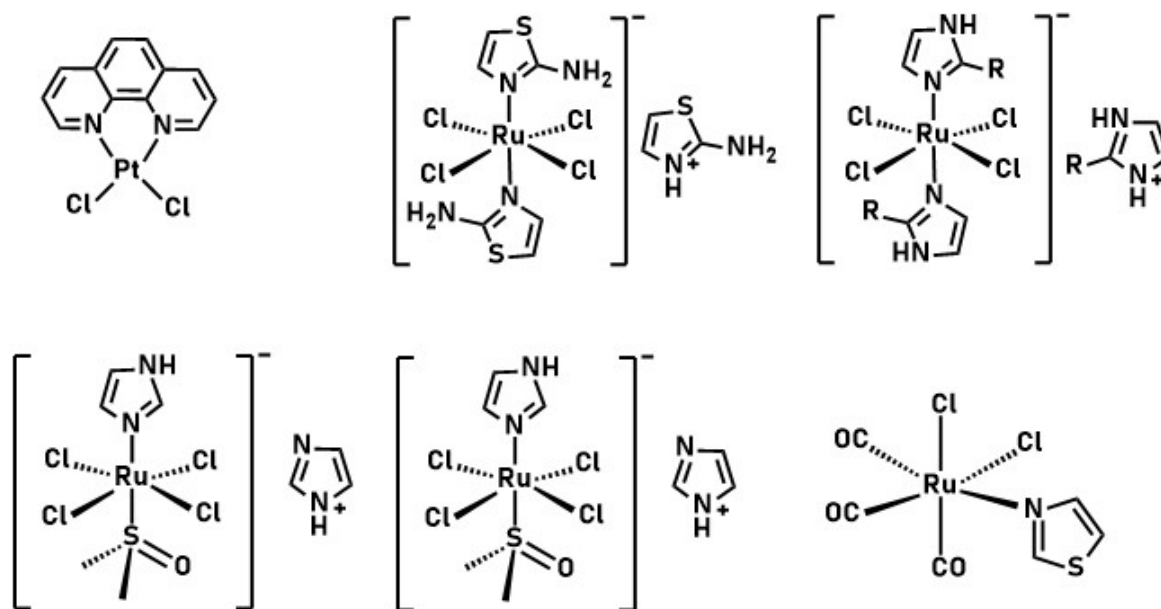
**Figura 1.8. Complexos de Ru (II) utilizados como sondas luminescentes de agregação para o A $\beta$ .** Complexos polipiridínicos luminescentes estudados como sondas de agregação do A $\beta$ .

Complexos metálicos apresentam uma série de vantagens frente a sondas orgânicas luminescentes comumente utilizadas. Complexos apresentam tempos de vida de fotoluminescência longos, bem como grandes deslocamentos de Stokes. O complexo  $[Ru(bpy)_2dppz]^{2+}$  apresenta um aumento substancial em sua luminescência à medida que o A $\beta$  passa do estado monomérico para o fibrilar. Além disso, devido ao seu tempo de vida de emissão longo, esse complexo foi utilizado para detectar a agregação do A $\beta$  em tempo real em um meio com alta fluorescência de fundo.<sup>94</sup>

Por outro lado, a avaliação de complexos metálicos que têm como alvo inibir a agregação o A $\beta$  começou com o complexo a base de platina  $PtCl_2(phen)_2$  (Figura 1.9), o qual se mostrou capaz de prevenir a citotoxicidade do A $\beta$  em neurônios corticais primários de ratos.<sup>95</sup> Para esse complexo foi observado que o mesmo



interagia com o A $\beta$  tanto de forma covalente, com os resíduos de histidina do peptídeo, como por interações hidrofóbicas.<sup>96</sup>



**Figura 1.9. Complexos de Ru (II) utilizados como moduladores de agregação para o A $\beta$ .** Complexos de platina e rutênio estudados como moduladores de agregação do A $\beta$ , incluindo complexos testados como anticancerígenos.

Com o sucesso de complexos a base de platina, complexos com outros centros metálicos foram preparados e estudados, incluindo Co, Ir, Re, Rh e Ru, bem como complexos bimetálicos.<sup>97</sup> Isso levou à reavaliação dos compostos anticancerígenos de Ru(III) KP1019 e NAMI-A agora como moduladores de agregação do A $\beta$ .<sup>98,99</sup>

Pequenas modificações nas estruturas foram realizadas posteriormente a fim de melhorar a interação dos complexos com o A $\beta$ . Para os complexos de rutênio reportados até o momento, foi observado que os mesmos tendem a redirecionar o caminho de agregação do A $\beta$  para que sejam formados agregados amorfos ao invés de fibrilas altamente estruturadas<sup>100,101</sup>, Figura 1.9. Todos os complexos reportados

possuem ligantes cloreto em sua estrutura, os quais ao entrarem no meio aquoso são labilizados, sendo trocados por moléculas de água. Logo, esses complexos ao se depararem com os resíduos de histidina do peptídeo se coordenam a eles, mudando assim o caminho de agregação do A $\beta$ .

Portanto, complexos de rutênio continuam se mostrando versáteis quanto a sua utilidade frente a DA, tanto como sondas luminescentes do processo de agregação do A $\beta$  tornando-se possivelmente uma ferramenta de diagnóstico, mas também influenciando o processo de agregação do A $\beta$ , podendo assim atuar no tratamento da DA, evidenciando o potencial terapêutico dessa classe de compostos.

## 1.9. Objetivo Geral da Tese

A presente tese tem como objetivo otimizar a metodologia de expressão e purificação do A $\beta$  recombinante, bem como desenvolver uma série de complexos de Ru(II) com potenciais aplicações terapêuticas para a doença de Alzheimer.

### 1.9.1. Objetivos Específicos

- Expressar e purificar o peptídeo beta amiloide recombinante (Capítulo 2);
- Estudar a agregação do peptídeo beta amiloide recombinante obtido, bem como determinar seu mecanismo molecular de agregação (Capítulo 2);
- Sintetizar, caracterizar e avaliar propriedades luminescentes e antioxidantes de uma série de complexos de rutênio – *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(Apy)<sub>2</sub>] e [Ru(Mephen)<sub>2</sub>(Apy)<sub>2</sub>] onde phen = 1,10-fenantrolina; Mephen = 5,6-dimetil-1,10-fenantrolina, Apy = 4-aminopiridina, 3,4-diaminopiridina (Capítulo 3);
- Estudar o processo de agregação do peptídeo beta amiloide na presença dos complexos (Capítulo 4);
- Avaliar as espécies formadas na presença dos complexos (Capítulo 4);

- Avaliar os efeitos dos complexos em um sistema *in vivo* da doença de Alzheimer usando os nematoides *C. elegans* (Capítulo 5).

# 2

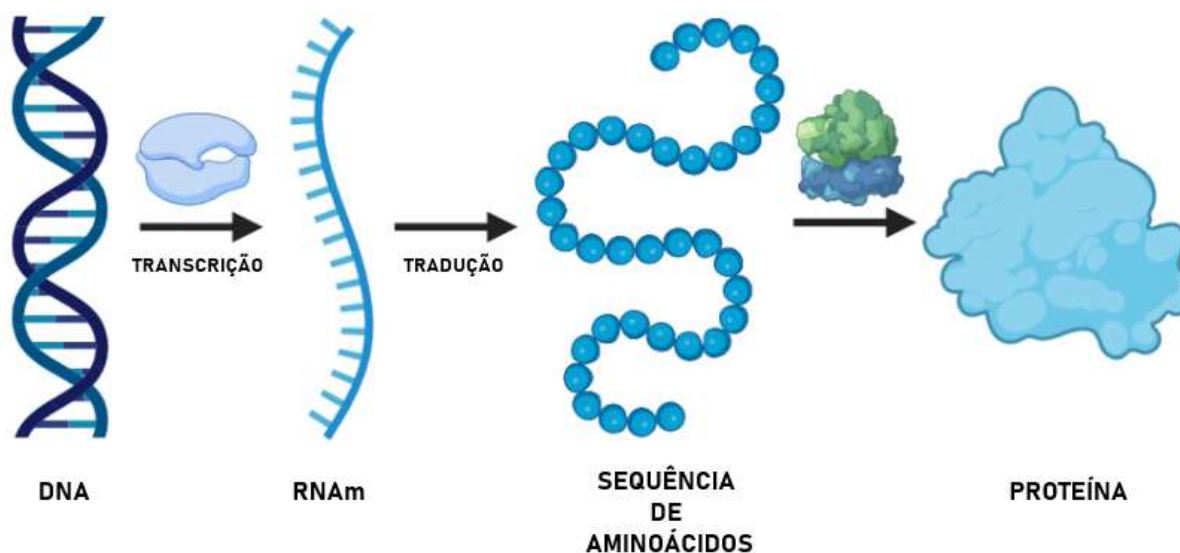
## **Expressão, Purificação e Validação Cinética do Peptídeo Beta Amiloide Recombinante**

*“Bacteria is the only culture some people have.”*

*- Karin Gillespie*

## 2.1. Introdução

Proteínas exercem inúmeras funções em sistemas biológicos, facilitando uma série de processos celulares, incluindo expressão gênica, crescimento celular, proliferação, absorção de nutrientes, comunicação celular e apoptose. As “informações” necessárias para a síntese de proteínas no organismo estão armazenadas no DNA, o qual serve de molde para processos de transcrição altamente regulados a fim de produzir o RNA mensageiro (RNAm). A mensagem codificada pelo RNAm é então traduzida em sequências definidas de aminoácidos que formam a proteína, Figura 2.1.



**Figura 2.1. Dogma central da biologia.** Sequências de DNA são transcritas por enzimas RNA polimerase em RNAm que são, por sua vez, traduzidas por ribossomos em sequências de aminoácidos que formam proteínas.

Para fins científicos, proteínas podem ser obtidas de forma nativa de seus hospedeiros naturais, através de síntese química, ou de forma recombinante. Proteínas recombinantes são proteínas codificadas por um DNA recombinante que foi inserido em um vetor de expressão, para ser produzido em um hospedeiro de

origem diferente (bactérias, leveduras ou células animais), o qual suporta a expressão do gene.<sup>102</sup> Proteínas recombinantes forneceram avanços importantes no setor de biotecnologia. Elas não só são utilizadas em pesquisas biomédicas, mas também como fármacos para o tratamento de doenças, como é o caso da insulina, a qual é fabricada de forma recombinante para o tratamento de diabetes desde 1982.<sup>103</sup>

Estudos de agregação do A $\beta$  *in vitro* são muitas vezes conduzidos com peptídeos produzidos sinteticamente.<sup>104,105</sup> Peptídeos obtidos sinteticamente apresentam uma série de desvantagens incluindo variações entre lotes, impurezas intrínsecas e alto custo.<sup>105</sup> Consequentemente, vários sistemas de expressão recombinantes foram estabelecidos para esses peptídeos. Esses protocolos ou resultam em peptídeos iniciando com uma metionina não-nativa<sup>106,107</sup> ou são baseados em proteínas de fusão que requerem uma clivagem proteolítica para se obter a sequência nativa do A $\beta$  humano.<sup>108-110</sup> A principal desvantagem de se obter um peptídeo iniciando com uma metionina é que a mesma pode afetar processos pós traducionais<sup>111-113</sup> e ligações com íons metálicos uma vez que o sítio de interação está localizado na parte N-terminal do peptídeo.

A expressão do A $\beta$  em *Escherichia coli* (*E. coli*) tem se mostrado difícil devido à sua toxicidade e baixa solubilidade.<sup>114</sup> A fim de superar esses problemas, uma abordagem convencional é expressar o A $\beta$  como uma proteína de fusão. A proteína de fusão ajuda na solubilização da proteína de interesse, aumenta seu rendimento e também previne a sua toxicidade.<sup>115,116</sup> Essa abordagem já foi bem-sucedida para diversas proteínas.<sup>115,116</sup> Existem várias formas de clivar a proteína de fusão a fim de se obter a proteína de interesse e, certas proteases virais, tal como as codificadas pelo *tobacco etch virus* (TEV), apresentam alta precisão na clivagem, fazendo com que elas sejam bastante úteis para esse fim.<sup>117</sup> A protease TEV reconhece a sequência de aminoácidos ENLYFQ/G com alta eficiência de clivagem entre a glutamina (Q) e a glicina (G).<sup>117</sup> Assim, essa pequena sequência de

aminoácidos é inserida na proteína de fusão para que a clivagem possa ocorrer no final do processo de purificação da proteína de interesse.

Assim, cada vez mais proteínas amiloides vêm sendo produzidas de forma recombinante, obtendo-se proteínas de alta qualidade e em grande quantidade.

## 2.2. Objetivos do Capítulo

Nesse capítulo serão explorados os processos de expressão e purificação da protease TEV bem como os processos de expressão e purificação dos peptídeos A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42, juntamente com a validação cinética dos peptídeos obtidos.

## 2.3. Materiais e Métodos

O trabalho apresentado neste capítulo foi realizado no *Centre for Misfolding Diseases* na Universidade de Cambridge durante o estágio sanduíche.

### 2.3.1. Plasmídeos

O plasmídeo pRK793, de uso comum do laboratório, utilizado na expressão da protease TEV foi transformado em bactérias *E. coli* BL21(DE3) pLysS (New England BioLabs Inc.).<sup>117</sup> Para a expressão da proteína de fusão NT\*<sub>FISp</sub>-A $\beta$  o plasmídeo pT7 contendo o gene que codifica a proteína foi fornecido pelo grupo de pesquisa de Henrik Biverstal<sup>118</sup> e foi transformado em bactérias *E. coli* BL21(DE3) (New England BioLabs Inc).

### 2.3.2. Transformação e Cultivo de Células

Colônias de bactérias foram cultivadas em placas de ágar (MP Biomedicals, USA) contendo 100  $\mu$ g/mL de ampicilina (Sigma-Aldrich) e 30  $\mu$ g/mL de cloranfenicol (Sigma-Aldrich) para a protease TEV e 70  $\mu$ g/mL de canamicina (Sigma-Aldrich)

para a proteína de fusão NT\*<sub>FISp</sub>-A $\beta$ . Ambas proteínas foram cultivadas em maior escala usando meio de cultura Luria Bertani (LB) (cápsulas, MP Biomedicals, USA). Soluções estoques dos antibióticos ampicilina 100 mg/mL (2g em 20 mL de água MilliQ), cloramfenicol 30 mg/mL (600 mg em 20 mL de etanol 100%) e canamicina 70 mg/mL (1.4 mg em 20 mL de água MilliQ) foram preparadas para o uso no cultivo das células. Para a indução das células uma solução estoque de IPTG (Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo, Sigma-Aldrich) 1M foi preparada. Para a purificação da protease TEV foi preparado uma solução estoque de glicose 20% (25g em 125 mL de água MilliQ). Todas as soluções foram filtradas com filtros de porosidade 5  $\mu$ m (Whatman) antes de serem adicionadas às soluções. Os frascos contendo as culturas de células foram incubadas em incubadoras Multitron Standard (Infors HT). O crescimento das bactérias foi monitorado através de medidas de dispersão ótica ao longo do tempo usando um espectrofotômetro OD600 (Mettler Toledo).

### 2.3.3. Isolamento das Células e Sonicação

As células foram separadas do meio de cultura por centrifugação (Avanti JXN-26, Beckman Coulter Life Sciences) à 5000xg por 10 minutos à 4°C. O precipitado de células foi então congelado em nitrogênio líquido e mantido à -80°C até seu uso. Para a purificação, as células foram descongeladas deixando-as em temperatura ambiente, resuspendidas em tampão de lise – tampão fosfato 50 mM, pH 8.0, 200 mM NaCl, 10% glicerol, 25 mM imidazol para a protease TEV e tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8, uréia 8M para a proteína de fusão NT\*<sub>FISp</sub>-A $\beta$ . As suspensões foram sonicadas em banho de gelo usando um sonicador (Q700, Qsonica) por 3 minutos (amplitude: 70, pulso: 15s, pausa: 45s). Após a sonicação, as soluções foram centrifugadas novamente a 15000xg por 30 minutos para separar o sobrenadante do precipitado das células. Os sobrenadantes foram filtrados por filtros de seringa de 0.22  $\mu$ m (Whatman).



### 2.3.4. Purificação

A purificação por cromatografia de afinidade, facilitada pela presença da cauda de histidina em ambas proteínas, foi realizada utilizando colunas de níquel HiPrep excel (Cytiva, GE Healthcare) de capacidade de 5 mL em um sistema de purificação de proteínas ÄKTA Prime (Cytiva, GE Healthcare). Para a proteína de fusão foram utilizadas três colunas de 5 mL conectadas umas às outras para aumentar a eficiência do processo. Para a purificação subsequente por exclusão de tamanho foi utilizada uma coluna Superdex 30 26/600pg (Cytiva, GE Healthcare) em um sistema de purificação de proteínas ÄKTA Pure (Cytiva, GE Healthcare).

### 2.3.5. Determinação da Concentração das Proteínas

A concentração das proteínas foi determinada através da absorvância em 280 nm usando o espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Fisher). Para a protease TEV a sua absorvância molar em 280 nm é de  $\epsilon_{280} = 32290 \text{ L. mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  e para a proteína de fusão NT\*<sub>FISp</sub>-A $\beta$  é de  $\epsilon_{280} = 2980 \text{ L. mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

### 2.3.6. SDS-PAGE

Para SDS-PAGE 10  $\mu\text{L}$  da amostra foram adicionados a 10  $\mu\text{L}$  de tampão de amostra LDS NuPAGE (Invitrogen) e aplicados a gel pré-preparados NuPAGE 4 a 12%, Bis-Tris (Invitrogen). A referência SeeBlue (Invitrogen) foi utilizada como padrão. O tampão NuPAGE MES SDS (Invitrogen) foi utilizado na medida. Uma voltagem de 200 V foi aplicada durante 35 minutos para a separação das amostras. Os géis foram deixados no *Instant Blue Coomassie Protein Stain* durante a noite para corar as amostras. As imagens dos géis foram obtidas usando o sistema de imagens ChemiDoc (Bio-Rad).

### 2.3.7. Transformação, expressão e purificação da protease His<sub>6</sub>-TEV(S219V)-Arg<sub>5</sub>

Células *E. Coli* BL21 (DE3) pLysS foram transformadas com o plasmídeo contendo a sequência genética da proteína de fusão MBP-TEV através de um choque térmico e incubadas à 37°C por uma hora. 100 µL das células transformadas foram espalhadas em placas de ágar contendo o antibiótico ampicilina (70 mg/mL) e cloranfenicol (30 mg/mL) e incubadas à 37°C *overnight*. Após a incubação, uma única colônia bacteriana foi selecionada e usada para inocular a pré-cultura contendo meio de cultura LB (50 mL), ampicilina (70 µg/mL) e cloranfenicol (30 µg/mL). A pré-cultura foi incubada *overnight* à 37°C sob agitação à 180 rpm. No dia seguinte, 4 mL da pré-cultura foram incubados independentemente em seis frascos estéreis contendo meio de cultura LB (400 mL), ampicilina (70 µg/mL) e cloranfenicol (30 µg/mL). Essas culturas foram incubadas à 30 °C à 120 rpm até que o valor da densidade ótica OD<sub>600</sub> ~ 0.5 fosse obtido (aproximadamente 3 horas). A produção da proteína de fusão MBP-TEV foi induzida adicionando IPTG numa concentração final de 1 mM individualmente a cada um dos frascos. Os frascos contendo as células bacterianas foram incubados à 30°C à 120 rpm *overnight*. Após a indução e redução da temperatura de incubação a proteína de fusão MBP-TEV se auto cliva *in vivo* gerando a protease His<sub>6</sub>-TEV(S219V)-Arg<sub>5</sub>. Praticamente toda a protease se mantém solúvel depois de seu processamento intracelular com a redução da temperatura de 37 para 30°C após a adição do IPTG.<sup>117</sup> No dia seguinte as células foram isoladas através da centrifugação do meio de cultura à 5000xg usando uma centrífuga Beckman JLA-81000 por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi descartado e os precipitados de células foram congelados em nitrogênio líquido e mantidas à -80 °C até o dia seguinte. No próximo dia, deu-se o início do processo de purificação da protease, onde todos os processos subsequentes foram realizados no gelo. As células bacterianas isoladas foram descongeladas no gelo e resuspendidas em tampão fosfato

50mM, pH 8, 200 mM de NaCl, 10% glicerol, 25 mM imidazol (40 mL por *pellet*). A solução foi então sonicada 3 vezes (3 x 1 minuto – pulso de 15 segundos, pausa de 45 segundos). Foi adicionado polietilenoimina em uma concentração final 0.1%, o qual se liga ao DNA e RNA em solução, removendo-os por precipitação. As células lisadas foram centrifugadas por 30 minutos à 15000 rpm à 4°C. O supernadante foi isolado e filtrado usando um filtro a vácuo de porosidade 0.22 µm. Como a protease His<sub>6</sub>-TEV(S219V)-Arg<sub>5</sub> conta com uma cauda de histidina, o primeiro passo de purificação foi através da cromatografia de afinidade. O lisado celular filtrado foi então carregado em uma coluna de afinidade metálica de níquel imobilizado (5 mL HisTrap Excel – GE Healthcare) usando um sistema ÄKTA Prime. Uma vez que a proteína foi carregada na coluna, a eluição da mesma foi dada com um tampão com alta concentração de imidazol (50mM, pH 8, 200 mM de NaCl, 10% glicerol, 250 mM imidazol). SDS-PAGE foi realizado para identificar as frações contendo a proteína His<sub>6</sub>-TEV(S219V)-Arg<sub>5</sub> (~28 kDa) e as mesmas foram combinadas e dialisadas *overnight* em tampão fosfato 25 mM, pH 7.5, 100 mM de NaCl, 10% glicerol à 4 °C. A proteína subsequentemente foi carregada em uma coluna de exclusão por tamanho Superdex 30 26/600 pg (GE Healthcare) e eluída em tampão fosfato 25 mM, pH 7.5, 100 mM de NaCl e 10% glicerol. As frações correspondentes à protease foram combinadas, a concentração determinada e as amostras aliqüotadas, congeladas e mantidas à -80°C.

### **2.3.8. Transformação, expressão e purificação dos peptídeos Aβ40 e Aβ42**

Para a cultura das células 4 mL da pré-cultura foram incubados independentemente em seis frascos estéreis contendo meio de cultura LB (400 mL) e canamicina (70 µg/mL). Essas culturas foram incubadas à 30 °C à 120 rpm até que o valor da densidade ótica OD<sub>600</sub> ~ 0.8-0.9 foi obtido (aproximadamente 4 horas). A produção da proteína de fusão NT\*<sub>FISp</sub>-Aβ foi induzida adicionando IPTG numa concentração final de 0.1 mM individualmente a cada um dos frascos. Os frascos contendo as

células bacterianas foram incubados à 20°C à 120 rpm *overnight*. No dia seguinte as células foram isoladas através da centrifugação do meio de cultura à 5000xg usando uma centrífuga Beckman JLA-81000 por 20 minutos à 4°C. O sobrenadante foi descartado e os precipitados de células foram congelados em nitrogênio líquido e mantidas à -80 °C. Todos os processos subsequentes de purificação foram realizados no gelo. As células bacterianas isoladas foram descongeladas no gelo e resuspendidas em tampão Tris-HCl 20mM, pH 8, uréia 8M (40 mL por *pellet*). A solução foi então sonicada 3 vezes (3 x 1 minuto – pulso de 15 segundos, pausa de 45 segundos). As células lisadas foram centrifugadas por 15 minutos à 21000 rpm à 4°C. O supernadante foi isolado e filtrado usando um filtro a vácuo de porosidade 0.22 µm. O lisado celular filtrado foi então carregado em uma coluna de afinidade metálica de níquel imobilizado (3 x 5 mL HisTrap Excel – GE Healthcare) usando um sistema ÄKTA Prime. Durante o carregamento da coluna, o descarte também foi coletado e mantido no gelo (*flow through*) uma vez que parte da proteína de interesse pode não ter ficado retida na coluna. Uma vez que a proteína foi carregada na coluna, a eluição da mesma foi dada com um tampão com alta concentração de imidazol (300 mM imidazol, 20 mM Tris-HCl, 8M uréia, pH 8) o que leva à troca da proteína pelo imidazol na coluna. O mesmo processo foi repetido para o *flow through*. SDS-PAGE foram realizados para identificar as frações contendo a proteína NT\*<sub>FISp</sub>-Aβ (~20 kDa) e as mesmas foram combinadas e dialisadas *overnight* em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8 à 4 °C. Os cromatogramas e suas análises por SDS-PAGE estão apresentados na Figura 2.6. O peptídeo beta amiloide foi clivado da proteína NT\*<sub>FISp</sub> pelo sítio de clivagem específico TEV no final N-terminal da sequência do Aβ. A clivagem foi realizada através da diálise adicionando a protease TEV à solução contendo a proteína de fusão numa proporção 20 NT\*<sub>FISp</sub>-Aβ : 1 TEV em sacos de diálise de porosidade de 3 kDa em 4 litros de tampão Tris-HCl pH 8, 0.5 mM EDTA e 1 mM DTT à 4 °C. SDS-PAGE confirmou a clivagem na proteína NT\*<sub>FISp</sub>-

A $\beta$ . Após a diálise, as soluções foram centrifugadas e o sobrenadante foi liofilizado. O produto da clivagem liofilizado foi solubilizado em guanidina-HCl 6M e a proteína foi carregada em uma coluna de exclusão por tamanho Superdex 30 26/600 pg (GE Healthcare) e eluída em tampão fosfato 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2 mM EDTA, pH 8.5. As frações correspondentes ao peptídeo A $\beta$  foram combinadas e liofilizadas.

### **2.3.9. Espectrometria de Massas**

A espectrometria de mobilidade iônica foi realizada no espectrômetro de massas Waters Vion IMS-QToF, onde 1  $\mu$ L da amostra da proteína purificada foi injetada no equipamento com um tempo de retenção máximo de 7 minutos. O sistema foi lavado com 3  $\mu$ L de água entre as amostras para minimizar a contaminação entre amostras. Os espectros de massas foram reconstruídos usando o algoritmo MaxEnt no software MassLynx de acordo com o manual.

### **2.3.10. Preparo do A $\beta$ monomérico**

O peptídeo A $\beta$  liofilizado foi dissolvido em guanidina-HCl 6M e incubado por 3 horas a fim de dissolver quaisquer agregados pré-formados. O peptídeo foi purificado por cromatografia de exclusão de tamanho utilizando uma coluna preparativa (Cytiva Superdex 200 Increase 10/300 GL) e eluído em tampão NaPi (fosfato de sódio 20 mM, EDTA 0,2 mM, pH 6.9 para o A $\beta$ 40 e fosfato de sódio 20 mM, EDTA 0,2 mM, pH 8 para o A $\beta$ 42) preparado no dia do experimento. A concentração de proteína foi calculada usando o detector de UV do Sistema ÄKTA utilizado na purificação usando a média integrada do pico da proteína eluída (concentração = média da área do pico/0,2\*1490).

### 2.3.11. Cinética de Agregação do Peptídeo A $\beta$

Soluções de diferentes concentrações do A $\beta$  monomérico (2-8  $\mu$ M para o A $\beta$ 40 e 1-5  $\mu$ M para o A $\beta$ 42) e foram preparadas diluindo o peptídeo proveniente da cromatografia de exclusão de tamanho em tampão NaPi, adicionando Tioflavina T (ThT) em uma concentração final de 20  $\mu$ M. Todas as amostras foram homogeneizadas 8 vezes com a pipeta. As amostras foram aliqüotadas em uma placa de 96 poços de meia-área, *low binding* de fundo transparente (Corning 3881) em um volume final de 90  $\mu$ L e coberta com uma tampa adesiva de alumínio. A placa foi então incubada sem agitação no leitor de placas (FLUROstar Optima, BGM) a 37°C por 12 horas. Todos os experimentos foram realizados como réplicas biológicas e os dados são apresentados como média  $\pm$  DP. GraphPad Prism 9 (GraphPad Software) foi aplicado para todas as análises estatísticas dos dados. A análise dos tempos de meia vida e expoente escalar foram realizados através da plataforma AmyloFit.

### 2.3.12. Análise cinética dos dados pelo AmyloFit

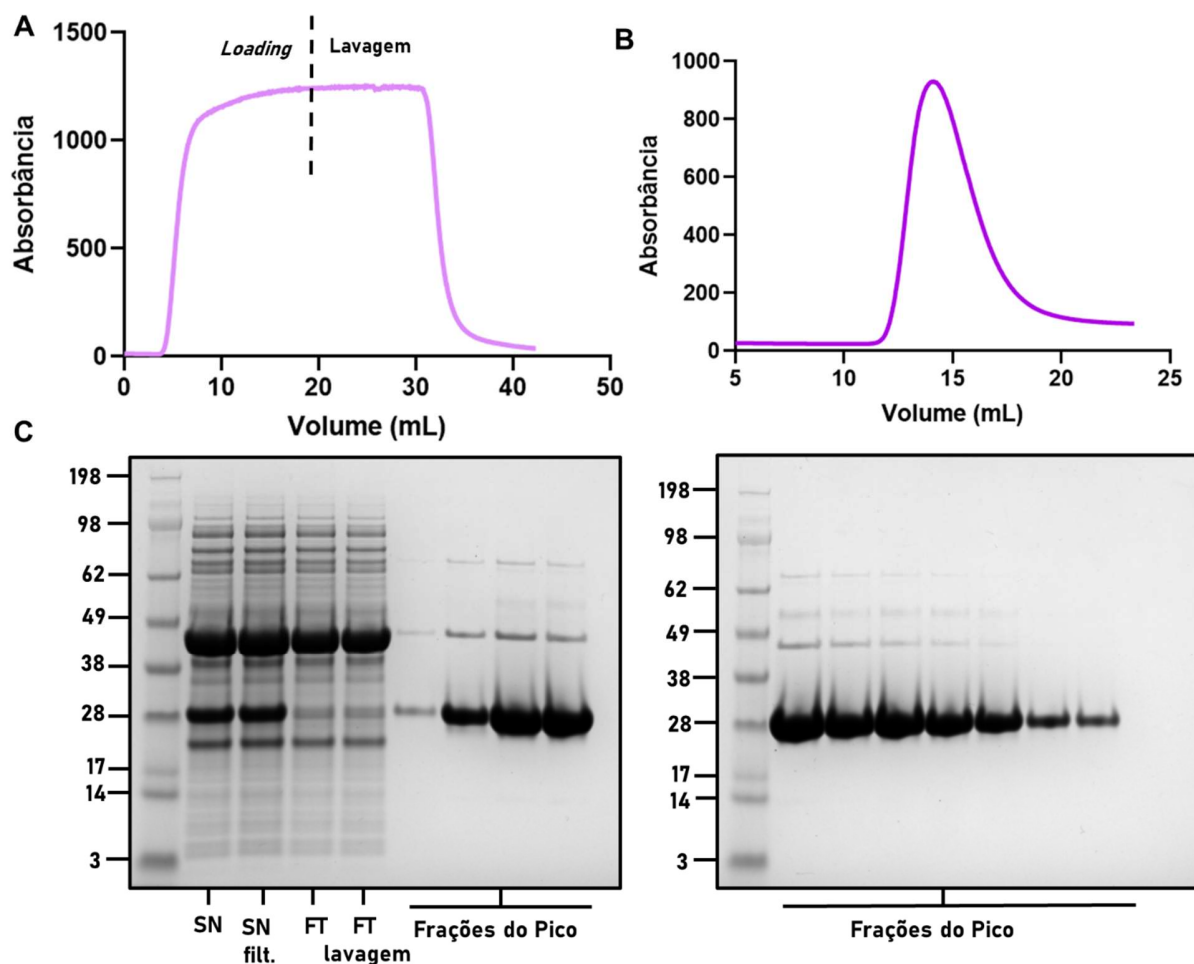
A agregação do A $\beta$  foi monitorada como descrito acima. O *upload* dos valores experimentais da fluorescência da ThT foi realizado na plataforma *online* gratuita AmyloFit (<https://www.amylofit.ch.cam.ac.uk>). Logo após, os dados foram normalizados de 0 a 1 tirando a média dos valores na linha de base e do *plateau* da reação. Após a normalização, a concentração dos agregados pode ser observada em função do tempo. Um avançado algoritmo *basin-hopping* foi aplicado para ajustar os dados experimentais a um modelo *s* de agregação de proteínas. O número de *basin hops* foi definido como 10 para cada um dos *fits*. O modelo aplicado só foi considerado apropriado se ele se encaixou adequadamente com os dados experimentais. O manual do usuário do AmyloFit pode ser consultado para informações mais aprofundadas do processo de *fitting* dos dados.

## 2.4. Resultados e Discussão

### 2.4.1. Expressão e Purificação da Protease TEV

A protease TEV foi produzida para poder ser utilizada na purificação do peptídeo beta amiloide. A protease TEV é pouco solúvel quando produzida em grandes quantidades em *Escherichia coli*.<sup>119</sup> No entanto, esse problema pode ser contornado produzindo essa enzima na forma de uma proteína de fusão com a proteína MBP (*maltose binding protein*), a qual se cliva *in vivo* gerando um domínio catalítico de protease de TEV solúvel com uma cauda de polihistidina N-terminal, altamente solúvel e ativa. A fusão com o MBP permite que a enzima se enovele na sua conformação nativa e evite o seu acúmulo como agregados insolúveis.<sup>119</sup> Outro problema com a protease TEV é que a mesma sofre autoclivagem em um sítio específico, gerando uma enzima truncada de menor atividade<sup>120</sup>, mas isso foi evitado introduzindo uma mutação (S219V) que torna a enzima praticamente imune à autoinativação e também aumenta sua atividade catalítica em aproximadamente duas vezes.<sup>120</sup>

Após a obtenção do sobrenadante proveniente da expressão proteica em *E.coli*, a protease TEV foi separada dos outros componentes da solução através de cromatografia de afinidade, fazendo o uso de colunas de níquel. A Figura 2.2. mostra os cromatogramas obtidos correspondentes à eluição da protease His<sub>6</sub>-TEV(S219V)-Arg<sub>5</sub> e sua posterior identificação através de SDS-Page.

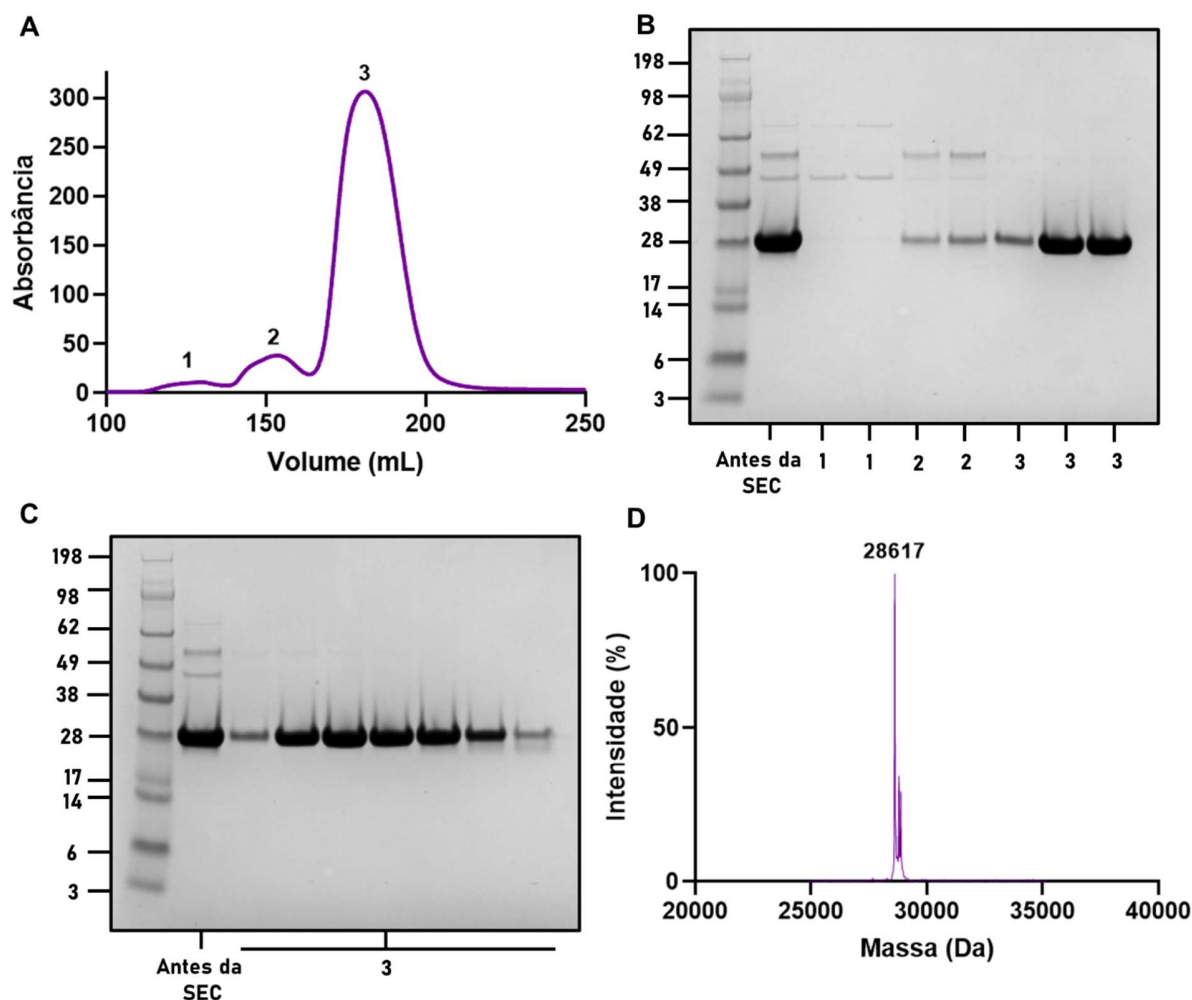


**Figura 2.2.** Isolamento da proteína His<sub>6</sub>-TEV(S219V)-Arg<sub>5</sub> através de cromatografia de afinidade. (A) Lisado celular é carregado na coluna de níquel, onde a cauda de histidina se liga ao níquel da coluna, fazendo com que a proteína de interesse fique retida. A coluna foi então lavada, eluindo todos os subprodutos não imobilizados na coluna. (B) Protease His<sub>6</sub>-TEV(S219V)-Arg<sub>5</sub> é eluída utilizando um tampão com alta concentração de imidazol. (C) SDS-PAGE dos picos da obtidas protease His<sub>6</sub>-TEV(S219V)-Arg<sub>5</sub> (~28 kDa) e MBP (~43 kDa) na eluição do lisado celular (SN = sobrenadante, SN filt. = sobrenadante filtrado, FT = *flow through*).

A segunda etapa de purificação envolve a separação da protease His<sub>6</sub>-TEV(S219V)-Arg<sub>5</sub> da proteína MBP que se encontra em solução. Como seus pesos



moleculares são bastante distintos, foi utilizado a cromatografia de exclusão de tamanho para separar esses dois componentes. Três picos distintos eluíram, sendo o terceiro pico correspondente à protease TEV, Figura 2.3.



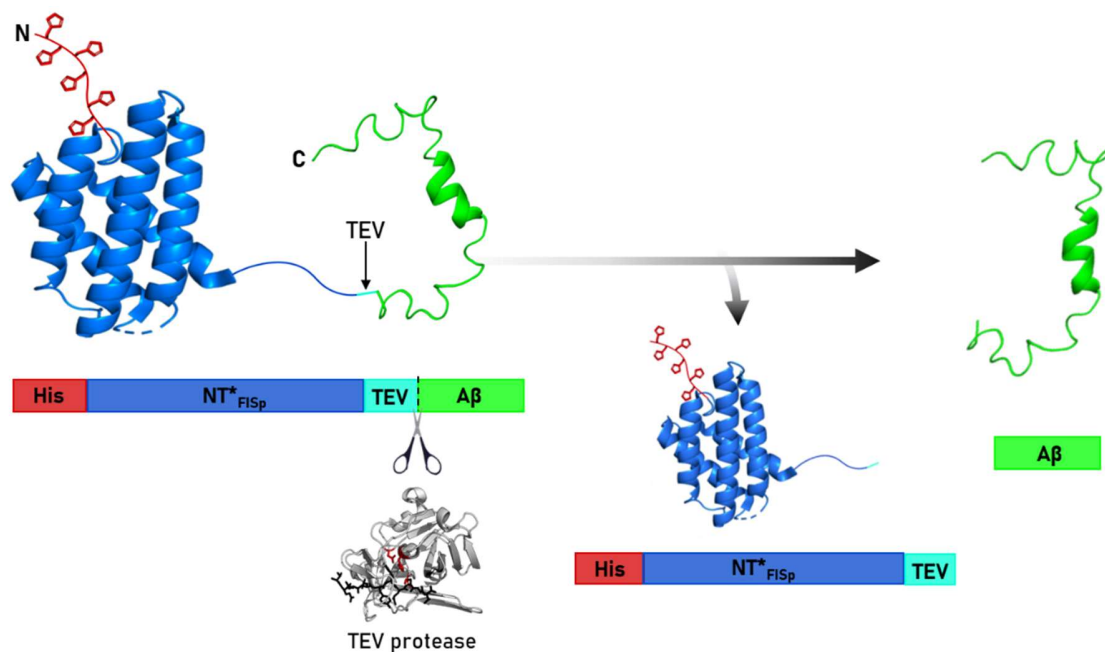
**Figura 2.3. Obtenção da protease TEV.** (A) Cromatograma de exclusão de tamanho, onde foram separados os três componentes da solução (B) SDS-PAGE antes e após a cromatografia por exclusão de tamanho. (C) SDS-PAGE da pico referente à protease His<sub>6</sub>-TEV(S219V)-Arg<sub>5</sub>. (D) Espectrometria de massas da protease His<sub>6</sub>-TEV(S219V)-Arg<sub>5</sub> obtida.

A separação das proteínas em solução foi confirmada por SDS-PAGE e a massa da protease de 28617 kDa foi confirmada por espectrometria de massas. Picos referentes à  $\alpha$ -N-gluconoilação e  $\alpha$ -N-fosfogluconoilação da cauda de histidina N-terminal em 28795 [M+178] e 28875 [M+258] também foram observados, sendo que ambas modificações pós-traducionais são comumente observadas em proteínas heterólogas expressas em *E. Coli*.<sup>121</sup> No entanto, como o sítio de reconhecimento da protease não é afetado por essas modificações, a eficiência da mesma não é comprometida.

#### 2.4.2. Expressão e Purificação dos Peptídeos A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42

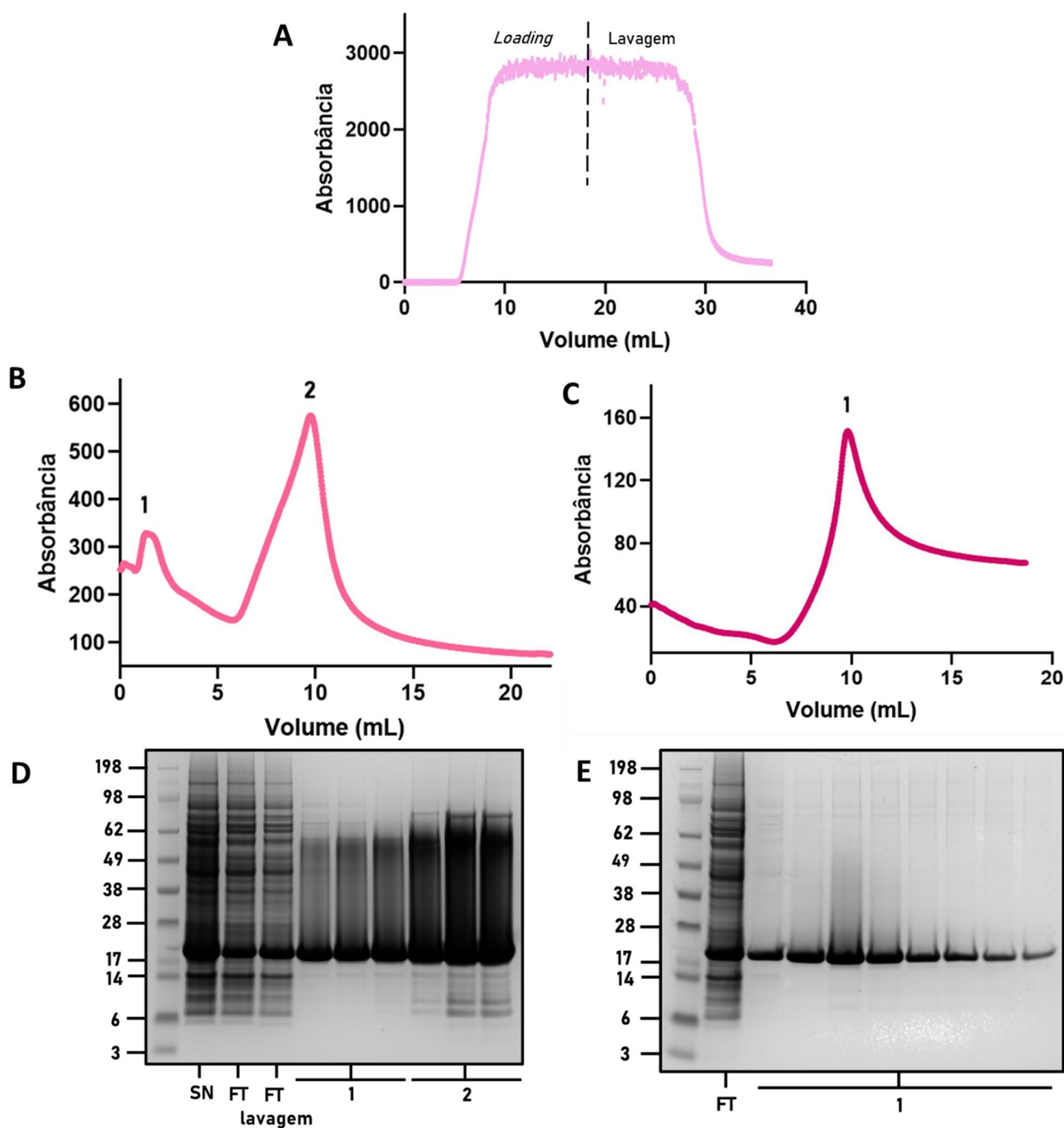
Os peptídeos beta amiloide, assim como a protease TEV, foram expressos na forma de uma proteína de fusão. Abelein e colaboradores propuseram o uso de uma cauda de histidina, juntamente com um domínio N-terminal proveniente da seda produzida por aranhas (NT\*<sub>FISp</sub>), o qual protege o peptídeo beta amilóide até a fase final de purificação, além de manter o peptídeo em solução em altas concentrações sem que o mesmo inicie seu processo de agregação.<sup>118</sup> Entre o domínio NT\*<sub>FISp</sub> e o A $\beta$  foi inserido um sítio de clivagem TEV para auxiliar na clivagem do A $\beta$  na fase final da purificação, Figura 2.4.

Células de *E. coli* BL21(DE3) foram transformadas com os plasmídeos contendo a sequência genética do A $\beta$ 40 (DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV) e A $\beta$ 42 (DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA). A única diferença no processo de transformação quando comparado à protease TEV foi o uso somente de canamicina como antibiótico ao qual o plasmídeo é resistente.



**Figura 2.4. Proteína de fusão NT\*<sub>FISp</sub>-Aβ e subsequente obtenção do Aβ.** O peptídeo beta amiloide é expresso a partir de uma proteína de fusão maior, melhorando a solubilidade e, ao mesmo tempo, diminuindo a propensão se agregação do peptídeo.

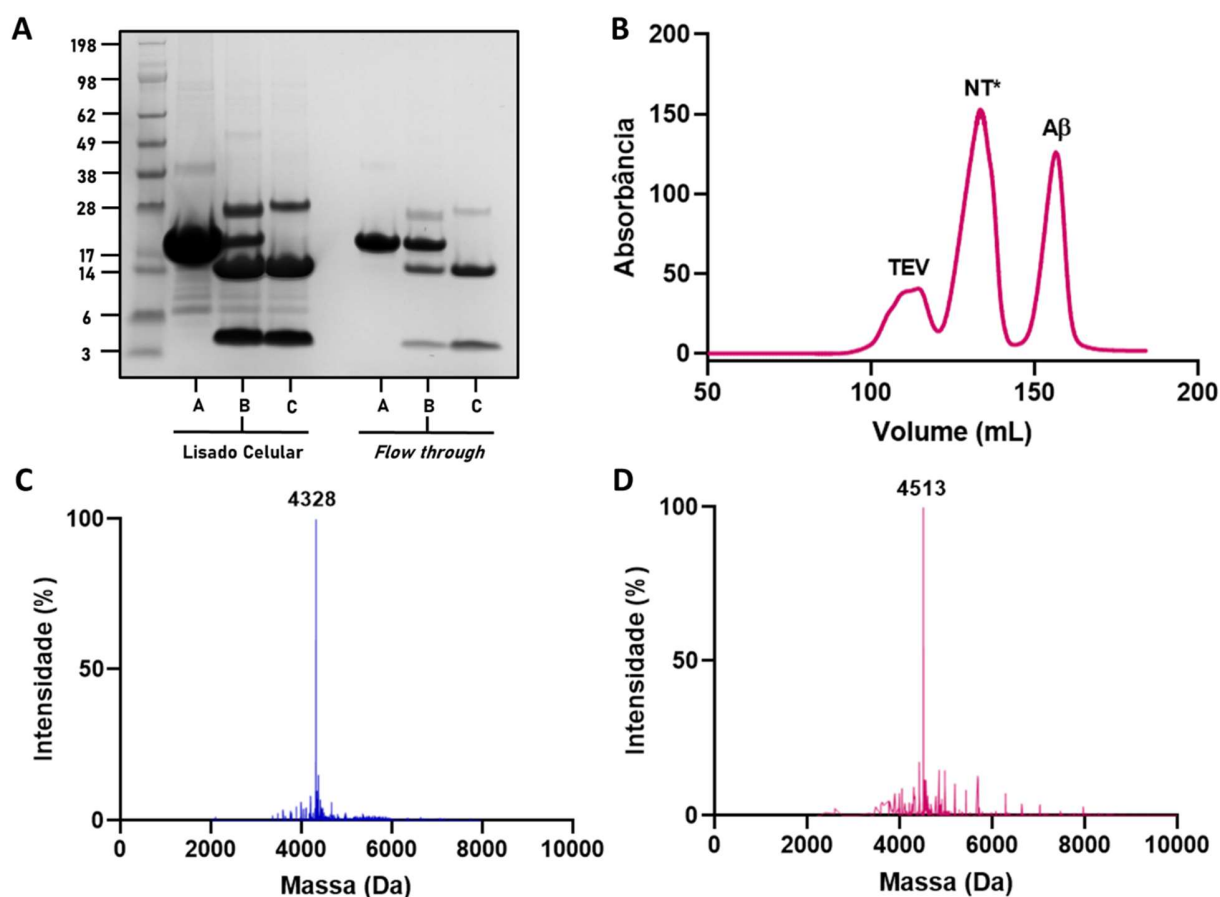
Assim como na purificação da protease TEV, após a obtenção do sobrenadante proveniente da expressão proteica em *E.coli*, a proteína de fusão NT\*<sub>FISp</sub>-Aβ foi separada dos outros componentes da solução através de cromatografia de afinidade, fazendo o uso de colunas de níquel. A Figura 2.5. mostra os cromatogramas obtidos correspondentes à eluição da protease NT\*<sub>FISp</sub>-Aβ e sua posterior identificação através de SDS-Page.



**Figura 2.5. Isolamento da proteína NT\*<sub>FISP</sub>-Aβ através de cromatografia de afinidade.** (A) Lisado celular é carregado na coluna de níquel, onde a cauda de histidina se liga ao níquel da coluna, fazendo com que a proteína de interesse fique retida. A coluna foi então lavada, eluindo todos os subprodutos não imobilizados na coluna. (B) Proteína NT\*<sub>FISP</sub>-Aβ é eluída utilizando um tampão com alta concentração de imidazol. (C) Eluição da proteína NT\*<sub>FISP</sub>-Aβ presente no *flow*

*through*. (D) SDS-PAGE dos picos obtidos na eluição do lisado celular. (E) SDS-PAGE dos picos obtidos na eluição do *flow through*.

A segunda etapa da purificação envolve isolar o A $\beta$  que foi clivado da proteína de fusão e da protease TEV. A separação dos três componentes da solução pode ser observada na Figura 2.6B.



**Figura 2.6. Clivagem da proteína NT\*<sub>FISP</sub>-A $\beta$  e obtenção do A $\beta$ .** (A) SDS-PAGE antes – A - e após – B e C - da clivagem pela protease TEV. (B) Cromatograma de exclusão de tamanho, onde foram separados os três componentes da solução. (C) Espectrometria de massas do A $\beta$ 40 obtido. (D) Espectrometria de massas do A $\beta$ 42 obtido.

Espectroscopia de massas foi utilizada para confirmar a massa molecular dos peptídeos obtidos, Figura 2.7C e D.

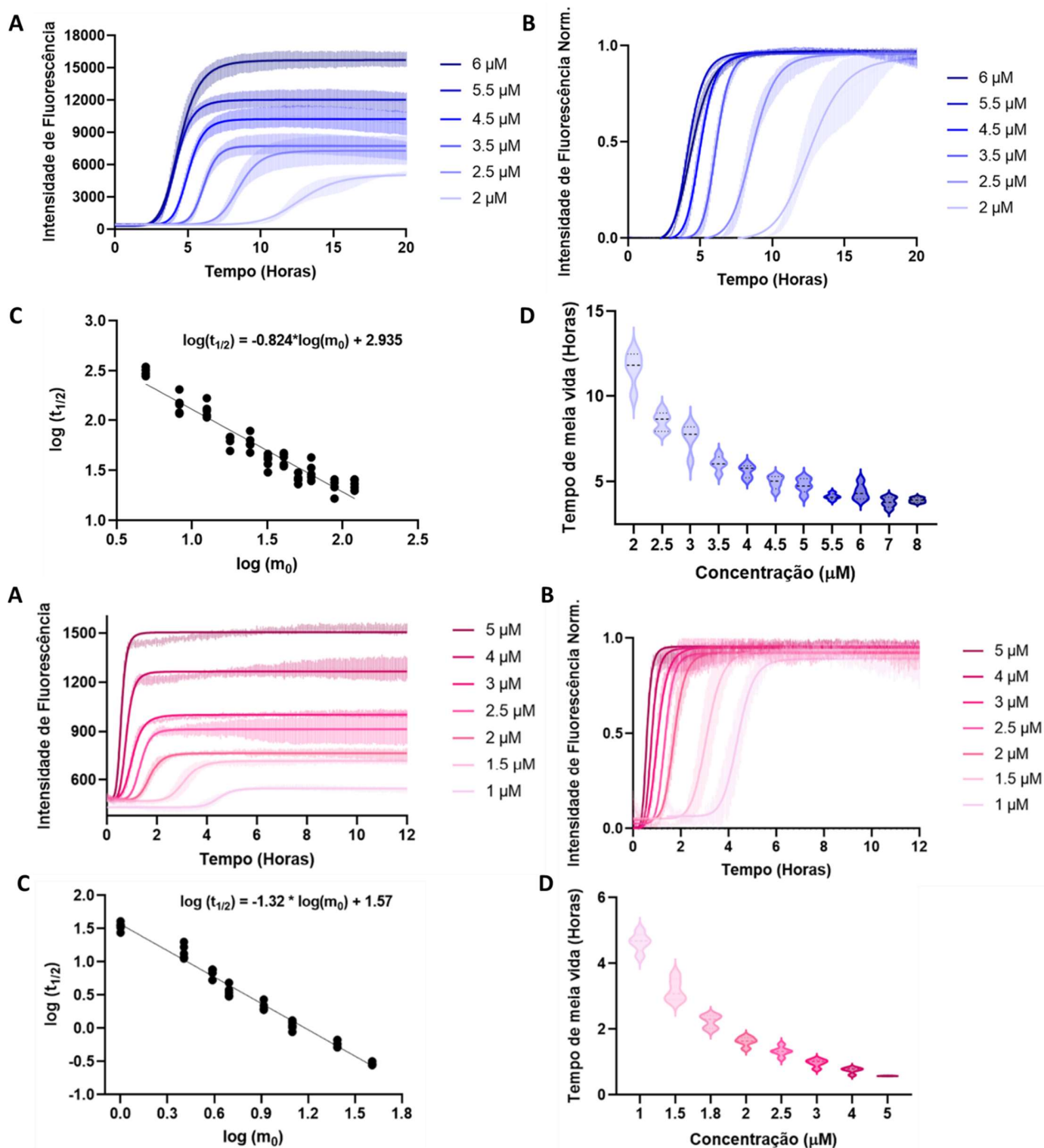
### **2.4.3. Validação cinética dos peptídeos beta amiloide recombinantes obtidos**

Antes que os peptídeos obtidos possam ser utilizados para avaliar a influência de moléculas em seu processo de agregação, a qualidade do A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42 purificados deve ser cineticamente validada conduzindo uma série de ensaios de agregação para confirmar se o comportamento da proteína é tal qual o que se é esperado. Além disso, foi realizada uma análise cinética do processo microscópico dominante por detrás da agregação do peptídeo A $\beta$ .

O processo de agregação do A $\beta$  é regido por processos de nucleação secundária envolvendo a presença de agregados maiores, tais como fibrilas.<sup>122,123</sup> Assim, para avaliar a sua agregação é necessário se assegurar que o peptídeo esteja em sua forma monomérica. A cinética do A $\beta$  foi acompanhada através da técnica de fluorescência do estado estacionário usando o corante Tioflavina T (ThT) como sonda luminescente. A ThT é um marcador fluorescente amplamente utilizado a qual possui emissão em 480 nm quando estabilizado pela presença de estruturas ricas em folhas  $\beta$ , como é o caso das fibrilas amilóides.<sup>124,125</sup> O peptídeo na sua forma monomérica foi obtido a partir do peptídeo liofilizado após passar por uma coluna analítica. O processo de obtenção do peptídeo monomérico, bem como a preparação das amostras para avaliação cinética estão descritos na sessão de metodologia deste capítulo.

Inicialmente, os dados experimentais obtidos dos ensaios cinéticos para o A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42 mostraram uma dependência da concentração, onde foi observado um aumento na intensidade de fluorescência da ThT com o aumento da concentração

bem como uma diminuição no tempo necessário para que a fluorescência da ThT estabilizasse no seu máximo, Figura 2.7A. Além disso, a relação inversa entre a concentração do A $\beta$  e o tempo necessário para a obtenção do máximo da fluorescência da ThT é mais pronunciado para o A $\beta$ 42, Figura 2.7B. Esses resultados são consistentes com resultados da literatura que reportam que o A $\beta$ 42 possui uma maior propensão à agregação, bem como uma velocidade de reação microscópica maior do que o A $\beta$ 40.<sup>122,123</sup> Para mostrar esse comportamento mais claramente, as curvas cinéticas do A $\beta$  em diferentes concentrações foram avaliadas em relação ao tempo de meia-vida da reação, isto é, o tempo no qual metade da proteína que inicialmente se apresentava na forma monomérica se encontra agregada. Experimentalmente, o tempo de meia vida é determinado pelo tempo necessário para que a emissão da ThT atinja a metade do seu valor de *plateau*. A dependência do tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) na concentração monomérica inicial ( $m_0$ ) é representada por  $t_{1/2} \sim m_0^\gamma$ , onde  $\gamma$  é o expoente escalar.<sup>126</sup> Usando leis de velocidade para o aumento da massa de agregados com o tempo,  $\gamma$  pode ser comparado à ordem de reação para cada um dos modelos de agregação. Na prática, é útil plotar o tempo de meia-vida versus a concentração monomérica em um gráfico logarítmico, uma vez que  $\log(t_{1/2}) = \gamma \log(m_0) + \text{constante}$ , Figura 2.7C. A inclinação da reta obtida portanto fornece o expoente escalar e quaisquer desvios da linearidade indicam que  $\gamma$  é dependente na concentração monomérica.



**Figura 2.7. Cinética de agregação do Aβ40 e Aβ42.** (A) Cinética de agregação do Aβ40 (azul) e Aβ42 (rosa) em diferentes concentrações. (B) Velocidades de



agregação normalizada. (C) Log dos tempos de meia-vida versus log das concentrações, onde foi obtido um expoente escalar de  $\gamma = -0.8$  e  $\gamma = -1.3$  para o A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42, respectivamente. (D) Relação direta entre os tempos de meia-vida e concentrações.

**TABELA 2.1. Tempos de meia-vida da cinética de agregação dos peptídeos A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42**

A $\beta$ 40			A $\beta$ 42		
Concentração ( $\mu$ M)	$t_{1/2}$	Desvio padrão	Concentração ( $\mu$ M)	$t_{1/2}$	Desvio padrão
2	13.21	0.95	1	4.04	0.77
2.5	9.08	0.63	1.5	2.26	0.81
3	8.37	0.23	1.8	1.76	0.17
3.5	6.37	0.44	2	1.39	0.32
4	6.23	0.47	2.5	1.10	0.55
4.5	5.39	0.47	3	0.85	0.17
5	5.30	0.27	4	0.62	0.15
5.5	4.50	0.37	5	0.47	0.10
6	4.70	0.31			
7	4.00	0.24			
8	4.08	0.27			

A análise cinética do A $\beta$ 40 em 20 mM fosfato de sódio, 0.2 mM EDTA, pH 6.9 e A $\beta$ 42 em 20 mM fosfato de sódio, 0.2 mM EDTA, pH 8.0 mostraram coeficiente escalar de  $\sim -0.8$  e  $\sim -1.3$  para A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42 respectivamente. Ambos os valores estão em concordância com resultados previamente reportados na literatura.<sup>37,42</sup> Experimentalmente mais uma vez é observada uma relação inversa entre a concentração monomérica inicial e o tempo de meia-vida, com o A $\beta$ 42 apresentando uma relação inversa mais pronunciada do que o A $\beta$ 40, Tabela 2.1

Uma vez obtidos os dados cinéticos experimentais, os mesmos foram analisados através da plataforma *online* gratuita Amylofit para uma análise mais aprofundada da cinética de agregação e subsequentemente determinação dos mecanismos moleculares dominantes da reação. Cada curva sigmoideal experimental obtida foi inserida na plataforma Amylofit e as réplicas independentes de cada concentração foram combinadas e normalizadas.

Além de determinar os expoentes escalares para os peptídeos, a plataforma Amylofit foi utilizada para elucidar os mecanismos moleculares dominantes que regem a agregação do A $\beta$  através de uma função de *fitting* global. Um mecanismo molecular de agregação definido foi selecionado no Amylofit, o qual aplica as complexas equações integradas de velocidade do modelo selecionado aos resultados experimentais obtidos nos ensaios cinéticos.

Três processos foram considerados para a agregação de ambas isoformas do beta amilóide: fragmentação, nucleação primária e nucleação secundária, Figura 2.8. Na nucleação secundária a velocidade de formação de fibrilas é dependente da concentração inicial monomérica bem como da concentração de superfícies pré-existentes que atuam como superfície catalítica para espécies monoméricas. Além disso, a cinética de nucleação secundária pode ser conceitualizada aplicando a cinética de Michaelis-Menten para atividade enzimática de suas etapas. As unidades

monoméricas do A $\beta$  são descritas como moléculas substrato enquanto o produto são núcleos formados a partir da agregação do monômero. Fibrilas pré-existentes podem ser conceitualizadas como a enzima cujo papel é de catalisar a formação de novos agregados através da adsorção de superfície do A $\beta$  monomérico. O parâmetro  $K_m$  indica o ponto de saturação da nucleação secundária catalisada por superfície.<sup>127</sup> Em concentrações monoméricas baixas (abaixo do valor de  $K_m$ ), a velocidade da reação de nucleação secundária é limitada pela concentração de A $\beta$  monomérico a qual pode se adsorver à superfície de uma fibrila existente. Em concentrações monoméricas altas (acima do valor de  $K_m$ ), a habilidade do A $\beta$  monomérico de se adsorver à superfície de fibrilas pré-existentes se torna a etapa determinante da reação, devido ao fato de que os sítios de adsorção nas fibrilas se tornam saturados com o aumento da concentração monomérica. A partir da análise global, ambas isoformas apresentam agregação dominada pelo modelo de nucleação secundária multi-etapas, para qual o *fitting* apresentou menor erro médio residual. O resultado obtido é consistente com a literatura.<sup>122,123</sup>

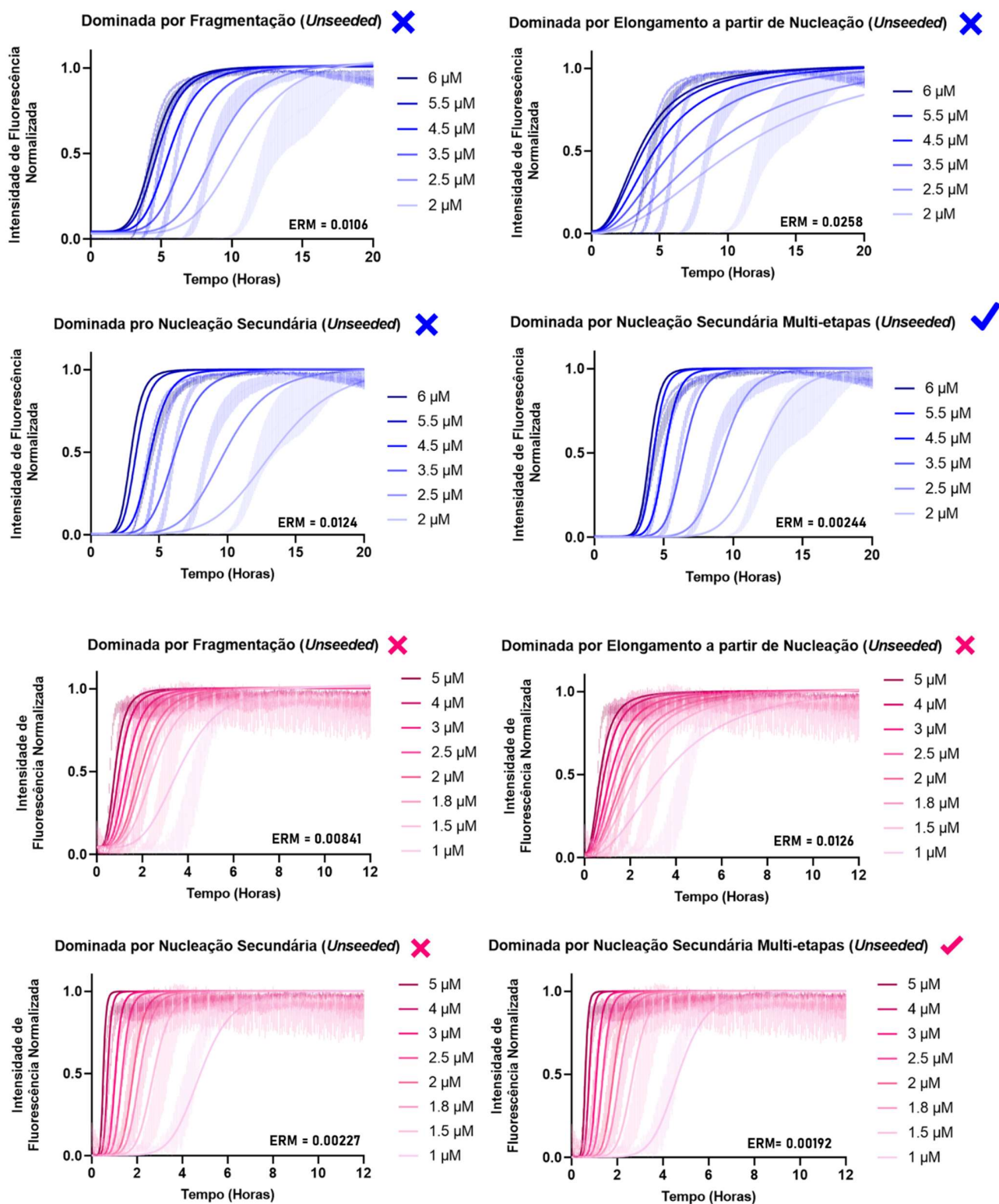


Figura 2.8. Determinação do mecanismo de agregação usando Amylofit. A previsão do mecanismo de agregação de A $\beta$  usando Amylofit mostra o melhor ajuste

(ERM = erro residual médio) para o mecanismo dominado por nucleação secundária multi-etapas para A $\beta$ 40 (azul) e A $\beta$ 42 (rosa).

## 2.5. Conclusões Parciais

Nesse capítulo foram apresentados os resultados da expressão e purificação da protease TEV e dos peptídeos A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42. Todas as proteínas foram expressas inicialmente como proteínas de fusão a fim de aumentar a solubilidade das proteínas de interesse. O processo de purificação para ambas as proteínas foi o mesmo, fazendo o uso da cauda de histidina presente em ambas para separá-las das demais proteínas provenientes do processo de expressão em *E. coli* através de cromatografia de afinidade. Em seguida, as proteínas de interesse foram isoladas usando cromatografia por exclusão de tamanho.

A protease TEV produzida foi utilizada no processo de purificação dos peptídeos beta amilóide, clivando a proteína de fusão para a obtenção dos peptídeos. A clivagem pela TEV recombinante produzida se mostrou eficiente, não sendo observada proteína de fusão NT\*<sub>FISp</sub>-A $\beta$  intacta ao final do processo de diálise. Após a cromatografia de exclusão de tamanho, os peptídeos beta amilóide foram obtidos em alto grau de pureza. A proteína de fusão proposta por Abelein e colaboradores se mostrou extremamente efetiva na produção de peptídeos beta amiloide, onde através de um processo de purificação relativamente simples, os peptídeos nativos foram obtidos com alto rendimento e pureza.

Os peptídeos produzidos mostraram comportamento cinético esperado, apresentando padrões de agregação como já descritos na literatura. Os peptídeos apresentaram dependência da concentração na agregação e, através de uma análise teórica das curvas cinéticas de agregação, apresentaram mecanismo molecular de

agregação correspondente à nucleação secundária, o qual, segundo a literatura é o mecanismo que domina o processo de agregação do peptídeo beta amiloide.

Assim, os peptídeos beta amiloide obtidos de forma recombinante estão aptos para serem utilizados em ensaios cinéticos a fim de testar inibidores de agregação.

# 3

## **Síntese e Caracterização de Complexos Polipiridínicos de Ru (II)**

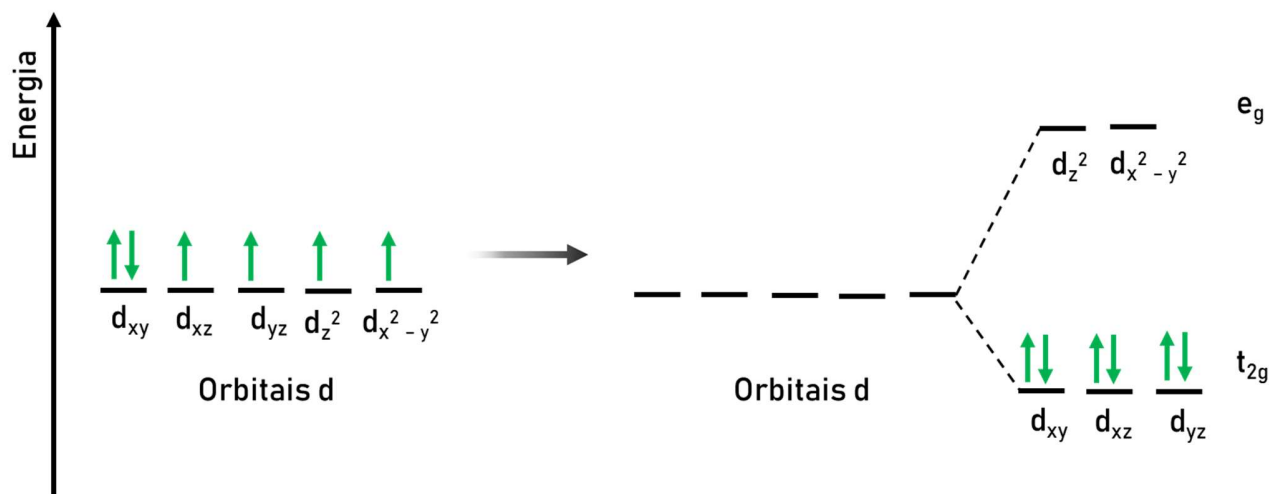
*“Chemists are dreamers. We think up new molecules and bring them to life”.*

*-Carolyn Bertozzi*

### 3.1. Introdução

Complexos polipiridínicos de rutênio (II) são um dos sistemas mais desenvolvidos e estudados extensivamente dentro dos complexos de metais de transição luminescentes. Notavelmente, há um grande interesse nas aplicações biológicas desses complexos devido a suas singulares propriedades fotofísicas e fotoquímicas.

O íon Ru (II) quando em complexos polipiridínicos apresenta uma configuração eletrônica  $d^6$  baixo spin, formando complexos bastante estáveis uma vez que os orbitais  $e_g$  estão vazios. Em um complexo, o íon Ru (II) atua como uma ácido de Lewis, contando com orbitais d vazios. Isso faz com que o íon metálico apresente afinidade por ligantes ricos em elétrons, tais como os ligantes polipiridínicos, os quais atuam como base de Lewis. O íon Ru (II) pode realizar seis ligações químicas, formando complexos com geometria octaédrica.



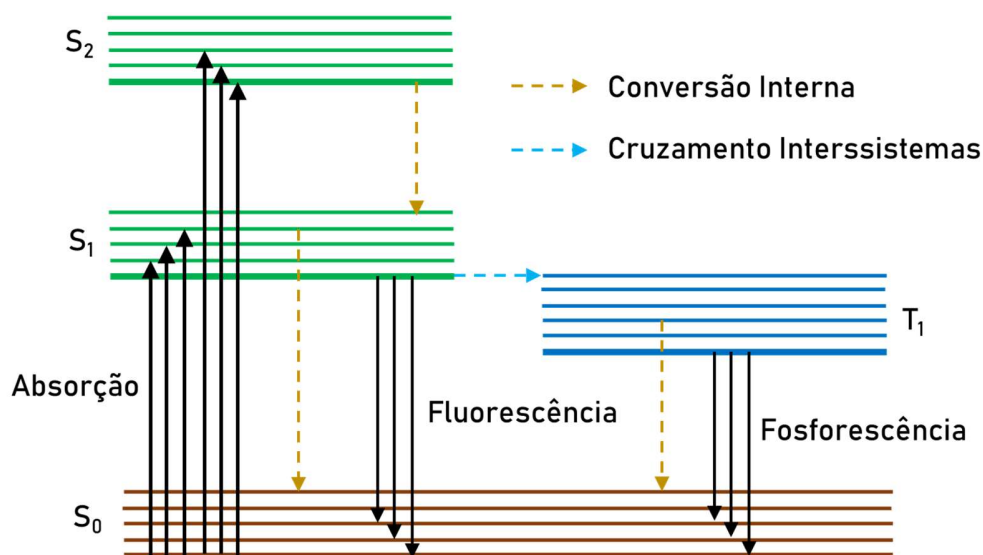
**FIGURA 3.1. Configuração eletrônica de complexos de Ru(II).** O íon  $Ru^{2+}$  apresenta seis elétrons em seus orbitais d, os quais são degenerados. Com a aproximação dos ligantes, os orbitais apresentam energias distintas e os elétrons ocupam os orbitais de menor energia.



Complexos polipiridínicos de rutênio apresentam propriedades fotofísicas e fotoquímicas devido à transição eletrônica MLCT dos orbitais  $d\pi$  do rutênio para os orbitais  $\pi^*$  dos ligantes polipiridínicos. É justamente essa transição a qual é responsável por grande parte da emissão desses complexos.

Moléculas emitem luz como uma forma de perda energética para retornar ao estado fundamental após serem excitadas a estados energéticos de maior energia. O estado fundamental da maioria das moléculas é o estado singlete  $S_0$  uma vez que os elétrons que ocupam este estado possuem spins opostos, possuindo assim multiplicidade 1. Ao absorver um fóton, o elétron no estado fundamental é promovido para um nível mais energético, seja ele  $S_1$ , ou qualquer outro estado singlete de maior energia, sendo que cada nível energético possui vários níveis vibracionais e rotacionais. Caso o elétron excitado se encontre em um nível vibracional maior do que o zero para aquele nível no qual se encontra, o mesmo sofrerá relaxação vibracional para que o elétron excitado se encontre no nível zero. Caso o elétron excitado esteja em um nível energético maior do que o  $S_1$ , o mesmo poderá sofrer conversão interna para popular o nível  $S_1$ , podendo haver ou não relaxação vibracional dentro dos níveis energéticos vibracionais de  $S_1$ .<sup>128</sup> Quando em  $S_1$ , o elétron excitado pode retornar ao estado fundamental através da emissão de um fóton pela transição  $S_1 \rightarrow S_0$ , em um processo denominado fluorescência. O elétron pode também sofrer cruzamento intersistemas para um estado tripleto de energias equivalentes. Uma vez no estado tripleto, o elétron possui duas possibilidades: absorver mais um fóton e realizar transições do tipo tripleto-tripletto para níveis mais energéticos ou retornar ao estado fundamental liberando um fóton através da transição  $T_1 \rightarrow S_0$ , denominada fosforescência, Figura 3.2.<sup>128</sup> Complexos de metais de transição luminescentes, como os de rutênio, normalmente apresentam emissão proveniente do tripleto uma vez que o cruzamento intersistemas é favorecido pelo acoplamento spin-órbita. Emissões provenientes do estado tripleto apresentam tempo

de vida de emissão longos, devido à inversão de spin necessária para que a transição do  $T_1$  para  $S_0$  ocorra.



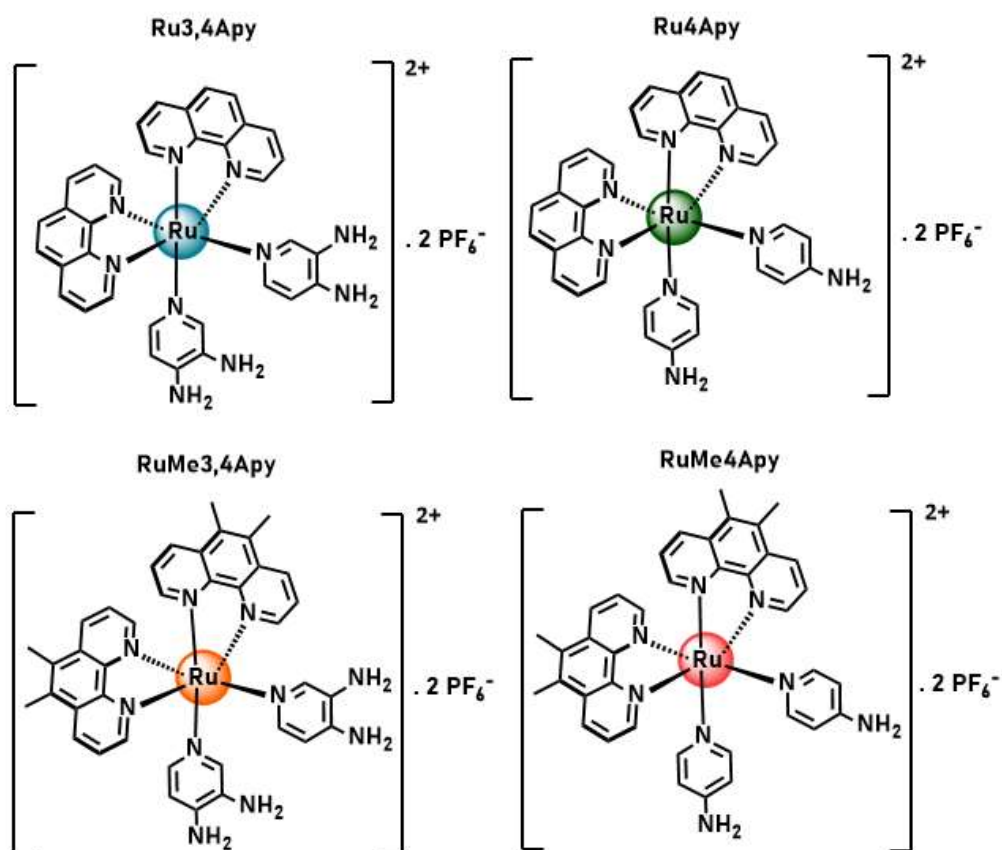
**FIGURA 3.2. Diagrama de Jablonski.** Diagrama de Jablonski mostrando os vários processos envolvidos na fluorescência e fosforescência.  $S_0$  denota o estado fundamental singleto e  $S_1$  e  $S_2$  são os estados excitados singleto. T representa os estados tripleto. Conversão interna e cruzamento intersistemas são processos não radiativos, indicados por flechas pontilhadas. Figura adaptada com permissão.<sup>129</sup>

Portanto, complexos polipiridínicos de Ru(II) são complexos estáveis devido à sua configuração eletrônica e que podem apresentar propriedades fotofísicas e fotoquímicas interessantes para possíveis aplicações biológicas, dependendo dos ligantes coordenados ao centro metálico.

O complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(3,4Apy)<sub>2</sub>].2PF<sub>6</sub> (Ru3,4Apy) previamente desenvolvido pelo grupo apresentou resultados promissores como potencial fármaco no tratamento da doença de Alzheimer.<sup>130,131</sup> O complexo se mostrou capaz de atuar na inibição da enzima acetilcolinesterase e também capaz de atuar como um marcador luminescente de agregados do peptídeo beta amilóide.<sup>130</sup> Mais

recentemente, o mesmo complexo apresentou influência na agregação do A $\beta$ 40 bem como propriedades neuro protetivas frente à toxicidade de espécies oligoméricas do A $\beta$ 40.<sup>131</sup> Assim, uma série de complexos polipiridínicos de Ru (II) luminescentes, baseada no complexo Ru3,4Apy, foi desenvolvida para interagir com o peptídeo beta amiloide e influenciar sua agregação, Figura 3.3. Moléculas de fenantrolina foram escolhidas como ligantes por serem ligantes bidentados, conferindo assim estabilidade ao complexo. Além disso, a coordenação das fenantrolinas ao centro metálico favorecem à transição de transferência de carga do metal para o ligante (MLCT) o que confere aos complexos suas propriedades luminescentes. As moléculas de aminopiridinas foram selecionadas uma vez que essa classe de moléculas é utilizadas no tratamento de doenças neuromusculares.<sup>132,133,134</sup>

Para os complexos RuMe3,4Apy e RuMe4Apy a fenantrolina funcionalizada 5,6-dimetil-1,10-fenantrolina foi utilizada a fim de tornar o complexo mais hidrofóbico com a presença dos grupos metila, em uma tentativa de melhorar a interação dos complexos com o peptídeo beta amilóide.



**FIGURA 3.3.** Série de complexos polipiridínicos de Ru(II). Complexos *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(3,4Apy)<sub>2</sub>].2PF<sub>6</sub> (Ru3,4Apy), *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4Apy)<sub>2</sub>].2PF<sub>6</sub> (Ru4Apy), *cis*-[Ru(Mephen)<sub>2</sub>(3,4Apy)<sub>2</sub>].2PF<sub>6</sub> (RuMe3,4Apy) e *cis*-[Ru(Mephen)<sub>2</sub>(4Apy)<sub>2</sub>].2PF<sub>6</sub> (RuMe4Apy) sintetizados neste trabalho.

### 3.2. Objetivos do Capítulo

Sintetizar uma série de complexos polipiridínicos de Ru (II), em especial os compostos inéditos RuMe3,4Apy e RuMe4Apy, e avaliar suas propriedades fotofísicas e fotoquímicas, bem como seu potencial antioxidante frente ao radical ABTS<sup>•+</sup>.

### 3.3. Materiais e Métodos

#### 3.3.1. Reagentes

Os reagentes usados nas sínteses dos complexos -  $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 1,10-fenantrolina (phen), 5,6-dimetil-1,10-phenantrolina (Mephen), cloreto de lítio (LiCl), 3,4-diaminopiridina (3,4Apy) e hexafluorofosfato de amônio ( $\text{NH}_4\text{PF}_6$ ) - foram todos de procedência Sigma-Aldrich. Na preparação das soluções tampão foram usados fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), fosfato de potássio bibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), cloreto de sódio (NaCl) e cloreto de potássio (KCl) 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.

#### 3.3.2. Recristalização do ligante 1,10-phenantrolina

O ligante 1,10-phenantrolina foi solubilizado em uma quantidade mínima de metanol quente. Em seguida, água destilada gelada foi adicionada à solução de metanol. A solução foi deixada na geladeira *overnight*. O precipitado branco cristalino foi filtrado em um funil de Büchner sob vácuo e lavado com água destilada gelada. O ligante recristalizado foi seco à vácuo.

#### 3.3.3. Síntese do complexo precursor *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]

O complexo precursor foi sintetizado seguindo o procedimento previamente descrito na literatura, com algumas modificações.<sup>135</sup> Assim, 200 mg (0,76 mmol) de  $\text{RuCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ , 345 mg (1,90 mmol) de 1,10-phenantrolina e 259 mg (6,08 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 final do período de refluxo, a solução foi filtrada quente sob vácuo, obtendo-se um sólido preto. O sólido obtido

foi então lavado com água gelada até que a água mãe ficasse incolor. O complexo foi lavado com 5 mL de acetona gelada e seco à vácuo. O rendimento obtido foi de 63%.

### 3.3.4. Síntese do complexo precursor *cis*-[Ru(Mephen)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]

O complexo precursor foi sintetizado seguindo o procedimento previamente descrito na literatura, com algumas modificações.<sup>135</sup> Assim, 150 mg (0,72 mmol) de RuCl<sub>3</sub>.xH<sub>2</sub>O, 301 mg (1,44 mmol) de 5,6-dimetil-1,10-phenantrolina e 245 mg (5,76 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 final do período de refluxo, a solução foi filtrada quente sob vácuo, obtendo-se um sólido preto. O sólido obtido foi então lavado com água gelada até que a água mãe ficasse incolor. O complexo foi lavado com 5 mL de acetona gelada e seco à vácuo. O rendimento obtido foi de 45%.

### 3.3.5. Síntese do complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(3,4Apy)<sub>2</sub>].2PF<sub>6</sub> (Ru3,4Apy)

O complexo foi sintetizado seguindo o procedimento previamente descrito pelo grupo.<sup>130,136</sup> Assim, 150 mg (0,284 mmol) do precursor *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] e 61,5 mg (0,568 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 para retirar quaisquer reagentes ou precipitados não solubilizados e o sistema foi então resfriado a temperatura ambiente. Uma vez resfriado, foram adicionados 92 mg (0,564 mmol) do contra íon hexafluorofosfato de amônio (NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub>). 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 escuro foi filtrado e o rendimento obtido foi de 68%.

### 3.3.6. Síntese do complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4Apy)<sub>2</sub>].2PF<sub>6</sub> (Ru4Apy)

O complexo foi sintetizado seguindo o procedimento previamente descrito pelo grupo.<sup>130,136</sup> Assim, 150 mg (0,282 mmol) do precursor *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] e 53 mg (0,564 mmol) do ligante 4-aminopiridina 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 para retirar quaisquer reagentes ou precipitados não solubilizados e o sistema foi então resfriado a temperatura ambiente. Uma vez resfriado, foram adicionados 92 mg (0,564 mmol) do contra íon hexafluorofosfato de amônio (NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub>). 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 alaranjado foi filtrado e o rendimento obtido foi de 65%.

### 3.3.7. Síntese do complexo *cis*-[Ru(Mephen)<sub>2</sub>(3,4Apy)<sub>2</sub>].2PF<sub>6</sub> (RuMe3,4Apy)

200 mg (0,339 mmol) do precursor *cis*-[Ru(Mephen)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] e 74 mg (0,678 mmol) do ligante 3,4-diaminopiridina foram 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 para retirar quaisquer reagentes ou precipitados não solubilizados e o sistema foi então resfriado a temperatura ambiente. Uma vez resfriado, foram adicionados 111 mg (0,678 mmol) do contra íon

hexafluorofosfato de amônio ( $\text{NH}_4\text{PF}_6$ ). 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 amarronzado foi filtrado e o rendimento obtido foi de 70%.

### 3.3.8. Síntese do complexo *cis*-[Ru(Mephen)<sub>2</sub>(4Apy)<sub>2</sub>].2PF<sub>6</sub> (RuMe4Apy)

220 mg (0,374 mmol) do precursor *cis*-[Ru(Mephen)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] e 70,4 mg (0,748 mmol) do ligante 4-aminopiridina foram 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 para retirar quaisquer reagentes ou precipitados não solubilizados e o sistema foi então resfriado a temperatura ambiente. Uma vez resfriado, foram adicionados 122 mg (0,748 mmol) do contra íon hexafluorofosfato de amônio ( $\text{NH}_4\text{PF}_6$ ). 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 82%.

### 3.3.9. 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 ensaios de atividade antioxidante com o radical ABTS<sup>•+</sup>

### 3.3.10. 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.

### **3.3.11. 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.

### **3.3.12. Tempo de Vida de Emissão**

As medidas de tempo de vida de emissão foram realizadas utilizando um laser pulsado PDL 800-D de diodo (PicoQuant). Os dados foram adquiridos através do software da PicoQuant a partir do ajuste monoexponencial, sendo a qualidade do ajuste avaliada pelo parâmetro  $\chi^2$ .

### **3.3.13. Solubilidade**

A solubilidade dos complexos em meio aquoso (PBS – 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.7 mM KCl e 137 mM NaCl, pH 7.4) foi determinada a  $37 \pm 0,5$  °C pelo método Shake Flask. Para tanto soluções saturadas dos complexos foram preparadas em um volume final de 2 mL de tampão PBS. As soluções foram agitadas durante 24 horas a 600 rpm até o equilíbrio em um termoshaker (TS-100C, Boeco Germany). Na sequência, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos em uma centrífuga (MiniSpin, Eppendorf) à 14000 rpm. O sobrenadante foi retirado do precipitado, diluído conforme a necessidade e a concentração final da solução foi determinada com o uso do espectrofotômetro no UV-Vis.

### 3.3.14. Atividade Antioxidante Frente ao Radical ABTS<sup>•+</sup>

O radical ABTS<sup>•+</sup> foi gerado a partir da reação entre o sal de ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) e persulfato de potássio.<sup>137</sup> Uma solução 7 mM do sal ABTS e 2.4 mM de persulfato de potássio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) foi preparada em água destilada e mantida em repouso no escuro por 16 horas para a completa formação do radical. Após esse período, a solução do radical ABTS<sup>•+</sup> foi diluída, ajustando a absorbância em 734 nm para (0.7 ± 0.02). As soluções de complexo e ligante foram preparadas em tampão PBS. Diversas concentrações dos complexos e ligantes foram adicionadas ao radical, cuja concentração foi fixada para que a absorbância do mesmo se mantivesse constante à 0.7 para todas as amostras. As amostras foram homogeneizadas no vortex e incubadas no escuro por 10 minutos antes da medida. A atividade antioxidante foi avaliada de acordo com a supressão da banda em 734 nm. O valor de IC<sub>50</sub> referente à inibição do radical ABTS<sup>•+</sup> de foi determinado através da equação:

$$\% I = \left( \frac{A - A_0}{A_0} \right) \times 100\%$$

Onde %I é porcentagem de inibição, A<sub>0</sub> é a absorbância da amostra padrão sem analito no comprimento de onda de 734 nm e A é a absorbância da amostra com analito no comprimento de onda de 734 nm. Os experimentos foram conduzidos em triplicata e os dados foram tratados no software GraphPad Prism.

### 3.3.15. Cultura de Células de Neuroblastoma

Células de neuroblastoma humano SH-SY5Y (Sigma-Aldrich, MO, EUA, origem de A.T.C.C., VA, EUA) foram cultivadas em DMEM, F12 HAM com 25mM HEPES e NaHCO<sub>3</sub> (1:1) e suplementado com 10% FBS, 1 mM de glutamina e 1.0% de antibióticos. As culturas celulares foram mantidas em atmosfera umidificada, 5% de

CO<sub>2</sub> à 37 °C e cultivadas até atingirem 80% de confluência por um máximo de 20 passagens. A linha celular foi autenticada pelo *European Collection of Authenticated Cell Cultures* através de repetidas análises de loci e testado negativo para contaminações por micoplasma.

### 3.3.16. Avaliação da Toxicidade dos Complexos

Células diferenciadas SH-SY5Y (DMEM F12, Glutamax e 10% iFBS) a uma densidade de 10000 células/poço em um volume final de 100 µL/poço foram pipetadas em uma placa de 96 poços (Corning 3917). 4 poços/placa contendo somente meio de cultura (sem células) foram preparados para serem utilizados como branco. As placas foram incubadas a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> por 48 horas. Para o tratamento, soluções estoques de 5 mM dos complexos foram preparadas em DMSO e filtradas com filtros de seringa de porosidade 0.02 µm (Whatman Inc.). Os quatro complexos foram testados nas concentrações 50, 15.8, 5, 1.5, 0.5, 0.15, 0.05, 0.015, 0.002 e 0.0005 µM. Puromicina (Sigma-Aldrich) foi utilizada como controle positivo. As células tratadas com os complexos foram incubadas por 24 horas à 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. O kit *CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay* (Promega) foi utilizado para determinar a viabilidade das células. O reagente CellTiter-Glo® foi preparado de acordo com as especificações do fabricante. Após a aspiração do meio de cultura, 100 µL do reagente CellTiter-Glo® foi adicionado a cada um dos poços, as soluções homogeneizadas em um shaker orbital e as placas deixadas 10 minutos à temperatura ambiente para a estabilização do sinal luminescente. A resposta luminescente foi observada em um leitor de placas (Clariostar, BGM) no comprimento de onda de 560 nm. O teste de comparação múltipla *one-way* ANOVA foi empregado para a análise da significância estatística entre grupos experimentais distintos. GraphPad Prism 9 (GraphPad Software) foi aplicado para todas as análises estatísticas dos dados.

### 3.4. Resultados e Discussão

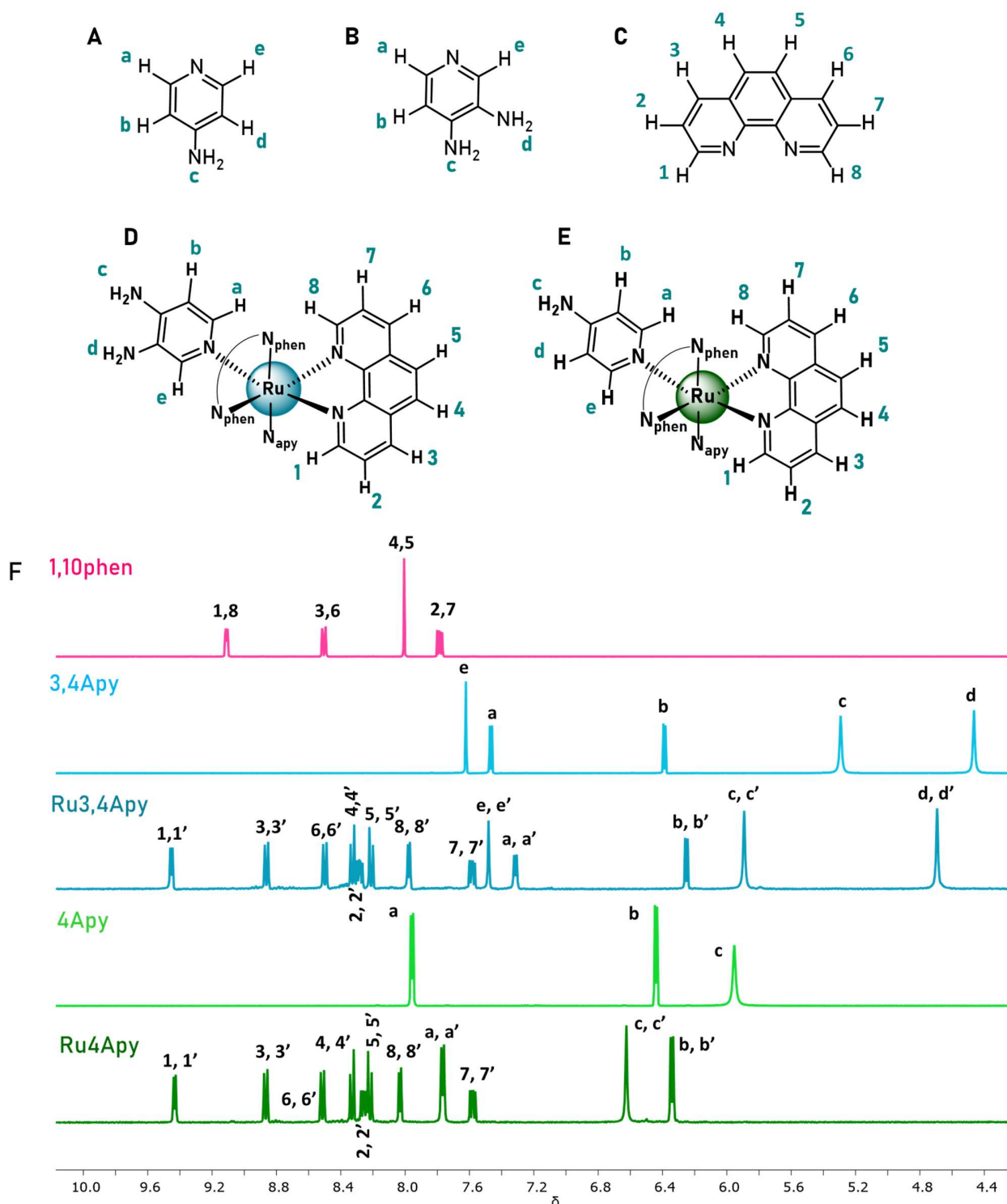
#### 3.4.1. Caracterização estrutural dos complexos

A caracterização dos complexos Ru<sub>3</sub>,<sub>4</sub>Apy e Ru<sub>4</sub>Apy, bem como suas propriedades biológicas, já foram realizadas e estudadas de forma extensiva previamente pelo grupo.<sup>130,136</sup> Os complexos RuMe<sub>3</sub>,<sub>4</sub>Apy e RuMe<sub>4</sub>Apy são apresentados pela primeira vez na literatura neste trabalho. Os resultados de caracterização abaixo foram reproduzidos a fim de confirmar a obtenção do complexo e sua pureza.

Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H para os complexos Ru<sub>3</sub>,<sub>4</sub>Apy, RuMe<sub>3</sub>,<sub>4</sub>Apy, Ru<sub>4</sub>Apy e RuMe<sub>4</sub>Apy e a comparação com os ligantes livres fenantrolina e aminopiridina obtidos em DMSO-*d*<sub>6</sub> são apresentados nas Figuras 3.4 e 3.5. Foi possível observar o desdobramento dos sinais da fenantrolina, bem como a mudança no deslocamento químico dos sinais das aminopiridinas devido à coordenação ao centro metálico. Os sinais referentes aos ligantes 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. Para os complexos com os ligantes Mephen, o sinal referente às metilas é observado em 2.71 ppm no ligante livre, se duplicando quando complexado em 2.71 e 2.82 ppm. A atribuição de todos os sinais é apresentada nas Tabelas 4.1 e 4.2. Os resultados obtidos são consistentes com a geometria octaédrica proposta, contendo dois ligantes fenantrolina bidentados e dois ligantes aminopiridina monodentados para os quatro complexos. A ausência de sinais referentes ao precursor e ligante livre indica a pureza do complexo. Os resultados obtidos para os quatro complexos estão em concordância com os resultados previamente obtidos pelo grupo<sup>130,136,138</sup> confirmando a obtenção dos complexos propostos.

**TABELA 4.1. Atribuição dos sinais do espectro de RMN  $^1\text{H}$  para os complexos Ru3,4Apy e Ru4Apy em DMSO- $d_6$ .**

Ru3,4Apy		Ru4Apy	
H	$\delta_{\text{H}}$ (ppm), mult. (J em Hz), H	H	$\delta_{\text{H}}$ (ppm), mult. (J em Hz), H
<b>d, d'</b>	4.48; s; 4	<b>b, b'</b>	6.33; d (5,3); 4
<b>c, c'</b>	5.88; s; 4	<b>c, c'</b>	6.62; s; 4
<b>b, b'</b>	6.24; d (6.1); 2	<b>7, 7'</b>	7.57; m; 2
<b>a, a'</b>	7.31; d (6.1); 2	<b>a, a'</b>	7.76; d (6.4); 4
<b>e, e'</b>	7.47; s; 2	<b>8, 8'</b>	8.02; d (5.3); 2
<b>7, 7'</b>	7.57; m; 2	<b>5, 5'</b>	8.21; d; 2
<b>8, 8'</b>	7.97; d (5.3); 2	<b>2, 2'</b>	8.23; m; 2
<b>5, 5'</b>	8.20; d (8.8); 2	<b>4, 4'</b>	8.32; d (8.8); 2
<b>2, 2'</b>	8.28; m; 2	<b>6, 6'</b>	8.51; d (8.2); 2
<b>4, 4'</b>	8.32; d (8.9); 2	<b>3, 3'</b>	8.86; m; 2
<b>6, 6'</b>	8.49; d (8.2); 2	<b>1, 1'</b>	9.42; d (5.2); 2
<b>3, 3'</b>	8.85; d (8.2); 2		
<b>1, 1'</b>	9.44; d (5.3); 2		

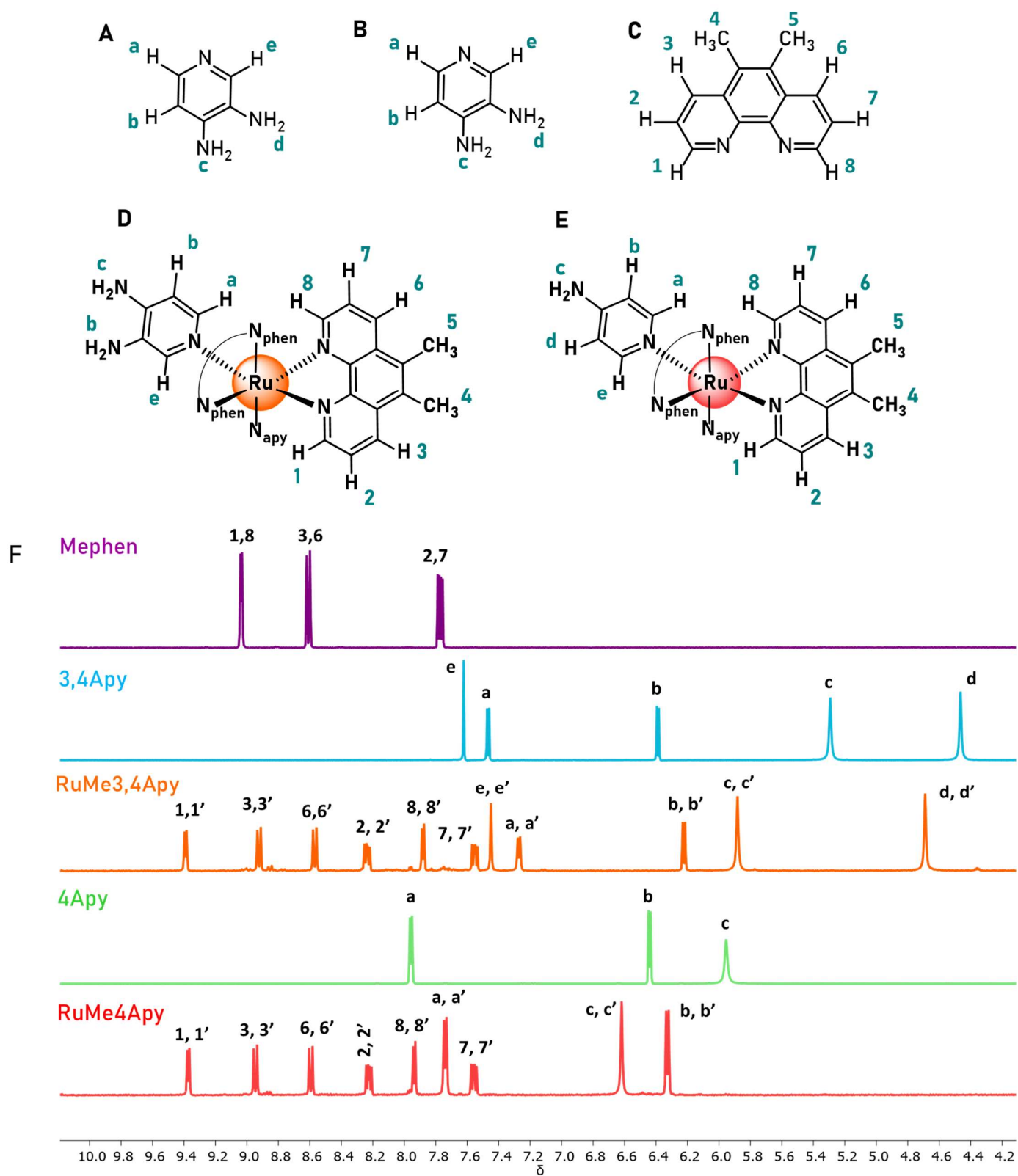


**FIGURA 3.4.** Espectros de espectro de RMN  $^1\text{H}$  para os complexos Ru3,4Apy e Ru4Apy em  $\text{DMSO}-d_6$ . Estruturas dos ligantes 4-aminopiridina (A), 3,4-diaminopiridina (B) e 1,10-fenantrolina (C) e dos complexos Ru3,4Apy (D) e

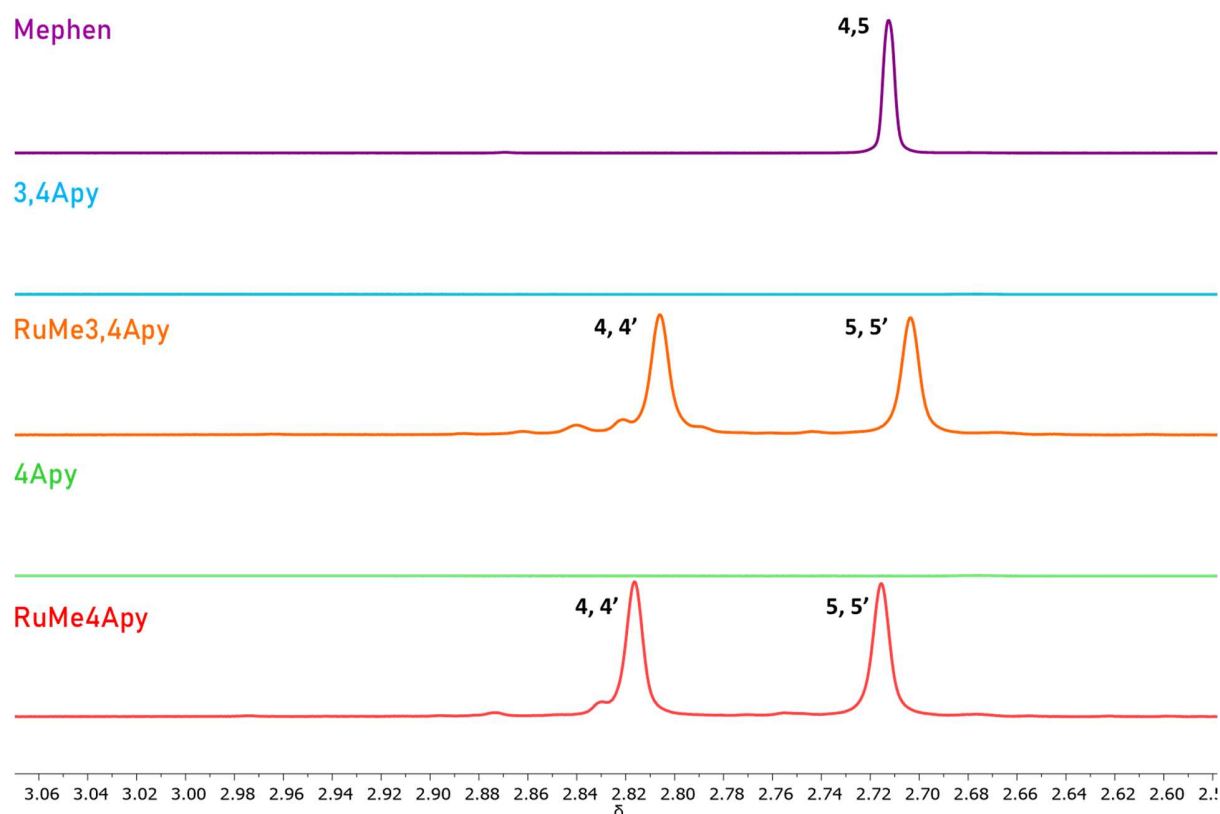
Ru4Apy (E) com as devidas atribuições. Espectros de RMN  $^1\text{H}$  dos ligantes e complexos (F).

**TABELA 4.2. Atribuição dos sinais do espectro de RMN  $^1\text{H}$  para os complexos RuMe<sub>3,4</sub>Apy e RuMe<sub>44</sub>Apy em DMSO-*d*<sub>6</sub>.**

RuMe <sub>3,4</sub> Apy		RuMe <sub>44</sub> Apy	
H	$\delta_{\text{H}}$ (ppm), mult. (J em Hz), H	H	$\delta_{\text{H}}$ (ppm), mult. (J em Hz), H
5, 5'	2.71; s; 6	5, 5'	2.71; s; 6
4, 4'	2.81; s; 6	4, 4'	2.82; s; 6
d, d'	4.69; s; 4	b, b'	6.33; d (5.3); 4
c, c'	5.89; s; 4	c, c'	6.62; s; 4
b, b'	6.22; d (6.1); 2	7, 7'	7.57; m; 2
a, a'	7.27; d (6.1); 2	a, a'	7.76; d (6.4); 4
e, e'	7.45; s; 2	8, 8'	8.02; d (5.3); 2
7, 7'	7.55; m; 2	2, 2'	8.23; m; 2
8, 8'	7.88; d (5.2); 2	6, 6'	8.51; d (8.2); 2
2, 2'	8.24; m; 2	3, 3'	8.86; m; 2
6, 6'	8.57; d (8.5); 2	1, 1'	9.42; d (5.2); 2
3, 3'	8.92; d (8.5); 2		
1, 1'	9.39; d (5.2); 2		

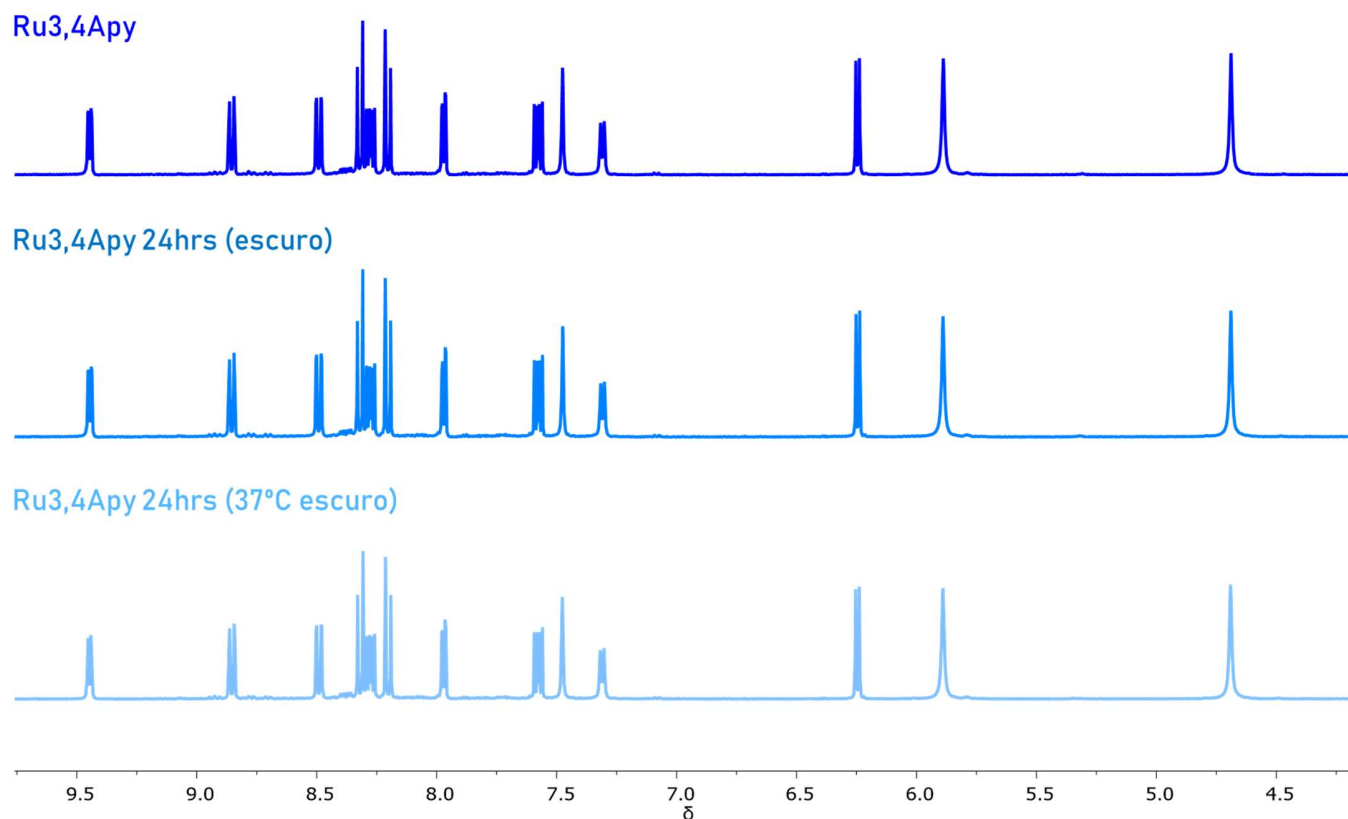






**FIGURA 3.5.** Espectros de espectro de RMN  $^1\text{H}$  para os complexos RuMe $_{3,4}$ Apy e RuMe $_4$ Apy em DMSO- $d_6$ . Estruturas dos ligantes 4-aminopiridina (A), 3,4-diaminopiridina (B) e 5,6-dimetil-1,10-fenantrolina (C) e dos complexos RuMe $_{3,4}$ Apy (D) e RuMe $_4$ Apy (E) com as devidas atribuições. Espectros de RMN  $^1\text{H}$  dos ligantes e complexos (F).

Os complexos também foram testados quanto à sua estabilidade. Os complexos apresentaram estabilidade durante 24 horas quando mantidos no escuro, também se mantendo estáveis por 24 horas quando mantidos à 37°C na ausência de luz, onde não foram observadas mudanças nos espectros de RMN durante esse período para o complexo representativo Ru $_{3,4}$ Apy, Figura 3.6.



**FIGURA 3.6. Estabilidade do complexo  $\text{Ru}_{3,4}\text{Apy}$ .** Espectros de RMN  $^1\text{H}$  em  $\text{DMSO-d}_6$  do complexo  $\text{Ru}_{3,4}\text{Apy}$  mostrando sua estabilidade por 24 horas no escuro tanto à temperatura ambiente como a  $37^\circ\text{C}$ .

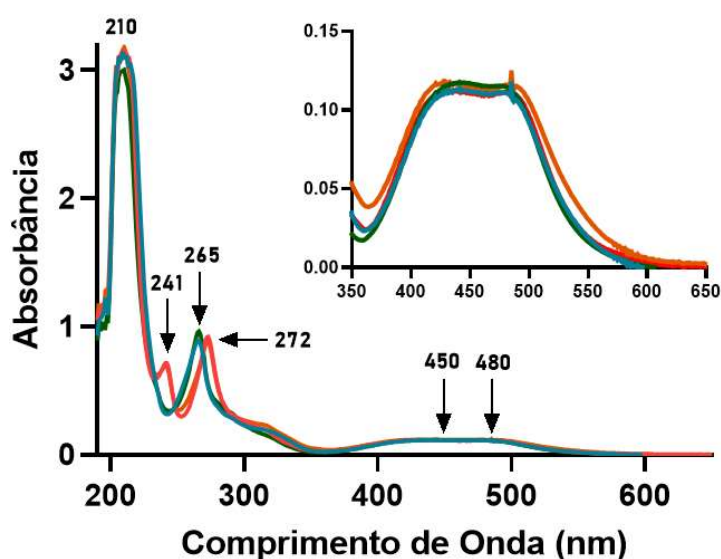
Isso indica que os complexos permanecem com sua estrutura inicial, não havendo dissociação dos ligantes monodentados aminopiridina com o tempo ou com a elevação da temperatura ambiente para a temperatura fisiológica de  $37^\circ\text{C}$ .

### 3.4.2. Caracterização espectroscópica dos complexos

Todas as caracterizações espectroscópicas dos complexos foram realizadas em meio aquoso e em pH fisiológico utilizando tampão PBS.

### 3.4.2.1. Espectroscopia de UV-vis e Absortividade Molar

Os espectros de UV-vis dos complexos apresentam bandas na região do ultravioleta em 210 e 265 nm para os complexos Ru<sub>3,4</sub>Apy e Ru<sub>4</sub>Apy e bandas em 210, 241 e 272 nm para os complexos RuMe<sub>3,4</sub>Apy e RuMe<sub>4</sub>Apy, Figura 3.7. Essas transições na região do UV são correspondentes as transições de transferência de carga intraligantes (ILCT) dos ligantes aromáticos fenantrolina e aminopiridina, onde elétrons são promovidos dos orbitais  $\pi$  para os orbitais  $\pi^*$  desses ligantes. Os quatro complexos apresentam uma banda larga na região do visível na faixa entre 400 e 500 nm. Essa banda corresponde à transição de transferência de carga do metal para o ligante (MLCT) dos orbitais  $d\pi$  do Ru(II) para os orbitais  $\pi^*$  dos ligantes fenantrolina e aminopiridina, os quais são receptores  $\pi$ .



**FIGURA 3.7. Espectro de absorção dos complexos de rutênio.** Espectros de absorção de soluções 20  $\mu$ M dos complexos Ru<sub>3,4</sub>Apy (azul), Ru<sub>4</sub>Apy (verde), RuMe<sub>3,4</sub>Apy (laranja) e RuMe<sub>4</sub>Apy (vermelho) em tampão PBS.

Os valores de absortividade molar, ou seja, a habilidade de uma determinada molécula em absorver luz em um dado comprimento de onda, foram determinados para os quatro complexos, Tabela 4.3.

**TABELA 4.3. Valores de absorvidade molar dos complexos em PBS em L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>.**

Complexo	241 nm	265 nm	272 nm	450 nm	480 nm
Ru3,4Apy	-	71104	-	10308	10158
Ru4Apy	-	84996	-	10495	10297
RuMe3,4Apy	56231	-	72060	9647	9826
RuMe4Apy	55355	-	70446	8486	8502

As transições ILCT ( $\pi \rightarrow \pi^*$ ) são transições permitidas tanto por laporte como por spin e, conseqüentemente, apresentam valores de absorvidade molar altos ( $\epsilon > 50000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ). As transições MLCT ( $d(\pi) \rightarrow \pi^*$ ) também são permitidas e apresentaram absorvidade molar  $\epsilon \sim 10000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ , resultados concordantes com outros complexos polipiridínicos reportados na literatura.<sup>139</sup>

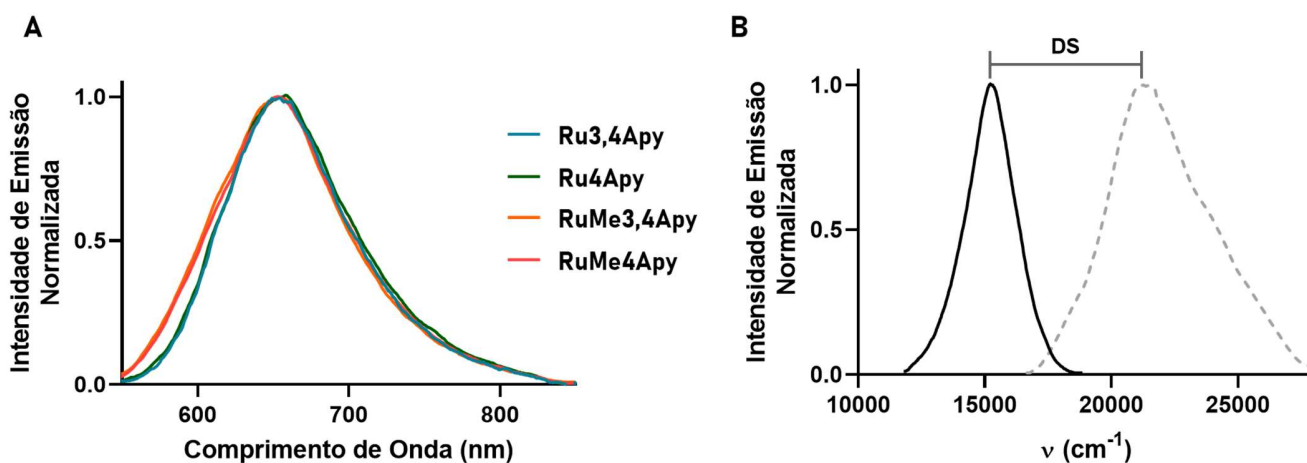
Os complexos também apresentaram solubilidades diferentes em meio aquoso de acordo com os ligantes dos complexos, Tabela 4.4. Os complexos com os ligantes 3,4Apy apresentaram uma solubilidade muito maior quando comparados ao complexos com os ligantes 4Apy, provando que os grupos amino das aminopiridinas são cruciais na solubilidade dos complexos, provavelmente facilitando ligações de hidrogênio com o meio aquoso. Já a presença dos grupos metila nas fenantrolina reduziu drasticamente a solubilidade dos complexos, tornando os complexos RuMe3,4Apy e RuMe4Apy de fato mais hidrofóbicos dos que os complexos análogos Ru3,4Apy e Ru4Apy.

**TABELA 4.4. Solubilidade dos complexos em PBS.**

	Ru3,4Apy	Ru4Apy	RuMe3,4Apy	RuMe4Apy
Concentração Máxima ( $\mu\text{M}$ )	844	487	144.8	30.2
Solubilidade (mg/mL)	0.818	0.458	0.148	0.03

### 3.4.2.2. Espectroscopia de Luminescência e Tempo de Vida

Os complexos apresentam uma banda de emissão larga (550 a 850 nm) com máximo em 655 nm e intensidade de emissão considerável até 750 nm, Figura 3.8A. Todos os complexos apresentaram o mesmo perfil de emissão, o que já se era esperado uma vez que a transição MLCT é responsável pelas propriedades emissivas dos complexos e essa transição é igual para todos os complexos.



**FIGURA 3.8. Propriedades luminescentes dos complexos em PBS.** (A) Espectros de emissão dos complexos Ru3,4Apy, Ru4Apy, RuMe3,4Apy e RuMe4Apy. (B) Espectros demonstrativos do deslocamento de Stokes dos complexos.  $\lambda_{\text{exc}}=480$  nm e  $\lambda_{\text{em}}=650$  nm.

**TABELA 4.5. Deslocamento de Stokes dos complexos em PBS.**

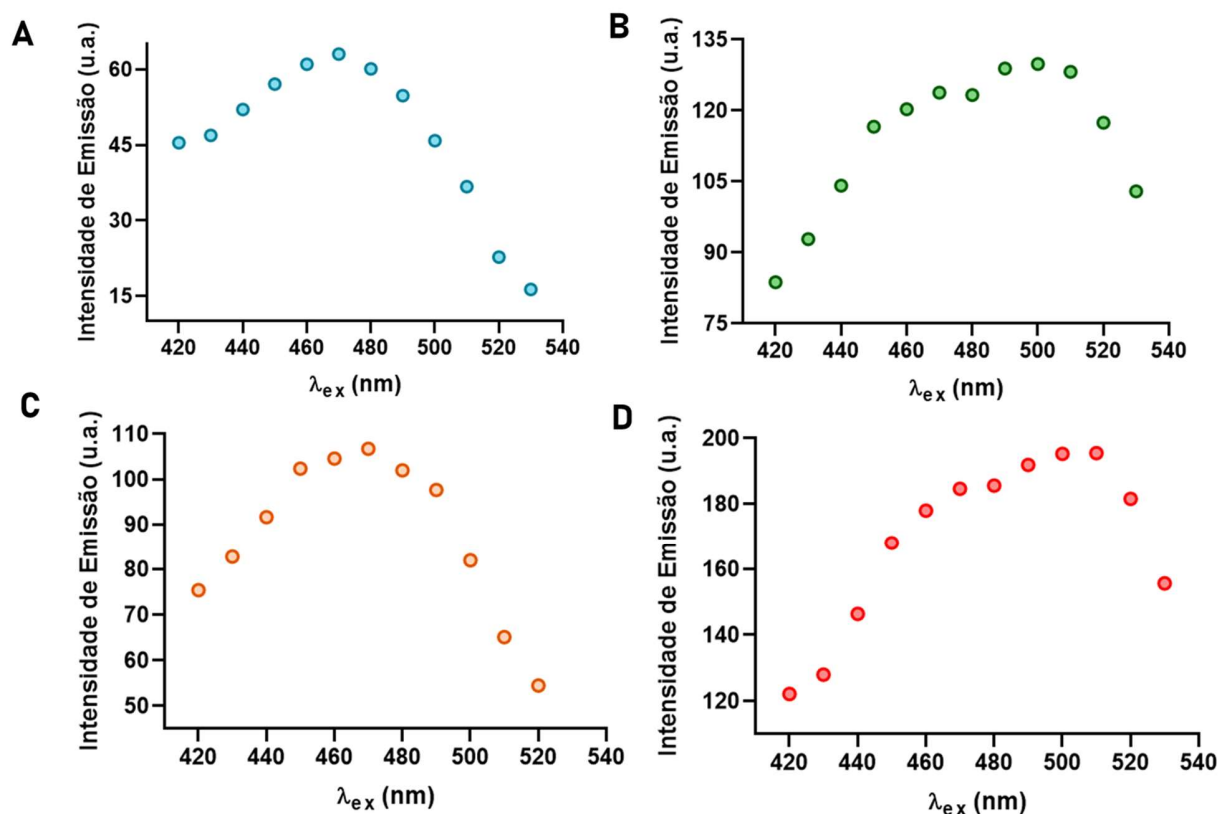
	<b>Ru3,4Apy</b>	<b>Ru4Apy</b>	<b>RuMe3,4Apy</b>	<b>RuMe4Apy</b>
DS (cm <sup>-1</sup> )	5700	5300	6500	6000

Os complexos apresentam deslocamento de Stokes, isto é, a diferença energética entre a excitação e emissão de molécula luminescente, na ordem de 6000 cm<sup>-1</sup>, Figura 3.8B e Tabela 4.5.

Tanto a emissão na região do infravermelho próximo como um deslocamento de Stokes grande são características importantes para moléculas com potencial uso em meios biológicos. A emissão de uma sonda luminescente na região do infravermelho próximo é interessante uma vez que uma grande quantidade de proteínas e pequenas moléculas apresentam emissão na região do 250 - 400 nm. Assim uma sonda luminescente fora dessa região não sofreria interferência com a fluorescência de quaisquer outras moléculas em solução. O deslocamento de Stokes grande evita a sobreposição entre a excitação e emissão, impedindo assim a reabsorção da luz emitida, levando à perda de sinal, bem como sinais de fundo provenientes da excitação.

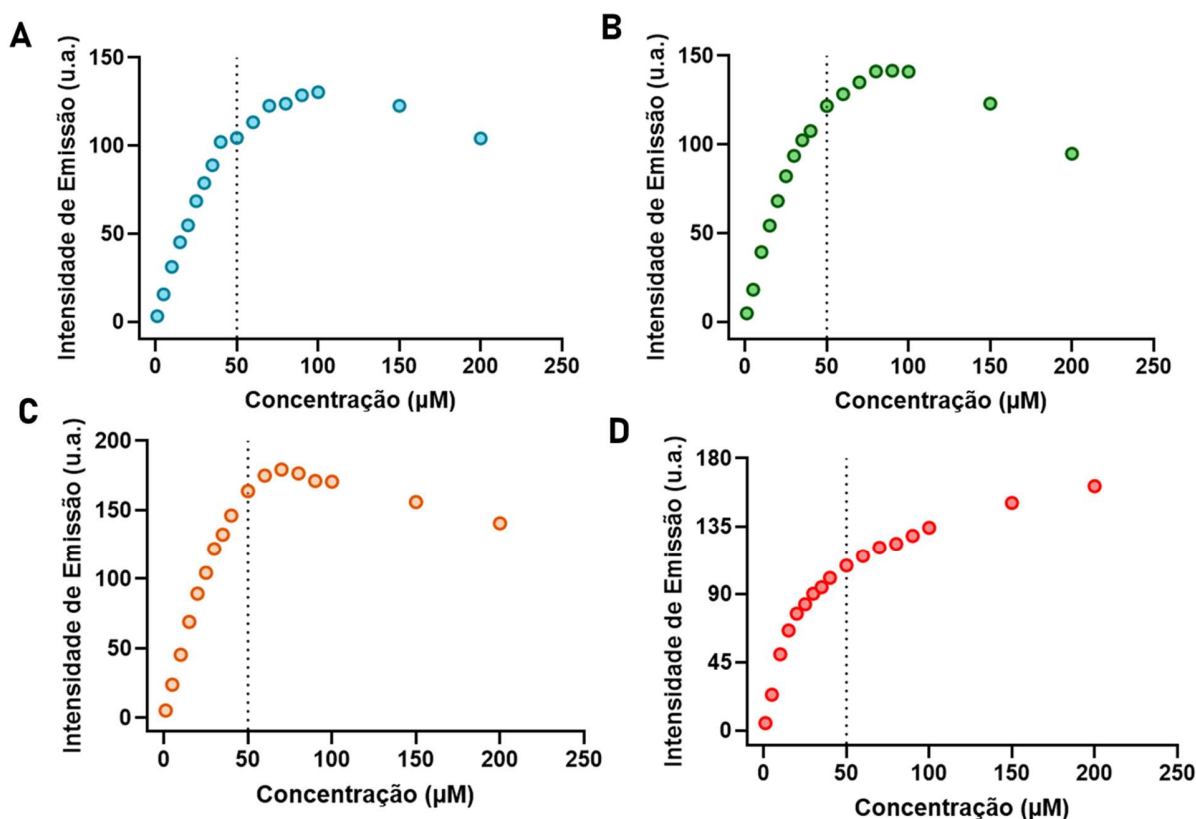
Uma vez que a banda de MLCT responsável pela emissão vai de 400 a 500 nm, um estudo do melhor comprimento de onda de excitação para o melhor sinal de emissão foi realizado, Figura 3.9.

Todos os quatro complexos apresentaram maior intensidade de emissão entre 470 e 500 nm, com os complexos contendo os ligantes 3,4Apy apresentando maior intensidade de emissão quando excitados em 470 nm e os complexos com os ligantes 4Apy apresentando maior intensidade de emissão quando excitados em 500 nm.



**FIGURA 3.9.** Emissão dos complexos em diferentes comprimentos de onda de excitação em PBS. Máximos de emissão quando excitados em diferentes comprimentos de emissão dos complexos (A) Ru<sub>3,4</sub>Apy, (B) Ru<sub>4</sub>Apy, (C) RuMe<sub>3,4</sub>Apy e (D) RuMe<sub>4</sub>Apy.

Um estudo de concentração foi realizado para determinar a concentração máxima de trabalho com os complexos, Figura 3.10. Todos os quatro complexos apresentaram uma dependência linear entre a concentração e a intensidade de emissão até 50  $\mu$ M. Acima dessa concentração, há uma saturação e eventual diminuição da intensidade de emissão em altas concentrações (acima de 100  $\mu$ M).



**FIGURA 3.10.** Estudo de saturação de emissão dos complexos em PBS. Máximos de emissão em diferentes concentrações dos complexos (A) Ru<sub>3,4</sub>Apy, (B) Ru<sub>4</sub>Apy, (C) RuMe<sub>3,4</sub>Apy e (D) RuMe<sub>4</sub>Apy.

Essa diminuição de intensidade pode ser atribuída ao efeito de filtro interno. Em soluções altamente concentradas, o feixe de excitação é atenuado pela amostra de modo que apenas a superfície voltada para o feixe de excitação fluoresça fortemente. O centro da cubeta, onde o monocromador do equipamento faz a leitura da emissão, recebe menos luz e, subsequentemente, tem menor emissão de fluorescência o que afeta o sinal detectado. Alternativamente, uma desativação colisional devido à alta concentração também pode ocorrer, acarretando uma perda de energia por processos não radiativos. Assim, a concentração máxima de trabalho dos complexos foi estabelecida como 50  $\mu\text{M}$ , sendo esse limite respeitado para todos os experimentos subsequentes realizados com os complexos.



Em seguida, o tempo de vida de emissão dos complexos foi determinado. Os complexos apresentaram decaimento monoexponencial e tempos de vida de emissão longos, como já se era esperado para complexos de metais de transição com emissões provenientes do estado tripleto, Tabela 4.6. Para o elétron retornar do estado excitado tripleto para o estado fundamental, o qual é singleto, é necessária uma inversão de spin, o que é refletido em tempos de vida de emissão mais longos quando comparado com emissões provenientes do estado excitado singleto.

**TABELA 4.6. Tempo de vida dos complexos em PBS.**

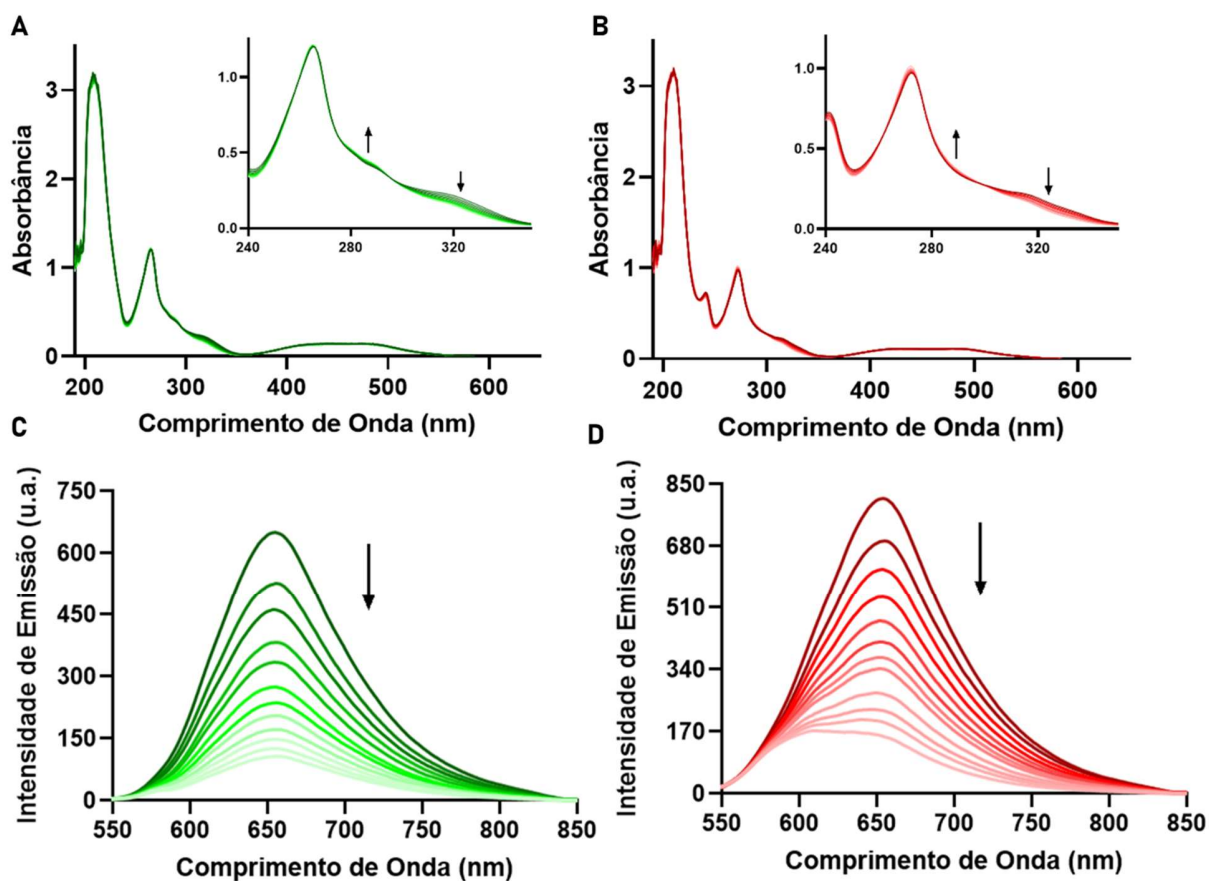
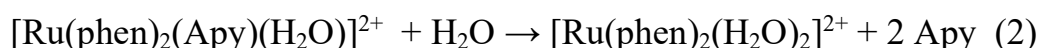
	<b>Ru3,4Apy</b>	<b>Ru4Apy</b>	<b>RuMe3,4Apy</b>	<b>RuMe4Apy</b>
$\tau$ (ns)	168.4	147.7	149.9	152.5
$\chi^2$	1.184	1.129	1.461	1.568

É importante ressaltar que os complexos apresentam tempos de vida de emissão longos em meio aquoso e na presença de oxigênio em solução, o qual poderia atuar como um supressor de emissão, uma vez que o oxigênio molecular em seu estado fundamental se encontra no estado tripleto, facilitando assim processos de transferência de energia. Assim, os complexos podem ser utilizados em ensaios biológicos em condições fisiológicas sem que haja supressão do seu tempo de vida de emissão.

### 3.4.2.3. Fotoquímica

O comportamento fotoquímico dos complexos foi investigado em tampão PBS. Os complexos foram irradiados continuamente por 60 minutos por uma lâmpada de comprimento de onda de 450 nm e intensidade de  $1.1 \times 10^{-8}$  einstein.s<sup>-1</sup>.

Os resultados obtidos são consistentes com a substituição dos ligantes monodentados aminopiridina por moléculas de água (Equações 1 e 2), corroborando resultados previamente obtidos pelo grupo<sup>136,138,140</sup> bem como outros sistemas do tipo  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{L})\text{Cl}]$  reportados na literatura.<sup>141</sup>



**FIGURA 3.11. Mudanças espectrais durante reação fotoquímica dos complexos.**

Mudanças nos espectros de UV-vis dos complexos  $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{Apy})_2]^{2+}$  (A) e  $[\text{Ru}(\text{Mephen})_2(\text{Apy})_2]^{2+}$  (B) e espectros de emissão dos complexos  $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{Apy})_2]^{2+}$  (C) e  $[\text{Ru}(\text{Mephen})_2(\text{Apy})_2]^{2+}$  (D).

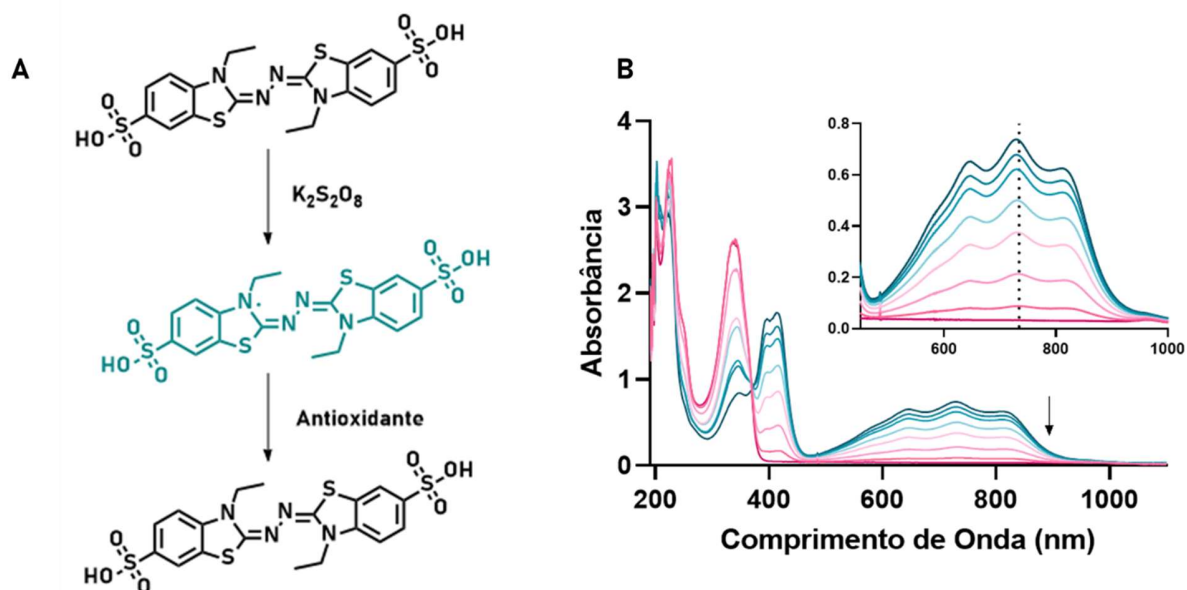
Poucas mudanças são observadas nos espectros de UV-vis, havendo apenas pequenas variações nas bandas de ILCT devido a labilização dos ligantes aminopiridina e nenhuma mudança considerável na banda de MLCT, Figura 3.11A e B.

Isso já era esperado uma vez que a transferência de carga do rutênio para os ligantes fenantrolina é o componente majoritário da banda MLCT e o complexo aquo formado apresenta absorção na mesma região. A maior diferença durante a irradiação foi observada nos espectros de emissão, Figura 3.11C e D. Durante a fotólise, observou-se a redução na intensidade de emissão devido à perda dos ligantes aminopiridinas e formação do fotoproduto aquo não-emissivo. Todos os quatro complexos apresentaram comportamentos similares. A perda dos ligantes aminopiridina decorrente da irradiação contínua pode ser utilizada como uma ferramenta de liberação controlada desses ligantes no meio biológico, uma vez que os mesmos só são labilizados com irradiação contínua nos comprimentos de onda da banda MLCT dos complexos.

### 3.4.3. Atividade Antioxidante

Um dos possíveis métodos de avaliar a atividade antioxidante de uma molécula é através de um ensaio de descolorização do radical ABTS<sup>•+</sup>. Nele o radical ABTS<sup>•+</sup>, de coloração azul esverdeada, é obtido através da reação entre o ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) e o persulfato de potássio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) em proporções subestequiométricas, resultando assim na oxidação incompleta do ABTS<sup>137</sup>, Figura 3.12A. O radical ABTS é um cromóforo contando com três máximos de absorção em 645 nm, 734 nm e 815 nm. A adição de antioxidantes ao radical pré-formado o reduz ao ABTS, sendo que a extensão dessa redução bem como o tempo de reação depende da atividade antioxidante da molécula em questão.<sup>137</sup> Com a redução do radical, suas bandas de absorção vão diminuindo, uma

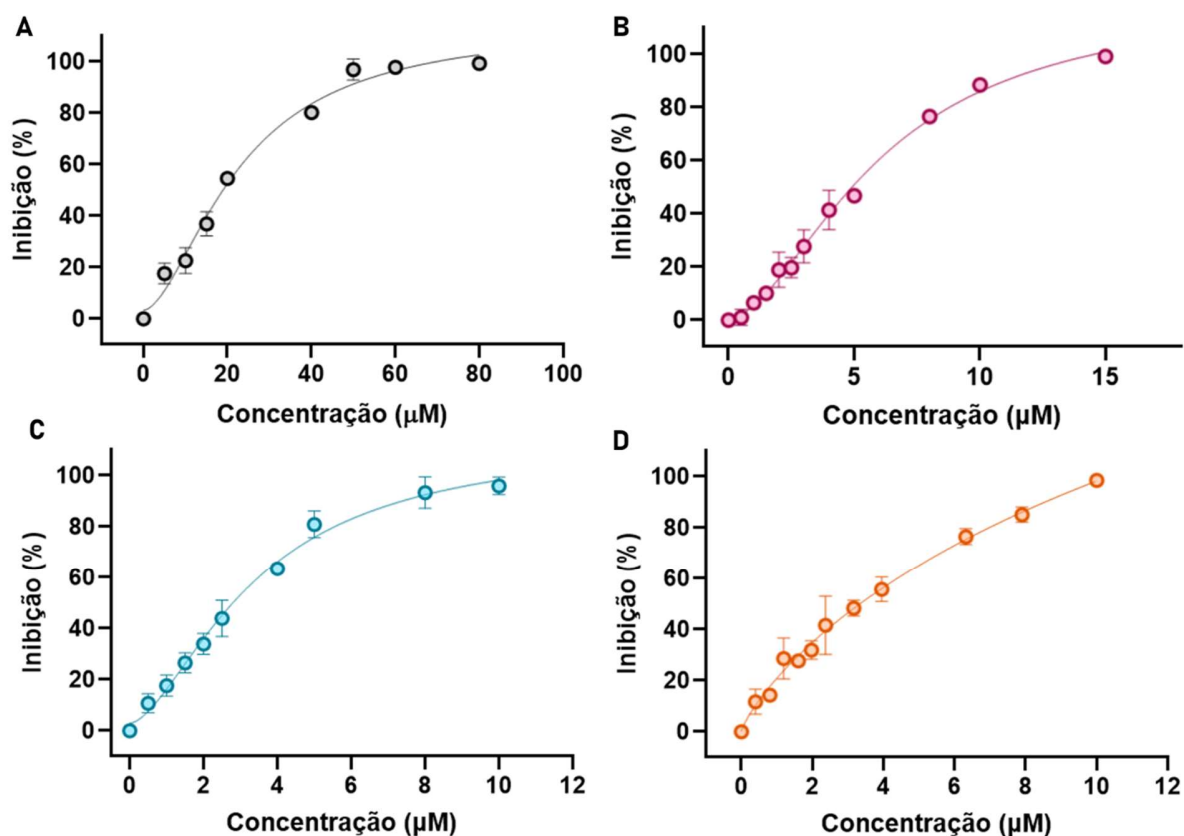
vez que o ABTS neutralizado é incolor, Figura 3.12B. O percentual de inibição foi monitorado através da diminuição da banda em 734 nm que é então calculado e plotado em função da concentração dos antioxidantes, Figura 3.13. A atividade antioxidante é calculada em função do IC<sub>50</sub>, isto é, a concentração de antioxidante necessária para neutralizar cinquenta por cento do radical em solução.



**FIGURA 3.12. Formação do radical ABTS<sup>•+</sup>.** (A) Reação entre o ABTS e persulfato de potássio gerando o radical ABTS<sup>•+</sup> e sua eventual neutralização. (B) Espectros de absorção do radical ABTS<sup>•+</sup> durante a reação com o antioxidante.

Os quatro complexos bem como os dois ligantes aminopiridina foram testados separadamente frente ao radical ABTS<sup>•+</sup>. O ligante 4-aminopiridina bem como os complexos Ru4Apy e RuMe4Apy não apresentaram atividade antioxidante significativa, mesmo em concentrações altas. No entanto, tanto o ligante 3,4-diaminopiridina bem como os complexos Ru3,4Apy e RuMe3,4Apy apresentaram alta atividade antioxidante, excedendo a capacidade antioxidante dos padrões ácido ascórbico e BHT, Tabela 4.7. Esses resultados refletem a importância do segundo grupo amino na atividade antioxidante dos complexos, bem como definem que a

atividade dos complexos provém dos ligantes aminopiridina. Além disso, a coordenação dos ligantes aminopiridina potencializou a atividade antioxidante, uma vez que os complexos apresentaram um  $IC_{50}$  menor do que o ligante livre.



**FIGURA 3.13. Atividade antioxidante dos ligantes e complexos.** Curvas de inibição do padrão ácido ascórbico (A), ligante 3,4-diaminopiridina (B), complexo Ru3,4Apy (C) e complexo RuMe3,4Apy (D).

**TABELA 4.7. Valores de IC<sub>50</sub> do radical ABTS<sup>•+</sup> frente aos ligantes e complexos**

Composto	IC <sub>50</sub> (μM)	Composto	IC <sub>50</sub> (μM)
Ácido Ascórbico	19.97	Ru3,4Apy	2.94
BHT	7.24	Ru4Apy	>>100
3,4Apy	5.46	RuMe3,4Apy	3.25
4Apy	-	RuMe4Apy	-

Como espécies reativas de oxigênio estão intrinsicamente associadas ao peptídeo beta amilóide e a doença de Alzheimer, a atividade antioxidante apresentada pelos complexos pode ser uma das frentes de ação desses complexos no tratamento da doença.

#### 3.4.4. Viabilidade Celular

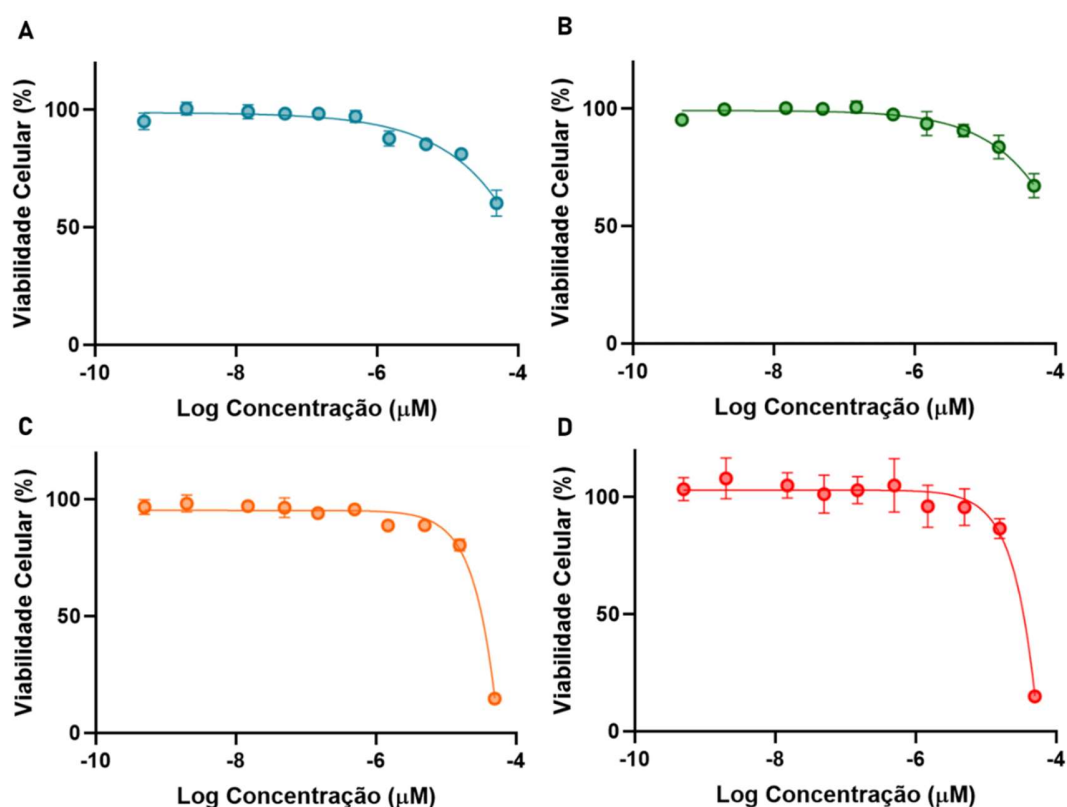
Para determinar potenciais efeitos citotóxicos dos complexos polipiridínicos de rutênio, ensaios de viabilidade celular frente a linhagem de neuroblastoma SH-SY5Y foram realizados monitorando a quantidade de ATP, o qual é um marcador da presença de células metabolicamente ativas<sup>142</sup>, presente após o tratamento com os complexos. Para tanto, foi utilizado o reagente CellTiter-Glo® o qual reage com ATP formando um composto luminescente em 540 nm. A toxicidade dos complexos foi avaliada em uma faixa de 0 a 50 μM, Figura 3.14.

A incubação com os complexos manteve a viabilidade celular acima de 80% para concentrações até 20 μM. Os complexos Ru3,4Apy e Ru4Apy apresentaram baixa toxicidade mesmo em concentrações mais altas, onde a viabilidade celular para as células tratadas com 50 μM foi de aproximadamente 60%, Tabela 4.8.

**TABELA 4.8. Valores de IC<sub>50</sub> da linhagem celular SH-SY5Y frente aos complexos de rutênio**

Composto	Linhagem Celular	IC <sub>50</sub> (μM)
Ru3,4Apy	SH-SY5Y	>> 50
Ru4Apy	SH-SY5Y	>> 50
RuMe3,4Apy	SH-SY5Y	32.6
RuMe4Apy	SH-SY5Y	34.2

Já os complexos RuMe3,4Apy e RuMe4Apy demonstraram alta toxicidade em concentrações mais altas, sendo a viabilidade celular à 50 μM para ambos os complexos em torno de 15%.



**FIGURA 3.14. Viabilidade celular da linhagem celular SH-SY5Y frente aos complexos de rutênio.** Resultados do ensaio de viabilidade CTG da linhagem celular

SH-SY5Y frente aos complexos (A) Ru<sub>3,4</sub>Apy, (B) Ru<sub>4</sub>Apy, (C) RuMe<sub>3,4</sub>Apy e (D) RuMe<sub>4</sub>Apy.

De modo geral, pode-se dizer que os quatros complexos apresentam baixa toxicidade quando comparados a outros complexos de rutênio, os quais são desenvolvidos como potenciais agentes anticancerígenos.<sup>142</sup> No entanto, para a proposta desse trabalho, a alta viabilidade celular apresentada na faixa de concentração 0-20 µM é uma característica positiva dos complexos sendo estudados, uma vez que os complexos foram desenvolvidos para interferir com a agregação do peptídeo beta amiloide, sem que haja interferência na integridade das células.

### 3.5. Conclusões Parciais

Esse capítulo abordou a síntese e caracterização de uma série de complexos polipiridínicos de rutênio (II) usando o complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(3,4Apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> (Ru<sub>3,4</sub>Apy) previamente estudado pelo grupo como complexo modelo. Assim os complexos Ru<sub>4</sub>Apy, RuMe<sub>3,4</sub>Apy, RuMe<sub>4</sub>Apy, além do complexo Ru<sub>3,4</sub>Apy foram sintetizados e suas estruturas e pureza confirmados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear.

Os quatro complexos apresentaram propriedades espectroscópicas bastante similares como já era esperado uma vez que os quatro complexos são bastante parecidos estruturalmente. A banda característica de MLCT é responsável pelas propriedades luminescentes dos complexos, os quais apresentam emissão na região do infravermelho próximo bem como tempos de vida de emissão longos na faixa de 150 ns, o que os torna bons candidatos a sondas luminescentes para o meio biológico.

Os complexos se mostraram estáveis quando mantidos no escuro e quando mantidos à 37 °C, porém se apresentaram suscetíveis à degradação fotoquímica quando irradiados continuamente na região da banda MLCT. Em meio aquoso, sob



irradiação, os ligantes monodentados aminopiridina são labilizados e trocados por moléculas de água, fazendo com que o complexo perca suas propriedades luminescentes.

Além disso, os complexos com ligantes 3,4-diaminopiridina apresentaram alta atividade antioxidante frente ao radical  $ABTS^{\cdot+}$  e a atividade antioxidante deste ligante foi potencializada ao ser coordenado ao centro metálico, uma vez que os complexos Ru3,4Apy e RuMe3,4Apy não só apresentaram maior atividade do que os antioxidantes controle mas também frente ao ligante livre.

Por último, a linhagem de neuroblastoma SH-SY5Y mostrou alta viabilidade celular quando exposta aos complexos, não sendo observada toxicidade em concentrações até 20  $\mu$ M.

# 4

## **Efeito dos Complexos de Ru(II) na Agregação do A $\beta$ 42**

*“If we knew what it was we were doing,  
it would not be called research, would it?”*

*- Albert Einstein*

## 4.1. Introdução

Para se estudar o efeito de uma dada molécula sobre o peptídeo beta amiloide é necessário avaliar a formação de agregados amiloides na ausência e na presença da mesma. A presença de moléculas que interajam com o as proteínas amilóide podem tanto interferir na agregação, retardando ou acelerando esse processo, ou pode levar à formação de agregados não fibrilares. Assim, a caracterização desse processo *in vitro* é fundamental para determinar a eficácia de moléculas com potencial atividade anti-amiloide.

Dois aspectos da formação de fibrilas amiloides podem ser caracterizadas *in vitro*: o processo de formação de fibrilas, tal como o mecanismo e cinética, e a estrutura das fibrilas formadas. Ambos os processos começam com a caracterização do peptídeo ou proteína por técnicas tradicionais usadas para estudar estrutura de proteínas. No entanto, como muitos peptídeos e proteínas amiloides são altamente propensos à agregação, técnicas que requerem baixa concentração de amostra são utilizadas com maior frequência para manter a proteína em sua forma monomérica.

A cinética de agregação pode ser estudada monitorando a formação de fibrilas em solução em dados intervalos. As técnicas mais comumente utilizadas para identificar a presença de fibrilas amiloides são fluorescência usando o corante ThT, birrefringência do corante Congo Red, microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e espectroscopia de infravermelho (FTIR).<sup>143</sup> Uma vez finalizado o processo de agregação, os agregados formados devem ser avaliados, estudando a estrutura secundária do peptídeo ou proteína, bem como a sua morfologia. Assim é possível avaliar se uma dada molécula influenciou o processo de agregação durante o seu curso, podendo ou não desviar a agregação de seu caminho amiloidogênico.

## 4.2. Objetivos do Capítulo

O presente capítulo tem como objetivo avaliar o efeito dos complexos polipiridínicos de Ru(II) Ru<sub>3,4</sub>Apy, Ru<sub>4</sub>Apy, RuMe<sub>3,4</sub>Apy e RuMe<sub>4</sub>Apy na agregação do A $\beta$ 42, bem como avaliar as espécies agregadas formadas.

## 4.3. Materiais e Métodos

O trabalho apresentado neste capítulo foi realizado no *Centre for Misfolding Diseases* na Universidade de Cambridge durante o estágio sanduíche.

### 4.3.1. Preparo do A $\beta$ 42 monomérico

O peptídeo A $\beta$ 42 liofilizado foi dissolvido em guanidina-HCl 6M e incubado por 3 horas a fim de dissolver quaisquer agregados pré-formados. O peptídeo foi purificado por cromatografia de exclusão de tamanho utilizando uma coluna preparativa (Cytiva Superdex 200 Increase 10/300 GL) e eluído em tampão NaPi (fosfato de sódio 20 mM, EDTA 0.2 mM, pH 8) preparado no dia do experimento. A concentração de proteína foi calculada usando o detector de UV do Sistema ÄKTA utilizado na purificação usando a média integrada do pico da proteína eluída (concentração = média da área do pico/0,2\*1490).

### 4.3.2. Supressão dos Corantes Amiloides

As fibrilas de A $\beta$ 42 foram pré-formadas por incubação sem agitação do A $\beta$ 42 monomérico em tampão NaPi a uma concentração de 8  $\mu$ M em uma placa de 96 poços de meia-área, *low binding* de fundo transparente (Corning 3881) em um volume final de 78  $\mu$ L por poço em um leitor de placas (FLUROstar Optima, BGM) a 37°C por 12 horas. As soluções contendo as fibrilas foram retiradas da placa, as réplicas combinadas e centrifugadas (Thermo Scientific Heraeus Pico 21) à 21000 rcf por 90 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de fibrila foi

ressuspensão em tampão no mesmo volume de antes para garantir a concentração de 8  $\mu$ M (equivalentes monoméricos). Estoques de 10 mM de cada um dos complexos foram preparados em DMSO e filtrados usando filtros de seringa de 0,02  $\mu$ M (Whatman Anotop 10/0,02). O potencial efeito de supressão dos complexos foi testado nos seguintes corantes amilóides: Tioflavina T, Tioflavina S, X34, Amytracker 630 e Niad-4. Para tanto foram preparadas soluções contendo 4  $\mu$ M (equivalentes monoméricos) de fibrilas, 20  $\mu$ M de corante amilóide e 10  $\mu$ M de um determinado complexo. A intensidade de fluorescência desta mistura foi comparada com uma solução de controle de fibrilas a 4  $\mu$ M (equivalentes monoméricos) e 20  $\mu$ M de corante amiloide. Uma solução de 20  $\mu$ M de cada corante amiloide também foi preparada para obter uma fluorescência de linha de base de cada corante. Todas as amostras foram aliqüotadas em uma placa de 96 poços e monitoradas por pelo menos três horas em um leitor de placas. Os filtros de excitação e emissão para cada um dos corantes foram  $\lambda_{ex}=440$  nm/ $\lambda_{em}=480$  nm para ThT,  $\lambda_{ex}=355$  nm/ $\lambda_{em}=460$ nm para ThS e X34,  $\lambda_{ex}=480$ nm/ $\lambda_{em}=620$  nm para Amytracker 630 e Niad-4. Todos os experimentos foram realizados como réplicas biológicas e os dados são apresentados como média  $\pm$  DP. O teste de comparação múltipla *one-way* ANOVA foi empregado para a análise da significância estatística entre grupos experimentais distintos. GraphPad Prism 9 (GraphPad Software) foi aplicado para todas as análises estatísticas dos dados.

### 4.3.3. Nefelometria

Soluções estoques dos complexos a 10 mM foram preparadas em 100% DMSO (Thermo Scientific), filtrados com filtros de seringa 0.02  $\mu$ M (Whatman Anotop 10/0.02) e diluídos conforme a necessidade. Um estoque de 10  $\mu$ M de A $\beta$ 42 foi preparado diluindo o peptídeo proveniente da cromatografia de exclusão de tamanho em tampão NaPi. Esse estoque foi então aliqüotado em diferentes *ependorfs* em um

volume final de 247.5  $\mu$ L, onde 2.5  $\mu$ L do complexo foram adicionados. Diferentes proporções amiloide:complexo foram testadas (1:0.625; 1:1.25; 1:2.5; 1:5). Após a adição do complexo, todas as amostras foram homogeneizadas 8 vezes com a pipeta e incubadas no gelo por 30 minutos. Após 30 minutos, as amostras foram aliqüotadas em uma placa de 96 poços de meia-área, *low binding* de fundo transparente (Corning 3881) em um volume final de 78  $\mu$ L. A placa foi coberta com uma tampa transparente e vedada com parafilme. A placa foi então incubada sem agitação no nefelômetro (NEPHELOstar Plus, BGM) a 37°C por 4 horas. Todos os experimentos foram realizados como réplicas biológicas e os dados são apresentados como média  $\pm$  DP. O teste de comparação múltipla *one-way* ANOVA foi empregado para a análise da significância estatística entre grupos experimentais distintos. GraphPad Prism 9 (GraphPad Software) foi aplicado para todas as análises estatísticas dos dados.

#### 4.3.4. Espectrometria de Massas

Soluções estoques dos complexos a 10 mM foram preparadas em 100% DMSO (Thermo Scientific) e filtrados com filtros de seringa 0.02  $\mu$ M (Whatman Anotop 10/0.02) e diluídos conforme a necessidade. Um estoque de 10  $\mu$ M de A $\beta$ 42 foi preparado diluindo o peptídeo proveniente da cromatografia de exclusão de tamanho em tampão NaPi. Esse estoque foi então aliqüotado em diferentes *ependorfs* em um volume final de 247.7  $\mu$ L, onde 2.5  $\mu$ L do complexo foram adicionados. Após a adição do complexo, todas as amostras foram homogeneizadas 8 vezes com a pipeta e incubadas no gelo por 30 minutos. Após os 30 minutos, as amostras foram diluídas a uma concentração final de 5  $\mu$ M de proteína para a realização da medida. A espectrometria de mobilidade iônica foi realizada no espectrômetro de massas Waters Vion IMS-QToF, onde 1  $\mu$ L de cada amostra foi injetada no equipamento com um tempo de retenção máximo de 7 minutos. O sistema foi lavado com 3  $\mu$ L de água entre as amostras para minimizar a contaminação entre amostras. Os espectros

de massas foram reconstruídos usando o algoritmo MaxEnt no software MassLynx de acordo com o manual.

#### 4.3.5. Microscopia de Transmissão Eletrônica

Soluções estoques dos complexos a 10 mM foram preparadas em 100% DMSO (Thermo Scientific) e filtrados com filtros de seringa 0.02  $\mu$ M (Whatman Anotop 10/0.02) e diluídos conforme a necessidade. Um estoque de 10  $\mu$ M de A $\beta$ 42 foi preparado diluindo o peptídeo proveniente da cromatografia de exclusão de tamanho em tampão NaPi. Esse estoque foi então aliqotado em diferentes *ependorfs* em um volume final de 245.5  $\mu$ L, onde 2.5  $\mu$ L do complexo foram adicionados. Após a adição do complexo, todas as amostras foram homogeneizadas 8 vezes com a pipeta e incubadas no gelo por 30 minutos. Após 30 minutos, as amostras foram aliqotadas em uma placa de 96 poços de meia-área, *low binding* de fundo transparente (Corning 3881) em um volume final de 78  $\mu$ L. A placa foi coberta com uma tampa transparente e vedada com parafilme. A placa foi então incubada sem agitação no nefelômetro (NEPHELOstar Plus, BGM) a 37°C por 4 horas. As soluções foram retiradas da placa, as réplicas unificadas e centrifugadas (Eppendorf 5424 R) a 21000 rcf à 4 °C por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de fibrila foi ressuspenso em água MilliQ no mesmo volume de antes para garantir a concentração de 10  $\mu$ M (equivalentes monoméricos). As amostras obtidas (5  $\mu$ L) foram depositadas em grades de cobre recobertas por filme de carbono 400 mesh 3mm. As grades foram lavadas uma vez com água MilliQ, incubadas com acetato de uranila 1% (m/v) por 2 minutos, lavadas posteriormente duas vezes com água MilliQ e secas ao ar à temperatura ambiente. As imagens foram obtidas pela Dra. Heather Greer no *Cambridge Advanced Imaging Centre* usando o microscópio eletrônico TALOS F200X G2 operando entre 80-200 keV. Todas as imagens foram analisadas e processadas utilizando o *software* ImageJ.

### 4.3.6. Dicroísmo Circular

Soluções estoques dos complexos a 10 mM foram preparadas em 100% DMSO (Thermo Scientific) e filtrados com filtros de seringa 0.02  $\mu$ M (Whatman Anotop 10/0.02) e diluídos conforme a necessidade. Um estoque de 20  $\mu$ M de A $\beta$ 42 foi preparado diluindo o peptídeo proveniente da cromatografia de exclusão de tamanho em tampão NaPi. Esse estoque foi então aliquotado em diferentes *ependorfs* em um volume final de 247.5  $\mu$ L, onde 2.5  $\mu$ L do complexo foram adicionados. As amostras foram incubadas na proporção 1:5 amilóide:complexos nos *ependorfs* em uma incubadora estática (HeraTherm Incubator, Thermo Fischer) à 37°C durante 24 horas. As amostras foram centrifugadas (Eppendorf 5424 R) a 21000 rcf à 4 °C por 90 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de fibrila foi ressuspensão em água MilliQ no mesmo volume de antes para garantir a concentração de 20  $\mu$ M (equivalentes monoméricos). Os espectros de dicroísmo circular foram obtidos utilizando o espectrofotômetro Jasco J-815 e uma cubeta de caminho ótico de 1 mm após 15 acumulações.

## 4.4. Resultados e Discussão

O peptídeo A $\beta$ 42 foi escolhido para os ensaios com os complexos uma vez que ele é a isoforma mais abundante encontrada nas placas senis em pacientes da doença de Alzheimer, como já apresentado no Capítulo 1 deste trabalho. A partir desse ponto, todas as menções do peptídeo beta amiloide, mesmo que não especificadas se referem a isoforma A $\beta$ 42.

### 4.4.1. Interferência dos complexos na emissão de corantes amiloides

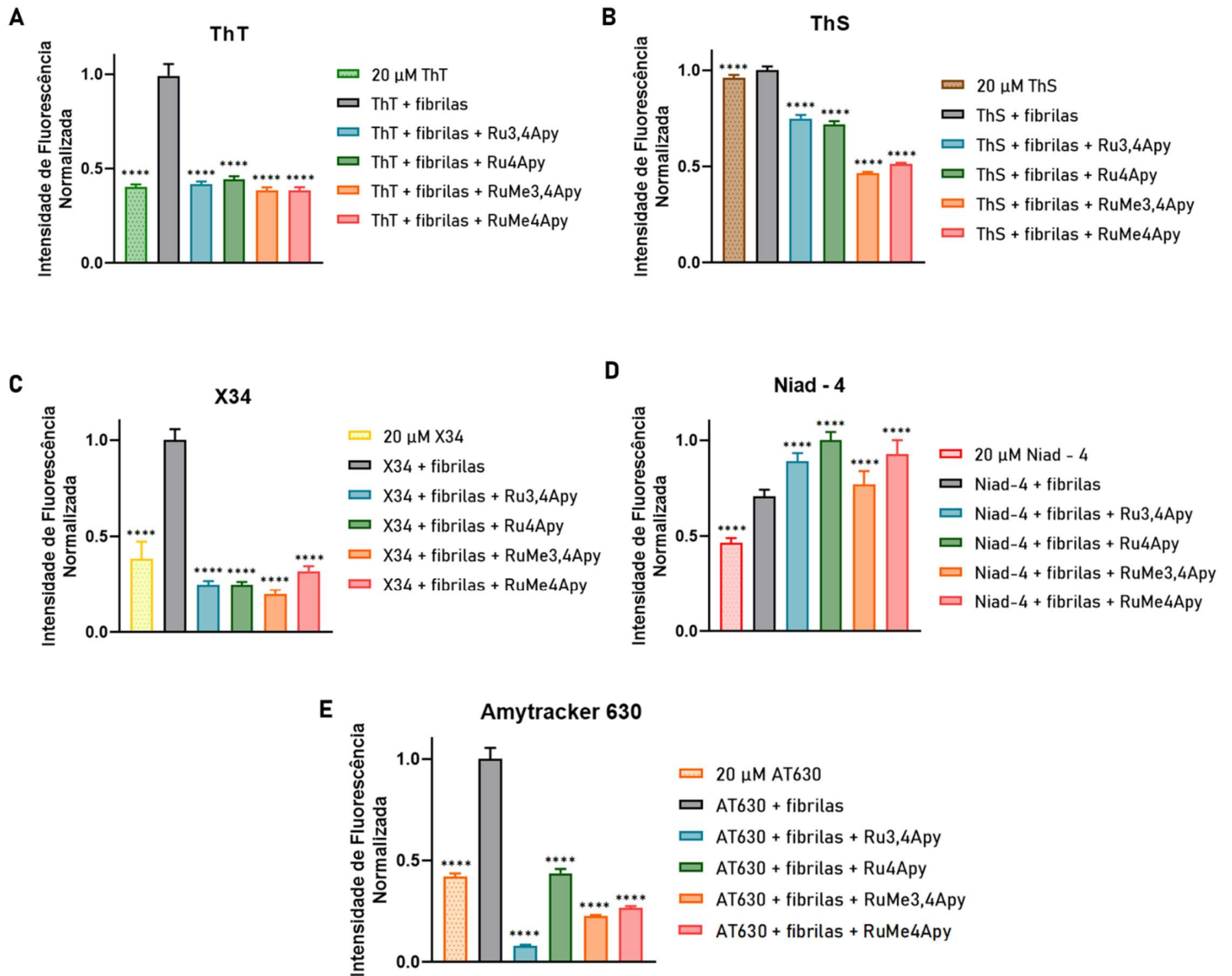
O processo de agregação de proteínas amilóides é normalmente monitorado por fluorescência, acompanhando a resposta luminescente de corantes orgânicos com especificidade em agregados amilóides. Idealmente um aumento na fluorescência



dos corantes é observado à medida que a proteína vai agregando. O corante amilóide mais utilizado na literatura é a Tioflavina T (ThT), sendo sua emissão em 480 nm é monitorada no decorrer da agregação. No entanto, como a emissão da ThT, assim como de outros corantes amilóides, e a absorção dos complexos de rutênio coincidem em seus comprimentos de onda, o potencial efeito de supressão da emissão dos corantes foi estudado antes de escolher o qual seria utilizado nos estudos de agregação.

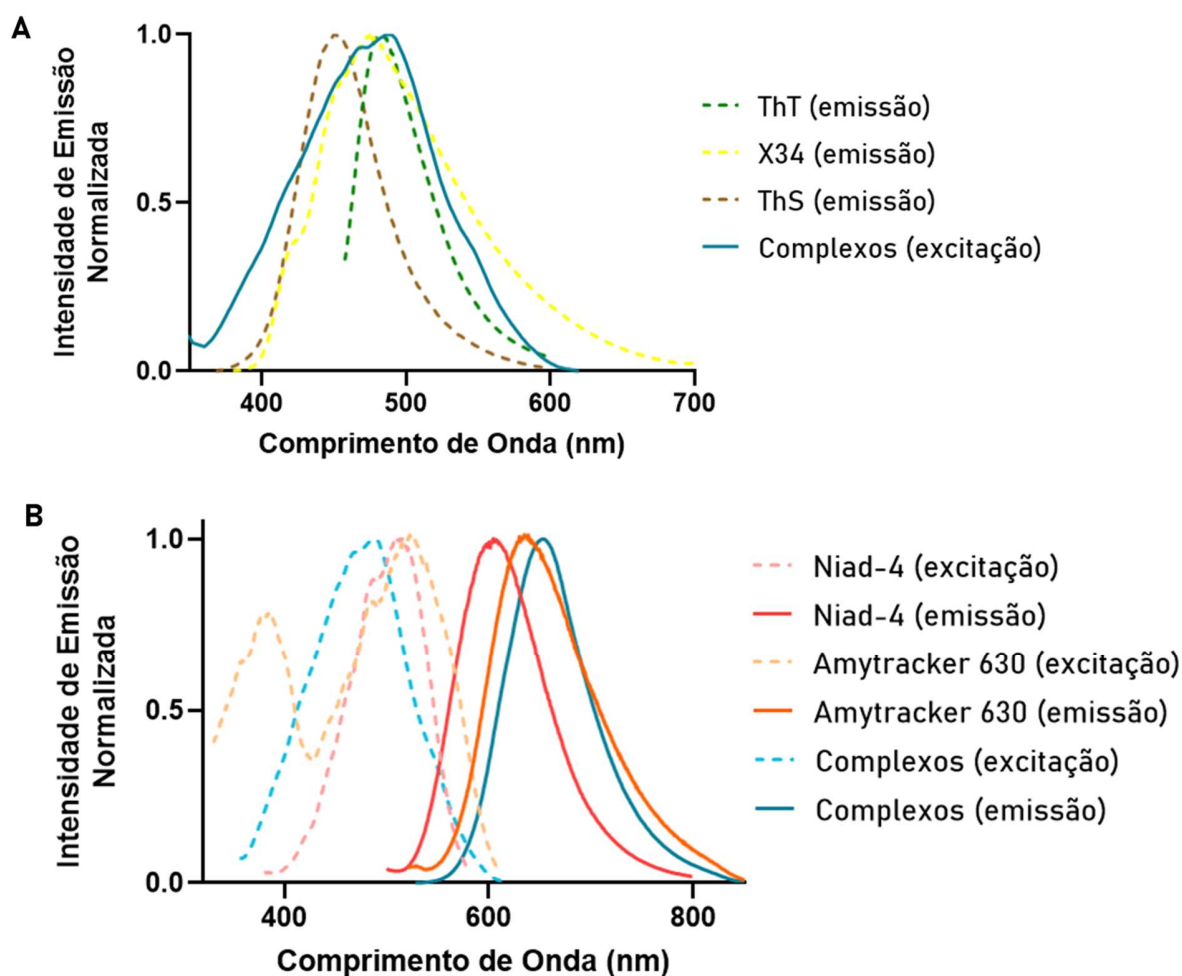
Para tanto, fibrilas foram formadas a partir do beta amilóide monomérico e soluções contendo o corante amilóide e cada um dos complexos foram preparadas e a resposta luminescente do sistema formado monitorada durante 3 horas. Foram testados os corantes amiloides Tioflavina T (ThT), X34, Niad-4, Tioflavina S (ThS) e Amytracker 630, Figura 4.1. Os quatro complexos apresentaram supressão ou interferência em todos os corantes testados onde, muito provavelmente, processos de transferência de energia do tipo FRET ocorreram.

A transferência de energia de Förster (FRET) é um fenômeno onde um doador no estado excitado transfere energia para um grupo aceptor através de um processo não radiativo, sendo esse processo altamente dependente da distância entre o doador e o aceptor.<sup>128</sup> Para que a FRET ocorra o grupo doador deve possuir alta absorvidade molar e alto rendimento quântico de emissão, tal como é o caso dos corantes amiloides. A sobreposição do espectro de emissão do doador (corantes) e o espectro de absorção do aceptor (complexos) significa que a energia perdida pelo doador pode excitar o grupo aceptor. Quanto maior a sobreposição espectral, maior a eficiência da transferência de energia. Para os corantes ThT, X34 e ThS a sobreposição espectral é praticamente total, Figura 4.2.A, explicando a supressão da emissão dos corantes. Para os corantes Niad-4 e Amytracker 630, há uma sobreposição tanto dos espectros de absorção como dos espectros de emissão, Figura 4.2.B.



**FIGURA 4.1. Interferência dos complexos na emissão dos corantes amilóides.**

Fibrilas pré-formadas do A $\beta$ 42 (4 $\mu$ M) foram incubadas com diferentes corantes amilóides à 20 $\mu$ M na ausência (controle) e na presença de 10  $\mu$ M de cada um dos complexos afim de determinar qualquer efeito de supressão da emissão dos corantes amilóides. Todos os complexos apresentaram interferência na emissão dos corantes testados, restringindo o uso dos mesmos em ensaios de cinética de agregação. One-way ANOVA. \* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ , \*\*\* $P \leq 0.001$ , \*\*\*\* $P \leq 0.0001$ , ns = não significativo.



**FIGURA 4.2. Interferência dos complexos na emissão dos corantes amilóides.**

Espectros de excitação e emissão dos corantes amiloides testados. Para todos, a emissão ou excitação dos corantes coincide com a emissão ou excitação dos complexos (A) ou ambos (B), facilitando assim os processos de supressão entre os corantes e os complexos.

Embora os espectros de emissão dos corantes Niad-4 e Amytracker 630 não se sobreponham necessariamente com o espectro de absorção dos complexos, uma interferência na emissão dos corantes é observada em ambos os casos. Para o Niad-4 a emissão na presença dos complexos é aumentada em relação ao controle, podendo haver uma somatória das emissões do corante e complexo. Já para o Amytracker 630

uma supressão da emissão do corante é observada, onde processos de transferência de energia podem estar ocorrendo.

Assim, o uso de fluorescência para determinar a influência dos complexos na agregação do beta amiloide foi descartada, uma vez que a interferência dos complexos na fluorescência dos corantes pode levar a conclusões errôneas.

#### 4.4.2. Nefelometria

Uma vez que técnicas que fazem uso de fluorescência e corantes amiloides padrões reportados na literatura não puderam ser utilizadas, outra forma teve que ser explorada para monitorar a cinética de agregação do A $\beta$ 42 na presença dos complexos. A técnica de nefelometria, a qual monitora a turbidez da solução à medida que o processo de agregação se desenvolve, foi escolhida para monitorar esse fenômeno.<sup>144</sup> Essa técnica não faz uso de corantes, sendo a solução medida pelo equipamento composta somente pelo A $\beta$ 42, solução tampão e complexo. À medida que agregados maiores são formados, os quais se tornam insolúveis, a turbidez da solução aumenta, obtendo-se assim uma curva sigmoideal correspondente à formação de agregados. As amostras incubadas com os complexos Ru<sub>3,4</sub>Apy, RuMe<sub>3,4</sub>Apy e RuMe<sub>4</sub>Apy exibiram valores de unidades relativas de nefelometria (URNs) menores quando comparadas ao controle, sendo que os complexos RuMe<sub>3,4</sub>Apy e RuMe<sub>4</sub>Apy apresentaram a maior diferença referente ao controle nas proporções 1:2.5 e 1:5 amiloide:complexo, Figura 4.3. O complexo Ru<sub>4</sub>Apy não apresentou diferença estatisticamente relevante em nenhuma das proporções estudadas. Além disso, os complexos Ru<sub>3,4</sub>Apy e Ru<sub>4</sub>Apy não mostraram diferença na velocidade na cinética de agregação do A $\beta$ 42 para nenhuma das concentrações estudadas.

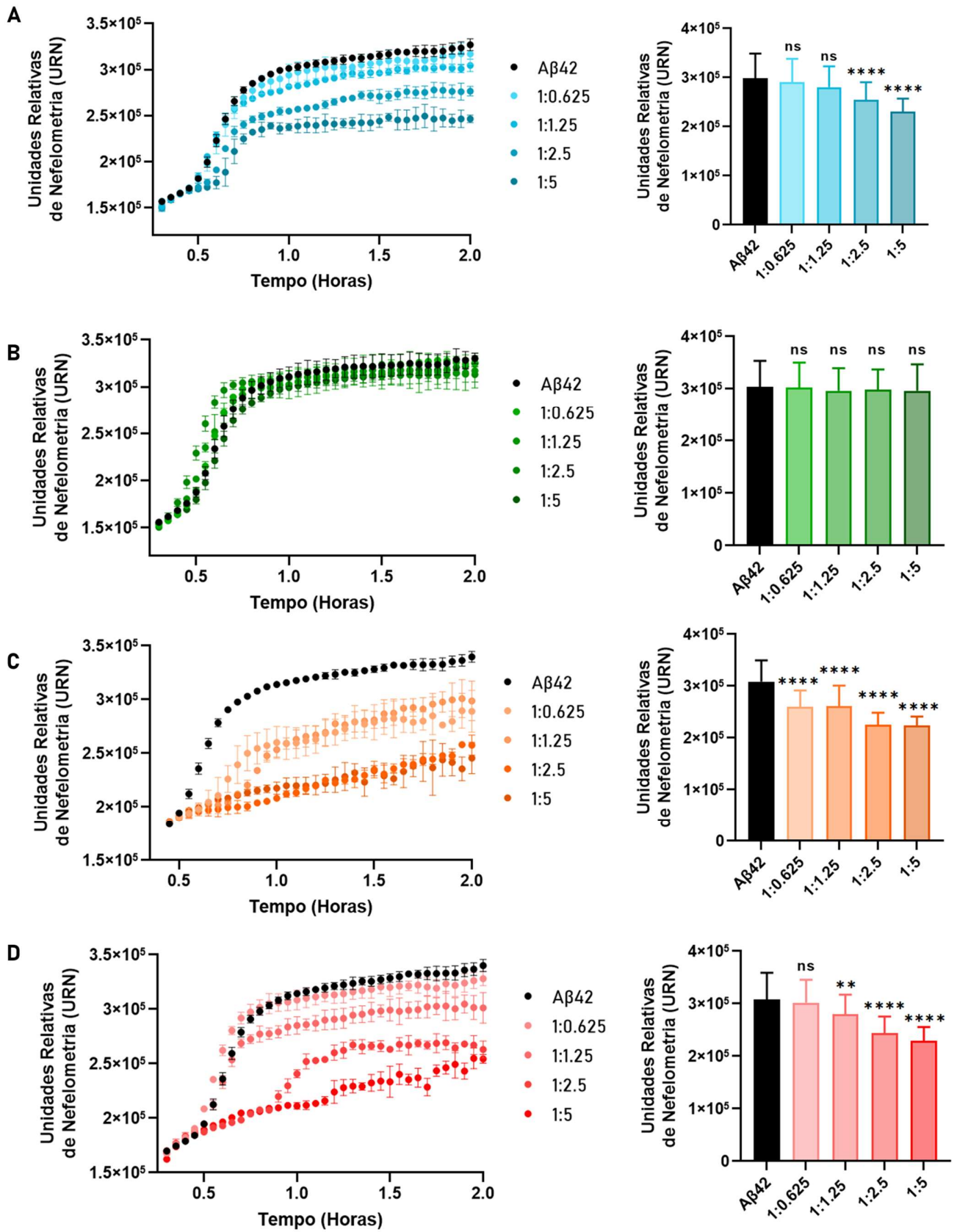
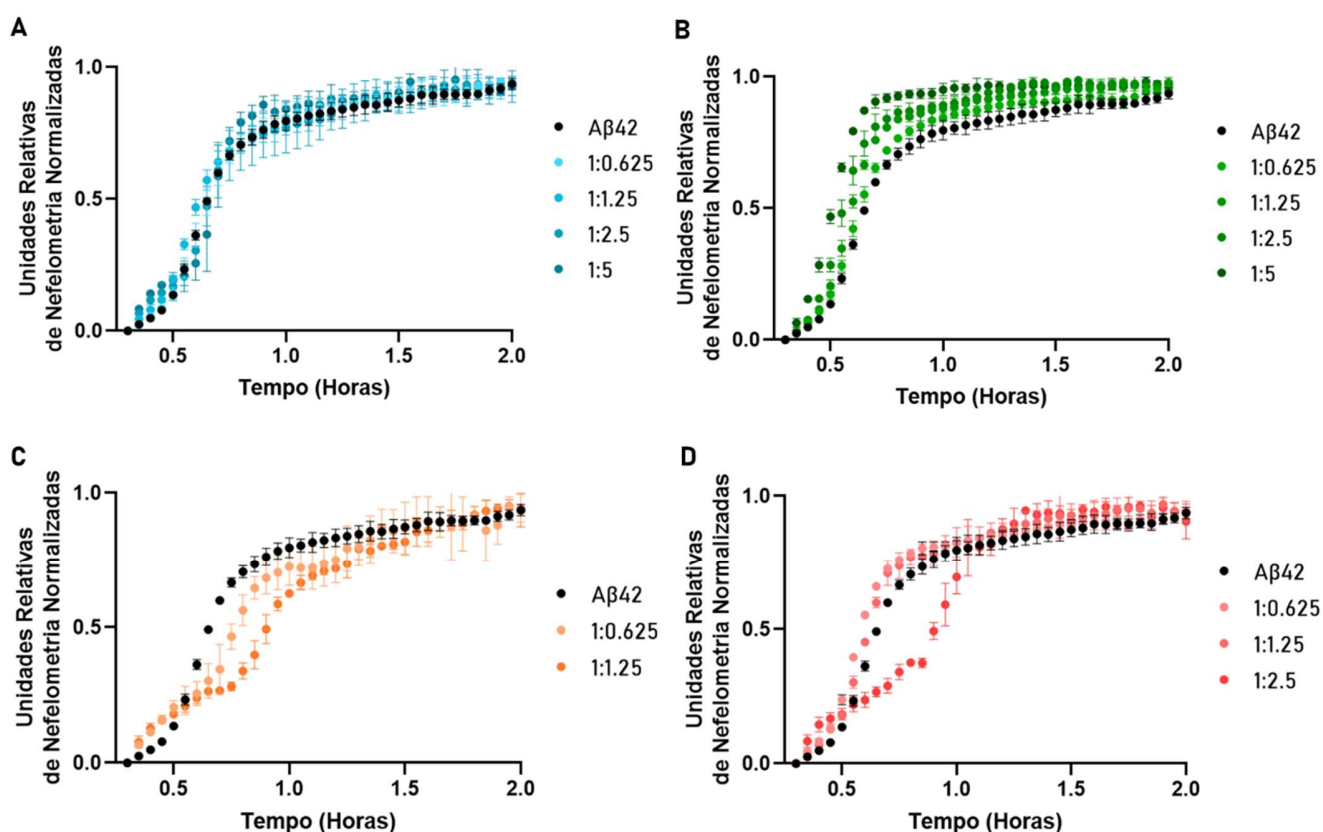


FIGURA 4.3. Complexos afetam o processo de agregação do A $\beta$ 42. Nefelometria

do processo de agregação do A $\beta$ 42 à 10  $\mu$ M na ausência (A $\beta$ 42) e presença dos complexos (A) Ru<sub>3,4</sub>Apy, (B) Ru<sub>4</sub>Apy, (C) RuMe<sub>3,4</sub>Apy e (D) RuMe<sub>4</sub>Apy. One-way ANOVA. \*P  $\leq$  0.05, \*\*P  $\leq$  0.01, \*\*\*P  $\leq$  0.001, \*\*\*\*P  $\leq$  0.0001, ns = não significativo.

Através dos gráficos normalizados foi possível observar que os complexos RuMe<sub>3,4</sub>Apy e RuMe<sub>4</sub>Apy apresentam um retardo na fase de nucleação nas proporções 1:1.25 e 1:2.5, respectivamente. Figura 4.4. Os complexos RuMe<sub>3,4</sub>Apy e RuMe<sub>4</sub>Apy não exibiram curvas sigmóides nas proporções 1:2.5, 1:5 e 1:5, respectivamente.



**FIGURA 4.4.** Complexos influenciam a velocidade de agregação do A $\beta$ 42.

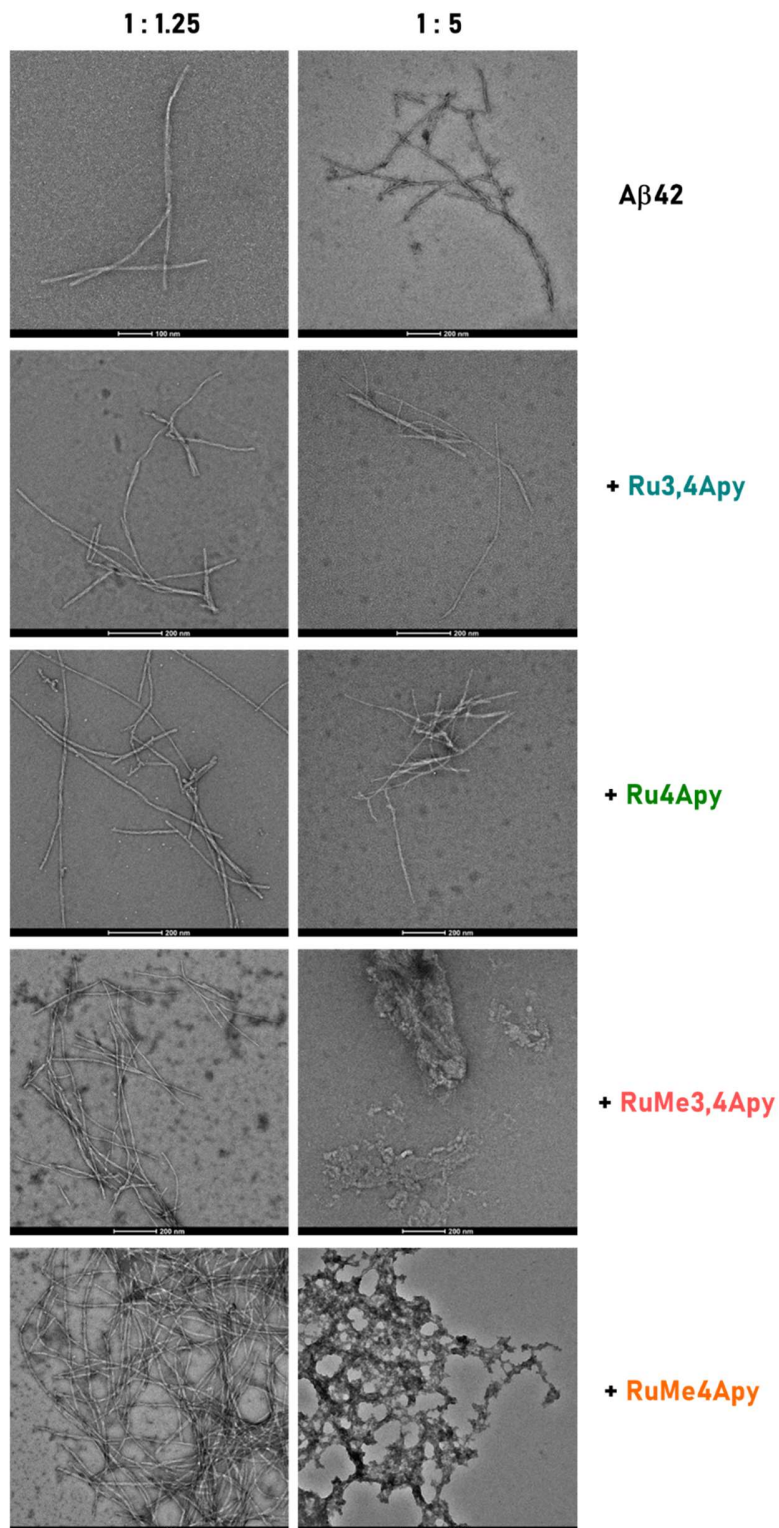
Nefelometria normalizada do processo de agregação do A $\beta$ 42 à 10  $\mu$ M na ausência

(controle) e presença dos complexos (A) Ru<sub>3,4</sub>Apy, (B) Ru<sub>4</sub>Apy, (C) RuMe<sub>3,4</sub>Apy e (D) RuMe<sub>4</sub>Apy.

No entanto, ao contrário de ensaios de fluorescência usando a ThT, a qual é sensível às estruturas de folhas beta, não é possível obter nenhuma informação adicional sobre os agregados formados através da técnica de nefelometria. O sinal de turbidez irá aumentar independentemente se o agregado formado é estruturado ou não. Assim foi necessário o uso de técnicas complementares para investigar os agregados formados na presença dos complexos, com principal atenção aos complexos RuMe<sub>3,4</sub>Apy e RuMe<sub>4</sub>Apy, os quais apresentaram maior diferença em relação ao controle.

#### 4.4.3. Morfologia dos Agregados Formados

Os agregados formados na presença dos complexos foram estudados através de diferentes técnicas. A partir dos resultados de nefelometria, imagens de microscopia de transmissão eletrônica foram obtidas a fim de avaliar a morfologia dos agregados formados na presença dos complexos nas proporções 1:1.25 e 1:5 amilóide-complexo. Foi possível observar que em proporções baixas (1:1.25) os agregados formados sob a influência de todos os complexos são fibrilares, podendo então concluir que nessa proporção a agregação não é desviada de seu caminho normal. No entanto, em proporções altas (1:5) fibrilas são formadas na presença dos complexos Ru<sub>3,4</sub>Apy e Ru<sub>4</sub>Apy enquanto os complexos RuMe<sub>3,4</sub>Apy e RuMe<sub>4</sub>Apy induzem a formação de agregados amorfos, Figura 4.5. Agregados amorfos, em teoria, podem ser removidos mais facilmente por fagocitose mediada por microglia ou autofagia do que agregados ricos em folhas beta, como é o caso de fibrilas amiloides.<sup>145</sup>



**FIGURA 4.5.** Complexos induzem a formação de agregados amorfos de acordo com sua proporção em relação ao peptídeo. Imagens de microscopia eletrônica de



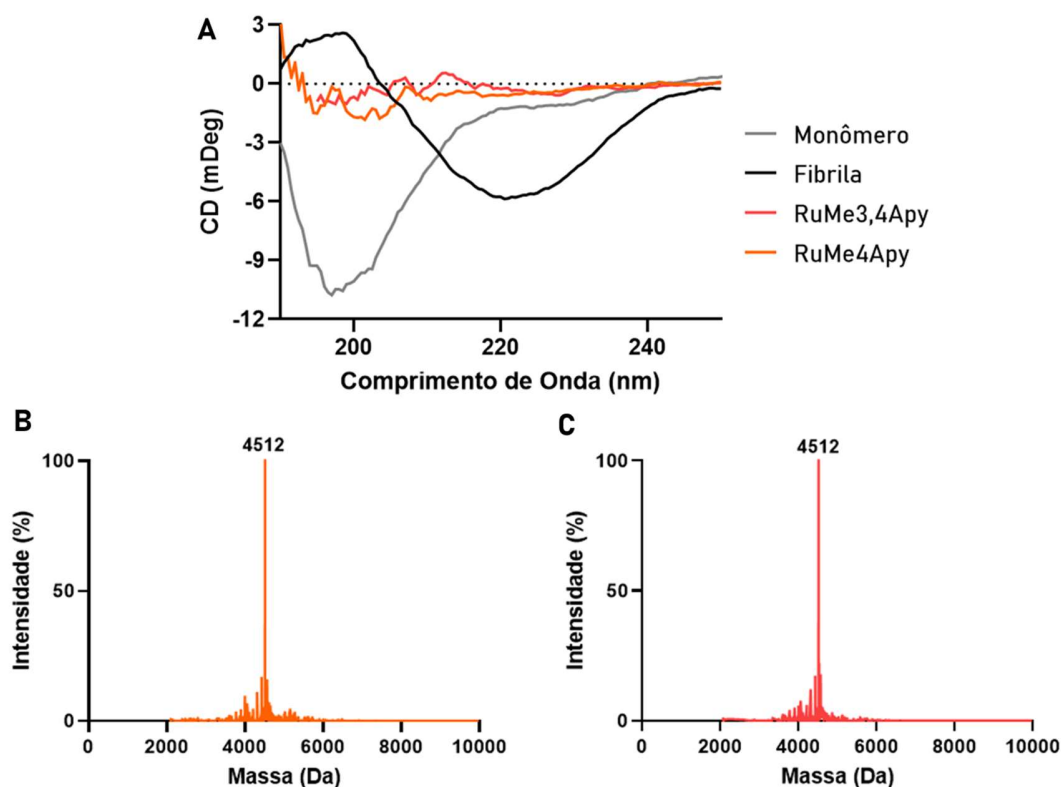
transmissão dos agregados formados após a agregação do A $\beta$ 42 (10  $\mu$ M) na ausência e na presença dos complexos quando incubados nas proporções 1:1.25 e 1:5 amilóide-complexo.

Os agregados observados por TEM corroboram os resultados obtidos na nefelometria, principalmente para os complexos RuMe<sub>3,4</sub>Apy e RuMe<sub>4</sub>Apy, onde desvios da curva sigmóide foram observadas para esses dois complexos.

A formação de agregados amorfos como os observados para os complexos RuMe<sub>3,4</sub>Apy e RuMe<sub>4</sub>Apy na presença de complexos de rutênio já foi reportada previamente na literatura.<sup>100,101,146</sup> No entanto, todos os complexos reportados previamente com esse comportamento apresentam sítios livres de coordenação, onde o íon Ru(II) se coordena aos resíduos de histidina do peptídeo e, portanto, essa mudança no caminho de agregação se dá devido à uma ligação covalente entre as duas espécies. Contudo, complexos com sítios de coordenação abertos não são seletivos a uma dada proteína, e podem se ligar de forma permanente a qualquer outra molécula ou proteína que esteja no mesmo ambiente, o que pode diminuir a sua eficácia e levar a possíveis complicações. Por outro lado, os complexos apresentados neste trabalho também levam à formação de agregados amorfos, porém isso se dá de forma não covalente, uma vez que os complexos RuMe<sub>3,4</sub>Apy e RuMe<sub>4</sub>Apy são estáveis e possuem seus seis sítios de coordenação ocupados pelos ligantes.

Outro ponto importante a ser ressaltado é que somente os complexos com as fenantrolinas funcionalizadas redirecionaram a agregação para formar complexos amorfos em proporções super estequiométricas. Assim, pode-se então hipotetizar que a interação entre o peptídeo e os complexos é dada através dos ligantes fenantrolina e que a presença das funcionalizações metila auxilia na interação entre os dois, uma vez que o complexo se torna mais hidrofóbico com os ligantes Mephen.

A estrutura secundária dos agregados formados foi analisada através da técnica de dicroísmo circular, a qual confirmou que os agregados formados na presença dos complexos RuMe<sub>3,4</sub>Apy e RuMe<sub>4</sub>Apy de fato não possuem estrutura secundária de folha beta sendo que os agregados não amiloidogênicos observados não possuem estrutura secundária definida, como é o caso de agregados fibrilares, Figura 4.6A. Através de espectroscopia de massas foi possível constatar que os complexos de fato não se ligam covalentemente ao peptídeo em seu estado monomérico, uma vez que a massa molecular do peptídeo (~ 4.5 kDa) se mostrou inalterada ao ser incubada com os complexos, Figura 4.6B e C.



**FIGURA 4.6. Complexos RuMe<sub>3,4</sub>Apy e RuMe<sub>4</sub>Apy induzem a formação de agregados amorfos.** (A) Espectros de dicroísmo circular dos agregados de A $\beta$ 42 formados na ausência (preto - fibrila) e presença dos complexos RuMe<sub>3,4</sub>Apy e RuMe<sub>4</sub>Apy na proporção de 1:5 (amiloide:complexo). Espectrometria de massas do

peptídeo A $\beta$ 42 monomérico incubado com os complexos (B) RuMe<sub>3,4</sub>Apy e (C) RuMe<sub>4</sub>Apy.

#### 4.5. Conclusões Parciais

Neste capítulo foram discutidos os efeitos dos complexos Ru<sub>3,4</sub>Apy, Ru<sub>4</sub>Apy, RuMe<sub>3,4</sub>Apy e RuMe<sub>4</sub>Apy no processo de agregação do peptídeo beta amiloide, bem como nos agregados formados.

Inicialmente foi determinado que os complexos, devido a sua região de absorção e emissão, participavam como aceptores em processos de transferência de energia com os corantes amiloides que são comumente utilizados como padrão em ensaios de fluorescência no monitoramento da agregação do A $\beta$ . Assim, foi utilizada a técnica de nefelometria, a qual segue a agregação do peptídeo sem utilizar corantes, para monitorar possíveis mudanças no comportamento do peptídeo durante a sua agregação. Os complexos Ru<sub>3,4</sub>Apy, RuMe<sub>3,4</sub>Apy e RuMe<sub>4</sub>Apy apresentaram uma diminuição na quantidade de agregados formados dependente da concentração de complexo utilizada, onde os complexos com as fenantrolinas funcionalizadas apresentaram maior influência do que os complexos análogos sem funcionalização. O complexo Ru<sub>4</sub>Apy não apresentou nenhuma diferença. Os complexos RuMe<sub>3,4</sub>Apy e RuMe<sub>4</sub>Apy apresentaram um retardamento na agregação, enquanto os complexos Ru<sub>3,4</sub>Apy e Ru<sub>4</sub>Apy não influenciaram na cinética de agregação.

Uma vez terminada a agregação, os agregados formados foram analisados por microscopia de transmissão eletrônica e dicroísmo circular. Com essas medidas pode-se constatar que os complexos influenciam a agregação de acordo com a proporção em que os mesmos se encontram em relação ao peptídeo. Em proporções sub e estequiométricas, fibrilas amiloides são formadas. Já em proporções super estequiométricas, a formação de fibrilas não é influenciada pelos complexos Ru<sub>3,4</sub>Apy e Ru<sub>4</sub>Apy, porém os complexos RuMe<sub>3,4</sub>Apy e RuMe<sub>4</sub>Apy levam à

formação de agregados amorfos. Isso demonstra a importância da funcionalização das fenantrolinas, as quais são peças importantes na interação e efeito dos complexos na agregação do A $\beta$ 42.

A ausência de estrutura secundária definida dos agregados amorfos foi confirmada com dicroísmo circular, onde os sinais dos agregados formados não correspondiam a estruturas de folha beta ou alfa hélice. Através de espectroscopia de massas foi constatado que os complexos não se ligam covalentemente ao peptídeo em sua forma monomérica, e influenciam então a agregação do peptídeo de forma não-covalente, induzindo a formação de agregados não amiloidogênicos.

# 5

## **Influência dos Complexos De Ru(II) em um Modelo *in vivo* da Doença de Alzheimer**

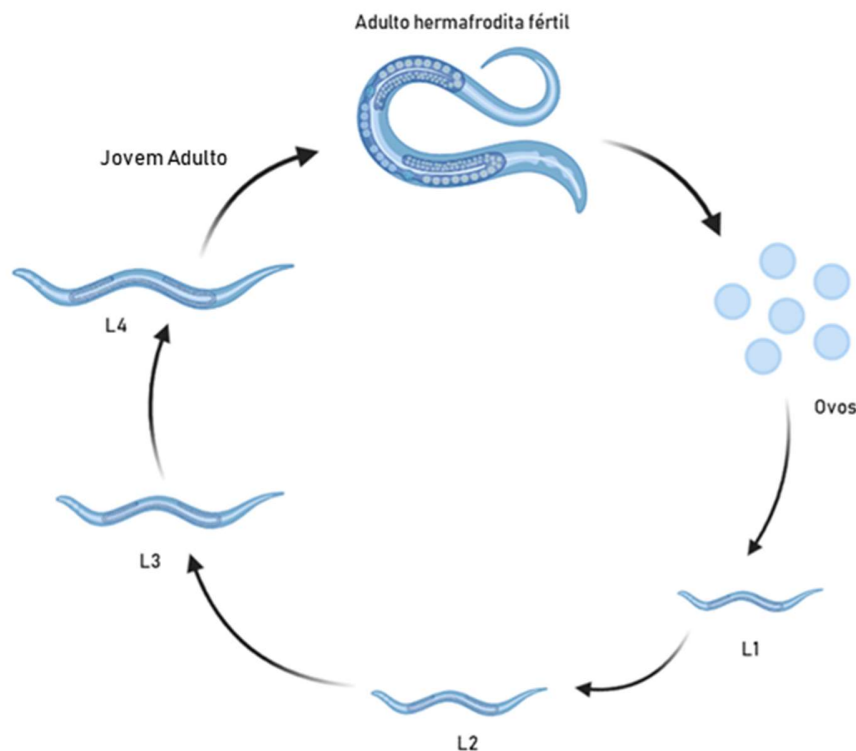
*“We are all worms. But I believe that I am a glow worm.”*

*- Winston Churchill*

## 5.1. Introdução

Apesar de sua aparente simplicidade, o nematoide *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) se desenvolveu em um modelo importante na pesquisa biomédica, particularmente na caracterização funcional de novos alvos terapêuticos que foram identificados usando tecnologias genômicas.<sup>147</sup>

A espécie *C. elegans* possui uma série de propriedades que a torna uma ferramenta importante na indústria farmacêutica. Primeiramente, os indivíduos são fáceis de serem cultivados: mesmo que na natureza cresçam no solo e se alimentando de várias bactérias, são facilmente capazes de serem cultivados em laboratório com uma dieta de *Escherichia coli*. Além disso, os nematoides se reproduzem rapidamente e em grandes quantidades, onde em 3 dias os ovos se desenvolvem em nematoides adultos de 1.3 mm de comprimento, Figura 5.1.



**FIGURA 5.1.** Ciclo de vida dos nematoides *C. elegans*. Em três dias, os ovos de *C. elegans* passam por quatro estágios larvais até chegar a fase adulta, onde são capazes de se reproduzirem.

Os adultos, os quais são hermafroditas e, portanto, se autofecundam, produzem ovos, os quais se desenvolvem em larvas. Após quatro fases larvais, os indivíduos entram na fase adulta e amadurecem em um dia para seu estágio final fértil.

*C. elegans* também é um organismo modelo, possuindo sistema nervoso, músculos, intestino e sistema reprodutivo, mas sem a complexidade de mamíferos. Isso faz com que estudos usando *C. elegans* requeiram menos espaço, populações maiores possam ser utilizadas, obtendo resultados mais rápidos quando comparados a ensaios com camundongos. Além disso, o corpo transparente desses animais facilita a visualização através de técnicas de microscopia. As *C. elegans* são amplamente utilizadas como modelos *in vivo* para doenças relacionadas ao envelhecimento, uma vez que devido ao ciclo de vida curto desses animais (expectativa de vida entre 10 a 15 dias) é possível observar o envelhecimento natural ao invés de envelhecimento acelerado, como é o caso de animais de maior complexidade.<sup>147</sup>

No entanto, a aparente simplicidade das *C. elegans* não deve mascarar a alta complexidade observada a níveis celular e fisiológico. Modelos de doenças humanas em *C. elegans* podem ser correlacionados mais diretamente quando o alvo dos fármacos a serem estudados é conservado entre as duas espécies. De fato, isso ocorre na maioria dos casos, uma vez que já foram identificados entre 60-80% de genes humanos homólogos em *C. elegans*.<sup>148,149</sup> Assim, esses nematoides são um bom modelo para entender doenças que afetam humanos, bem como uma boa ferramenta para testar potenciais candidatos à fármacos.

## 5.2. Objetivos do Capítulo

Esse capítulo tem como objetivo avaliar o efeito dos complexos polipiridínicos de Ru(II) RuMe<sub>3</sub>,4Apy e RuMe<sub>4</sub>Apy em um modelo *in vivo* da doença de Alzheimer usando os nematoides *C. elegans*.

### 5.3. Materiais e Métodos

O trabalho apresentado neste capítulo foi realizado no *Centre for Misfolding Diseases* na Universidade de Cambridge durante o estágio sanduíche.

#### 5.3.1. Linhagens de *C. elegans*

Todas as linhagens de *C. elegans* foram adquiridas do *Caenorhabditis Genetics Center (CGC)*, o qual é financiado pelo *National Institutes of Health Office of Research Infrastructure Programs (P40 OD010440)*. Duas linhagens foram utilizadas para esses experimentos. A linhagem sensível à temperatura, a qual expressa beta amilóide humano *dvls100* [unc-54p::A-beta-1-42::unc-54 3'-UTR+mtl-2p::GFP] (GMC101) foi utilizada, no qual *mtl-2p::GFP* causa a expressão de GFP na parede intestinal dos animais e *unc-54p::A-beta-1-42* expressa A $\beta$ 42 humano nas paredes musculares dos animais. Aumentar a temperatura acima de 20° C no estágio L4 ou estágio adulto causa parálise devido à agregação do A $\beta$ 42 na parede muscular. A linhagem N2 foi utilizada como controle (nematóides *wild-type*).

#### 5.3.2. Meio de Cultura *C. elegans*

Condições padrão foram utilizadas para a propagação de *C. elegans*.<sup>150</sup> Os animais foram sincronizados fazendo *bleaching* com uma solução de hipoclorito de sódio e hidróxido de sódio (3 mL NaOH 10M, 5 mL de hipoclorito de sódio 12-14%, 42 mL MilliQ) onde após o tratamento somente os ovos permanecem. Os mesmos são chocados *overnight* em tampão M9 (3 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 g/L NaCl, 1  $\mu$ M MgSO<sub>4</sub>), e cultivados a 20° C em placas de ágar NGM (CaCl<sub>2</sub>, 1 mM, MgSO<sub>4</sub> 1mM, colesterol 5 g/mL, 250  $\mu$ M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6, ágar 17 g/L, NaCl 3 g/L, caseína 7.5 g/L) com baterias *E. coli* OP50. Culturas saturadas de OP50 foram obtidas inoculando 1L de meio de cultura LB (triptona 10g/L, NaCl 10 g/L, extrato de levedura 5g/L) com OP50 e incubando o meio de cultura por 16 horas a 37 °C e 180



rpm. 350  $\mu$ L da cultura de bactérias foram adicionados às placas de ágar já solidificadas. As placas de ágar foram deixadas a temperatura ambiente durante 3 dias. Após o terceiro dia de sincronização, os animais foram transferidos para placas de ágar NGM contendo 75  $\mu$ M de 5-fluoro-2'-deoxyuridina (FUdR, Sigma Aldrich, MO, USA) a fim de inibir o crescimento de filhotes e mantidos durante sua vida útil a 24 °C.

### **5.3.3. Administração dos complexos a *C. elegans***

500  $\mu$ L dos complexos em diferentes concentrações (5, 10 e 20  $\mu$ M) foram adicionados a placas de ágar contendo FUdR e secos em uma capela de fluxo laminar a temperatura ambiente. Os nematoides foram transferidos para as placas contendo os complexos no estágio L4 de desenvolvimento. Os nematoides tratados com os complexos foram mantidos em placas de FUdR a 24 °C desde o estágio L4 de desenvolvimento até o fim da sua vida útil, como descrito acima.

### **5.3.4. Ensaio fenotípico automatizado de *C. elegans***

Nos dias indicados e para cada uma das condições, os nematoides foram lavados das placas de ágar com tampão M9 e adicionados a uma placa de ágar NGM sem bactérias em um volume final de 5 mL. Logo após, os movimentos dos nematoides foram gravados 20 fps por 1200 frames. Os vídeos foram analisados de forma consistente a registrar a motilidade dos nematoides (dobras por minuto). Todos os dados são representativos de três experimentos a partir de populações de nematoides sincronizadas individualmente.

### **5.3.5. *Staining* de *C. elegans* vivos para microscopia**

Os animais vivos foram incubados com o corante amilóide X34 para visualização dos depósitos amilóides através de microscopia ótica. Para tanto, os nematoides

foram lavados com 5 mL de tampão M9 das placas de ágar e a solução transferida para tubos falcon de 15 mL, onde os nematoides se depositaram no fundo do tubo. Logo após, 1 mL da solução foi transferida para tubos de *ependorf low bind* e 10  $\mu$ L de uma solução 10 mM de X34 foi adicionada ao tubo. Esse procedimento foi repetido para cada uma das condições estudadas. Os tubos de *ependorf* foram colocados em um tubo falcon de 50 mL, cobertos com papel alumínio e deixados sob rotação a temperatura ambiente por 2 horas. Após esse período os nematoides foram transferidos para placas de ágar NGM e mantidos a 20 °C até o próximo dia (6-16 hrs) para a obtenção das imagens. Os animais foram anestesiados com 40  $\mu$ M de Levamisol (Sigma Aldrich) e transferidos para lâminas de vidro. 20  $\mu$ L de Cygel (Abcam) foram adicionados às lâminas para a fixação dos nematoides e cobertas com lamínulas de vidro. Imagens foram obtidas em um microscópio Leica DMI8. O *software* ImageJ foi utilizado para a análise das imagens.

### 5.3.6. Western Blot

Aproximadamente 6000 animais foram coletados no sétimo dia da vida adulta das placas de ágar NGM e, subsequentemente sonificados em 8M ureia, 2% SDS, 50 mM DTT, 50 mM Tris, pH 8.0, e coquetel inibidor de protease (Roche, Mannheim, Alemanha). O lisado de cada amostra foi combinado com tampão NuPAGE LDS (Life Technologies, CA, USA) e aquecido por 10 minutos a 70 °C. As amostras foram separadas utilizando o gel de proteína NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris (Life Technologies, CA, USA). O conteúdo do gel foi então transferido para uma membrana de nitrocelulose (iBlot Dry Blotting System, Life Technologies, CA, USA). A membrana foi mantida *overnight* em BSA 5% e no dia seguinte lavada com PBS e mantida *overnight* novamente incubando em 1:500 anticorpo monoclonal anti-A $\beta$  (clone W0-2, MABN10, Merck Millipore, Technologies, CA, USA). A membrana foi então incubada por 2 horas a temperatura ambiente em 1:500 anticorpo

secundário conjugado com Alexa 647 (anti-mouse, Life Technologies, CA, USA) e, subsequentemente lavada com PBS + 0.02% tween. A membrana foi analisada por fluorescência usando ChemiDoc MP (Bio-Rad Laboratories, CA, USA). A $\beta$ 42 monomérico foi preparado como descrito anteriormente e utilizado como controle positivo. O lisado dos nematoides N2 (não expressam A $\beta$ ) foi utilizado como controle negativo. Os dados mostrados são representativos de experimentos realizados em triplicata, para os quais o resultado foi consistente.

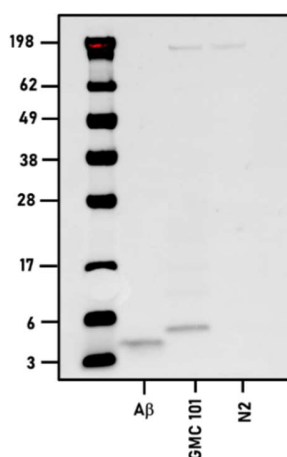
## 5.4. Resultados e Discussão

### 5.4.1. Ensaio de Motilidade

A fim de caracterizar os efeitos dos complexos *in vivo*, a linhagem GMC101 dos nematóides transgênicos *C. elegans* foi utilizada como modelo da doença de Alzheimer. Nessa linhagem, A $\beta$ 42 humano é expresso no tecido muscular dos animais com um aumento de temperatura no ambiente em que os animais estão inseridos. Com isso, à medida que o peptídeo beta amiloide vai se acumulando ao longo do corpo dos animais, os mesmos vão perdendo sua capacidade de movimentação. A redução de motilidade é proporcional aos níveis de espécies tóxicas geradas durante a agregação do A $\beta$ 42 em fibrilas. Depósitos fibrilares são normalmente observados a partir do dia 6 da fase adulta dos animais. Antes do sexto dia da vida adulta os agregados amiloides são considerados pré-fibrilares e não são observados através de técnicas de microscopia ótica.

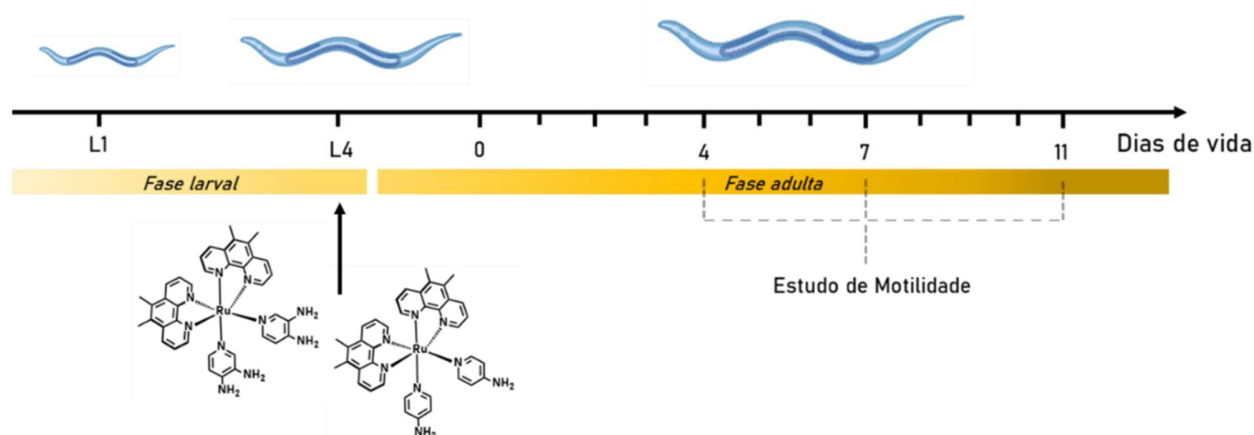
Para testar o efeito dos complexos nas *C. elegans* foi necessária a sincronização de toda a população para que todos os nematoides estivessem na fase larval L4 para a administração dos complexos. Nesse estágio, as *C. elegans* foram transferidas para placas de ágar contendo os complexos em diferentes concentrações

(5, 10 e 20  $\mu\text{M}$ ). Uma vez administrados os complexos, as placas de ágar contendo os vermes com os complexos foram mantidas à 25°C à 80% de umidade. A produção de A $\beta$  pela linhagem GMC101 foi confirmada através da técnica de *western blot*, Figura 5.2, onde o resultado obtido é consistente com a literatura.<sup>151</sup>



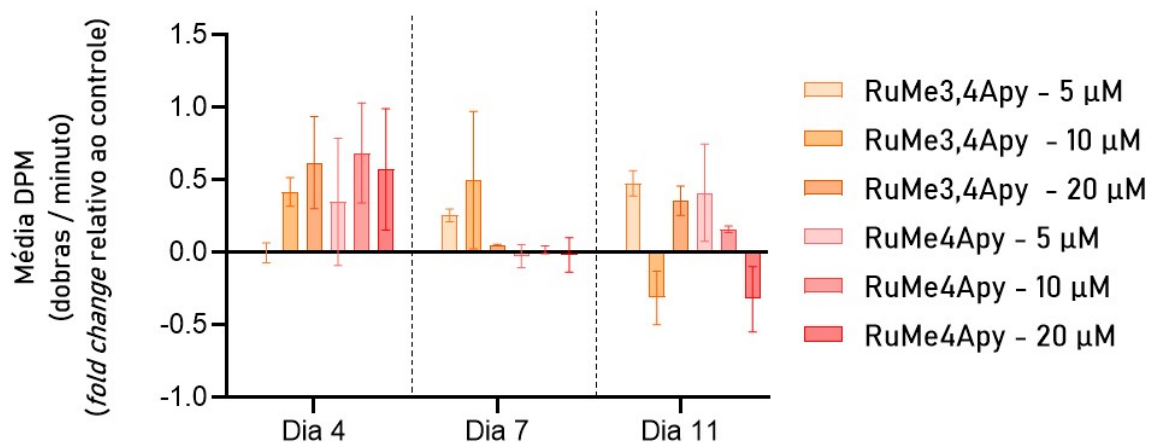
**FIGURA 5.2. Western blot das linhagens de *C. elegans*.** Expressão de A $\beta$  pelas *C. elegans* GMC101 e ausência de A $\beta$  na linhagem N2, quando comparadas ao controle (A $\beta$  recombinante).

Com base nos resultados obtidos para os complexos RuMe<sub>3,4</sub>Apy e RuMe<sub>4</sub>Apy, cuja presença levou à formação de agregados amorfos *in vitro*, ambos complexos foram utilizados nos testes *in vivo*. A motilidade dos animais foi monitorada em 3 dias distintos de sua vida adulta – dias 4, 7 e 11 – onde a motilidade dos animais sob efeito dos complexos foi monitorada, comparando esses resultados com as populações para as quais os complexos não foram administrados, Figura 5.3.



**FIGURA 5.3. Layout experimental dos ensaios *in vivo*.** Os complexos foram administrados na fase larval L4 e seu efeito monitorado através do estudo de motilidade nos dias 4, 7 e 11.

Os animais foram monitorados de forma automatizada e altamente sensível usando a “*wide field-of-view nematode tracking platform*” a qual monitora o movimento dos animais durante 60 segundos. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 5.4, onde os resultados foram apresentados em função da melhora na movimentação dos animais em relação ao grupo controle (DMSO 1%).



**FIGURA 5.4. Estudo de Motilidade.** Resultados do estudo de motilidade com a administração dos complexos RuMe3,4Apy e RuMe4Apy em três concentrações diferentes (5, 10, 20 µM) relativo ao controle (DMSO 1%).

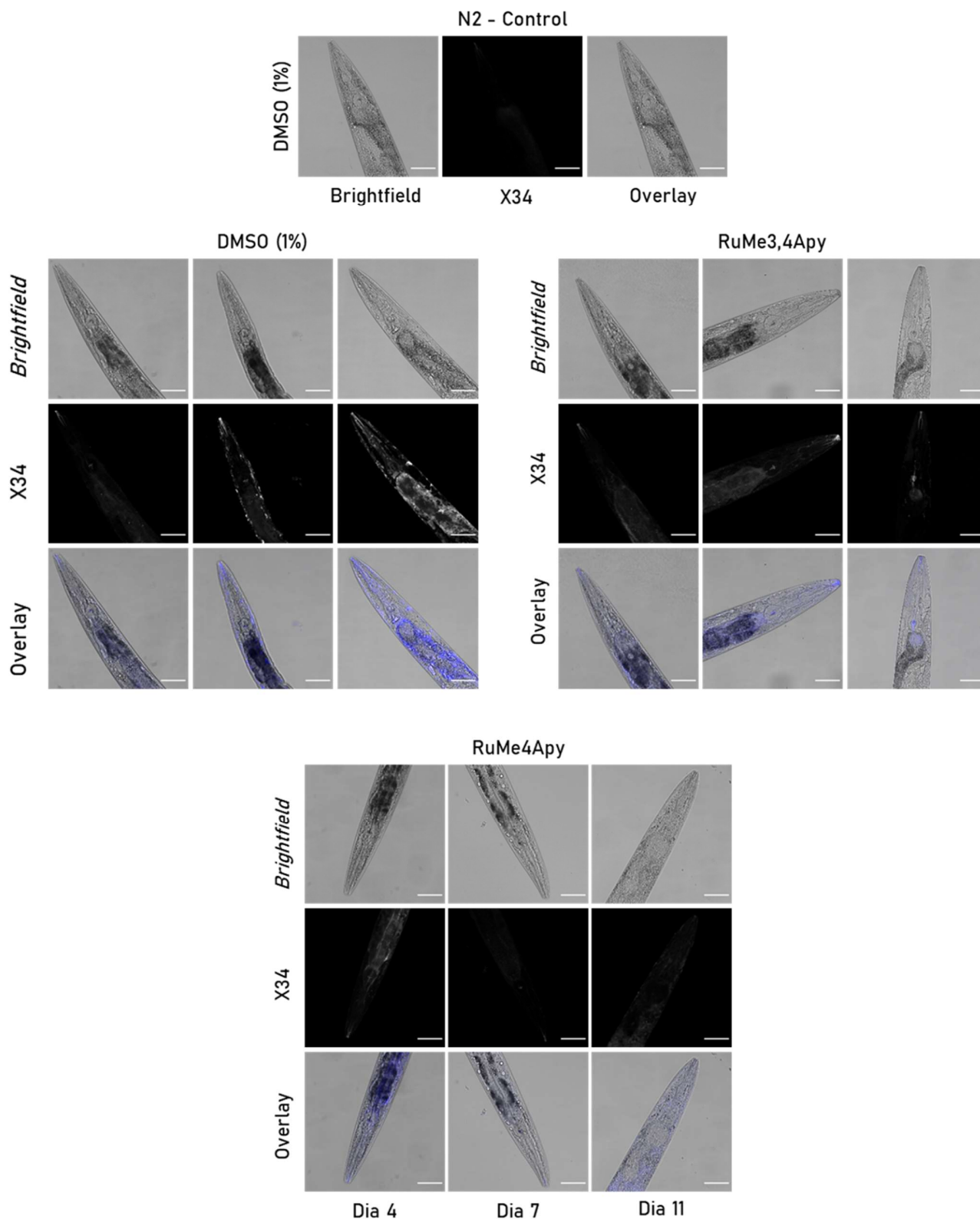
Os complexos apresentaram maior efeito no dia 4 de observação, onde as espécies de A $\beta$ 42 ainda são pré-fibrilares. Ambos os complexos apresentaram melhora significativa dependente da concentração. Espécies pré-fibrilares são amplamente estudadas pela comunidade científica e são consideradas tóxicas aos neurônios.<sup>152,153</sup> Já no dia 7, onde agregados fibrilares já estão presentes, onde apenas o complexo RuMe<sub>3,4</sub>Apy apresentou melhoras na mobilidade dos indivíduos.

É importante ressaltar que o complexo RuMe<sub>3,4</sub>Apy apresenta propriedades antioxidantes, o que pode influenciar positivamente na resposta dos animais quando comparado ao complexo RuMe<sub>4</sub>Apy, o qual não apresenta essas propriedades.

No dia 11, ambos os complexos apresentaram uma melhora na motilidade embora duas das concentrações não tenham apresentado melhoras em relação ao controle. No entanto, é interessante notar que à medida que os nematoides vão envelhecendo a sua movimentação é diminuída naturalmente, independentemente da presença de agregados amiloides, o que pode gerar inconsistências nos resultados de motilidade no fim da vida desses animais.

#### **5.4.2. Visualização dos agregados amiloides por microscopia confocal de campo claro e fluorescência**

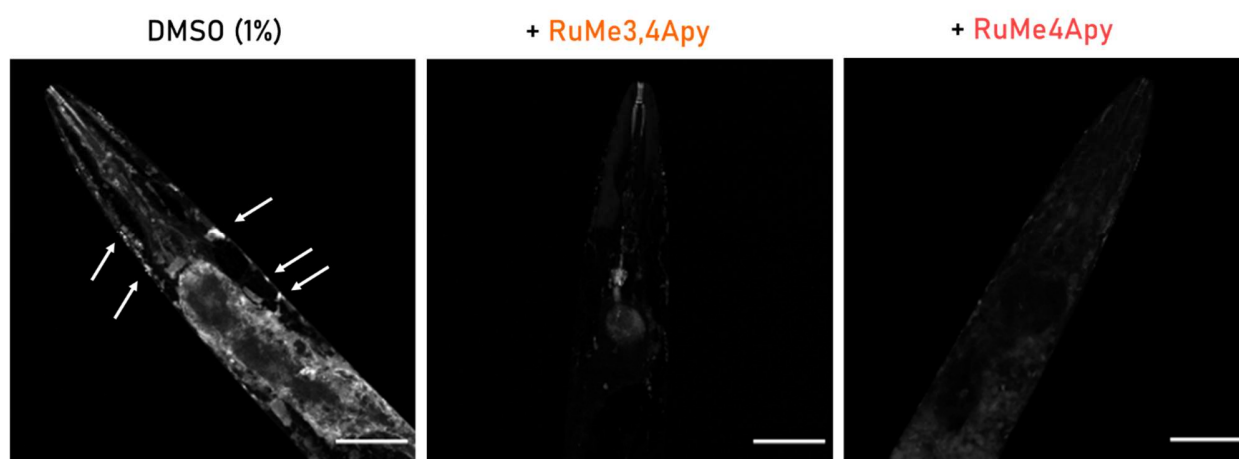
A visualização dos agregados amilóides foi realizada corando os indivíduos com o corante específico para fibrilas amilóides X34. O procedimento de *staining* está descrito na sessão de métodos. Com base na literatura, os agregados podem ser visualizados a partir do dia 7 da sua fase adulta. A Figura 5.5. mostra as imagens obtidas para o controle (DMSO 1%) e os nematoides para as quais foram administrados os complexos RuMe<sub>3,4</sub>Apy e RuMe<sub>4</sub>Apy na concentração 10  $\mu$ M.



**FIGURA 5.5. Visualização de Agregados Amilóides em *C. elegans*.** Imagens de microscopia confocal de campo claro (*brightfield*) e fluorescência na presença de

X34 dos agregados amilóides. Animais tratados com os complexos não apresentaram agregados. Barra de escala = 50  $\mu\text{m}$ .

Foi possível observar, como ressaltado na Figura 5.6, os vermes que receberam tratamento não apresentam os agregados como foram visualizados para o controle, indicando que os mesmos apresentaram efeito anti-amiloide não só *in vitro*, como também *in vivo*. O corante X34 interage com estruturas organizadas em folhas  $\beta$ , e como foi possível constatar nos ensaios *in vitro*, os complexos mudam a rota de agregação do peptídeo beta amilóide para agregados amorfos, assim os mesmos não seriam detectados pelo X34.



**FIGURA 5.6. Ampliação dos Agregados Amilóides em *C. elegans*.** Imagens de microscopia confocal de fluorescência na presença de X34 dos agregados amilóides no controle DMSO 1%, porém sem sinal de fluorescência para os indivíduos para as quais foram administrados os complexos. Barra de escala = 50  $\mu\text{m}$ .

### 5.5. Conclusões Parciais

Nesse capítulo foram apresentados os efeitos *in vivo* dos complexos RuMe3,4Apy e RuMe4Apy utilizando os nematoides *C.elegans* como modelo da



doença de Alzheimer. Ambos os complexos apresentaram bons resultados *in vitro* e, portanto, foram escolhidos para os ensaios com os nematoides.

Os vermes foram primeiramente preparados para o ensaio com os complexos sendo todos sincronizados na mesma fase larval, para que assim os complexos pudessem agir da mesma forma em todas as condições monitoradas. Os animais para os quais os complexos foram administrados apresentaram uma melhora na motilidade, a qual é comprometida devido ao acúmulo do peptídeo beta amiloide ao longo da camada muscular ao longo do corpo. Os complexos se mostraram mais eficazes no início da fase adulta dos animais, onde as espécies amiloides são pré-fibrilares. Espécies pré-fibrilares são consideradas tóxicas, assim um bom efeito nessa fase de agregação é interessante. O complexo RuMe<sub>3,4</sub>Apy em especial apresentou melhor resultado nos três dias monitorados, podendo haver um efeito sinérgico entre a capacidade anti-amiloide e antioxidante desse complexo.

Uma grande diferença foi observada nos depósitos amiloides formados ao longo do tempo, onde os animais tratados com os complexos não apresentaram depósitos amiloides detectáveis pelo corante seletivo a fibrilas X34. Isso corrobora tanto os resultados obtidos nos ensaios de motilidade como os resultados obtidos *in vitro* para os complexos RuMe<sub>3,4</sub>Apy e RuMe<sub>4</sub>Apy, onde o caminho de agregação do peptídeo beta amiloide quando na presença dos complexos é desviado para um caminho não-amiloidogênico.

# 6

## Conclusões

*“Ageing and death are immutable facts of life,  
but how we live until our last day is not.”*

*- Elizabeth Blackburn*

## 6.1. Conclusões

O trabalho apresentado na presente tese abrange diferentes conceitos de química, bioquímica, biologia molecular e biofísica a fim de determinar a influência de complexos polipiridínicos de Ru(II) no processo de agregação do peptídeo beta amiloide.

No Capítulo 2 foram apresentadas as expressões e purificações da protease TEV e dos peptídeos beta amiloide A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42, juntamente com a validação cinética dos peptídeos obtidos. Produzir os peptídeos de forma recombinante em bactérias *E. coli* foi de extrema importância para o trabalho apresentado, uma vez que uma quantidade considerável do peptídeo foi utilizada para a realização de todos os experimentos propostos. Produzir peptídeos em grandes quantidades e alto grau de pureza e a baixo custo permitiu conduzir experimentos com vários complexos e em diferentes condições, o que não seria possível caso fosse necessário adquirir esses peptídeos comercialmente. A expressão das proteínas na forma de proteína de fusão se mostrou uma ferramenta importante a fim de se obter uma purificação simples e com alto rendimento. A função da protease TEV expressada foi validada no processo de purificação dos peptídeos beta amiloide, onde foi possível clivar a porção NT<sub>FISP</sub> do A $\beta$ . Os peptídeos obtidos de forma recombinante apresentaram cinética dependente da concentração e mecanismo molecular de agregação correspondente à nucleação secundária, sendo assim condizente com a literatura. Desse modo, a expressão e purificação das proteínas descritas nesse capítulo permitiu não só a aprendizagem de técnicas de biologia molecular, como também proveu um maior entendimento do processo de agregação do peptídeo beta amiloide, o que foi fundamental para os passos seguintes deste projeto.

A síntese e caracterização de complexos polipiridínicos de complexos de Ru(II) foi apresentada no Capítulo 3. Baseado em resultados promissores previamente obtidos no nosso grupo de pesquisa com o complexo *cis*-

$[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{Apy})_2]^{2+}$  ( $\text{Ru}_{3,4}\text{Apy}$ ), uma série de compostos com modificações nos ligantes fenantrolina e aminopiridina, apresentados pela primeira vez neste trabalho, foram sintetizados com intuito de aumentar a interação entre os complexos e o peptídeo beta amiloide. Os complexos apresentaram propriedades fotofísicas e fotoquímicas interessantes para moléculas com potencial uso biológico, como emissão no infravermelho próximo e longos tempos de vida de emissão em meio aquoso e em condições fisiológicas. Além disso, os complexos com os ligantes 3,4-diaminopiridina apresentaram alta atividade antioxidante, o que é interessante devido à associação de espécies reativas de oxigênio associadas à doença de Alzheimer. Assim os compostos propostos se mostraram bons candidatos para os ensaios com os peptídeos beta amiloide.

No Capítulo 4 foi estudado o efeito dos complexos sintetizados no processo de agregação do peptídeo beta amiloide ( $\text{A}\beta_{42}$ ) recombinante. Os complexos apresentaram respostas distintas na agregação de acordo com a proporção testada em relação ao peptídeo. Os complexos  $\text{Ru}_{3,4}\text{Apy}$ ,  $\text{RuMe}_{3,4}\text{Apy}$  e  $\text{RuMe}_4\text{Apy}$  apresentaram uma diminuição de agregados formados de acordo com a concentração do complexo, sendo que os complexos  $\text{RuMe}_{3,4}\text{Apy}$  e  $\text{RuMe}_4\text{Apy}$  apresentaram a maior diferença em relação ao controle. Isso indica que a interação entre os complexos e o peptídeo se dá majoritariamente através dos ligantes fenantrolina dos complexos, embora os ligantes aminopiridina também tenham influência uma vez que o complexo  $\text{Ru}_4\text{Apy}$  não apresentou nenhuma diferença em relação ao controle. Em proporções super estequiométricas, os complexos  $\text{RuMe}_{3,4}\text{Apy}$  e  $\text{RuMe}_4\text{Apy}$  foram capazes de mudar seu caminho de agregação para a formação de agregados não amiloidogênicos. Esse resultado se mostrou bastante promissor uma vez que ele é dado através de interações não covalentes, ao contrário de outros complexos previamente reportados na literatura, os quais influenciam a agregação através da coordenação dos resíduos de aminoácidos do peptídeo ao centro metálico dos

complexos. Interações covalentes são permanentes e muitas vezes não seletivas à um alvo específico, podendo acarretar outros efeitos no sistema no qual o complexo está inserido. Assim, os complexos RuMe<sub>3,4</sub>Apy e RuMe<sub>4</sub>Apy se mostraram bastante promissores como candidatos a inibidores de agregação do peptídeo beta amiloide baseado nos ensaios *in vitro*.

Por fim, no Capítulo 5 são explorados os efeitos dos complexos RuMe<sub>3,4</sub>Apy e RuMe<sub>4</sub>Apy em um sistema *in vivo*, com intuito de confirmar o efeito observado *in vitro* para esses complexos. Os nematoides *C. elegans* foram utilizados como modelo da doença Alzheimer, onde A $\beta$ 42 é expresso no tecido muscular desses animais tornando-os paralisados com o tempo. Os complexos foram capazes de aumentar a motilidade dos animais em diferentes estágios de sua vida adulta, indicando um efeito desagregante *in vivo*. O complexo RuMe<sub>3,4</sub>Apy em especial apresentou maior diferença em relação ao controle, podendo haver influência do efeito antioxidante desse complexo na vida dos animais. Através de microscopia confocal de fluorescência foi possível confirmar que para os animais os quais foram administrados os complexos não foi observado resposta luminescente do corante amiloide X34 como no controle, indicando que na presença dos complexos, não são formados agregados amiloides com alto teor de folha beta, assim como observado nos ensaios *in vitro*, corroborando assim o efeito anti-amiloide observado anteriormente.

Assim, nesse trabalho foi possível evidenciar a influência de complexos polipiridínicos de Ru(II) no processo de agregação do peptídeo beta amiloide, o qual foi potencializado pela hidrofobicidade dos complexos. Os resultados de supressão amiloide observados *in vitro* puderam ser também observados *in vivo*, abrindo uma nova frente para potenciais fármacos tendo como alvo o peptídeo beta amiloide.

## 6.2. Perspectivas Futuras

Pode-se dizer que o presente trabalho motiva a exploração do potencial dos complexos apresentados. Uma das possíveis frentes de estudo é o efeito antioxidante dos complexos Ru<sub>3</sub>,<sub>4</sub>Apy e RuMe<sub>3</sub>,<sub>4</sub>Apy frente às espécies reativas de oxigênio geradas pelo peptídeo beta amiloide. Em especial, um estudo sobre o efeito antioxidante dos complexos frente aos oligômeros do A $\beta$  seria bastante interessante, uma vez que seu efeito oxidativo é bastante estudado na literatura.

Além disso, explorar o efeito dos complexos RuMe<sub>3</sub>,<sub>4</sub>Apy e RuMe<sub>4</sub>Apy frente à toxicidade de espécies pré-fibrilares do A $\beta$  também seria vantajoso, uma vez que o complexo Ru<sub>3</sub>,<sub>4</sub>Apy apresentou resultados promissores em trabalhos anteriores.

Finalmente, esse trabalho abre portas para explorar novos ligantes para serem coordenados ao rutênio, uma vez que as fenantrolinas modificadas obtiveram melhor resultado frente ao complexo original. Tornar o complexo mais hidrofóbico na região das fenantrolinas com diferentes funcionalizações pode ser uma estratégia para melhorar ainda mais a interação entre os complexos e o peptídeo.

# 7

## Referências

*“No finite point has meaning without an infinite reference point.”*

*- Jean-Paul Satre*

1. WÄLTI MA, RAVOTTI F, ARAI H, GLABE CG, WALL JS, BÖCKMANN A, ET AL. Atomic-resolution structure of a disease-relevant A $\beta$ (1-42) amyloid fibril. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(34):E4976–84.
2. KOLLMER M, CLOSE W, FUNK L, RASMUSSEN J, BSOUL A, SCHIERHORN A, ET AL. Cryo-EM structure and polymorphism of A $\beta$  amyloid fibrils purified from Alzheimer’s brain tissue. *Nat Commun*. 2019;10(1):1–8.
3. KNOWLES TPJ, VENDRUSCOLO M, DOBSON CM. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(6):384–96.
4. PRINCE M, COMAS-HERRERA A, KNAPP M, GUERCHET M, KARAGIANNIDOU M. World Alzheimer Report 2016 Improving healthcare for people living with dementia. Coverage, Quality and costs now and in the future. *Alzheimer’s Dis Int*. 2016;
5. DETURE MA., DICKSON DW. The neuropathological diagnosis of Alzheimer disease. *Mol Neurodegener*. 2019;14(32):97–118.
6. MAURER K, VOLK S, GERBALDO H. Auguste D and Alzheimer’s disease. *Lancet*. 1997;349(9064):1546–9.
7. STELZMANN RA, NORMAN SCHNITZLEIN H, REED MURTAGH F. An english translation of alzheimer’s 1907 paper, “über eine eigenartige erkankung der hirnrinde.” *Clin Anat*. 1995;8(6):429–31.
8. XU M MING, REN W MING, TANG X CAN, HU Y HONG, ZHANG H YAN. Advances in development of fluorescent probes for detecting amyloid- $\beta$  aggregates. *Nat Publ Gr* 2016;37(6):719–30.
9. WILHELM BG, MANDAD S, TRUCKENBRODT S, KRÖHNERT K, SCHÄFER C, RAMMNER B, ET AL. Composition of isolated synaptic boutons reveals the amounts of vesicle trafficking proteins. *Science*.



- 2014;344(6187):1023–9.
10. RICE HC, MALMAZET D DE, SCHREURS A, FRERE S, MOLLE I VAN, VOLKOV AN, ET AL. Secreted Amyloid- $\beta$  Precursor Protein Functions as a GABAB R1a Ligand to Modulate Synaptic Transmission. *Science*. 2019;363(27581):1–19.
  11. SADLEIR KR, KANDALEPAS PC, BUGGIA-PRÉVOT V, NICHOLSON DA, THINAKARAN G, VASSAR R. Presynaptic dystrophic neurites surrounding amyloid plaques are sites of microtubule disruption, BACE1 elevation, and increased A $\beta$  generation in Alzheimer’s disease. *Acta Neuropathol*. 2016;132(2):235–56.
  12. O’BRIEN RJ., WONG PC. Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer’s Disease. *Annu Rev Neurosci*. 2011;1987(34):185–204.
  13. BERTRAM L, TANZI RE. Thirty years of Alzheimer’s disease genetics: The implications of systematic meta-analyses. Vol. 9, *Nature Reviews Neuroscience*. 2008. p. 768–78.
  14. ZHANG C, BROWNE A, DIVITO JR, STEVENSON JA, ROMANO D, DONG Y, ET AL. Amyloid- $\beta$  Production Via Cleavage of Amyloid- $\beta$  Protein Precursor is Modulated by Cell Density. *J Alzheimer’s Dis*. 2010;22(2):683–94.
  15. KOK E, HAIKONEN S, LUOTO T, HUHTALA H, GOEBELER S, HAAPASALO H, ET AL. Apolipoprotein E-dependent accumulation of Alzheimer disease-related lesions begins in middle age. *Ann Neurol*. 2009 Jun 1;65(6):650–7.
  16. NYARKO JNK, QUARTEY MO, PENNINGTON PR, HEISTAD RM, DEAD D, POIRIER J, ET AL. Profiles of  $\beta$ -Amyloid Peptides and Key Secretases in Brain Autopsy Samples Differ with Sex and APOE  $\epsilon$ 4 Status: Impact for Risk and Progression of Alzheimer Disease. *Neuroscience*. 2018;373:20–36.

17. GU L, GUO Z. Alzheimer's A $\beta$ 42 and A $\beta$ 40 peptides form interlaced amyloid fibrils. *J Neurochem*. 2013;126(3):305–11.
18. IWATSUBO T, MANN DMA, ODAKA A, SUZUKI N, IHARA Y. Amyloid  $\beta$  protein (A $\beta$ ) deposition: A $\beta$ 42(43) precedes A $\beta$ 40 in down Syndrome. *Ann Neurol*. 1995;37(3):294–9.
19. IWATSUBO T, ODAKA A, SUZUKI N, MIZUSAWA H, NUKINA N, IHARA Y. Visualization of A $\beta$ 42(43) and A $\beta$ 40 in senile plaques with end-specific A $\beta$  monoclonals: Evidence that an initially deposited species is A $\beta$ 42(43). *Neuron*. 1994;13(1):45–53.
20. CUKALEVSKI R, YANG X, MEISL G, WEININGER U, BERNFUR K, FROHM B, ET AL. The A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 peptides self-assemble into separate homomolecular fibrils in binary mixtures but cross-react during primary nucleation. *Chem Sci*. 2015;6(7):4215–33.
21. COHEN SIA, LINSE S, LUHESHI LM, HELLSTRAND E, WHITE DA, RAJAH L, ET AL. Proliferation of amyloid- $\beta$ 42 aggregates occurs through a secondary nucleation mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(24):9758–63.
22. CHEN GF, XU TH, YAN Y, ZHOU YR, JIANG Y, MELCHER K, ET AL. Amyloid beta: Structure, biology and structure-based therapeutic development. Vol. 38, *Acta Pharmacologica Sinica*. Nature Publishing Group; 2017. p. 1205–35.
23. WALSH DM, SELKOE DJ. A $\beta$  oligomers - A decade of discovery. Vol. 101, *Journal of Neurochemistry*. 2007. p. 1172–84.
24. SENGUPTA U, NILSON AN, KAYED R. The Role of Amyloid- $\beta$  Oligomers in Toxicity, Propagation, and Immunotherapy. Vol. 6, *EBioMedicine*. The Authors; 2016. p. 42–9.
25. TYCKO R. Alzheimer's disease: Structure of aggregates revealed. Vol. 537,

- Nature. 2016. p. 492–3.
26. COLVIN MT, SILVERS R, NI QZ, CAN T V, SERGEYEV I, ROSAY M, ET AL. Atomic Resolution Structure of Monomorphic A $\beta$ 42 Amyloid Fibrils. *J Am Chem Soc.* 2016;138(30):9663–74.
  27. D’ANDREA MR, NAGELE RG. Morphologically distinct types of amyloid plaques point the way to a better understanding of Alzheimer’s disease pathogenesis. *Biotech Histochem.* 2010;85(2):133–47.
  28. HAMPEL H, HARDY J, BLENNOW K, CHEN C, PERRY G, KIM SH, ET AL. The Amyloid- $\beta$  Pathway in Alzheimer’s Disease. *Mol Psychiatry.* 2021;26(10):5481–503.
  29. KOYCHEV I, HOFER M, FRIEDMAN N. Correlation of Alzheimer disease neuropathologic staging with amyloid and tau scintigraphic imaging biomarkers. *J Nucl Med.* 2020;61(10):1413–8.
  30. JOHN H, GERALD H. Alzheimer’s Disease: The Amyloid Cascade Hypothesis. *Science (80- ).* 1992;256(6):184–5.
  31. THAL DR, RÜB U, ORANTES M, BRAAK H. Phases of A $\beta$ -deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology.* 2002;58(12):1791–800.
  32. MURRAY ME, LOWE VJ, GRAFF-RADFORD NR, LIESINGER AM, CANNON A, PRZYBELSKI SA, ET AL. Clinicopathologic and 11C-Pittsburgh compound B implications of Thal amyloid phase across the Alzheimer’s disease spectrum. *Brain.* 2015;138(5):1370–81.
  33. CHEIGNON C, TOMAS M, BONNEFONT-ROUSSELOT D, FALLER P, HUREAU C, COLLIN F. Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer’s disease. *Redox Biol.* 2018;14:450–64.
  34. BUTTERFIELD DA, BADER LANGE ML, SULTANA R. Involvements of the lipid peroxidation product, HNE, in the pathogenesis and progression of

- Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. 2010;1801(8):924–9.
35. WANG X, WANG W, LIL, PERRY G, LEE H GON, ZHU X. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2014;1842(8):1240–7.
  36. BUTTERFIELD DA, LAUDERBACK MC. Serial Review : Causes and Consequences of Oxidative Stress in Alzheimer 's Disease. *Free Radic Biol Med*. 2002;32(11):1050–60.
  37. SULTANA R, BOYD-KIMBALL D, POON HF, CAI J, PIERCE WM, KLEIN JB, ET AL. Redox proteomics identification of oxidized proteins in Alzheimer's disease hippocampus and cerebellum: An approach to understand pathological and biochemical alterations in AD. *Neurobiol Aging*. 2006;27(11):1564–76.
  38. TAMAGNO E, GUGLIELMOTTO M, VASCIAVEO V, TABATON M. Oxidative stress and beta amyloid in alzheimer's disease. Which comes first: The chicken or the egg? *Antioxidants*. 2021;10(9).
  39. BHATIA V, SHARMA S. Role of mitochondrial dysfunction, oxidative stress and autophagy in progression of Alzheimer's disease. Vol. 421, *Journal of the Neurological Sciences*. Elsevier; 2021
  40. ANANTHARAMAN M, TANGPONG J, KELLER JN, MURPHY MP, MARKESBERY WR, KININGHAM KK, ET AL.  $\beta$ -amyloid mediated nitration of manganese superoxide dismutase: Implication for oxidative stress in a APPNLh/NLh X PS-1 P264L/P264L double knock-in mouse model of Alzheimer's disease. *Am J Pathol*. 2006;168(5):1608–18.
  41. SEN A, NELSON TJ, ALKON DL, HONGPAISAN J. Loss in PKC Epsilon Causes Downregulation of MnSOD and BDNF Expression in Neurons of Alzheimer's Disease Hippocampus. *J Alzheimer's Dis*. 2018 Jan

- 1;63(3):1173–89.
42. DUCK KA, CONNOR JR. Iron uptake and transport across physiological barriers. *BioMetals*. 2016;29(4):573–91.
  43. QI Z, LIU KJ. The Interaction of Zinc and the Blood-brain Barrier under Physiological and Ischemic Conditions. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2019;34:114–9.
  44. HUANG X, ATWOOD CS, HARTSHORN MA, MULTHAUP G, GOLDSTEIN LE, SCARPA RC, ET AL. The A $\beta$  peptide of Alzheimer's disease directly produces hydrogen peroxide through metal ion reduction. *Biochemistry*. 1999;38(24):7609–16.
  45. HOODA J, SHAH A, ZHANG L. Heme, an essential nutrient from dietary proteins, critically impacts diverse physiological and pathological processes. *Nutrients*. 2014;6(3):1080–102.
  46. FAUX NG, REMBACH A, WILEY J, ELLIS KA, AMES D, FOWLER CJ, ET AL. An anemia of Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry*. 2014;19(11):1227–34.
  47. ATAMNA H, LIU J, AMES BN. Heme deficiency selectively interrupts assembly of mitochondrial complex IV in human fibroblasts: Relevance to aging. *J Biol Chem*. 2001;276(51):48410–6.
  48. GANGULY U, KAUR U, CHAKRABARTI SS, SHARMA P, AGRAWAL BK, SASO L, ET AL. Oxidative Stress, Neuroinflammation, and NADPH Oxidase: Implications in the Pathogenesis and Treatment of Alzheimer's Disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2021;2021.
  49. FROST GR, JONAS LA, LI YM. Friend, Foe or Both? Immune Activity in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci*. 2019;11(December):1–20.
  50. CRIBBS DH, BERCHTOLD NC, PERREAU V, COLEMAN PD, ROGERS J, TENNER AJ, ET AL. Extensive innate immune gene activation accompanies

- brain aging, increasing vulnerability to cognitive decline and neurodegeneration: A microarray study. *J Neuroinflammation* . 2012;9(1):1.
51. XIANG Z, HAROUTUNIAN V, HO L, PUROHIT D, PASINETTI GM. Microglia activation in the brain as inflammatory biomarker of Alzheimer's disease neuropathology and clinical dementia. *Dis Markers*. 2006;22(1–2):95–102.
52. MARTÍNEZ LEO EE, SEGURA CAMPOS MR. Systemic Oxidative Stress: A Key Point in Neurodegeneration — A Review. *J Nutr Health Aging*. 2019 Aug 30;23(8):694–9.
53. HUANG X, ZHAO X, LI B, CAI Y, ZHANG S, YU F, ET AL. Biomarkers for evaluating the effects of exercise interventions in patients with MCI or dementia: A systematic review and meta-analysis. *Exp Gerontol*. 2021;15:111424.
54. KARISSETTY BC, BHATNAGAR A, ARMOUR EM, BEAVER M, ZHANG H, ELEFANT F. Amyloid- $\beta$  Peptide Impact on Synaptic Function and Neuroepigenetic Gene Control Reveal New Therapeutic Strategies for Alzheimer's Disease. *Front Mol Neurosci*. 2020;13:1–8.
55. LIVINGSTON G, HUNTLEY J, SOMMERLAD A, AMES D, BALLARD C, BANERJEE S, ET AL. Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission. *Lancet Comm*. 2020;396:19–21.
56. DHANA K, EVANS DA, RAJAN KB, BENNETT DA, MORRIS MC. Healthy lifestyle and the risk of Alzheimer dementia: Findings from 2 longitudinal studies. *Neurology*. 2020;95(4):E374–83.
57. SABIA S, FAYOSSE A, DUMURGIER J, VAN HEES VT, PAQUET C, SOMMERLAD A, ET AL. Association of sleep duration in middle and old age with incidence of dementia. *Nat Commun*. 2021;12(1).
58. CORDONE S, ANNARUMMA L, ROSSINI PM, DE GENNARO L. Sleep

- and  $\beta$ -amyloid deposition in Alzheimer disease: Insights on mechanisms and possible innovative treatments. *Front Pharmacol.* 2019;10:1–12.
59. SHOKRI-KOJORI E, WANG GJ, WIERS CE, DEMIRAL SB, GUO M, KIM SW, ET AL.  $\beta$ -Amyloid accumulation in the human brain after one night of sleep deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(17):4483–8.
  60. MONTINE T, PHELPS C, BEACH T, BIGIO E, CAIRNS N, DICKSON D, ET AL. NIA-AA guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer’s disease: a practical approach. *Acta Neuropathol.* 2013;123(1):1–11.
  61. HYMAN BT, PHELPS CH, BEACH TG, BIGIO EH, CAIRNS NJ, CARRILLO MC, ET AL. National Institute on Aging-Alzheimer’s Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer’s disease. *Alzheimer’s Dement.* 2012;8(1):1–13.
  62. LINAZASORO G. Imaging  $\beta$ -amyloid burden in aging and dementia. *Neurology.* 2008;70(18):1649.
  63. IKONOMOVIC MD, KLUNK WE, ABRAHAMSON EE, MATHIS CA, PRICE JC, TSOPELAS ND, ET AL. Post-mortem correlates of in vivo PiB-PET amyloid imaging in a typical case of Alzheimer’s disease. *Brain.* 2008;131(6):1630–45.
  64. FILIPPI L, CHIARAVALLOTI A, BAGNI O, SCHILLACI O. F-labeled radiopharmaceuticals for the molecular neuroimaging of amyloid plaques in Alzheimer’s disease. 2018;8(4):268–81.
  65. MAYO CLINIC. Alzheimer’s: Drugs help manage symptoms [Internet]. 2022 [cited 2022 Dec 1]. Available from: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/alzheimers-disease/in-depth/alzheimers/art-20048103>
  66. KRSTI DZ, LAZAREVI TD, BOND AM, VASI VM. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Curr Neuropharmacol.* 2013;11:315–35.

67. WANG R, REDDY PH. Role of glutamate and NMDA receptors in Alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis*. 2018;57(4):1041–8.
68. SWANSON CJ, ZHANG Y, DHADDA S, WANG J, KAPLOW J, LAI RYK, ET AL. A randomized, double-blind, phase 2b proof-of-concept clinical trial in early Alzheimer's disease with lecanemab, an anti-A $\beta$  protofibril antibody. *Alzheimer's Res Ther*. 2021;8:1–14.
69. ARDAYFIO PA, ANDERSEN SW, SHCHERBININ S, SPARKS J, ET AL. Donanemab in Early Alzheimer's Disease. *N Engl J Med*. 2021;384(18):1691–704.
70. GALLARDO G, HOLTZMAN DM. Antibody therapeutics targeting A $\beta$  and tau. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017;7(10):1–17.
71. BUDD HAEBERLEIN S, AISEN PS, BARKHOF F, CHALKIAS S, CHEN T, COHEN S, ET AL. Two Randomized Phase 3 Studies of Aducanumab in Early Alzheimer's Disease. *J Prev Alzheimer's Dis*. 2022;9(2):197–210.
72. SERVICK K. Alzheimer's drug approved despite doubts about effectiveness. *Science*. American Association for the Advancement of Science (AAAS); 2021. Available from: <https://www.science.org/content/article/alzheimer-s-drug-approved-despite-doubts-about-effectiveness>
73. PILLER C. Second death linked to potential antibody treatment for Alzheimer's disease | *Science*. *Science*. 2022. Available from: <https://www.science.org/content/article/second-death-linked-potential-antibody-treatment-alzheimer-s-disease>
74. SODHI RK. Metal Complexes in Medicine: An Overview and Update from Drug Design Perspective. *Cancer Ther Oncol Int J*. 2019;14(2).
75. ALLARDYCE CS, DYSON PJ. Ruthenium in medicine: Current clinical uses and future prospects. *Platin Met Rev*. 2001;45(2):62–9.
76. ROSENBERG B, VANCAMP L, KRIGAS T. Inhibition of Cell Division in



- Escherichia coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature*. 1965;205:698–9.
77. ROSENBERG B, VANCAMP L. Platinum Compounds: a New Class of Potent Antitumour Agents. *Nature*. 1969;222:385–6.
78. ARMSTRONG-GORDON E, GNJIDIC D, MCLACHLAN AJ, HOSSEINI B, GRANT A, BEALE PJ, ET AL. Patterns of platinum drug use in an acute care setting: a retrospective study. *J Cancer Res Clin Oncol* [Internet]. 2018;144(8):1561–8.
79. GASSER G. Metal complexes and medicine: A successful combination. *Chimia (Aarau)*. 2015;69(7–8):442–6.
80. WANG D, LIPPARD SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4(4):307–20.
81. APPS MG, CHOI EHY, WHEATE NJ. The state-of-play and future of platinum drugs. *Endocr Relat Cancer*. 2015;22(4):R219–33.
82. GIACCONE G. Clinical perspectives on platinum resistance. *Drugs*. 2000;59(SUPPL. 4):9–17.
83. MCEVOY LM, O'TOOLE SA, SPILLANE CD, MARTIN CM, GALLAGHER MF, STORDAL B, ET AL. Identifying novel hypoxia-associated markers of chemoresistance in ovarian cancer. *BMC Cancer*. 2015;15(1):1–13.
84. RABIK CA, DOLAN ME. Molecular Mechanisms of Resistance and Toxicity Associated with Platinating Agents. *Cancer Treat Rev*. 2007;33(1):9–23.
85. ALESSIO E. Thirty Years of the Drug Candidate NAMI-A and the Myths in the Field of Ruthenium Anticancer Compounds: A Personal Perspective. *Eur J Inorg Chem*. 2017;2017(12):1549–60.
86. ARTNER C, HOLTKAMP HU, HARTINGER CG, MEIER-MENCHES SM. Characterizing activation mechanisms and binding preferences of ruthenium

- metallo-prodrugs by a competitive binding assay. *J Inorg Biochem.* 2017;177:322–7.
87. KOSTOVA I. Ruthenium Complexes as Anticancer Agents. *Curr Med Chem.* 2006 Mar 28;13(9):1085–107.
88. THOTA S, RODRIGUES DA, CRANS DC, BARREIRO EJ. Ru(II) Compounds: Next-Generation Anticancer Metallotherapeutics? *J Med Chem.* 2018;61(14):5805–21.
89. LEE SY, KIM CY, NAM TG. Ruthenium complexes as anticancer agents: A brief history and perspectives. Vol. 14, *Drug Design, Development and Therapy.* 2020. p. 5375–92.
90. MAN BYW, CHAN HM, LEUNG CH, CHAN DSH, BAI LP, JIANG ZH, ET AL. Group 9 metal-based inhibitors of  $\beta$ -amyloid (1-40) fibrillation as potential therapeutic agents for Alzheimer's disease. *Chem Sci.* 2011;2(5):917–21.
91. MA DL, MA VPY, CHAN DSH, LEUNG KH, HE HZ, LEUNG CH. Recent advances in luminescent heavy metal complexes for sensing. *Coord Chem Rev.* 2012;256(23–24):3087–113.
92. SONG H, KAISER JT, BARTON JK. Crystal structure of  $\Delta$ -[Ru(bpy)<sub>2</sub>dppz]<sup>2+</sup> bound to mismatched DNA reveals side-by-side metalloinsertion and intercalation. *Nat Chem.* 2012;4(8):615–20.
93. COOK NP, OZBIL M, KATSAMPES C, PRABHAKAR R, MARTÍ AA. Unraveling the photoluminescence response of light-switching ruthenium(II) complexes bound to amyloid- $\beta$ . *J Am Chem Soc.* 2013;135(29):10810–6.
94. ALIYAN A, COOK NP, MARTÍ AA. Interrogating Amyloid Aggregates using Fluorescent Probes. *Chem Rev.* 2019;119:11819–56.
95. BARNHAM KJ, KENCHE VB, CICCOTOSTO GD, SMITH DP, TEW DJ, LIU X, ET AL. Platinum-based inhibitors of amyloid- $\beta$  as therapeutic agents for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(19):6813–8.

96. MA G, HUANG F, PU X, JIA L, JIANG T, LI L, ET AL. Identification of [PtCl<sub>2</sub>(phen)] binding modes in amyloid- $\beta$  peptide and the mechanism of aggregation inhibition. *Chem - A Eur J*. 2011;17(41):11657–66.
97. WALL BJ, WILL MF, YAWSON GK, BOTHWELL PJ, PLATT DC, APUZZO CF, ET AL. Importance of Hydrogen Bonding: Structure-Activity Relationships of Ruthenium(III) Complexes with Pyridine-Based Ligands for Alzheimer's Disease Therapy. *J Med Chem*. 2021;64(14):10124–38.
98. JONES MR, MU C, WANG MCP, WEBB MI, WALSBY CJ, STORR T. Modulation of the A $\beta$  peptide aggregation pathway by KP1019 limits A $\beta$ -associated neurotoxicity. *Metallomics*. 2015;7(1):129–35.
99. MESSORI L, CAMARRI M, FERRARO T, GABBIANI C, FRANCESCHINI D. Promising in Vitro anti-alzheimer properties for a ruthenium(III) complex. *ACS Med Chem Lett*. 2013;4(3):329–32.
100. GOMES LMF, BATAGLIOLI JC, JUSSILA AJ, SMITH JR, WALSBY CJ, STORR T. Modification of A $\beta$  Peptide Aggregation via Covalent Binding of a Series of Ru(III) Complexes. *Front Chem*. 2019;7:1–13.
101. YAWSON GK, HUFFMAN SE, FISHER SS, BOTHWELL PJ, PLATT DC, JONES MA, ET AL. Ruthenium(III) complexes with imidazole ligands that modulate the aggregation of the amyloid- $\beta$  peptide via hydrophobic interactions. *J Inorg Biochem*. 2021;214.
102. SCHUMANN W, FERREIRA LCS. Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Genet Mol Biol*. 2004;27(3):442–53.
103. PHAM P V. Medical biotechnology: Techniques and applications. *Omi Technol Bio-engineering Towar Improv Qual Life*. 2018;1:449–69.
104. ZARÁNDI M, SOÓS K, FÜLÖP L, BOZSÓ Z, DATKI Z, TÓTH GK, ET AL. Synthesis of A $\beta$ [1-42] and its derivatives with improved efficiency. *J Pept Sci*. 2007 Feb 1;13(2):94–9.

105. TICKLER AK, BARROW CJ, WADE JD. Improved preparation of amyloid- $\beta$  peptides using DBU as N $\alpha$ -Fmoc deprotection reagent. *J Pept Sci.* 2001 Sep 1;7(9):488–94.
106. WALSH DM, THULIN E, MINOGUE AM, GUSTAVSSON N, PANG E, TEPLOW DB, ET AL. A facile method for expression and purification of the Alzheimer's disease-associated amyloid  $\beta$ -peptide. *FEBS J.* 2009;276(5):1266–81.
107. MACAO B, HOYER W, SANDBERG A, BRORSSON AC, DOBSON CM, HÄRD T. Recombinant amyloid beta-peptide production by coexpression with an affibody ligand. *BMC Biotechnol.* 2008;8:1–11.
108. LONG F, CHO W, ISHII Y. Expression and purification of <sup>15</sup>N- and <sup>13</sup>C-isotope labeled 40-residue human Alzheimer's  $\beta$ -amyloid peptide for NMR-based structural analysis. *Protein Expr Purif.* 2011;79(1):16–24.
109. FINDER VH, VODOPIVEC I, NITSCH RM, GLOCKSHUBER R. The Recombinant Amyloid- $\beta$  Peptide A $\beta$ 1-42 Aggregates Faster and Is More Neurotoxic than Synthetic A $\beta$ 1-42. *J Mol Biol.* 2010;396(1):9–18.
110. GARAI K, CRICK SL, MUSTAFI SM, FRIEDEN C. Expression and purification of amyloid- $\beta$  peptides from *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 2009;66(1):107–12.
111. JAWHAR S, WIRTHS O, BAYER TA. Pyroglutamate amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ): A hatchet man in alzheimer disease. *J Biol Chem.* 2011;286(45):38825–32.
112. GUNN AP, MASTERS CL, CHERNY RA. Pyroglutamate-A $\beta$ : Role in the natural history of Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;42(12):1915–8.
113. DAMMERS C, GREMER L, NEUDECKER P, DEMUTH HU, SCHWARTEN M, WILLBOLD D. Purification and characterization of recombinant n-terminally pyroglutamate-modified Amyloid- $\beta$  variants and

- structural analysis by solution nmr spectroscopy. *PLoS One*. 2015;10(10):1–11.
114. SHARPE S, YAU WM, TYCKO R. Expression and purification of a recombinant peptide from the Alzheimer’s  $\beta$ -amyloid protein for solid-state NMR. *Protein Expr Purif*. 2005;42(1):200–10.
115. AUSTIN BP, NALLAMSETTY S, WAUGH DS. Hexahistidine-tagged maltose-binding protein as a fusion partner for the production of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Methods Mol Biol*. 2009;498:157–72.
116. LAVALLIE ER, DIBLASIO EA, KOVACIC S, GRANT KL, SCHENDEL PF, MCCOY JM. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Bio/Technology*. 1993;11(2):187–93.
117. TROPEA JE, CHERRY S, WAUGH DS. High Throughput Protein Expression and Purification. Vol. 4, Springer Protocols. 2009. 297–308 p.
118. ABELEIN A, CHEN G, KITOKA K, ALEKSIS R, OLESKOVS F, SARR M, ET AL. High-yield Production of Amyloid- $\beta$  Peptide Enabled by a Customized Spider Silk Domain. *Sci Rep*. 2020;10(1):1–10.
119. KAPUST RB, WAUGH DS. *Escherichia coli* maltose-binding protein is effective in promoting solubility. *Protein Sci*. 1999;(8):1668–74.
120. PARKS TD, HOWARD ED, WOLPERT TJ, ARP DJ, DOUGHERTY WG. Expression and Purification of a Recombinant Tobacco Etch Virus N1a Proteinase: Biochemical Analyses of the Full-Length and a Naturally Occurring Truncated Proteinase Form. Vol. 210, *Virology*. 1995. p. 194–201.
121. GEOGHEGAN KF, DIXON HBF, ROSNER PJ, HOTH LR, LANZETTI AJ, BORZILLERI KA, ET AL. Spontaneous alpha-N-6-Phosphogluconoylation of a “His Tag” in *Escherichia coli*: The Cause of Extra Mass of 258 or 178 Da in

- Fusion Proteins. *Anal Biochem.* 1999;184:169–84.
122. COHEN SIA, LINSE S, LUHESHI LM, HELLSTRAND E, WHITE DA, RAJAH L, ET AL. Proliferation of amyloid- $\beta$ 42 aggregates occurs through a secondary nucleation mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(24):9758–63.
123. TÖRNQUIST M, MICHAELS TCT, SANAGAVARAPU K, YANG X, MEISL G, COHEN SIA, ET AL. Secondary nucleation in amyloid formation. *Chem Commun.* 2018;54(63):8667–84.
124. XUE C, LIN TY, CHANG D, GUO Z. Thioflavin T as an amyloid dye: Fibril quantification, optimal concentration and effect on aggregation. *R Soc Open Sci.* 2017;4(1).
125. FANDRICH M, SCHMIDT M, GRIGORIEFF N. Recent progress in understanding Alzheimer's  $\beta$ -amyloid structures. *Trends Biochem Sci.* 2011;36(6):338–45.
126. MEISL G, KIRKEGAARD JB, AROSIO P, MICHAELS TCT, VENDRUSCOLO M, DOBSON CM, ET AL. Molecular mechanisms of protein aggregation from global fitting of kinetic models. *Nat Protoc.* 2016;11(2):252–72.
127. MEISL G, YANG X, HELLSTRAND E, FROHM B, KIRKEGAARD JB, COHEN SIA, ET AL. Differences in nucleation behavior underlie the contrasting aggregation kinetics of the A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(26):9384–9.
128. VALEUR B. *Molecular Fluorescence Principles and Applications. Vol. 8, Methods.* 2001.
129. KOCHUVEEDU ST, KIM DH. Surface plasmon resonance mediated photoluminescence properties of nanostructured multicomponent fluorophore systems. *Nanoscale.* 2014;6(10):4966–84.

130. SILVA DES, CALI MP, PAZIN WM, CARLOS-LIMA E, SALLES TREVISAN MT, VENÂNCIO T, ET AL. Luminescent Ru(II) Phenanthroline Complexes as a Probe for Real-Time Imaging of A $\beta$  Self-Aggregation and Therapeutic Applications in Alzheimer's Disease. *J Med Chem.* 2016;59(19):9215–27.
131. CALI MP, PEREIRA LMB, TEODORO MD, SELLANI TA, RODRIGUES EG, CARLOS RM. Comparison of A $\beta$  (1–40, 1–28, 11–22, and 29–40) aggregation processes and inhibition of toxic species generated in early stages of aggregation by a water-soluble ruthenium complex. *J Inorg Biochem.* 2021;215:111314.
132. LEMEIGNAN M, MILLART H, LETTERON N. The ability of 4-aminopyridine and 3,4-diaminopyridine to cross the blood-brain barrier can account for their difference in toxicity. Vol. No. 35, *Adv. Biosci.* Pergamon Press Ltd; 1982. 222–229 p.
133. LUNDH H. Therapeutic Applications of Aminopyridines in Diseases of Neuromuscular Transmission. *Aminopyridines and Similarly Acting Drugs: Effects on Nerves, Muscles and Synapses.* Pergamon Press Ltd; 1982. 287–296 p.
134. KOSTADINOVA I, DANCHEV N. 4-Aminopyridine - the New Old Drug for the Treatment of Neurodegenerative Diseases. *Pharmacia.* 2019;66(2):67–74.
135. CAMPAGNA S, PUNTORIERO F, NASTASIF, BERGAMINI G, BALZANI V. Photochemistry and photophysics of coordination compounds: Ruthenium. *Top Curr Chem.* 2007 May 24;280:117–214.
136. CAMILO MR, CARDOSO CR, CARLOS RM, LEVER ABP. Photosolvolytic of cis -[Ru( $\alpha$ -diimine)<sub>2</sub>(4-aminopyridine)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> complexes: Photophysical, spectroscopic, and density functional theory analysis. *Inorg Chem.* 2014;53(7):3694–708.

137. RE R, PELLEGRINI N, PROTEGGENTE A, PANNALA A, YANG M, RICE-EVANS C. Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 1999;26(2007):1231–7.
138. CARDOSO CR, DE AGUIAR I, CAMILO MR, LIMA MVS, ITO AS, BAPTISTA MS, ET AL. Synthesis, spectroscopic characterization, photochemical and photophysical properties and biological activities of ruthenium complexes with mono- and bi-dentate histamine ligand. *Dalt Trans.* 2012;41(22):6726–34.
139. BONNESON P, WALSH JL, PENNINGTON WT, CORDES AW, DURHAM B. Six-Coordinate Complexes with 1,10-Phenanthroline Ligands in the Trans Configuration. Preparation of trans -Bis(1,10-phenanthroline)ruthenium(II) Complexes and Crystal Structure of trans-Bis(1,10-phenanthroline)bis(pyridine)ruthenium(II) Hexafluorophospha. *Inorg Chem.* 1983;22(12):1761–5.
140. INGLEZ SD, LIMA FCA, SILVA ABF, SIMIONI AR, TEDESCO AC, DANIEL JFS, ET AL. Photoinduced electron-transfer processes based on novel bipyridine-Ru(II) complex: Properties of cis-[Ru(2,2'-bipyridine)2(5,6-bis(3- amidopyridine)-7-oxanorbornene)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> and cis-[Ru(2,2'-bipyridine)2(3-aminopyridine)2](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> complexes. *Inorg Chem.* 2007;46(14):5744–53.
141. LITKE S V., MEZENTSEVA T V., LYALIN GN, ERSHOV AY. Spectroscopy and photophysics of chloro-bis-bipyridyl complexes of ruthenium(II) with pyridine ligands. *Opt Spectrosc (English Transl Opt i Spektrosk.* 2003;95(6):917–24.
142. PROMEGA. CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay Cell Viability Assay. 2002.
143. NILSSON MR. Techniques to study amyloid fibril formation in vitro.



- Methods. 2004;34(1):151–60.
144. KRICKA L, PARK J. Optical Techniques - ClinicalKey [Internet]. [cited 2023 Mar 14]. Available from: <https://www.clinicalkey.com/#!/content/book/3-s2.0-B9780323359214000132>
  145. IKENOUE T, APRILE FA, SORMANNI P, RUGGERI FS, PERNI M, HELLER GT, ET AL. A rationally designed bicyclic peptide remodels A $\beta$ 42 aggregation in vitro and reduces its toxicity in a worm model of Alzheimer's disease. Sci Rep [Internet]. 2020;10(1):1–15.
  146. VYAS NA, RAMTEKE SN, KUMBHAR AS, KULKARNI PP, JANI V, SONAWANE UB, ET AL. Ruthenium(II) polypyridyl complexes with hydrophobic ancillary ligand as A $\beta$  aggregation inhibitors. Eur J Med Chem. 2016;121:793–802.
  147. KALETTA T, HENGARTNER MO. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. Nat Rev Drug Discov. 2006;5(5):387–99.
  148. CONSORTIUM\* TC ELEGANS S. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: A platform for investigating biology. Science. 1998 Dec 11;282(5396):2012–8.
  149. LAI CH, CHOU CY, CH'ANG LY, LIU CS, LIN WC. Identification of novel human genes evolutionarily conserved in *Caenorhabditis elegans* by comparative proteomics. Genome Res. 2000;10(5):703–13.
  150. BRENNER S. The Genetics of *Caenorhabditis Elegans*. Genetics. 1974;77:71–94.
  151. LIMBOCKER R, CHIA S, RUGGERI FS, PERNI M, CASCELLA R, HELLER GT, ET AL. Trodusquemine enhances A $\beta$  42 aggregation but suppresses its toxicity by displacing oligomers from cell membranes. Nat Commun [Internet]. 2019;10(1):1–13.
  152. WANG W, HOU T TING, JIA L FEI, WU Q QI, QUAN M NA, JIA J PING.

- Toxic amyloid- $\beta$  oligomers induced self-replication in astrocytes triggering neuronal injury. *EBioMedicine*. 2019;42:174–87.
153. HUANG YR, LIU RT. The toxicity and polymorphism of  $\beta$ -amyloid oligomers. *Int J Mol Sci*. 2020;21(12):1–19.