

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

Gabriel Machado de Oliveira

Elucidando os mecanismos moleculares da agregação de amiloides funcionais  
formados pelo Hormônio Liberador de Corticotrofina humano

São Carlos

2024

Gabriel Machado de Oliveira

**Elucidando os mecanismos moleculares da agregação de amiloides  
funcionais formados pelo Hormônio Liberador de Corticotrofina humano**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao  
Instituto de Física de São Carlos da Universidade de  
São Paulo para obtenção do título de Bacharel em  
Ciências Físicas e Biomoleculares.

Orientador: Prof. Dr. Luis Felipe Santos Mendes -  
IFSC/USP.

**São Carlos**  
**2024**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

## **RESUMO**

Os amilóides são um tipo de agregado proteico que adota uma estrutura fibrilar altamente ordenada e estável, rica em folhas  $\beta$ . O estudo da formação de fibrilas é uma área de investigação fundamental devido à sua associação com várias doenças neurodegenerativas, bem como à capacidade única de várias proteínas formarem estas estruturas, mesmo sem partilharem semelhanças de sequência. O papel exato dos amilóides nas doenças neurodegenerativas não está totalmente esclarecido, mas as evidências sugerem que podem perturbar processos celulares, induzir inflamações e causar morte celular. Este projeto visa elucidar a cinética de agregação e desagregação de um importante exemplar de amilóide funcional, o Hormônio Liberador de Corticotrofina humana (CRH), hormônio este, que desempenha um papel crucial na modulação da atividade neuronal e na regulação de uma variedade de processos fisiológicos. O CRH é fundamental na resposta do organismo ao estresse, com níveis elevados associados à depressão e apresentam uma concentração significativamente maior no líquido cefalorraquidiano de indivíduos que cometem suicídio. Iremos investigar os mecanismos que permitem às células controlar este processo sem gerar estruturas patogênicas, uma vez que esse hormônio é armazenado e liberado na forma de amiloides nas células nervosas. A formação de amiloides funcionais tende a ser bem mais rápida quando comparada com a formação de amiloides patogênicos, fazendo assim com que sua formação ocorra por um processo diferente de agregação. A compreensão destes processos pode fornecer novas perspectivas para o tratamento de doenças neurodegenerativas e alargar a nossa compreensão da fisiologia do estresse e da regulação do sistema nervoso.

Palavras-chave: Amilóides Funcionais. Grânulos de Secreção. Hormônio liberador de Corticotrofina

## 1 INTRODUÇÃO

Neuropeptídeos são pequenas estruturas polipeptídicas, sintetizadas e liberadas pelos neurônios para modular a atividade neuronal e a comunicação entre as células nervosas (1, 2). Sendo compostos por cadeias curtas de aminoácidos, eles apresentam diversas funções como de neurotransmissores, neuromoduladores e hormônios, desempenhando um papel importante na regulação do humor, apetite, sono, dor, recompensa, memória, aprendizado e estresse (1, 2). Os neuropeptídeos se ligam aos receptores específicos nas células-alvo, ativando ou inibindo vias de sinalização intracelular que levam a respostas fisiológicas. Eles representam a classe mais diversa e ampla de moléculas sinalizadoras no sistema nervoso, sendo que existem mais de 100 neuropeptídeos conhecidos. Produzidos em várias áreas do sistema nervoso, sua diversidade permite que esse grupo atue na regulação de uma ampla variedade de processos fisiológicos e comportamentais de maneira precisa e sofisticada. Um exemplo é o Hormônio Liberador de Corticotrofina (CRH), peptídeo de 41 aminoácidos (SEPPISLDL TFHLLREVLE MARAEQLAQQ AHSNRKLMEI I - NH<sub>2</sub> (1, 11)) da classe dos hormônios liberadores hipotalâmicos, essencial para a resposta do organismo ao estresse. Níveis elevados de CRH estão associados à depressão e são encontrados em concentrações significativamente mais altas no líquido cefalorraquidiano de indivíduos que cometem suicídio (1).

Uma função essencial para a regulação e secreção de hormônios é desempenhada pelas vias de secreção que utilizam os chamados grânulos de secreção. Esses grânulos, envolvidos por uma membrana, armazenam hormônios em altas concentrações, permitindo uma liberação controlada e eficiente conforme as necessidades do organismo (3). Esse armazenamento permite que as células acumulem grandes quantidades de um determinado hormônio até serem ativadas por um sinal externo, resultando em taxas de liberação muito superiores às taxas de síntese (3). Os grânulos geralmente contêm uma única espécie de peptídeo, armazenada em estado insolúvel chamado amilóide (4).

Amilóides são estruturas compostas por múltiplas cópias de um peptídeo ou proteína (geralmente de centenas a milhares), ordenadas ao longo de um único eixo e de maneira repetitiva, formando fibras com aproximadamente 6 a 12 nm de diâmetro e até vários micrômetros de comprimento. A subestrutura repetitiva dessas fibras consiste em camadas de folhas  $\beta$ , que se estendem ao longo do eixo da fibra por meio de interações intermoleculares, como ilustrado na Figura 1.

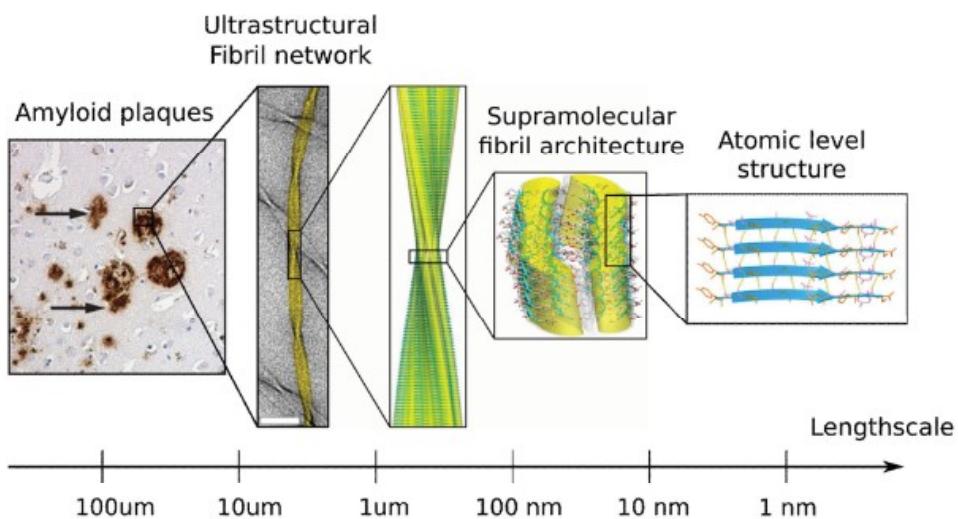


Figura 1: Escala hierárquica de formação de agregados amilóides. A figura serve como representação das etapas e processos que levam à formação de agregados amilóides na forma de placas, destacando as diferentes camadas estruturais e as interações intermoleculares que estabilizam as fibras amilóides. Fonte: Retirado de (5)

Esses agregados desempenham um papel fundamental no desenvolvimento patológico de diversas doenças, como Alzheimer, Parkinson, diabetes tipo 2, certos tipos de câncer, entre outras (6, 7). Durante muitos anos, os agregados amilóides foram considerados apenas como um estado aberrante de agregação proteica, que ocorre de maneira não nativa e evolui para uma condição patológica. No entanto, esses agregados também possuem funções nativas específicas, devido à sua capacidade de converter proteínas solúveis em formas insolúveis, sua elevada estabilidade estrutural frente a perturbações químicas e térmicas e sua resistência à proteólise (3). Para desempenhar essa função de forma controlada, as estruturas amiloides presentes nos grânulos de secreção precisam ser reversíveis, de modo que possam se dispersar em sua forma monomérica na corrente sanguínea. Contudo, com exceção de alguns estudos envolvendo a  $\beta$ -endorfina (3, 8), os mecanismos moleculares e físico-químicos responsáveis pelo processo de agregação e desagregação de neuropeptídeos ainda são pouco compreendidos, e a generalização desses mecanismos permanece incerta.

Nos estudos de agregação, busca-se compreender a cinética de formação dessas fibras amiloides, uma vez que o processo é altamente complexo e envolve vários estágios, incluindo nucleação, crescimento e maturação das fibras (9). O processo começa com a nucleação, que é a formação de núcleos iniciais de agregação. Tais núcleos podem ser criados por diferentes mecanismos, incluindo a formação de estruturas a partir de interações intermoleculares ou agregação de oligômeros (10). Na sequência, ocorre o processo de crescimento, em que monômeros

se adicionam ao núcleo inicialmente formado. Durante essa etapa, a proteína passa por mudanças conformacionais que possibilitam a formação de novas interações intermoleculares, resultando em uma rede de ligações que estabilizam as fibras. Embora, de modo geral, a montagem siga essa sequência de etapas, diversos fenômenos podem alterar a concentração total de agregados amilóides, independentemente de sua natureza (2). Ao menos três processos moleculares afetam diretamente o número de agregados: (i) Nucleação primária, que depende apenas da concentração de monômeros livres, possuindo uma ordem de reação de  $n_c$  e ocorrendo com constante de velocidade  $k_n$ , a nucleação homogênea em solução é um exemplo desse tipo de processo. (ii) Nucleação secundária, que depende tanto da concentração de monômeros livres quanto da concentração de massa de agregados, possuindo uma ordem de reação de  $n_2$  em monômeros e 1 em massa de agregados procedendo com uma constante de velocidade  $k_2$ , nucleação catalisada pela superfície das fibras existentes é um exemplo desse processo. (iii) Fragmentação, que depende apenas da concentração de massa de agregados e ocorre com constante de velocidade  $k$ , possui uma ordem de reação de 1 em massa de agregados (2).

Compreender os mecanismos moleculares pelos quais proteínas solúveis são convertidas para a forma amiloide é fundamental para elucidar o processo de montagem dessas estruturas. O estudo da cinética de agregação de amiloides é particularmente relevante para o desenvolvimento de terapias contra doenças neurodegenerativas, uma vez que a interrupção desse processo pode constituir uma estratégia terapêutica eficaz. Neste trabalho, o principal objetivo foi estabelecer um protocolo robusto e eficiente para a expressão e purificação do CRH humano, um alvo notoriamente desafiador devido à sua instabilidade e suscetibilidade à agregação. Além disso, buscamos validar o sistema de produção e iniciar a caracterização físico-química da proteína, estabelecendo as bases para investigações futuras sobre os mecanismos de agregação do CRH. A implementação bem-sucedida deste protocolo abre caminho para novos estudos detalhados sobre a agregação amilóide e contribui para o avanço na compreensão dos processos associados a doenças neurodegenerativas.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### Soluções de trabalho:

Para esse trabalho, foram usadas as seguintes soluções-tampão. O *Work Buffer* (WB) contendo 20 mM Tris(hidroximetil)metano (Tris) e 200 mM Cloreto de sódio com o pH sendo

ajustado para 8. Tampão A: 20 mM Tris e 200 mM Cloreto de sódio com o pH de 8.8. Tampão R: 50 mM Bis(2-hidroxietil)amino-tris(hidroximetil)metano (Bis-Tris) e 100 mM NaCl com o pH de 6.5. Todos os reagentes deste trabalho foram adquiridos da Sigma Aldrich-USA.

### Expressão Heteróloga:

A sequência gênica que codifica o CRH humano foi sub-clonada em vetor pET28α modificado para obter a construção HisTag - Tiorredoxina 1 (TRX) - TEV site – CRH. Os plasmídeos, otimizados para expressão em *Escherichia coli* (*E. coli*), foram adquiridos juntos à GenScript SA. Os plasmídeos foram transformados na linhagem de *E. coli* BL21 Star (DE3) quimicamente competente, utilizando o protocolo de *heat-shock*. Esse método incorpora o DNA exógeno dentro da bactéria, sensibilizando a membrana por meio de uma variação abrupta de temperatura, conforme ilustrado na Figura 2.

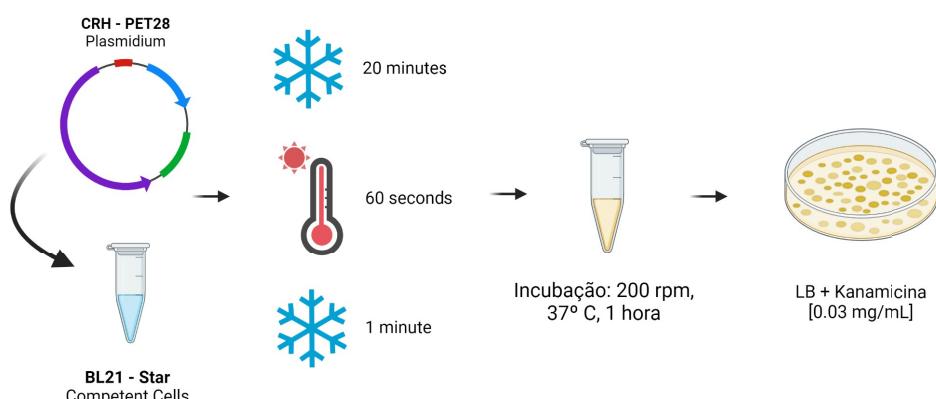


Figura 2 - Modelo esquemático do processo de transformação bacteriana por choque térmico. Fonte:  
Elaborado pelo autor

Após o crescimento das culturas na placa de Petri, as bactérias passam por uma pré-inoculação. Esse processo é realizado adicionando uma colônia isolada a um frasco contendo 5 mL de Luria-Bertani Broth (LB) e kanamicina a uma concentração final de 0,03 mg/mL. O frasco é mantido sob agitação constante a 250 rpm e a 37 °C por 18 horas.

Em seguida, o conteúdo desse frasco é transferido para um erlenmeyer contendo 1 L de LB e kanamicina a uma concentração de 0,03 mg/mL, sendo mantido sob agitação de 150 rpm a 37 °C, até que a densidade óptica a 600 nm atinja um valor entre 0,6 e 0,8. Nesse ponto, a expressão das proteínas é induzida com isopropil β-D-1-tiogalactopiranósideo (IPTG) a 1 mM, por cerca de 18 horas, a 18°C, com agitação de 150 rpm. Em seguida, as células são sedimentadas por centrifugação

a 5.000 rpm por 15 minutos, o sobrenadante é descartado, e o pellet celular é ressuspensido em 25 mL de tampão R.

### **Purificação da CRH:**

As células sedimentadas são lisadas por sonicação com ponta, utilizando-se uma amplitude de 30% durante 7 minutos, com ciclos de 15 segundos de sonicação seguidos por 30 segundos de repouso. Antes, porém, são adicionados 0,1% (v/v) de Triton X-100, 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) e 1 mg/mL de lisozima para facilitar a lise celular. Após a sonicação, a fração solúvel é separada por centrifugação a 18.000g, durante 20 minutos, a 4 °C, e descartada, pois o CRH se encontra nos corpos de inclusão.

O pellet é ressuspensido em tampão R contendo 1 M de uréia, 1 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), 5 mM de β-mercaptoetanol e 1% de Triton X-100 (Tampão R+). A solução é mantida em agitação sobre gelo por 15 minutos para promover a lavagem dos corpos de inclusão. Em seguida, a solução é submetida à sonicação seguindo o mesmo protocolo da lise celular e, após isso, centrifugada para remoção do sobrenadante. O pellet obtido é então lavado novamente com tampão R, mas sem a adição de Triton X-100, e deixado em agitação sobre gelo por mais 15 minutos. Após esse período, é novamente sonicado e centrifugado. Por fim, o pellet é ressuspensido em tampão A com 2 M de uréia e 5 mM de β-mercaptoetanol e armazenado no congelador a -20 °C para um congelamento lento, com o objetivo de solubilizar o CRH. Tal procedimento é esquematizado na figura 3.

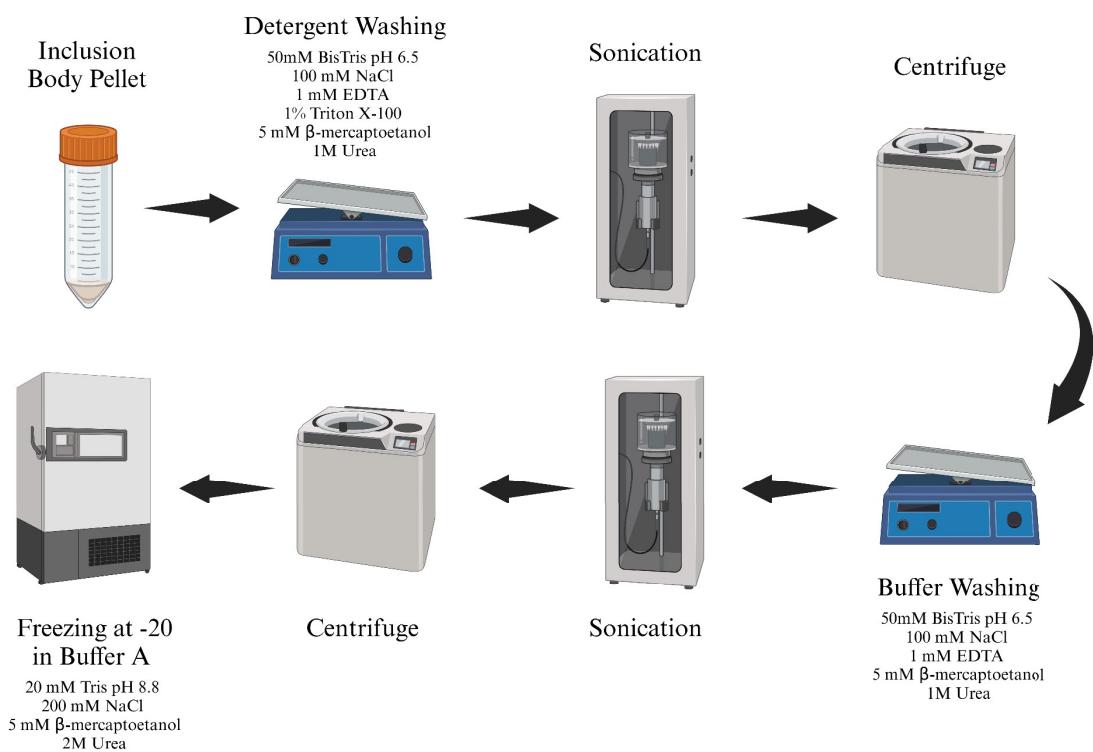


Figura 3 - Esquema do protocolo de lavagem do corpo de inclusão na forma de diagrama do fluxo. As etapas utilizadas incluem lavagens com soluções-tampão e posterior congelamento lento. Fonte: Elaborado pelo autor.

Para isolar o CRH, utiliza-se cromatografia de afinidade em coluna de níquel. Essa técnica aproveita a presença de uma resina complexada com íons de níquel, que se ligam às sequências de histidina (HisTag) na proteína alvo, permitindo sua retenção na coluna. Para eluir a proteína ligada, utiliza-se imidazol, uma molécula aromática com estrutura semelhante à histidina, que compete com o CRH pelos sítios de ligação ao níquel na resina. Dessa forma, o CRH é liberado e pode ser coletado em sua forma purificada. A eluição é realizada com tampão A contendo 300 mM de imidazol.

O próximo passo consiste em realizar uma diálise na presença da TEV protease, com o objetivo de clivar o CRH do construto de fusão (HisTag+TRX) e reduzir a concentração de imidazol na solução, obtendo assim a proteína de interesse. Para isso, utiliza-se um bêquer de 2 litros contendo tampão A com 5 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol. Em seguida, é introduzida uma membrana de diálise com corte de 3 kDa (Spectra/Pro Dialysis Membrane) e adiciona-se a TEV protease na proporção de 1:5 mg de protease por mg de proteína alvo. A TEV protease atua

clivando especificamente o sítio de reconhecimento, separando o CRH do restante do construto. O sistema é mantido sob agitação constante por 16 horas a 10 °C.

Após a diálise, a solução contendo CRH é novamente passada pela coluna de níquel, desta vez com o objetivo de reter a TRX, que ainda contém a cauda de histidina, permitindo a separação do CRH clivado. Em seguida, para remover quaisquer impurezas residuais, a amostra passa por cromatografia por exclusão molecular. Nesta etapa, utiliza-se uma coluna Superdex Peptide 10/300 GL (GE Healthcare), com pressão máxima de 1,5 MPa e fluxo de 0,5 mL/min, acoplada a um cromatógrafo ÄKTA pure (GE Healthcare). A Figura 4 ilustra todo o processo de purificação do CRH.

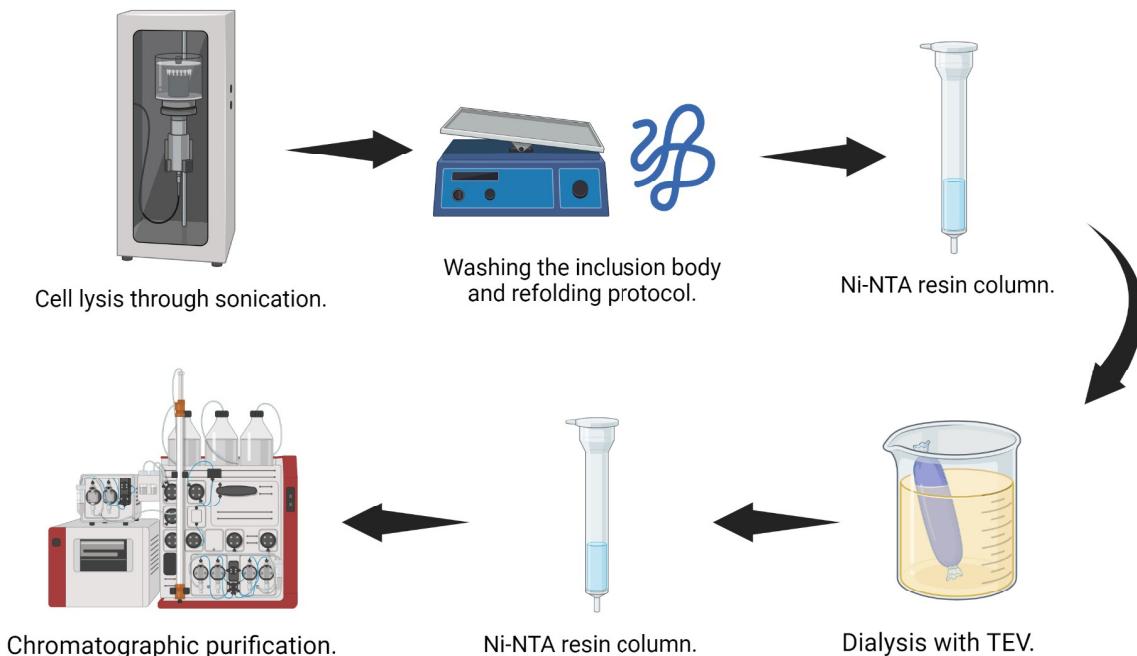


Figura 4 - Esquema do protocolo de purificação do CRH na forma de diagrama do fluxo. As etapas utilizadas para purificar o CRH incluem a lise celular, lavagem dos corpos de inclusão, solubilização e duas etapas de cromatografia. Fonte: Elaborado pelo autor.

### Caracterização por dicroísmo circular:

Para estudar e caracterizar estruturalmente o CRH, utilizou-se a técnica de dicroísmo circular (CD), uma espectroscopia amplamente empregada para analisar a conformação estrutural de biomoléculas. Esta técnica baseia-se no fenômeno de absorção diferencial de luz circularmente polarizada, permitindo identificar as estruturas secundárias presentes na molécula, como

alfa-hélices, folhas beta, voltas ou regiões desordenadas, cada uma com um espectro característico. Essas variações espetrais decorrem das diferenças no momento do dipolo elétrico de cada tipo de estrutura. Neste estudo, os espectros de CD foram registrados utilizando um espectropolarímetro J-815 (JASCO, Corporation, Tóquio, Japão).

### 3 RESULTADOS

#### Expressão heteróloga e purificação

A proteína de fusão CRH-TRX foi expressa em *E. coli* e verificou-se que ela se acumula predominantemente nos corpos de inclusão, como evidenciado pela análise de eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% (Figura 5). Para maximizar a pureza da proteína e remover resíduos celulares, os corpos de inclusão foram isolados e lavados com uma solução de Triton X-100. Em seguida, realizou-se o processo de refold por congelamento lento, o que permitiu que a proteína de fusão se tornasse solúvel

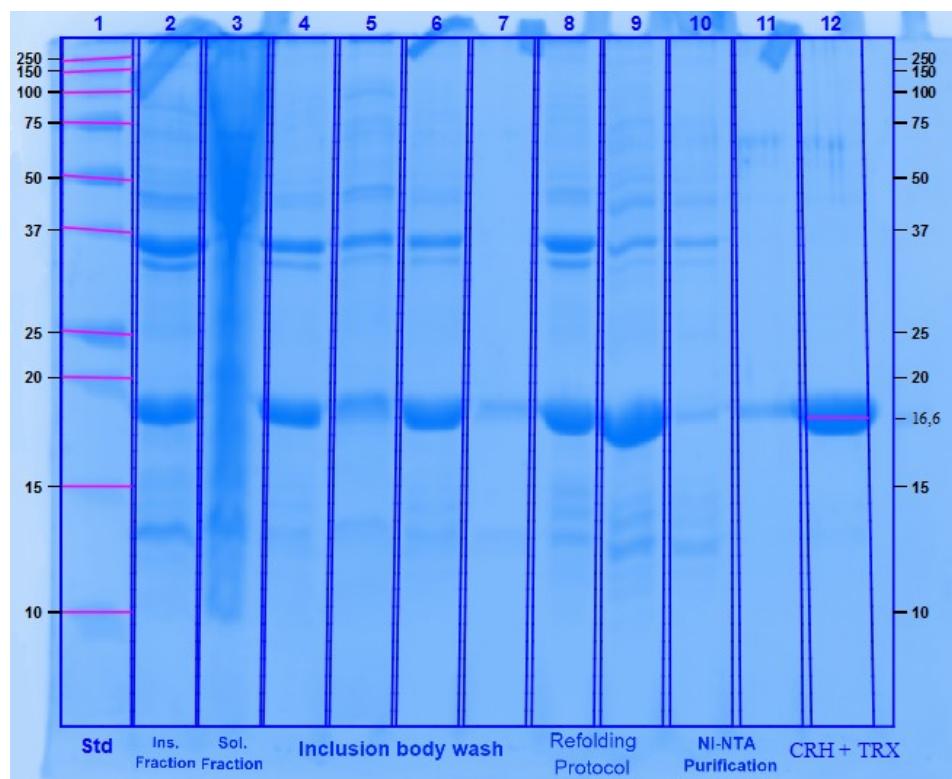


Figura 5 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) como análise dos primeiros passos do protocolo de purificação. A análise das frações obtidas nos estágios iniciais de purificação do CRH evidenciam a localização do CRH-TRX nos corpos de inclusão e o efeito das lavagens com detergente para remover contaminantes celulares. Fonte: Elaborado pelo autor.

Após a solubilização, o CRH foi isolado através de cromatografia de afinidade em coluna de níquel, onde se liga pela cauda His-Tag e é eluído com uma alta concentração de imidazol. A pureza do CRH foi confirmada por uma segunda eletroforese em gel (Figura 6), que mostra a clivagem bem-sucedida pela TEV protease e a obtenção do CRH em condições puras.

Nos passos seguintes, a fração eluída é submetida à diálise na presença de TEV protease para clivagem da proteína de fusão. Em seguida, uma nova cromatografia de afinidade foi realizada, e a fração não ligada foi submetida à uma cromatografia por exclusão molecular. A Figura 5 apresenta um gel de eletroforese em poliacrilamida a 15%, utilizando Septina Coiled-Coil (~5 kDa) e Ribonuclease A (~15 kDa) como padrões moleculares auxiliares. O gel evidencia a clivagem bem-sucedida pela TEV protease e a obtenção de CRH em condições puras.

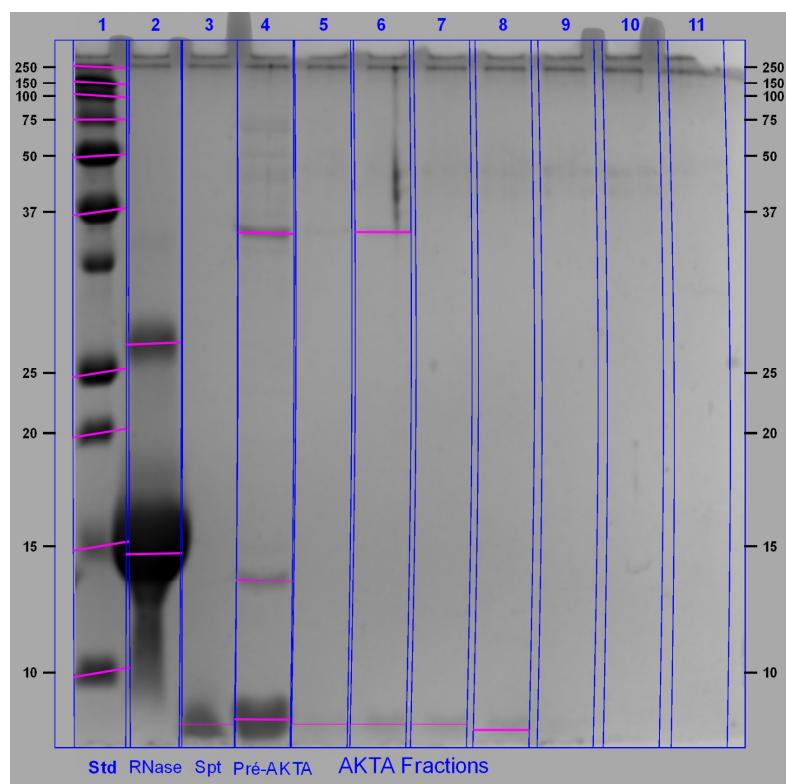


Figura 6 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) demonstrando a obtenção do CRH após cromatografia de exclusão molecular. O gel demonstra a pureza da proteína CRH após clivagem do tag de fusão e purificação por exclusão molecular; utilizou-se padrões moleculares auxiliares (Spt e RNase) para confirmar a presença do CRH em condições puras. Fonte: Elaborado pelo autor.

## Avaliação da solubilidade do CRH em função do pH durante a lise celular

Como mencionado anteriormente, o CRH tende a se acumular quase totalmente nos corpos de inclusão. Para otimizar os processos subsequentes de purificação, é interessante se trabalhar em condições que promovam a máxima localização da proteína nesses corpos de inclusão. Observou-se que a quantidade de proteína na fração insolúvel depende principalmente do pH do tampão utilizado. Assim, para identificar a condição em que o CRH se torna mais insolúvel, foram testados diferentes pHs nos tampões durante a ressuspensão das células. Após essa etapa, o protocolo de purificação foi seguido conforme descrito, e uma eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% foi realizada com amostras de cada uma das quatro condições de pH testadas. A Figura 7 exibe as frações solúveis e insolúveis da expressão em diferentes pHs, evidenciando um aumento na intensidade da banda de 16,6 kDa, marcada na figura. Esse aumento indica que, com a acidificação do pH, o CRH adota uma conformação mais insolúvel, favorecendo sua localização nos corpos de inclusão.

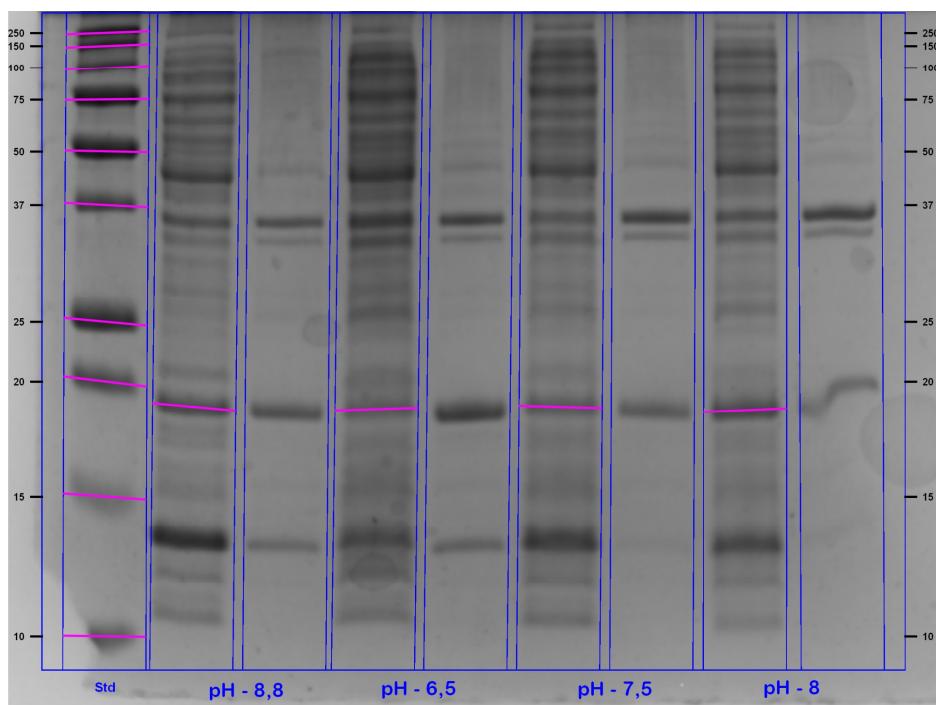


Figura 7 - Efeito do pH na solubilidade do CRH durante a lise celular. A comparação das frações solúveis e insolúveis do CRH em diferentes condições de pH no processo de lise celular demonstra que a acidificação do pH favorece a formação de agregados e a localização do CRH na fração insolúvel. Fonte: Elaborado pelo autor.

## Deconvolução de sinal

Para uma análise estrutural mais detalhada do CRH, é possível realizar a deconvolução do sinal dos espectros de dicroísmo circular, permitindo identificar as frações relativas de cada tipo de estrutura secundária presente na proteína. A partir dos dados obtidos para o CRH em pH 7,4, essa deconvolução foi realizada utilizando diferentes métodos. A Figura 8 apresenta o espectro experimental de dicroísmo circular do CRH, juntamente com a reconstrução do sinal, possibilitando a determinação das frações de alfa-hélices, folhas  $\beta$ , voltas e regiões desordenadas.

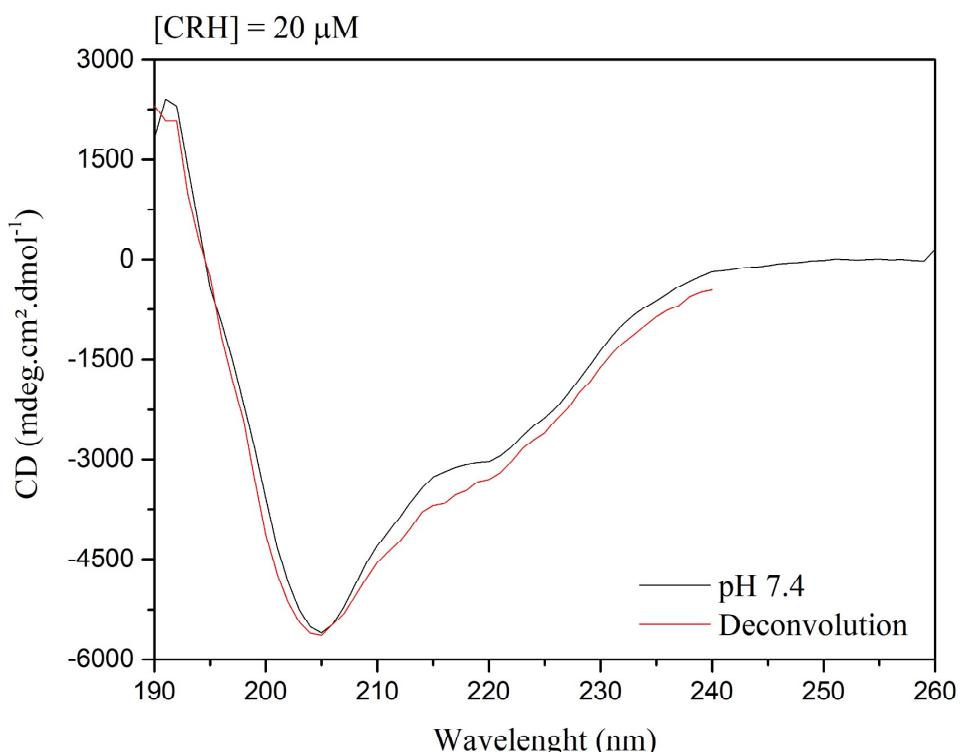


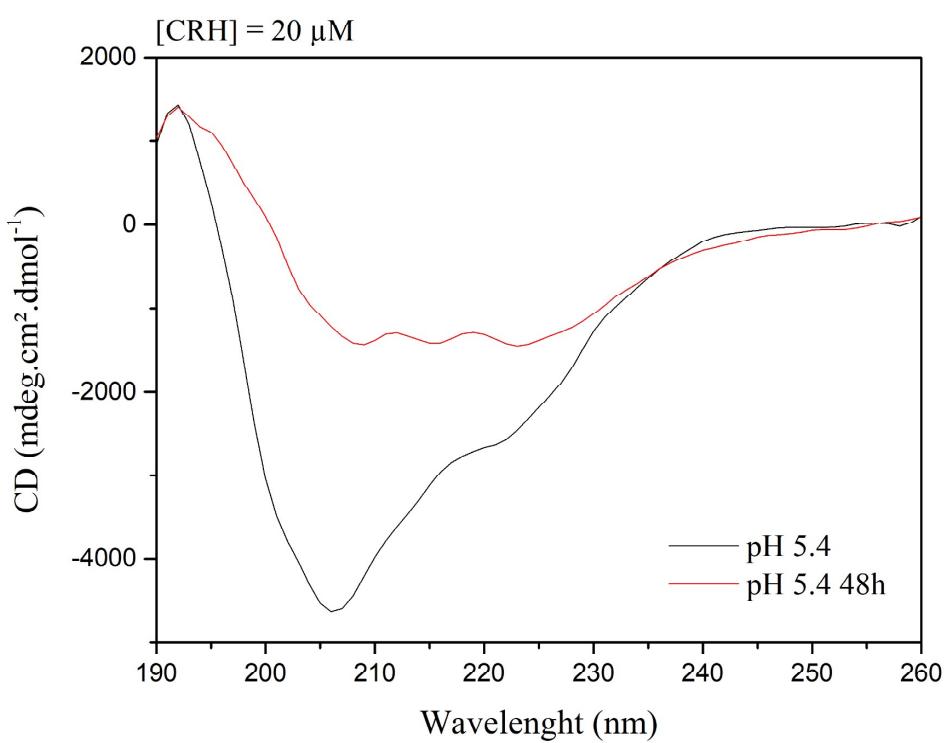
Figura 8 - Dado experimental de dicroísmo circular do CRH em tampão fosfato de sódio (pH 7,4) e deconvolução espectral realizada pelo programa DichroWeb. O espectro de dicroísmo circular do CRH em pH 7,4, com deconvolução espectral, permite a identificação das frações de estruturas secundárias presentes, incluindo alfa-hélices, folhas  $\beta$  e regiões desordenadas. Fonte: elaborado pelo autor.

Os resultados deste estudo fornecem uma visão inicial sobre a estruturação secundária do CRH em solução, indicando uma composição rica em regiões desordenadas, juntamente com uma fração significativa de folhas  $\beta$  e menores proporções de alfa-hélices e voltas. A análise de dicroísmo circular com deconvolução de sinal revelou aproximadamente 7% de alfa-hélices, 37%

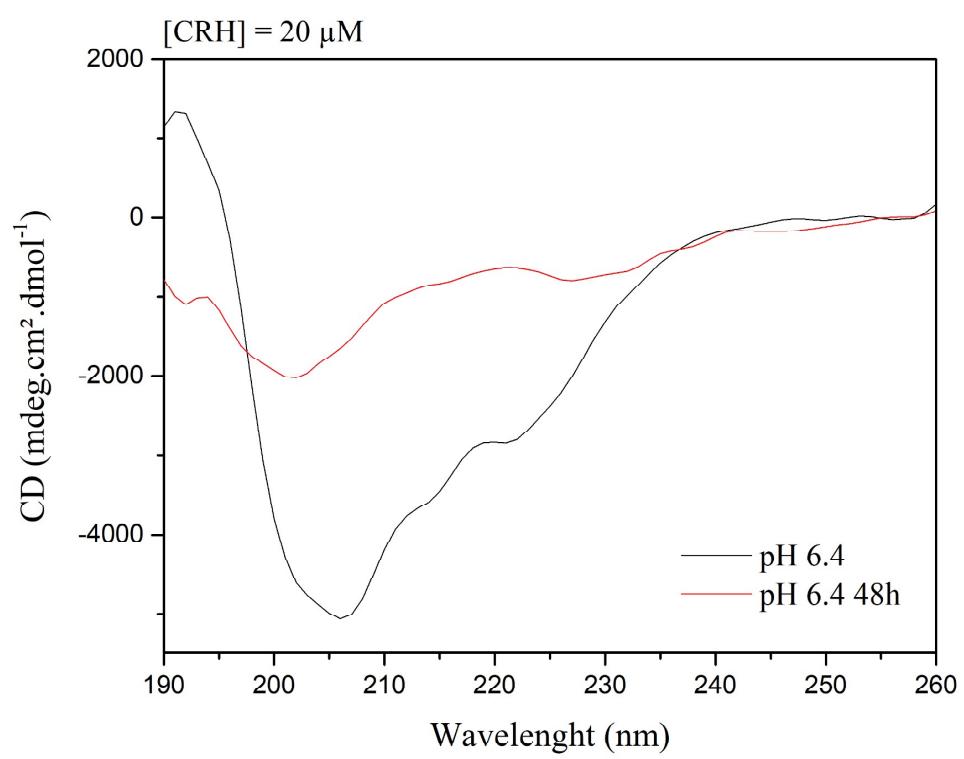
de folhas  $\beta$ , 14% de voltas e 42% de regiões desordenadas. Embora esses dados ofereçam uma visão geral da estrutura do CRH, a precisão é limitada, especialmente devido ao caráter desordenado da proteína. Esse aspecto dificulta uma reconstrução fiel do sinal, dada a limitação do quão distante no *far-UV* conseguimos alcançar com equipamentos convencionais de bancada. Esse aspecto ressalta a importância de métodos complementares, como a ressonância magnética nuclear (RMN), para uma caracterização estrutural mais detalhada e robusta no futuro. Apesar dessas limitações, a predominância de regiões desordenadas e de folhas  $\beta$  é consistente com a tendência do CRH de formar agregados amilóides em condições específicas. A presença de uma estrutura desordenada pode ser um fator crucial para sua funcionalidade biológica, permitindo ao CRH transitar entre estados solúveis e agregados em resposta ao microambiente celular, regulando sua ação em processos fisiológicos de forma controlada.

### **Caracterização por Dicroísmo Circular**

Para investigar o impacto do microambiente químico na formação de amiloides, analisamos como diferentes pHs, observados ao longo das vias de secreção, afetam o processo de agregação. A variação de pH, que diminui do retículo endoplasmático (pH ~7,4) até os grânulos secretores (pH ~5,5) e subsequentemente aumenta nas vias sanguíneas (pH ~7,4), pode levar o hormônio de um estado livre a um estado de agregação amiloide, seguido de desagregação no espaço extracelular. Para avaliar essas transições estruturais, utilizou-se a técnica de dicroísmo circular, com o objetivo de observar as mudanças nas estruturas secundárias da proteína em diferentes condições de pH. A Figura 9 apresenta os espectros obtidos em cada pH testado.



a)



b)

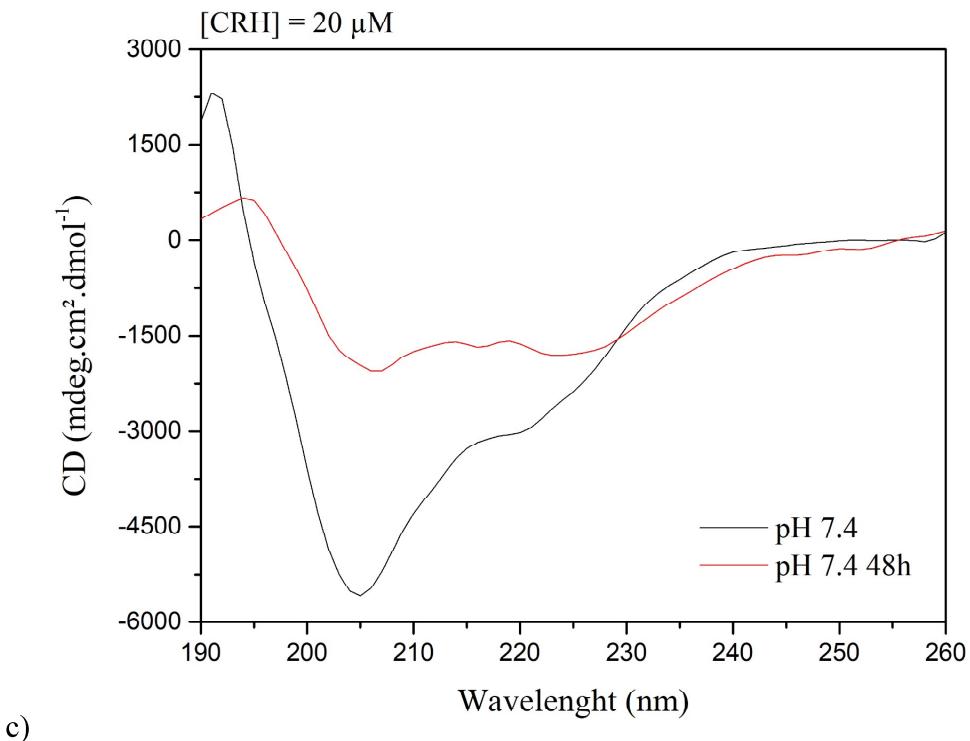


Figura 9 - Espectros de dicroísmo circular para o CRH em diferentes pHs [(A) 5.4; (B) 6.4 e (C) 7.4] em tampão fosfato. A análise dos espectros de dicroísmo circular para o CRH a diferentes pHs mostra as variações nas estruturas secundárias em resposta ao microambiente químico e sua propensão temporal à formação de folhas  $\beta$  em condições ácidas. Fonte: Elaborado pelo autor.

Inicialmente, o CRH apresenta uma estrutura rica em regiões desordenadas mas com presença de estruturas em  $\beta$  e de alfa-hélices. Após 48 horas de incubação, sua estrutura secundária é modificada, com uma redução no conteúdo desordenado e uma tendência ao aumento de conteúdo em folhas  $\beta$ , comportamento esperado devido à formação progressiva de agregados amiloides.

A estrutura proteica é essencial para sua função biológica, e a exposição a temperaturas elevadas pode desnaturar as proteínas, resultando na perda de função. O processo de desnaturação térmica envolve a quebra de interações não covalentes que mantêm a estrutura da proteína, e o ponto em que isso ocorre é conhecido como temperatura de desnaturação ou ponto de transição térmica ( $T_m$ ). Com isso em mente, a estabilidade térmica do CRH foi avaliada, conforme mostrado na Figura 10, para garantir a integridade estrutural da amostra e assegurar que não houve desnaturação térmica nas condições de formação de estruturas amiloides.

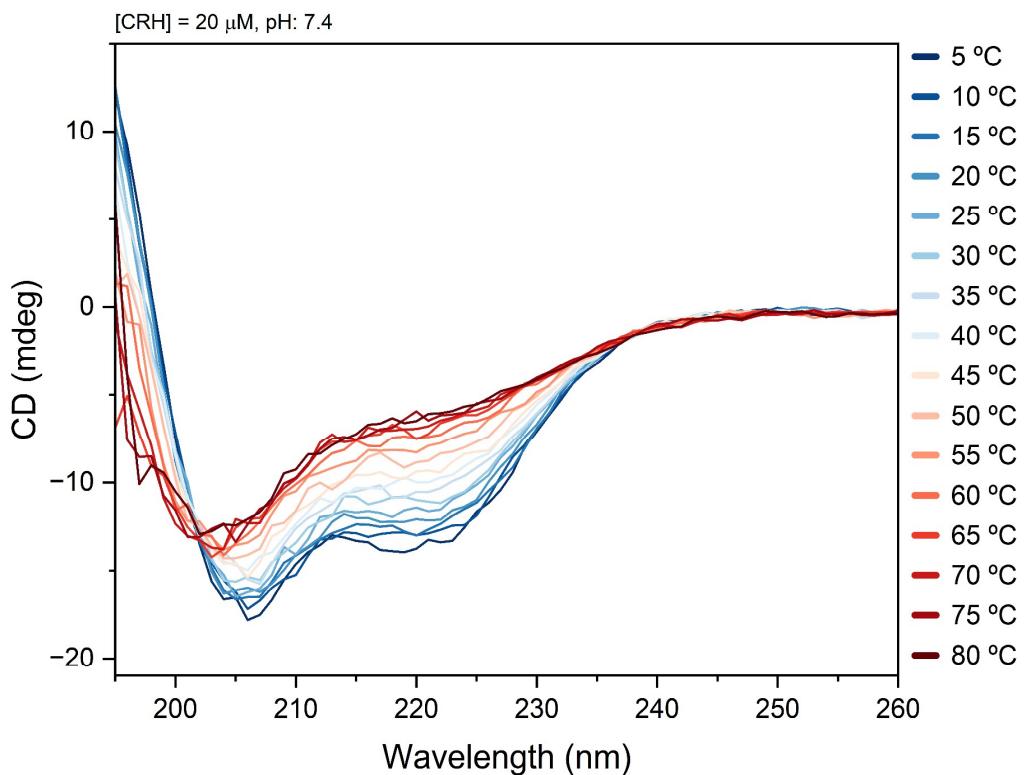


Figura 10 - Curva de desnaturação térmica do CRH em tampão fosfato pH 7,4. A análise da estabilidade térmica do CRH evidencia a perda da estrutura secundária com o aumento da temperatura.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para a determinação do  $T_m$ , escolheu-se um comprimento de onda específico e analisou-se a variação de intensidade de sinal em função do aumento da temperatura. Neste caso, utilizou-se o comprimento de onda de 222 nm, cuja intensidade é indicativa de arranjos em alfa-hélice. A partir da Figura 11, foi determinado o  $T_m$  em  $(41 \pm 1)^\circ\text{C}$ , temperatura na qual cerca de 50% da população de proteínas encontra-se desenovelada, assumindo uma transição de dois estados. Esse resultado sugere que a conformação do CRH é relativamente estável em condições específicas, embora mudanças estruturais possam ocorrer com o aumento da temperatura.

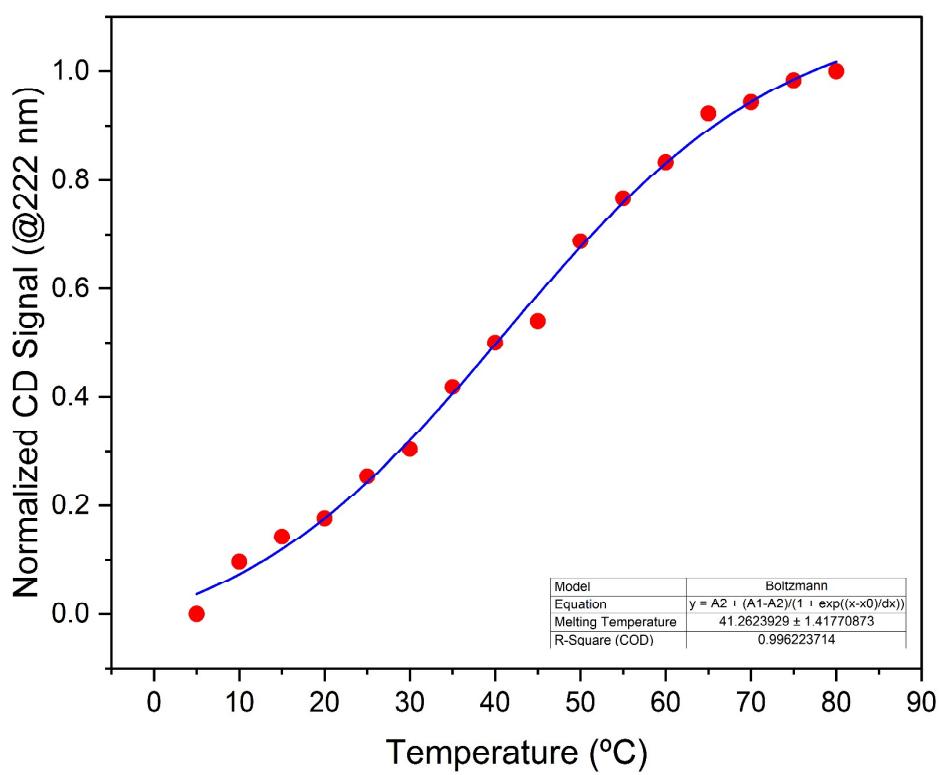


Figura - 11: Determinação da temperatura de melting ( $T_m$ ) do CRH em pH 7,4. A curva de desnaturação térmica obtida por dicroísmo circular, monitorando a dependência da intensidade em 222 nm em função da temperatura, permite a determinação do  $T_m$  para o CRH nessas condições, na qual aproximadamente 50% das moléculas perdem sua conformação nativa devido ao aumento da temperatura.

Fonte: Elaborado pelo autor.

#### **4 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Este trabalho estabeleceu com sucesso um protocolo eficiente para a expressão e purificação do CRH, resultando na obtenção da proteína com alto grau de pureza, condição necessária para detalhados estudos estruturais. Além disso, as análises iniciais indicam que o CRH possui uma estrutura predominantemente desordenada em estado solúvel, mas que, ao longo de 48 horas de incubação, ocorre uma transição estrutural com diminuição do conteúdo desordenado e aumento nas folhas  $\beta$ , característico de agregados amilóides. Esse comportamento corrobora a hipótese de que o microambiente químico, especialmente o pH e a temperatura, influencia significativamente o processo de agregação. A estabilidade térmica da amostra foi avaliada por meio de dicroísmo circular, evidenciando que as mudanças estruturais observadas não se devem à desnaturação térmica, mas sim à dinâmica de agregação amilóide. Essa estabilidade estrutural é fundamental, pois confirma a viabilidade do CRH como modelo para estudos futuros, visando a elucidação detalhada dos mecanismos de agregação e desagregação que ocorrem naturalmente no organismo.

Contudo, para um entendimento completo dos mecanismos envolvidos na agregação do CRH, ainda são necessárias caracterizações adicionais. Estudos sobre o processo de desagregação e as condições que facilitam a liberação controlada do CRH em ambientes extracelulares, por exemplo, permanecem como lacunas importantes. Essas questões abrem oportunidades para novas investigações, incluindo a caracterização detalhada de sua estrutura em diferentes microambientes e a análise do tempo e das condições de formação das fibras, empregando uma variedade de técnicas analíticas. A implementação bem-sucedida deste protocolo estabelece uma base sólida para futuros estudos detalhados sobre a agregação amilóide e contribui para a compreensão dos processos moleculares por trás desse fundamental processo biológico.

## **REFERÊNCIAS**

- 1 - G. Serafini, M. Pompili, D. Lindqvist, Y. Dwivedi, P. Girardi, **The Role of Neuropeptides in Suicidal Behavior: A Systematic Review**. Biomed Research International 2013, (2013).
- 2 - Nes povitaya N, Gath J, Barylyuk K, Seuring C, Meier BH, Riek R. **Dynamic Assembly and Disassembly of Functional β-Endorphin Amyloid Fibrils**. Journal of the American Chemical Society. (2016).
- 3 - Otzen, D. & Riek, R. **Functional Amyloids**. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 11 (2019).
- 4 - Maji SK, Perrin MH, Sawaya MR, et al. **Functional amyloids as natural storage of peptide hormones in pituitary secretory granules**. Science. (2009).
- 5 - T. P. J. Knowles and R. Mezzenga, **Amyloid Fibrils as Building Blocks for Natural and Artificial Functional Materials**. Advance Materials. (2016).
- 6 - N. Jain, N. D. Hammer, X. Wang, B. A. McGuffie, M. R. Chapman, **Amyloid: Friend and Foe**. Handbook of Infection and Alzheimer's Disease 5, 297-311 (2017).
- 7 - T. P. J. Knowles, M. Vendruscolo, C. M. Dobson, **The amyloid state and its association with protein misfolding diseases**. Nature Reviews Molecular Cell Biology 15, 384-396 (2014).
- 8 - C. Seuring et al., **The three-dimensional structure of human beta-endorphin amyloid fibrils**. Nature Structural & Molecular Biology 27, 1178-U1202 (2020).
- 9 - D. Chatterjee et al., **Co-aggregation and secondary nucleation in the life cycle of human prolactin/galanin functional amyloids**. Elife 11, (2022).
- 10 - C. Seuring et al., **Amyloid Fibril Polymorphism: Almost Identical on the Atomic Level, Mesoscopically Very Different**. Journal of Physical Chemistry B 121, 1783-1792 (2017).
- 11 - C. R. R. Grace et al., **Common and divergent structural features of a series of corticotropin releasing factor-related peptides**. Journal of the American Chemical Society 129, 16102-16114 (2007).
- 12 - Meisl, G. et al. **Molecular mechanisms of protein aggregation from global fitting of kinetic models**. Nature Protocols 11, 252-272 (2016).
- 13 - Qi X, Sun Y, Xiong S. **A single freeze-thawing cycle for highly efficient solubilization of inclusion body proteins and its refolding into bioactive form**. Microbial Cell Factories. (2015).
- 14 - V. Kormos, B. Gaszner, **Role of neuropeptides in anxiety, stress, and depression: From animals to humans**. Neuropeptides 47, 401-419 (2013).
- 15 - Mitchell AJ. **The role of corticotropin releasing factor in depressive illness: a critical review**. Neuroscience & Biobehavioral Reviews.(1998).