

Isabel Cristina Mendonça de Azevedo Cardeal

Uso terapêutico de *chaperones* em doenças conformacionais



Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2013

Isabel Cristina Mendonça de Azevedo Cardeal

Uso terapêutico de *chaperones* em doenças conformacionais



Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2013

Isabel Cristina Mendonça de Azevedo Cardeal

Uso terapêutico de *chaperones* em doenças conformacionais

Assinatura

.....
(Isabel Cristina Mendonça de Azevedo Cardeal)

“Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para
obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas”

Orientador: Doutora Maria Gil Roseira Ribeiro
Prof.Associada, FCS-UEP

.....



Sumário

Os *chaperones* são proteínas que têm por função principal assistir e promover o enrolamento adequado de cadeias polipeptídicas, quer as cadeias recém-sintetizadas nos ribossomas do retículo endoplasmático quer pós-traducionalmente durante o seu processo de translocação através das membranas intracelulares. No ambiente celular existem várias classes de *chaperones* não relacionadas estruturalmente que se organizam formando redes cooperativas de vigilância e manutenção da conformação nativa de proteínas ou de indução da destruição de proteínas *misfolded* através da formação de corpos de inclusão e posterior degradação pelas proteases do sistema lisosomal ou proteossomal.

As doenças conformacionais, como por exemplo as doenças amiloides, são caracterizadas pela redução do nível de proteína nativa e pela acumulação da respetiva proteína *misfolded*, resultando na sua aglomeração e deposição em tecidos específicos que está associada a um aumento de morbilidade e mortalidade. A investigação ao nível terapêutico sugere que o tratamento com *chaperones* farmacológicos pode ser preventivo, ao reduzir o *stress* oxidativo que é um agente causador comum a estas doenças, ou curativo, seja pela aplicação/administração de *chaperones* farmacológicos ou pelo meio de indução de produção destes *chaperones* pelo próprio organismo. No entanto, ainda existe um longo caminho para percorrer até que seja identificado um fármaco que consiga devolver a estes doentes a qualidade de vida que eles merecem, facto que torna fundamental a continuidade da investigação sobre *chaperones*, desde a elucidação do seu funcionamento à sua aplicação farmacológica.

Palavras-chave: *Chaperones*, *Misfolding*, Lisossoma, Proteassoma, Doenças conformacionais.



Abstract

Chaperones are proteins whose function is to assist and promote the correct folding of proteins, either newly proteins synthesized at ribosomes of the endoplasmic reticulum or post-translationally during the process of translocation across intracellular membranes. In the cellular environment, there are several classes of structurally unrelated chaperones. These molecules are organized in cooperative networks involved in surveillance and maintenance of the native conformation of proteins, or in the destruction of misfolded proteins through the formation of inclusion bodies that are subsequently degraded by lysosomal or proteosomal systems.

Protein conformational diseases, such as amyloid disorders, are characterized by a reduction in the level of native protein and, simultaneously, by the accumulation of misfolded proteins. These alterations result in the agglomeration of misfolded proteins and their accumulation at toxic levels in a specific tissue is associated with disorders with an increased morbidity and mortality. Data from investigation of therapeutic options suggest that pharmacological chaperons may act preventively, by reducing oxidative stress which is a common causative agent of these diseases or correctively by either the application/administration of these molecules or the induction of its production by the body itself. However, there is still a long way until the identification of a drug that can return to these patients the quality of life they deserve, thus underline the importance of future research on chaperones, not only to better elucidate its molecular mechanism in the cell but also to identify more effective drugs for the treatment of conformational diseases.

Key-words: *Chaperones*, *Misfolding*, Lysosome, Proteasome, Conformational diseases.



Agradecimentos

Aos meus pais, Adélio e Carolina, pelo sacrifício pessoal que fizeram por mim ao longo da minha vida académica e pelas energias positivas que sempre me transmitiram ao longo deste percurso.

Ao meu irmão, Tiago, que com a sua juventude me oferece as gargalhadas que juntos partilhamos e pelo seu apoio e presença constante na minha vida.

Às minhas avós, Celestina e Irene, pelo saber que sempre cultivam em mim, o que me torna mais forte quer a nível pessoal quer na vida profissional/académica.

Aos meus avôs, Cardeal e Mendonça, que vivem no meu coração, meus pilares, e a quem dedico este momento da minha vida por tudo que representam.

Ao meu namorado, Miguel, agradeço a compreensão pelos momentos agora perdidos mas que irão fazer evoluir e fortalecer a nossa relação, além de ser um dos mais fortes pilares na minha vida pessoal.

À orientadora Prof. Doutora Maria Gil Ribeiro, pelo tempo que dispensaram para me auxiliar e me encaminhar na concretização desta tese de mestrado.

À Universidade Fernando Pessoa, agradeço a possibilidade de tornar real o sonho de ter educação superior e com a qualidade e exigência que sempre pontuaram esta instituição ao longo do meu percurso.

Às minhas amigas, Bruna, Suzi, Ísis, Soraia de Máisa agradeço os sentimentos e momentos que partilhamos e que sempre serão inesquecíveis e, acima de tudo, a nossa união que sempre tornou mais fácil ultrapassar os obstáculos que a vida me reservou.



Índice

Sumário	II
Abstract	III
Lista de figuras	VI
Lista de tabelas	VI
Lista de abreviaturas e siglas.....	VII
Capítulo I - Introdução	1
Capítulo II - Desenvolvimento.....	3
1. Proteínas: estrutura e função	4
2. Expressão genética e biossíntese de proteínas.....	7
3. Fenómenos de <i>misfolding</i> e agregação de proteínas	15
4. Defesa celular – Controlo de qualidade.....	18
4.1. Chaperones.....	20
4.2. Sistema Ubiquitina/Proteassoma	26
5. Patologias conformacionais	28
6. Terapia mediada por <i>Chaperones</i>	32
7. Métodos usados para o desenvolvimento de fármacos protéicos	37
Capítulo III - Conclusão	40
BIBLIOGRAFIA	42
Referências Bibliográficas	43

Lista de figuras

Figura 1: Níveis de organização estrutural das proteínas	6
Figura 2: Expressão genética e síntese proteica	8
Figura 3: Biogénese e maturação das proteínas.....	12
Figura 4: Mecanismo molecular de ação dos <i>chaperones</i>	20
Figura 5: Via ubiquitina/proteassoma	26
Figura 6: Modelo para a identificação de potenciais fármacos a partir de uma abordagem fisiopatológica.....	34

Lista de tabelas

Tabela 1: Análise funcional de alguns <i>chaperones</i>	23
---	----



Lista de abreviaturas e siglas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosina trifosfato
AVC	Acidente Vascular Cerebral
CG	Complexo de Golgi
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GCase	Glucocerebrosidase
HSF	Fator de choque térmico
HSP	Proteína de choque térmico
HTS	<i>high throughput screening</i>
mARN	ARN mensageiro
NAC	Complexo associado à cadeia nascente
RE	Retículo Endoplasmático
RER	Retículo Endoplasmático Rugoso
RTFC	Reguladores de condutância transmembranar
tARN	ARN de transferência



Capítulo I - Introdução



Nas últimas décadas registou-se uma evolução notável ao nível dos recursos tecnológicos, dos cuidados de saúde e da qualidade de vida das populações, resultando num considerável aumento da longevidade. No entanto, essa mesma longevidade aliada a fatores ambientais, tais como a poluição, alimentação e o *stress*, podem estar associados a desequilíbrios moleculares e, subsequentemente, ao aparecimento de alterações fisiopatológicas que poderão traduzir-se no aparecimento de doenças específicas.

Os seres vivos superiores possuem tecidos e estruturas de elevada complexidade celular, onde o bom funcionamento e a homeostasia celular estão dependentes de vários mecanismos de vigilância e de comunicação celular, muitos deles mediados por proteínas. As proteínas são componentes celulares que exercem funções muito diversas. Assim, a aquisição da estrutura tridimensional correta da proteína é fundamental para o desempenho adequado da sua função. Para esse efeito, existe um conjunto de proteínas auxiliaadoras, conhecidas por *chaperones*, que assistem ao processo de enrolamento e transporte de proteínas para o compartimento onde irão exercer a respetiva função celular.

Presentemente são conhecidas várias doenças relacionadas com uma produção defeituosa de proteínas, nomeadamente doenças metabólicas, doenças neuromusculares e doenças neurodegenerativas. Uma das estratégias usadas no tratamento destas doenças consiste na utilização de *chaperones*. Esta abordagem terapêutica consiste no aumento do nível intracelular de *chaperones*, quer pela administração de fármacos específicos quer pela indução da sua produção celular. Assim, com o aumento do nível intracelular de *chaperones* o risco de malformação de proteínas é reduzido e, conseqüentemente, aumenta a possibilidade de reversão da doença.

O trabalho de revisão bibliográfica descrito nesta tese visa explorar o modo de funcionamento dos *chaperones* no organismo e a potencialidade da sua utilização no tratamento de algumas doenças.

Esta tese foi redigida ao abrigo do novo acordo ortográfico.



Capítulo II - Desenvolvimento



1. Proteínas: estrutura e função

Na natureza, a matéria viva é composta por células que em conjunto formam os tecidos e as estruturas que compõem os órgãos. As proteínas são componentes centrais dos processos biológicos uma vez que as transformações moleculares que integram o metabolismo celular são dependentes de proteínas enzimáticas (Voet *et al.*, 2000). O primeiro indício da sua existência ocorreu no início do século XIX, em pesquisas desenvolvidas por cientistas na área da nutrição, quando foram descobertos compostos de nitrogénio essenciais para a existência dos seres vivos. Em 1839, G.J Mulder atribuiu a estes compostos o termo de proteína, que vem do grego *proteios*, que significa primário. Nessa época, os fisiologistas não se aperceberam de que estes compostos resultavam da união de aminoácidos, unidades estruturais isoladas em 1830. Hoje em dia as proteínas são consideradas estruturas essenciais para a existência de vida (Halpern, 1997, Voet *et al.*, 2000).

As proteínas são constituídas por polipéptidos, isto é, polímeros compostos por monómeros, os aminoácidos, que se encontram unidos por ligações amida as quais são especificamente denominadas por ligações peptídicas (Halpern, 1997). Os aminoácidos são moléculas orgânicas que apresentam, pelo menos, um grupo amina e um grupo carboxilo. Na generalidade, 20 aminoácidos padrão, na sua maioria L- α -aminoácidos, fazem parte da constituição de proteínas. Os α -aminoácidos são unidades estruturais em que o grupo amina e o grupo carboxilo estão ligados ao carbono- α , cuja fórmula geral é $H_2NCHR\text{COOH}$. Aqui o carbono- α é um centro quiral que apresenta atividade ótica; a geometria tetraédrica que ocorre à volta deste carbono permite conformações espaciais diferentes sob a forma de estereoisómeros. (Halpern, 1997, Koolman e Roehm, 2005, Voet *et al.*, 2000). Os aminoácidos podem ser classificados de acordo com a natureza química e polaridade da cadeia lateral (grupo radical, R) (Halpern, 1997). Os aminoácidos não só são as estruturas base das cadeias peptídicas e polipeptídicas como também podem ser não-proteinogénicos funcionando como neurotransmissores ou precursores de alguns metabolitos (Halpern, 1997, Koolman e Roehm, 2005).



A configuração tridimensional das proteínas depende não só das unidades estruturais que as compõem, como também da sua organização estrutural. Assim, em relação à sua organização estrutural, as proteínas apresentam 4 níveis: primário, secundário, terciário e quaternário. A estrutura primária de uma proteína é representada pela ordem dos aminoácidos na cadeia polipeptídica, sem qualquer organização tridimensional. A estrutura secundária é caracterizada pelo arranjo espacial dos átomos de um esqueleto polipeptídico e é assegurada por ligações não covalentes específicas (pontes de hidrogénio). Estas ligações podem apresentar vários ângulos, onde a repetição destes em várias ligações peptídicas adjacentes podem levar à formação de estruturas secundárias, nomeadamente hélices α e folhas β . A estrutura terciária refere-se à estrutura tridimensional do polipéptido. Nesta configuração, é possível observar ligações entre aminoácidos distantes na estrutura primária da cadeia polipeptídica e entre as estruturas secundárias. As interações responsáveis pela aquisição/manutenção da conformação terciária são fundamentalmente hidrofóbicas e envolvem as cadeias laterais apolares dos resíduos de aminoácidos que se concentram no interior da molécula, ou correspondem a pontes dissulfureto que se estabelecem entre as cadeias laterais de resíduos de cisteína. A estrutura quaternária é representada pela associação não covalente de uma ou mais cadeias polipeptídicas de nível terciário, referidas como subunidades (Halpern, 1997, Voet *et al.*, 2000). A Figura 1 representa os quatro níveis de organização estrutural de proteínas. As estruturas proteicas mais complexas (nível terciário e quaternário) assumem uma configuração tridimensional.

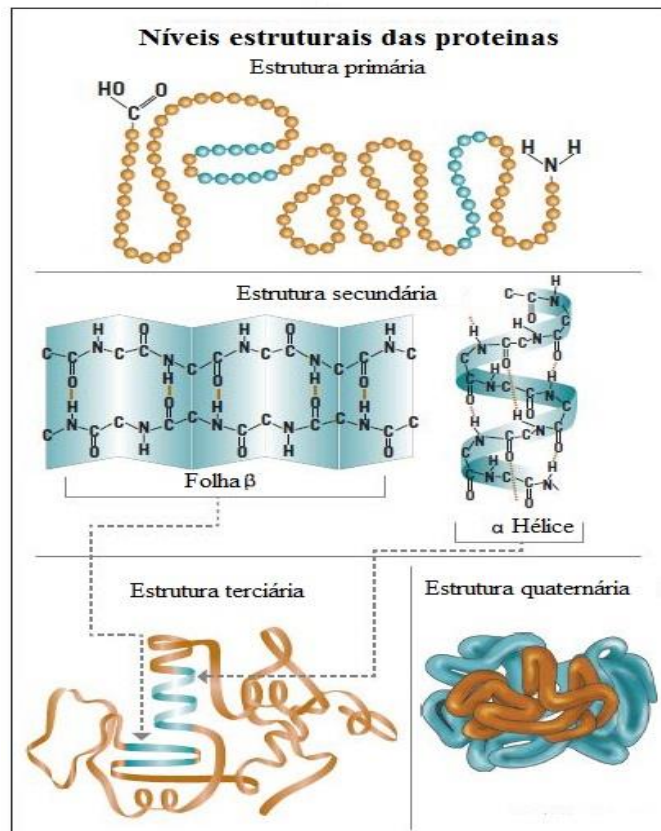


Figura 1: Níveis de organização estrutural das proteínas [Adaptado de Sciences (2009)].

As proteínas podem exercer várias funções na célula. A sua forma tridimensional encontra-se adaptada à função que pode ser de natureza estrutural, de transporte, proteção e defesa, de controlo e regulação, catálise, movimento e armazenamento (Gavin *et al.*, 2002, Koolman e Roehm, 2005, Voet *et al.*, 2000). Dada a diversidade funcional, as proteínas são moléculas fundamentais para o bom funcionamento da célula e, subsequentemente, do organismo.



2. Expressão genética e biossíntese de proteínas

O organismo vivo é composto por diferentes tecidos que, por sua vez, resultam da organização de vários tipos celulares. A unidade celular é composta por vários organelos que desempenham diferentes funções, destacando-se o núcleo por se tratar de um organelo central que reúne a totalidade da informação genética da célula, a qual é essencial para a sua manutenção e divisão celular.

A expressão genética representa o processo que usa a informação presente nos genes, localizados no ADN, para produzir proteínas. Nas células eucarióticas, este processo inicia-se no núcleo com a transcrição de uma das cadeias de ADN numa molécula de ARN, que migra, através do poro nuclear, para o citoplasma onde está localizada a maquinaria de síntese proteica. Nos ribossomas, a informação contida na molécula de ARN é traduzida na cadeia polipeptídica respetiva (Passarge, 2004, Videira, 2001, Voet *et al.*, 2000). Assim, a estrutura e, subsequentemente, a função das proteínas está representada na informação contida nos genes presentes na molécula de ADN (Voet *et al.*, 2000).

De forma resumida, o processo de biossíntese de proteínas ocorre no citoplasma, em polissomas. O ADN do gene é transcrito em ARN pré-mensageiro que é posteriormente processado originando o ARN mensageiro (ARNm). O ARNm desloca-se até ao ribossoma onde um grupo de três nucleótidos (codão) é emparelhado com três nucleótidos complementares (anti-codão) numa pequena molécula de ARN transferência (ARNt). Cada molécula de ARNt está ligada ao aminoácido correspondente. O ribossoma catalisa a união dos aminoácidos, os quais são adicionados à cadeia polipeptídica crescente de acordo com a ordem de ligação das moléculas de ARNt ao ARNm. Como a sequência de nucleótidos no ARNm reflete uma sequência de nucleótidos no gene correspondente, é o ADN do gene que, indiretamente, conduz à síntese de proteínas (Passarge, 2004, Purves *et al.*, 1998, Voet *et al.*, 2000). O processo de biossíntese de proteínas está ilustrada na Figura 2.

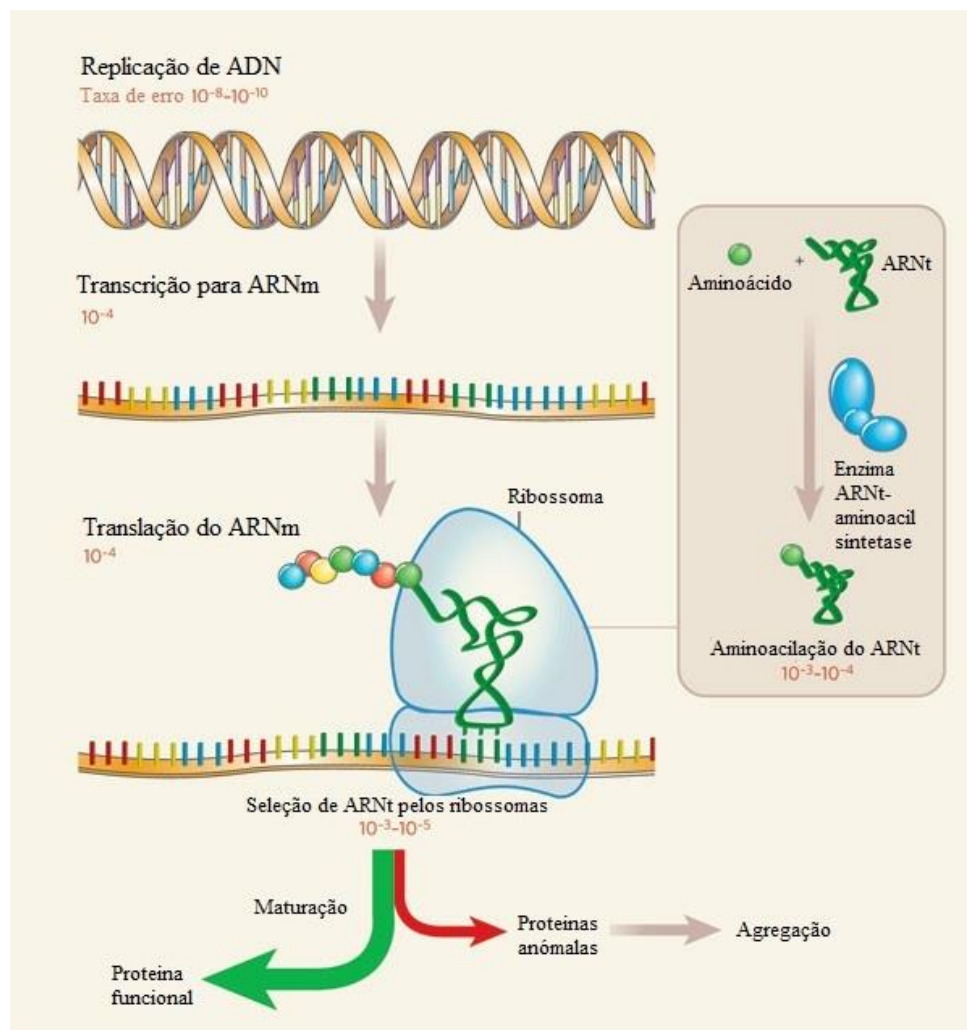


Figura 2: Expressão genética e síntese proteica [Adaptado de Roy e Ibba (2006)].

Tal como evidenciado na Figura 2, a síntese proteica implica que previamente tenham ocorrido a transcrição do gene respetivo para ARNm e posterior translação. A partir deste ponto, a proteína recém-sintetizada é maturada, originando uma proteína funcional ou anómala (devido à taxa de erro inerente a estes processos ou à presença de mutações genéticas). De salientar que a síntese proteica pode completar-se em polissomas ou continuar em ribossomas associados à face externa do retículo endoplasmático (RE), como acontece no caso de proteínas da via secretora (Passarge, 2004). Este último grupo de proteínas será especificamente abordado no presente trabalho.



No caso das proteínas solúveis da via secretora, a sua translocação para o lúmen do retículo endoplasmático rugoso (RER) ocorre de acordo com a hipótese sinal. Esta hipótese baseia-se em péptidos sinal hidrofóbico, localizados no terminal-N da proteína precursora, que sinalizam e regulam a translocação de proteínas através da membrana. O péptido sinal é reconhecido pela partícula de reconhecimento de sinal assim que este emerge do ribossoma. O processo de translação é interrompido durante a ligação da partícula de reconhecimento de sinal com o recetor, no RER, reiniciando-se após o processo de translocação do polipéptido para o lúmen do RER estar concluído (Rapoport, 1985). Esta translocação é, pois, co-traducional e acompanhada de N-glicosilação da cadeia polipeptídica nascente. No processo de N-glicosilação, resíduos específicos de asparagina da cadeia polipeptídica são glicosilados por transferência em bloco de um oligossacarídeo rico em manose, dando início ao processo de enrolamento do polipéptido. De facto, o lúmen do RER possui o ambiente químico necessário para facilitar esse processo de “enrolamento” (Fewell *et al.*, 2001, Sitia e Braakman, 2003).

De salientar que o processo de enrolamento proteico até à configuração final não envolve um conjunto rígido de acontecimentos (Dobson, 2003). De facto, no decurso do enrolamento, as proteínas podem estar sujeitas a alterações conformacionais dinâmicas de forma a atingirem o seu estado mais estável, funcional e ergonómico (Surguchev e Surguchov, 2010). Ao longo deste processo, as alterações que a estrutura tridimensional sofre estão sob controlo cinético (sobretudo a estrutura quaternária) ou termodinâmico (especialmente as estruturas secundária e terciária) (Correia e Correia, 2001).

O RE é o organelo responsável pela biossíntese de lípidos, armazenamento de cálcio e enrolamento de proteínas. Este organelo reúne condições especiais que o distingue de outros compartimentos celulares, *e.g.* núcleo, citosol ou mitocôndria. De facto, o RE é um organelo celular composto por um lúmen equivalente ao espaço extracelular (Ellgaard e Helenius, 2003). Como este organelo possui um ambiente mais rico em iões cálcio que o citosol, o lúmen é cerca de 1000x mais oxidante (Ellgaard e Helenius, 2003, Fewell *et al.*, 2001, Sitia e Braakman, 2003). O ambiente oxidante característico do RE favorece a formação das ligações dissulfureto, que auxiliam o enrolamento e/ou atividade da proteína (Fewell *et al.*, 2001). Para além disso, o RE



possui uma composição em hidratos de carbono e uma maquinaria de glicosilação únicos (Gidalevitz *et al.*, 2013). Estas características são importantes para o enrolamento de proteínas dado que não só permitem a ação de *chaperones* como também aumentam a solubilidade das glicoproteínas, marcam a superfície dos módulos de enrolamento e conferem irreversibilidade ao processo de translocação das proteínas através da membrana do RE (Ellgaard e Helenius, 2003, Fewell *et al.*, 2001, Gidalevitz *et al.*, 2013, Sitia e Braakman, 2003).

O processo de enrolamento das proteínas recém-formadas está sujeito a um controlo de qualidade que visa assegurar que apenas as proteínas com a conformação correta são transportadas para o seu destino final (Ellgaard e Helenius, 2003, Sitia e Braakman, 2003).

Tal como anteriormente mencionado, as proteínas são sintetizadas em ribossomas a partir da informação genética presente no ADN celular. O processo de enrolamento *in vivo* é, em alguns casos, co-translacional, *i.e.*, iniciado antes da síntese proteica estar finalizada, como no caso das proteínas secretoras. No entanto, no caso de outras proteínas, o seu enrolamento ocorre principalmente em ambiente citoplasmático, depois de ocorrer a sua libertação do ribossoma e antes do seu tráfego e translocação membranar para organelos não pertencentes à via secretora, como por exemplo para o interior da mitocôndria. Assim, muitos detalhes do processo de enrolamento dependem do ambiente particular no qual o enrolamento ocorre (Dobson, 2003).

No caso das proteínas da via secretora, o enrolamento ocorre em três fases. Na primeira fase, o enrolamento é cotranslacional (*i.e.*, inicia-se antes da conclusão da síntese proteica, enquanto a cadeia em crescimento ainda está ligada ao ribossoma) e ocorre no complexo translocão que é um canal proteico através do qual as cadeias polipeptídicas entram no lúmen ou na membrana do RER. Na segunda fase, o enrolamento é pós-traducional e ocorre após a completa libertação da cadeia polipeptídica do ribossoma e do complexo translocão; a cadeia proteica assume uma configuração 3D que é estabilizada por ligações de hidrogénio, interações eletrostáticas e interações hidrofóbicas. Por último, na terceira fase, ocorre a montagem oligomérica, o que acontece quando a configuração das subunidades atingem uma conformação



próxima do estado nativo. As três fases são acompanhadas por *chaperones* e enzimas residentes no lúmen do RER. Assim, o processo de enrolamento é co-translacional e progressivo até que seja atingida a conformação nativa e, concluído o processo de tradução, a aquisição da estrutura tridimensional da proteína é assegurada por ligações de hidrogénio, assim como por interações eletrostáticas e hidrofóbicas (Esser *et al.*, 2004, Sitia e Braakman, 2003, Surguchev e Surguchov, 2010).

Resultados de ensaios *in vitro* sugerem que a estrutura secundária é formada em apenas milissegundos no lúmen do RER. Na maioria dos casos, o enrolamento começa com a formação das α -hélices, e a partir deste momento é necessário o envolvimento de aminoácidos adjacentes. A formação das folhas β requer o estabelecimento de pontes de hidrogénio entre aminoácidos que se encontram distantes na sequência primária, levando a um acentuado decréscimo da entropia. No final deste primeiro passo, os segmentos hidrofóbicos são segregados pelo ambiente aquoso, formando um centro hidrofóbico conhecido por glóbulo fundido (Csermely *et al.*, 2003). O estado parcialmente enrolado dos glóbulos fundidos ocorre durante o desenvolvimento da estrutura secundária, a qual é desorganizada na sua maioria, dispondo de quase nenhuma estrutura terciária. Estas estruturas ainda possuem superfícies hidrofóbicas expostas, submetendo-se a extensos fenómenos de agregação. Os últimos passos do enrolamento proteico são lentos e limitantes. O interior do núcleo proteico hidrofóbico é reorganizado e, em simultâneo, são formadas ligações que requerem energia (*e.g.* pontes dissulfito, emparelhamento iónico e isomeração de ligações *cis/trans* de prolina). A energia livre adquirida nestes processos viabiliza a formação de proteínas locais termodinamicamente instáveis de elevada energia que são estabilizadas pela conformação termodinamicamente favorável do resto da proteína. Estes segmentos proteicos de elevada energia conseguem estabilizar-se pela formação de complexos com outras moléculas, apesar de servirem muitas vezes como centros ativos de enzimas ou como superfícies de contacto entre várias proteínas (*e.g.* em processos de transdução de sinal) (Csermely *et al.*, 2003).

Durante a sua síntese, as proteínas devem adquirir a sua estrutura tridimensional característica isto é, a estrutura que possui as propriedades químicas necessárias para o



desempenho adequado da sua função celular específica e que, geralmente, corresponde ao estado termodinamicamente mais estável (Dobson, 2003, Hartl *et al.*, 2011). O enrolamento de proteínas não é um processo linear mas é tão preciso que, na maior parte das vezes, apenas a alteração de um aminoácido é suficiente para originar perda de função da respetiva proteína. No entanto, geralmente as proteínas de conformação nativa coexistem com outras, *e.g.* glóbulos fundidos ou proteínas desenroladas (Csermely *et al.*, 2003).

Após translocação e processamento no RER, as proteínas são dirigidas, em vesículas, para o complexo de Golgi (CG). Ultra-estruturalmente, o CG é constituído por várias cisternas, compreendendo 3 compartimentos principais, *i.e.*, *cis*, medial e *trans*, que se distinguem pela composição enzimática. Globalmente, as enzimas do CG estão envolvidas na síntese de glicanos e no processamento das proteínas produzidas pelo RER catalisando, designadamente, a adição ou remoção de açúcares de proteínas (processamento glicosídico), a adição de grupos sulfato (sulfatação) ou a adição de grupos fosfato (fosforilação). As proteínas entram no CG pelo lado adjacente ao RE (face *cis*), e saem pelo lado oposto das cisternas que está orientado para a membrana plasmática (face *trans*). As proteínas são transferidas entre as cisternas através de vesículas, sendo empacotadas na face *trans* do CG. Por fim, as proteínas processadas são expelidas do CG através de vesículas, que migram para a membrana celular, onde se fundem com a membrana e eventualmente libertam as proteínas para o meio extracelular. O processo de tráfego intracelular de proteínas da via secretora está esquematizado na Figura 3. De salientar que algumas das modificações mediadas pelo CG atuam como sinais para direcionar as proteínas para o seu destino celular, *i.e.* compartimento celular onde irão exercer a sua função (Ellgaard e Helenius, 2003, Malhotra e Mayor, 2006, Xu e Esko, 2009).

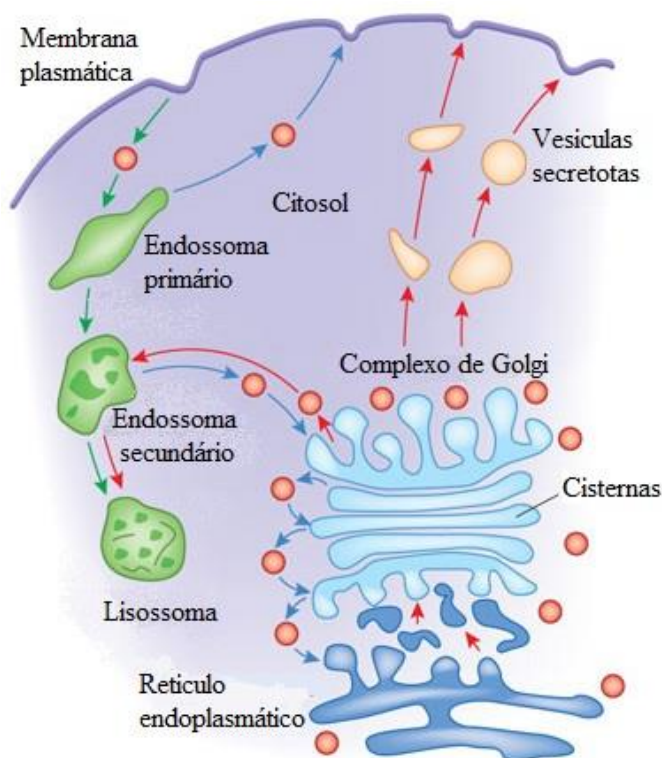


Figura 3: Biogênese e maturação das proteínas [Adaptado de Xu e Esko (2009)].

De acordo com a representação esquemática da Figura 3, as proteínas produzidas no RER podem dirigir-se para o CG e, após modificações específicas (glicosilação, sulfatação e/ou fosforilação), ser transportadas para os lisossomas ou a superfície celular.

Em conclusão, a vida depende do funcionamento apropriado das proteínas no ambiente celular. A sua função resulta da sua configuração tridimensional. Toda a informação necessária para o enrolamento das proteínas encontra-se disponível na sua sequência polipeptídica, linear, a qual é obtida pelo processo de tradução que ocorre em ribossomas (Stolz e Wolf, 2010). Porém, o enrolamento intracelular de proteínas não é um processo espontâneo uma vez que necessita da assistência de uma maquinaria complexa de *chaperones* moleculares e de energia metabólica, ambos necessários para que a proteína adote, de forma eficiente, o seu estado nativo funcional (Anfinsen, 1973, Dobson e Karplus, 1999). As células dos mamíferos expressam tipicamente cerca de 10



mil espécies proteicas diferentes. De uma forma geral, e tal como anteriormente descrito, estas cadeias enrolam-se de forma adequada produzindo a estrutura nativa. No entanto, o ambiente celular pode favorecer a agregação de cadeias polipeptídicas anómalas, recém-sintetizadas, dando origem a espécies potencialmente tóxicas (Hartl *et al.*, 2011). Estas proteínas podem ter origem em processos de mutação, desequilíbrio no processo de síntese, condições inadequadas (oxidação celular), ou como produto secundário da biossíntese normal das proteínas. As proteínas deformadas são degradadas em fragmentos (péptidos), os quais são dispostos na superfície celular. (Bagola *et al.*, 2011, Sitia e Braakman, 2003). As proteínas deformadas podem ser endereçadas para sistemas de degradação específicos ou, em alternativa, ocorrer a sua acumulação no ambiente celular até atingirem níveis tóxicos (Carrell e Gooptu, 1998). Como tal, o equilíbrio entre os processos de biossíntese, maturação e degradação proteica é fundamental para a função celular (Sitia e Braakman, 2003). Estes aspetos são explorados ao longo das próximas secções desta tese.



3. Fenómenos de *misfolding* e agregação de proteínas

O acontecimento de *misfolding*, ou seja, o enrolamento incorreto de proteínas, corresponde ao processo de aquisição de uma estrutura distinta daquela que é representada pela configuração nativa (Chiti e Dobson, 2006). O estudo de proteínas com estruturas desconfiguradas tem atraído muito a atenção de vários investigadores pelo facto deste fenómeno estar associado a diversas situações patológicas (Chiti e Dobson, 2006, Surguchev e Surguchov, 2010).

Para adquirir a conformação nativa e que corresponde à estrutura que, em condições fisiológicas, apresenta uma energia livre mínima, uma proteína deve submeter-se ao processo de enrolamento (Broadley e Hartl, 2009, Ferreira e De Felice, 2001). Pelo elevado número de configurações que as cadeias proteicas conseguem assumir, as reações de enrolamento são muito complexas e heterogéneas, dependendo da cooperação de várias interações fracas e não covalentes (Hartl *et al.*, 2011). Apesar de toda a informação necessária para a ocorrência deste fenómeno estar codificada na sequência primária, o meio em que este processo ocorre representa um desafio para o enrolamento proteico, o qual é, geralmente, colmatado com mecanismos de controlo de qualidade. No entanto, em situações de *stress* celular (tais como o envelhecimento, temperatura elevada ou mutações genéticas), as proteínas adquirem formas anómalas de enrolamento ou simplesmente se desenrolam (Broadley e Hartl, 2009, Stolz e Wolf, 2010). Proteínas em estados parcialmente desenrolados são problemáticas pois tendem a agregar em virtude da exposição de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e regiões desestruturadas do esqueleto polipeptídico que geralmente estão posicionadas no interior da estrutura nativa (Hartl *et al.*, 2011). Uma vez que proteínas com conformação nativa coexistem com proteínas desenroladas, o fenómeno de agregação representa um potencial problema no processo de *fold*ing proteico. No momento em que uma nova cadeia polipeptídica é libertada do ribossoma, os resíduos hidrofóbicos, que normalmente se encontram protegidos no interior da proteína, tendem a ficar expostos em vez de se enrolarem de forma apropriada, podendo associar-se a outras cadeias proteicas que se encontrem na mesma situação. A tendência de agregação de cadeias



proteicas não nativas aumenta com a elevada quantidade de proteínas e outras macromoléculas no ambiente celular, conhecido por aglomeramento macromolecular. Assim, o fenómeno de agregação é conduzido pelas forças hidrofóbicas que levam à aquisição de estruturas amorfas. Em alternativa, os agregados fibrilares podem dar origem a estruturas denominadas agregados amiloides definidas pela apresentação de filamentos β perpendiculares ao eixo axial (estruturas cruzadas β). A formação destas estruturas é, no entanto, restringida na presença de *chaperones* (Hartl e Hayer-Hartl, 2002).

Normalmente, a associação de quantidades elevadas de proteínas deformadas leva à formação de agregados. Estes agregados apenas são solúveis em pequenas quantidades pois a partir de um certo nível eles têm tendência a precipitar sob condições fisiológicas. Do ponto de vista morfológico, é possível diferenciar dois tipos de agregados: amorfos e fibrilas amiloides. Os agregados amorfos resultam de cadeias polipeptídicas desordenadas, enquanto as fibrilas amiloides apresentam uma estrutura altamente ordenada onde todos os polipéptidos adotam uma conformação comum (Dobson, 2003, Invernizzi *et al.*, 2012, Surguchev e Surguchov, 2010). Enquanto as fibrilas amiloides e os agregados nem sempre apresentam toxicidade, as formas oligoméricas desenroladas, oligómeros solúveis, protofibrilas e algumas espécies monoméricas são classificadas como espécies tóxicas (Gidalevitz *et al.*, 2010).

Uma das características das proteínas naturalmente desenroladas é a existência de um número reduzido de ligações hidrofóbicas entre aminoácidos e uma elevada abundância de resíduos promotores de desordem, o que assegura uma reduzida hidrofobicidade e uma carga elétrica elevada e, subsequentemente, um grau adequado de solubilidade. No entanto, estas estruturas proteicas poderão agregar e formar fibrilas amiloides, mesmo na ausência de mutações. Na presença de mutações, este fenómeno de agregação é potenciado. Essa tendência de agregação aumenta com a sua concentração intracelular e envelhecimento celular e/ou cronológico devido a modificações covalentes nas proteínas (promovidos por processos de oxidação, de fosforilação e de clivagem proteolítica) e/ou redução da capacidade de eliminação de proteínas desenroladas (Ross e Poirier, 2004, Surguchev e Surguchov, 2010).



Na literatura, diversas proteínas (rodopsina, α -sinucleína, péptido β -amilóide e proteínas priónicas) têm sido associadas ao aparecimento e desenvolvimento de doenças conformacionais. Estas proteínas estão associadas à formação de 3 tipos de estruturas patogénicas, *i.e.* agregados amorfos, fibrilas amiloides ou oligómeros. A sua formação depende da sequência em aminoácidos, e pode ser potenciada pela presença de mutações e modificações pós-translacionais específicas, e/ou ambiente celular (Surguchev e Surguchov, 2010).



4. Defesa celular – Controlo de qualidade

O organismo humano está dotado de numerosos mecanismos de controlo de qualidade que visam a sua proteção contra atividades celulares aberrantes. No caso das proteínas, estes sistemas asseguram que apenas as proteínas enroladas de forma correta e completa consigam atingir o seu local de ação celular (Bernier *et al.*, 2004). De fato, a degradação proteica é um processo celular conservativo que permite a reciclagem dos aminoácidos e que atua após o acionamento do mecanismo de controlo de qualidade proteico (Kon e Cuervo, 2010). O controlo de qualidade visa, assim, manter o equilíbrio entre a retenção e degradação de produtos nocivos e a libertação de proteínas biologicamente ativas (Sitia e Braakman, 2003), assegurando o correto funcionamento do proteoma celular. Deste modo, a remoção e renovação das proteínas desenroladas e danificadas de forma atempada e eficiente são fundamentais para a manutenção da função celular.

Tal como referido anteriormente, o RE proporciona um ambiente otimizado para o enrolamento e maturação de proteínas (Ellgaard e Helenius, 2003). No entanto, a produção de proteínas anómalas é bastante comum, representando cerca de 80 % das proteínas produzidas em condições fisiológicas. Em resposta a um fluxo de proteínas desenroladas, as células dos mamíferos possuem mecanismos de proteção contra a invasão celular destas proteínas, *i.e.* um sofisticado controlo de qualidade de proteínas que reconhece as estruturas desconfiguradas e potencialmente tóxicas enquanto ainda está a decorrer a sua biossíntese. Estes mecanismos são capazes de reparar a estrutura de algumas proteínas, colocando-as na sua configuração ativa, ou assinalando-as de forma a serem encaminhadas para o complexo de proteólise celular (proteassoma) e, subsequentemente, degradadas. Enquanto que a remoção das proteínas danificadas é realizada por sistemas proteolíticos, a reparação de proteínas desenroladas é mediada por *chaperones* (Ellgaard e Helenius, 2003, Surguchev e Surguchov, 2010). Os *chaperones* ligam-se às regiões da proteína propensa à agregação, *e.g.* extensões hidrofóbicas ou resíduos de cisteína, provocando alterações na sequência anómala de forma a induzir o enrolamento correto de proteínas. No caso de proteínas com



conformação não nativa, os *chaperones* também interagem por ligações não covalentes com as superfícies hidrofóbicas das proteínas anómalas, estabilizando-as e favorecendo a reversibilidade do processo de agregação, bem como facilitando a translocação da proteína para a sua localização intracelular correta. Se as múltiplas tentativas de correção de enrolamento falharem, os próximos passos de defesa são ativados para proteger as células contra os efeitos da acumulação de proteínas desenroladas. Estas proteínas anormais são conjugadas com a ubiquitina e direcionadas para os proteassomas onde se dá a proteólise. No caso das doenças conformacionais, este processo está total ou parcialmente bloqueado, o que leva à acumulação de proteínas anómalas dentro e fora da célula e, subsequentemente, à formação de agregados, fibras, placas ou “corpos” que podem tornar-se tóxicos para a célula (Reiss *et al.*, 2002). Assim, o sistema ubiquitina-proteassoma representa um importante mecanismo de controlo de qualidade que reconhece e degrada proteínas com estruturas anómalas (Esser *et al.*, 2004, Surguchev e Surguchov, 2010).

Com o envelhecimento (celular e cronológico), a possibilidade de acumulação de agregados de proteínas desenroladas aumenta devido à acumulação de mutações, agentes tóxicos (um exemplo é a α -sinucleína que com o envelhecimento celular sofre fosforilação levando aos fenómenos de *misfolding* e agregação, o que pode induzir o surgimento de Parkinson) e/ou à inoperância progressiva dos sistemas de controlo de qualidade (Sitia e Braakman, 2003, Söti e Csermely, 2007, Surguchev e Surguchov, 2010).

Os sistemas de controlo intracelular do enrolamento proteico e os mecanismos de controlo de qualidade são parte de uma rede celular complexa conhecida por proteostase *i.e.*, homeostase proteica celular (estado dinâmico de equilíbrio no qual a síntese proteica e o enrolamento são equilibrados com a degradação). Esta rede compreende mais de uma dúzia de vias biológicas que mantêm o delicado balanço entre a síntese proteica, agregação, troca e degradação de proteínas, o qual é essencial ao correto funcionamento da célula (Gidalevitz *et al.*, 2010, Surguchev e Surguchov, 2010).

4.1. Chaperones

Hartl *et al.* (2011) define *chaperone* molecular como qualquer proteína que interage, estabiliza ou auxilia outra proteína a adquirir a sua conformação funcionalmente ativa, sem estar presente na sua estrutura final. Estas moléculas, em geral de baixo peso molecular, fazem parte de uma classe proteica que inclui uma grande variedade de proteínas que se distinguem pelo seu mecanismo de ação, comportamento e necessidade de energia para o exercício das suas funções (Slavotinek e Biesecker, 2001, Stolz e Wolf, 2010). O mecanismo molecular de ação dos *chaperones* está esquematizado na Figura 4.

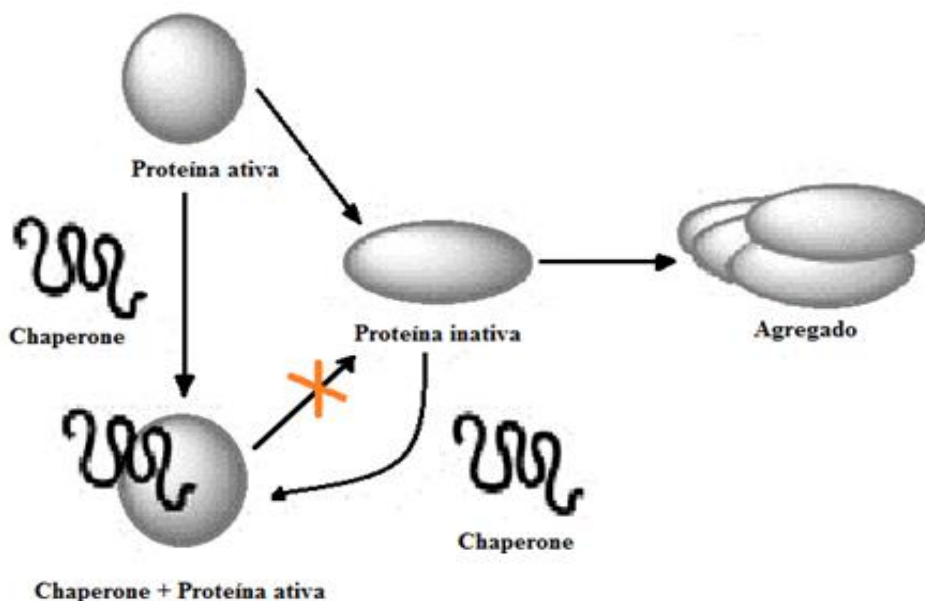


Figura 4: Mecanismo molecular de ação dos *Chaperones* [Adaptado de Kovacs *et al.* (2009)].



Como se pode verificar na Figura 4, a presença de *chaperones* impede, por um lado, a formação de proteínas inativas e consequente a agregação, e por outro lado possibilita a reativação de proteínas inativas (Kovacs *et al.*, 2009). Estas moléculas são capazes de reconhecer as superfícies hidrofóbicas dos polipéptidos para evitar a sua agregação, e de se ligarem a proteínas desconfiguradas com recurso a ATP para removê-las do ambiente celular (Csermely *et al.*, 2003, Slavotinek e Biesecker, 2001). Um dos problemas que assiste ao processo de enrolamento de proteínas é o vasto leque de possibilidades conformacionais que podem ser produzidas. Uma das funções dos *chaperones* é a de interagir seletivamente com algumas sequências e elementos estruturais proteicos, limitando as possibilidades conformacionais e favorecendo algumas conformações particulares (Gidalevitz *et al.*, 2013). De fato, a interação com *chaperones* permite à proteína escapar de estados intermediários não produtivos estabilizados por interações não nativas (*e.g.* ligações de *chaperones* em ciclos mediados por ATP, proteínas dissulfídicas isomerases com ações semelhantes a enzimas e proteínas propil isomerases) (Gidalevitz *et al.*, 2013).

Os *chaperones* estão presentes no RER em elevadas quantidades para supervisionar o processo de enrolamento de proteínas recentemente sintetizadas ou danificadas, sequestrando as proteínas danificadas para serem enroladas novamente ou destruídas (Ellgaard e Helenius, 2003). No caso de este processo falhar, as proteínas cujo enrolamento é reconhecido como impróprio ou incompleto são, normalmente, marcadas para serem degradadas através da via ubiquitina-proteassoma (Bernier *et al.*, 2004). Os *chaperones* moleculares que estão ligados aos ribossomas a aguardar pela nova cadeia polipeptídica bloqueiam o enrolamento prematuro do segmento emergente do ribossoma até que o resto da cadeia seja sintetizada. Os *chaperones* também assistem proteínas intracelulares noutras situações. Os poros da mitocôndria são demasiado pequenos para acomodar proteínas globulares completamente enroladas. Por isso, as proteínas têm de se desenrolar para passar e voltar a enrolar-se no lúmen do organelo sob a assistência de *chaperones* (Csermely *et al.*, 2003). As moléculas *chaperones* também podem induzir a destruição proteica. Em casos de danos proteicos massivos, em que o nível de proteínas a degradar excede a capacidade dos sistemas proteolíticos intracelulares, os *chaperones* ajudam a promover a formação de corpos de inclusão, os quais visam a segregação de



proteínas danificadas para posterior degradação pelas proteases do sistema lisossomal ou do proteossoma extralisossomal (Csermely *et al.*, 2003, Slavotinek e Biesecker, 2001). Por norma, a degradação lisossomal ocorre pela via autofágica (Cuervo, 2010).

Existem várias classes diferentes de *chaperones* definidos pelo tamanho molecular, compartimento celular e função. Os *chaperones* são classificados normalmente de acordo com o seu peso molecular (HSP40, HSP60, HSP70, HSP90, HSP100 e pequenas HSPs). Estes *chaperones* cooperam no processo de enrolamento de proteínas, estando envolvidos em várias funções de manutenção do proteoma, incluindo o enrolamento de proteínas recém-sintetizadas ou pós-traducionalmente, o reenrolamento das proteínas desnaturadas pelo *stress*, organização oligomérica e a assistência na degradação proteolítica (Slavotinek e Biesecker, 2001). Os *chaperones* que assistem ao processo de enrolamento e reenrolamento proteico (HSP70s, HSP90s e HSP60s) reconhecem as cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicos expostas por proteínas não nativas e cooperam funcionalmente com *chaperones* ATP independentes de forma a impedir o fenómeno de agregação por tamponamento (em ambientes compostos por soluções tampão diluídas, as proteínas de maiores proporções demoram minutos a horas para se enrolar, o que leva a que muitas vezes falhem a sua conformação nativa) (Hartl *et al.*, 2011). A Tabela 1 resume a função associada a diferentes tipos de *chaperones*.

Tabela 1: Análise funcional de alguns *chaperones* [Adaptado de Almeida *et al.* (2011) e Horvath *et al.* (2008)].

<i>Chaperone</i>	Função
HSPA	Enrolamento e desenrolamento de proteínas, providencia termotolerância celular, previne agregação de péptidos desenrolados
HSPB	Bloqueia a agregação proteica
HSP40	Suprime a agregação dos polipeptídeos, promove o enrolamento proteico, facilita a translocação das proteínas através de compartimentos intracelulares e auxilia a secreção proteica
HSP60	Liga polipéptidos parcialmente enrolados e assiste ao correto enrolamento de proteínas
HSP70	Assiste à produção de proteínas, detenção de proteínas anómalas ou <i>misfolded</i>
HSP90	Previne a agregação de péptidos re-enrolados, auxilia a correta construção e enrolamento de proteínas recém-sintetizadas e realiza a detenção de proteínas anómalas
HSP100	Promove a solubilização de agregados proteicos
HSP104, HSP110	Providencia tolerância a temperaturas extremas

Os *chaperones* são ativados pela via citosólica de *stress* ao choque térmico. Esta via é mediada por fatores de transcrição específicos, nomeadamente HSF-1 (*heat shock factor*) que induz, quase instantaneamente a transcrição de genes que codificam *chaperones* (também conhecidos por proteínas *heat shock*) {Broadley e Hartl, 2009}. Todas as células possuem uma extensa rede de *chaperones* que em conjunto promovem a manutenção da proteostase (sistema que assiste o enrolamento de proteínas e a remoção de proteínas não nativas), minimizando a produção de espécies proteicas com enrolamento aberrante pois promovem o seu correto enrolamento ou, em alternativa, a



sua degradação prematura (Broadley e Hartl, 2009). As células requerem da ação dos *chaperones* moleculares não apenas a prevenção da agregação das proteínas de conformação não nativa durante o processo de síntese, como também para o impedimento e/ou reversão de interações incorretas que ocorrem, sobretudo, quando o ambiente celular está sob *stress*. Essas interações podem originar a exposição das superfícies hidrofóbicas que, normalmente, se encontram protegidas no interior e, assim, provocar o desenrolamento de proteínas. A ligação da proteína a um *chaperone* impede a agregação direta entre as moléculas através da proteção das superfícies interativas nos polipéptidos não nativos, incluindo as de subunidades não montadas, como também evita ou reverte o enrolamento inapropriado no ambiente celular. Outra função conhecida destas estruturas é a de catalisar o processo de enrolamento proteico. Assim, alguns *chaperones* envolvem total ou parcialmente a cadeia de polipéptidos para as isolar do meio exterior e criar o ambiente ideal para que se atinja a sua conformação nativa de forma rápida e sem interferências (Dobson e Karplus, 1999).

Os *chaperones* HSPs exercem o seu efeito fisiológico a 2 níveis: (i) assistem à formação de novas proteínas; e (ii) promovem a preservação de estruturas já existentes. No entanto, as suas funções principais são evidenciadas em condições patológicas: (i) promovem a retificação de estruturas de proteínas desnaturadas; e (ii) solubilizam os agregados proteicos (Almeida *et al.*, 2011, Powers *et al.*, 2010). Os HSPs conseguem formar complexos com *co-chaperones* que são proteínas de pequenas dimensões que detetam as proteínas-alvo e assumem o controlo dos ciclos de associação e dissociação de HSPs (Almeida *et al.*, 2011).

As classes de *chaperones* que têm sido destacadas na literatura são HSP60 (ou *chaperoninas*), HSP70 e HSP90, pela importância das funções que exercem e pela sua prevalência no organismo (Almeida *et al.*, 2011, Hartl *et al.*, 2011). HSP60 são responsáveis pelo enrolamento de proteínas com dimensões até ~60 kDa. O processo de enrolamento ocorre, normalmente, dentro do conglomerado da *chaperonina* conhecido como câmara de enrolamento (Almeida *et al.*, 2011, Hartl *et al.*, 2011). *Chaperones* pertencentes à família HSP70 são peças centrais no controlo de formação e enrolamento de proteínas (Broadley e Hartl, 2009, Hartl *et al.*, 2011). Mais concretamente, as



HSP70s participam no enrolamento e construção de proteínas recém-sintetizadas, na prevenção de agregação, na dissolução e re-enrolamento de proteínas agregadas assim como na degradação proteica (Broadley e Hartl, 2009). Estudos experimentais demonstram que, em modelos animais de doenças conformacionais, níveis mais elevados de HSP70 são eficazes na prevenção da agregação tóxica de proteínas (Auluck *et al.*, 2002, Hartl *et al.*, 2011). Por sua vez, HSP90 formam uma secção que controla numerosas vias de sinalização em células eucariotas incluindo a progressão do ciclo celular, a manutenção dos telómeros, a apoptose, a transdução do sinal mitótico, o transporte mediado por vesículas, a imunidade inata e a degradação de proteínas marcadas com ubiquitina (Hartl *et al.*, 2011, Rutherford e Lindquist, 1998).



Como se pode verificar na Figura 5, a degradação da proteína é iniciada com a sua conjugação com a ubiquitina. Este processo é dependente de energia (ATP) e envolve 3 enzimas: ativação dependente de ATP dos monómeros de ubiquitina mediada pela enzima ativadora ubiquitina (E1), transporte da ubiquitina ativada com a enzima conjugada (E2), e transferência da ubiquitina ativada para o substrato proteico e ligação pela ubiquitina ligase (E3). As proteínas anormais ubiquitinadas, *i.e.*, cinco moléculas de ubiquitina ligadas à proteína anómala, são reconhecidas pelo proteassoma, o qual remove a ubiquitina e digere a proteína em péptidos. Os péptidos são degradados em aminoácidos pelas peptidases, no citoplasma, ou usados como antigénios de membrana indicadores de disfunção celular (Ande *et al.*, 2009, del Pozo e Estelle, 1999, Lindsten e Dantuma, 2003, Niu *et al.*, 2011). No entanto, as proteínas de conformação anormal encontradas nas doenças conformacionais são resistentes ao processo de proteólise, mesmo quando são ubiquitinadas, acumulando-se dentro e fora das células sob a forma de agregados, fibras, placas e “corpos”, os quais são tóxicos para o ambiente celular e/ou desprovidos de qualquer função biológica (Reiss *et al.*, 2002).



5. Patologias conformacionais

Nos últimos anos tem-se observado um crescente interesse sobre as consequências celulares do fenómeno de agregação de proteínas aberrantes em virtude da sua associação a doenças específicas (Carrell, 2005). De facto, estudos desenvolvidos ao longo da década de 90 nas áreas da biologia estrutural e medicina convergiram para um conjunto de patologias conhecidas por doenças conformacionais (Carrell e Gooptu, 1998).

O interesse estrutural deste grupo de doenças deve-se ao fato destas surgirem a partir de uma proteína de conformação aberrante que se acumula, de forma tóxica, em células ou tecidos (Bernier *et al.*, 2004, Carrell e Gooptu, 1998, Reiss *et al.*, 2000). A apresentação clínica destas doenças conformacionais reflete o seu mecanismo molecular, que se inicia de forma particularmente lenta e insidiosa, acompanhando o processo de transição da proteína normal (Carrell e Gooptu, 1998). A ocorrência e a persistência destas anomalias na formação de proteínas tendem a ser minimizadas por meio de diferentes estratégias inerentes ao funcionamento normal das células. No entanto, estes acontecimentos não são totalmente evitados. Os erros de enrolamento que ocorrem durante a formação de proteínas estão, normalmente, ligados a eventos que expõem regiões previamente escondidas dotadas de capacidade de estabelecer ligações indesejadas, resultando na formação de estruturas proteicas insolúveis anómalas. O efeito citotóxico é exercido por estes agregados que se acumulam progressivamente no ambiente celular.

As doenças conformacionais são, assim, caracterizadas pela redução do nível de proteína nativa e pelo aumento do nível de proteína alterada conformacionalmente, originando a sua aglomeração e deposição em tecidos (Carrell e Gooptu, 1998, Sandefur e Schnell, 2011). Está descrito na literatura que proteínas anómalas possuem a capacidade de interagir com isómeros espectadores. As proteínas espectadoras são aquelas que, na ausência de proteínas anómalas, são encaminhadas para as suas vias fisiológicas normais, suscitando a formação de fenótipos com anomalias de enrolamento. O grupo de proteínas espectadoras é composto por isómeros desenrolados



e por proteínas nativas (enroladas) que, na presença de proteínas *misfolded* sofrem um enrolamento anómalo, o que não só reduz os níveis de proteínas nativas, como também aumenta o fenómeno de agregação de proteínas sempre que existe o contacto destas com proteínas anómalas (Gidalevitz *et al.*, 2006, Sandefur e Schnell, 2011).

Os erros de enrolamento podem ser causados pelo *stress* celular, assim como por mutações hereditárias ou esporádicas que originam alterações no tráfego intracelular de proteínas e que, por isso, afetam de uma forma indireta a função dessas proteínas (Bernier *et al.*, 2004). Assim, as doenças conformacionais são classificadas em esporádicas (85%), hereditárias (10%) ou encefalopatias espongiformes transmissíveis (5%) (Chiti e Dobson, 2006, Dobson, 2003). Nos tecidos afetados encontram-se fibrilas semelhantes a cordas, em alguns casos agrupadas em placas, com um componente proteico predominante característico de cada doença (Dobson, 2003, Gidalevitz *et al.*, 2010). Em muitos casos, estes agregados estão associados ao desenvolvimento de patologias degenerativas com grande impacto em faixas etárias mais avançadas (Invernizzi *et al.*, 2012). Neste grupo encontram-se as doenças associadas à formação de fibrilas amiloides ou inclusões extracelulares com características amiloides, onde se enquadram doenças como Alzheimer, Parkinson, Huntington, ou proteínas priónicas no caso da encefalopatia espongiforme transmissível de Creutzfeldt-Jakob, nas quais se observa a acumulação de proteínas específicas (Bernier *et al.*, 2004, Chiti e Dobson, 2006, Esser *et al.*, 2004, Guidolin *et al.*, 2012, Reiss *et al.*, 2000, Surguchev e Surguchov, 2010). Os depósitos proteicos podem ocorrer de forma intracelular e extracelular. Os depósitos extracelulares normalmente consistem em fibrilas amiloides e estão presentes em doenças como diabetes tipo II ou doença de Alzheimer. Por sua vez os depósitos proteicos intracelulares (corpos inclusos ou agregados) podem ser ordenados em estruturas amiloides, fibrilas não amiloides, ou agregados amorfos ou desordenados (Gidalevitz *et al.*, 2010). Baseado no tipo de tecido em que se observa a acumulação em proteínas, as patologias são categorizadas em neurodegenerativas se a agregação ocorre no cérebro, amiloidoses não neuropáticas localizadas se a agregação ocorre num único tipo de tecido que não o cérebro, e amiloidoses não neuropáticas sistémicas em que a agregação ocorre em múltiplos tecidos.



A doença de Alzheimer é um tipo de demência característica de uma faixa etária mais elevada e que é acompanhada de perda de memória progressiva, a qual tem impacto na realização de tarefas e na capacidade de comunicação e reconhecimento de pessoas e objetos. Nesta doença é observada degeneração dos neurónios, assim como alteração das sinapses e das ligações neuronais. Esta doença envolve dois tipos de agregação protéica importante, *i.e.*, (i) agregados extracelulares conhecidos como placas neuríticas cujo principal componente é o péptido β -amilóide, derivado de processos proteolíticos dos precursores das proteínas amiloides ou (ii) agregados intracelulares de proteína Tau associados aos microtúbulos, conhecidos por emaranhados neurofibrilares (Ross e Poirier, 2004). Nesta doença encontram-se filamentos helicoidais emparelhados que são uma forma anómala da proteína Tau (Weaver *et al.*, 2000). Esta proteína é codificada pelo gene humano *MAPT* (*microtubule-associated protein tau*) através de *splicing* alternativo. Mutações neste gene estão associadas a demência frontotemporal com parkinsonismo presumivelmente por afetarem o a ligação da proteína à tubulina (Hyman *et al.*, 2005). Nesta doença, a alteração fisiopatológica principal consiste na segmentação de péptidos β -amiloides de 42 aminoácidos de uma proteína precursora de membrana. Os péptidos β -amiloides formam fibrilas, e apesar destas eventualmente se agregarem como placas amiloides no cérebro, são as próprias fibrilas que serão neurotóxicas (Carrell e Lomas, 1997).

A doença de Parkinson é caracterizada clinicamente por tremor constante, rigidez e lentidão de movimentos. Esta é causada pela degeneração dos neurónios dopaminérgicos na substância *nigra* no cérebro central e outros neurónios monoaminérgicos do tronco cerebral (Ross e Poirier, 2004). Esta degeneração pode ser resultado de disfunção mitocondrial, *stress* oxidativo, inflamação ou acumulação de proteínas alteradas (Dexter e Jenner, 2013). Uma das características é a deposição da α -sinucleína, uma proteína pré sináptica de 140 aminoácidos encontrada nas inclusões de várias doenças neurológicas (Invernizzi *et al.*, 2012, Ross e Poirier, 2004).

A doença de Huntington é uma desordem neurodegenerativa progressiva causada pela expansão de sequências repetidas GAG que codificam para a glutamina, criando uma extensão de poliglutaminas no terminal-N da proteína *huntingtin*. Os agregados de



huntingtin são marcados com ubiquitina para degradação pelo proteassoma. Com o aumento de proteína anômala, o proteassoma tem dificuldade em digerir este tipo de proteínas, o que leva à sua acumulação (Ross e Poirier, 2004).

As doenças priônicas são consideradas um paradigma das doenças conformacionais em virtude do seu mecanismo molecular (Carrell e Lomas, 1997). Doenças priônicas são doenças neurodegenerativas causadas por priões (proteínas modificadas causadoras de doenças neurodegenerativas e que apresentam resistência à ação das proteases). Estas doenças são, geralmente, adquiridas tanto por transmissão ambiental como por mutações genéticas. A via ambiental inclui a ingestão de partículas priônicas derivadas de cérebros infetados ou implantes cirúrgicos de instrumentos contaminados. A doença priônica pode também ser causada por mutações no gene priônico, levando a alterações na proteína priônica. A patologia pode incluir placas amiloides, semelhantes com as observadas na doença de Alzheimer, que podem ser identificadas através da sua marcação com anticorpos priônicos. Assim, esta doença é resultado do enrolamento anormal de proteínas priônicas cuja agregação pode ocorrer tanto ao nível intracelular como extracelular (Ross e Poirier, 2004).



6. Terapia mediada por *Chaperones*

Os *chaperones* farmacológicos são pequenas moléculas capazes de se ligar a proteínas anómalas no RE facilitando o seu enrolamento de forma eficiente, estabilizando-as e prevenindo a sua deteção e degradação pelo sistema de controlo de qualidade (Bendikov-Bar *et al.*, 2013, Zimran *et al.*, 2013). A terapia mediada por *chaperones* farmacológicos representa uma estratégia terapêutica emergente para muitas doenças conformacionais, tal como a seguir é apresentado e discutido.

Doenças degenerativas do sistema nervoso central, possuem uma elevada taxa de morbilidade e de mortalidade assim como uma significativa limitação terapêutica. Como já foi referido, diversas patologias são causadas por mutações *missense* que originam *misfolding* e perda de função da proteína respetiva. Este é um aspeto comum das doenças neurodegenerativas *i.e.* um mecanismo de dano proteico, fruto de uma maquinaria de controlo de qualidade insuficiente. A descoberta de *chaperones* moleculares e o seu papel evidente no controlo de qualidade do ambiente celular representa, atualmente, uma opção terapêutica para muitas patologias (Almeida *et al.*, 2011, Powers *et al.*, 2010).

O fundamento do tratamento por *chaperones* consiste na possibilidade de manipulação da maquinaria de controlo de qualidade celular e, subsequentemente, no ganho de função da proteína afetada. A primeira evidência de que seria possível manipular os sistemas de controlo de qualidade resultou de estudos desenvolvidos sobre reguladores de condutância transmembranar da fibrose cística (RTFC). Mutações neste canal de cloreto levam ao desenvolvimento de uma doença hereditária monogénica conhecida por fibrose cística. Esta doença é caracterizada pela incapacidade das células epiteliais conseguirem segregar cloreto (responsável pela produção do muco espesso e viscoso) causando obstruções funcionais graves dos pulmões e do pâncreas. Uma dessas mutações é a deleção *in-frame* do resíduo 508 de fenilalanina (conhecida por DF508) que está localizado no terceiro ciclo do canal. Esta mutação é encontrada em 90% dos doentes afetados com fibrose cística. A proteína mutada *misfolded* fica retida no RE e é degradada prematuramente pelo sistema ubiquitina-proteassoma. A observação de que a



redução da temperatura de crescimento de células que expressam DF508 originaria o aumento da quantidade de canais funcionais presentes na superfície celular, sugeriu que o abrandamento do processo de enrolamento deveria permitir que uma maior proporção de proteínas mutantes adotasse uma conformação nativa e, desse modo, escapassem ao controlo de qualidade do RE, alcançando o seu local de ação apropriado como canais funcionais (Bernier *et al.*, 2004, Kreindler, 2010).

Presentemente existem estudos que demonstram que este tipo de terapia pode ser aplicado não só a proteínas solúveis mas também a proteínas de membrana. Entre as mutações que ocorrem naturalmente em transportadores ATP-dependentes (*i.e.* Transportadores de cobre ATPase tipo-P), algumas podem originar a retenção desta proteína no RE, impedindo o seu tráfego entre o CG e a membrana plasmática. Doentes com este tipo de mutações apresentam défices no transporte de cobre que se traduzem em alterações no tecido conetivo, degeneração neuronal, atraso mental, tremores, osteoporose e hipopigmentação, um padrão clínico conhecido por doença de Menke. Em células que expressam a mutação G1019D associada à doença de Menke, a suplementação com cobre permite que o transportador seja libertado do RE para o CG, onde é processado antes de atingir membrana plasmática, sugerindo que o cobre atua como *chaperone* farmacológico (Bernier *et al.*, 2004).

Estudos clínicos e experimentais sobre a indução da família de *chaperones* HSP70 demonstraram benefícios potenciais no tratamento de doenças neurodegenerativas, onde há escassez de alternativas. Doenças como Huntington, Parkinson e Alzheimer são caracterizadas por alterações celulares progressivas que levam à agregação de proteínas desnaturadas. A indução dos *chaperones* HSP 70 pode prevenir a progressão destas condições ou, pelo menos, diminuir os sintomas através da proteção e estabilização estrutural de proteínas. Em concordância com esta possibilidade estão os bons resultados obtidos em modelos experimentais da atrofia espinobulbar muscular tratada com o indutor HSP geranylgeranilcetona, assim como com o 17AAG, inibidor do HSP90 (Almeida *et al.*, 2011).

As doenças lisossomais de sobrecarga também podem beneficiar da terapia por *chaperones*. A doença de Gaucher (doença autossómica recessiva) é caracterizada pela



acumulação da glucosilceramida em lisossomas devido à mutação no gene *GBA1*, que codifica a hidrolase lisossomal β -glucocerebrosidase (Gcase) (Bendikov-Bar *et al.*, 2013). As moléculas de GCase são sintetizadas em polirribossomas ligados a RE donde são translocadas para o lúmen do RE, onde sofrem modificações e enrolamento antes de serem transferidas para o CG e deste para os lisossomas. Moléculas mutantes de GCase caracterizadas por falhas no enrolamento são degradadas prematuramente no proteassoma. Estão descritos vários *chaperones* moleculares que promovem eficazmente o correto enrolamento de moléculas GCase mutantes no RE, facilitando o seu transporte para os lisossomas. Entre estes *chaperones* moleculares encontra-se o ambroxol, um conhecido expectorante capaz de aumentar a fração lisossomal e a atividade enzimática de GCase mutantes em fibroblastos da pele de doentes com a forma não neuropática e com a forma neuropática aguda da doença de Gaucher, conhecidas por formas tipo 1 e tipo 2, respetivamente (Bendikov-Bar *et al.*, 2013).

Outro caso de doença lisossomal é a doença de Fabry (doença ligada ao cromossoma X) que é causada por mutações no gene que codifica para a α -galactosidase A, originando a acumulação lisossomal do substrato natural globotriaosilceramida numa variedade de órgãos e células de vasos sanguíneos ao longo de todo corpo (Khanna *et al.*, 2013, Shin *et al.*, 2007). Esta doença apresenta um quadro clínico de dor, angioqueratomas, doença cardíaca, AVC, insuficiência renal progressiva, hipoidrose, e possível morte por falência renal crónica (Shin *et al.*, 2007). Para o tratamento desta doença é usada uma estratégia semelhante à descrita para a doença de Gaucher (terapia de substituição enzimática, *e.g.* α -gal A) e que resulta na estabilização das enzimas recém-sintetizadas permitindo o seu trânsito apropriado para o lisossoma (Schiffmann *et al.*, 2001, Shin *et al.*, 2007).

O *stress* oxidativo responsável por diversas doenças, em particular as doenças degenerativas associadas ao envelhecimento, também poderá beneficiar deste tipo de abordagem terapêutica mediada por *chaperones*. Um exemplo é o HSP70 que demonstrou capacidade de proteção da atividade elétrica estriatal em amostras de cérebro de modelos murinos de *stress* oxidativo de doenças como a de Huntington e de Parkinson. Uma hipótese para a explicação desta observação poderá estar relacionada



com a preservação funcional da mitocôndria (Almeida *et al.*, 2011). De um modo geral, os *chaperones* apresentam efeitos benéficos no sistema nervoso central pelo que a sua aplicação em tratamentos levam à neuroregeneração e aumento da sobrevivência dos neurónios. De facto, está documentado a redução significativa de AVCs e a melhoria da função sensoriomotora em ratinhos submetidos a isquemia cerebral e posteriormente sujeitos ao tratamento com HSP70 recombinante (Almeida *et al.*, 2011).

Em conclusão, existe atualmente uma ampla evidência de que a utilização de *chaperones* farmacológicos constitui uma alternativa viável para tratar doenças de etiologia diversa mas com uma causa comum *i.e.*, a presença de proteínas *misfolded*. Adicionalmente, sabe-se, hoje, que as doenças órfãs (doenças que afetam percentagens muito pequenas da população, nomeadamente ~ 6 a 10 % da população Europeia e dos Estados Unidos em conjunto), e.g, a doença de Huntington, fibrose cística e alguns casos raros de cancro (como os sarcomas) (Lunn e Stockwell, 2005), podem ser tratadas por *chaperones* farmacológicos, como já foi referido, o que faz com que estes se encontrem incluídos no grupo restrito das *orphan drugs*.

Paralelamente à abordagem terapêutica baseada na sobreexpressão ou administração de *chaperones*, o contrário também pode ter importância terapêutica, como acontece no cancro. A denominação “cancro” é usada em mais de 100 doenças diferentes cujo principal sintoma é o rápido crescimento celular que leva à destruição de células e tecidos saudáveis, e que pode atacar qualquer órgão ou tecido além do foco primário (Tabaei e Sohrabi, 2013). Em Portugal é reconhecido o impacto social da doença oncológica dado que representa a segunda causa de morte. Na verdade, a sua crescente morbidade e mortalidade fazem aumentar os custos económico-sociais envolvidos na sua prevenção, tratamento e reabilitação (Silveira *et al.*, 2012). É, por isso, de grande importância a identificação de novos fármacos que apresentem maior eficácia e menor toxicidade do que os agentes já existentes (Workman, 2004). Dado que, em muitos casos, o desenvolvimento das células tumorais está fortemente associado à herança genética de cada indivíduo (Tabaei e Sohrabi, 2013), a identificação da combinação genética associada ao aparecimento e progressão destas doenças permitirá, no futuro, o desenvolvimento de fármacos mais personalizados (Workman,



2004). Uma abordagem interessante na terapêutica tumoral envolve o desenvolvimento de inibidores dos *chaperones* moleculares HSP90 e HSP70 (Goloudina *et al.*, 2012, Workman, 2004). Como já foi mencionado, o HSP90 é necessário para o enrolamento correto, estabilidade e funcionalidade de várias proteínas, incluindo proteínas mutadas expressas em maiores quantidades em células tumorais. Nesse sentido, os inibidores da HSP90 representam potenciais alvos terapêuticos (Workman, 2004). No caso da HSP70, estas moléculas encontram-se acumuladas em células submetidas a *stress* para promover a sua sobrevivência em condições adversas. De facto, ao contrário das células normais, as células tumorais expressam grandes quantidades de HSP70 para as tornar resistentes nos diferentes estágios da tumorigénese e durante os tratamentos oncológicos, o que torna interessante o uso de inibidores destes *chaperones* para combater estas doenças (Ding *et al.*, 2013, Goloudina *et al.*, 2012). Estudos desenvolvidos recentemente sugerem que a terapia combinada de HSP90 com HSP70 poderá representar uma abordagem mais eficaz no tratamento oncológico (Goloudina *et al.*, 2012). No entanto, é de referir que o objetivo deste trabalho não se encontra no aprofundamento deste tema, razão pela qual este não será explorado com maior detalhe, tendo sido mencionado apenas como um bom exemplo da potencialidade futura da terapia por *chaperones*.



7. Métodos usados para o desenvolvimento de fármacos proteicos

Ao longo deste trabalho de revisão foi evidenciado o importante papel que as proteínas *chaperone* desempenham na fisiopatologia e no tratamento de doenças conformacionais. Paralelamente, os avanços tecnológicos na área biofarmacêutica e a expectativa de identificação de novos fármacos proteicos tem impulsionado a otimização de metodologias já existentes bem como a investigação de novas metodologias para o desenvolvimento de formulações proteicas (Capelle *et al.*, 2007). Porém, a formulação de fármacos proteicos é um processo difícil e moroso, principalmente pela complexidade da estrutura proteica e pela necessidade de preservação de propriedades físico-químicas específicas. Por isso, cada formulação proteica implica um desenvolvimento cuidadoso e personalizado (Capelle e Arvinte, 2008). Uma das preocupações reside, precisamente, na estabilidade da formulação proteica, a qual deverá manter-se com a sua conformação ativa durante muito anos e mesmo em condições desfavoráveis de transporte e de armazenamento. Presentemente, a combinação ótima de excipientes pode ser encontrada pela aplicação do modelo *high throughput screening* (HTS), cuja plataforma foi concebida para permitir a identificação de potenciais fármacos a partir da validação do conhecimento fisiopatológico (Figura 6).

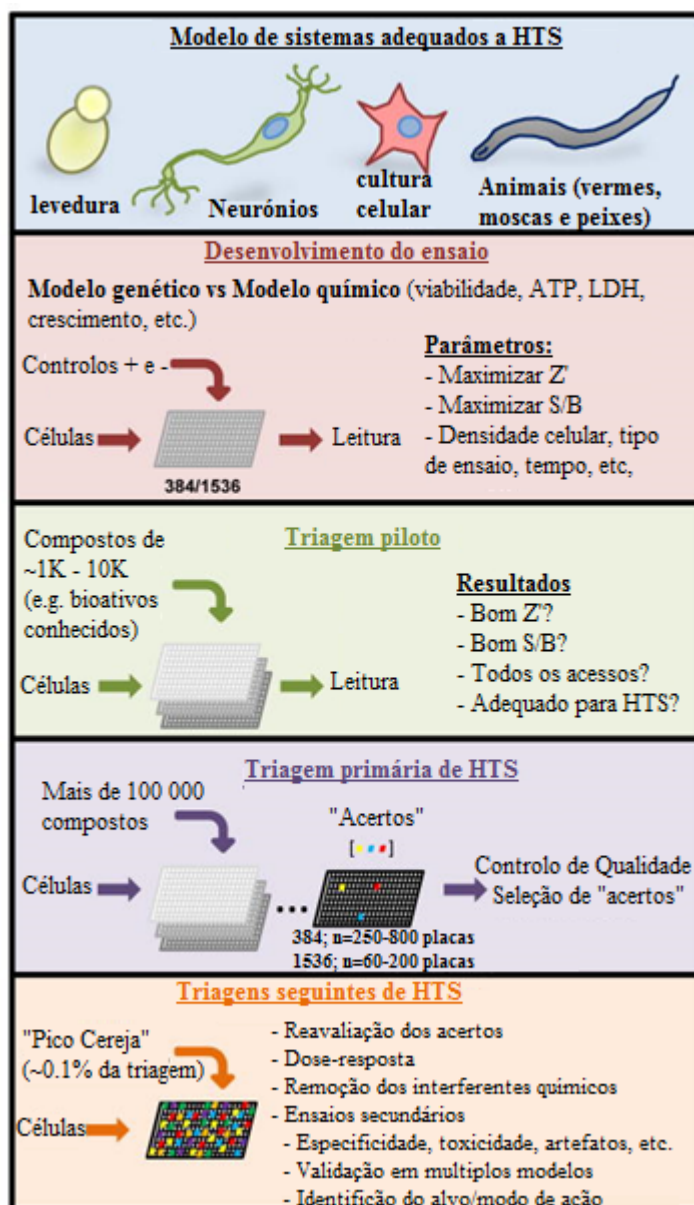


Figura 6: Modelo para a identificação de potenciais fármacos a partir de uma abordagem fisiopatológica [Adaptado de Capelle e Arvinte (2008)].

Uma plataforma HTS está otimizada para o procedimento de preparação e da análise das amostras (Capelle *et al.*, 2007). Os métodos HTS na formulação de fármacos proteicos oferecem algumas vantagens, *e.g.*: (i) minimizam a quantidade de proteína necessária; (ii) simplificam a forma de escolha do ensaio correto e dos consumíveis; (iii)



permitem a preparação da formulação com auxílio de uma biblioteca de excipientes; (iv) possibilidade de integração de múltiplas técnicas num sistema completamente automatizado; (v) avaliação e processamento contínuo de dados, e (vi) flexibilidade em desenhar novas experiências (Capelle e Arvinte, 2008). As vantagens que este método apresenta fazem com que ele seja considerado um bom aliado para a pesquisa de novos fármacos proteicos.



Capítulo III - Conclusão



Ao longo desta tese foi explorada a importância das proteínas *chaperones* para o bom funcionamento do organismo. Além de fazerem parte da base estrutural dos seres vivos, estas estruturas também integram o processo de sinalização celular que é fundamental para uma adequada comunicação celular e, conseqüentemente, para o bom funcionamento de qualquer organismo vivo. Esta diversidade funcional implica a existência de uma maquinaria molecular e celular sofisticadas para assistir e regular a produção de proteínas e, ainda, um rigoroso controlo de qualidade que evite a formação de proteínas anómalas. De fato, nos casos em que o processo de controlo de qualidade não funciona adequadamente ou o seu nível de ação é insuficiente para a quantidade de proteína produzida, observa-se o fenómeno de acumulação e agregação de proteínas *misfolded* no organismo. A inexistência de uma correção atempada deste processo origina, a longo prazo, o aparecimento de doenças conformacionais, como o caso das doenças amiloides que, na maior parte dos casos, condicionam dramaticamente a qualidade de vida desses doentes podendo, mesmo, levar à morte prematura de indivíduos depois da meia-idade. Por estas razões, tem havido um interesse crescente na procura de estratégias terapêuticas eficazes para as doenças conformacionais. Nesse sentido, o tratamento com *chaperones* farmacológicos pode ser preventivo, ao reduzir o *stress* oxidativo que é um agente causador comum a estas doenças, ou curativo, seja pela aplicação/administração de *chaperones* farmacológicos ou pelo meio de indução de produção destes *chaperones* pelo próprio organismo. De fato, ao longo desta última década os resultados publicados na literatura são demonstrativos da enorme potencialidade dos *chaperones* para o tratamento destas doenças. No entanto, ainda existe um longo caminho para percorrer até que seja identificado um fármaco que consiga devolver a estes doentes a qualidade de vida que eles merecem, fato que torna fundamental a continuidade da investigação sobre *chaperones*, desde a elucidação do seu funcionamento à sua aplicação farmacológica.



BIBLIOGRAFIA



Referências Bibliográficas

Almeida, M. B.; Do Nascimento, J. L. M.; Herculano, A. M. e Crespo-López, M. E. 2011. Molecular chaperones: Toward new therapeutic tools. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 65, 239-243.

Ande, S. R.; Chen, J. e Maddika, S. 2009. The ubiquitin pathway: An emerging drug target in cancer therapy. *European Journal of Pharmacology*, 625, 199-205.

Anfinsen, C. B. 1973. Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, 181, 223-230.

Auluck, P. K.; Chan, H. Y.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M. e Bonini, N. M. 2002. Chaperone suppression of alpha-synuclein toxicity in a *Drosophila* model for Parkinson's disease. *Science*, 295, 865-868.

Bagola, K.; Mehnert, M.; Jarosch, E. e Sommer, T. 2011. Protein dislocation from the ER. *Biochim Biophys Acta*, 1808, 925-936.

Bendikov-Bar, I.; Maor, G.; Filocamo, M. e Horowitz, M. 2013. Ambroxol as a pharmacological chaperone for mutant glucocerebrosidase. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 50, 141-145.

Bernier, V.; Lagacé, M.; Bichet, D. G. e Bouvier, M. 2004. Pharmacological chaperones: potential treatment for conformational diseases. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 15, 222-228.

Betarbet, R.; Sherer, T. B. e Greenamyre, J. T. 2005. Ubiquitin–proteasome system and Parkinson's diseases. *Experimental Neurology*, 191, Supplement 1, S17-S27.



Broadley, S. A. e Hartl, F. U. 2009. The role of molecular chaperones in human misfolding diseases. *FEBS Letters*, 583, 2647-2653.

Capelle, M. A.; Gurny, R. e Arvinte, T. 2007. High throughput screening of protein formulation stability: practical considerations. *Eur J Pharm Biopharm*, 65, 131-148.

Capelle, M. a. H. e Arvinte, T. 2008. High-throughput formulation screening of therapeutic proteins. *Drug Discovery Today: Technologies*, 5, e71-e79.

Carrell, R. W. 2005. Cell toxicity and conformational disease. *Trends in Cell Biology*, 15, 574-580.

Carrell, R. W. e Gooptu, B. 1998. Conformational changes and disease — serpins, prions and Alzheimer's. *Current Opinion in Structural Biology*, 8, 799-809.

Carrell, R. W. e Lomas, D. A. 1997. Conformational disease. *The Lancet*, 350, 134-138.

Chiti, F. e Dobson, C. M. 2006. Protein misfolding functional amyloid, and human disease. *Annu. Rev. Biochem.*, 75, 333-366.

Correia, J. H. R. D. e Correia, A. a. D. 2001. Formação e replicação de príões patogénicos nas encefalopatias espongiiformes transmissíveis. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 96.

Csermely, P.; Söti, C.; Kalmar, E.; Papp, E.; Pato, B.; Vermes, A. e Sreedhar, A. S. 2003. Molecular chaperones, evolution and medicine. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 666–667, 373-380.

Cuervo, A. M. 2010. Chaperone-mediated autophagy: selectivity pays off. *Trends Endocrinol Metab*, 21, 142-150.



Del Pozo, J. C. e Estelle, M. 1999. Function of the ubiquitin–proteasome pathway in auxin response. *Trends in Plant Science*, 4, 107-112.

Dexter, D. T. e Jenner, P. 2013. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine*, 62, 132-144.

Ding, X.; Li, H.; Xie, H.; Huang, Y.; Hou, Y.; Yin, Y. e Li, G. 2013. A novel method to assay molecular chaperone activity of HSP70: Evaluation of drug resistance in cancer treatment. *Biosensors and Bioelectronics*, 47, 75-79.

Dobson, C. M. 2003. Protein folding and misfolding. *Nature*, 426, 884-890.

Dobson, C. M. e Karplus, M. 1999. The fundamentals of protein folding: bringing together theory and experiment. *Curr Opin Struct Biol*, 9, 92-101.

Ellgaard, L. e Helenius, A. 2003. Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4, 181-191.

Esser, C.; Alberti, S. e Hohfeld, J. 2004. Cooperation of molecular chaperones with the ubiquitin/proteasome system. *Biochim Biophys Acta*, 1695, 171-188.

Ferreira, S. T. e De Felice, F. G. 2001. Protein dynamics, folding and misfolding: from basic physical chemistry to human conformational diseases. *FEBS Letters*, 498, 129-134.

Fewell, S. W.; Travers, K. J.; Weissman, J. S. e Brodsky, J. L. 2001. The action of molecular chaperones in the early secretory pathway. *Annu Rev Genet*, 35, 149-191.

Gavin, A. C.; Bosche, M.; Krause, R.; Grandi, P.; Marzioch, M.; Bauer, A.; Schultz, J.; Rick, J. M.; Michon, A. M.; Cruciat, C. M.; Remor, M.; Hofert, C.; Schelder, M.;



Brajenovic, M.; Ruffner, H.; Merino, A.; Klein, K.; Hudak, M.; Dickson, D.; Rudi, T.; Gnau, V.; Bauch, A.; Bastuck, S.; Huhse, B.; Leutwein, C.; Heurtier, M. A.; Copley, R. R.; Edelmann, A.; Querfurth, E.; Rybin, V.; Drewes, G.; Raida, M.; Bouwmeester, T.; Bork, P.; Seraphin, B.; Kuster, B.; Neubauer, G. e Superti-Furga, G. 2002. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature*, 415, 141-147.

Gidalevitz, T.; Ben-Zvi, A.; Ho, K. H.; Brignull, H. R. e Morimoto, R. I. 2006. Progressive disruption of cellular protein folding in models of polyglutamine diseases. *Science*, 311, 1471-1474.

Gidalevitz, T.; Kikis, E. A. e Morimoto, R. I. 2010. A cellular perspective on conformational disease: the role of genetic background and proteostasis networks. *Curr Opin Struct Biol*, 20, 23-32.

Gidalevitz, T.; Stevens, F. e Argon, Y. 2013. Orchestration of secretory protein folding by ER chaperones. *Biochimica et Biophysica Acta* xxx, xxx-xxx.

Goloudina, A. R.; Demidov, O. N. e Garrido, C. 2012. Inhibition of HSP70: A challenging anti-cancer strategy. *Cancer Letters*, 325, 117-124.

Guidolin, D.; Agnati, L. F.; Albertin, G.; Tortorella, C. e Fuxe, K. 2012. Bioinformatics aggregation predictors in the study of protein conformational diseases of the human nervous system. *Electrophoresis*, 33, 3669-3679.

Halpern, M. J. 1997. *Bioquímica*, Lisboa, Lidel.

Hartl, F. U.; Bracher, A. e Hayer-Hartl, M. 2011. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*, 475, 324-332.



Hartl, F. U. e Hayer-Hartl, M. 2002. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*, 295, 1852-1858.

Horvath, I.; Multhoff, G.; Sonnleitner, A. e Vigh, L. 2008. Membrane-associated stress proteins: more than simply chaperones. *Biochim Biophys Acta*, 1778, 1653-1664.

Hyman, B. T.; Augustinack, J. C. e Ingelsson, M. 2005. Transcriptional and conformational changes of the tau molecule in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1739, 150-157.

Invernizzi, G.; Papaleo, E.; Sabate, R. e Ventura, S. 2012. Protein aggregation: mechanisms and functional consequences. *Int J Biochem Cell Biol*, 44, 1541-1554.

Khanna, R.; Xu, S.; Lun, Y.; Soska, R.; Feng, J.; Frascella, M.; Garcia, A.; Flanagan, J.; Lockhart, D. e Valenzano, K. 2013. Exploring the use of a co-formulated pharmacological chaperone AT2220 with recombinant human acid alpha-glucosidase for Pompe disease. *Molecular Genetics and Metabolism*, 108, S53.

Kon, M. e Cuervo, A. M. 2010. Chaperone-mediated autophagy in health and disease. *FEBS Lett*, 584, 1399-1404.

Koolman, J. e Roehm, K. H. 2005. *Color Atlas of Biochemistry*, New York, Flexibook.

Kovacs, D.; Rakacs, M.; Agoston, B.; Lenkey, K.; Semrad, K.; Schroeder, R. e Tompa, P. 2009. Janus chaperones: Assistance of both RNA- and protein-folding by ribosomal proteins. *FEBS Letters*, 583, 88-92.

Kreindler, J. L. 2010. Cystic fibrosis: Exploiting its genetic basis in the hunt for new therapies. *Pharmacology & Therapeutics*, 125, 219-229.



Lindsten, K. e Dantuma, N. P. 2003. Monitoring the ubiquitin/proteasome system in conformational diseases. *Ageing Research Reviews*, 2, 433-449.

Lunn, M. R. e Stockwell, B. R. 2005. Chemical Genetics and Orphan Genetic Diseases. *Chemistry & Biology*, 12, 1063-1073.

Malhotra, V. e Mayor, S. 2006. Cell biology: the Golgi grows up. *Nature*, 441, 939-940.

Murton, A. J.; Constantin, D. e Greenhaff, P. L. 2008. The involvement of the ubiquitin proteasome system in human skeletal muscle remodelling and atrophy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1782, 730-743.

Niu, C.; Zhang, J.; Mei, J. e Fu, X. 2011. Does neurotrophic factor benefit to PD therapy via co-function with ubiquitin–proteasome system? *Medical Hypotheses*, 76, 589-592.

Passarge, E. 2004. *Genética: Texto e Atlas*, Porto Alegre.

Powers, M. V.; Jones, K.; Barillari, C.; Westwood, I.; Van Montfort, R. L. e Workman, P. 2010. Targeting HSP70: the second potentially druggable heat shock protein and molecular chaperone? *Cell Cycle*, 9, 1542-1550.

Purves, W. K.; Oruans, G. H.; Heller, H. C. e Sadava, D. 1998. *Life - The Science of Biology*, USA, W.H, Freeman and company.

Rapoport, T. A. 1985. Extensions of the signal hypothesis - sequential insertion model versus amphipathic tunnel hypothesis. *FEBS Letters*, 187, 1-10.



Reiss, C.; Ehrlich, R.; Lesnick, T.; Parvez, S. e Parvez, H. 2002. Conformational diseases: Misfolding mechanisms may pave the way to early therapy. *Neurotoxicology and Teratology*, 24, ix-xiv.

Reiss, C.; Lesnik, T.; Parvez, H.; Parvez, S. e Ehrlich, R. 2000. Conformational toxicity and sporadic conformational diseases. *Toxicology*, 153, 115-121.

Ross, C. A. e Poirier, M. A. 2004. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med*, 10 Suppl, S10-17.

Roy, H. e Ibba, M. 2006. Molecular biology: sticky end in protein synthesis. *Nature*, 443, 41-42.

Rutherford, S. L. e Lindquist, S. 1998. Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature*, 396, 336-342.

Sandefur, Conner i. e Schnell, S. 2011. A Model of Threshold Behavior Reveals Rescue Mechanisms of Bystander Proteins in Conformational Diseases. *Biophysical Journal*, 100, 1864-1873.

Schiffmann, R.; Kopp, J. B.; Austin, H. A., 3rd; Sabnis, S.; Moore, D. F.; Weibel, T.; Balow, J. E. e Brady, R. O. 2001. Enzyme replacement therapy in Fabry disease: a randomized controlled trial. *JAMA*, 285, 2743-2749.

Sciences, P. 2009. Protein structure. *Technical Brief*.
<http://www.particlesciences.com/news/technical-briefs/2009/protein-structure.html>:
Particle Sciences.



Shin, S.-H.; Murray, G. J.; Kluepfel-Stahl, S.; Cooney, A. M.; Quirk, J. M.; Schiffmann, R.; Brady, R. O. e Kaneski, C. R. 2007. Screening for pharmacological chaperones in Fabry disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 359, 168-173.

Silveira, A.; Gonçalves, J.; Sequeira, T.; Ribeiro, C.; Lopes, C.; Monteiro, E. e Pimentel, F. L. 2012. Oncologia de Cabeça e Pescoço: enquadramento epidemiológico e clínico na avaliação da Qualidade de Vida Relacionada com a Saúde. *Rev Bras Epidemiol*, 15, 38-48.

Sitia, R. e Braakman, I. 2003. Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory. *Nature*, 426, 891-894.

Slavotinek, A. M. e Biesecker, L. G. 2001. Unfolding the role of chaperones and chaperonins in human disease. *Trends in Genetics*, 17, 528-535.

Sóti, C. e Csermely, P. 2007. Aging cellular networks: Chaperones as major participants. *Experimental Gerontology*, 42, 113-119.

Stolz, A. e Wolf, D. H. 2010. Endoplasmic reticulum associated protein degradation: a chaperone assisted journey to hell. *Biochim Biophys Acta*, 1803, 694-705.

Surguchev, A. e Surguchov, A. 2010. Conformational diseases: Looking into the eyes. *Brain Research Bulletin*, 81, 12-24.

Tabaei, S. M. Y. e Sohrabi, R. 2013. Comparing the Personality Profile of Patients Suffering from Cancer Disease. *Procedia - Social and Behavioral Sciences*, 84, 1801-1803.

Videira, A. 2001. *Engenharia Genética. Princípios e aplicações.*, Lisboa, Lidel.



Voet, D.; Voet, J. G. e Pratt, C. W. 2000. *Fundamentos de Bioquímica*, São Paulo, John Wiley & Sons, Inc.

Weaver, C. L.; Espinoza, M.; Kress, Y. e Davies, P. 2000. Conformational change as one of the earliest alterations of tau in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 21, 719-727.

Workman, P. 2004. Altered states: selectively drugging the Hsp90 cancer chaperone. *Trends Mol Med*, 10, 47-51.

Xu, D. e Esko, J. D. 2009. A Golgi-on-a-chip for glycan synthesis. *Nat Chem Biol*, 5, 612-613.

Zimran, A.; Altarescu, G. e Elstein, D. 2013. Pilot study using ambroxol as a pharmacological chaperone in type 1 Gaucher disease. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 50, 134-137.