



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

**Efeito do 17-beta-estradiol na expressão da
transtirretina e da metalotioneína-1/2 numa linha
celular de plexo coroídeo de rato**

Marta Isabel Nunes Costa

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica
(2º ciclo de estudos)

Orientadora: Prof^a. Doutora Isabel Gonçalves
Co-orientadora: Prof^a. Doutora Cecília Santos

Covilhã, Junho de 2011

Folha em branco

Agradecimentos

Não posso deixar de agradecer a todos aqueles que, directa ou indirectamente, tornaram este projecto possível:

À prof^a. Doutora Isabel Gonçalves por tornar este trabalho possível. Obrigada pelo apoio, compreensão e conselhos;

À prof^a. Doutora Cecília Santos pela oportunidade de trabalhar com o seu grupo de investigação e pelos conhecimentos teóricos e práticos transmitidos;

Aos colegas de laboratório, Joana, Telma, Sandra, Diana, Susana e Paulo pelo suporte teórico, prático e sobretudo moral;

Ao Janela, Luís, Patrícia e Teresa pelo optimismo, compreensão e paciência;

À Ana Martinho por tudo o que me ensinaste, pela disponibilidade, pelos sábios conselhos, pelo apoio e claro pela amizade. Sem ti esta tese não seria possível...OBRIGADA!

Ao Ricardo pelo apoio incondicional e pelas palavras certas no momento certo, mas principalmente por fazeres parte da minha vida;

E finalmente, aos meus pais e irmão, por me terem feito chegar até aqui, dando-me todo o amor, compreensão e paciência...OBRIGADO por acreditarem em mim!

Folha em branco

Resumo

O envelhecimento progressivo das populações dos países ocidentais, tem vindo a agravar a incidência de patologias neurodegenerativas, nomeadamente da doença de Alzheimer (AD). Esta patologia caracteriza-se pela deposição extracelular de fibrilhas do péptido β amiloide (A β) no córtex cerebral, levando à degeneração das células nervosas circulantes. A transtirretina (TTR), sintetizada principalmente no fígado e plexos coroideus (CPs), parece sequestrar o A β , prevenindo a formação dos agregados amilóides. As metalotioneínas (MTs) são proteínas de baixo peso molecular cuja expressão parece estar alterada em cérebros com AD. O aumento da expressão de MT-1/2 e a diminuição de MT-3 em doenças neuroinflamatórias tem suscitado um interesse crescente no papel destas proteínas na patogénese da AD. O reconhecimento das funções da MT-1/2 na captação de espécies reactivas de oxigénio (ROS), na viabilidade neuronal e no controlo da concentração de iões metálicos envolvidos na agregação amiloide, tem reforçado o interesse da proteína na neurodegeneração e neuroprotecção. Contudo, dados recentes indiciam que a MT-1/2 pode comprometer a remoção de A β , ao interagir com a TTR. Nesta perspectiva, o esclarecimento dos mecanismos que controlam os níveis de TTR e de MT-1/2 nos CPs pode prestar um contributo valioso ao desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas e de diagnóstico para a AD. Com este trabalho pretendeu-se avaliar o efeito de uma hormona com conhecidos efeitos neuroprotectores, o estradiol (E₂) na expressão de TTR e de MT-1/2 nos CPs, recorrendo a uma linha celular de CP de rato (RCP). Foi ainda objectivo deste trabalho optimizar as condições de transfecção das linhas celulares RCP, com Lipofectamine 2000™, e HEK 293, pelo método do CaCl₂, com o intuito de estabelecer metodologias práticas e eficazes para futuros estudos.

As culturas da linha celular RCP foram estimuladas com várias concentrações de E₂ (0, 1, 10, 100 e 1000nM) durante 6, 12, 24 e 36h. Os extractos proteicos das células foram analisados por *Western blot* para avaliar os níveis de expressão de TTR e de MT-1/2.

Nas células tratadas com E₂, os níveis de expressão de TTR aumentaram às 12h de estímulo com hormona a 10 e 100nM ($p < 0,05$). O efeito da hormona esteróide foi máximo às 24h de estímulo com E₂ a 10nM ($p < 0,001$), sendo os níveis de proteína aproximadamente 2 vezes mais elevados que nas células não estimuladas. Relativamente ao efeito da hormona na expressão de MT-1/2, os resultados revelaram aumentos significativos às 12h de estímulo para todas as concentrações de hormona testadas. 24h após o estímulo hormonal, a expressão de MT-1/2 permaneceu significativamente elevada, comparativamente ao controlo (0nM), sendo o efeito atenuado às 36h de estímulo.

Posto isto, conclui-se que o E2 regula positivamente a expressão de TTR e MT-1/2 na linha celular RCP e este efeito pode constituir um mecanismo importante subjacente ao efeito neuroprotector da hormona.

As experiências efectuadas para a optimização da transfecção em HEK 293 com CaCl_2 mostraram que o pH e concentração dos tampões, a densidade celular e a concentração de plasmídeo são parâmetros críticos no processo de transfecção. Obteve-se uma eficiência de transfecção entre os 40 e os 60%, usando 5 μg de plasmídeo, CaCl_2 a 300mM, tampão HBS 2x pH 7,05 e uma densidade celular entre os 60-80%. No caso da transfecção na linha RCP com Lipofectamine 2000TM terão que se testar mais condições para otimizar a técnica.

Palavras-chave

Transtirretina, Metalotioneína-1/2, Plexo Coroideu, Estradiol, Doença de Alzheimer, Transfecção.

Folha em branco

Abstract

In developed countries, the progressive aging of the population has led to an increase of neurodegenerative pathologies, particularly Alzheimer's disease (AD). AD is characterized by an extracellular deposition of amyloid fibrils, in the cerebral cortex, causing the degeneration of the surrounding nervous cells. Transthyretin (TTR), a protein that is majority expressed in the liver and choroid plexus (CPs), seems to sequester the amyloid beta peptide (A β), preventing the formation of amyloid aggregates. The metallothioneins (MTs) are low molecular weight proteins whose expression seems to be altered in AD brains. The higher expression of MT-1/2 and diminished levels of MT-3 in neuroinflammatory diseases has an increasing interest in its role in AD pathogenesis. The recognition of the ability of MT-1/2 in scavenging oxygen reactive species (ROS), in neuronal viability and in the control of metal ions involved in A β aggregation, has emphasized the interest of these proteins in neurodegeneration and neuroprotection. Nevertheless, recent studies suggest that MT-1/2 in interaction with TTR may compromise A β clearance. In this context, the elucidation of the mechanisms which control TTR and MT-1/2 levels in CPs could provide a good approach in the development of novel therapeutic and diagnostic targets in AD.

The aim of this study was to evaluate the effect of estradiol (E2), an hormone with neuroprotector effects, in TTR and MT-1/2 expression in CPs, using a rat CP cell line (RCP). Also, in the present study the transfection conditions for the RCP using the Lipofectamine 2000™ reagent and for the HEK 293 cell line, using the CaCl₂ method. This second aim intended to achieve novel practical methodologies for future works.

Cells were stimulated with different hormone concentrations (0, 1, 10, 100 e 1000nM) during various time periods (6, 12, 24 e 36h). Total protein extracts were collected and TTR and MT-1/2 expression were analyzed by *Western blot*.

The results from the stimulation of RCP cells with E2 showed that TTR expression was up-regulated after 12h for concentrations between 10 and 100nM ($p < 0,05$), and its expression nearly doubled after 24h for 10nM of E2. For the MT-1/2 expression with the E2 stimulation, the results showed that the protein levels were higher at 12 and 24h in all concentrations tested. And, this up-regulation was attenuated after 36h of stimulation.

With the results obtained it can be concluded that the E2 up-regulates both TTR and MT-1/2 expression levels in RCP. This observed effect can constitute an underlying mechanism in understanding the neuroprotector role of E2.

The optimization of the transfection conditions in HEK 293 with CaCl₂ revealed that several tested parameters were extremely important in the overall process. So, factors as the pH and concentration of buffers, cellular density and plasmid concentration seem to be crucial for the transfection success. After the optimization of all conditions, a transfection efficiency of 40-60% was obtained, using 5µg of plasmid, CaCl₂ 300mM, HBS2x buffer pH 7,05 and a cellular confluence between 60-80%. The transfection of RCP cells using Lipofectamine 2000™ was not completely optimized and additional assays are required.

Keywords

Transthyretin, metallothionein-1/2, choroid plexus, estradiol, Alzheimer's disease, transfection

Folha em branco

Índice

Lista de Figuras	xiv
Lista de Tabelas	xvi
Lista de Acrónimos	xviii
1. Introdução	1
1.1. Transtirretina	2
1.1.1. Descoberta e Caracterização Bioquímica	2
1.1.2. Gene	2
1.1.3. Estrutura da Proteína	3
1.1.4. Expressão	4
1.1.5. Regulação do gene	5
1.1.6. Funções biológicas	6
1.1.7. Transtirretina e Doença de Alzheimer	8
1.2. Metalotioneínas	9
1.2.1. Descoberta e Caracterização Bioquímica da Proteína	9
1.2.2. Gene	10
1.2.3. Estrutura da Proteína	10
1.2.4. Expressão e Distribuição Celular	12
1.2.5. Regulação do gene	12
1.2.6. Funções Biológicas	14
1.2.7. Metalotioneína-1/ 2 e Doença de Alzheimer	15
1.3. Estrogénios	16
1.3.1. As Hormonas	16
1.3.2. Síntese, Transporte e Excreção	16
1.3.3. Estrogénios e a Doença de Alzheimer	17
1.4. Estradiol, Transtirretina, Metalotioneína-1/2 e Doença de Alzheimer	18
2. Objectivos	19
3. Material e Métodos	21
3.1. Cultura de linhas celulares	22
3.1.1. Linha celular RCP	22
3.1.2. Linha HEK 293	22
3.1.3. Descongelamento e Contagem de células viáveis	23
3.1.4. Passagem	24
3.1.5. Congelamento	24
3.2. Estudo do efeito do 17- β -estradiol na viabilidade celular -Ensaio do MTT	25

3.3.	Estímulo hormonal da linha celular RCP com E2	25
3.4.	Extracção e Quantificação da proteína total	26
3.5.	<i>Western blot</i>	27
3.5.1.	Protocolo <i>Western blot</i> TTR	27
3.5.2.	Protocolo <i>Western blot</i> MT	28
3.6.	Transfecção	29
3.6.1.	Transfecção de RCP com lipofectamine 2000™	29
3.6.2.	Transfecção de HEK 293 pelo método do CaCl ₂	31
4.	Resultados	33
4.1.	Efeito do E2 na viabilidade celular	34
4.2.	Efeito do E2 na expressão de TTR	34
4.3.	Efeito do E2 na expressão de MT-1/2	36
4.4.	Eficiência de Transfecção	38
4.4.1.	Transfecção em RCP com lipofectamine 2000™	38
4.4.2.	Tranfecção em HEK 293 com CaCl ₂	39
5.	Discussão e Conclusão	41
5.1.	Efeito do E2 na expressão da TTR	42
5.2.	Efeito do E2 na expressão da MT-1/2	43
5.3.	Transfecção	44
5.3.1.	Transfecção em RCP com lipofectamine 2000™	44
5.3.2.	Transfecção em HEK 293 com CaCl ₂	45
6.	Perspectivas Futuras	46
7.	Anexos	48
7.1.	Marcador de pesos moleculares	49
7.2.	Vector pCMV.sport-β-gal	49
8.	Referências Bibliográficas	50

Folha em branco

Lista de Figuras

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura tridimensional do tetrâmero e do monómero da TTR humana *wild-type*.

Figura 2 - Representação morfológica e histológica do plexo coroideu do ventrículo lateral do cérebro.

Figura 3- Representação do *enhancer* distal e do promotor proximal do gene TTR de rato.

Figura 4 - Representação do complexo TTR-RBP.

Figura 5- Esquema representativo da MT-2.

Figura 6- Estrutura tridimensional da MT-2 de rato ligada a 7 íões metálicos.

Figura 7- Regulação da expressão do gene MT-1/2.

Figura 8- Estrutura do 17- β -estradiol.

Figura 9- Células RCP observadas ao microscópio óptico numa ampliação de 100x.

Figura 10 Células HEK 293 observadas ao microscópio óptico numa ampliação de 100x.

Figura 11- Análise do efeito de E2 na viabilidade das células RCP.

Figura 12 - Análise da expressão de TTR a partir de extractos proteicos de RCP por *Western blot*, usando a β -actina como proteína normalizadora.

Figura 13 - Análise dos níveis de expressão de TTR em células RCP estimuladas 6, 12, 24 e 36h com E2 a 0, 1, 10, 100 e 1000nM.

Figura 14 - Análise da expressão de MT-1/2 a partir de extractos proteicos de RCP por *Western blot*, usando a β -actina como proteína normalizadora.

Figura 15 - Análise dos níveis de expressão de MT-1/2 em células RCP estimuladas 6, 12, 24 e 36h com E2 a 0, 1, 10, 100 e 1000nM.

Figura 16 - Células RCP transfectadas com 1,2 μ g de pDNA e 1,2 μ l de lipofectamine observadas ao microscópio óptico na objectiva de 10x.

Figura 17 - Células HEK 293 transfectadas pelo método do CaCl₂ observadas ao microscópio óptico numa ampliação de 100x.

Figura 18 - Células HEK 293 transfectadas pelo método de CaCl₂ observadas ao microscópio óptico numa ampliação de 200x.

Figura 19 - Marcador de pesos moleculares *Kaleidoscope Prestained Standards*.

Figura 20 - Mapa do vector pCMV.sport-B-gal.

Folha em branco

Lista de Tabelas

Tabela 1- Reagentes e respectivos volumes para a quantificação de proteína total em placa de 96 poços, pelo método de Bradford.

Tabela 2- Condições testadas na transfecção da linha RCP com Lipofectamine 2000™.

Tabela 3- Condições testadas na transfecção das células HEK 293 pelo método do cloreto de cálcio.

Tabela 4- Condições testadas na otimização da transfecção em RCP usando o reagente Lipofectamine 2000™, com referência às respectivas imagens da figura 16 e eficiências de transfecção.

Tabela 5- Condições testadas para a otimização da transfecção na linha celular HEK 293 pelo método do CaCl_2 , com referência às respectivas imagens da figura 17 e eficiências de transfecção.

Folha em branco

Lista de Acrónimos

Å	Amstrong
AD	Doença de Alzheimer
AP-1	Proteína activadora-1
ApoA-I	Apolipoproteína A-I
ApoC-III	Apolipoproteína-CIII
APP	Proteína precursora amilóide
ARE	Elemento responsivo a antioxidantes
AB	Péptido B amilóide
BSA	Albumina sérica bovina
CAPS	Ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propanosulfónico
CEBP/CCAAT	Proteína de ligação ao <i>enhancer</i> /CCAAT
CP	Plexo coroideu
CSF	Fluído cerebrospinal
DHT	5 α - dihidrotestosterona
DMEM	<i>Dulbeccos's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DTT	Ditiotreitol
E2	17- β -estradiol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra acético
EGTA	Ácido etilenoglicol tetra acético
FBS	Soro fetal bovino
GRE	Elemento responsivo a glucocorticóides
HBS	Tampão salino de HEPES
HEK 293	Linha de células embrionárias de rim humano
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico
HNF	Factor nuclear de hepatócitos
IL	Interleucina
INF- α	Interferão α
Kb	Quilopares de bases
kDa	Quilodaltóns
KO	<i>Knockout</i>
LPS	Lipopolisacarídeos
MRE	Elemento responsivo a metais
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro

MT	Metalotioneína
MTF-1	Factor de transcrição responsivo a metais 1
MTL-5	MT-like 5
MTT	3-(4,5-dimetil-2-il)-2,5-brometo difeniltetrazólio
Opti-MEM	Meio de Eagle's mínimo essencial
ORF	<i>Open reading frames</i>
P	Progesterona
Pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato salino
pDNA	Ácido desoxiribonucleico plasmídico
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonilo
PS	Penicilina - estreptomicina
PVDF	Polivinildieno difluorido
RBP	Proteína de ligação ao retinol
RCP	Linha celular de plexo coroideu de rato
ROS	Espécies reactivas de oxigénio
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SNC	Sistema nervoso central
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
TBPA	Prealbumina de ligação à tiroxina
TBS	Tampão tris salino
TNF- α	Factor de necrose tumoral- α
TTR	Transtirretina
UTR	Região não traduzida
WT	<i>Wild type</i>

Folha em branco

1. Introdução

1.1. Transtirretina

1.1.1. Descoberta e Caracterização Bioquímica

A transtirretina (TTR) foi identificada em 1942 no fluído cerebrospinal (CSF) [2] e no soro humano. Inicialmente foi designada por componente X e depois por prealbumina, uma vez que é a única proteína plasmática que migra na frente da albumina, numa electroforese a pH 8,6 [3]. O papel funcional da proteína não era conhecido; assim que se descobriu que ligava a tiroxina (T4), passou a ser designada por prealbumina de ligação à tiroxina (TBPA). Uma década mais tarde, foi demonstrado que a TTR forma complexos com a proteína de ligação ao retinol (RBP) [4] [5]. Como a proteína em questão também desempenha um papel crucial no transporte de retinol, foi sugerida a alteração do nome para transtirretina (TRANS de transporte, TI de tiroxina e RETINA relativo a retinol) [5, 6].

1.1.2. Gene

A TTR humana é codificada por um gene de cópia única [7] localizado no cromossoma 18, [8] mais precisamente na região 18q11.2-q12.1 [9]. O gene, de aproximadamente 7 kilobases (kb), abrange 4 exões de 95, 131, 136 e 253 pares de bases (pb) e 3 intrões de 934, 2090 e 3308 pb. O primeiro exão codifica um péptido de 20 aminoácidos, que é removido no processo pós-transdução, e 3 aminoácidos da TTR madura. Os exões 2, 3 e 4 codificam respectivamente os resíduos 4-47, 48-92 e 93-127 da subunidade da TTR [7], [10].

Uma característica do gene da TTR é a presença de dois *open reading frames* (ORF), no primeiro e terceiro intrão, com a mesma direcção transcripcional da TTR e com putativas sequências consensus reguladoras da transcrição do gene [7]. Posteriormente, foi demonstrado que esses ORF intrónicos não são transcritos para serem expressos como polipéptidos independentes, nem integram o mRNA completamente traduzido [11]. No segundo e terceiro intrão, Tsuzuki e seus colaboradores identificaram sequências de 300pb homólogas aos elementos repetitivos do tipo Alu [7]. Na região 5' não traduzida (UTR), foram identificadas duas sequências sobrepostas com uma extensa homologia com o elemento responsivo aos glucocorticóides [12]. Nessa região existem outras sequências consensus, a CAAT box, do nucleótido -101 ao -96, a TATA box, da posição -30 à -24, e uma região rica em GC com cerca de 20 pb. Na região 3'UTR, mais precisamente na posição 123, encontra-se o sinal de poliadenilação (AATAAA) [10].

1.1.3. Estrutura da Proteína

A estrutura tridimensional da TTR humana foi deduzida com base nos dados obtidos por cristalografia de raio X [13] e pela determinação da sequência de aminoácidos que constituem a proteína [14, 15]. Trata-se de uma proteína tetramérica constituída por 4 subunidades idênticas de 13745Da, sendo cada uma composta por 127 aminoácidos [15]. Cerca de 45% dos aminoácidos que constituem o monómero da TTR formam 8 cadeias β (representadas na imagem B da figura 1 de A a H) ligadas entre si por loops. A estrutura secundária do monómero da TTR inclui ainda uma pequena hélice α de 9 resíduos, que está ligada à cadeia E. Dos 127 resíduos que compõem cada subunidade, apenas 10 resíduos da extremidade NH_2 e 5 da zona C-terminal ocorrem sem estrutura organizada. As cadeia β formam 2 folhas β pregueadas, uma composta pelas cadeias CBEF, e outra com as cadeias DAGH (imagem B da figura 1). As interações estabelecidas entre as cadeias β são antiparalelas, à exceção da conexão entre a cadeia A e G [16].

Duas subunidades de TTR interagem por pontes de hidrogénio formando um dímero estável. Os dímeros de TTR são compostos por um par de folhas β internas (cadeias DAGHH'G'A'D') e outro externo (cadeias CBEFF'E'B'C') [16, 17]. A associação de dois dímeros por interações hidrofóbicas e hidrofílicas entre os resíduos dos loops AB e GH, formam uma molécula de TTR de aproximadamente 55kDa. (Imagem A da figura 1) [16, 18]. A estrutura quaternária da TTR tem a forma de uma proteína globular cujo tamanho global é de 70 Å x 55 Å x 50 Å. Os quatro monómeros associam-se, de tal modo que se forma um canal hidrofóbico central com 2 locais de ligação para a tiroxina [18].

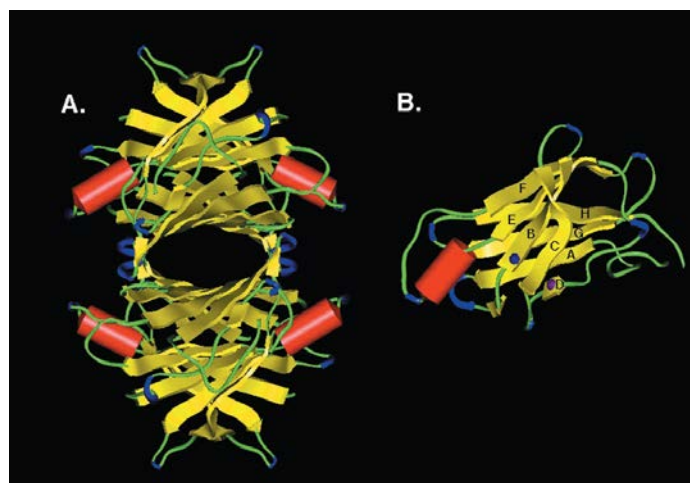


Figura 1- Representação esquemática da estrutura tridimensional do tetrâmero (A) e do monómero (B) da TTR humana *wild-type*. As cadeias β estão representadas por fitas amarelas, os cilindros vermelhos correspondem às hélices α . Adaptado de [19].

A TTR humana e a de rato apresentam algumas diferenças estruturais, mais precisamente nos *loops* de superfície da proteína. No rato, a TTR apresenta monómeros mais compactos mas essas diferenças não surtem efeito ao nível da sua função [18].

1.1.4. Expressão

A TTR é sintetizada principalmente no fígado e no cérebro. A TTR produzida no fígado é libertada para o sangue, onde a sua concentração oscila entre os 20 e os 40 mg/dL [20]. No cérebro, a proteína é activamente sintetizada pelas células epiteliais dos plexos coroídeos (CPs) e libertada unidireccionalmente para o CSF, representando cerca de 20% das proteínas totais do CSF [21, 22].

Os CPs são estruturas ramificadas muito vascularizadas que se projectam nos ventrículos do cérebro e formam uma interface entre o sangue e o CSF, a barreira sangue-CSF. Constituídos por um cordão de células epiteliais cubóides, conectadas por junções apertadas, restringem a passagem de iões e de moléculas entre o sangue e o CSF (figura 2) [23]. Os CPs representam o principal local de produção e secreção de CSF, mas também sintetizam compostos essenciais ao SNC e protegem o cérebro de agressões neurotóxicas. As células dos CPs expressam um vasto conjunto de receptores e péptidos, desde citocinas, receptores de citocinas, receptores de neurotransmissores, factores de crescimento, péptidos neuroprotectores e receptores de hormonas sexuais. Posto isto, supõe-se que este tecido seja alvo da acção das hormonas sexuais [24].

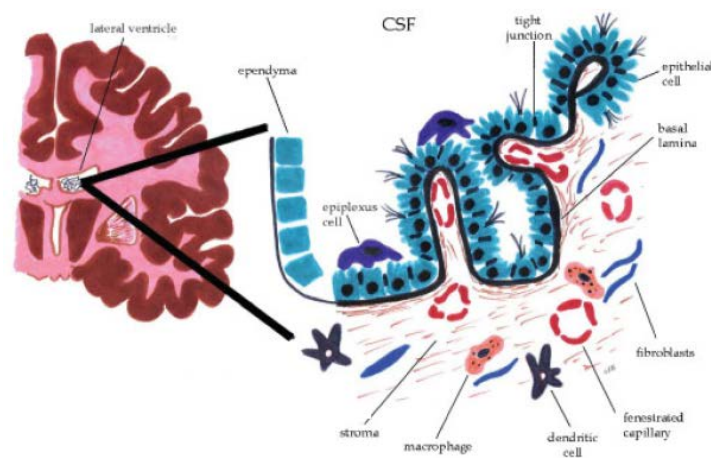


Figura 2- Representação morfológica e histológica do plexo coroídeo do ventrículo lateral do cérebro. Adaptado de [25].

No epitélio pigmentar do olho também ocorre a síntese de TTR [26]. Mais recentemente foi detectada a presença da proteína no epitélio pigmentar ciliado do olho em coelhos [27] e na placenta humana [28]. Pequenas quantidades de TTR são expressas nas meninges [29-31], pâncreas [32], estômago, coração, músculo e baço [33].

1.1.5. Regulação do gene

Resultados de estudos levados a cabo pela equipa de Robert Costa, que se debruçaram sobre o gene da TTR de rato, foram cruciais para a compreensão da regulação transcripcional do gene TTR humano [34-36]. A sequência codificante do gene TTR de rato apresenta 82% de homologia com o respectivo gene humano. Relativamente à sequência de aminoácidos que constituem a proteína, a homologia é ainda mais acentuada (91%) [34]. A sequência compreendida entre o nucleótido -50 e o -190 é muito conservada entre o gene humano e o dos roedores [12, 37], insinuando conter bons candidatos para a regulação transcripcional do gene TTR [34].

O estudo da região a montante do gene TTR de rato permitiu identificar duas sequências reguladoras: o promotor proximal, situado entre os nucleótidos -50 e -150, e o *enhancer* distal, -1.86 a -1.96 kilobases (kb) [34, 35]. O promotor contém sítios de ligação para os factores nucleares de hepatócitos 1, 3 e 4 (HNF-1, HNF-3 e HNF-4) e para a proteína de ligação ao *enhancer*/CCAAT (C/EBP) [12, 35]. O *enhancer* contém sítios de ligação para a proteína activadora-1 (AP-1), HNF-4 e C/EBP (figura 3). Essas sequências reguladoras foram detectadas no gene TTR humano por análise comparativa e são suficientes para regular a expressão do gene no fígado [34, 36].

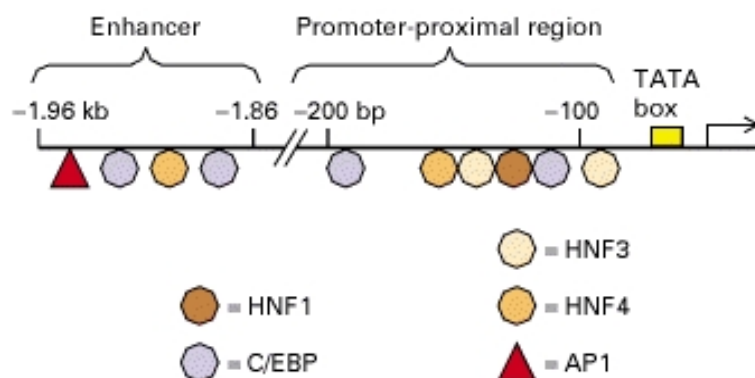


Figura 3 - Representação do *enhancer* distal e do promotor proximal do gene TTR de rato, com destaque para os sítios de ligação dos factores de transcrição que controlam a expressão da TTR nos hepatócitos. Adaptado de [38].

A activação e manutenção da transcrição do gene TTR no fígado requer a combinação de vários factores de transcrição ligados aos sítios de reconhecimento. Resultados de estudos realizados em ratinhos transgénicos, contendo sequências incompletas do gene da TTR humana, sugerem que a transcrição do gene é diferencialmente regulada no fígado e no CP. No cérebro, a transcrição do gene TTR envolve uma sequência adicional localizada a pelo menos 65pb a montante do início da transcrição [36, 39].

Os níveis séricos de TTR estão tipicamente diminuídos em condições de malnutrição, trauma, cirurgia ou inflamação, resultado da inibição da transcrição do gene no fígado [6]. As citocinas libertadas na resposta aguda à inflamação (factor de necrose tumoral α , interleucina 1e 6) induzem a expressão de HNF-3 e C/EBP que podem suprimir a transcrição do gene TTR no fígado. Contudo, no CP a expressão da TTR não é afectada pela resposta inflamatória [40]. A análise dos genes responsivos ao estímulo inflamatório induzido por lipopolisacarídeos (LPS) no CP de rato mostrou que a transcrição do gene TTR não é afectada [41]. Por outro lado, as hormonas 17- β -estradiol (E2) e 5- α -dihidrotestosterona (DHT) induzem a expressão da TTR no fígado de ratos [42]. No CP, a TTR é regulada positivamente pela DHT [43], E2 [44, 45], e progesterona (P) [46], segundo estudos *in vitro* e *in vivo* realizados em ratos. Experiências recentes realizadas pelo nosso grupo de investigação, cujos resultados ainda não foram publicados, sugerem que a hidrocortisona aumenta a expressão da TTR nos CPs de rato. (Martinho et al, 2011, *com pers*) Por outro lado, o stress associado à separação materna reduz a expressão da TTR no cérebro de ratos recém-nascidos [47]. Dados obtidos por Li e seus colaboradores mostram que a nicotina aumenta a expressão e secreção de TTR no CP [48]. A administração de extracto de *Ginkgo biloba* [49], tal como o óleo de peixe rico em ómega-3 [50], induzem a expressão da TTR no cérebro de ratos. Um estudo levado a cabo por Pulford revelou uma redução dos níveis de mRNA de TTR em CPs de ratos tratados com lítio [51].

1.1.6. Funções biológicas

1.1.6.1. Transporte das hormonas da tiróide

No homem, a TTR que circula no plasma é responsável pelo transporte de aproximadamente 15% da T4 total. 70% das hormonas tiroideas circulam ligadas à globulina de ligação à tiroxina e 10% ligam-se à albumina [52]. No CSF humano, a TTR é a principal proteína transportadora das hormonas da tiróide, tal como no CSF e corrente sanguínea dos roedores [53]. O tetrâmero de TTR possui um canal hidrofóbico central com 2 sítios de ligação estruturalmente idênticos para a T4 [54], mas com afinidades diferentes para a hormona. Em condições fisiológicas a TTR liga apenas uma molécula de T4, dada a cooperação negativa da ligação

[55]. Estudos da função da TTR com ratinhos *knockout* (KO) para TTR não revelaram diferenças na concentração das hormonas da tiróide, comparativamente aos ratos *wild-type* (WT). Estes dados sugerem que a TTR não é indispensável para a entrada das hormonas da tiróide no cérebro, nem nos outros tecidos [56, 57].

1.1.6.2. Transporte de retinol

O transporte de retinol (vitamina A) é mediado pela proteína de ligação ao retinol (RBP) que, na corrente sanguínea, se associa à TTR. Apesar do tetrâmero de TTR possuir vários sítios de ligação para a RBP, em condições fisiológicas, a TTR só transporta uma molécula de RBP, provavelmente devido à concentração limitante de RBP ($2\mu\text{M}$) comparando com a de TTR ($4,5\mu\text{M}$) [58]. A formação do complexo retinol-RBP-TTR (80kDa) facilita a liberação da RBP do seu local de síntese (retículo endoplasmático dos hepatócitos) e previne a perda desta proteína de baixo peso molecular (21kDa) durante a filtração glomerular [5, 59].



Figura 4 - Representação do complexo TTR-RBP. O tetrâmero de TTR está ligado a duas moléculas de RBP, representadas na imagem a vermelho. Adaptado de [16].

Tendo em conta a elevada quantidade de TTR que circula livre e demonstrada, *in vitro*, a sua afinidade para pequenas moléculas (benzodiazepinas, salicilatos, fenoxazinas, flavenóides, etc.), é possível que esta proteína desempenhe um papel relevante na remoção de substâncias endógenas e exógenas potencialmente tóxicas [1].

1.1.6.3. Actividade anti-apoptótica

No pâncreas, a TTR protege as células β da apoptose induzida pela apolipoproteína CIII (apoCIII). Esta função é desempenhada apenas pela forma tetramérica da TTR e postula-se que a conversão do tetrâmero no monómero de TTR esteja envolvida na destruição das células β em pacientes com diabetes tipo1 [17, 60].

1.1.6.4. Actividade proteolítica

Uma fracção da TTR plasmática (1-2%) circula associada a lipoproteínas de alta densidade via ligação à apolipoproteína A-I (ApoA-I). Recentemente, foi reconhecida *in vitro* e *in vivo* a capacidade da TTR clivar a ApoA-I no terminal carboxílico, mais precisamente depois do resíduo fenilalanina 225 [61]. A actividade proteolítica da TTR sobre a ApoA-I promove um decréscimo no efluxo de colesterol e aumenta o potencial amiloidogénico da ApoA-I [62].

O neuropéptido Y foi identificado como um dos substratos naturais da TTR. A TTR cliva o neuropéptido Y depois da arginina 33 e 35 o que promove a regeneração axonal dos neurónios [63].

Actualmente sabe-se que a TTR também exerce a sua actividade proteolítica sobre o péptido beta amilóide (A β). A TTR cliva o A β solúvel, contribuindo para a manutenção dos níveis de A β numa taxa normal, e degrada os agregados de A β , desfavorecendo a formação das fibras amilóides, características da doença de Alzheimer (AD) [64, 65].

1.1.7. Transtirretina e Doença de Alzheimer

O primeiro indício do papel da TTR na AD adveio da observação de uma considerável diminuição dos níveis da proteína no CSF de doentes com a patologia [66, 67]. Estudos complementares referem uma correlação negativa dos níveis de TTR no CSF com o grau de demência [68] e com a prevalência de placas senis nos doentes [69]. Estudos recentes confirmam a diminuição de TTR no CSF de doentes com AD [70-72], ainda que outros mostrem resultados ambíguos. A análise de amostras de CSF de doentes em diferentes estadios da doença pode explicar este facto. *In vitro* a TTR sequestra o péptido A β , o principal constituinte das placas senis que ocorrem no cérebro de doentes com AD, prevenindo a formação de agregados amilóides tóxicos [73].

Estudos realizados em animais transgénicos evidenciaram o papel da TTR na modulação dos agregados A β in vivo. Experiências efectuadas em *C.elegans* transgénicos induzidos a expressar os genes A β e TTR humanos mostram uma atenuação da neurodegeneração [74]. Em ratinhos modelo de AD, expostos a um ambiente rico em A β , detectou-se um aumento da expressão de TTR nos CPs, associado à redução da deposição de A β no SNC [75]. Como forma de superar a deposição amilóide, em ratinhos transgénicos modelo de AD, observou-se uma sobreexpressão de TTR, face à superprodução de A β [76]. Choi e seus colaboradores observaram níveis mais elevados de A β e de deposição amilóide no cérebro de ratinhos modelo de AD portadores da deleção do gene TTR (ceAPP^{swe}/PS1 Δ E9/TTR^{+/-}), comparativamente aos controlos (ceAPP^{swe}/PS1 Δ E9/TTR^{+/+}) [77]. A sobreexpressão do gene humano TTR *wild type*, em ratinhos transgénicos APP23 modelos de AD, parece melhorar o fenótipo da doença. Por sua vez, o silenciamento do gene TTR no modelo animal favorece o desenvolvimento da doença. Recorrendo a técnicas bioquímicas, os autores reportam ainda a interacção directa entre a TTR e os agregados A β [78]. Pressupõe-se que a deposição amilóide nos pacientes com AD numa fase inicial se deva à insuficiência de TTR no CSF para sequestrar o excesso de A β [79].

Colectivamente, estes dados evidenciam o contributo da TTR na prevenção da deposição amilóide no cérebro, tornando-a num mecanismo de defesa nativo e um potencial alvo terapêutico para a AD.

1.2. Metalotioneínas

1.2.1. Descoberta e Caracterização Bioquímica da Proteína

Em 1957, Margoshes e Vallee isolaram, do córtex renal de equinos, uma proteína com elevada afinidade para o cádmio. A proteína foi caracterizada bioquimicamente por Kägi e Vallee e recebeu a designação de metalotioneína (MT), dado o seu elevado teor em cisteína e afinidade para os metais pesados [80]. Actualmente, metalotioneína é o nome genérico para uma superfamília de metaloproteínas de baixo peso molecular (6-7 kDa), encontradas no reino animal, em eucariontes e alguns procariontes, e em plantas superiores [81]. Em humanos, a MT foi isolada pela primeira vez do tecido hepático por Pulido e seus colaboradores [82].

1.2.2. Gene

No homem, os genes que codificam as MTs estão agrupados no cromossoma 16, na região q13 [83]. Pelo menos 10 genes MT, dos 17 identificados, são funcionais e codificam as várias isoformas da MT-1 (MT-1A, -B, -E, -F, -G, -H e -X), a MT-2, MT-3 e MT-4 [84]. Um gene conhecido por MT-like 5 (MTL-5) foi descrito no cromossoma 11 e codifica uma MT específica dos testículos, designada por tesmina [85, 86]. Em ratos foram identificados 4 genes no cromossoma 8, que codificam a MT-1, MT-2, MT-3 e MT-4. Comparativamente aos humanos, os genes MT dos roedores são menos complexos, uma vez que possuem um único gene funcional para cada MT. A heterogeneidade das isoformas resulta de modificações pós-tradução, nomeadamente acetilações, e na composição em iões metálicos [87]. O rato também possui o gene MTL-5, localizado no cromossoma 19B [85, 88, 89].

1.2.3. Estrutura da Proteína

As MTs que ocorrem nos mamíferos (MT-1, MT-2, MT-3 e MT-4) são proteínas não enzimáticas de baixo peso molecular, compostas por uma única cadeia polipeptídica de 61 a 68 aminoácidos, dos quais aproximadamente 30% são cisteínas [80]. A análise da sequência de aminoácidos das MTs revela ainda a ausência de aminoácidos aromáticos e um baixo teor ou mesmo ausência de histidinas [81]. Estas metaloproteínas têm tipicamente um ou dois domínios onde se ligam múltiplos iões metálicos mono ou divalentes [80]. *In vivo*, as MTs ligam Zn(II), Cu(II), Cd(II) e Hg(II). Outros metais como Ag(I), Au(I), Bi(III), Co(II), Fe(II), Pb(II), Pt(II) e Tc(IV) são capazes de se ligar à apotioneína (proteína na sua forma livre de metais) *in vitro*. Em condições fisiológicas normais, as MTs dos mamíferos contêm zinco [86, 90].

A pH neutro a MT-1 e MT-2 diferem apenas numa carga negativa e são muitas vezes referidas colectivamente como MT-1/2 uma vez que, no contexto do SNC, partilham propriedades e funções que contrastam com as da MT-3 [91]. A MT-1/2 consiste numa cadeia polipeptídica de 61 e 62 aminoácidos, arranjados em sequências repetitivas de Cys-X-Cys, Cys-X-Cys-Cys, Cys-X-X-Cys, onde X corresponde a um aminoácido que não a cisteína [90]. A proteína possui 2 domínios globulares (domínio α e β) separados por uma pequena sequência polipeptídica rica em lisinas [92]. O domínio α na extremidade carboxilica (resíduo 32 ao 61) contém 11 cisteínas onde a proteína incorpora 4 catiões divalentes ou 6 monovalentes. Por sua vez, o domínio β na extremidade amina (resíduo 1 ao 31) contém 9 cisteínas onde se ligam 3 catiões divalentes ou 6 monovalentes. A ligação dos metais à apotioneína promove o enrolamento da cadeia polipeptídica (figura 5 e 6) [93].

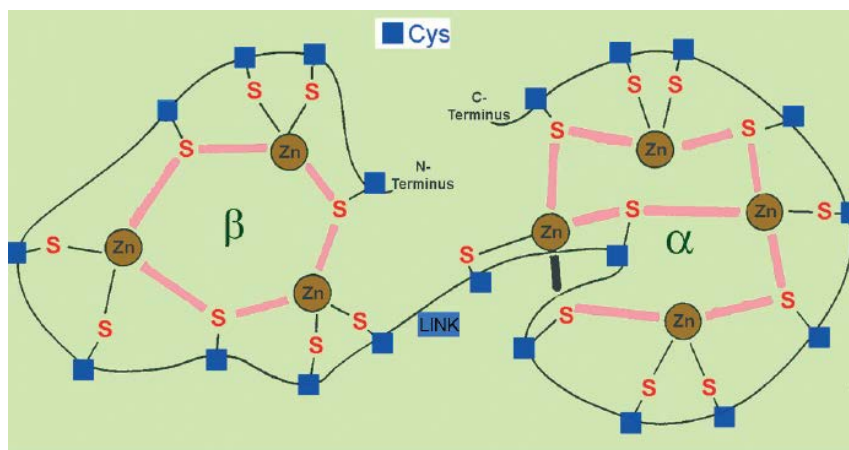


Figura 5 - Esquema representativo da MT-2. O esquema ilustra a cadeia polipeptídica da MT-2, com destaque para os resíduos de cisteína (quadrados azuis). O polipeptídeo incorpora 7catiões Zn no domínio α e β , por pontes dissulfeto. Adaptado de [86].

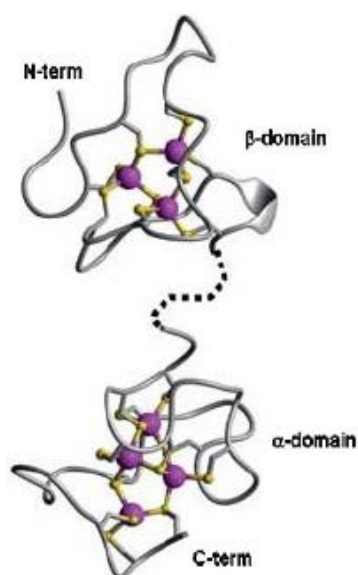


Figura 6 - Estrutura tridimensional da MT-2 de rato ligada a 7 iões metálicos. Os metais, ligados à cadeia polipeptídica por pontes dissulfeto, estão representados por esferas. Adaptado de [94].

A MT-3 é estruturalmente muito semelhante à MT-1/2. Esta isoforma de 68 aminoácidos apresenta uma Thr na região do terminal amina e um hexapéptido ácido na região C-terminal. A MT-3 possui sequências altamente conservadas de Cys(6)-Pro-Cys-Pro(9) que estão ausentes em todos os outros membros da família MT [92].

1.2.4. Expressão e Distribuição Celular

Os genes MT-1 e MT-2 são expressos em praticamente todos os tecidos, já a expressão de MT-3 e de MT-4 é mais restrita. A MT-3 é predominantemente expressa no cérebro, porém foram detectados níveis baixos de proteína na língua, estômago, coração, rim e tecidos reprodutivos [95-97]. Relativamente à MT-4, sabe-se que é expressa em alguns epitélios estratificados e no decídua materno [84, 98].

A presença de MT-1/2 no parênquima cerebral foi confirmada por imunohistoquímica em diversas espécies [99]. A expressão desta proteína é mais relevante nos astrócitos, contudo a sua presença também foi detectada nas células ependimais, pia mater, epitélio vascular e CPs [100, 101]. Microglia, oligodendrócitos e células endoteliais são praticamente desprovidos de MT-1/2 [100]. Alguns estudos apontam para a presença de MT-1/2 imunoreactiva nalgumas populações de neurónios mas esses dados são controversos [99, 102].

As MTs são proteínas intra e extracelulares [103] e dados experimentais mostram que exibem funções análogas dentro e fora da célula [86]. Os astrócitos podem libertar MT-1/2 para o CSF e espaço extracelular como forma de proteger os neurónios adjacentes [104]. Dentro da célula, a MT-1/2 está dispersa pelo citoplasma, mitocôndrias e lisossomas. Dado o seu baixo peso molecular, a proteína consegue difundir-se para o núcleo em resposta ao stress oxidativo [105, 106]. Apesar do processo de degradação das MTs ainda não estar bem esclarecido, sabe-se que a proteína é degradada rapidamente no lisossoma e a nível citosólico, por intermédio do complexo 26S. A apotioneína é mais susceptível à proteólise e a incorporação de metais parece regular a degradação lisossomal da proteína [107].

1.2.5. Regulação do gene

Os genes MT-1 e MT-2 são expressos coordenadamente e respondem em paralelo a uma variedade de estímulos [108]. O estado nutricional e a actividade física regulam a expressão de MT-1/2, afectando os níveis de mRNA e de proteína [81, 109]. Alguns metais, como Zn, Cu, Cd e Hg, promovem a transcrição do gene MT-1/2 e este processo é mediado pelo factor de transcrição MTF-1, que se liga aos elementos responsivos a metais (MREs), na região promotora do gene (ver figura 7) [109-113]. Perante um défice de Zn, o inibidor da transcrição de MT interage com o MTF-1 e impede a ligação desta proteína de zinco com os MREs, controlando negativamente a expressão de MT [109]. O tratamento de ratos adultos com Cu parece reduzir o mRNA de MT-1/2 a nível renal, sendo acompanhado por um aumento significativo da proteína, sugerindo uma regulação pós-transcricional [114]. Nas células humanas, a proteína PZ120 inibe a expressão do gene MT-2A por ligação ao sítio de início da

transcrição [115]. A biosíntese de MT-1/2 é estimulada por hormonas glucocorticóides, testosterona, estrona [116], e por catecolaminas (noradrenalina e isoproterenol) [109, 117]. As hormonas glucocorticóides, libertadas em situações de stress, podem ser o elemento chave para o aumento da expressão das MTs no fígado, coração e cérebro em resposta ao stress (ver figura 7) [118]. Valendo-se de estudos efectuados em ratinhos transgénicos com superprodução e com défice de citocinas pró-inflamatórias, Carrasco e seus colaboradores verificaram o aumento da expressão da MT-1/2 no cérebro, induzida pela IL-6, IL-3, TNF- α e INF- α [119]. As espécies reactivas de oxigénio (ROS) e o stress oxidativo também regulam positivamente a transcrição do gene MT-1/2 e este mecanismo envolve a interacção de factores de transcrição com os elementos responsivos a antioxidantes (AREs) no promotor do gene (ver figura 7) [110]. Os factores de transcrição Fos e Fra-1 podem inibir a síntese de MT-1/2 por ligação aos AREs [109]. Os níveis de MT-1/2 estão aumentados em doenças neuroinflamatórias, como é o caso da AD [120]. Curiosamente, a expressão de MT-3 não sofre alterações significativas [121] ou encontra-se diminuída em cérebros com AD [122].

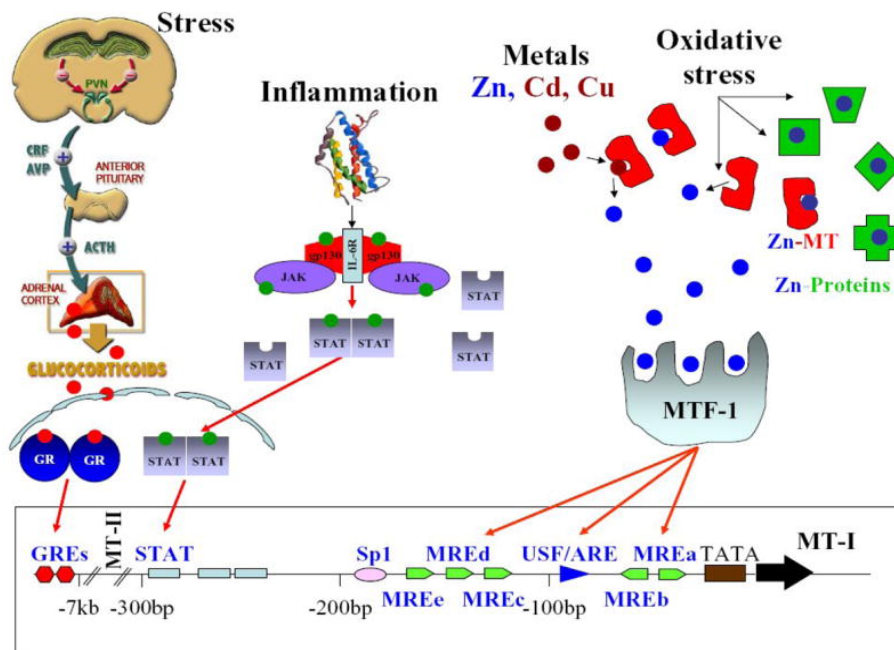


Figura 7- Regulação da expressão do gene MT-1/2. O esquema ilustra a regulação da transcrição do gene MT-1/2 por stress, inflamação, metais e stress oxidativo. Os íões metálicos e as espécies reactivas de oxigénio (ROS) activam o factor de transcrição MTF-1 que interage com os elementos responsivos a metais (MREs) e os elementos responsivos a antioxidantes (AREs), no promotor do gene MT-1/2. As citocinas pró-inflamatórias activam uma cascata de proteínas, levando à activação do factor de transcrição STAT e à transcrição do gene. As hormonas glucocorticóides, libertadas em situações de stress, difundem-se até ao núcleo e ligam-se aos respectivos receptores. O complexo hormona-receptor funciona como factor de transcrição e interage com os elementos responsivos a glucocorticóides (GREs), promovendo a transcrição do gene MT-1/2. Adaptado de [123].

1.2.6. Funções Biológicas

1.2.6.1. Homeostase dos metais

Uma das funções biológicas atribuída à MT-1/2 é o seu papel na homeostase dos metais essenciais, em particular do Zn e Cu, e a protecção contra metais pesados [124-126]. Enquanto proteína dadora e receptora de iões, a MT-1/2 consegue controlar a activação de proteínas dependentes de Zn e Cu, enzimas e factores de transcrição, e regular os níveis dos iões metálicos em resposta à dieta e a alterações fisiológicas. Esta MT pode ainda funcionar como reservatório de metais, cedendo-os às apometaloproteínas (enzimas, factores de transcrição, etc.) quando necessário [124].

Estudos desenvolvidos em células e ratinhos transgénicos mostram o papel protector da MT-1/2 na toxicidade por metais pesados [81]. Assim, astrócitos com défice em MT-1/2 apresentavam maior susceptibilidade ao metilmercúrio, comparativamente aos astrócitos com expressão normal da proteína. A transfecção do gene MT-1 nos astrócitos deficientes em MT-1/2 conferiu-lhes resistência ao metal pesado [125]. Recorrendo a ratos transgénicos com superprodução de MT-1, foi demonstrado que a MT-1 protege as células da toxicidade e da morte induzida pelo Cd. Por sua vez, ratos KO para MT-1/2 são mais sensíveis à toxicidade do metal [105].

1.2.6.2. Imunomodulação

A MT-1/2 é uma proteína imunomoduladora, na medida em que reduz significativamente a activação e o recrutamento de macrófagos e linfócitos T, numa situação de dano cerebral. Também interfere na activação da microglia e das células B, embora a inibição seja mais pronunciada nos macrófagos e linfócitos T CD4+. A MT-1/2 inibe a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β , IL-6, IL-12 e TNF- α , reprimindo a resposta inflamatória dos linfócitos [86, 127].

1.2.6.3. Protecção contra stress oxidativo

Dados de diversos estudos permitiram atribuir à MT-1/2 um papel crucial na captura de espécies reactivas de oxigénio e na prevenção da neurodegeneração e apoptose. Estudos *in vivo*, realizados em ratinhos com défice em MT-1/2 mostram um aumento da produção de ROS e do stress oxidativo, desde peroxidação lipídica, nitrosilação proteica à oxidação do DNA, comparando com os controlos WT. Adicionalmente, ratinhos KO para a MT exibiam um

aumento da neurodegeneração e da apoptose, relativamente aos controlos WT [128]. Células com sobreexpressão de MT-1 revelam protecção contra o stress oxidativo, enquanto as células derivadas de ratinhos KO para a MT-1/2 apresentam maior sensibilidade. O papel antioxidante e neuroprotector da MT-1/2 é de tal ordem que, em ratinhos KO para a MT, mesmo com o aumento da expressão de outras proteínas antioxidantes, verifica-se o aumento de ROS [86]. A administração de MT-1/2 exógena em ratinhos modelo de neuroinflamação promove uma atenuação dos danos cerebrais, resultado da diminuição de ROS e do stress oxidativo [103]. Colectivamente, estes dados sugerem que *in vivo* a MT-1/2 é um antioxidante relevante e o aumento dos níveis da proteína em doenças neurodegenerativas pode tornar-se numa promissora estratégia terapêutica.

1.2.7. Metalotioneína-1/ 2 e Doença de Alzheimer

A AD é uma doença neurodegenerativa associada a sinais de inflamação, stress oxidativo e deposição de agregados AB. Além disso, o número de células que expressam factores apoptóticos aumentam significativamente na doença. Posto isto, é natural que uma proteína neuroprotectora como a MT-1/2 esteja implicada na patogénese da doença. A ligação da biologia das MTs à AD estreou-se com os estudos de Duguid e seus colaboradores que detectaram um aumento do mRNA de MT-1/2 no hipocampo de cérebros com a patologia [129]. Em estudos mais recentes, foram encontrados níveis drasticamente elevados de MT-1/2 nas células adjacentes aos agregados AB, astrocitose, microgliose e sinais de stress oxidativo em cérebros com AD e em modelos animais de neuroinflamação [120].). Estudos em culturas celulares mostram que a expressão de MT-1/2 é directamente induzida pelos neurónios lesados adjacentes, insinuando que o aumento da MT-1/2 é secundário à neurodegeneração [104]. Por sua vez, estudos realizados em ratinhos transgénicos com sobre ou subexpressão de MT-1/2 e em ratinhos com ablação dos genes MT-1/2 indicam que a MT-1/2 está directamente envolvida no desenvolvimento da AD [92].

Adicionalmente, sabe-se que os iões Zn e Cu interferem na agregação de péptidos AB. A MT-1/2 regula os níveis de Zn e está envolvida na distribuição celular do metal, de tal modo que a distribuição de Zn coincide com a distribuição celular de MT-1/2 [92]. O péptido precursor amilóide (APP) é clivado por α -secretases, que não são mais do que metaloproteases dependentes de Zn, formando péptidos AB solúveis. Os péptidos AB ligam-se a catiões Zn e tornam-se compostos insolúveis, favorecendo a sua agregação e a formação das placas senis características da AD [130]. A isoforma MT-2A também previne a agregação AB mediada por Cu, aparentemente por troca dos metais entre a Zn⁷MT-2A e o Cu²⁺-AB [131].

1.3. Estrogénios

1.3.1. As Hormonas

Os estrogénios Os estrogénios constituem um grupo de hormonas sexuais onde se inclui a estrona, o estriol e o estradiol (figura 8), sendo o estradiol o estrogénio mais relevante. A síntese destas hormonas ocorre predominantemente nos ovários, a partir do colesterol. O papel biológico destas hormonas esteróides passa pela diferenciação sexual e desenvolvimento reprodutivo mas também pela neuroprotecção [132].

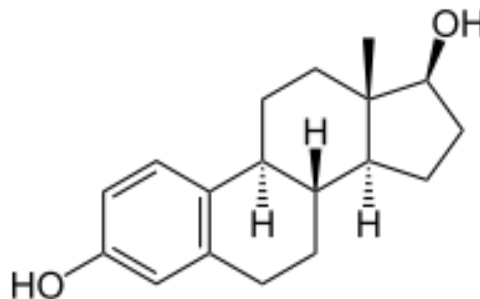


Figura 8 - Estrutura do 17-β-estradiol.

1.3.2. Síntese, Transporte e Excreção

Nas mulheres, o estradiol é maioritariamente sintetizado nos ovários, pela aromatização da androstenediona em estrona, sendo esta convertida em estradiol pela 17-β-hidroxiesteróide desidrogenase. Pequenas quantidades de estradiol são produzidas no córtex adrenal, testículos, artérias e cérebro. No cérebro, o colesterol é transformado em pregnenolona, ao nível da membrana interna da mitocôndria, pela enzima P450_{scc}. A pregnenolona pode ser convertida em progesterona ou em dehidroepiandrosterona, no retículo endoplasmático. A formação de androstenediona, a partir da dehidroepiandrosterona, permite a síntese de testosterona por acção da 17-β-hidroxiesteróide desidrogenase. Uma parte da testosterona é convertida em estradiol pela P450 aromatase [133].

A expressão das enzimas envolvidas na síntese do estradiol nas células cerebrais determina a produção da hormona, que ocorre sobretudo a nível neuronal. Oligodendrócitos exibem elevada actividade da P450_{scc}, já nos neurónios e astrócitos a actividade da enzima é mais

discreta. A P450 aromatase é expressa quer nos astrócitos, quer nos neurónios mas, em condições normais, a aromatização da testosterona é mais relevante nos neurónios [134].

Dado o seu carácter lipofílico, o estradiol circula nos fluídos corporais ligado a proteínas plasmáticas (globulina de ligação a hormonas sexuais e albumina). A fracção de hormona livre é biologicamente activa e atravessa as membranas celulares, actuando através de receptores intracelulares. Os complexos hormona-receptor actuam como factores de transcrição, ligando-se a sequências específicas no DNA, e induzem a expressão de proteínas que determinam os seus efeitos.

A desactivação do estradiol envolve a sua conversão em estrona e estriol, sendo este último composto excretado por via urinária. No fígado, o estradiol é conjugado com o ácido glucurónico, formando-se um composto hidrosolúvel excretado pelos rins [132].

1.3.3. Estrogénios e a Doença de Alzheimer

Nos últimos anos, um crescente número de estudos evidencia o papel neuroprotector dos estrogénios e os seus efeitos benéficos nas doenças neurodegenerativas, em especial na AD. O mecanismo pelo qual os estrogénios protegem o cérebro na AD ainda não está totalmente esclarecido, mas estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram que promove a viabilidade neuronal e a degradação do AB pelas células da microglia. Além disso, regula os níveis de AB e de proteínas que interferem na agregação amilóide.

Estudos epidemiológicos e evidências clínicas mostram que a depleção de hormonas sexuais na menopausa aumenta o risco de AD, em mulheres pós-menopausa. O tratamento de reposição hormonal em mulheres com menopausa parece reduzir o risco de desenvolverem AD [135], se bem que a administração de estrogénios em doentes com a patologia parece não ter qualquer efeito [136]. Apesar das evidências experimentais que sugerem que os estrogénios reduzem o risco de AD, de acordo com o *Women's Health Initiative Memory Study*, têm-se verificado um aumento da incidência de demência em mulheres sujeitas a terapêutica hormonal pós-menopausa [137]. Os défices de E2 no cérebro estão associados a um aumento na produção e deposição de AB, em modelos animais de AD [138]. Por sua vez, a ovariectomia prolongada promove um aumento significativo de deposição amilóide no cérebro de ratos [139]. Os estrogénios protegem os neurónios da toxicidade mediada pelo AB, o primeiro sinal de neurodegeneração na AD. Os estrogénios inibem a apoptose neuronal induzida por AB, em parte pelo aumento da expressão de proteínas anti-apoptóticas e pela diminuição de proteínas pró-apoptóticas [140]. Relativamente à regulação dos níveis de AB, os estrogénios promovem, por um lado, a degradação do APP pela via não amiloidogénica, estimulando as α -secretases [141] e, por outro, a fagocitose da substância amilóide pelas células da microglia

[142]. Estas hormonas sexuais estão ainda implicadas na regulação de proteínas envolvidas na remoção de A β . Num estudo realizado em mulheres sujeitas a terapia com estrogénios, observou-se uma diminuição dos níveis séricos de apo-E, um conhecido factor de agregação amilóide [143]. Os estrogénios também regulam a expressão da enzima que degrada a insulina e da neprilisina, ambas envolvidas na remoção de A β e na patogénese da AD [140]. Para além disso, experiências *in vitro* e *in vivo* realizadas pelo nosso grupo de investigação mostram que o E2 aumenta a expressão da TTR nos CPs de rato [42, 44] sendo que, esta proteína intervém na captação de A β e portanto poderá prevenir a deposição amilóide [73].

1.4. Estradiol, Transtirretina, Metalotioneína-1/2 e Doença de Alzheimer

Da revisão da literatura, ficou claro o contributo do estradiol, bem como da TTR, na protecção contra a AD. Dada a existência de elementos responsivos para os estrogénios no promotor do gene TTR e a identificação de locais de ligação para os receptores de estrogénios, depreende-se que esta hormona sexual regule a expressão da TTR. De facto, estudos realizados *in vivo* [42] e em culturas primárias de células epiteliais do CP de rato [42, 44], mostram que o E2 regula positivamente a expressão de TTR, dando ênfase ao papel neuroprotector da hormona.

Relativamente às MTs, o aumento da expressão de MT-1/2 e a diminuição de MT-3 em doenças neuroinflamatórias, como é o caso da doença de Alzheimer, tem suscitado um interesse crescente no impacto destas proteínas no cérebro. O reconhecimento do papel da MT-1/2 na captação de espécies reactivas de oxigénio, na viabilidade neuronal e no controlo de iões metálicos envolvidos na agregação amilóide, tem reforçado o interesse da proteína na neurodegeneração e neuroprotecção. Contudo, dados recentes indiciam que a MT-1/2 pode comprometer a remoção de A β . Resultados obtidos pelo nosso grupo de investigação mostraram a ocorrência de uma interacção entre a TTR e a MT-1/2 *in vitro* e *in vivo*. Os complexos TTR-MT-1/2 foram detectados no fígado humano e no rim e CP de ratos. Estes complexos podem ser funcionalmente significantes em condições normais mas também na AD, intervindo na remoção/deposição de A β . Tendo em conta que a MT-2 diminui a ligação da TTR ao A β , o aumento dos níveis de MT-1/2 pode comprometer a remoção de A β pela TTR. [144]. Por outro lado, a TTR interage com a MT-3 e essa interacção parece fomentar a ligação da TTR ao A β [145]. Posto isto, é de todo o interesse avaliar o efeito do E2 na regulação da expressão das MTs nos CPs.

2. Objetivos

Com este trabalho pretende-se avaliar o efeito do 17- β -estradiol (E2) na expressão da transtirretina (TTR) numa linha de células epiteliais de plexo coroideu de rato (RCP), tendo por objectivo verificar se a resposta da linha RCP ao estímulo com a hormona esteróide é concordante com resultados obtidos em culturas primárias de plexo coroideu de rato e *in vivo*.

Dado o papel neuroprotector do E2 e reconhecido o seu efeito *in vitro* e *in vivo* na expressão da TTR, é de todo o interesse ver o efeito desta hormona na regulação da expressão da MT-1/2 nos plexos coroideus, dada a sua relação com a TTR. Este estudo será efectuado na linha celular RCP.

É ainda objectivo deste trabalho optimizar as condições de transfecção na linha celular RCP com Lipofectamine 2000™ e numa linha de células embrionárias de rim humano (HEK 293) pelo método do cloreto de cálcio.

3. Material e Métodos

3.1. Cultura de linhas celulares

3.1.1. Linha celular RCP

A linha comercial RCP - *rat choroid plexus* - (Health Protection Agency, França) foi estabelecida a partir de culturas primárias de células de plexo coroídeo, dissecadas do quarto ventrículo cerebral, de ratos *Wistar* adultos. A cultura primária foi imortalizada por transfecção com o adenovírus *TSori minus*. Das células imortalizadas foram seleccionados os clones que libertavam iões cálcio em resposta aos estímulos da vasopresina, angiotensina, bradiquinina, serotonina ou endotelina. O sub-clone que exibia uma melhor resposta às cinco hormonas foi seleccionado e expandido em cultura, constituindo-se assim a linha celular RCP.

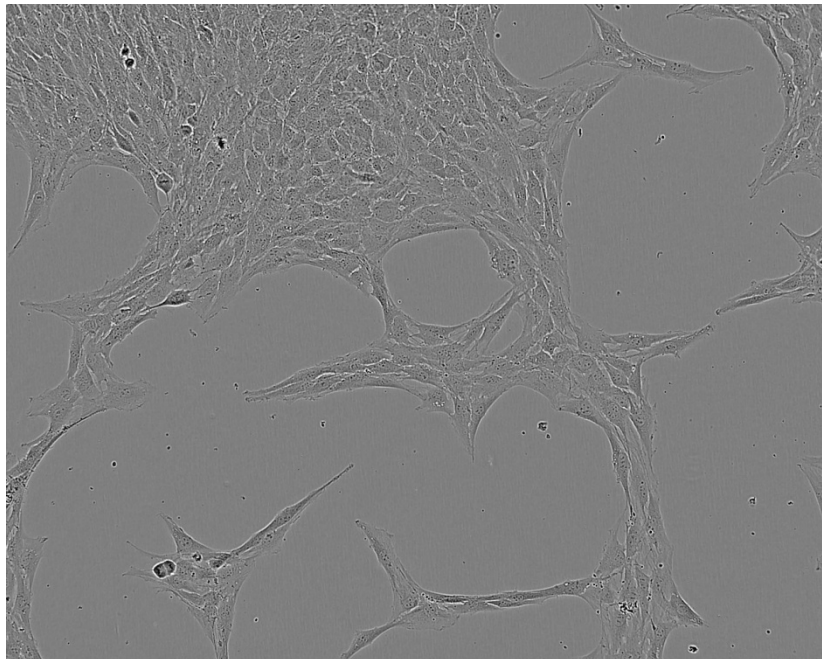


Figura 9 - Células RCP observadas ao microscópio óptico numa ampliação de 100x.

3.1.2. Linha HEK 293

A linha celular HEK 293 - *human embryonic kidney* - (Health Protection Agency, França) foi constituída a partir de células embrionárias de rim humano, transformadas com DNA do adenovírus 5. Com a transformação conseguiu-se inserir um fragmento de aproximadamente 4,5kb do genoma viral no cromossoma 19 humano. Estas células epiteliais são muito usadas para estudos de biologia molecular, dada a facilidade de transfecção.

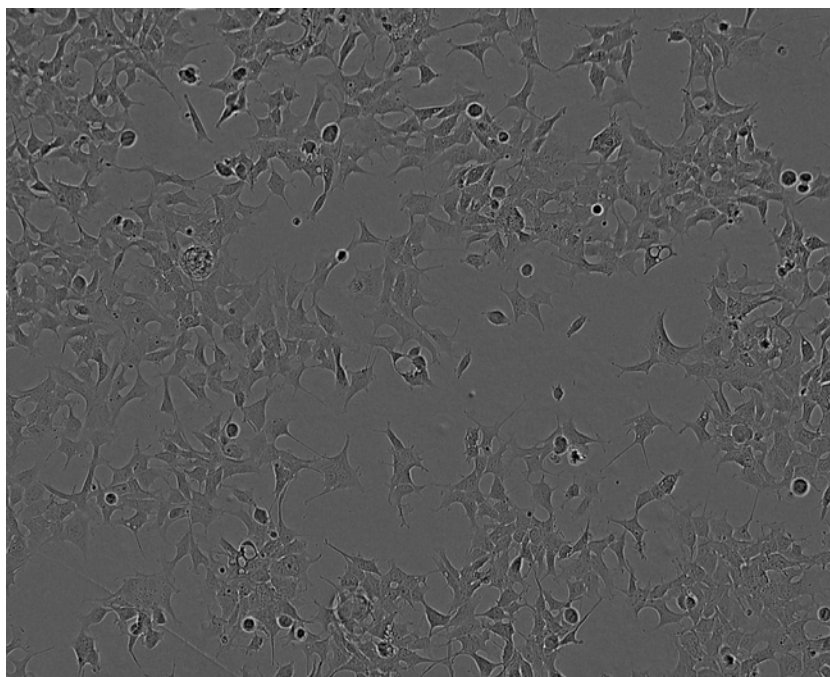


Figura 10 - Células HEK 293 observadas ao microscópio óptico numa ampliação de 100x.

3.1.3. Descongelamento e Contagem de células viáveis

Para proceder à cultura da linha celular, descongelou-se a 37°C uma alíquota de células criopreservadas em azoto líquido. As células foram ressuspensas em meio *Dulbeccos's Modified Eagle Medium* (DMEM, Sigma-Aldrich) com 10% de soro fetal bovino (FBS, Biochrom) e 1% de penicilina-estreptomicina (PS, Sigma-Aldrich). Após centrifugação a 1300 rotações por minuto (rpm) durante 5 min, aspirou-se o sobrenadante e ressuspenderam-se as células em 1 mL de meio de cultura. Retiraram-se 10µL da suspensão celular e colocaram-se as restantes na estufa a 37 °C, para minimizar perda de células viáveis. Aos 10µL de células juntou-se igual volume de azul de tripano e a mistura foi colocada numa câmara de *Neubauer* para contar as células viáveis. Após a contagem de células foi estimado o número de células viáveis por mL com base nas seguintes fórmulas:

Nº células total = média do nº de células x 10^4 x 2 x volume de suspensão de células

Nº células por mL = Nº de células total / volume de suspensão de células

Tendo em conta que se devem semear $1-3 \times 10^5$ células por cm^2 , retirou-se o volume correspondente ao número de células indicado à área do frasco de cultura e juntou-se meio de cultura suficiente para a manutenção e proliferação celular. As células foram mantidas numa estufa a 37 °C com 5% CO_2 e atmosfera húmida.

3.1.4. Passagem

O processo de passagem de células realiza-se quando a sua confluência atinge valores próximos de 100%. Com este processo pretende-se diminuir a densidade celular de forma a assegurar uma contínua expansão da linha celular. No caso das RCP e das HEK 293, como aderem ao frasco de cultura, necessitam de ser tripsinizadas. Aspirou-se o meio de cultura e lavaram-se as células com PBS1x (tampão fosfato salino pH 7,4), fazendo-o circular suavemente sobre estas. Aspirou-se o PBS e adicionou-se tripsina-EDTA 0,25% num volume suficiente para cobrir as células, deixando-a actuar durante 3 a 5 min. Quando as células se encontram em solução, adiciona-se DMEM com 10%FBS, num volume igual ao de tripsina, para neutralizar a acção da enzima. Recolheu-se a suspensão para um tubo de 50 mL e centrifugou-se 5 min a 1300 rpm. De seguida, aspirou-se o sobrenadante, e ressuspendeu-se o *pellet* de células em 5 mL de PBS1x. Efectuou-se mais uma lavagem com PBS1x para remover a tripsina. Ressuspendeu-se o *pellet* num mL de meio de cultura e procedeu-se à contagem do número de células.

O número de células colocado varia consoante a área do frasco de crescimento celular, assim, para frascos de cultura de 25cm² semeiam-se 10⁶ células, 3x10⁶ células para frascos de 75 cm² e 6x10⁶ células para frascos de 175 cm². Em placas de 6 poços aconselha-se a cultura de 1.5x10⁵ células e 5x10⁴ células para as de 12 poços.

3.1.5. Congelamento

O processo de congelamento de células foi efectuado nas passagens iniciais, de modo a assegurar a eternização da linha celular. Para tal, procedeu-se à tripsinização e contagem de células viáveis como descrito anteriormente. As células foram diluídas em meio de cultura de modo a ter 1x10⁶ células por mL e adicionou-se 10% de DMSO (dimetilsulfóxido). O DMSO previne a formação de cristais de água capazes de lisar as células mas é tóxico para estas, pelo que é importante remover o DMSO ao descongelar as células. Numa primeira fase, as alíquotas de células foram mantidas a -20°C durante 3 a 4h passando depois 48h a -80°C. Seguiu-se o armazenamento das células em azoto líquido

3.2. Estudo do efeito do 17- β -estradiol na viabilidade celular -

Ensaio do MTT

Antes de estimular a linha celular RCP com E2 para estudar o seu efeito na expressão da transtirretina e da metalotioneína, efectuou-se o teste do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio bromido, Sigma-Aldrich) para avaliar o efeito da hormona na viabilidade celular. O MTT é absorvido pelas células e reduzido a formazano por acção da succinato desidrogenase mitocondrial, uma enzima activa apenas nas células com metabolismo e cadeia respiratória intactos. As células são lisadas para extrair os cristais púrpura de formazano que são dissolvidos em isopropanol acidificado. A absorvância da solução resultante é lida a 570nm e é directamente proporcional ao número de células viáveis.

Semearam-se aproximadamente 3×10^3 células em placas de 96 poços em DMEM com 10%FBS e 1%PS. 8h antes de submeter as células ao efeito da hormona foi-lhes retirado o meio com soro e substituído por DMEM com 1%PS. As células foram estimuladas com E2 a 100 e 1000nM em DMEM 1%PS durante 6, 12, 24 e 36 horas. O E2 (Sigma-Aldrich) foi reconstituído em etanol absoluto numa solução stock de 1mM preservada a 4°C. Terminado o tempo de estímulo, retirou-se o meio de cultura e adicionaram-se 150 μ l de solução de MTT (0,5mg/mL preparado em Tampão Krebs) e deixou-se a incubar 1h a 37°C. A solução de MTT foi removida e as células foram lisadas com 100 μ l de HCl 0,04 M preparado em isopropanol. A placa foi colocada no agitador durante 30 min para facilitar a dissolução dos cristais e sempre protegida da luz. Seguiu-se a leitura da densidade óptica num leitor de microplacas (Anthos 2020, Biochrom) usando o filtro de 570 nm. Realizaram-se 3 experiências independentes e para cada condição foram efectuados hexaplicados.

3.3. Estímulo hormonal da linha celular RCP com E2

O meio DMEM com 10% FBS, 1% PS foi substituído por meio sem FBS 8h antes de proceder ao estímulo das células. Estimularam-se as células com várias concentrações de E2, 0, 1, 10, 100 e 1000 nM em DMEM com 1% PS e incubaram-se durante 6h, 12h, 24h e 36h. Seguidamente recolheu-se o extracto celular de cada uma das condições para posterior análise por Western blotting.

Para cada condição foram efectuados triplicados e foram recolhidos dados de 3 experiências independentes.

3.4. Extracção e Quantificação da proteína total

Para comparar os níveis de expressão proteica entre células não tratadas e células estimuladas com E2, extraiu-se a proteína total e submetem-se as amostras à técnica de Western blot.

Findo o período de estímulo, lavaram-se e recolheram-se as células com PBS1x frio. Centrifugaram-se as células 30 min a 12000rpm a 4°C e descartou-se o sobrenadante. Os extractos proteicos foram obtidos por homogeneização e lise das células em 50µl de tampão de lise composto por 25 mM Tris, 2,5 mM EDTA (ácido etilenodiamino tetra acético), 2,5mM EGTA (ácido etilenoglicol tetra acético), 1% Triton X-100, 1mM DTT (ditiotreitól), 1mM PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonilo) e 25µM de leupeptina.

A concentração de proteína total foi determinada pelo método de Bradford, usando uma recta de calibração calculada com base na absorvância dos padrões de albumina sérica bovina (BSA, Sigma-Aldrich) (ver tabela 1). O ensaio de Bradford baseia-se na mudança de absorvância do corante Azul Brillhante Coomassie que, em condições ácidas, se liga aos resíduos positivos das proteínas passando à sua forma aniónica. A 595nm a forma aniónica do corante tem absorvância máxima, sendo esta proporcional à quantidade de proteína presente na amostra.

Tabela 1- Reagentes e respectivos volumes para a quantificação de proteína total em placa de 96 poços, pelo método de Bradford.

	Concentração (µg/µL)	Volume de Padrão/Amostra (µL)	Água (µL)	Meio de lise (µL)	<i>Protein assay reagent (BioRad)</i> (µL)
	0,2	2µL de BSA 0,01µg/µL	157	1	40
	0,4	4µL de BSA 0,01µg/µL	155	1	40
	1	1µL de BSA 0,1µg/µL	158	1	40
Padrões de BSA	2	2µL de BSA 0,1µg/µL	157	1	40
	4	4µL de BSA 0,1µg/µL	155	1	40
	8	8µL de BSA 0,1µg/µL	151	1	40
	10	10µL de BSA 0,1µg/µL	149	1	40
Amostra	?	1 µL	159	-	40

3.5. *Western blot*

A técnica de *Western blot* é utilizada na detecção e/ou quantificação relativa de proteínas a partir de extractos de proteína total. Esta técnica baseia-se numa electroforese em gel de poliacrilamida para separar proteínas, previamente desnaturadas, segundo o seu tamanho. Depois, sob a acção da corrente eléctrica, as proteínas são transferidas do gel para uma membrana, normalmente de polivinildieno difluorido (PVDF) ou de nitrocelulose. A membrana é incubada com o anticorpo específico para a proteína de interesse, de forma a detectar a sua presença. Para que o anticorpo tenha acesso ao epítopo, que pode não estar acessível na conformação tridimensional da proteína, é necessário desnaturar as proteínas. As amostras são tratadas com tampão de redução e sujeitas a 100°C durante 10 minutos para desnaturar as proteínas. O tampão de redução contém dodecilsulfato de sódio (SDS), um detergente aniónico, que se liga às proteínas conferindo-lhes carga negativa, e β-mercaptoetanol ou ureia, para reduzir as pontes dissulfeto. Para além dos agentes desnaturantes possui glicerol ou sacarose, para conferir densidade à amostra, e azul de bromofenol, para facilitar a visualização da migração das proteínas no decorrer da electroforese. Paralelamente às amostras, corre-se um marcador de pesos moleculares com proteínas de peso molecular conhecido (Kaleidoscope Prestained Standards, BioRad) (ver anexo). Uma vez transferidas as proteínas, a membrana é bloqueada com uma solução de leite magro para impedir ligações inespecíficas do anticorpo primário e/ou secundário. Segue-se a incubação com o anticorpo primário que possui especificidade para a proteína de interesse. É importante lavar a membrana com tampão Tris para remover o anticorpo primário ligado inespecificamente. O anticorpo secundário, que reconhece o primário usado, está conjugado à fosfatase alcalina. Esta enzima converte o substrato ECF num produto que emite fluorescência, quando excitado por uma fonte de luz adequada. A fluorescência da banda é directamente proporcional à quantidade de proteína presente na amostra. A imagem é de seguida analisada por densitometria, permitindo quantificar a proteína presente.

3.5.1. Protocolo *Western blot* TTR

Num microtubo de 1,5mL, juntou-se o volume de amostra equivalente a 30 µg de proteína total e tampão de redução 2x (4% SDS, 6% β-mercaptoetanol, 40% sacarose, 0,02% azul bromofenol em Tris-HCl 0,125M pH 6,8), de modo a ficar numa concentração de 1x. Os extractos proteicos, previamente desnaturados a 100°C durante 5min, foram separados em gel desnaturante com 12% de acrilamida a 100-120 V. As proteínas foram transferidas para membranas de PVDF 0,45µm de poro (Amersham) previamente activadas em metanol e equilibradas na solução de electrotransferência constituída por 10 mM CAPS (ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propanosulfónico), 10% metanol, pH 11, e cortadas numa zona intermédia à localização das duas proteínas de interesse (aproximadamente a meio da membrana). A

electrotransferência foi efectuada a 750 mA durante 10 min para a TTR e 30 min para a β -actina. As membranas foram bloqueadas com 5% de leite magro em TBS-T (0,1% Tween 20 em 20 mM Tris e 137 mM NaCl pH7,4) durante 1 h à temperatura ambiente. Findo esse período, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário *rabbit* anti-*human* TTR (1:300, Dakocytomation) ou *mouse* anti- β -actina (1:5000, Sigma-Aldrich), diluídos em TBS-T, durante 1 h à temperatura ambiente ou *overnight* a 4°C e com agitação lenta constante. Efectuaram-se 3 lavagens de 15 min com TBS-T, seguindo-se a incubação com o anticorpo secundário correspondente: anti-*rabbit* ligado à fosfatase alcalina (1:20000) para a detecção da TTR e com anti-*mouse* ligado à fosfatase alcalina (1:20000) na detecção da β -actina. Lavaram-se as membranas 3 vezes com TBS-T e incubaram 5 min com o substrato ECF (*ECF Western Blotting Reagent Packs, GE Healthcare*). As bandas de proteína foram detectadas por quimiofluorescência, usando o *Molecular Imager FX system* (Bio-rad) e quantificadas por densitometria, usando o *software Quantity One*.

3.5.2. Protocolo *Western blot* MT

Num microtubo de 1,5mL, juntou-se o volume de amostra equivalente a 30 μ g de proteína total e tampão de redução 2x (4% SDS, 6% mercaptoetanol, 40% sacarose, 0,02% azul bromofenol em Tris-HCl 0,125M pH 6,8), de modo a ficar numa concentração de 1x. Para obter uma desnaturação eficaz as amostras foram mantidas a 100°C durante 5-10min. O extracto proteico foi sujeito a uma electroforese em gel desnaturante com 12% de acrilamida a 148 mA. Prosseguiu-se com a electrotransferência das proteínas contidas no gel para membranas de PVDF de 0,2 μ m de poro (Thermo Scientific), previamente activadas em metanol e equilibradas na solução de electrotransferência constituída por 10 mM CAPS, 10% metanol, 2mM CaCl_2 , pH 11. A electrotransferência foi efectuada a 220 mA durante 2h. Terminada a electrotransferência, procedeu-se à fixação das proteínas com gluteraldeído a 0,25% durante 1h à temperatura ambiente. Lavaram-se as membranas 3vezes durante 5min com TBS-T (20 mM Tris, 137 mM NaCl, 0,1%Tween20, pH 7,6) e secaram-se. Prosseguiu-se o *Western blot* reactivando as membranas em metanol, removendo o seu excesso com TBS-T. Bloquearam-se as membranas com 3% de caseína em TBS-T durante 1 h à temperatura ambiente. Findo esse período, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário *mouse* anti-*human* MT (1:1000, Dakocytomation) ou *mouse* anti- β -actina (1:5000, Sigma-Aldrich), diluídos em TBS-T, durante 1 h à temperatura ambiente e com agitação lenta constante. Efectuaram-se 3 lavagens de 15 min com TBS-T e incubaram-se as membranas com o anticorpo secundário anti-*mouse* ligado à fosfatase alcalina (1:20000, *GE Healthcare*). Após 3 lavagens de 15 min com TBS-T, as membranas foram incubadas com o substrato ECF (*ECF Western Blotting Reagent Packs, GE Healthcare*) durante 5 min. As bandas de proteína foram

detectadas por quimiofluorescência, usando o *Molecular Imager FX system* (Bio-rad) e quantificadas por densitometria usando o *software Quantity One*.

Durante o processo de optimização do *Western blot* para a MT foram testadas várias condições, nomeadamente a quantidade de proteína total (20, 30, 50 e 70µg), tempo de electrotransferência (1h, 1h15min, 1h30min, 1h45min, 2h, 2h15min), tempo de incubação e concentração do anticorpo primário anti-β-actina (1h e 2h à temperatura ambiente, *overnight* a 4°C; 1:20000; 1:10000; 1:7500 e 1:5000).

3.6. Transfecção

A transfecção é uma técnica laboratorial, que consiste na introdução de DNA exógeno no interior de células. O objectivo é que as células repliquem o fragmento de DNA introduzido ou que expressem uma determinada proteína. Em condições fisiológicas, há repulsa entre o ácido nucleico, carregado negativamente, e as membranas celulares; pelo que, é necessária a intervenção de moléculas, como lipossomas catiónicos (Lipofectamine 2000™) ou CaCl₂, que permitem a permeabilização das membranas celulares e a entrada do DNA. Um dos objectivos deste trabalho foi optimizar as condições de transfecção na linha RCP com lipofectamine e nas HEK 293 pelo método do CaCl₂. O intuito foi estabelecer metodologias práticas e eficazes de induzir as células a expressar genes exógenos de interesse para estudos futuros.

3.6.1. Transfecção de RCP com lipofectamine 2000™

Para os ensaios de transfecção foi usado o vector plasmídico pCMV.sport-β-Gal (ver anexo). Transformaram-se células *E.coli* DH5α competentes para obter DNA plasmídico (pDNA) em quantidade suficiente para os ensaios de transfecção.

Preparação de células competentes:

Inocularam-se 5 mL de meio LB-Broth sem antibiótico com 100µL de células *E.coli* DH5α competentes preservadas a -80°C. As células foram incubadas a 37°C no agitador orbital a 250rpm durante a noite. Retiraram-se 800µL do pré-inóculo e adicionaram-se a 100mL de meio LB-broth sem antibiótico, sempre em condições estéreis. As células foram incubadas a 37°C no agitador orbital a 250 rpm até atingirem uma óptica densidade entre 0,3 e 0,4 a 600nm. Centrifugou-se o inóculo a 5000rpm durante 10min a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspendido em 25mL de MgCl₂ a 100mM frio. A suspensão foi sujeita a uma centrifugação de 10min a 4000rpm a 4°C. Depois de descartar o sobrenadante, ressuspendeu-se o pellet em 5mL de CaCl₂ a 100mM frio e adicionaram-se 45mL de CaCl₂. A

suspensão foi mantida em gelo por 20min. Centrifugou-se a suspensão de células a 4000rpm 10min a 4°C e ressuspendeu-se o pellet em 2mL de CaCl₂ 85mM com 15% de glicerol w/v. As células competentes foram distribuídas por alíquotas e colocadas em azoto líquido, sendo posteriormente armazenadas a -80°C.

Preparação do pDNA

As células *E. coli* DH5 α competentes foram transformadas, por choque térmico, para inserirem o plasmídeo pCMV.sport- β -gal. Pretende-se que as células repliquem o DNA plasmídico (pDNA) de modo a obter material genético em quantidade suficiente para os ensaios de transfecção. Como o pCMV.sport- β -Gal contém o gene lacZ, que codifica a enzima β -galactosidase, e o gene β -lactamase, responsável pela resistência à ampicilina, semearam-se as bactérias em LB-agar com ampicilina para seleccionar as células transformadas. As células foram incubadas a 37°C durante a noite. Selecionou-se uma colónia e semeou-se em meio LB-broth com 10mg/mL de ampicilina. O pré-inóculo foi mantido 12h a 37°C num agitador orbital a 250rpm. 200mL de meio LB-Broth com ampicilina foram inoculados com o pré-inóculo e incubados a 37°C no agitador orbital durante a noite, sendo posteriormente recolhido para extracção do pDNA. Para a extracção do plasmídeo foi usado o kit Qiagen Plasmid Maxi Prep (Qiagen), segundo as instruções do fabricante. O pDNA foi quantificado espectrofotometricamente, recorrendo ao NanoPhotometer (IMPLEN) e a sua pureza estimada com base na razão da absorvância a 260nm sobre a absorvância a 280nm. A integridade do DNA foi avaliada por electroforese em gel de agarose 1% com brometo de etídeo e revelada no Fire Reader (UviTec Cambridge).

Transfecção

As células RCP foram semeadas em placas de 24 poços e mantidas a 37°C com 5%CO₂ e atmosfera húmida até atingirem as confluências pretendidas. 12h antes da transfecção, foi-lhes retirado o meio e substituído por meio sem antibiótico. Posteriormente, as células foram transfectadas, testando vários parâmetros, como a confluência das células, quantidade de lipofectamine (Invitrogen) e quantidade de pDNA (ver tabela 2). Primeiro diluiu-se a lipofectamine 2000TM em 50 μ L de meio Opti-MEM (meio de *Eagle's* mínimo essencial, Invitrogen) e incubou 5min à temperatura ambiente. Entretanto, diluiu-se o pDNA em 50 μ L de Opti-MEM e adicionou-se à mistura de lipofectamine. Após 20 min de incubação à temperatura ambiente, para se formarem os complexos DNA-lipofectamine, adicionaram-se 100 μ L da mistura a cada poço da placa de cultura celular e as células foram incubadas 6, 8 ou 10h a 37°C com 5% CO₂ e atmosfera húmida. Findo o tempo de transfecção, foi removido o meio com a lipofectamine e pDNA e adicionou-se meio DMEM com 10% FBS e 1% PS. A expressão da

enzima β -galactosidase foi detectada, 24h após a transfecção, com o β -gal Staining Kit (Invitrogen), segundo as recomendações do fabricante. A observação das células ao microscópio permitiu inferir a eficiência da transfecção, por contagem do número de células totais e de células tranfectadas, com uma tonalidade azul.

Tabela 2 - Condições testadas na transfecção da linha RCP com lipofectamine 2000™.

Confluência das células	40%	60%	80%
Quantidade de lipofectamine 2000	0,6 μ L	1,2 μ L	2,4 μ L
Quantidade de pDNA	0,8 μ g	1,2 μ g	2 μ g
Tempo de tranfecção	6h	8h	10h

3.6.2. Transfecção de HEK 293 pelo método do CaCl_2

Este trabalho passou ainda pela optimização das condições de transfecção pelo método do cloreto de cálcio. Para isso, recorreu-se à linha celular Hek 293, uma vez que estas células têm facilidade em incorporar DNA exógeno. Durante o processo de optimização foram testadas várias condições apresentadas na tabela 3.

As células foram semeadas em placas de 24 poços e mantidas a 37°C com 5% CO_2 e atmosfera húmida até atingirem a confluência pretendida. 12h antes da transfecção foi substituído o meio por meio sem antibiótico. O pDNA foi diluído em água bi-destilada (Tudor) ao qual foi adicionado CaCl_2 , perfazendo um volume total de 20 μ L. A formação dos precipitados DNA- CaCl_2 foi favorecida pela adição de igual volume de HBS2x (tampão salino de HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico): 280mM NaCl, 1,5mM Na_2PO_4 e 50mM HEPES) e deixou-se incubar 30, 40 ou 60min à temperatura ambiente. Homogeneizou-se a mistura dos complexos DNA- CaCl_2 e adicionaram-se 40 μ L a cada poço da placa de cultura celular. As células foram mantidas 10, 11, 12, 13, 16 ou 18h a 37°C com 5% CO_2 e atmosfera húmida. Findo o tempo de tranfecção, foi removido o meio e substituído por DMEM com 10% FBS e 1% PS. Foi ainda testado o tratamento com glicerol, uma vez que nalgumas células o choque com DMSO ou glicerol aumenta a eficiência de transfecção. Cuidadosamente, adicionaram-se 100 μ L de glicerol 1%, preparado em HBS1x, às células e deixou-se actuar 2 min à temperatura ambiente. Aspirou-se a solução de glicerol e lavaram-se as células 2 vezes com PBS1x. A expressão da enzima β -galactosidase foi detectada 24, 36, 40 e 48h após a transfecção, com o

β -gal Staining Kit (Invitrogen), segundo as instruções do fabricante. A observação das células ao microscópio permitiu inferir a percentagem de células transfectadas.

Tabela 3 - Condições testadas na transfecção das células HEK 293 pelo método do cloreto de cálcio.

Confluência das células	40%	50%	60%	65%	70%	75%	80%	85%
Quantidade de pDNA	1 μ g	2 μ g	2,5 μ g	5 μ g	7,5 μ g	10 μ g		
Concentração de CaCl ₂	125mM	200mM	250mM	300mM	500mM			
pH do HBS2x	6,95	7,00	7,05	7,10	7,05			
Tempo de incubação para formar os complexos DNA-CaCl ₂		30min		40min		60min		
Tempo de transfecção	10h	11h	12h	13h	16h	18h		
Tratamento com glicerol		Sim		Não				
Tempo de incubação para produção de β -Gal	24h	36h	40h	48h				

4. Resultados

4.1. Efeito do E2 na viabilidade celular

Antes de proceder ao estímulo das culturas celulares com E2 para estudar o seu efeito nos níveis de expressão de TTR e de MT-1/2, efectuou-se o ensaio do MTT para avaliar o efeito da hormona na viabilidade das células RCP. Com base na redução do MTT a formazano, por acção da succinato desidrogenase mitocondrial, inferiu-se a percentagem de células viáveis, o que permitiu comparar a viabilidade celular das culturas tratadas com E2 com a das culturas não tratadas. Aplicando o teste T-Student, observou-se que não há diferenças significativas na viabilidade de células tratadas com E2 a 100 e 1000nm, relativamente às células não tratadas (0nM) nos diferentes períodos de estímulo (figura 11).

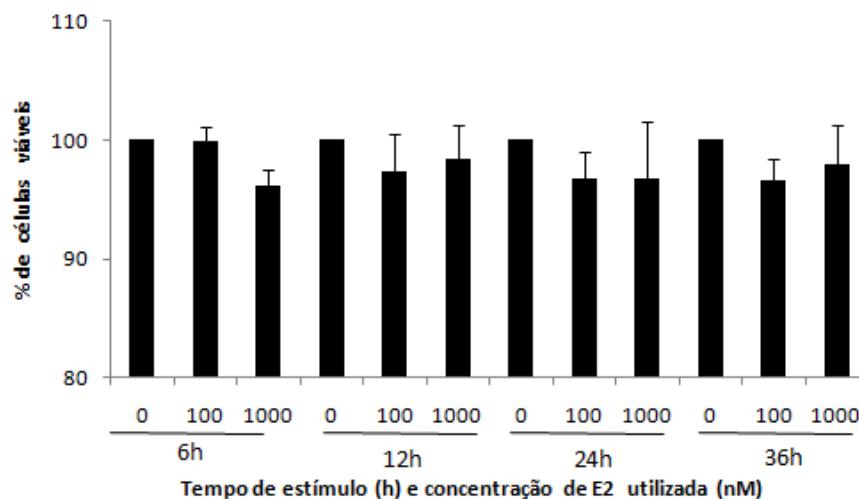


Figura 11 - Análise do efeito de E2 na viabilidade das células RCP. A redução do MTT foi usada para avaliar a viabilidade celular 6, 12, 24 e 36h após o estímulo das culturas com 0, 100 e 1000nm de E2. Os dados apresentados são expressos em percentagem de células viáveis e representam a média +- desvio padrão de 3 ensaios de MTT. O teste T-Student mostrou não haver diferenças significativas ($p > 0,05$) na viabilidade de células tratadas com E2, relativamente às não tratadas.

4.2. Efeito do E2 na expressão de TTR

Para comparar os níveis de expressão de TTR entre RCP estimuladas com E2 a 1, 10, 100 e 1000 nM com células não estimuladas (0 nM) extraiu-se a proteína total e analisaram-se os extractos por *Western blot*. A intensidade das bandas de proteína, detectadas por quimiofluorescência, foi quantificada por densitometria. Para a quantificação relativa de TTR, utilizou-se uma proteína normalizadora, a β -actina, cuja expressão não é regulada por

E2. Os resultados obtidos no *Western blot* estão representadas na figura 12 e a sua interpretação gráfica é apresentada na figura 13. De acordo com os resultados, não há alterações significativas nos níveis de expressão de TTR às 6h de estímulo para qualquer uma das concentrações de E2 testadas. Às 12h de estímulo verifica-se um aumento pouco pronunciado dos níveis de TTR, nas células estimuladas com E2 a 10 e 100nM ($p < 0,05$), relativamente às não estimuladas (0nM). A expressão de TTR aumenta consideravelmente às 24h de estímulo com E2 a 10nM ($p < 0,001$), se bem que, para a concentração de 1nM também se regista o aumento dos níveis da proteína ($p < 0,05$), comparando com as células não estimuladas (0nM). Perante estes resultados, deduz-se que o efeito de E2, nas células RCP ao nível da expressão de TTR, é máximo às 24h de estímulo numa concentração de 10nM. Passadas 36h de estímulo, o efeito da hormona na regulação da expressão do gene TTR é atenuado, de tal modo que os níveis da proteína não sofrem alterações significativas, relativamente às células não estimuladas (0nM).

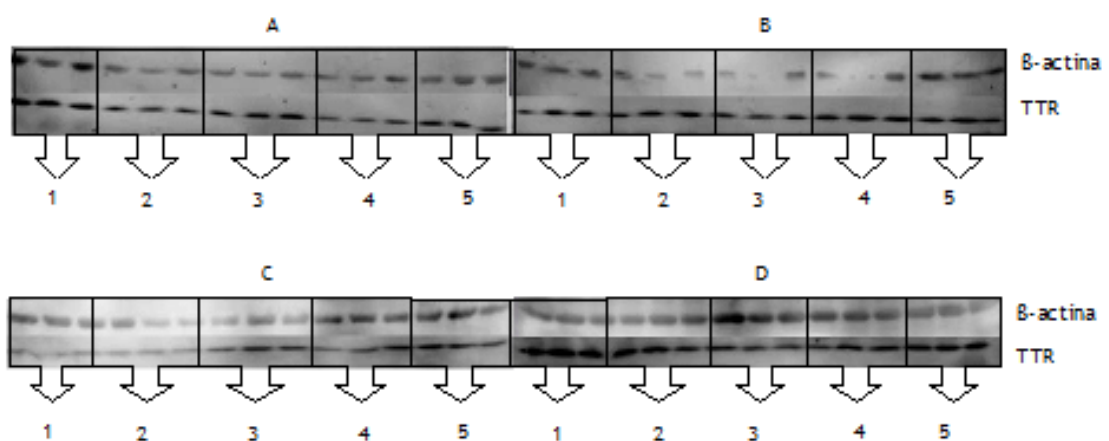


Figura 12 - Análise da expressão de TTR a partir de extractos proteicos de RCP por *Western blot*, usando a B-actina como proteína normalizadora. A expressão de TTR foi avaliada em células estimuladas 6 (A), 12 (B), 24 (C) e 36h (D) com 0, 1, 10, 100 e 1000 nM de E2, que na figura correspondem às bandas 1, 2, 3, 4 e 5 respectivamente. Para cada condição foram efectuados triplicados.

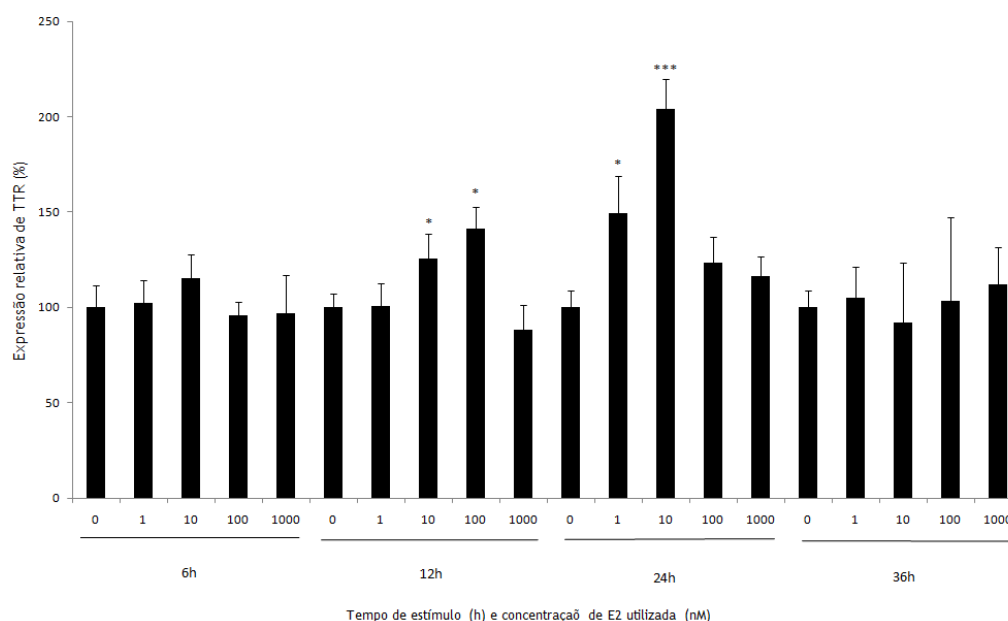


Figura 13 - Análise dos níveis de expressão de TTR em células RCP estimuladas 6, 12, 24 e 36h com E2 a 0, 1, 10, 100 e 1000nM. Os resultados apresentados são expressos em percentagem de níveis de expressão de TTR e representam a média \pm desvio padrão de 3 experiências independentes. (*- $p < 0,05$; ***- $p < 0,001$).

4.3.Efeito do E2 na expressão de MT-1/2

As culturas de células da linha RCP foram estimuladas 6, 12, 24 e 36h com diferentes concentrações de E2 (0, 1, 10, 100 e 1000nM) para avaliar o efeito da hormona na expressão de MT-1/2. Findo o tempo de estímulo, as células foram lisadas e o extracto proteico analisado por *Western blot*. Para a detecção e quantificação relativa de MT-1/2 foi usado anticorpo específico para esta MT, mas também anticorpo dirigido à β -actina, que foi usada como proteína normalizadora. Recorrendo a anticorpos secundários, conjugados com a fosfatase alcalina, que reconhecem os anticorpos primários, foram detectadas as bandas de proteína por quimioluminescência, após a incubação das membranas com o substrato ECF. As bandas obtidas são apresentadas na figura 14 e a interpretação dos resultados, após quantificação e normalização, representada na figura 15.

Os resultados mostram um aumento dos níveis de expressão de MT-1/2 às 12h de estímulo para todas as concentrações de E2 testadas ($p < 0,001$), relativamente às células não estimuladas (0nM). Às 24h de estímulo, a expressão de MT-1/2 está aumentada comparando com a situação controlo (0nM) e esse efeito é mais acentuado para a concentração de 100nM ($p < 0,001$). O efeito da hormona esteróide na regulação da expressão de MT-1/2 parece

diminuir às 36h, uma vez que apenas se regista um aumento estatisticamente significativo de proteína para estímulos com E2 a 1nM (ver figura 15).

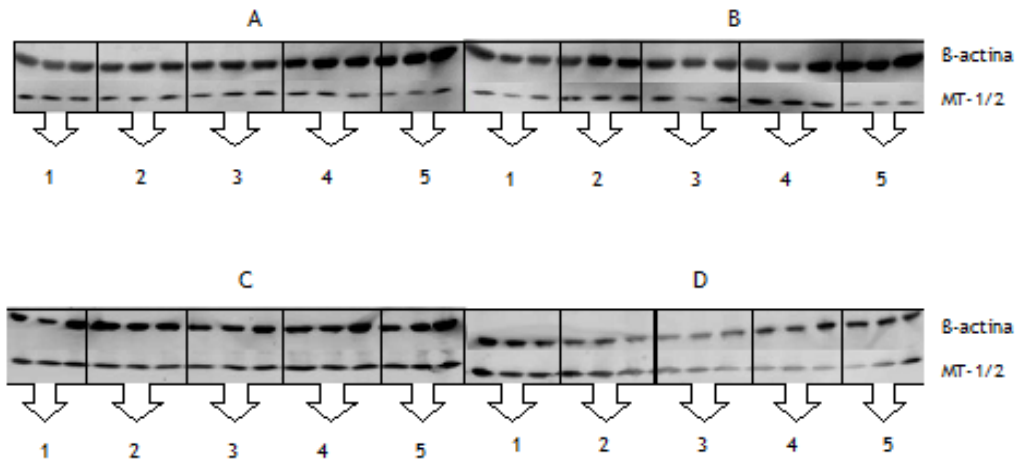


Figura 14 - Análise da expressão de MT-1/2 a partir de extractos proteicos de RCP por *Western blot*, usando a β -actina como proteína normalizadora. A expressão de MT-1/2 foi avaliada em células estimuladas 6 (A), 12 (B), 24 (C) e 36h (D) com 0, 1, 10, 100 e 1000 nM de E2, que na figura correspondem às bandas 1, 2, 3, 4 e 5 respectivamente. Para cada condição foram efectuados triplicados.

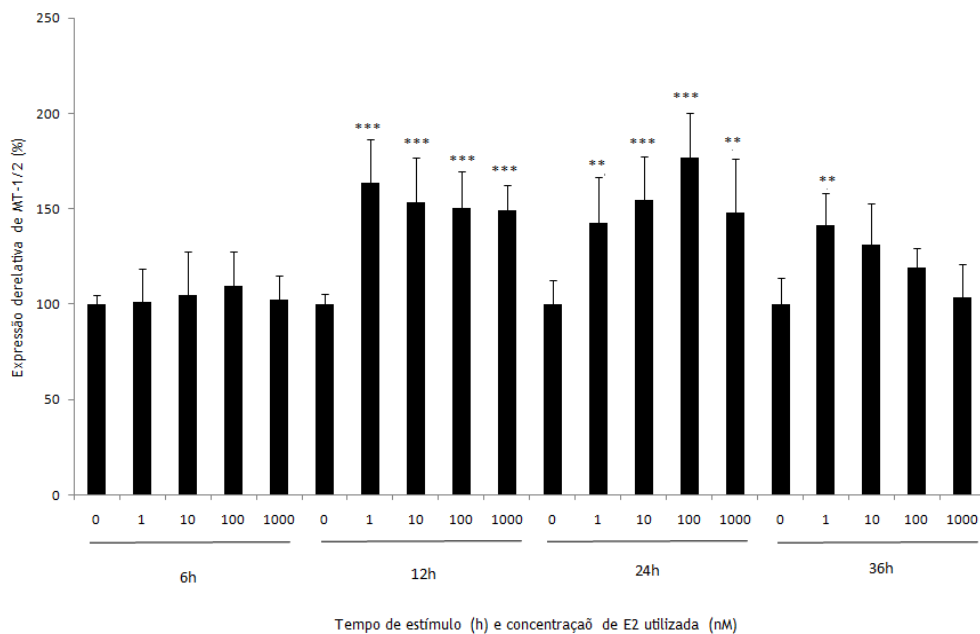


Figura 15 - Análise dos níveis de expressão de MT-1/2 em células RCP estimuladas 6, 12, 24 e 36h com E2 a 0, 1, 10, 100 e 1000nM. Os resultados apresentados são expressos em percentagem de níveis de expressão de MT-1/2 e representam a média +- desvio padrão de 3 experiências independentes. (** - 0,01 <p> 0,001 e *** - p< 0,001).

4.4. Eficiência de Transfecção

4.4.1. Transfecção em RCP com lipofectamine 2000™

Com o intuito de otimizar as condições de transfecção na linha celular RCP com Lipofectamine 2000™ foram testadas diferentes densidades celulares, concentrações de pDNA, quantidades de Lipofectamine 2000™ e tempos de transfecção (ver tabela 2).

A percentagem de células transfectadas não foi além dos 5% e estes resultados foram obtidos com 80% de confluência celular, 1,2µg de pDNA, 1,2µL de Lipofectamine 2000™ e 8h de transfecção (figura 16 e tabela 4).

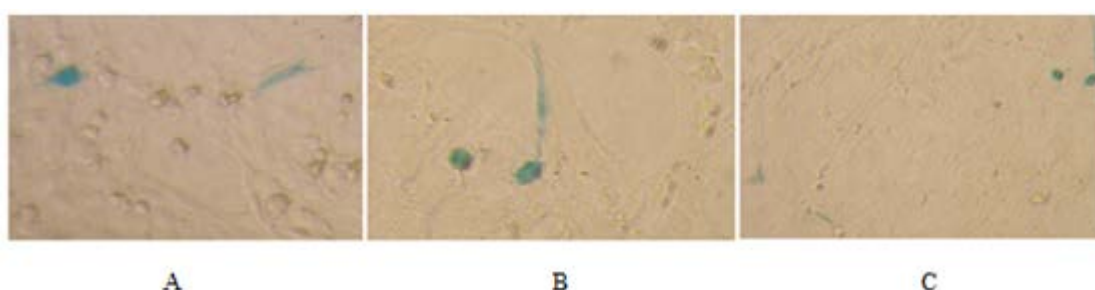


Figura 16 - Células RCP transfectadas com Lipofectamine 2000™ observadas ao microscópio óptico numa ampliação de 100x. Na imagem as células azuis correspondem às células transfectadas, que passam a expressar a enzima β -galactosidase, capaz de degradar o substrato X-gal num produto de cor azul.

Tabela 4 - Condições testadas na otimização da transfecção em RCP usando o reagente Lipofectamine 2000™, com referência às respectivas imagens da figura 16 e eficiências de transfecção.

Imagem	A	B	C
Confluência celular (%)	60	40	80
pDNA (µg)	0,8	0,8	1,2
Lipofectamine 2000™ (µL)	1,2	2,4	1,2
Tempo de transfecção (h)	8	8	8
Tempo de incubação para a expressão de β -gal (h)	24	24	24
Eficiência de transfecção (%)	1	3	5

4.4.2. Transfecção em HEK 293 com CaCl₂

Durante o processo de optimização da transfecção na linha celular HEK 293 com CaCl₂ foram testados vários parâmetros: confluência das células, concentração de pDNA, concentração de CaCl₂, pH do HBS 2x, tempo de incubação para formar os complexos DNA-CaCl₂, tempo de transfecção, choque com glicerol e tempo de incubação para expressão de β-gal.

Os resultados obtidos mostram que os parâmetros pH do HBS 2x, densidade celular, concentração de pDNA e de CaCl₂ são críticos no processo de transfecção pelo método do CaCl₂ (figura 17 e tabela 5).

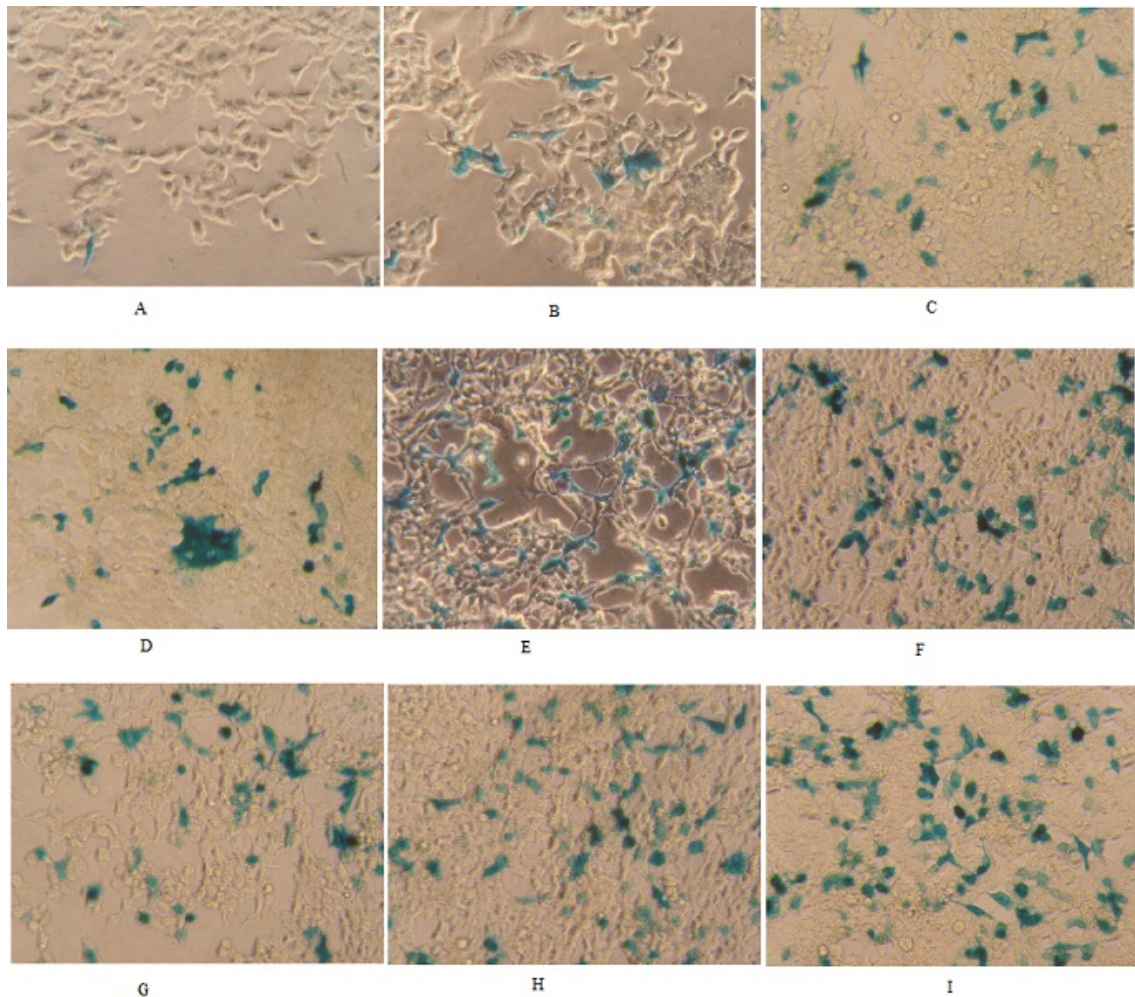


Figura 17 - Células HEK 293 transfectadas pelo método do CaCl₂ observadas ao microscópio óptico numa ampliação de 100x.

Tabela 5. Condições testadas para a otimização da transfecção na linha celular HEK 293 pelo método do CaCl_2 , com referência às respectivas imagens da figura 17 e eficiências de transfecção.

Imagem	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Confluência celular (%)	40	40	70	80	65	85	60	70	75
pDNA (μg)	1	2,5	2,5	7,5	5	5	10	7,5	5
CaCl_2 (mM)	125	125	125	250	300	300	500	300	300
pH HBS 2x	7,14	7,1	6,95	6,95	7,05	7,05	7,05	7,05	7,05
Tempo de incubação para a formação dos complexos pDNA- CaCl_2 (min)	30	40	40	40	60	60	60	60	60
Tempo de transfecção (h)	18	16	13	13	11	11	13	11	11
Choque com glicerol	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Tempo de incubação para a expressão de β -gal (h)	24	24	36	36	36	36	36	48	36
Eficiência de transfecção (%)	2	10	15	20	40	50	40	50	60

Os melhores resultados foram obtidos usando 5 μg de pDNA, CaCl_2 a 300mM, HBS 2x pH 7,05 e uma densidade celular entre os 60-80%, obtendo-se uma eficiência de transfecção entre os 40 e os 60% (figura 18).

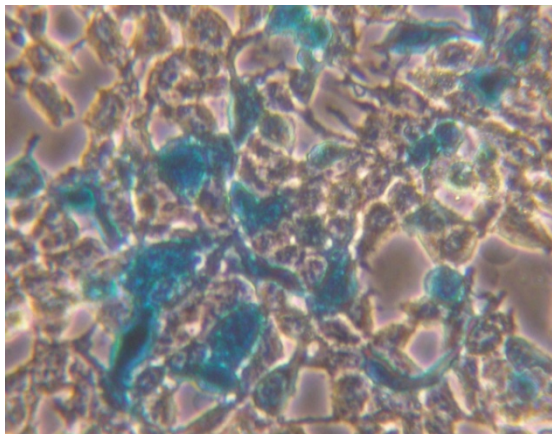


Figura 18 - Células HEK 293 transfectadas pelo método de CaCl_2 observadas ao microscópio óptico numa ampliação de 200x. As células azuis correspondem às células transfectadas que, ao inserirem o pCMV.sport- β -gal, passam a expressar a enzima β -galactosidase capaz de degradar o substrato X-gal num composto azul.

5. Discussão e Conclusão

5.1. Efeito do E2 na expressão da TTR

Nos últimos anos, um crescente número de estudos evidencia o contributo da TTR na protecção contra a AD. O primeiro indício do papel neuroprotector da TTR resultou da observação de uma considerável diminuição dos níveis da proteína no CSF de doentes com a patologia [66, 67]. Outros estudos mostram que os níveis de TTR no CSF relacionam-se negativamente com o grau de demência [68] e com a abundância de placas amilóides nos doentes com esta neuropatologia [69]. Actualmente, sabe-se que a TTR interage com o péptido A β , prevenindo a formação dos agregados amilóides característicos da AD [73, 78]. O esclarecimento dos mecanismos que controlam os níveis de TTR nos CPs pode prestar um contributo valioso ao desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas e de diagnóstico para a AD. Diversos trabalhos debruçaram-se no estudo da regulação transcripcional do gene TTR no cérebro. Esses estudos mostram a regulação positiva de TTR mediada por nicotina [48], extracto de *G. biloba* [49], óleo de peixe rico em ómega-3 [50] e pelas hormonas DHT [42, 43], P [46] e hidrocortisona (Martinho et al, 2011, *com pers*). Dada a existência de elementos responsivos para os estrogénios no promotor do gene TTR e a identificação de locais de ligação para os receptores dos estrogénios, depreende-se que esta hormona sexual regule a expressão do gene da TTR. De facto, estudos realizados *in vivo* [42, 44, 45] e em culturas primárias de células epiteliais de CP de rato [44], mostraram que o E2 regula positivamente a transcrição do gene TTR nos CPs, tendo-se verificado aumentos ao nível da proteína e do mRNA.

Um dos objectivos do presente trabalho consistiu em avaliar o efeito do E2 na expressão de TTR na linha celular RCP, para verificar se a resposta da linha RCP ao estímulo com a hormona esteróide é concordante com resultados obtidos em estudos *in vitro* e *in vivo*. Pretende-se averiguar se esta linha celular representa uma alternativa viável face às culturas primárias de células epiteliais de CP de rato e à experimentação animal. De acordo com os resultados obtidos, o E2 induz o aumento da expressão de TTR nas células da linha RCP, corroborando com dados prévios de estudos realizados *in vitro* [44] e *in vivo* [42, 44, 45]. Experiências realizadas em culturas primárias de células epiteliais de CP de rato mostraram que o efeito de E2 é máximo às 12h de estímulo com hormona a 1 μ M [44]. Por sua vez, os resultados do presente estudo revelam que, nas RCP, os níveis de expressão de TTR aumentam significativamente 24h após o estímulo da cultura celular com E2 a 10nM, com níveis de proteína aproximadamente 2 vezes mais elevados que nas células não estimuladas. Na linha RCP, o efeito do E2 na regulação da expressão de TTR também é notado às 12h com E2 a 10 e 100nM, bem como às 24h a 1nM. Aparentemente, a linha celular carece de mais tempo para a activação das vias de sinalização mediadas pelo E2, que culminam com a transcrição do gene TTR. Nos estudos de Quintela et al foi demonstrado o aumento da expressão de TTR nas culturas primárias de células epiteliais de CP de rato quando estimuladas com E2 em concentrações na gama dos μ M [44]. Experiências posteriores demonstraram que o mesmo efeito é alcançado usando doses mais baixas de E2,

nomeadamente com concentrações na ordem dos nM [46], tal como o observado no presente estudo. Apesar das diferenças na concentração e tempo óptimos de estímulo hormonal, a linha celular RCP responde do mesmo modo ao E2, constituindo uma ferramenta viável para futuros estudos.

5.2. Efeito do E2 na expressão da MT-1/2

Os mecanismos pelos quais os estrogénios protegem o cérebro das lesões neurodegenerativas têm sido alvo do interesse científico. Sabe-se que o efeito neuroprotector destas hormonas esteróides se deve, em parte, à regulação positiva da expressão de proteínas envolvidas na remoção amilóide, como é o caso da TTR [42, 44]. O E2, para além de regular os níveis de proteínas que interferem na agregação [140, 141, 143] e na remoção da substância amilóide [42, 44, 146], fomenta a viabilidade neuronal [140] e a degradação do A β pelas células da microglia [142]. Posto isto, o estudo do efeito do E2 na regulação de outras proteínas implicadas na AD, nomeadamente das MTs, parece promissor.

O primeiro indício do envolvimento das MTs na AD proveio da observação de níveis drasticamente elevados de MT-1/2 [120, 129] e a diminuição dos níveis de MT-3 em cérebros com a doença [122]. Este facto, associado ao papel da MT-1/2 na captação de ROS, na viabilidade neuronal e no controlo dos níveis de metais envolvidos na agregação amilóide, tem suscitado o interesse na função neuroprotectora desta metaloproteína. Dados mais recentes sugerem que o aumento dos níveis de MT-1/2 pode comprometer a remoção de A β mediada pela TTR. A MT-2 interage com a TTR e essa ligação parece desfavorecer a remoção do A β pela TTR [144]. Perante estes dados, o estudo da regulação dos níveis de MT-1/2 nos CPs pode fornecer informações importantes para a compreensão da patogénese da AD e para o estabelecimento de estratégias terapêuticas.

No presente estudo foi avaliado o efeito do E2 na expressão da MT-1/2 numa linha celular de CP de rato. No decorrer da experiência foram testadas várias concentrações de hormona (1, 10, 100 e 1000nM) a vários períodos de estímulo (6, 12, 24 e 36h), sendo os níveis de expressão de MT-1/2 das células estimuladas comparados aos níveis de proteína detectados nas células não tratadas (0nM). Os dados obtidos sugerem que a hormona esteróide regula positivamente a expressão da MT-1/2 na linha celular RCP. De acordo com os resultados obtidos, o efeito do E2 é notado às 12h de estímulo para todas as concentrações de hormona testadas. 24h após o estímulo hormonal, a expressão de MT-1/2 permanece significativamente elevada, comparativamente ao controlo (células não estimuladas). A concentração óptima de E2, para a qual se verifica o efeito mais evidente sobre os níveis de MT, é ambígua. Uma análise pormenorizada sobre os níveis de expressão de MT-1/2 para a mesma concentração hormonal não revela diferenças significativas entre as 12 e 24h de estímulo ($p > 0,05$). Este

facto poderá indicar que o período óptimo de actuação da hormona sobre a expressão desta MT ocorrerá entre as 12 e 24h, sendo por isso pertinente testar o efeito do E2 às 18h de estímulo com as várias concentrações.

O efeito da estrona na expressão cerebral de MTs foi estudado por Beltramini e seus colaboradores. À semelhança dos resultados obtidos na linha celular de CP de rato estimulada com E2, Beltramini detectou um aumento dos níveis de MTs no cérebro de ratos tratados com o estrogénio estrona [116]. A sobreexpressão de MT-1/2 induzida pelo E2 reforça o papel neuroprotector da hormona, se pensarmos nas funções que esta metaloproteína desempenha na captura de ROS, na viabilidade neuronal e na regulação dos níveis de iões metálicos envolvidos na agregação amilóide. No entanto, propõe-se um estudo mais aprofundado sobre este efeito da hormona, uma vez que o aumento dos níveis de MT-1/2 pode favorecer a formação dos complexos MT-1/2-TTR, que parecem comprometer a remoção do AB pela TTR [144].

5.3. Transfecção

5.3.1. Transfecção em RCP com lipofectamine 2000™

A transfecção é uma ferramenta essencial nos laboratórios de investigação e consiste na introdução de material genético exógeno em células eucariotas. A finalidade é que as células repliquem o fragmento de DNA introduzido ou que expressem uma determinada proteína. Muitos dos protocolos de transfecção descritos recorrem ao uso de lipossomas catiónicos, como é o caso da formulação Lipofectamine 2000™, ou a moléculas de cálcio. Os lipossomas formam complexos com o ácido nucleico; a natureza catiónica e lipofílica dos complexos permite, por um lado, superar a repulsa electrostática entre as moléculas de ácido nucleico e a membrana celular e, por outro, a permeabilização celular [147]. A precipitação dos ácidos nucleicos com CaCl_2 é um método mais simples e barato de promover a entrada do material genético em células eucariotas [148].

Um dos objectivos deste trabalho experimental consistiu em otimizar as condições de transfecção na linha RCP com Lipofectamine 2000™ e em HEK 293 pelo método do CaCl_2 , com o intuito de estabelecer metodologias práticas e eficazes de induzir as células a expressar proteínas de interesse para estudos futuros.

Durante o processo de optimização da transfecção com Lipofectamine 2000™ na linha celular RCP foram testadas diferentes densidades celulares, concentrações de pDNA, quantidades de Lipofectamine 2000™ e tempos de transfecção. Dos ensaios efectuados ficou claro que a quantidade de Lipofectamine 2000™ e de pDNA são parâmetros cruciais na transfecção. A

eficiência de transfecção não foi além dos 5%, tendo sido este resultado obtido em células com 80% de confluência, 1,2 μ g de pDNA, 1,2 μ L de Lipofectamine 2000TM e 8h de transfecção. A detecção da enzima β -galactosidase foi efectuada 24h após o fim da transfecção, mas o prolongamento deste período de incubação dará às células tempo para activar os todos os factores de transcrição e enzimas envolvidas na transcrição do gene lac Z. Portanto, o aumento do tempo de incubação poderá favorecer a expressão de β -gal pelas células. Seria conveniente testar concentrações mais elevadas de pDNA e de Lipofectamine 2000TM, uma vez que a eficiência de transfecção tende a diminuir com baixas concentrações de plasmídeo e de Lipofectamine 2000TM. Por outro lado, o excesso de pDNA, bem como de Lipofectamine 2000TM induz a morte celular. A optimização da transfecção em RCP requer mais ensaios onde se testem várias densidades celulares, concentrações mais elevadas de plasmídeo e de Lipofectamine 2000TM e eventualmente prolongar o tempo de incubação para as células expressarem o gene da β -gal.

5.3.2. Transfecção em HEK 293 com CaCl₂

Testadas várias condições e vários parâmetros decisivos na transfecção com CaCl₂, conseguiu-se obter uma eficiência de transfecção de 40-60% em células HEK 293. Das experiências efectuadas constatou-se que o tratamento com glicerol parece não promover o aumento da eficiência de transfecção nas HEK 293, como ainda fragiliza as células. O aumento da concentração de CaCl₂ para 500mM induziu a morte de algumas células, bem como o aumento do tempo de transfecção para as 16 e 18h. Os melhores resultados foram obtidos com 5 μ g de pDNA, CaCl₂ a 250 e 300mM, HBS 2x com pH de 7,05 e densidades celulares entre os 60 e os 80%. Nestas condições, uma taxa considerável de células inserem o pDNA exógeno, dispondo de uma metodologia prática e eficaz de induzir as células HEK 293 a expressar proteínas de interesse para estudos futuros.

6. Perspectivas Futuras

Este trabalho evidenciou o papel do E2 na regulação da expressão de TTR na linha celular RCP. Concluiu-se ainda que a hormona esteróide induz a expressão da MT-1/2, dando ênfase ao carácter neuroprotector do E2. No futuro, será conveniente complementar os resultados deste trabalho analisando o efeito do E2 na expressão da TTR e da MT-1/2 a nível do mRNA, por PCR em tempo real. Paralelamente aos estudos já descritos para a TTR, seria uma mais valia analisar o efeito da hormona E2 na expressão de MT-1/2 em culturas primárias de células epiteliais de CP de rato, assim como *in vivo*. Os estudos *in vitro* não substituem as experimentações *in vivo*, pelo que, será importante delinear uma experiência em ratinhos modelo de AD ovariectomizados e sujeitos a tratamento com várias concentrações de E2, com o objectivo de avaliar, por um lado, o efeito da hormona na expressão das proteínas TTR e MT-1/2 e, por outro, o seu efeito na deposição amilóide. Uma experiência deste tipo poderia ajudar a compreender o papel da MT-1/2 na AD, uma vez que, apesar do seu impacto na captura de ROS, na viabilidade neuronal e na regulação dos níveis de iões metálicos envolvidos na agregação amilóide, esta metaloproteína parece desfavorecer a remoção de A β mediada pela TTR. O efeito da hormona na expressão das proteínas TTR e MT-1/2 poderá ser avaliado por *Western blot* ou ELISA e a deposição de A β por determinação dos níveis de A β solúvel.

Propõe-se ainda a identificação da região reguladora do gene MT-1/2, por ensaios de transfecção com um gene repórter e o putativo elemento responsivo ao estradiol do promotor do gene MT-1/2 humano.

Dado o papel neuroprotector e demonstrada a regulação positiva da TTR nos CPs pelas hormonas DHT e P, seria interessante avaliar o efeito das hormonas sexuais na expressão da MT-1/2 na linha celular RCP, em culturas primárias de plexo coroideu de rato e *in vivo*. No seguimento destes estudos, uma abordagem do efeito destas hormonas sexuais na expressão da MT-3 também seria promissora.

Relativamente à optimização da transfecção com Lipofectamine 2000TM na linha celular RCP, sugerem-se novos ensaios onde se testem concentrações mais elevadas de plasmídeo e de Lipofectamine 2000TM em diferentes densidades celulares, bem como prolongar o tempo de incubação para as células expressarem o gene lac Z.

7. Anexos

7.1. Marcador de pesos moleculares

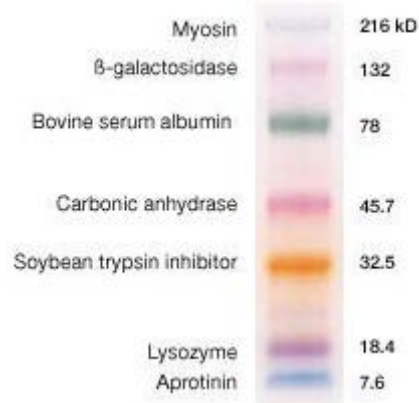


Figura 19 - Marcador de pesos moleculares *Kaleidoscope Prestained Standards*. O marcador contém as proteínas: miosina de 216 kDa, β -galactosidase de 132 kDa, albumina sérica bovina de 78 kDa, anidrase carbónica de 45,7 kDa, inibidor da tripsina de soja de 32,5 kDa, lisozima de 18,4 kDa e aprotinina de 7,6 kDa.

7.2. Vector pCMV.sport- β -gal

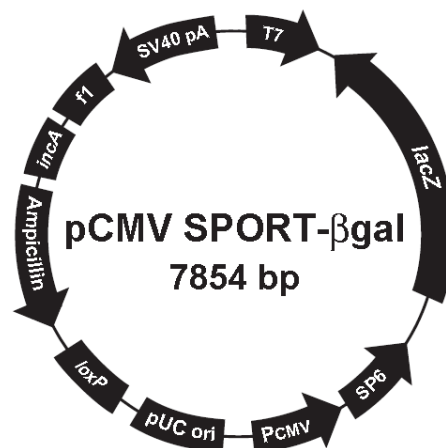


Figura 20 - Mapa do vector pCMV.sport- β -gal. O plasmídeo pCMV.sport β -gal contém o gene lac Z, que codifica a enzima β -galactosídase, e o gene da β -lactamase, que confere resistência ao antibiótico ampicilina.

8. Referências Bibliográficas

1. Buxbaum, J.N. and N. Reixach, *Transthyretin: the servant of many masters*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(19): p. 3095-101.
2. Kabat, E.A., D.H. Moore, and H. Landow, *An Electrophoretic Study of the Protein Components in Cerebrospinal Fluid and Their Relationship to the Serum Proteins*. J Clin Invest, 1942. **21**(5): p. 571-7.
3. Ingbar, S.H., *Pre-albumin: a thyroxinebinding protein of human plasma*. Endocrinology, 1958. **63**(2): p. 256-9.
4. Kanai, M., A. Raz, and D.S. Goodman, *Retinol-binding protein: the transport protein for vitamin A in human plasma*. J Clin Invest, 1968. **47**(9): p. 2025-44.
5. Raz, A. and D.S. Goodman, *The interaction of thyroxine with human plasma prealbumin and with the prealbumin-retinol-binding protein complex*. J Biol Chem, 1969. **244**(12): p. 3230-7.
6. Richardson, S.J., *Evolutionary changes to transthyretin: evolution of transthyretin biosynthesis*. Febs J, 2009. **276**(19): p. 5342-56.
7. Tsuzuki, T., et al., *Structure of the human prealbumin gene*. J Biol Chem, 1985. **260**(22): p. 12224-7.
8. Whitehead, A.S., et al., *Cloning of human prealbumin complementary DNA. Localization of the gene to chromosome 18 and detection of a variant prealbumin allele in a family with familial amyloid polyneuropathy*. Mol Biol Med, 1984. **2**(6): p. 411-23.
9. Sparkes, R.S., et al., *Assignment of the prealbumin (PALB) gene (familial amyloidotic polyneuropathy) to human chromosome region 18q11.2-q12.1*. Hum Genet, 1987. **75**(2): p. 151-4.
10. Sasaki, H., et al., *Structure of the chromosomal gene for human serum prealbumin*. Gene, 1985. **37**(1-3): p. 191-7.
11. Soares, M.L., et al., *Human transthyretin intronic open reading frames are not independently expressed in vivo or part of functional transcripts*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1626**(1-3): p. 65-74.
12. Wakasugi, S., et al., *Structural comparisons between mouse and human prealbumin*. J Biochem, 1985. **98**(6): p. 1707-14.
13. Blake, C.C., et al., *An x-ray study of the subunit structure of prealbumin*. J Mol Biol, 1971. **61**(1): p. 217-24.
14. Gonzalez, G. and R.E. Offord, *The subunit structure of prealbumin*. Biochem J, 1971. **125**(1): p. 309-17.
15. Kanda, Y., et al., *The amino acid sequence of human plasma prealbumin*. J Biol Chem, 1974. **249**(21): p. 6796-805.
16. Hamilton, J.A. and M.D. Benson, *Transthyretin: a review from a structural perspective*. Cell Mol Life Sci, 2001. **58**(10): p. 1491-521.
17. Prapunpoj, P. and L. Leelawatwattana, *Evolutionary changes to transthyretin: structure-function relationships*. Febs J, 2009. **276**(19): p. 5330-41.

18. Henneby, S.C., *Evolutionary changes to transthyretin: structure and function of a transthyretin-like ancestral protein*. *Febs J*, 2009. 276(19): p. 5367-79.
19. Quintas, A., M.J. Saraiva, and R.M. Brito, *The tetrameric protein transthyretin dissociates to a non-native monomer in solution. A novel model for amyloidogenesis*. *J Biol Chem*, 1999. 274(46): p. 32943-9.
20. Vatassery, G.T., et al., *A sensitive assay of transthyretin (prealbumin) in human cerebrospinal fluid in nanogram amounts by ELISA*. *Clin Chim Acta*, 1991. 197(1): p. 19-25.
21. Aleshire, S.L., et al., *Localization of human prealbumin in choroid plexus epithelium*. *J Histochem Cytochem*, 1983. 31(5): p. 608-12.
22. Dickson, P.W., et al., *High prealbumin and transferrin mRNA levels in the choroid plexus of rat brain*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1985. 127(3): p. 890-5.
23. Brightman, M.W. and T.S. Reese, *Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain*. *J Cell Biol*, 1969. 40(3): p. 648-77.
24. Chodobski, A. and J. Szmydynger-Chodobska, *Choroid plexus: target for polypeptides and site of their synthesis*. *Microsc Res Tech*, 2001. 52(1): p. 65-82.
25. Emerich, D.F., et al., *The choroid plexus in the rise, fall and repair of the brain*. *Bioessays*, 2005. 27(3): p. 262-74.
26. Cavallaro, T., et al., *The retinal pigment epithelium is the unique site of transthyretin synthesis in the rat eye*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1990. 31(3): p. 497-501.
27. Kawaji, T., et al., *Transthyretin synthesis in rabbit ciliary pigment epithelium*. *Exp Eye Res*, 2005. 81(3): p. 306-12.
28. McKinnon, B., et al., *Synthesis of thyroid hormone binding proteins transthyretin and albumin by human trophoblast*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005. 90(12): p. 6714-20.
29. Blay, P., et al., *Transthyretin expression in the rat brain: effect of thyroid functional state and role in thyroxine transport*. *Brain Res*, 1993. 632(1-2): p. 114-20.
30. Herbert, J., et al., *Transthyretin: a choroid plexus-specific transport protein in human brain. The 1986 S. Weir Mitchell award*. *Neurology*, 1986. 36(7): p. 900-11.
31. Sousa, J.C., et al., *Transthyretin and Alzheimer's disease: where in the brain?* *Neurobiol Aging*, 2007. 28(5): p. 713-8.
32. Kato, M., et al., *Plasma and cellular retinoid-binding proteins and transthyretin (prealbumin) are all localized in the islets of Langerhans in the rat*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985. 82(8): p. 2488-92.
33. Soprano, D.R., et al., *Demonstration of transthyretin mRNA in the brain and other extrahepatic tissues in the rat*. *J Biol Chem*, 1985. 260(21): p. 11793-8.
34. Costa, R.H., E. Lai, and J.E. Darnell, Jr., *Transcriptional control of the mouse prealbumin (transthyretin) gene: both promoter sequences and a distinct enhancer are cell specific*. *Mol Cell Biol*, 1986. 6(12): p. 4697-708.

35. Costa, R.H., et al., *The cell-specific enhancer of the mouse transthyretin (prealbumin) gene binds a common factor at one site and a liver-specific factor(s) at two other sites.* Mol Cell Biol, 1988. 8(1): p. 81-90.
36. Yan, C., et al., *Distinct positive and negative elements control the limited hepatocyte and choroid plexus expression of transthyretin in transgenic mice.* Embo J, 1990. 9(3): p. 869-78.
37. Fung, W.P., et al., *Structure and expression of the rat transthyretin (prealbumin) gene.* J Biol Chem, 1988. 263(1): p. 480-8.
38. Lodish H, B.A., Zipursky SL, *Molecular Cell Biology.* 4th ed. 2000, New York: W. H. Freeman.
39. Motojima, K. and S. Goto, *Brain-specific expression of transthyretin mRNA as revealed by cDNA cloning from brain.* FEBS Lett, 1989. 258(1): p. 103-5.
40. Yamauchi, K. and A. Ishihara, *Evolutionary changes to transthyretin: developmentally regulated and tissue-specific gene expression.* Febs J, 2009. 276(19): p. 5357-66.
41. Marques, F., et al., *Kinetic profile of the transcriptome changes induced in the choroid plexus by peripheral inflammation.* J Cereb Blood Flow Metab, 2009. 29(5): p. 921-32.
42. Goncalves, I., et al., *Transthyretin is up-regulated by sex hormones in mice liver.* Mol Cell Biochem, 2008. 317(1-2): p. 137-42.
43. Quintela, T., et al., *5Alpha-dihydrotestosterone up-regulates transthyretin levels in mice and rat choroid plexus via an androgen receptor independent pathway.* Brain Res, 2008. 1229: p. 18-26.
44. Quintela, T., et al., *17beta-estradiol induces transthyretin expression in murine choroid plexus via an oestrogen receptor dependent pathway.* Cell Mol Neurobiol, 2009. 29(4): p. 475-83.
45. Tang, Y.P., et al., *Estrogen increases brain expression of the mRNA encoding transthyretin, an amyloid beta scavenger protein.* J Alzheimers Dis, 2004. 6(4): p. 413-20; discussion 443-9.
46. Quintela, T., et al., *Progesterone Enhances Transthyretin Expression in the Rat Choroid Plexus In Vitro and In Vivo via Progesterone Receptor.* J Mol Neurosci.
47. Kohda, K., et al., *Maternal separation stress drastically decreases expression of transthyretin in the brains of adult rat offspring.* Int J Neuropsychopharmacol, 2006. 9(2): p. 201-8.
48. Penkowa, M., et al., *Altered central nervous system cytokine-growth factor expression profiles and angiogenesis in metallothionein-I+II deficient mice.* J Cereb Blood Flow Metab, 2000. 20(8): p. 1174-89.
49. Watanabe, C.M., et al., *The in vivo neuromodulatory effects of the herbal medicine ginkgo biloba.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(12): p. 6577-80.
50. Puskas, L.G., et al., *Short-term administration of omega 3 fatty acids from fish oil results in increased transthyretin transcription in old rat hippocampus.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(4): p. 1580-5.

51. Pulford, D.J., et al., *Chronic lithium administration down regulates transthyretin mRNA expression in rat choroid plexus*. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2006. 2(4): p. 549-55.
52. Schreiber, G. and S.J. Richardson, *The evolution of gene expression, structure and function of transthyretin*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 1997. 116(2): p. 137-60.
53. Davis, P.J., S.W. Spaulding, and R.I. Gregerman, *The three thyroxine-binding proteins in rat serum: binding capacities and effects of binding inhibitors*. *Endocrinology*, 1970. 87(5): p. 978-86.
54. Blake, C.C., et al., *Structure of human plasma prealbumin at 2.5 Å resolution. A preliminary report on the polypeptide chain conformation, quaternary structure and thyroxine binding*. *J Mol Biol*, 1974. 88(1): p. 1-12.
55. Wojtczak, A., et al., *Structure of rat transthyretin (rTTR) complex with thyroxine at 2.5 Å resolution: first non-biased insight into thyroxine binding reveals different hormone orientation in two binding sites*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2001. 57(Pt 8): p. 1061-70.
56. Palha, J.A., et al., *Transthyretin is not essential for thyroxine to reach the brain and other tissues in transthyretin-null mice*. *Am J Physiol*, 1997. 272(3 Pt 1): p. E485-93.
57. Kassem, N.A., et al., *Role of transthyretin in thyroxine transfer from cerebrospinal fluid to brain and choroid plexus*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2006. 291(5): p. R1310-5.
58. van Bennekum, A.M., et al., *Biochemical basis for depressed serum retinol levels in transthyretin-deficient mice*. *J Biol Chem*, 2001. 276(2): p. 1107-13.
59. Noy, N., E. Slosberg, and S. Scarlata, *Interactions of retinol with binding proteins: studies with retinol-binding protein and with transthyretin*. *Biochemistry*, 1992. 31(45): p. 11118-24.
60. Refai, E., et al., *Transthyretin constitutes a functional component in pancreatic beta-cell stimulus-secretion coupling*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(47): p. 17020-5.
61. Liz, M.A., et al., *Transthyretin, a new cryptic protease*. *J Biol Chem*, 2004. 279(20): p. 21431-8.
62. Liz, M.A., et al., *ApoA-I cleaved by transthyretin has reduced ability to promote cholesterol efflux and increased amyloidogenicity*. *J Lipid Res*, 2007. 48(11): p. 2385-95.
63. Liz, M.A., et al., *Substrate specificity of transthyretin: identification of natural substrates in the nervous system*. *Biochem J*, 2009. 419(2): p. 467-74.
64. Costa, R., et al., *Transthyretin protects against A-beta peptide toxicity by proteolytic cleavage of the peptide: a mechanism sensitive to the Kunitz protease inhibitor*. *PLoS One*, 2008. 3(8): p. e2899.
65. Costa, R., et al., *Transthyretin binding to A-Beta peptide--impact on A-Beta fibrillogenesis and toxicity*. *FEBS Lett*, 2008. 582(6): p. 936-42.

66. Elovaara, I., C.P. Maury, and J. Palo, *Serum amyloid A protein, albumin and prealbumin in Alzheimer's disease and in demented patients with Down's syndrome.* Acta Neurol Scand, 1986. 74(3): p. 245-50.
67. Serot, J.M., et al., *Cerebrospinal fluid transthyretin: aging and late onset Alzheimer's disease.* J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1997. 63(4): p. 506-8.
68. Riisøen, H., *Reduced prealbumin (transthyretin) in CSF of severely demented patients with Alzheimer's disease.* Acta Neurol Scand, 1988. 78(6): p. 455-9.
69. Merched, A., et al., *Apolipoprotein E, transthyretin and actin in the CSF of Alzheimer's patients: relation with the senile plaques and cytoskeleton biochemistry.* FEBS Lett, 1998. 425(2): p. 225-8.
70. Castano, E.M., et al., *Comparative proteomics of cerebrospinal fluid in neuropathologically-confirmed Alzheimer's disease and non-demented elderly subjects.* Neurol Res, 2006. 28(2): p. 155-63.
71. Gloeckner, S.F., et al., *Quantitative analysis of transthyretin, tau and amyloid-beta in patients with dementia.* J Alzheimers Dis, 2008. 14(1): p. 17-25.
72. Hansson, S.F., et al., *Reduced levels of amyloid-beta-binding proteins in cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease patients.* J Alzheimers Dis, 2009. 16(2): p. 389-97.
73. Schwarzman, A.L., et al., *Transthyretin sequesters amyloid beta protein and prevents amyloid formation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. 91(18): p. 8368-72.
74. Link, C.J., Jr., J.H. Robbins, and V.A. Bohr, *Gene specific DNA repair of damage induced in familial Alzheimer disease cells by ultraviolet irradiation or by nitrogen mustard.* Mutat Res, 1995. 336(2): p. 115-21.
75. Lazarov, O., et al., *Environmental enrichment reduces Abeta levels and amyloid deposition in transgenic mice.* Cell, 2005. 120(5): p. 701-13.
76. Wu, Z.L., et al., *Comparative analysis of cortical gene expression in mouse models of Alzheimer's disease.* Neurobiol Aging, 2006. 27(3): p. 377-86.
77. Choi, S.H., et al., *Accelerated Abeta deposition in APP^{swe}/PS1^{deltaE9} mice with hemizygous deletions of TTR (transthyretin).* J Neurosci, 2007. 27(26): p. 7006-10.
78. Buxbaum, J.N., et al., *Transthyretin protects Alzheimer's mice from the behavioral and biochemical effects of Abeta toxicity.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(7): p. 2681-6.
79. Brouillette, J. and R. Quirion, *Transthyretin: a key gene involved in the maintenance of memory capacities during aging.* Neurobiol Aging, 2008. 29(11): p. 1721-32.
80. Kagi, J.H. and A. Schaffer, *Biochemistry of metallothionein.* Biochemistry, 1988. 27(23): p. 8509-15.
81. Miles, A.T., et al., *Induction, regulation, degradation, and biological significance of mammalian metallothioneins.* Crit Rev Biochem Mol Biol, 2000. 35(1): p. 35-70.
82. Pulido, P., J.H. Kagi, and B.L. Vallee, *Isolation and some properties of human metallothionein.* Biochemistry, 1966. 5(5): p. 1768-77.

83. Palmiter, R.D., et al., *MT-III, a brain-specific member of the metallothionein gene family*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. 89(14): p. 6333-7.
84. Quaife, C.J., et al., *Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia*. Biochemistry, 1994. 33(23): p. 7250-9.
85. Sadhu, C. and L. Gedamu, *Regulation of human metallothionein (MT) genes. Differential expression of MTI-F, MTI-G, and MTII-A genes in the hepatoblastoma cell line (HepG2)*. J Biol Chem, 1988. 263(6): p. 2679-84.
86. Penkowa, M., *Metallothioneins are multipurpose neuroprotectants during brain pathology*. Febs J, 2006. 273(9): p. 1857-70.
87. Coyle, P., et al., *Metallothionein: the multipurpose protein*. Cell Mol Life Sci, 2002. 59(4): p. 627-47.
88. Karin, M. and R.I. Richards, *The human metallothionein gene family: structure and expression*. Environ Health Perspect, 1984. 54: p. 111-5.
89. Searle, P.F., et al., *Regulation, linkage, and sequence of mouse metallothionein I and II genes*. Mol Cell Biol, 1984. 4(7): p. 1221-30.
90. Vasak, M., *Advances in metallothionein structure and functions*. J Trace Elem Med Biol, 2005. 19(1): p. 13-7.
91. Aschner, M. and A.K. West, *The role of MT in neurological disorders*. J Alzheimers Dis, 2005. 8(2): p. 139-45; discussion 209-15.
92. Hidalgo, J., et al., *Roles of the metallothionein family of proteins in the central nervous system*. Brain Res Bull, 2001. 55(2): p. 133-45.
93. Kille, P., A. Hemmings, and E.A. Lunney, *Memories of metallothionein*. Biochim Biophys Acta, 1994. 1205(2): p. 151-61.
94. Blindauer, C.A. and O.I. Leszczyszyn, *Metallothioneins: unparalleled diversity in structures and functions for metal ion homeostasis and more*. Nat Prod Rep. 27(5): p. 720-41.
95. Masters, B.A., et al., *Metallothionein III is expressed in neurons that sequester zinc in synaptic vesicles*. J Neurosci, 1994. 14(10): p. 5844-57.
96. Hoey, J.G., et al., *Expression of MT-3 mRNA in human kidney, proximal tubule cell cultures, and renal cell carcinoma*. Toxicol Lett, 1997. 92(2): p. 149-60.
97. Moffatt, P. and C. Seguin, *Expression of the gene encoding metallothionein-3 in organs of the reproductive system*. DNA Cell Biol, 1998. 17(6): p. 501-10.
98. Liang, L., et al., *Activation of the complete mouse metallothionein gene locus in the maternal deciduum*. Mol Reprod Dev, 1996. 43(1): p. 25-37.
99. Blaauwgeers, H.G., et al., *Distribution of metallothionein in the human central nervous system*. Glia, 1993. 8(1): p. 62-70.
100. Nishimura, N., et al., *Localization of metallothionein in the brain of rat and mouse*. J Histochem Cytochem, 1992. 40(2): p. 309-15.

101. Blaauwgeers, H.G., et al., *Localization of metallothionein in the mammalian central nervous system*. Biol Signals, 1994. 3(4): p. 181-7.
102. Hidalgo, J., et al., *Effect of zinc, copper and glucocorticoids on metallothionein levels of cultured neurons and astrocytes from rat brain*. Chem Biol Interact, 1994. 93(3): p. 197-219.
103. Giralt, M., et al., *Metallothionein-1+2 protect the CNS after a focal brain injury*. Exp Neurol, 2002. 173(1): p. 114-28.
104. Chung, R.S. and A.K. West, *A role for extracellular metallothioneins in CNS injury and repair*. Neuroscience, 2004. 123(3): p. 595-9.
105. Klaassen, C.D., J. Liu, and S. Choudhuri, *Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1999. 39: p. 267-94.
106. Cherian, M.G. and M.D. Apostolova, *Nuclear localization of metallothionein during cell proliferation and differentiation*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2000. 46(2): p. 347-56.
107. Hahn, S.H., O.J. Yoo, and W.A. Gahl, *Effect of metal ions on the stability of metallothionein in the degradation by cellular fractions in vitro*. Exp Mol Med, 2001. 33(1): p. 32-6.
108. Yagle, M.K. and R.D. Palmiter, *Coordinate regulation of mouse metallothionein I and II genes by heavy metals and glucocorticoids*. Mol Cell Biol, 1985. 5(2): p. 291-4.
109. Haq, F., M. Mahoney, and J. Koropatnick, *Signaling events for metallothionein induction*. Mutat Res, 2003. 533(1-2): p. 211-26.
110. Andrews, G.K., *Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions*. Biochem Pharmacol, 2000. 59(1): p. 95-104.
111. Ghoshal, K. and S.T. Jacob, *Regulation of metallothionein gene expression*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 2001. 66: p. 357-84.
112. Majumder, S., et al., *Downregulation of constitutive and heavy metal-induced metallothionein-I expression by nuclear factor I*. Gene Expr, 2001. 9(4-5): p. 203-15.
113. Klassen, R.B., et al., *Megalyn mediates renal uptake of heavy metal metallothionein complexes*. Am J Physiol Renal Physiol, 2004. 287(3): p. F393-403.
114. Vasconcelos, M.H., et al., *Metal- and tissue-dependent relationship between metallothionein mRNA and protein*. Toxicol Appl Pharmacol, 2002. 182(2): p. 91-7.
115. Tang, C.M., J. Westling, and E. Seto, *trans repression of the human metallothionein IIA gene promoter by PZ120, a novel 120-kilodalton zinc finger protein*. Mol Cell Biol, 1999. 19(1): p. 680-9.
116. Beltramini, M., et al., *Effects of steroid hormones on the Zn, Cu and MTI/II levels in the mouse brain*. Brain Res, 2004. 1013(1): p. 134-41.
117. Beattie, J.H., et al., *Metallothionein is expressed in adipocytes of brown fat and is induced by catecholamines and zinc*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2000. 278(4): p. R1082-9.

118. Hidalgo, J., et al., *Liver, brain, and heart metallothionein induction by stress*. J Neurochem, 1990. 55(2): p. 651-4.
119. Carrasco, J., et al., *Interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha type 1 receptor deficient mice reveal a role of IL-6 and TNF-alpha on brain metallothionein-I and -III regulation*. Brain Res Mol Brain Res, 1998. 57(2): p. 221-34.
120. Hidalgo, J., et al., *Expression of metallothionein-I, -II, and -III in Alzheimer disease and animal models of neuroinflammation*. Exp Biol Med (Maywood), 2006. 231(9): p. 1450-8.
121. Carrasco, J., et al., *Metallothionein-I and -III expression in animal models of Alzheimer disease*. Neuroscience, 2006. 143(4): p. 911-22.
122. Uchida, Y., et al., *The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein*. Neuron, 1991. 7(2): p. 337-47.
123. West, A.K., et al., *Metallothionein in the central nervous system: Roles in protection, regeneration and cognition*. Neurotoxicology, 2008. 29(3): p. 489-503.
124. Aschner, M., *The functional significance of brain metallothioneins*. Faseb J, 1996. 10(10): p. 1129-36.
125. Yao, C.P., et al., *Foreign metallothionein-I expression by transient transfection in MT-I and MT-II null astrocytes confers increased protection against acute methylmercury cytotoxicity*. Brain Res, 2000. 855(1): p. 32-8.
126. Penkowa, M., et al., *Zinc or copper deficiency-induced impaired inflammatory response to brain trauma may be caused by the concomitant metallothionein changes*. J Neurotrauma, 2001. 18(4): p. 447-63.
127. Stankovic, R.K., R.S. Chung, and M. Penkowa, *Metallothioneins I and II: neuroprotective significance during CNS pathology*. Int J Biochem Cell Biol, 2007. 39(3): p. 484-9.
128. Hidalgo, J., et al., *Metallothionein expression and oxidative stress in the brain*. Methods Enzymol, 2002. 348: p. 238-49.
129. Duguid, J.R., et al., *Changes in brain gene expression shared by scrapie and Alzheimer disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. 86(18): p. 7260-4.
130. Bush, A.I., et al., *Modulation of A beta adhesiveness and secretase site cleavage by zinc*. J Biol Chem, 1994. 269(16): p. 12152-8.
131. Chung, R.S., et al., *The native copper- and zinc-binding protein metallothionein blocks copper-mediated Abeta aggregation and toxicity in rat cortical neurons*. PLoS One. 5(8): p. e12030.
132. Gardner, D.G.a.D.S., *Grrenspan's Basic & clinical endocrinology*. 8th ed. 2007, London: Mc Graw Hill Medical
133. Mindnich, R., G. Moller, and J. Adamski, *The role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases*. Mol Cell Endocrinol, 2004. 218(1-2): p. 7-20.
134. Zwain, I.H. and S.S. Yen, *Dehydroepiandrosterone: biosynthesis and metabolism in the brain*. Endocrinology, 1999. 140(2): p. 880-7.

135. Yaffe, K., et al., *Estrogen therapy in postmenopausal women: effects on cognitive function and dementia*. *Jama*, 1998. 279(9): p. 688-95.
136. Mulnard, R.A., et al., *Estrogen replacement therapy for treatment of mild to moderate Alzheimer disease: a randomized controlled trial. Alzheimer's Disease Cooperative Study*. *Jama*, 2000. 283(8): p. 1007-15.
137. Pinkerton, J.V. and V.W. Henderson, *Estrogen and cognition, with a focus on Alzheimer's disease*. *Semin Reprod Med*, 2005. 23(2): p. 172-9.
138. Yue, X., et al., *Brain estrogen deficiency accelerates Abeta plaque formation in an Alzheimer's disease animal model*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(52): p. 19198-203.
139. Petanceska, S.S., et al., *Ovariectomy and 17beta-estradiol modulate the levels of Alzheimer's amyloid beta peptides in brain*. *Neurology*, 2000. 54(12): p. 2212-7.
140. Pike, C.J., et al., *Protective actions of sex steroid hormones in Alzheimer's disease*. *Front Neuroendocrinol*, 2009. 30(2): p. 239-58.
141. Manthey, D., et al., *Estrogen induces a rapid secretion of amyloid beta precursor protein via the mitogen-activated protein kinase pathway*. *Eur J Biochem*, 2001. 268(15): p. 4285-91.
142. Li, R. and Y. Shen, *Estrogen and brain: synthesis, function and diseases*. *Front Biosci*, 2005. 10: p. 257-67.
143. Urabe, M., et al., *Effect of estrogen replacement therapy on hepatic triglyceride lipase, lipoprotein lipase and lipids including apolipoprotein E in climacteric and elderly women*. *Endocr J*, 1996. 43(6): p. 737-42.
144. Goncalves, I., et al., *Transthyretin interacts with metallothionein 2*. *Biochemistry*, 2008. 47(8): p. 2244-51.
145. Martinho, A., et al., *Human metallothioneins 2 and 3 differentially affect amyloid-beta binding by transthyretin*. *Febs J*. 277(16): p. 3427-36.
146. Xu, H., et al., *Estrogen reduces neuronal generation of Alzheimer beta-amyloid peptides*. *Nat Med*, 1998. 4(4): p. 447-51.
147. Dalby, B., et al., *Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications*. *Methods*, 2004. 33(2): p. 95-103.
148. Kingston, R.E., C.A. Chen, and H. Okayama, *Calcium phosphate transfection*. *Curr Protoc Immunol*, 2001. Chapter 10: p. Unit 10 13.