



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

Ciências da Saúde

## **Efeitos dos estrogénios na regulação dos *scavengers* do péptido beta-amilóide no plexo coróide**

**António Brójo Afonso**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Ciências Biomédicas**  
(2º ciclo de estudos)

Orientadora: Prof. Doutora Cecília Santos

**Covilhã, Outubro de 2015**



# Dedicatória

À minha família. Às matriarcas, que enfrentam a montanha de Sísifo sem pedantismo nem heroísmo.



# Agradecimentos

Sem demoras, escolhi redigir esta dissertação com as normas ortográficas anteriores ao Acordo Ortográfico de 1990. Este acordo é uma decisão política e é como tal que deve ser tratado. Não é uma decisão técnica sobre a melhor forma de escrever português, não é uma adaptação da língua escrita à língua falada, não é uma melhoria que alguém exigisse do português escrito, não é um instrumento de cultura e criação. Em jeito pessoano, “a minha pátria é a língua portuguesa”. Este é o meu contributo para a sua abolição.

Agradeço, em primeiro lugar, à Prof<sup>a</sup>. Doutora Cecília Santos, minha orientadora, pela disponibilidade e ajuda que sempre expressou ao longo da investigação. Um muito obrigado pelo encorajamento, empenho e dedicação.

Às colegas de laboratório e do centro de investigação, Ana Costa, Ana Duarte, Maria Maltez, Mariya Hrynychak e Joana Tomás, pela disponibilidade, conhecimentos e paciência prestados neste curto hiato temporal, que me permitiram atingir o término desta etapa académica.

À camaradagem das cerejas, pelas aventuras etéreas esculpidas no tempo. Espero poder continuar a reinventá-las.

Esta investigação foi apoiada ao abrigo da Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) (PTDC/SAU-NEU/114800/2009) e do projecto COMPETE (Pest-C/SAU/UI0709/2011)

Encerro com Vasco Lima Couto: *só agradeço o que peço / e não o que mereço*

Bem-haja a todos



## RESUMO

O plexo coróide (PC) tem um papel fundamental na remoção do péptido beta-amilóide (A $\beta$ ), que é um dos principais factores causadores da doença de Alzheimer (DA), do líquido cefalorraquidiano (LCR), evitando a sua acumulação e consequente morte neuronal. Na DA, o PC desenvolve disfunções semelhantes às observadas durante a senescência, nomeadamente a atrofia acentuada do seu epitélio, alterando significativamente as suas funcionalidades, culminando com a elevação da concentração de A $\beta$  no cérebro. Todas as estratégias de tratamento da DA têm sido direccionadas para o tratamento de sintomas e não para a sua prevenção. Por isso, é cada vez mais importante desenvolver estratégias terapêuticas preventivas no aparecimento desta patologia neurodegenerativa.

O PC é um alvo reconhecido das hormonas sexuais, e estes esteróides afectam a expressão de genes responsáveis pela eliminação de A $\beta$ , podendo ser determinantes na progressão da DA. O objectivo deste trabalho foi analisar a expressão de genes dos *scavengers* de A $\beta$  no PC de ratos *Wistar Han* recém-nascidos e estudar o efeito do tratamento com estradiol (E<sub>2</sub>) na expressão destes genes e, portanto, na DA. Principiou-se pela análise de vários genes dos *scavengers* de A $\beta$  (TTR, MT-2, IDE, GSN e ApoJ), por PCR convencional, em explantes de PC de ratos *Wistar Han* recém-nascidos, confirmando-se a sua expressão neste epitélio. Ulteriormente, a expressão dos genes dos *scavengers* de A $\beta$ , sob tratamento de E<sub>2</sub> em concentrações crescentes (10 nm e 100 nm) foi comparada por PCR em tempo real, verificando-se que estes genes são diferentemente expressos entre o grupo tratado com E<sub>2</sub> e o grupo de controlo. Por meio desta análise, podemos concluir que os estrogénios influenciam a expressão de algumas proteínas responsáveis pela depleção de A $\beta$ , podendo a terapia hormonal (TH) ter uma carácter preventivo contra a DA.

**Palavras-chave:** plexo coróide; beta-amilóide; *scavenger*; doença de Alzheimer; estrogénios

## ABSTRACT

The choroid plexus (CP) has a key role on the clearance of amyloid-beta peptide ( $A\beta$ ) from the cerebrospinal fluid (CSF), which is one of the major causative factors of Alzheimer's disease (AD), there by preventing its accumulation and consequent neuronal death. In this disease, CP develops dysfunctions similar to those seen during aging, including a significantly marked atrophy of the epithelium. Such modifications may alter the CP functions and hence, might increase the concentration of the  $\beta$ -amyloid ( $AB$ ) peptide in the brain. All treatment strategies of AD have been targeted for the treatment of symptoms and not for its prevention. Therefore, it is increasingly important to develop preventive therapeutic strategies in the onset of this neurodegenerative disease.

CP is a recognized target for sex hormones, and these sex hormones affect the expression of several genes responsible for the clearance of  $A\beta$  and thus may affect the progression of AD. The aim of this work was to analyze the expression of scavenging genes of  $A\beta$  in rat CP and study the effect of estradiol ( $E_2$ ) treatment in the expression of these genes, which may have an important role in neuroprotection against  $A\beta$  and hence Alzheimer's disease. We began by analyzing the expression of several genes with  $A\beta$ -scavenging properties (TTR, MT-2, IDE, GSN and ApoJ), by PCR, in the CP explants of newborn Wistar Han rats, confirming their expression in this epithelia. Later, the expression of TTR, MT-2, IDE, GSN and ApoJ, under treatment  $E_2$  (in two concentrations: 10 nm and 100 nm), was compared by Real-time PCR through which it was possible to confirm that these genes are differentially expressed between treated and non-treated rats. From this analysis we conclude that estrogens can influence the expression of some proteins associated with the clearance of  $A\beta$ , and extrapolate that hormone therapy might have a preventive character against AD.

**Keywords:** entrepreneurship; entrepreneurial intention, propensity to take risks, personal and professional background, entrepreneurial motivation, entrepreneurial self-efficacy; institutional environment.

# Índice

<b>I. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1. Plexo coróide .....	1
1.1. Estrutura e morfologia.....	2
1.2. Funções biológicas.....	3
1.2.1. Produção (síntese proteica) e secreção química.....	4
1.2.2 Protecção.....	5
1.2.3 Desenvolvimento do sistema nervoso central.....	6
1.3. Alterações do plexo coróide associadas ao envelhecimento.....	7
1.3.1. Alterações morfológicas.....	7
1.3.2. Alterações funcionais.....	7
2. Doença de Alzheimer.....	9
2.1. Péptido beta-amilóide.....	10
2.2. Eliminação do péptido beta-amilóide.....	13
2.3. <i>Scavengers</i> do péptido beta-amilóide.....	14
2.3.1. Transtirretina.....	14
2.3.2. Metalotioneínas.....	16
2.3.3. Enzima degradadora da insulina.....	19
2.3.4. Gelsolina.....	20
2.3.5. Apolipoproteína J.....	21
2.4. Alterações metabólicas.....	23
3. Papel dos estrogénios.....	25
3.1. Estrogénios.....	25
3.2. Regulação dos <i>scavengers</i> do péptido beta-amilóide por estrogénios.....	25
3.3. Terapia hormonal e o risco de doença de Alzheimer em mulheres pós-menstruais.....	27
4. Objectivo.....	28
<b>II. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>29</b>

1. Animais.....	29
2. ARN total .....	30
2.1. Extracção do ARN total.....	30
2.2. Determinação da integridade do ARN total.....	31
2.3. Quantificação do ARN total.....	31
3. Transcrição reversa e PCR convencional.....	31
4. PCR em tempo real .....	33
5. Análise estatística.....	34
<b>III. RESULTADOS .....</b>	<b>35</b>
1. Expressão dos <i>scavengers</i> do péptido beta .....	35
1.1. PCR em tempo real.....	35
<b>IV. DISCUSSÃO .....</b>	<b>39</b>
<b>V. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>44</b>
<b>VI. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>45</b>

## Lista de Figuras

Figura 1: Vista lateral esquerda do sistema ventricular do encéfalo.....	2
Figura 2: Composição, função e alterações com o envelhecimento e a DA da barreira sangue-cérebro.....	8
Figura 3: Hipótese da cascata amilóide.....	12
Figura 4: Mecanismos de eliminação de A $\beta$ .....	13
Figura 5: Esquema do estudo experimental sobre os efeitos de E <sub>2</sub> na regulação dos <i>scavengers</i> de A $\beta$ .....	29

## Lista de Gráficos

Gráfico 1: Níveis de expressão do ARN mensageiro do gene da TTR em PC de rato.....	36
Gráfico 2: Níveis de expressão do ARN mensageiro do gene da MT-2 em PC de rato.....	36
Gráfico 3: Níveis de expressão do ARN mensageiro do gene da IDE em PC de rato.....	37
Gráfico 4: Níveis de expressão do ARN mensageiro do gene da GSN em PC de rato.....	37
Gráfico 3: Níveis de expressão do ARN mensageiro do gene da ApoJ em PC de rato.....	38

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Sequências dos <i>primers</i> dos genes dos <i>scavengers</i> de A $\beta$ .....	33
--	----

# Lista de abreviaturas, acrónimos e siglas

A $\beta$  - beta-amilóide

AD - Alzheimer's disease

ADN - Ácido desoxirribonucleico

ApoE - Apolipoproteína E

ApoJ - Apolipoproteína J

APP - *Amyloid precursor protein*

ARN - Ácido ribonucleico

BDNF - *Brain-derived neurotrophic factor*

CP - *Choroid plexus*

CSF - *Cerebrospinal fluid*

DA - Doença de Alzheimer

DEPC - Dietil policarbonato

DMSO - Dimetilsulfóxido

E<sub>2</sub> - Estradiol

EUA - Estados Unidos da América

GSN - Gelsolina

IDE - *Insulin-degrading enzyme*

IGF-II - *Insulin-like growth factor*

LCR - Líquido cefalorraquidiano

MT-1 - Metalotioneína-1

MT-1/2 - Metalotioneína-1/2

MT-2 - Metalotioneína-2

MT-3 - Metalotioneína-3

MT-4 - Metalotioneína-4

MTs - Metalotioneínas

PC - Plexo coróide

PCR - Polymerase chain reaction

**RBP** - *Retinol-binding protein*

**SDS** - *Sodium dodecyl sulfate*

**TGF- $\alpha$**  - *transforming growth factor alpha*

**TGF- $\beta$ 1** - *transforming growth facto beta 1*

**TJ** - *Tight junctions*

**TNF $\alpha$**  - *Tumor necrosis factor alpha*

**TTR** - *transtirretina*

**VEGF** - *Vascular endotelial growth factor*

**WT** - *Wild-type*



# I. Introdução

## 1. Plexo coróide

No cérebro existem quatro ventrículos cerebrais interconectados (figura 1). Os dois ventrículos laterais, confinados respectivamente a cada um dos dois hemisférios cerebrais, encontram-se ligados ao terceiro ventrículo pelo forâmen de Monro. Este centra-se em redor do plano sagital médio numa posição inferior às cavidade ventriculares laterais e superior ao quatro orifício ventricular. A ligação entre o terceiro e quatro ventrículos é assegurada pelo aqueduto de Sylvius. Em termos macroscópicos, o quatro ventrículo encontra-se conectado ao espaço subaracnóide pelas aberturas lateral (forâmen de Luschka) e média (forâmen de Magendie). O espaço subaracnóide está contido entre a pia-máter e a aracnóideia. A restante, a dura-máter, é uma membrana dura e fibrosa que adere à parede do crânio, estando praticamente em contacto directo com a aracnóideia (Aminoff 2005; Kurtcuoglu et al. 2005; Smith et al. 2013).

As paredes internas das concavidades ventriculares cerebrais são cobertas por epêndima, e têm como principal função o alojamento e armazenamento do LCR. O plexo PC localiza-se e distribui-se no interior de cada uma das depressões ventriculares cerebrais, projectando-se como uma franja vascularizada (modificação da pia-máter), que comunica com o epêndima da cavidade ventricular, sendo o constituinte maioritário da barreira hematoencefálica (Zheng et al. 2002; Redzic & Segal 2004; Emerich et al. 2005). Trata-se de um tecido fulcral no desenvolvimento, homeostasia e reparação do SNC, com grande relevância e implicação no transporte de nutrientes, regulação endócrina, envelhecimento (senescência) e patogenicidade de determinados distúrbios neurodegenerativos (Zheng & Zhao 2002). A forte irrigação confere-lhe uma coloração rosada, possuindo também um aspecto rendilhado pelas suas inúmeras vilosidades, sendo facilmente distinguido dos capilares sanguíneos cerebrais (revisto por Redzic & Segal 2004; Kurtcuoglu et al. 2005; Emerich et al. 2005).

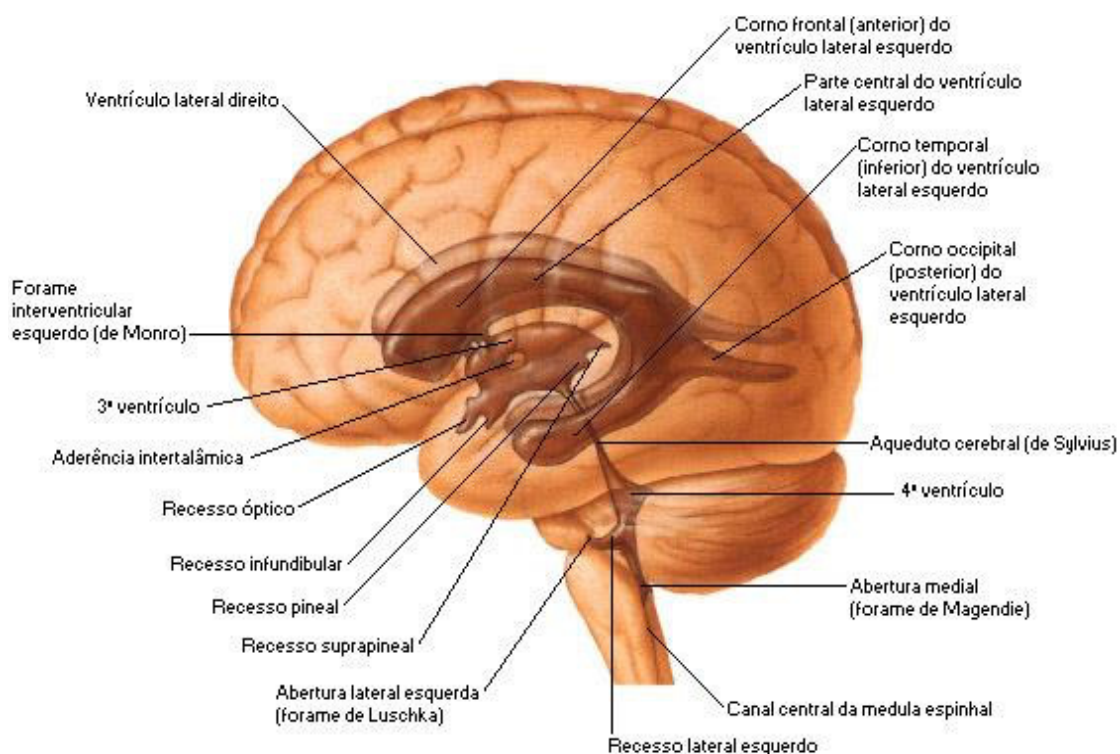


Figura 1 - Vista lateral esquerda do sistema ventricular do encéfalo. O sistema ventricular é constituído por quatro ventrículos: dois ventrículos laterais, o terceiro ventrículo e o quarto ventrículo. Adaptada de (Patten 2006).

## 1.1. Estrutura e morfologia

A ausência de drenagem linfática cerebral (Davson, H., Segal 1995) é colmatada pela existência de um compartimento fluído, desprovido de linfa e de comportamento similar: o LCR, que preenche um complexo de cavidades ventriculares interconectadas no interior do cérebro, ventrículos (alinhados com o epêndima) e espaço subaracnóide que envolve o cérebro (Keep et al. 1998). A camada celular endotelial continua para o epitélio endotelial do PC - estrutura com morfologia semelhante a uma folha, flutuante em LCR, em estreito contacto com o epêndima por um fino caule -, estando também em continuidade com o revestimento exterior do PC (figura 2). Contudo, nesta localização particular, verifica-se uma modificação na sua composição, apresentando-se numa camada única de células epiteliais abundante em mitocôndrias, unidas por *tight junctions* (Del Bigio 1995) envolventes que se encontram concentradas num espaço e comprimento diminutos de um complexo emaranhado de fios nas proximidades do LCR (lado apical), prevenindo a passagem livre entre o sangue (lado basal) e o LCR por via paracelular (revisto por Redzic & Segal 2004).

As *tight junctions* (TJ) formadas entre células epiteliais do PC diferem das células endoteliais da barreira sangue-cérebro (BSC) (figura 2). No PC, as zonas de oclusão são relativamente

pequenas e concentradas, e em contacto próximo com a face apical (lado do LCR) do tecido, verificando-se, todavia, a existência de zonas de aderência de padrão difuso, disseminadas ao longo do comprimento da fenda intercelular. Apesar de as junções na zona de oclusão serem de reduzida dimensão, estas impedem a progressão de moléculas instiladas quer do lado apical quer face da sanguínea. Considerando o plano a partir do, os compostos podem preencher o espaço intersticial do plexo coróide e penetrar ao longo da via paracelular, sendo a sua progressão interrompida pelas TJ (por exemplo, grandes moléculas de água). Contudo, algumas moléculas, como a aglutinina, possam entrar para as células do PC por endocitose, e posteriormente conseguir acesso ao lado do LCR, por um processo ainda mais complexo (Balin & Broadwell 1988).

Finalmente, na face apical situa-se um denso revestimento de microvilosidades, e entre as paredes laterais do PC emergem interdigitações abrangentes, próximas do lado sanguíneo do tecido (Figura 2). Tais estruturas expandem significativamente a área de superfície do PC, ainda que apresente uma dimensão reduzida comparativamente à interface da barreira hematoencefálica (Keep & Jones 1990). O núcleo do PC comporta uma vasta rede vascular de capilares fenestrados relativamente grandes, que permitem a fácil transição de moléculas pequenas e hidrofóbicas para o fluído intersticial do PC (Balin & Broadwell 1988). A prossecução de compostos polares para o LCR é limitada pelas paredes de natureza lipídica do PC e TJ, encerrando as vias paracelulares (revisto por Redzic & Segal 2004).

## 1.2. Funções biológicas

Fundamentalmente, a função primordial do PC é a produção e secreção de LCR. Apesar da distribuição única de transportadores/canais iónicos, a síntese de LCR é similar à produção de fluídos orgânicos em outros epitélios, baseando-se na energia libertada pela hidrólise de ATP, que conduz o fluxo unidireccional de iões, concomitantemente acompanhado pelo movimento osmótico das moléculas de água. O PC tem um papel importante na homeostasia dos nutrientes no LCR, pois os parâmetros cinéticos de glicose e aminoácidos transportados através PC são a razão fundamental para concentração reduzida destas moléculas no LCR. O PC é provavelmente a fonte de hormonas e factores de crescimento provenientes do LCR, incluindo o IGF II (do inglês, *insulin-like growth factor II*), vasopressina e o TGF- $\beta$ 1 (do inglês, *transforming growth factor  $\beta$ 1*). O PC é ainda perpetrador da síntese de proteínas transportadoras de hormonas da tiróide: transtirretina (TTR) e a transferrina, e capaz de quelar metais pesados (revisto por Redzic & Segal, 2004).

### 1.2.1. Produção (síntese proteica) e secreção química

Segregar LCR é a actividade exercida de maior destaque pelo PC (revisto por Redzic & Segal 2004). O LCR é um líquido transparente derivado do plasma, que protege o SNC contra acidentes físicos e químicos. É uma solução salina que contém aproximadamente 0,3% de proteínas do plasma com uma concentração (Kurtcuoglu et al. 2005). Com um pH próximo de 8, contém também glicose, em reduzida concentração, proteínas (TTR, em particular), ácido láctico, folato, ureia, catiões ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ), aniões ( $\text{Cl}^-$  e  $\text{HCO}_3^-$ ) e também uma diminuta percentagem de leucócitos (Spector 1977; Segal 2000; Emerich et al. 2005). É igualmente responsável pelo transporte de oxigénio e outros compostos necessários do sangue para os neurónios e células gliais, circulando continuamente (Segal 2001; Spector et al. 2015). Os níveis de folato são duas a três vezes superiores no LCR em relação aos verificados no plasma (Spector 1977), e a quantidade de TTR corresponde a 25% do volume total deste líquido (Palha et al. 2000). Os principais componentes iónicos que compõem o LCR são o sódio, o cloro e o bicarbonato (Emerich et al. 2005).

O tecido cerebral é suportado pelo LCR, que contribui para a sua homeostasia em termos mecânicos, químicos e nutritivos. O LCR funciona como “amortecedor” ao tecido cerebral e da medula espinhal ao proteger o crânio de choques físicos (colisão dos órgãos com as paredes ósseas das cavidades cranianas e vertebrais) e ao reduzir a tensão nas raízes nervosas (Kurtcuoglu et al. 2005). Permite que o cérebro flutue na cavidade craniana (diminui o efeito da gravidade) (Kurtcuoglu et al. 2005), com uma redução de massa em cerca de 25% de um (revisto por Redzic & Segal 2004). A transmissão sináptica neuronal é assegurada por um ambiente químico óptimo, pois alterações lentas na composição iónica do LCR podem interromper seriamente a produção de potenciais activos e pós-sinápticos (Kurtcuoglu et al. 2005). O PC nutre a totalidade do SNC através da renovação contínua de LCR, fornecendo micronutrientes, neurotrofinas, neuropéptidos e factores de crescimento (revisto por Redzic & Segal 2004; Emerich et al. 2005); e mantém o meio extracelular, através de processos pós-traumáticos ou desintoxicação (Serot et al. 2003). Estima-se que o volume total de LCR, num ser humano adulto, se situe entre 150 - 270 mL (Redzic et al. 2005), sendo produzidos ao longo do dia aproximadamente 600 mL, o suficiente para repor três a quatro vezes o volume deste líquido (Emerich et al. 2005).

O conjunto de ATPases, os numerosos canais iónicos e as aquaporinas presentes nas faces das membranas apicais e basolaterais estimulam o processo de secreção contínua do LCR. O transporte de iões sódio, cloro e bicarbonato do sangue periférico para os ventrículos através do PC, e o transporte de potássio em sentido inverso, originam um gradiente osmótico que promove a secreção de água na direcção dos ventrículos cerebrais (Brown et al. 2004; Thanos et al. 2010). Desta forma, a formação de LCR não resulta unicamente da filtração passiva de líquidos mediante as células epiteliais do PC (Segal 2001), mas sim da sua secreção activa

através destas (Redzic et al. 2005), num fluxo completo contínuo dos orifícios ventriculares laterais pelo forâmen de Monro para o terceiro ventrículo, e posteriormente do aqueduto de Sylvius para a quarta cavidade ventricular. Flui depois pelo forâmen lateral de Luschka e pelo forâmen mediano de Magendie (Cutler et al. 1968), passando pela cisterna cerebello-medular (figura 1). O seguimento dá-se pela medula espinhal e acima dos hemisférios cerebrais. A absorção (retorno à corrente sanguínea) do LCR ocorre principalmente pelas granulações aracnóideas que se encontram conectadas predominantemente ao seio longitudinal superior (Cutler et al. 1968; Kurtcuoglu et al. 2005).

Relativamente à capacidade de produção de outros compostos, o PC é um tecido alvo da acção de neuropéptidos, designadamente citocinas (as interleucinas -1, -1 $\beta$  e -6 e o TNF $\alpha$  [do inglês, *tumor necrosis factor alpha*]), hormonas (a angiotensina II, o péptido natriurético arterial, a vasopressina, a hormona de crescimento, a insulina, a leptina e a prolactina) e factores de crescimento (o IGFII, o TGF- $\beta$ 1, o VEGF [do inglês, *vascular endothelial growth factor* e o BDNF [do inglês, *brain-derived neurotrophic factor*]) (Chodobski & Szmydynger-Chodobska 2001). Além da síntese destes polipéptidos, o PC expressa também os seus receptores específicos, o que indica a condução de acções endócrinas e parácrinas sobre as células epiteliais, e a promoção de efeitos endócrinos dos neuropéptidos, quando libertados e transportados no LCR, em células-alvo no encéfalo (Chodobski & Szmydynger-Chodobska 2001; Emerich et al. 2005). O PC produz ainda um produto péptido que é seu apanágio: a TTR, que representa mais de 20% das proteínas sintetizadas e 50% das proteínas secretadas (Palha et al. 2000; Chodobski & Szmydynger-Chodobska 2001). Também designada pré-albumina, tem como função principal o transporte e manutenção dos níveis fisiológicos das hormonas da tiróide, T3 e T4, no SNC, e de formação de agregados estáveis com o A $\beta$ , sequestrando-o e, conseqüentemente, prevenindo a formação de complexos insolúveis no cérebro, que constituem um marcador molecular clássico da DA (Costa et al. 2008).

### 1.2.2. Protecção

Como referido anteriormente, o PC apresenta funções de protecção, de índole mecânica e química. No entanto, estas acções estendem-se como sistema de desintoxicação do SNC e prevenção de agressões neurotóxicas agudas, com controlo do efluxo, sequestro e metabolismo de toxinas/drogas, mediante um conjunto de enzimas de funcionalização, que catalisam reacções de oxidação, redução ou hidrólise de grupos funcionais de compostos com vista à sua eliminação/excreção. Do aglomerado de enzimas referido, destacam-se o citocromo p-450, as enzimas de conjugação que protegem contra o stress oxidativo (por exemplo, a superóxido dismutase), as metalotioneínas, as cisteínas, as glutatónicas, que sequestram agentes tóxicos em circulação, os sistemas de transporte de iões orgânicos e as

enzimas de transporte de drogas, que exportam compostos tóxicos do LCR (Emerich et al. 2005). O PC possui também a capacidade de absorção de proteínas e resíduos metabólicos provenientes do LCR por pinocitose ou transporte activo. As vesículas resultantes do processo de pinocitose são digeridas a nível intercelular ou libertadas por entre a membrana basolateral das células epiteliais para o estroma do tecido conectivo e vasculatura sanguínea periférica envolvente (Mortazavi et al. 2014).

Embora seja uma estrutura presente num órgão privilegiado em termos imunitários, o PC ostenta a capacidade de mediação de actividades entre o sistema imunitário periférico e o cérebro, concretamente através da libertação coordenada de citocinas pró-inflamatórias (Lacroix et al. 1998), da expressão de proteínas do major de histocompatibilidade I e II, em situações de invasão patogénica do LCR, e de apresentação antigénica, estimulando a proliferação de linfócitos T, possuindo assim um sistema de sobrevivência intrínseco, e de vigilância imunitária contra agentes patogénicos e antigénios em circulação entre o sangue periférico e o LCR (Wang & Kaur 2000; Emerich et al. 2005).

### **1.2.3. Desenvolvimento do sistema nervoso central**

A complementar a importante protecção física do crescimento cerebral, a manutenção de pressão hidrostática suficiente do LCR no sistema ventricular, resultante da produção e secreção de LCR pelo epitélio neuronal, é significativa nos mecanismos associados ao desenvolvimento do SNC - divisão, migração e diferenciação celulares e génese sináptica. Num estudo conduzido em embriões de galinha, foi demonstrado que a drenagem lenta de LCR do sistema ventricular provoca anormalidades consideráveis na organização neuronal do cérebro em crescimento. Adicionalmente, as células epiteliais do PC imaturo sintetizam, tal como o PC adulto, um número elevado de neuropéptidos, factores de crescimento e citocinas. A desproporção entre o tamanho das cavidades ventriculares e da fina camada de epitélio neuronal (responsável pela regulação da transferência de moléculas através da interface sangue-LCR, dependente da presença de *tight junctions* entre células adjacentes), no cérebro imaturo em relação ao cérebro maturo, encurta a distância de difusão destes compostos até aos seus alvos putativos, levantando a possibilidade de o PC embriogénico desempenhar activamente acções no desenvolvimento do SNC (Redzic et al. 2005; Liddelow 2015).

## **1.3. Alterações do plexo coróide associadas ao envelhecimento**

### **1.3.1. Alterações morfológicas**

A senescência induz alterações morfológicas atrofiantes no PC (figura 2), provocando atrofia nas suas acções. A massa e a altura das células epiteliais diminuem entre 10% a 15% e 10% a 12%, respectivamente, resultando em irregularidades na forma arredondada do núcleo, tornando-se achatado e alongado, com espessamento da membrana basal, no citoplasma surgem inclusões fibrilares, designados por Biondi, e o estroma que envolve o epitélio apresenta um aspecto fibroso, com maior espessamento, devido à deposição de fibras de colagénio, de inclusões de hialina e de calcificações (Dohrmann 1970; Shuangshoti & Netsky 1970; Wen et al. 1999; Segal 2001; Serot et al. 2003; Emerich et al. 2005). As paredes da vasculatura que sustentam as células epiteliais e a lâmina própria espessam, tornam-se gradualmente mais rígidas e verifica-se a fragmentação das fibras elásticas (Dohrmann 1970; Shuangshoti & Netsky 1970).

### **1.3.2. Alterações funcionais**

No SNC adulto, o PC aparenta estar profundamente envolvido nos processos de reparação neuronal e de restauração do microambiente cerebral após um acidente isquémico cerebral traumático, dado que alguns estudos sugerem que o PC promove o desenvolvimento de células neuronais e de células precursoras de astrócitos (Redzic et al. 2005).

Com o decorrer do processo de envelhecimento, o eixo PC-LCR exhibe um declínio transversal nas suas funcionalidades, incluindo na síntese proteica e secreção de LCR, cuja taxa de produção diminui cerca de 45% e a sua renovação torna-se mais lenta, ocorrendo completamente apenas duas vezes por dia (Preston 2001; Serot et al. 2003; Redzic et al. 2005).

Em termos metabólicos, a produção enzimática (essenciais para a manutenção) diminui, como nos casos do lactato desidrogenase e da succinato desidrogenase. Também intermediários químicos (co-transportadores), responsáveis pela produção de ATP, apresentam reduções de actividade, levando a alterações na disponibilidade de metabolitos dependentes do catabolismo da glicose (Serot et al. 2003; Emerich et al. 2005). Noutra instância, o número de células epiteliais deficientes em citocromo c oxidase aumenta, induzindo modificações na cadeia respiratória mitocondrial, provocando uma diminuição na quantidade de ATP produzido (Cottrell et al. 2001; Serot et al. 2003; Emerich et al. 2005).

Todas as alterações anatômicas e fisiológicas (figura 2) referidas causam disfunções na produção, secreção e renovação de LCR, na distribuição de substâncias nutritivas ao encéfalo e na remoção de compostos tóxicos do cérebro, incrementando o risco de desenvolvimento de patologias associadas ao envelhecimento, como a DA (Redzic et al. 2005).

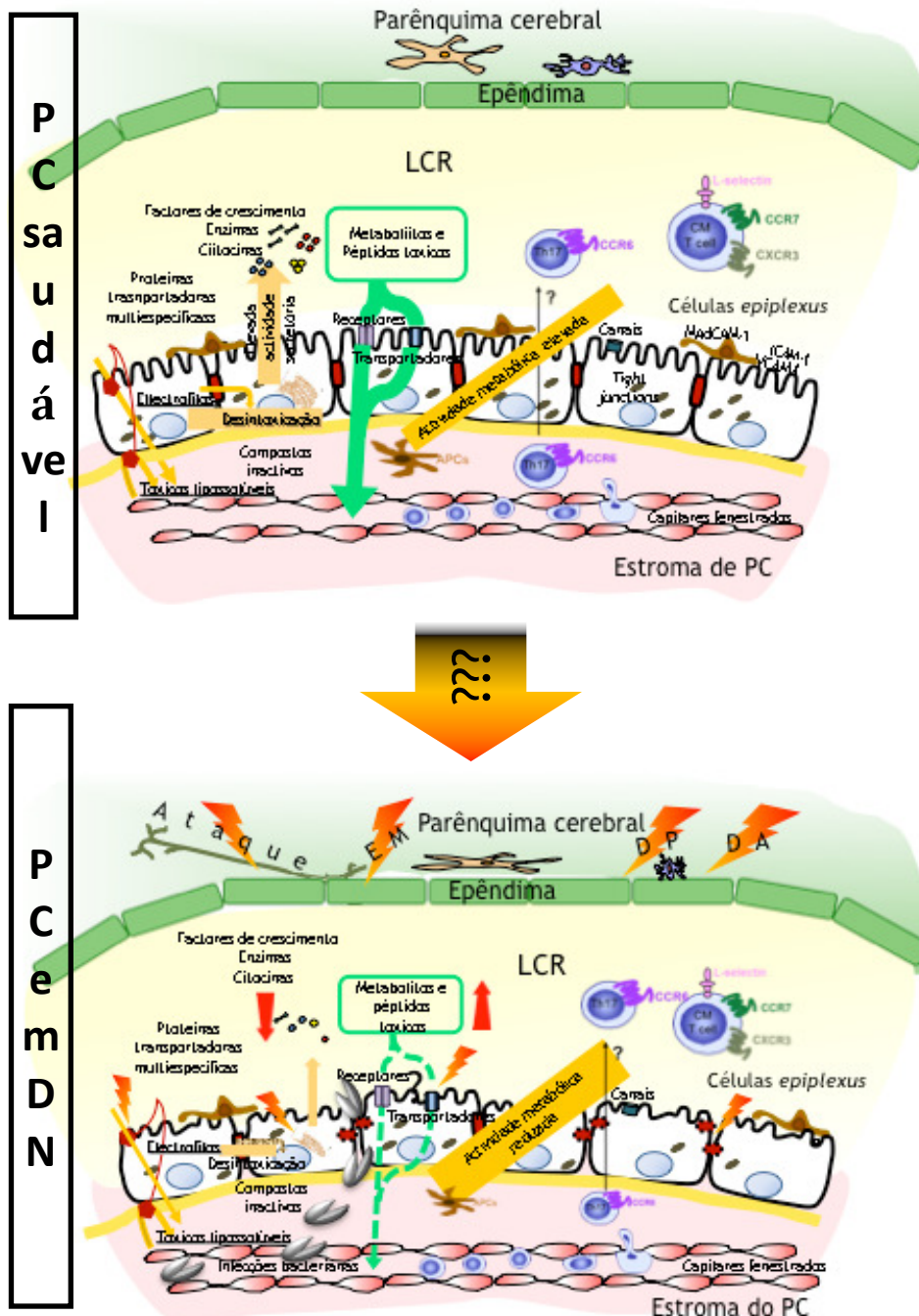


Figura 2 - Composição, função e alterações com o envelhecimento e a DA da barreira sangue-LCR. O PC é formado por uma monocamada de células epiteliais originárias de células ependimárias que alinham os ventrículos cerebrais, formando uma estrutura coesa - o estroma. O PC produz LCR. As células epiteliais do PC contêm transportadores e receptores em ambos os lados basolateral e apical.

Alterações severas são observadas nas células epiteliais da barreira sangue-LCR durante o envelhecimento e em casos de AVC e doença degenerativa.

## 2. Doença de Alzheimer

Descrita pela primeira vez em 1906 pelo psiquiatra e neuropatologista alemão Alois Alzheimer, que apontou a esperança média de vida dos doentes para os 42 anos (Boughey & Graff-Radford 1987; Giannopoulos & Praticò 2015). O avanço notável da esperança média de vida ocorrido durante o século XX tornou a DA uma desordem comum durante o envelhecimento (Selkoe 2015). A degenerescência progressiva patológica do cérebro define-se clínica e patologicamente com pérfida perda de memória anterógrada (capacidade de adquirir nova informação) e défices em vários domínios cognitivos: linguagem, dialética, habilidade visual e espacial, práxis, estabilidade comportamental e função executiva (Boughey & Graff-Radford 1987), que conduzem inexoravelmente à demência transversal e à morte prematura do doente (Selkoe 2015). Na autópsia, observa-se a existência de uma miríade de placas senis resultantes de depósitos amilóides extracelulares e emaranhados neurofibrilares derivados da proteína intraneuronal *tau* no sistema límbico e zonas corticais associadas e regiões que para si se projectam (Boughey & Graff-Radford 1987; Selkoe 2015).

A enfermidade provoca demência em 70% do casos, sabendo-se que cerca de 36 milhões de pessoas em todo o mundo apresentam este sintoma. Entre as idades de 65 e 69 anos, a incidência da doença é de 3,5 casos em 1000 por ano, aumentando para 72,8 casos em 1000 por ano entre os 85 e 89 anos de idade. Os números indicam uma duplicação da incidência a cada incremento de 5 anos de idade. A prevalência do mal é menor em indivíduos com idade inferior a 65 anos, mas aumenta entre 10% e 30% entre pessoas com idade superior a 85 anos (Boughey & Graff-Radford 1987).

A DA manifesta-se em ambas as formas familiar e esporádica. A primeira é provocada por mutações em genes singulares, herdadas num padrão autossómico dominante, que correspondem a aproximadamente 5% do total de casos. Mutações ocorridas no gene que codifica para o precursor do A $\beta$  (APP) foram descobertas no início dos anos de 1990, conhecendo-se actualmente 18. Outros casos familiares de DA afectam os genes de codificam para as presenilinas 1 e 2 (PS1 e PS2), moléculas que compõe o complexo da  $\gamma$ -secretase. Relativamente à segunda forma da doença, revela-se a mais comum e o resultado de uma interacção complexa entre factores genéticos e risco e elementos ambientais. Ainda que vários estudos demonstrem o papel de vários genes na patogénese da DA esporádica, os dados mais consistentes foram obtidos para a apolipoproteína E (ApoE), tendo-se demonstrado, por via epidemiológica, que os doentes com DA apresentam maior probabilidade de possuir o alelo

$\epsilon 4$  do gene, entre outros genes, como a enzima reguladora da insulina (IDE; do inglês, *insulin-degrading enzyme*) (Giannopoulos & Praticò 2015).

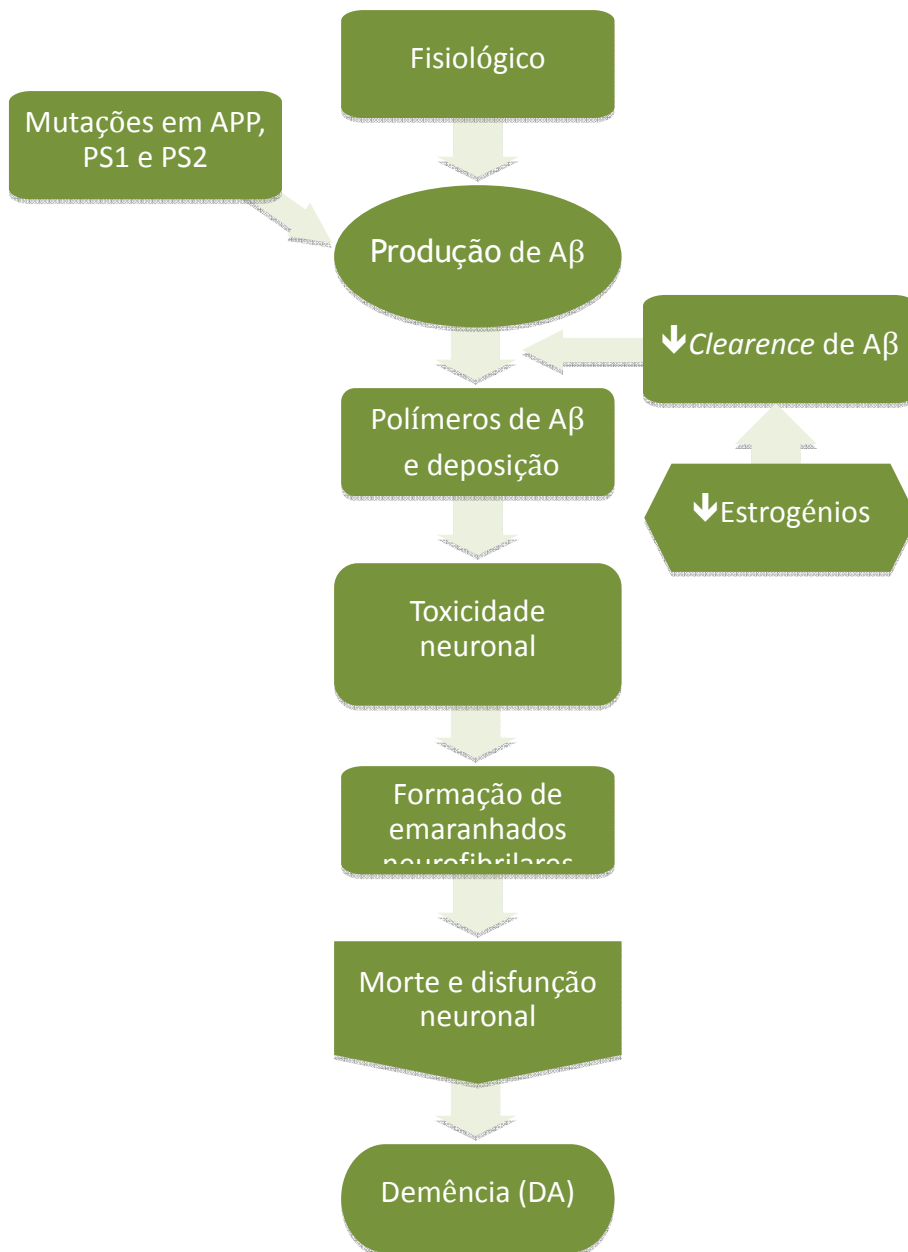
## 2.1. Péptido beta-amilóide

A hipótese da cascata amilóide (figura 3), formulada por Hardy e Higgins em 1992 (Chen et al., 2013), tem sido apontada como o principal modelo para explicar os mecanismos patogénicos que conduzem à DA (Boughey & Graff-Radford 1987; DeKosky & Orgogozo 2001; Chen et al. 2013; Giannopoulos & Praticò 2015). O núcleo deste modelo baseia-se na acumulação excessiva de A $\beta$  no início e na progressão de DA (Boughey & Graff-Radford 1987; DeKosky & Orgogozo 2001; Chen et al. 2013; Giannopoulos & Praticò 2015). Este facto é corroborado pela descoberta de mutações associadas à forma familiar de DA (Chen et al. 2013).

O A $\beta$  é produzido por clivagem sequencial proteolítica da proteína precursora amilóide (APP; do inglês, amyloid precursor protein) por secretases (Giannopoulos & Praticò 2015; DeKosky & Orgogozo 2001; Boughey & Graff-Radford 1987; Bertram 2013). Existem duas vias, ambas activas e envolvidas no metabolismo regular do A $\beta$ , sendo que uma resulta na produção de péptidos de A $\beta$  e a outra não. Na via amiloidogénica, o primeiro passo envolve a clivagem do APP na extremidade amino terminal pela  $\beta$ -secretase (protéase), resultando na formação de APP $\beta$  solúvel e de um fragmento conectado há membrana pelo terminal carboxílico (CTF- $\beta$ ). A divisão do CTF- $\beta$  pela  $\gamma$ -secretase culmina na formação de péptidos de A $\beta$  de tamanho variável, incluindo duas isoformas (mais comuns) de 40 (A $\beta$ 40) e 42 (A $\beta$ 42) aminoácidos, respectivamente (Boughey & Graff-Radford 1987; Bertram 2013; Giannopoulos & Praticò 2015). O A $\beta$ 40 é menos propenso a um processo de oligomerização e menos neurotóxico comparativamente ao A $\beta$ 42 (Giannopoulos & Praticò 2015). Este constitui menos de 10% do total de proteína amilóide secretada e apresenta maior probabilidade de formar fibrilas que o A $\beta$ 40; é também encontrado no cérebro de todos os doentes com DA, enquanto o A $\beta$ 40 se observa em dois terços dos casos (Boughey & Graff-Radford 1987; Bertram 2013). Após a libertação de A $\beta$ , esta molécula sofre alterações complexas na sua conformação, transitando de pequenos fragmentos solúveis e oligómeros para grandes fibrilas, que por sua vez formam placas que se acumulam no meio extracelular. Quanto à via não-amiloidogénica, a enzima  $\alpha$ -secretase é responsável pela clivagem a meio do APP em APP $\alpha$  e CTF- $\beta$ , que é posteriormente dividida pela  $\gamma$ -secretase em P3 e CTF- $\gamma$  (Boughey & Graff-Radford 1987; Giannopoulos & Praticò 2015).

A distribuição anatómica patológica dos emaranhados da proteína *tau* correlaciona-se em

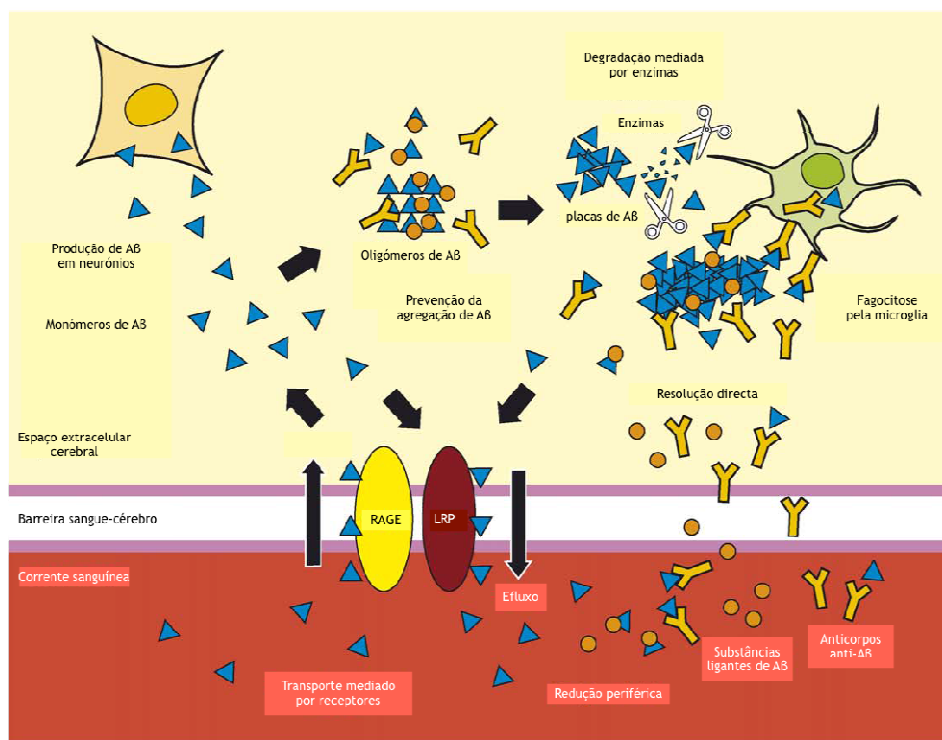
maior grau com o quadro clínico de DA em relação à distribuição anatômica das placas de A $\beta$  (Boughey & Graff-Radford 1987). As formas hiperfosforilada e agregada da *tau* são os componentes principais dos emaranhados neurofibrilares (Boughey & Graff-Radford 1987; Chen et al. 2013; Giannopoulos & Praticò 2015). Em condições normais, a *tau* é uma proteína solúvel, que existe abundantemente os axônios, onde promove a montagem e estabilização dos microtúbulos e transporte de vesículas (Giannopoulos & Praticò 2015). Porém, quando hiperfosforilada, a *tau* torna-se insolúvel, perde afinidade para os microtúbulos e tende a auto-agregar-se em pares de estruturas filamentosas e helicoidais, dando origem ulterior a emaranhados neurofibrilares (Boughey & Graff-Radford 1987; DeKosky & Orgogozo 2001; Chen et al. 2013; Giannopoulos & Praticò 2015). Similarmente aos oligômeros de A $\beta$ , os agregados intermediários de moléculas de *tau* anormais são citotóxicos e desempenham uma função no decréscimo de memória e cognição (Chen et al. 2013; Giannopoulos & Praticò 2015). Por esta razão, alguns autores propuseram que a *tau*, ao invés do A $\beta$ , é a causa da doença. Adicionalmente, muitos doentes não revelam demência, ainda que apresentem amplas placas de A $\beta$  (Boughey & Graff-Radford 1987).



**Figura 3 - Hipótese da cascata amilóide.** O A $\beta$  é um metabolito normal que, em condições fisiológicas, é constantemente sintetizado e celeremente degradado. Devido a defeitos genéticos como mutações no APP, PS1 e PS2, a produção de A $\beta$  aumenta, resultando na forma familiar de DA. Um fenótipo similar pode ocorrer com a diminuição das vias do catabolismo de A $\beta$ . Com a senescência, os níveis de hormonas sexuais diminuem, podendo reduzir-se a depleção de A $\beta$ . A acumulação de A $\beta$  principia pela oligomerização, formando-se gradualmente fibrilas, e culmina com placas amilóides visíveis microscopicamente. A morfologia fibrilar e solúvel e as proteínas associadas a placas são tóxicas para neurónios, resultando em perda sináptica, geração de emaranhados neurofibrilares e eventual morte neuronal e DA. Adaptada de (revisito por Wang et al. 2006)

## 2.2. Eliminação do péptido beta-amilóide

Os monómeros A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42 são catabolitos fisiológicos não neurotóxicos de um precursor membranar da APP encontrados no plasma, CSF e fluido intersticial. A única grande diferença entre os dois é que o A $\beta$ 42 oligomeriza mais rapidamente que o A $\beta$ 40 (Ono et al. 2005; FINDER & GLOCKSHUBER 2007). O A $\beta$ 42 pode ser eliminado de diversas formas: (1) é reabsorvido nos capilares por transportadores (Deane et al. 2009); (2) é localmente degradado por várias enzimas; (3) é drenado para o CSF, onde forma complexos com apolipoproteínas ou com a TTR, que se ligam a um transportador coróide e são enviados para o sangue (Alvira-Botero & Carro 2010). Esta última via parece ser secundária e elimina 10-15% do A $\beta$  (Tanzi et al. 2004). Além disso, os péptidos amilóides solúveis e fibrilares podem ser também resgatados pela endocitose microglial e astrocítica (Chung et al. 1999; Nielsen et al. 2010), no cérebro ou através de células endoteliais, incluindo a barreira hematoencefálica (Bell et al. 2009). O A $\beta$  extracelular pode ser também degradado através de proteases secretadas pela microglia e pelos astrócitos (Wei Qiao Qiu et al. 1998; Nielsen et al. 2010).



**Figura 4 - Mecanismos de eliminação de A $\beta$ .** O balanço dos níveis de A $\beta$  depende da sua produção e eliminação. O transporte de A $\beta$  através da BSC é mediado majoritariamente por receptores (RAGE; do inglês, *receptor for advanced glycation end products*; e LRP - associação com a ApoJ) nas células endoteliais. O A $\beta$  presente nos espaços extracelular e intracelular podem ser degradados por enzimas (por exemplo, a IDE). Os anticorpos anti-A $\beta$  e as substâncias endógenas ligantes de A $\beta$  conseguem

entrar no cérebro, onde podem prevenir a agregação e decompor fibrilas de A $\beta$ . Ao interagirem com A $\beta$  periférico, exercem uma remoção periférica que promove o efluxo de A $\beta$  do cérebro e danifica o seu equilíbrio entre o cérebro e o sangue, culminando com a sua *clearance* do cérebro. Estes processos de eliminação de A $\beta$  tornam-se alvos de tratamento farmacêutico para a DA. Adaptada de (revisto por Y.-J. Wang et al. 2006).

## 2.3. Scavengers do péptido beta-amilóide

### 2.3.1. Transtirretina

A designação pré-albumina foi alterada para TTR (Andrea et al. 1980) devido à sua função de transporte de tiroxina (T<sub>4</sub>) (Kanai et al. 1968; Sousa et al. 2007) e de retinol (vitamina A) (Raz et al. 1970), através da proteína de ligação ao retinol (RBP; do inglês, *retinol-binding protein*) (Raz et al. 1970). Maioritariamente expressa no fígado e PC (Soprano et al. 1985; Murakami et al. 1987), sendo secretada pelos hepatócitos para o plasma (Vatassery et al. 1991) e para o LCR (Aleshire et al. 1983), respectivamente, encontrando-se também expressa em menor concentração na retina, rins, pâncreas, epitélio da leptomeninges (Richardson 2009; Buxbaum & Reixach 2009; Li & Buxbaum 2011), saco vitelino visceral (Soprano et al. 1986), placenta (McKinnon et al. 2005), glândula pineal (Martone & Herbert 1993) e em menores quantidades no estômago, coração, músculo esquelético e baço (Soprano et al. 1985). A sua produção está circunscrita ao PC e às meninges, com o primeiro a representar o principal local de síntese (Sousa et al. 2007). A T<sub>4</sub> é uma hormona da tiróide importante em processos de crescimento, desenvolvimento, metabolismo, fertilidade, no sistema cardiovascular e na homeostasia do SNC (Hulbert 2000). A TTR é o principal transportador proteico de tiroxina no plasma e LCR de roedores e outros animais (Santos & Power 1999; revisto por Santos et al. 2002; Morgado et al. 2007). Em humanos, é responsável pelo transporte de 15% de T<sub>4</sub> no plasma e de 80% no LCR (Bartalena & Robbins 1992). Além do papel transportador, a TTR parece mediar a transferência de tiroxina sérica para tecidos-alvo, principalmente no cérebro, mediante as BSC e sangue-plexo coróide (Hagen & Solberg 1974; Schreiber et al. 1990).

O retinol é um micronutriente essencial envolvido em várias funções fisiológicas, nomeadamente na diferenciação celular, reprodução visão e desenvolvimento. A TTR transporta o retinol a nível plasmático, por ligação à RBP (Kanai et al. 1968). Esta conexão aumenta a estabilidade do complexo e reduz os níveis de filtração glomerular da proteína, de baixo peso molecular, nos rins (Noy et al. 1992). O RBP previne a oxidação do retinol e a sua insolubilidade no plasma.

Correspondendo as funções distintas de desintoxicação endógena de oligómeros proteicos, pela inibição da formação de fibrilas amilóides (Casella et al. 2013), foram identificados

para a TTR, até à data, três substratos naturais: a apolipoproteína AI, neuropeptídeo Y e A $\beta$  (Liz et al. 2012). Consequentemente, muita atenção tem sido dedicada a esta proteína na redução da formação de oligómeros de A $\beta$ , impedindo a progressão da DA (Buxbaum & Reixach 2009).

No LCR humano, a TTR foi a terceira proteína que interage com A $\beta$ , sendo o principal *scavenger* desta molécula (Schwarzman et al. 1994). A capacidade da TTR modular a agregação de A $\beta$ , originando complexos estáveis com monómeros, que previnem a formação amilóide (Schwarzman et al. 1994), e a diminuição significativa dos seus níveis plasmáticos em doentes com DA (Riisøen 1988; Serot et al. 1997; Velayudhan et al. 2012), apontam para uma função importante desta proteína em contexto de DA. Adicionalmente, a TTR está também envolvida na manutenção de processos cognitivos durante o envelhecimento, sabendo-se que níveis reduzidos plasmáticos estão relacionados com declínio cognitivo severo. Pelas razões enunciadas, esta proteína é um potencial biomarcador da DA (Velayudhan et al. 2012).

A TTR estabelece interações químicas com todas as formas de A $\beta$  (monómeros, oligómeros e fibrilas), em ambiente intracelular e extracelular, actuando como uma chaperona (Buxbaum et al. 2008). Contudo, apresenta maior afinidade para oligómeros solúveis, pensando-se que esta a forma mais tóxica de A $\beta$  (Yang et al. 2013; Cascella et al. 2013). Usualmente, a conformação em tetrâmero da TTR é estável e essencial à sua função transportadora; porém, a forma em monómeros conectam-se em maior número comparativamente aos tetrâmeros (Du & Murphy 2010), o que indica que alterações conformacionais nas moléculas são importantes para o estabelecimento da ligação (Du et al. 2012), e que é necessária a presença de monómeros para o sequestro de A $\beta$  (Yang et al. 2013). Recentemente foi reportado que a figuração de moléculas de A $\beta$  despoleta a destabilização dos tetrâmeros de TTR, permitindo a ligação dos monómeros de A $\beta$ , prevenindo a sua agregação, deposição e interacção com as células (Yang et al. 2013). Em conjugação com estes resultados, a regulação positiva da TTR em ratinhos transgénicos que sobre-expressam de APP mutante, provocando a diminuição da progressão da patologia e a ausência de neurodegeneração (Stein & Johnson 2002) e célere deposição de A $\beta$  (Choi et al. 2007), suportam o papel natural de protecção atribuído à TTR em contexto de DA (Costa et al. 2007).

Outras consequências da acumulação de oligómeros de A $\beta$ , como o stress oxidativo, o vazamento membranar e a apoptose, são prevenidas pela TTR, ao inibir o influxo de iões cálcio (Ca<sup>+2</sup>). Assim, o mecanismo pelo qual a TTR protege contra os efeitos deletérios da agregação proteica, parece envolver dois níveis distintos de intervenção: 1) inibição da agregação proteica e formação fibrilar; 2) neutralização da toxicidade dos oligómeros, assim que estes são formados (Cascella et al. 2013). Também a proteólise é apontada como um possível mecanismo de processamento do A $\beta$  pela TTR, clivando-o em pequenos péptidos de menor efeito amilóide, que serão posteriormente eliminados pelas células (Costa et al. 2007).

### 2.3.2. Metalotioneínas

As metalotioneínas, de designação genérica MTs, constituem uma superfamília de proteínas intracelulares, de baixa massa molecular (6-7 kDa), com elevada afinidade para metais bivalentes, nomeadamente zinco, cádmio e cobre, e resíduos de cisteína altamente conservados, apresentando quatro isoformas principais, MT-1 a MT-4, identificadas em humanos (El Refaey et al. 1997; Ebadi et al. 2005; Penkowa, Tio, et al. 2006; Stankovic et al. 2007; Hidalgo et al. 2009; Hozumi 2013). Estas proteínas possuem traços estruturais únicos, que lhes conferem propriedades de ligação a metais (participando na homeostasia dos iões metálicos supracitados), antioxidantes e anti-inflamatórias (Vasák & Hasler 2000; Penkowa, Tio, et al. 2006; Gauthier et al. 2008; Hidalgo et al. 2009; Hozumi 2013). Em adição, crescem as evidências que as MT-1 a MT-3 desempenham valências fisiológicas diversificadas como a inibição de mecanismos pró-apoptóticos, aumento da sobrevivência celular e regeneração de tecidos (Penkowa, Tio, et al. 2006; Hidalgo et al. 2009). Concomitantemente a esta matriz de funções, as MT-1 e MT-2 (MT-1/2 - funcionalmente consideradas com uma única isoforma por partilharem uma grande homologia de sequências de aminoácidos e nucleótidos, e perfis de expressão similares) parecem ter acção de protecção e regeneração neuronais, particularmente na DA (Penkowa 2006; Hidalgo et al. 2009; Hozumi 2013).

Em detalhe, em condições fisiológicas, as MTs exercem as suas funções primárias através de resíduos de cisteína, estabelecendo interacções químicas com metais como zinco e cobre, que podem ser substituídos por outros como cádmio, mercúrio, prata, platina e chumbo. A ligação a metais confere às MTs um papel essencial na homeostasia de metais celulares e desintoxicação de metais pesados, uma vez que impede a sua conexão a macromoléculas, protegendo células e tecidos contra a sua toxicidade (Maret 2009). A capacidade de ligar zinco e as propriedades antioxidantes, habilitam também, respectivamente, o transporte deste metal pelas MTs, sendo direccionado para o espaço intermembranar da mitocôndria ou núcleo, e a remoção de ROS, promovendo a sobrevivência de células com mitocôndrias disfuncionais, limitando a apoptose e preservando o potencial da membrana mitocondrial (Lindeque et al. 2010).

As MTs são expressas constitutivamente em vários tipos de tecidos, embora o fígado e os rins contenham as maiores quantidades (Chung et al. 2004; Gauthier et al. 2008). A expressão das MT-1/2 é ubíqua a todos os órgãos, enquanto a expressão de MT-3 se verifica no cérebro e PC, sistema reprodutor, rins, língua e glândulas salivares. A expressão de MT-4 está restringida a alguns epitélios escamosos estratificados (Irie et al. 2004; I Gonçalves et al. 2008; Hozumi et al. 2008). Substâncias químicas como metais, glucocorticóides, citocinas e uma variedade de condições de stress físico podem induzir a expressão dos genes de MT-1/2. Em paralelo ao papel protector contra danos provocados por espécies reactivas de oxigénio, a transcrição das MTs pode ser induzida por estas e pelo stress oxidativo (Vasák 2005). No SNC, as MT-1/2 são

expressas principalmente em astrócitos, encontrando-se aumentada em doenças neurodegenerativas como a DA, e em menor extensão em neurónios. São também expressas no epitélio do PC, células endoteliais, células meníngeas e microglia, tendo também sido detectadas no espaço extracelular cerebral e no LCR (Penkowa 2006; Faller 2010; Martinho et al. 2010). Relativamente à MT-3, esta apresenta expressão elevada em astrócitos, encontrando-se em menor concentração nas células da glia, monócitos e/ou macrófagos, e também em células do PC de rato. A sua expressão em neurónios é restrita (Tsuji et al. 1992; Erickson et al. 1995; Amoureux et al. 1995; Yamada et al. 1996; Penkowa et al. 1999; Carrasco et al. 1999; Martinho et al. 2010).

O efeito das MTs sobre a acumulação de A $\beta$  é indirecto, pelo que a estas proteínas não poderá ser atribuída a terminologia de *scavenger*.

Durante a última década, investigações sobre as funções das MTs na fisiologia cerebral revelaram que a isoforma MT-1/2 se encontra incrementada em resposta a lesões, protegendo do cérebro contra danos neuronais, regula o crescimento neuronal, influencia a arquitectura dos tecidos e a cognição e defende o organismo de insultos neurotóxicos e ROS. A MT-3 protege também contra danos cerebrais, antagoniza os efeitos neutróficos e neurotóxicos de A $\beta$  e influencia a regeneração neuronal, apesar de apresentar um papel antioxidante relevante. Deste modo, a MT-2 e MT-3 são reguladas em diversas desordens neurodegenerativas, incluindo a DA (Martinho et al. 2010).

A análise dos níveis de MTs em cérebros humanos com DA e cérebros de modelos animais de DA revelam consistentemente aumentos da expressão de MT-1 e MT-2 (Hidalgo et al. 2009). Porém, a expressão de MT-3 encontra-se reduzida relativamente a controlos de idade correspondente, ainda que outros estudos apontem uma tendência contrária ou ausência de diferenças na expressão de MT-3 (Martinho et al. 2010). Em doentes com DA, níveis elevados de citocinas e IL-1 podem induzir a produção de MT-1/2 em astrócitos. Estudos em modelos animais de DA, revelaram que os níveis de MT-1/2 se encontram aumentados, em comparação a ratinhos *wild-type* (WT), enquanto os níveis de MT-3 diminuíram ou permaneceram inalterados, sugerindo que estas proteínas podem ter um papel protector contra inflamação a longo prazo (Hidalgo et al. 2009). A regulação positiva de MT-1/2 observada em doentes com DA e modelos animais de DA poderá ter consequências prejudiciais na *clearance* de A $\beta$ , pois a MT-2 diminui a ligação entre TTR e o A $\beta$  (Martinho et al. 2010). Sabendo-se que a TTR é descrita como um *scavenger* de A $\beta$  (Costa et al. 2008), seria expectável uma redução na eficiência da sua remoção em condições de aumento dos níveis de MT-2, o que aparenta ser o caso na DA.

A possível importância das MTs na patogénese da DA centra-se na capacidade de armazenamento de zinco. Esta desordem neurodegenerativa caracteriza-se por acumulação extracelular de iões zinco (Zn<sup>+2</sup>) no interior de placas amilóides e elevação de ião ferroso

(Fe<sup>+2</sup>) intraneuronal. Foi demonstrado que a MT-2A consegue prevenir a agregação de Aβ<sub>40</sub> e Aβ<sub>42</sub>, mediada por cobre, e toxicidade neuronal associada, aparentemente pela permuta metálica entre Zn<sub>7</sub>.MT-2A e Cu<sup>+2</sup>-Aβ (Chung et al. 2010). De forma similar, a troca metálica de Zn<sub>7</sub>.MT-3 por Cu<sup>+2</sup>-Aβ<sub>40</sub> solúvel e agregado abole a geração de ROS e a toxicidade celular relacionada (Meloni et al. 2008). Adicionalmente, ratinhos injectados com Zn<sub>7</sub>.MT-2A revelam reversão do fenótipo de DA, mas sem redução na carga amilóide (Manso et al. 2011). Estas investigações, que relacionam permutas metálicas com a agregação de Aβ, conduziram ao interesse no uso de fármacos quelantes com potencial terapêutico na DA. Por exemplo, a administração de clioquinol, fármaco quelante de cobre e zinco, previne a formação de placas amilóides em ratinhos transgénicos com DA (Hegde et al. 2009). Foi recentemente descrito que a APP retém a actividade de ferroxidase, prevenindo o stress oxidativo por oxidação Fe<sup>+2</sup> e Fe<sup>+3</sup>, sendo esta acção inibida especificamente por Zn<sup>+2</sup> (Duce et al. 2010). Os mesmos autores referem que a actividade de ferroxidase da APP e a acumulação de ferro é inibida por Zn<sup>+2</sup> endógeno, proveniente de agregados amilóides, em córtices com DA pós-morte. Portanto, a troca anormal de zinco cortical poderá estar relacionada com os níveis alterados de MTs observados, ligando a patologia amilóide com a acumulação neuronal de ferro em contexto de DA (Duce et al. 2010).

Em oposição, a MT-3 não partilha parte dos efeitos da MT-1/2. Desde a sua descoberta como factor inibitório do crescimento, com níveis de expressão reduzida em cérebros com DA comparativamente a controlos de idade correspondente, vários estudos forneceram provas de que a MT-3 se relaciona com a etiologia da DA (Howells et al. 2010). Isoladamente, a MT-3 contraria as consequências tóxicas do Aβ ao inibir a formação de agregados resistentes a SDS (do inglês, *sodium dodecyl sulfate*), protegendo assim os neurónios corticais dos seus efeitos tóxicos. O MT-3 promove a sobrevivência neuronal a baixas concentrações, mas inibi-a a concentrações maiores. Tais observações sugerem que as acções anti-Aβ da MT-3 são distintas das acções de inibição do crescimento neuronal. Outros mecanismos de *clearance* de placas de Aβ pela MT-3 poderão estar relacionados com a sua interacção com a TTR (Martinho et al. 2010). Esta proteína adquire afinidade para se conectar com moléculas de Aβ na presença de MT-3, pelo que a clivagem integral de Aβ e a degradação de formas agregadas do péptido β-amilóide, características atribuídas à TTR, deverão ser também potenciadas pela figuração de MT-3 (Martinho et al. 2010).

Finalmente, a existência de conexões entre a TTR e as MTs sugere que podem desempenhar um papel importante no metabolismo de Aβ. A presença deste péptido em líquidos orgânicos, inclusive o LCR, é um traço distintivo da DA, sendo que a sua acumulação aumenta a severidade da doença. O PC tem a capacidade de eliminar e degradar o Aβ, contribuindo para a sua depuração do LCR. Conjuntamente, a TTR, também altamente expressa no PC, é a proteína mais abundante no LCR, sendo considerada a proteína chave no metabolismo de Aβ, e a sua capacidade de remoção deste péptido aparenta ser reduzida ou incrementada por

interacção química com MT-2 e MT-3, respectivamente, ainda que com resultados contraditórios. O entendimento aprofundado destas ligações químicas, e dos seus mecanismos, poderá ter um impacto relevante na deposição de A $\beta$  em variados modelos de DA (Martinho et al. 2010).

Em conclusão, o interesse na MT-1/2 está a aumentar devido ao seu possível papel na sobrevivência celular, concretamente no cérebro, podendo constituir um novo agente terapêutico a ser utilizado no tratamento de doenças neurodegenerativas, em particular a DA (Nielsen et al. 2007) .

### 2.3.3. Enzima degradadora da insulina

Além das MTs, a IDE liga igualmente zinco. Esta metaloprotease ou metaloendopeptidase hidrolisa morfologias monoméricas de A $\beta$  e insulina, possuindo também elevada afinidade, numa escala nanomolar, por outros substratos com diferentes sequências e estruturas, de natureza péptidica e amilóide. A IDE degrada igualmente glucagon, IGF-II (do inglês, *insulin-like growth factor II*), TGF- $\alpha$  (do inglês, *transforming growth factor- $\alpha$* ),  $\beta$ -enforfina, factor natriurético atrial, bradicinina, amilina e o domínio intracelular da proteína APP (Malito et al. 2008; Saido & Leissring 2012). Todavia, a relevância *in vivo* da sua actividade degradante foi apenas demonstrada para o A $\beta$  e a insulina, sabendo-se que doentes com diabetes tipo 2 possuem risco aumentado de ter DA, e que o A $\beta$  é um inibidor competitivo directo da actividade e interacção da insulina, o que parece justificar os níveis incrementados de A $\beta$  observados em doentes com DA resistentes a insulina (Xie et al. 2002). Este efeito dual da IDE realça a importância do desenvolvimento de inibidores e activadores da sua acção para o tratamento de diabetes e DA, respectivamente.

As primeiras evidências da capacidade da IDE para clivar A $\beta$  foram reportadas em 1994 (Kurochkin & Goto 1994), tendo-se identificado uma proteína de 110000 Da presente em fragmentos no citosol de cérebro e fígado de rato reticulados com A $\beta$  sintético marcado com <sup>125</sup>I. Poucos anos depois, a IDE foi identificada como a principal enzima solúvel degradante de A $\beta$  no cérebro humano e em culturas celulares neuronais, onde desempenha acções no meio extracelular (McDermott & Gibson 1997). Afora às funções de degradação de A $\beta$ , a acção da IDE está também associada com a oligomerização de A $\beta$  sintético a níveis fisiológicos em meio condicionado de culturas celulares (W Q Qiu et al. 1998). Adicionalmente, a prova que as isoformas da IDE (forma secretada e forma associada à membrana) exercem a hidrolisação e a eliminação do A $\beta$  secretado por neurónios e microglia, foi providenciada anos depois (Bertram et al. 2000). Um estudo recente revela que a IDE recombinante, com actividade catalítica inactiva, causa modificações drásticas na via de montagem própria do A $\beta$ , paragem na

formação de fibrilas amilóides e reunião agregados não-tóxicos de A $\beta$ , através de actividade similar a chaperonas (de Tullio et al. 2013).

A expressão de IDE é substantiva nos neurónios corticais e subcorticais, e foi detectada no citoplasma dos três maiores componentes da parede vascular: células endoteliais, pericitos e células do músculo liso (Gao et al. 2004; Dorfman et al. 2010). O tecido do PC apresenta expressão desta enzima na sua superfície apical, onde a sua inibição provoca a disrupção do metabolismo de A $\beta$ , e a sua concomitante acumulação na barreira sangue-LCR (Behl et al. 2009). Quanto à localização subcelular da IDE, esta estende-se além do citoplasma, existindo igualmente em mitocôndrias, na membrana/superfície celular e espaço extracelular, e com maior grau de incerteza noutros compartimentos: endossomas, peroxissomas, retículo endoplasmático, lisossomas e dendrites de neurónios (Malito et al. 2008; Saido & Leissring 2012). A tipologia de célula no sistema nervoso determina a expressão de IDE na forma membranar ou secretada, observando-se diferenças entre células primárias e linhas celulares (Malito et al. 2008).

Têm sido reveladas evidências que suportam a hipótese de que a redução da actividade de IDE conduz à acumulação de A $\beta$  no cérebro. Por exemplo, foram verificadas reduções na acção da IDE em cérebros portadores de DA em comparação com controlos de idade correspondente (Pérez et al. 2000). Outro estudo aponta que a concentração e actividade da forma membranar da IDE diminui na evolução de défice cognitivo ligeiro para DA de severidade moderada no hipocampo, o que se correlaciona negativamente com a concentração de A $\beta$ <sub>42</sub> em ambas as condições (Zhao et al. 2007). Contrariamente, outras pesquisas indicam que a IDE poderá não possuir menos importância no processo de eliminação de A $\beta$  (Wang et al. 2010). Existem também provas que a formação de placas de A $\beta$ , em cérebros de ratos transgénicos, induz a expressão de RNA mensageiro cortical e o incremento dos níveis de IDE paralelamente ao aumento na produção de A $\beta$ <sub>40</sub> e A $\beta$ <sub>42</sub>, o que sugere um mecanismo regulatório de retroalimentação positiva da regulação de A $\beta$  (Vepsäläinen et al. 2008). Deste modo, são necessárias investigações aturadas no sentido da clarificação da fisiologia da IDE na patologia amilóide em DA (biomarcador).

#### 2.3.4. Gelsolina

A gelsolina (GSN) é uma proteína reguladora da polimerização da actina, ao limitar e clivar os seus filamentos (Janmey et al. 1985; Matsumoto et al. 2003). Apresenta uma forma intrínseca e citoplasmática, responsável pela a sua função primordial, e outra segregada no plasma e LCR (Kwiatkowski et al. 1985), originadas a partir de *splicing* alternativo de um único gene, mas estruturalmente distintas com implicações funcionais derivadas da

organização espacial/topográfica e conformação que os resíduos de cisteína assumem (Wen et al. 1996). A forma citoplasmática parece possuir propriedades antioxidantes (Chauhan et al. 2008).

Em termos da localização, a GSN secretada, presente no LCR, poderá provir dos oligodendrócitos ou da microglia (Chauhan et al. 2008). Outros autores sugerem que o PC é responsável pelo aparecimento da proteína no LCR (Matsumoto et al. 2003), onde poderá desempenhar o papel de combate à neurotoxicidade do A $\beta$  (Antequera et al. 2009; Vargas et al. 2010). Em ratos, a GSN foi encontrada nos neurónios do gânglio da raiz dorsal, sabendo-se que neurónios totalmente desprovidos da proteína exibem morte celular aumentada e uma rápida e sustentada elevação dos níveis de Ca<sup>2+</sup> após privação de glucose e oxigénio (Qiao et al. 2005). Estas células apresentam também níveis de cálcio citosólico aumentados, *in vitro*, nos terminais nervosos, seguidamente a uma despolarização. A inibição da expressão génica de GSN produz incrementos na resposta apoptótica na presença de A $\beta$ , indicando que interferências com esta proteína aumentam a sensibilidade das células a estímulos pró-apoptóticos (Qiao et al. 2005).

Tanto a forma plasmática como a forma citosólica da GSN interagem com A $\beta$ , e os complexos GSN-A $\beta$  existem no plasma e citosol (Chauhan et al. 1999; Ji et al. 2008). Ambas inibem a fibrilação do A-beta e têm a capacidade desfibrilar fibrilas pré-formadas (Ray et al. 2000). Adicionalmente, foi demonstrado que a administração de GSN em modelos de DA em ratinhos transgénicos reduz o rácio A $\beta$ <sub>40</sub>/A $\beta$ <sub>42</sub> e a carga amilóide (Matsuoka et al. 2003; Hirko et al. 2007). Por conseguinte, a GSN poderá ter potencial terapêutico contra a DA (biomarcador).

### 2.3.5. Apolipoproteína J

Conhecida também por clusterina, a apolipoproteína J (ApoJ) (Yu & Tan 2012; Baig et al. 2012) é uma chaperona inicialmente descoberta na rede testicular de carneiro (não castrado) em 1983. Pode desempenhar várias funções celulares, incluindo na espermatogénese (primeira função descoberta), na adesão célula-célula e, mais significativamente, na agregação celular (Nuutinen et al. 2009; Lambert & Amouyel 2011).

Em humanos, a ApoJ é amplamente expressa no rim, fígado, próstata e predominantemente no cérebro, e em particular no PC. Foi demonstrado que a ApoJ se encontra aumentada na DA, com tendência a localizar-se com o péptido beta-amilóide, e é abundantemente expressa em neurónios e na astróglia, estando particularmente presente em placas senis onde o A $\beta$  difundível se agrega (Ling et al. 2012). No entanto, poucos artigos têm abordado os mecanismos exactos pelos quais a Apo J influencia o comportamento biológico das placas

amilóides, ainda que a sua detecção em cérebros com DA (biomarcador) a tenha tornado objecto de pesquisa.

A ApoJ fornece protecção contra a patogénese da DA ao inibir, no meio extracelular, o processo de agregação e proteólise de A $\beta$ ; mediando a eliminação de péptidos A $\beta$  exteriormente ao cérebro; e, intervindo, através da proteína megalina, na degradação por endocitose de complexos ApoJ-amilóide nos lisossomas. Sendo uma chaperona de estrutura globular, a ApoJ pode interagir com uma variedade de proteínas, existindo evidências substanciais que se liga a formas solúveis de A $\beta$ , prevenindo a sua agregação e sedimentação em placas senis, e tendo efeitos de protecção neuronal sob condições fisiológicas (Oda et al. 1995; Giannakopoulos et al. 1998), que podem variar relativamente à concentração de A $\beta$ . Ainda que a informação publicada aponte para uma dissociação entre a massa das placas senis e a severidade/risco da DA (Ling et al. 2012), alguns estudos demonstram uma correlação directa entre a agregação de A $\beta$  e a severidade da DA, sabendo-se que quanto maior a formação de A $\beta$ , maior a expressão de ApoJ (Choi-Miura & Oda).

Em condições fisiológicas, a taxa a que *clearance* de A $\beta$  ocorre é de 8,3% por hora, o que indica que os péptidos desta molécula são activamente eliminados do cérebro (Hammad et al. 1997; Guénette 2003), passando do fluído cerebrospinal para o PC, numa forma dependente da sua concentração (Hardy et al. 2011), em direcção à corrente sanguínea. Esta via apenas transporta 10% a 15% do A $\beta$  sintetizado, sendo o núcleo da sua produção transportado via LPRs (do inglês, *lipoprotein receptor-related protein*), em particular a LRP2, igualmente denominada megalina, responsável pelo transporte de ApoJ no cérebro (Hardy et al. 2011). A megalina é expressa nos vasos sanguíneos do SNC, nomeadamente do PC, do endotélio da BSC e o do epêndima. Quando acoplada ao A $\beta$ , a ApoJ poderá ter transporte elevado via megalina, sabendo-se que esta proteína está envolvida no transporte amilóide por ligação a ApoJ (Zlokovic et al. 1996; Bell et al. 2007). De facto, na ausência de A $\beta$ , a ApoJ é transportada através da megalina em condições fisiológicas. Porém, tanto a ApoJ como o A $\beta$  se encontram elevados em cérebros com DA em relação a condições normais. Assim, verificando-se a formação de um complexo entre ambas as substâncias, o transporte de ApoJ é mais célere do que considerando a ApoJ individualmente (Hammad et al. 1997). Testes de ELISA revelam que o A $\beta$  apenas interage quimicamente com a megalina na presença de ApoJ (Hammad et al. 1997). Contudo, fisiologicamente a valência da megalina é saturada pela ApoJ, sugerindo que esta via não constituirá a via fundamental da depleção de A $\beta$ . Adicionalmente à transferência de A $\beta$  na BSC, a megalina gere a endocitose e a subsequente degradação de A $\beta$  nos lisossomas, em complexo com a ApoJ (Zlokovic et al. 1996; Bell et al. 2007).

Apesar dos efeitos de protecção celular conferidos pela ApoJ, foi reportado que esta proteína induz a geração de formas oligoméricas solúveis de A $\beta$ . mediante mecanismos desconhecidos. Na presença de ApoJ, as moléculas de A $\beta$  agregam-se e depositam-se lentamente,

permanecendo algumas formas solúveis difusíveis no cérebro que podem exacerbar os efeitos da DA (DeMattos et al. 2002). Outra consequência negativa da ApoJ é a mediação de uma via de sinalização celular citotóxica, induzida pelo A $\beta$ , em que se verifica o aumento da expressão de vários genes, inclusive da ApoJ intracelular, e a redução da secreção de ApoJ (Thambisetty et al. 2010; Killick et al. 2014). A contradição entre as funções da ApoJ contrasta com o balanço da sua concentração no interior e exterior do citoplasma (Killick et al. 2014). Todavia, este equilíbrio poderá ser danificado pelo A $\beta$ , causando um aumento da ApoJ intracelular que despoleta vias citotóxicas. A ApoJ e o A $\beta$  formam complexos que resistem à proteólise (Oda et al. 1995; Yu & Tan 2012), facilitando assim o seu movimento em direcção ao LCR e o ataque a outros neurónios pelas vias acima mencionadas.

Por fim, a generalidade dos métodos terapêuticos da DA visam a redução da formação ou o aumento da depleção de A $\beta$  (Lin & Luo 2011). Um crescente número de estudos revela que a ApoJ possui um papel de protecção celular e anti-inflamatório, mostrando-se benéfica em modelos de ratos portadores de DA (Narayan et al. 2012). Por exemplo, a injeção de ApoJ purificada num modelo de isquemia cerebral em ratos diminui a formação de placas e de emaranhados fibrilares (Yu & Tan 2012). Também a injeção de ApoJ em cérebros de ratinhos com DA produz efeitos anti-apoptóticos e anti-inflamatórios. Estas investigações conduziram do uso de fármacos com potencial terapêutico (Ghanim et al. 2012). A administração de ácido valpróico, um fármaco anti-epiléptico comum, induz a expressão e secreção de ApoJ em astrócitos humanos, que poderá ter efeitos de protecção celular em cérebros com DA (Nuutinen et al. 2010). Para além da inibição da geração de placas amilóides, prevenção da oligomerização dos péptidos de A $\beta$  e do aumento da eliminação de A $\beta$ , a ApoJ poderá ser importante na prevenção dos efeitos secundários das vias citotóxicas induzidas pelo A $\beta$  e nociva, por razões inesperadas, na deposição de A $\beta$  mediada pela megalina num modelo de isquemia (Pluta 2007). A ApoJ aparenta apresentar funções protectoras e prejudiciais na patogénese de DA. Como tal, maior investigação é necessária para determinar a diferença de concentração intracelular e extracelular e averiguar a existência de um canal para transferência externa desta proteína.

## **2.4. Alterações metabólicas**

Durante o desenvolvimento da DA, o A $\beta$  acumula-se e ocorre a inibição de importantes enzimas mitocondriais no cérebro, resultando em distúrbios no transporte de electrões, na produção de ATP, no consumo de oxigénio e no potencial da membrana mitocondrial. Evidências experimentais em mitocôndrias de cérebros de humanos e de ratinhos com DA indicam a acumulação intraneuronal de A $\beta$ , e marcas de dano oxidativo precedem modificações patológicas. O receptor responsável pela glicação avançada das terminações de

produtos, medeia os efeitos pró-oxidantes das moléculas de A $\beta$  em células neurais, cerebrovasculares e da microglia. Estas últimas, quando estimuladas, assumem-se como a fonte fundamental de radicais de óxido nítrico. As espécies reactivas de oxigénio e azoto causam danos em múltiplos alvos moleculares (Giannopoulos & Praticò 2015).

Outra perturbação metabólica emergente associada à DA, com consequências na homeostasia energética e sináptica, envolve a sinalização de insulina no cérebro. A intolerância à glicose e a diabetes tipo 2 são considerados factores de risco para a existência de demência, uma vez que os níveis dos receptores de insulina, das proteínas de transporte de insulina e de outros componentes de vias de sinalização de insulina encontram-se reduzidos em DA. No processo de envelhecimento, são comuns os valores elevados de glicose sérica, que provocam danificações nas estruturas do hipocampo, incrementam a actividade da *tau* e reduzem os níveis de IDE em cérebros com DA (Giannopoulos & Praticò 2015).

A perda regulatória de cálcio é transversal a vários distúrbios neurodegenerativos. Elevadas quantidades relativas de cálcio no citosol estimulam a agregação de A $\beta$  e a amiloidogénese. As presenilinas modulam o balanço cálcico, e quando sofrem mutações génicas, incrementam directamente os níveis de A $\beta_{42}$ , que causam o aumento do armazenamento de cálcio no retículo endoplasmático e a sua libertação para o citoplasma (Giannopoulos & Praticò 2015).

Finalmente, os defeitos no metabolismo do colesterol poderão estar igualmente relacionados com a DA, dado que estão envolvidos no risco genético da ApoE, na produção e agregação de péptidos de A $\beta$  e nas lesões vasculares e capilares, presentes na patogénese da condição. O colesterol é um componente fundamental das membranas neuronais, estando concentrado em *lipid rafts* (ilhas de esfingolípido) - plataformas ordenadas onde ocorre a estruturação de  $\beta$ -secretases e  $\gamma$ -secretases e o processamento de APP em A $\beta$ . A sua formação e agregação são promovidas e a sua remoção do cérebro é diminuta quando a abundância de colesterol esterificado diminui o *turnover* lipídico. A ApoE derivada da glia constitui o principal transportador de colesterol no cérebro. Um risco major determinante para o começo tardio da DA é o padrão de herança da isoforma de ApoE, sabendo-se que um único alelo de ApoE4 incrementa o risco por um factor de 4, e dois alelos deste mesmo gene aumentam o risco por um factor de 19. Além de uma chaperona difusora da deposição de A $\beta$  e da fosforilação da *tau*, a ApoE4 é também a isoforma menos eficaz no *turnover* dos lípidos de membrana e na absorção de partículas proteicas/lipídicas (Giannopoulos & Praticò 2015).

### 3. Papel dos estrogénios

Com a senescência assiste-se ao declínio dos níveis de hormonas esteróides, normalmente associados ao surgimento e progressão de DA (Lim et al. 2003; Baum 2005). O seu envolvimento pode estar relacionado com a normalização dos níveis de A $\beta$ .

#### 3.1. Estrogénios

A deficiência hormonal ovárica após a menopausa é um factor de risco significativo para o desenvolvimento da doença de Alzheimer em mulheres que tem sido atribuída, principalmente, à depleção dos níveis de estrogénios. Os estrogénios podem impedir a patogénese da AD a vários níveis: 1) protegendo contra a morte celular induzida pelo A $\beta$ , reduzindo a produção e melhorando a *clearance* de A $\beta$ ; 2) influenciando a função cerebral, pois atravessam facilmente a barreira hematoencefálica, onde podem interagir tanto com os receptores estrogénicos nucleares como com os receptores membranares; 3) promovendo o crescimento de neurites e suprimento vascular para o cérebro, de forma a aumentar a regeneração e reparação neuronais; 4) promovendo a quebra da APP a fragmentos menos susceptíveis de acumular o A $\beta$ ; 5) enfraquecendo os efeitos neurotóxicos de A $\beta$ , devido às propriedades antioxidantes; 6) aumentando o catabolismo e reduz os níveis plasmáticos da ApoE; e 7) através de efeitos protetores na função e/ou estabilidade mitocondriais.

#### 3.2. Regulação dos *scavengers* do péptido beta-amilóide por estrogénios

Vários estudos epidemiológicos e neuropatológicos apontam diferenças de género relativamente ao desenvolvimento de DA, sendo as mulheres mais susceptíveis que os homens a esta condição (Ruitenbergh et al. 2001; Oliveira et al. 2011). Uma possível explicação advém da redução expressiva dos níveis de estrogénios e progesterona durante a menopausa, comparativamente à diminuição dos níveis de testosterona durante o envelhecimento (Yue et al. 2005; Oliveira et al. 2011). O grau de envolvimento da TTR na regulação dos níveis cerebrais de A $\beta$  poderá estar associado ao género, dependendo este dos níveis de estrogénios e testosterona (Oliveira et al. 2011).

Ambas as hormonas 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) e di-hidrotestosterona (DHT) regulam de forma positiva a expressão de TTR no fígado (I. Gonçalves, Alves, et al. 2008; Quintela et al. 2008; Quintela

et al. 2009) e PC de ratos e ratinhos. A complementar, a progesterona estimula também a expressão de TTR (Quintela et al. 2009; Quintela et al. 2011). A maioria dos estudos sustentam um papel de protecção neuronal para os estrogénios, ao reduzir a formação de A $\beta$  e à protecção contra a toxicidade neuronal, a apoptose e o stress oxidativo (Wilson et al. 2000; Greenfield et al. 2002; Amtul et al. 2010); particularmente, o 17 $\beta$ -estradiol, incrementa os níveis de TTR no cérebro, conduzindo à inibição da agregação de A $\beta$  (Amtul et al. 2010), salientando a importância desta hormona sexual na DA, e o papel relevante da TTR no despoletar e na progressão da DA.

Em relação a outras proteínas, vários modelos animais e de cultura de células estabelecem uma associação entre E<sub>2</sub> e a mediação de IDE (Zhao et al. 2011; Barron et al. 2009). *In vitro*, em neurónios de hipocampo de rato cultivados, o E<sub>2</sub> provocou um aumento da expressão de IDE, enquanto *in vivo*, os níveis IDE no hipocampo diminuíram, efeito que foi revertido pela administração de E<sub>2</sub> (Zhao et al. 2011). No mesmo estudo, o tratamento com E<sub>2</sub> promoveu a expressão de IDE no hipocampo com decréscimo da acumulação de A $\beta$  *in vivo* (Zhao et al. 2011). Noutros estudos, verificaram-se reduções dos níveis de A $\beta$  e o incremento dos níveis de IDE após administração com E<sub>2</sub> (Amtul et al. 2010) e tratamento com um agonista selectivo de um receptor de estrogénios (RE) (George et al. 2013), respectivamente, em modelos animais de DA.

A gelsolina tem sido implicada em processos de cicatrização mediados por hormonas (Nishimura et al. 2003; Archer et al. 2004; Archer et al. 2005), assim como é conhecido o papel regulatório importante de estrogénios e androgénios em mecanismos de reparação de tecidos (Ashcroft et al. 2002). Várias pesquisas identificaram a gelsolina como co-activadora do receptor de androgénios (RA) (Ashcroft & Mills 2002; Nishimura et al. 2003; van de Wijngaart et al. 2006; Urbanucci et al. 2008), incrementando a sua actividade transcricional na presença de agonistas (Nishimura et al. 2003), prevendo-se que apresente uma função importante em mecanismos de cicatrização. Sabendo-se que os esteróides sexuais reduzem os níveis de A $\beta$  (Wilson et al. 2000; Greenfield et al. 2002; Amtul et al. 2010) e que gelsolina interfere activamente no catabolismo de A $\beta$  (Antequera et al. 2009; Vargas et al. 2010), clivando péptidos, o seu papel no despoletar e progressão da DA poderá relacionar-se positivamente com a presença de hormonas sexuais, em particular os estrogénios.

Existe pouca informação na literatura que relacione os efeitos dos estrogénios na regulação dos níveis de ApoJ no cérebro. No entanto, em linhas celulares de cancro endometrial foi demonstrado que o tratamento com estrogénios aumenta a sua expressão proteica, não se observando alterações com a administração de progesterona (Won 2012). Dada a sua transcrição em múltiplas células e tecidos e funções de adesão e agregação celulares, inibição do complemento, transporte de lípidos, protecção membranar e secreção endócrina, assim como a inibição da agregação e proteólise de A $\beta$  (Won 2012), o uso de estrogénios poderá aumentar a sua resposta contra a patogénese de DA no PC.

Por fim, a MT-2 diminui a interação da TTR com A $\beta$ , reduzindo a eficiência da sua depleção, enquanto as acções dos estrogénios aumenta os níveis de TTR (Martinho et al. 2010). A nível hormonal, os glucocorticóides regulam positivamente a MT-1/2 no PC de ratos, diminuindo os efeitos apoptóticos (a. Martinho, Santos, & Gonçalves, 2013). Em mamíferos, os glucocorticóides partilham características estruturais com os esteróides sexuais, sendo ambas hormonas sexuais (a. Martinho, Gonçalves, & Santos, 2013). São empregues no tratamento de condições inflamatórias, com implicações na apoptose, e potenciais reguladores da expressão de MT-1/2 no PC, uma vez que os de MT-1/2 possuem elementos responsivos a glucocorticóides responsáveis pelo incremento da expressão de MT-1/2 após indução de stress noutras zonas cerebrais (a. Martinho, Gonçalves, et al., 2013). O PC expressa ainda receptores de glucocorticóides e de mineralocorticóides, sendo um tecido responsivo a glucocorticóides (a. Martinho, Gonçalves, et al., 2013). Assim, os estrogénios poderão aumentar a transcrição de MT-1/2, causando efeitos negativos no processo de eliminação de A $\beta$ .

### **3.3. Terapia hormonal e o risco de doença de Alzheimer em mulheres pós-menopausa**

Observações em mulheres e modelos de roedores associam níveis baixos de E<sub>2</sub> com a DA e várias acções de protecção neuronal de E<sub>2</sub> relevantes em contexto de DA (Paganini-Hill & Henderson 1994). Em função destes dados, o uso de TH em mulheres pós-menstruais parece reduzir o risco de DA, existindo evidências em ensaios clínicos e observacionais humanos (Henderson et al. 1994; Paganini-Hill 1996; Hogervorst et al. 1999; LeBlanc et al. 2001; Zandi et al. 2002; revisto por Craig & Murphy 2010). Apesar da abundância de provas na literatura a suportar os efeitos de protecção neuronal dos estrogénios contra a DA, esta hipótese continua a gerar controvérsia (Haskell et al. 1997; Rapp et al. 2003; Shumaker et al. 2003). O ensaio WHIMS (do inglês, *Womens's Health Initiative Memory Study*) fez parte de um amplo estudo, conduzido em vários centros médicos, que avaliou os resultados da administração de TH (composta por estrogénios equinos conjugados ou não com acetato de 17 $\alpha$ -hidroxil-6 $\alpha$ -metilprogesterona, indicando que a TH não providencia abrandamento do declínio cognitivo em mulheres com insuficiência cognitiva, aumentando, pelo contrário, o risco de demência.

Desde que os resultados do WHIMS foram reportados, vários argumentos têm sido dados para explicar os potenciais benefícios ou riscos da TH (Maki 2004; Gleason et al. 2005; Henderson 2006). A aparente discrepância entre as primeiras pesquisas, que apontam para acções neurais benéficas do E<sub>2</sub>, e os dados clínicos do WHIMS, que revelam conclusões antagónicas, sugere que aspectos fundamentais da TH são problemáticos, como a formulação terapêutica (estrogénios equinos contra E<sub>2</sub>), a via de administração (oral contra transdérmica) e a

periodicidade da administração (combinação continuada contra cíclica) (Gleason et al. 2005; Henderson 2006). Existem amplas provas experimentais que aparentam validar estes argumentos. Por exemplo, num estudo recente foram comparados os efeitos da administração contínua ou cíclica de progesterona, em conjugação com E<sub>2</sub>, num modelo de DA de ratinhos fêmeas com ablação ovárica (Carroll et al. 2010). A redução dos níveis de A $\beta$  desempenhada pelo E<sub>2</sub> foi reduzida pela administração conjunta com progesterona contínua, mas aumentada com administração conjunta com progesterona cíclica. O factor que parece contribuir mais significativamente para a variância observada nas consequências clínicas da TH é a idade a que o tratamento é iniciado. Considerando a hipótese da “janela de oportunidade” (revisto por Craig & Murphy, 2010; Whitmer, Quesenberry, Zhou, & Yaffe, 2011), os efeitos neurais da TH deverão ser mais favoráveis quando utilizada no início da menopausa do que em anos posteriores, como no ensaio WHIMS. De facto, trabalho anterior conduzido em modelos animais demonstra que parte dos efeitos neurais de E<sub>2</sub> são atenuados em fêmeas envelhecidas (revisto por Pike et al. 2009). Adicionalmente, dados clínicos recentes apontam que o risco de DA se encontra reduzido quando a TH é principiada na meia-idade, sendo exacerbado quando a TH é administrada numa fase tardia da vida (Whitmer et al. 2011). Novas informações importantes relacionadas com aspectos críticos emergirão de ensaios clínicos em execução: o ELITE (do inglês, *Early versus Late Intervention Trial with Estradiol*) e o KEEPS (do inglês, *Kronos Early Estrogen Prevention Study*).

## 4. Objectivos

Mediante diversos estudos que reportam a importância de proteínas sintetizadas no plexo coróide, determinantes para a eliminação/depleção de A $\beta$ , e a importância dos esteróides sexuais, em particular os estrogénios, na regulação e produção de TTR e, em menor extensão, na IDE, sendo limitado o conhecimento da sua interferência noutras moléculas endógenas, pretende-se, com este estudo, investigar a influência dos estrogénios na expressão de *scavengers* de A $\beta$  no plexo coróide de ratos recém-nascidos.

## II. Materiais e métodos

### 1. Animais

Neste trabalho, foram realizados vários ensaios com explantes de PC recolhidos em ratos *Wistar* recém-nascidos (N=11). Todos os animais foram tratados em conformidade com as orientações do *National Institute of Health* e com as normas da União Europeia para o cuidado e o tratamento de animais de laboratório (Directiva 2010/63/UE). Os explantes foram submetidos a tratamento com estradiol ( $E_2$ ), e os efeitos deste composto foram avaliados com recurso a diversas técnicas. O esquema experimental empregue com os explantes encontra-se representado na figura 5.

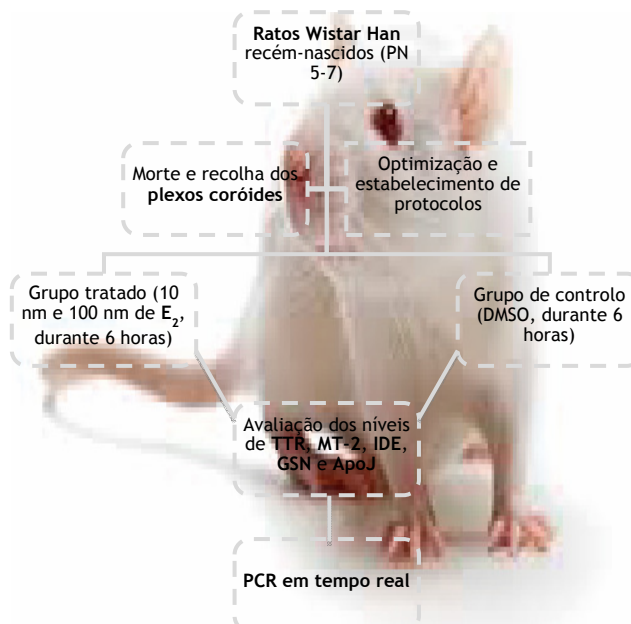


Figura 5 - Esquema do estudo experimental sobre os efeitos de  $E_2$  na regulação dos *scavengers* de  $A\beta$ , em explantes de PC de rato. A avaliação dos efeitos de  $E_2$  foi conduzida em PCs de ratos Wistar Han recém-nascidos. Os explantes de PC de rato foram submetidos à técnica de PCR em tempo real. PN-pós-natal;  $E_2$ -estradiol; DMSO-dimetilsulfóxido; TTR-transtirretina; MT-2-metalotioneína-2; IDE-enzima degradadora de insulina (do inglês, *insulin-degrading enzyme*); GSN-gelsolina; ApoJ-apolipoproteína J

## 2. ARN total

Procedeu-se à extracção de ARN total a partir de PCs de ratos *Wistar Han* recém-nascidos, armazenados a -80°C após amostragem. A totalidade do procedimento foi conduzida em gelo (sensibilidade térmica). A dificuldade de obtenção de sequências de ARN íntegras, associada à degradação enzimática por ribonucleases, torna necessária a utilização de fortes agentes desnaturantes, responsáveis pela lise celular e inactivação de ribonucleases, e água tratada com dietilpirocarbonato (água DEPC).

### 2.1. Extracção do ARN total

A extração de ARN total foi efectuada utilizando TRIzol® Reagent, uma solução monofásica de fenol e guanidina isotiocianato, de acordo com as recomendações do fabricante (1 mL TRIzol/100 mg de tecido). Deste modo, adicionaram-se 300 µL de TRIzol a cada microtubo contendo o tecido em causa e homogeneizou-se manualmente a mistura com um pilão de forma a permitir o rompimento celular e a dissolução de vários componentes celulares. Após uma incubação durante 5 minutos à temperatura ambiente, que permitiu a completa dissociação de complexos de nucleoproteínas, juntou-se clorofórmio (200 µL de clorofórmio/1 mL de TRIzol) e homogeneizaram-se as amostras por inversão. As provas foram incubadas durante 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugadas posteriormente a 4°C durante 15 minutos a 12000 g. Seguidamente à centrifugação, as soluções separaram-se em três fases: no fundo do microtubo obteve-se a fase orgânica (cor rosada), que apresentava as proteínas e resíduos de fenol e clorofórmio; a interfase contendo o DNA; e a fase aquosa (transparente), composta por ARN. Assim, a fase aquosa foi transferida para um novo microtubo, ao qual se adicionou o isopropanol (500 µL de isopropanol/1mL de TRIzol), e misturou-se por inversão, de forma a permitir a recuperação do RNA por precipitação. Posteriormente a uma incubação durante 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugação a 4°C durante 10 minutos a 12000 g, rejeitou-se o sobrenadante. O ARN, sob forma de um precipitado branco (*pellet*), foi lavado duas vezes com 500 µL de etanol 75% em água DEPC (-20°C) e centrifugado a 4°C durante 5 minutos a 7500 g, tendo-se rejeitado o sobrenadante. Por fim, retirou-se o etanol excedente e o precipitado de ARN total foi reidratado (ressuspensão) em 10 µL de água DEPC e armazenado a -80°C para uso posterior.

## 2.2. Determinação da integridade do ARN total

Para a determinação da integridade do ARN total realizou-se uma eletroforese do ARN total em gel de agarose a 1.5% corado com GreenSafe (NZYTech, Portugal). A qualidade do ARN foi confirmada pela presença de 2 bandas de ARN ribossómico - 18S e 28S - em que a banda 28S apresenta o dobro da intensidade da 18S (dados não exibidos). Caso o ARN se encontrasse degradado, esta proporção estaria alterada, podendo mesmo observar-se arrastamento. O procedimento foi efectuado da seguinte forma: preparou-se um gel de agarose a 1.5% em Tampão TAE 1x diluído em água DEPC, ao qual se adicionaram 40 µL de GreenSafe, agente intercalante dos ácidos nucleicos. As amostras foram preparadas com 2 µL de prova, 8 µL de H<sub>2</sub>O estéril e 2 µL de *loading buffer* 10x, e seguidamente depositadas no gel. Após a corrida da eletroforese a 100 V durante 30 minutos, visualizou-se o gel no transiluminador UVITEC (UVitec Cambridge, Reino Unido) (dados não exibidos).

## 2.3. Quantificação do ARN total

A quantificação do ARN total foi realizada utilizando o nanoespectrofotómetro Nanophotometer™ (Implen, Alemanha), que fornece diretamente a concentração de RNAt (µg/µL) e a razão A260/A280, indicando o grau de pureza do ARN total com base na leitura de absorvência a 260 e 280 nm, comprimentos de onda aos quais os ácidos nucleicos e as proteínas absorvem. Considera-se que o ARN total se encontra puro quando a razão entre as absorvências se situa no intervalo entre 1,8 e 2,1 (dados não exibidos).

## 3. Transcrição reversa e PCR convencional

Com o intuito de corroborar a expressão dos *scavengers* de Aβ - TTR, MT-2, IDE, GSN e ApoJ - nos PCs ratos Wistar Han (N=11) recém-nascidos, esquadrinhou-se mediante amplificação enzimática de ADN complementar com *primers* (Stab Vida, Espanha) específicos para os genes de interesse pela técnica de PCR convencional. Os *primers* (Stab Vida, Espanha) foram desenhados com o programa *Primer-Blast-NCBI-NIH* (dados não exibidos). Na prossecução da amplificação das sequências relativas aos ARN mensageiros dos genes em estudo recorreu-se à enzima Taq ADN polimerase, segundo as recomendações do fabricante, estando integrada numa *Master Mix* (Bio-Rad, EUA) para PCR que apresenta todos componentes necessários ao

desenvolvimento da reacção. Em conformidade, por cada transformação química, elaborou-se uma *mix* contendo 5 µL de *Master Mix* (0,075 unidades de Taq ADN polimerase, tampão de reacção, 4 mM MgCl<sub>2</sub> e 0,4 mM de cada dNTP: dATP, dCTP, dGTP e dTTP; Bio-Rad, EUA), 0,3 µL de *primer forward* (25 µmol) e 0,3 µL de *primer reverse* (25 µmol) dos respectivos genes em análise. Por último, perpez-se com água estéril até um volume final de 20 µL. A cada reacção foi introduzido 1 µL de ADN complementar (linha celular Z310), com excepção do negativo, ao qual foi adicionado 1 µL de água estéril. A amplificação dos *scavengers* de Aβ foi conduzida num termociclador Tprofessional Basic (Biometra, Alemanha), em que as amostras foram submetidas a 95°C durante 3 minutos. Seguiram-se 40 ciclos de 10 segundos de exposição a 95°C para desnaturação do ADN; exposição à temperatura óptima de emparelhamento (utilização de um gradiente) de cada *primer* durante 10 segundos, promovendo a ligação deste ao ADN; exposição a 72°C durante 3 segundos, para amplificação do material genético, e, finalmente, exposição a 72°C durante 1 minuto.

A separação dos produtos de PCR foi efectuada por electroforese em gel de agarose 1,5% em TE e na presença de *Green Safe*. Retiram-se 10 µL de cada produto de PCR e depositaram-se no gel sem necessidade de adição de *loading buffer*, uma vez que este reagente já se encontra presente na *Master Mix*. No primeiro poço foram colocados 5 µL de marcador de pesos moleculares *HipperLadder II* (Bioline, Reino Unido). Os produtos de PCR devidamente amplificados foram visualizados no transiluminador UVITEC (UVitec Cambridge, Reino Unido), e ulteriormente alíquotas foram enviadas para sequenciação na empresa Stab Vida (Espanha), com alinhamento subsequente na base de dados NCBI-Blast (<http://blast.st-va.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), tendo sido aceites como produtos de amplificação específicos todos aqueles em que o nível de homologia entre as sequências estudadas fosse superior a 97% (dados não exibidos).

Tabela 1 - Sequências dos *primers* dos genes dos *scavengers* de A $\beta$  e do controlo endógeno

Genes	Sequência dos <i>primers</i> (Fw)	Sequência dos <i>primers</i> (Rv)	Tamanho do fragmento (pb)	Temperatura óptima de emparelhamento (°C)
Cyc A	CAAGACTGAG TGGCTGGAT	GCCCGCAAGTCA AAGAAATTAGAG	163	58
TTR	GGA CTGATA TTTGCGTCTG AA	ACTTTCACGGCC ACATCGAC	119	56
MT-2	TGTGCCACAG ATGGATCCT	GCAGCCCTGGG AGCACTT	126	57
IDE	TGGCTGTGGA CGCACCAAGG A	GGGTGGCGCTT CGGAAAGGT	125	56
GSN	GGTGCAGAGG CTCTTCCAGG	CTGCCGGAGCC ACACCACTG	141	58
ApoJ	CTGACCCAGCA GTACACCGA	AGCTTCACCACC ACCTCAGT	215	54

#### 4. PCR em tempo real

Quantificou-se a expressão relativa dos genes *scavengers* de A $\beta$ , nomeadamente IDE, ApoJ, GSN, MT2 e TTR, mediante a técnica de PCR em tempo real. Na experiência foi analisado um grupo de ratos Wistar Han (N=11) recém-nascidos, dividido em dois, submetidos a condições distintas (não tratados/veículo [DMSO, n=3] e tratados [10 nm, n=4, e 100 nm, n=4, de E<sub>2</sub>]). As formas foram optimizadas testando a eficiência das reações para cada um dos genes com 4 diluições de cDNA (1:2, 1:3 (stock), 1:4 e 1:8), de forma a optimizar o procedimento, tendo os ensaios sido efectuados em duplicado. A emissão de fluorescência do SYBR®Green I foi determinada após cada ciclo, e a quantidade relativa de cada mRNA foi quantificada usando o software do iCycler. A amplificação dos transcritos específicos foi confirmada pelos perfis da curva de melting gerados no final de cada ensaio, permitindo avaliar a formação de dímeros dos *primers* e a pureza do produto amplificado. O gene da Ciclofilina A foi utilizado como controlo endógeno para normalizar os níveis de expressão dos genes da apoptose. Por cada análise adicionaram-se 10  $\mu$ L de SYBR®Green I dye (kit iQ™ SYBR®Green Supermix, Bio-Rad,

EUA), 0.8  $\mu$ L de primer Fw e 0.8  $\mu$ L de primer Rv diluídos 1:20, 1  $\mu$ L cDNA nas diluições mencionadas anteriormente, e perpez-se com água estéril (Fermentas, Lituânia) para um volume de 20  $\mu$ L. As condições de amplificação utilizadas foram as seguintes: 95°C durante 3 minutos, 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 56°C durante 30 segundos e 72°C durante 30 segundos, num termociclador iQ™5 (Bio-Rad, EUA). Os dados foram tratados através do método de Pfaffl (Pfaffl 2001), no qual a expressão relativa dos genes em estudo foi calculada com base na razão entre a eficiência de amplificação e o desvio do ponto de cruzamento das amostras em análise (10 nm e 100 nm de estradiol) e das amostras controlo (DMSO), em relação à expressão do gene de referência Ciclofilina A (CycA) (dados não exibidos).

## 5. Análise estatística

Todos os resultados da análise estatística estão representados como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM) e com um n superior a 3, de forma a que pudessem ser considerados estatisticamente significativos. No tratamento estatístico foi usado o método *one-way ANOVA* (comparação da média entre três grupos), seguido de testes de Dunnett's e Bonferroni's. Foram considerados resultados estatisticamente significativos sempre que o *p-value* fosse inferior a 0,05. A análise estatística foi efectuada com recurso ao *software* Prism6 (GraphPad).

### III. Resultados

#### 1. Expressão dos *scavengers* do péptido beta-amilóide

##### 1.1. PCR em tempo real

A técnica de PCR em tempo real permitiu analisar as diferenças dos níveis de expressão do ARN mensageiro dos genes dos *scavengers* de A $\beta$ : TTR, MT-2, IDE, GSN e ApoJ nos dois grupos de ratos em estudo: tratados com E<sub>2</sub>, nas concentrações de 10 nm (n=4) e 100 nm (n=4), durante 6 horas, e controlos (n=3). Para normalizar os níveis de expressão dos genes dos *scavengers* de A $\beta$ , foi utilizado o gene da CycA como controlo endógeno. Os gráficos de barras abaixo exibidos representam o rácio entre a expressão do gene de interesse e a expressão do gene da CycA para cada condição. No final, os dados foram tratados estatisticamente usando o teste One-Way ANOVA, considerando-se significativo o resultado quando p<0,05. O gráfico 1 diz respeito ao gene da TTR, cuja expressão aumentou de forma significativa (p<0,05) após tratamento com E<sub>2</sub> em ambas as concentrações de 10nm e 100nm, mas de forma mais pronunciada na segunda condição, comparativamente ao grupo de controlo. O gráfico 2 corresponde ao gene da MT-2, verificando-se uma diminuição significativa (p<0,05), próxima dos 50%, da expressão entre o grupo tratado com E<sub>2</sub> e o grupo de controlo, não existindo diferenças entre condições de E<sub>2</sub>. Quanto ao gene da IDE (gráfico 3), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na expressão entre condições de E<sub>2</sub> e o grupo de controlo, embora se visualize uma tendência de incremento em função da concentração de E<sub>2</sub>. O gene da GSN (gráfico 4) apresenta igualmente ausência de diferenças estatisticamente significativas na sua expressão entre o grupo tratado (ambas as condições) e a condição de controlo. O gráfico 5 diz respeito ao gene da ApoJ, onde se verifica uma redução (p<0,05) para metade da expressão no grupo submetido à concentração de 10 nm de E<sub>2</sub> relativamente ao grupo controlo. Uma diminuição menos pronunciada, ainda que significativa (p<0,05), observa-se entre o grupo tratado com a condição de 100 nm e o grupo de controlo.

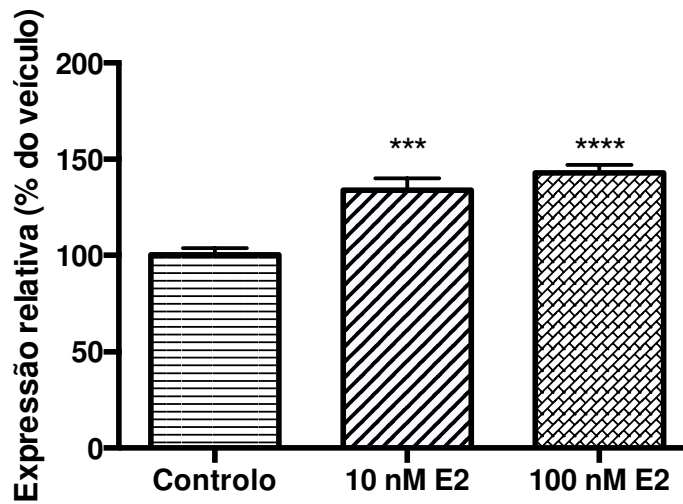


Gráfico 1 - Níveis de expressão de ARN mensageiro do gene da TTR em PC de rato. A expressão do gene da TTR apresenta diferenças na expressão génica entre o grupo tratado com E<sub>2</sub> (nas concentrações de 10 nm e 100 nm, com maior incidência na segunda condição) e o grupo de controlo, sendo essas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

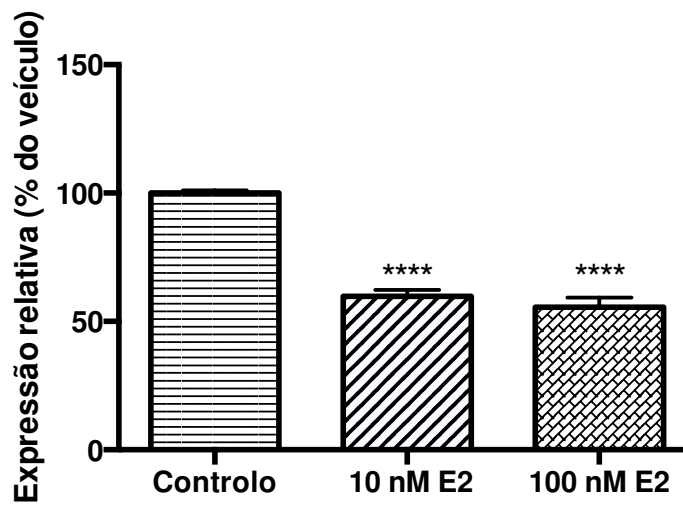


Gráfico 2 - Níveis de expressão do ARN mensageiro do gene da MT-2 em PC de rato. A expressão do gene da MT-2 diminui para aproximadamente metade, com significado estatístico ( $p < 0,05$ ), para o grupo tratado com E<sub>2</sub>, sem diferença substancial entre concentrações, relativamente ao grupo de controlo.

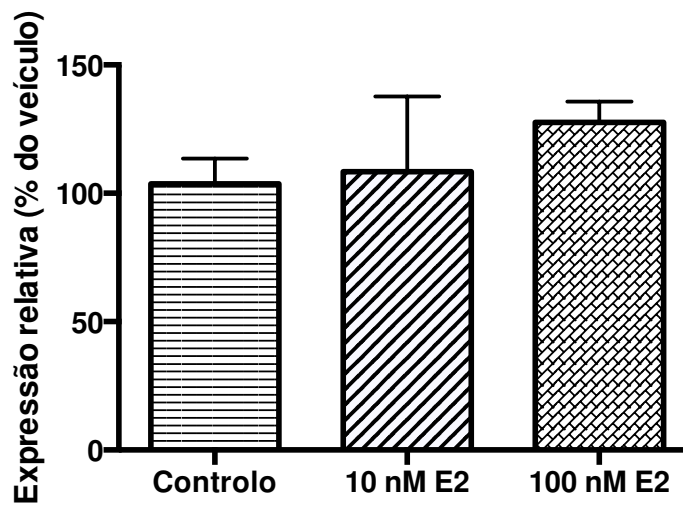


Gráfico 3 - Níveis de expressão do ARN mensageiro do gene da IDE em PC de rato. A expressão do gene da IDE parece ter a tendência a aumentar com o incremento da concentração de E<sub>2</sub> comparativamente ao grupo de controlo, mas sem significado estatístico.

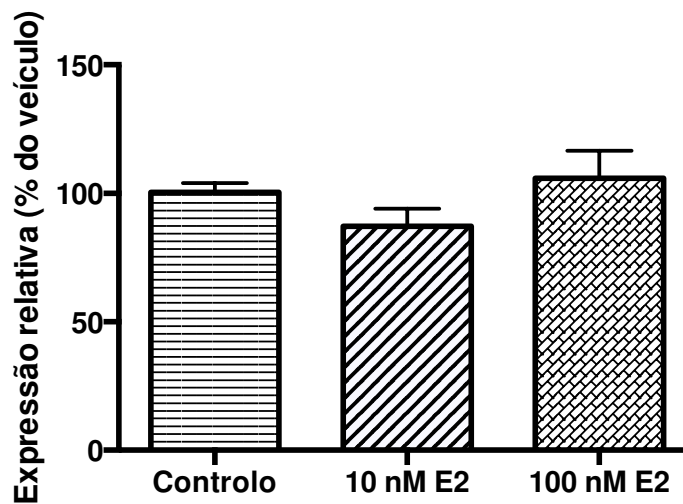


Gráfico 4 - Níveis de expressão do ARN mensageiro do gene da GSN em PC de rato. A expressão génica da GSN não apresenta diferenças com significado estatístico entre o grupo tratado (ambas as condições) e o grupo de controlo.

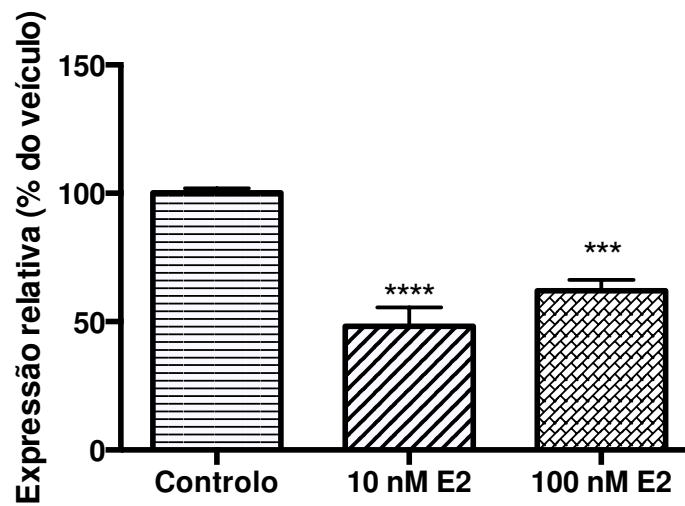


Gráfico 5 - Níveis de expressão do ARN mensageiro do gene da ApoJ em PC de rato. A expressão génica diminui para metade ( $p < 0,05$ ) no grupo tratado com  $E_2$ , para a concentração de 10 nm, sendo a redução menos acentuada, ainda que significativa ( $p < 0,05$ ) para a condição de 100 nm, relativamente ao grupo de controlo.

## IV. Discussão

O PC é uma estrutura essencial para a homeostasia do SNC (Sousa et al. 2007) que se distribui pelos quatro ventrículos cerebrais responsável pela produção, secreção e desintoxicação do LCR (Kittisupamongkol 2009), pelo ajustamento do volume craniano, pelo tamponamento do fluído extracelular (Gherzi-Egea & Strazielle 2001) e pela coordenação dos processos imunológicos entre o cérebro e o sistema imunitário periférico (Thanos et al. 2010). Em conformidade com esta pletera de funcionalidade, o PC contém um espectro amplo de receptores e péptidos: citocinas e receptores de citocinas envolvidos em processos inflamatório; vários receptores de neurotransmissores, factores de crescimento e péptidos neuroprotectores; e receptores de hormonas sexuais, como a progesterona, os estrogénios (alfa e beta) e androgénios (Hong-Goka & Chang 2004; Quadros et al. 2007; Alves et al. 2009; Quintela et al. 2013), sugerindo que é um tecido-alvo para esteróides com efeitos neuroprotectores, cujos os níveis diminuem com a idade (Hong-Goka & Chang 2004) e em situações de patologia neurodegenerativa, particularmente na DA, frequentemente associada com o declínio dos níveis de hormonas sexuais (Quintela et al. 2013). Estas hormonas previnem mecanismos apoptóticos e possuem acção directa mediante receptores e indirecta através de vias de sinalização (revisto por Pike et al. 2009). Em contexto de DA, as funções de síntese, secreção e transporte do PC encontram-se substancialmente modificadas, tendo como resultado a redução da renovação de LCR. Paralelamente, a expressão de algumas proteínas - TTR, GSN e ApoJ - encontra-se também diminuída de forma significativa. De modo adicional, algumas das proteínas expressas no PC encontram-se implicadas em papéis de protecção e degeneração neuronal, sendo responsivas a estrogénios e androgénios. Ainda que muito ARN mensageiro/proteínas sejam distintamente expressas no PC em resposta a hormonas sexuais, muitas outras de diferentes funções poderão ser reguladas por hormonas esteróides sexuais (Quintela et al. 2013).

A relevância das hormonas sexuais contra a patogénese da DA assenta na redução dos níveis de A $\beta$ , péptido implicado no despoletar da patogénese da DA. Estudos humanos associaram a depleção dos níveis de E<sub>2</sub> e testosterona com elevações nos níveis plasmáticos e neurais de A $\beta$ . Em investigações animais, a manipulação de E<sub>2</sub> e testosterona por meio de gonadectomia e suplementação hormonal afecta significativamente a acumulação de A $\beta$ . Comparativamente a estudos experimentais em animais fêmeas, os efeitos da castração e da suplementação com testosterona nos níveis de A $\beta$  têm sido mais consistentes (revisto por Barron & Pike 2012). Os mecanismos pelos quais os estrogénios e os androgénios regulam o A $\beta$  ainda não foram inteiramente elucidados. Porém, ambas as tipologias de hormonas sexuais têm sido implicadas na coordenação da produção e eliminação de A $\beta$ . Em adição à regulação das vias envolvidas na síntese de A $\beta$ , as hormonas sexuais reduzem igualmente os níveis de A $\beta$  ao

modularem processos de depleção de A $\beta$ , concretamente a degradação de monómeros e oligómeros peptídicos por uma variedade de enzimas para as quais o A $\beta$  é substrato, das quais se salientam a TTR, a IDE e a GSN (Saido & Leissring 2012; revisto por Barron & Pike 2012). Por conseguinte, dada a importância do PC na homeostasia do SNC, das informações sobre o papel de determinadas proteínas no balanceamento dos níveis de A $\beta$  no cérebro e a acção regulatória dos estrogénios sobre algumas destas proteínas (Quintela et al. 2009; Quintela et al. 2013), foi proposto o estudo da influência dos estrogénios na expressão de *scavengers* de A $\beta$  no PC.

Começou-se por analisar os níveis de expressão do ARN mensageiro dos genes dos *scavengers* de A $\beta$  seleccionados no plexo coróide pela técnica de PCR convencional, de modo a corroborar a informação inscrita na literatura acerca da expressão destes genes no PC de rato. No cérebro, o PC é o único local que produz TTR (Sousa et al. 2007). Em ratos, a TTR é expressa predominantemente no fígado e no PC (I. Gonçalves, Alves, et al. 2008; Quintela et al. 2013; Quintela et al. 2014). Relativamente à MT-1/2, a sua expressão foi detectada no epitélio PC, assim como noutras estruturas cerebrais (Penkowa 2006; Faller 2010; Martinho et al. 2010). O tecido do PC apresenta expressão da enzima IDE na sua superfície apical, onde a sua inibição provoca a disrupção do metabolismo de A $\beta$ , e a sua concomitante acumulação na barreira sangue-LCR (Behl et al. 2009). Alguns autores sugerem que o PC é responsável pelo aparecimento da proteína GSN no LCR (Matsumoto et al. 2003), onde poderá desempenhar o papel de combate à neurotoxicidade do A $\beta$  (Antequera et al. 2009; Vargas et al. 2010). Em humanos, a ApoJ é amplamente expressa no rim, fígado, próstata e predominantemente no cérebro, e em particular no PC (Ling et al. 2012). Assim, após a análise do RNA mensageiro dos genes em estudo, foi possível confirmar que todos eles são expressos nos explantes de PC de rato, constituindo um bom modelo para o estudo dos *scavengers* de A $\beta$ .

Posteriormente procedeu-se à análise da expressão dos genes dos *scavengers* de A $\beta$  (TTR, MT-2, IDE, GSN e ApoJ) por PCR em tempo real, que permitiu confirmar também a sua expressão no PC de rato, com resultados diferenciados. Os explantes de PC de ratos recém-nascidos foram tratados com E<sub>2</sub> diluído em DMSO, durante 6 horas, numa forma dependente da dosagem. Para o gene da TTR, observou-se um aumento da expressão significativo do grupo tratado em relação ao grupo de controlo, sendo superior para a concentração de 100 nm comparativamente à condição de 10 nm. Este dado está em concordância com as pesquisas que indicam uma elevação dos níveis de TTR como efeito de E<sub>2</sub>. Um estudo anterior revelou que o tratamento de curta duração com E<sub>2</sub> em ratinhos culminou com o incremento substantivo dos níveis de ARN mensageiro de TTR no PC (Tang et al. 2004). Em adição, uma investigação mais recente documentou um efeito robusto desta hormona no aumento do ARN mensageiro e da proteína TTR em células de PC de rato, tanto *in vitro* como *in vivo*, através do RE (Quintela et al. 2009). Com o fígado de rato, órgão em que a TTR é abundantemente transcrita, verificaram-se efeitos comparáveis na expressão de TTR por estímulo com E<sub>2</sub> (I.

Gonçalves, Alves, et al. 2008). Desde há muito que se demonstrou que os estrogénios são substâncias com carácter de protecção neuronal (Amtul et al. 2010; Quintela et al. 2009). A diminuição da acumulação de péptidos de A $\beta$ , componente central da patologia da DA, por tratamento com estrogénios, sugere uma correlação negativa entre os níveis deste tipo de hormona esteróide sexual e de A $\beta$ . Concomitantemente, a TTR relaciona-se negativamente com os níveis de A $\beta$  e a existência de vastas placas senis em doentes com DA, sabendo-se que estas consequências são o resultado do papel de principal *scavenger* do péptido A $\beta$ , que previne a formação de fibrilas amilóides (Quintela et al. 2009).

Em sentido contrário aos dados obtidos para a TTR, a MT-2 apresenta um decréscimo significativo da sua expressão, para cerca de metade, no grupo tratado com E<sub>2</sub>, similar em ambas as condições, comparativamente ao grupo de controlo. Este resultado parece indicar uma correlação negativa entre a expressão de MT-2 e os efeitos do tratamento de E<sub>2</sub>, em dosagens crescentes. Num estudo foi descrita uma correlação negativa as expressões de MT-2 e do RE (Surowiak et al. 2005), sendo esta ligação reversível e dependente da disponibilidade de zinco no meio intracelular (Cano-Gauci & Sarkar 1996). Este dado pode ter implicações no entendimento das interacções químicas que a TTR estabelece com diferentes isoformas de MTs, que medeiam a sua ligação ao A $\beta$ , modificando a sua depleção (Martinho et al. 2010). A regulação positiva de MT-1/2 observada em doentes com DA e modelos animais de DA poderá ter consequências prejudiciais na *clearance* de A $\beta$ , pois a MT-2 diminui a ligação entre TTR e o A $\beta$  (I. Gonçalves, Quintela, et al. 2008; Martinho et al. 2010). Sabendo-se que a TTR é descrita como um *scavenger* de A $\beta$  (Costa et al. 2008), seria expectável uma redução na eficiência da sua remoção em condições de aumento dos níveis de MT-2, o que aparenta ser o caso na DA. Tal efeito poderá ser potenciado pelo aumento dos níveis de estrogénio no cérebro, diminuindo a eficácia da TH. Outra isoforma, a MT-3, interage igualmente com a TTR (Martinho et al. 2010). Esta proteína adquire afinidade para se conectar com moléculas de A $\beta$  na presença de MT-3, pelo que a clivagem integral de A $\beta$  e a degradação de formas agregadas do péptido  $\beta$ -amilóide, características atribuídas à TTR, deverão ser também potenciadas pela figuração de MT-3 (Martinho et al. 2010). Considerando a sua expressão no PC (Irie et al. 2004; I Gonçalves et al. 2008; Hozumi et al. 2008), e os vários estudos que fornecem provas do seu envolvimento na etiologia da DA (Howells et al. 2010), a sua actividade poderá correlacionar-se com as variações nos níveis de estrogénios.

Relativamente à IDE e aos restantes genes em estudo, apesar de não se verificar qualquer distinção substancial entre a expressão para as condições do grupo tratado com E<sub>2</sub> e a expressão para o grupo de controlo, a figura 8 revela uma tendência de aumento dos níveis de expressão do ARN mensageiro do gene da IDE associada ao incremento da concentração de E<sub>2</sub>, que corrobora o descrito na literatura. Vários modelos animais e de cultura de células estabelecem uma associação entre E<sub>2</sub> e a mediação de IDE (Zhao et al. 2011; Barron et al. 2009). *In vitro*, em neurónios de hipocampo de rato cultivados, o E<sub>2</sub> provocou um aumento da

expressão de IDE, enquanto *in vivo*, os níveis IDE no hipocampo diminuíram, efeito que foi revertido pela administração de E<sub>2</sub> (Zhao et al. 2011). No mesmo estudo, o tratamento com E<sub>2</sub> promoveu a expressão de IDE no hipocampo com decréscimo da acumulação de A $\beta$  *in vivo* (Zhao et al. 2011). Noutros estudos, verificaram-se reduções dos níveis de A $\beta$  e o incremento dos níveis de IDE após administração com E<sub>2</sub> (Amtul et al. 2010) e tratamento com um agonista selectivo de RE (George et al. 2013), respectivamente, em modelos animais de DA. A expressão de GSN não sofreu alterações após tratamento com E<sub>2</sub>, em concentrações crescentes. A GSN combate a neurotoxicidade exercida pelo A $\beta$  (Qiao et al. 2005) e restaura alterações no epitélio do PC por si provocadas (Vargas et al. 2010). Esta proteína, se regulada em sentido descendente, poderá elevar a progressão do carcinoma mamário (Winston et al. 2001). Liga-se também às extremidades dos filamentos de actina, limitando-a e polimerizando-a, possivelmente através do aumento da actividade transcricional do RE e do RA, sem mecanismo conhecido. Sabe-se que a GSN interage com o RE (forma beta), e que esta ligação aumenta através do tratamento com E<sub>2</sub> em animais novos, não se verificando a mesma relação para animais velhos (Nishimura et al. 2003; Ahn et al. 2003). Com a idade, a expressão de GSN aumenta (Ahn et al. 2003), pelo que a ausência de modificações na expressão de RNA mensageiro do gene da GSN poderá dever-se ao facto de a amostra utilizada ser composta por animais recém-nascidos. Por último, para ApoJ verificou-se um decréscimo na sua expressão no grupo tratado com E<sub>2</sub>, sendo esta redução de aproximadamente 50% para a condição de 10 nm e inferior para a concentração de 100 nm, relativamente ao grupo de controlo. A ApoJ encontra-se aumentada na DA e em outros modelos experimentais de lesões cerebrais (Stone et al. 1998; Stone et al. 2000; Ling et al. 2012), e sob controlo de esteróides (Stone et al. 1998), com tendência a localizar-se com o péptido beta-amilóide, estando particularmente presente em placas senis onde o A $\beta$  difundível se agrega (Ling et al. 2012). Contudo, o aumento da resposta de ApoJ a lesões cerebrais e DA, após tratamento com E<sub>2</sub>, parece depender da associação àe variar com a idade (Stone et al. 2000). Também foi demonstrado que o tratamento com estrogénios aumenta a expressão proteica de ApoJ em linhas celulares de cancro endometrial. não se observando alterações com a administração de progesterona (Won 2012). Na investigação conduzida, os níveis de expressão do gene da ApoJ não foram avaliados/medidos em condições de lesão cerebral, concretamente no PC, mas sim em condições normais, pelo não se poderá extrapolar este resultado para condições de agressão. No entanto, sabendo-se que a elevação da transcrição de ApoJ, em resposta ao tratamento com E<sub>2</sub> em condições de lesão, parece depender da interacção com ApoE, seria expectável que os níveis permanecessem inalterados, o que não se verificou. Deste modo, a aparente contradição poderá tratar-se de uma anomalia estatística relacionada com o baixo número de amostras para cada gene (tratados com E<sub>2</sub>, nas concentrações de 10 nm (n=4) e 100 nm (n=4), durante 6 horas, e controlos (n=3)).

O corpo prático deste trabalho revela genericamente expressões distintas dos genes dos *scavengers* de A $\beta$ , confirmando-se o previsto para a TTR e, parcialmente, para IDE. Não se identificaram alterações para o gene da GSN. E de forma controversa, os genes da MT-2 e da ApoJ parecem exibir resultados contraditórios com o inicialmente previsto. Todavia, seria necessário o recurso a outras técnicas (por exemplo, *Western Blot* e imunocitoquímica) para aferir com profundidade o papel dos estrogénios na regulação dos *scavengers* de A $\beta$ , o impacto do PC na modulação de degradação do péptido A $\beta$  (Bolos et al. 2014) e a responsabilidade por toxicidade neuronal e defeitos celulares do A $\beta$  (Kam et al. 2014).

## V. Conclusão e perspectivas futuras

A elaboração desta dissertação permitiu confirmar que no plexo coróide alguns genes, implicados na eliminação do péptido A $\beta$ , são distintivamente expressos em função dos níveis das hormonas sexuais, nomeadamente os estrogénios.

O envelhecimento, pela depleção de hormonas, e a DA, pela acumulação de A $\beta$ , relacionam-se com o PC, pela indução de alterações morfológicas, funcionais e orgânicas. Tendo em conta que a morte e disfunção neuronais estão associadas à acumulação de A $\beta$ , que provoca a DA, e que as hormonas esteróides reduzem os níveis de A $\beta$ , maior atenção preventiva deverá ser prestada a esta hipótese.

Pensando na complementaridade e no aprofundamento desta investigação, poderá ser confirmada e quantificada a expressão dos *scavengers* de A $\beta$  por determinação da quantidade de proteína secretada, antes e depois do tratamento E<sub>2</sub>; avaliar a concentração de E<sub>2</sub> no meio, antes e depois do estímulo com E<sub>2</sub>; analisar concomitantemente os efeitos da incubação de E<sub>2</sub> com A $\beta$ , avaliando também a *clearance* de A $\beta$ ; e perceber as vias sinalizadoras, através do RE, pelas quais são geradas as respostas celulares e as interacções entre componentes dessas vias.

Adicionalmente, a idade de ocorrência dos sintomas da DA tem um peso e sensibilidade vincadas na progressão desta patologia, pelo que deverá ser igualmente analisado o seu contributo para a etiologia da DA.

## VI. Referências bibliográficas

- Ahn, J.S. et al., 2003. Aging-associated increase of gelsolin for apoptosis resistance. *Biochemical and biophysical research communications*, 312(4), pp.1335-41.
- Aleshire, S.L. et al., 1983. Localization of human prealbumin in choroid plexus epithelium. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*, 31(5), pp.608-12.
- Alves, C.H. et al., 2009. Androgen receptor is expressed in murine choroid plexus and downregulated by 5 $\alpha$ -Dihydrotestosterone in male and female mice. *Journal of Molecular Neuroscience*, 38(1), pp.41-49.
- Alvira-Botero, X. & Carro, E.M., 2010. Clearance of amyloid-B peptide across the choroid plexus in Alzheimer's disease. *Current aging science*, 3(3), pp.219-229.
- Aminoff, M.J., 2005. Netter's neurology. *Muscle & Nerve*, 32(6), pp.821-821.
- Amoureux, M.C., Wurch, T. & Pauwels, P.J., 1995. Modulation of metallothionein-III mRNA content and growth rate of rat C6-glia cells by transfection with human 5-HT<sub>1D</sub> receptor genes. *Biochemical and biophysical research communications*, 214(2), pp.639-45.
- Amtul, Z. et al., 2010. Neuroprotective mechanism conferred by 17 $\beta$ -estradiol on the biochemical basis of Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 169(2), pp.781-6.
- Andrea, T.A. et al., 1980. Binding of thyroid hormones and analogues to the human plasma protein prealbumin. *Biochemistry*, 19(1), pp.55-63.
- Anon, R. Keep, S.R. Ennis, A.L. Betz, Blood-brain barrier ion transport, in: W.M. Pardridge (Ed.), *An Introduction to the Blood-Brain-Barrier: Methodology, Biology and Pathology*, University Press, Cambridge, 1998, pp. 207-213. -
- Antequera, D. et al., 2009. Cytoplasmic gelsolin increases mitochondrial activity and reduces A $\beta$  burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*, 36(1), pp.42-50.
- Archer, S.K. et al., 2004. The flightless I protein and the gelsolin family in nuclear hormone receptor-mediated signalling. *Biochemical Society transactions*, 32(Pt 6), pp.940-2.
- Archer, S.K., Claudianos, C. & Campbell, H.D., 2005. Evolution of the gelsolin family of actin-binding proteins as novel transcriptional coactivators. *BioEssays*, 27(4), pp.388-396.
- Ashcroft, G.S. & Mills, S.J., 2002. Androgen receptor-mediated inhibition of cutaneous wound healing. *The Journal of clinical investigation*, 110(5), pp.615-24.
- Ashcroft, G.S., Mills, S.J. & Ashworth, J.J., 2002. Ageing and wound healing. *Biogerontology*, 3(6), pp.337-45.
- Baig, S. et al., 2012. Clusterin mRNA and protein in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, 28(2), pp.337-44.

- Balin, B.J. & Broadwell, R.D., 1988. Transcytosis of protein through the mammalian cerebral epithelium and endothelium. I. Choroid plexus and the blood-cerebrospinal fluid barrier. *Journal of neurocytology*, 17(6), pp.809-26.
- Barron, A.M. et al., 2009. Ovariectomy and 17beta-estradiol replacement do not alter beta-amyloid levels in sheep brain. *Endocrinology*, 150(7), pp.3228-36.
- Barron, A.M. & Pike, C.J., 2012. Sex hormones, aging, and Alzheimer's disease. *Frontiers in bioscience (Elite edition)*, 4, pp.976-97.
- Bartalena, L. & Robbins, J., 1992. Variations in thyroid hormone transport proteins and their clinical implications. *Thyroid: official journal of the American Thyroid Association*, 2(3), pp.237-45.
- Baum, L.W., 2005. Sex, hormones, and Alzheimer's disease. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 60(6), pp.736-43.
- Behl, M., Zhang, Y. & Zheng, W., 2009. Involvement of insulin-degrading enzyme in the clearance of beta-amyloid at the blood-CSF barrier: Consequences of lead exposure. *Cerebrospinal fluid research*, 6, p.11.
- Bell, R.D. et al., 2009. SRF and myocardin regulate LRP-mediated amyloid-beta clearance in brain vascular cells. *Nature cell biology*, 11(2), pp.143-153.
- Bell, R.D. et al., 2007. Transport pathways for clearance of human Alzheimer's amyloid beta-peptide and apolipoproteins E and J in the mouse central nervous system. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 27(5), pp.909-918.
- Bertram, L., 2013. *Alzheimer's Disease*, Elsevier.
- Bertram, L. et al., 2000. Evidence for genetic linkage of Alzheimer's disease to chromosome 10q. *Science (New York, N.Y.)*, 290(5500), pp.2302-3.
- Del Bigio, M.R., 1995. The ependyma: a protective barrier between brain and cerebrospinal fluid. *Glia*, 14(1), pp.1-13.
- Bolos, M. et al., 2014. Choroid plexus implants rescue Alzheimer's disease-like pathologies by modulating amyloid-B degradation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(15), pp.2947-2955.
- Boughey, J.G.F. & Graff-Radford, N.R., 1987. *Alzheimer's Disease*, Elsevier.
- Brown, P.D. et al., 2004. Molecular mechanisms of cerebrospinal fluid production. *Neuroscience*, 129(4), pp.955-968.
- Buxbaum, J.N. et al., 2008. Transthyretin protects Alzheimer's mice from the behavioral and biochemical effects of A $\beta$  toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(7), pp.2681-6.
- Buxbaum, J.N. & Reixach, N., 2009. Transthyretin: the servant of many masters. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 66(19), pp.3095-101.
- Cano-Gauci, D.F. & Sarkar, B., 1996. Reversible zinc exchange between metallothionein and the estrogen receptor zinc finger. *FEBS Letters*, 386(1), pp.1-4.

- Carrasco, J. et al., 1999. Metallothionein (MT)-III: generation of polyclonal antibodies, comparison with MT-I+II in the freeze lesioned rat brain and in a bioassay with astrocytes, and analysis of Alzheimer's disease brains. *Journal of neurotrauma*, 16(11), pp.1115-29.
- Carroll, J.C. et al., 2010. Sex differences in  $\beta$ -amyloid accumulation in 3xTg-AD mice: role of neonatal sex steroid hormone exposure. *Brain research*, 1366, pp.233-45.
- Cascella, R. et al., 2013. Transthyretin suppresses the toxicity of oligomers formed by misfolded proteins in vitro. *Biochimica et biophysica acta*, 1832(12), pp.2302-14.
- Chauhan, V., Ji, L. & Chauhan, A., 2008. Anti-amyloidogenic, anti-oxidant and anti-apoptotic role of gelsolin in Alzheimer's disease. In *Biogerontology*. pp. 381-389.
- Chauhan, V.P. et al., 1999. Binding of gelsolin, a secretory protein, to amyloid beta-protein. *Biochemical and biophysical research communications*, 258(2), pp.241-6.
- Chen, M. et al., 2013. *Animal Models for the Study of Human Disease*,
- Chodobski, A. & Szmydynger-Chodobska, J., 2001. Choroid plexus: Target for polypeptides and site of their synthesis. *Microscopy Research and Technique*, 52(1), pp.65-82.
- Choi, S.H. et al., 2007. Accelerated Abeta deposition in APPswe/PS1deltaE9 mice with hemizygous deletions of TTR (transthyretin). *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(26), pp.7006-10.
- Choi-Miura, N.H. & Oda, T., Relationship between multifunctional protein "clusterin" and Alzheimer disease. *Neurobiology of aging*, 17(5), pp.717-22.
- Chung, H. et al., 1999. Uptake, Degradation, and Release of Fibrillar and Soluble Forms of Alzheimer's Amyloid  $\beta$ -Peptide by Microglial Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 274(45), pp.32301-32308.
- Chung, R.S. et al., 2004. Neuron-glia communication: metallothionein expression is specifically up-regulated by astrocytes in response to neuronal injury. *Journal of neurochemistry*, 88(2), pp.454-61.
- Chung, R.S. et al., 2010. 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.
- Costa, D.A. et al., 2007. Enrichment improves cognition in AD mice by amyloid-related and unrelated mechanisms. *Neurobiology of aging*, 28(6), pp.831-44.
- Costa, R. et al., 2008. Transthyretin protects against A-beta peptide toxicity by proteolytic cleavage of the peptide: a mechanism sensitive to the Kunitz protease inhibitor. *PloS one*, 3(8), p.e2899.
- Cottrell, D.A. et al., 2001. Cytochrome C oxidase deficient cells accumulate in the hippocampus and choroid plexus with age. *Neurobiology of Aging*, 22(2), pp.265-272.
- Craig, M.C. & Murphy, D.G.M., 2010. Estrogen therapy and Alzheimer's dementia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1205, pp.245-53.
- Cutler, R.W. et al., 1968. Formation and absorption of cerebrospinal fluid in man. *Brain : a journal of neurology*, 91(4), pp.707-20.

- Davson, H., Segal, M.B., 1995. Physiology of the CSF and blood-brain-barriers. *Diabetes Care*, 33(Supplement\_1), pp.S11-S61.
- Deane, R. et al., 2009. Clearance of amyloid-beta peptide across the blood-brain barrier: implication for therapies in Alzheimer's disease. *CNS & neurological disorders drug targets*, 8(1), pp.16-30.
- DeKosky, S.T. & Orgogozo, J.-M., 2001. *Alzheimer Disease*, Elsevier.
- DeMattos, R.B. et al., 2002. Clusterin promotes amyloid plaque formation and is critical for neuritic toxicity in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(16), pp.10843-8.
- Dohrmann, G.J., 1970. The choroid plexus: a historical review. *Brain research*, 18(2), pp.197-218.
- Dorfman, V.B. et al., 2010. Differential cerebral deposition of IDE and NEP in sporadic and familial Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, 31(10), pp.1743-57.
- Du, J. et al., 2012. Identification of beta-amyloid-binding sites on transthyretin. *Protein engineering, design & selection : PEDS*, 25(7), pp.337-45.
- Du, J. & Murphy, R.M., 2010. Characterization of the Interaction of  $\beta$ -Amyloid with Transthyretin Monomers and Tetramers. *Biochemistry*, 49(38), pp.8276-8289.
- Duce, J.A. et al., 2010. Iron-export ferroxidase activity of  $\beta$ -amyloid precursor protein is inhibited by zinc in Alzheimer's disease. *Cell*, 142(6), pp.857-67.
- Ebadi, M. et al., 2005. Metallothionein-mediated neuroprotection in genetically engineered mouse models of Parkinson's disease. *Brain research. Molecular brain research*, 134(1), pp.67-75.
- Emerich, D.F. et al., 2005. The choroid plexus in the rise, fall and repair of the brain. *BioEssays*, 27(3), pp.262-274.
- Erickson, J.C. et al., 1995. Expression of human metallothionein-III in transgenic mice. *Neurochemistry international*, 27(1), pp.35-41.
- Faller, P., 2010. Neuronal growth-inhibitory factor (metallothionein-3): reactivity and structure of metal-thiolate clusters. *The FEBS journal*, 277(14), pp.2921-30.
- Finder, V.H. & Glockshuber, R., 2007. Amyloid-beta aggregation. *Neurodegenerative Diseases*, 4(1), pp.13-27.
- Gao, W. et al., 2004. Insulin degrading enzyme is expressed in the human cerebrovascular endothelium and in cultured human cerebrovascular endothelial cells. *Neuroscience letters*, 371(1), pp.6-11.
- Gauthier, M.A. et al., 2008. Covalent arylation of metallothionein by oxidized dopamine products: a possible mechanism for zinc-mediated enhancement of dopaminergic neuron survival. *Neurotoxicity research*, 14(4), pp.317-28.
- George, S. et al., 2013. Nonsteroidal selective androgen receptor modulators and selective estrogen receptor  $\beta$  agonists moderate cognitive deficits and amyloid- $\beta$  levels in a mouse model of Alzheimer's disease. *ACS Chemical Neuroscience*, 4(12), pp.1537-1548.

- Ghanim, H. et al., 2012. Reduction in inflammation and the expression of amyloid precursor protein and other proteins related to Alzheimer's disease following gastric bypass surgery. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 97(7), pp.E1197-201.
- Gherzi-Egea, J.F. & Strazielle, N., 2001. Brain drug delivery, drug metabolism, and multidrug resistance at the choroid plexus. *Microscopy Research and Technique*, 52(1), pp.83-88.
- Giannakopoulos, P. et al., 1998. Possible neuroprotective role of clusterin in Alzheimer's disease: a quantitative immunocytochemical study. *Acta neuropathologica*, 95(4), pp.387-94.
- Giannopoulos, P.F. & Praticò, D., 2015. Alzheimer's Disease. In *Diet and Nutrition in Dementia and Cognitive Decline*. pp. 13-21.
- Gleason, C.E. et al., 2005. Clinical pharmacology and differential cognitive efficacy of estrogen preparations. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1052, pp.93-115.
- Gonçalves, I., Quintela, T., et al., 2008. Transthyretin interacts with metallothionein 2. *Biochemistry*, 47(8), pp.2244-2251.
- Gonçalves, I., Alves, C.H., et al., 2008. Transthyretin is up-regulated by sex hormones in mice liver. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 317(1-2), pp.137-142.
- Greenfield, J.P. et al., 2002. Estrogen lowers Alzheimer ??-amyloid generation by stimulating trans-Golgi network vesicle biogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 277(14), pp.12128-12136.
- Guénette, S.Y., 2003. Mechanisms of Abeta clearance and catabolism. *Neuromolecular medicine*, 4(3), pp.147-60.
- Hagen, G.A. & Solberg, L.A., 1974. Brain and cerebrospinal fluid permeability to intravenous thyroid hormones. *Endocrinology*, 95(5), pp.1398-410.
- Hammad, S.M. et al., 1997. Interaction of apolipoprotein J-amyloid beta-peptide complex with low density lipoprotein receptor-related protein-2/megalin. A mechanism to prevent pathological accumulation of amyloid beta-peptide. *Journal of Biological Chemistry*, 272(30), pp.18644-18649.
- Hardy, J., Guerreiro, R. & Lovestone, S., 2011. Clusterin as an Alzheimer biomarker. *Archives of neurology*, 68(11), pp.1459-60.
- Haskell, S.G., Richardson, E.D. & Horwitz, R.I., 1997. The effect of estrogen replacement therapy on cognitive function in women: a critical review of the literature. *Journal of clinical epidemiology*, 50(11), pp.1249-64.
- Hegde, M.L. et al., 2009. Challenges associated with metal chelation therapy in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 17(3), pp.457-68.
- Henderson, V.W. et al., 1994. Estrogen replacement therapy in older women. Comparisons between Alzheimer's disease cases and nondemented control subjects. *Archives of neurology*, 51(9), pp.896-900.
- Henderson, V.W., 2006. Estrogen-containing hormone therapy and Alzheimer's disease risk: understanding discrepant inferences from observational and experimental research. *Neuroscience*, 138(3), pp.1031-9.

- Hidalgo, J. et al., 2009. 10. Structure and Function of Vertebrate Metallothioneins. In *Metallothioneins and Related Chelators*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, pp. 279-317.
- Hirko, A.C. et al., 2007. Peripheral Transgene Expression of Plasma Gelsolin Reduces Amyloid in Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease. *Molecular Therapy*, 15(9), pp.1623-1629.
- Hogervorst, E. et al., 1999. 1998 Curt P. Richter Award. The effect of hormone replacement therapy on cognitive function in elderly women. *Psychoneuroendocrinology*, 24(1), pp.43-68.
- Hong-Goka, B.C. & Chang, F.-L.F., 2004. Estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in choroid plexus epithelial cells in Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, 360(3), pp.113-116.
- Howells, C., West, A.K. & Chung, R.S., 2010. Neuronal growth-inhibitory factor (metallothionein-3): evaluation of the biological function of growth-inhibitory factor in the injured and neurodegenerative brain. *The FEBS journal*, 277(14), pp.2931-9.
- Hozumi, I. et al., 2008. Metallothionein-3 is expressed in the brain and various peripheral organs of the rat. *Neuroscience letters*, 438(1), pp.54-8.
- Hozumi, I., 2013. Roles and therapeutic potential of metallothioneins in neurodegenerative diseases. *Current pharmaceutical biotechnology*, 14(4), pp.408-13.
- Hulbert, A.J., 2000. Thyroid hormones and their effects: a new perspective. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 75(4), pp.519-631.
- Irie, Y. et al., 2004. Expression of neuronal growth inhibitory factor (metallothionein-III) in the salivary gland. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, 53(6), pp.719-23.
- Janmey, P.A. et al., 1985. Interactions of gelsolin and gelsolin-actin complexes with actin. Effects of calcium on actin nucleation, filament severing, and end blocking. *Biochemistry*, 24(14), pp.3714-23.
- Ji, L., Chauhan, A. & Chauhan, V., 2008. Cytoplasmic gelsolin in pheochromocytoma-12 cells forms a complex with amyloid beta-protein. *Neuroreport*, 19(4), pp.463-466.
- Kam, T.-I., Gwon, Y. & Jung, Y.-K., 2014. Amyloid beta receptors responsible for neurotoxicity and cellular defects in Alzheimer's disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(24), pp.4803-4813.
- Kanai, M., Raz, A. & Goodman, D.S., 1968. Retinol-binding protein: the transport protein for vitamin A in human plasma. *The Journal of clinical investigation*, 47(9), pp.2025-44.
- Keep, R.F. & Jones, H.C., 1990. A morphometric study on the development of the lateral ventricle choroid plexus, choroid plexus capillaries and ventricular ependyma in the rat. *Brain research. Developmental brain research*, 56(1), pp.47-53.
- Killick, R. et al., 2014. Clusterin regulates  $\beta$ -amyloid toxicity via Dickkopf-1-driven induction of the wnt-PCP-JNK pathway. *Molecular psychiatry*, 19(1), pp.88-98.
- Kittisupamongkol, W., 2009. Cerebrospinal fluid production rate. *Clinical & experimental ophthalmology*, 37(8), p.827; author reply 827-8.

- Kurochkin, I. V & Goto, S., 1994. Alzheimer's beta-amyloid peptide specifically interacts with and is degraded by insulin degrading enzyme. *FEBS letters*, 345(1), pp.33-7.
- Kurtcuoglu, V., Poulidakos, D. & Ventikos, Y., 2005. Computational modeling of the mechanical behavior of the cerebrospinal fluid system. *Journal of biomechanical engineering*, 127(2), pp.264-269.
- Kwiatkowski, D.J. et al., 1985. Isolation and properties of two actin-binding domains in gelsolin. *The Journal of biological chemistry*, 260(28), pp.15232-8.
- Lacroix, S., Feinstein, D. & Rivest, S., 1998. The bacterial endotoxin lipopolysaccharide has the ability to target the brain in upregulating its membrane CD14 receptor within specific cellular populations. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 8(4), pp.625-640.
- Lambert, J.-C. & Amouyel, P., 2011. Genetics of Alzheimer's disease: new evidences for an old hypothesis? *Current opinion in genetics & development*, 21(3), pp.295-301.
- LeBlanc, E.S. et al., 2001. Hormone replacement therapy and cognition: systematic review and meta-analysis. *JAMA*, 285(11), pp.1489-99.
- Li, X. & Buxbaum, J.N., 2011. Transthyretin and the brain re-visited: is neuronal synthesis of transthyretin protective in Alzheimer's disease? *Molecular neurodegeneration*, 6, p.79.
- Liddel, S. a., 2015. Development of the choroid plexus and blood-CSF barrier. *Frontiers in Neuroscience*, 9(March), pp.1-13.
- Lim, D. et al., 2003. Can testosterone replacement decrease the memory problem of old age? *Medical hypotheses*, 60(6), pp.893-6.
- Lin, L.-F. & Luo, H.-M., 2011. Screening of treatment targets for Alzheimer's disease from the molecular mechanisms of impairment by  $\beta$ -amyloid aggregation and tau hyperphosphorylation. *Neuroscience Bulletin*, 27(1), pp.53-60.
- Lindeque, J.Z. et al., 2010. The involvement of metallothioneins in mitochondrial function and disease. *Current protein & peptide science*, 11(4), pp.292-309.
- Ling, I.-F. et al., 2012. Genetics of clusterin isoform expression and Alzheimer's disease risk. *PLoS one*, 7(4), p.e33923.
- Liz, M.A. et al., 2012. Transthyretin is a metallopeptidase with an inducible active site. *Biochemical Journal*, 443(3), pp.769-778.
- Maki, P.M., 2004. Hormone therapy and risk for dementia: where do we go from here? *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, 19(6), pp.354-9.
- Malito, E., Hulse, R.E. & Tang, W.-J., 2008. Amyloid beta-degrading cryptidases: insulin degrading enzyme, presequence peptidase, and neprilysin. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 65(16), pp.2574-85.
- Manso, Y. et al., 2011. Metallothionein and brain inflammation. *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*, 16(7), pp.1103-13.
- Maret, W., 2009. Molecular aspects of human cellular zinc homeostasis: redox control of zinc potentials and zinc signals. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, 22(1), pp.149-57.

- Martinho, a., Gonçalves, I. & Santos, C.R., 2013. Glucocorticoids regulate metallothionein-1/2 expression in rat choroid plexus: Effects on apoptosis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 376(1-2), pp.41-51.
- Martinho, a., Santos, C.R. & Gonçalves, I., 2013. A distal estrogen responsive element upstream the cap site of human transthyretin gene is an enhancer-like element upon ER $\alpha$  and/or ER $\beta$  transactivation. *Gene*, 527(2), pp.469-476.
- Martinho, A. et al., 2010. Human metallothioneins 2 and 3 differentially affect amyloid-beta binding by transthyretin. *The FEBS journal*, 277(16), pp.3427-36.
- Martone, R.L. & Herbert, J., 1993. Transthyretin interacts with globin to form protein complexes with hemedependent solubility. *Amyloid and Amyloidosis*, pp.532-534.
- Matsumoto, N. et al., 2003. Isolation of a set of genes expressed in the choroid plexus of the mouse using suppression subtractive hybridization. *Neuroscience*, 117(2), pp.405-15.
- Matsuoka, Y. et al., 2003. Novel therapeutic approach for the treatment of Alzheimer's disease by peripheral administration of agents with an affinity to beta-amyloid. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(1), pp.29-33.
- McDermott, J.R. & Gibson, A.M., 1997. Degradation of Alzheimer's beta-amyloid protein by human and rat brain peptidases: involvement of insulin-degrading enzyme. *Neurochemical research*, 22(1), pp.49-56.
- McKinnon, B. et al., 2005. Synthesis of thyroid hormone binding proteins transthyretin and albumin by human trophoblast. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 90(12), pp.6714-20.
- Meloni, G. et al., 2008. Metal swap between Zn<sup>7</sup>-metallothionein-3 and amyloid-beta-Cu protects against amyloid-beta toxicity. *Nature chemical biology*, 4(6), pp.366-72.
- Morgado, I. et al., 2007. Regulation of transthyretin by thyroid hormones in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 152(2-3), pp.189-197.
- Mortazavi, M.M. et al., 2014. The choroid plexus: A comprehensive review of its history, anatomy, function, histology, embryology, and surgical considerations. *Child's Nervous System*, 30(2), pp.205-214.
- Murakami, T. et al., 1987. Prealbumin gene expression during mouse development studied by in situ hybridization. *Cell differentiation*, 22(1), pp.1-9.
- Narayan, P. et al., 2012. The extracellular chaperone clusterin sequesters oligomeric forms of the amyloid-B(1-40) peptide. *Nature structural & molecular biology*, 19(1), pp.79-83.
- Nielsen, A.E., Bohr, A. & Penkowa, M., 2007. The Balance between Life and Death of Cells: Roles of Metallothioneins. *Biomarker insights*, 1, pp.99-111.
- Nielsen, H.M. et al., 2010. Astrocytic A beta 1-42 uptake is determined by A beta-aggregation state and the presence of amyloid-associated proteins. *Glia*, 58(10), pp.1235-46.
- Nishimura, K. et al., 2003. Modulation of androgen receptor transactivation by gelsolin: a newly identified androgen receptor coregulator. *Cancer research*, 63(16), pp.4888-94.

- Noy, N., Slosberg, E. & Scarlata, S., 1992. Interactions of retinol with binding proteins: studies with retinol-binding protein and with transthyretin. *Biochemistry*, 31(45), pp.11118-24.
- Nuutinen, T. et al., 2009. Clusterin: a forgotten player in Alzheimer's disease. *Brain research reviews*, 61(2), pp.89-104.
- Nuutinen, T. et al., 2010. Valproic acid stimulates clusterin expression in human astrocytes: Implications for Alzheimer's disease. *Neuroscience letters*, 475(2), pp.64-8.
- Oda, T. et al., 1995. Clusterin (apoJ) alters the aggregation of amyloid beta-peptide (A beta 1-42) and forms slowly sedimenting A beta complexes that cause oxidative stress. *Experimental neurology*, 136(1), pp.22-31.
- Oliveira, S.M. et al., 2011. Gender-dependent transthyretin modulation of brain amyloid-B levels: evidence from a mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 27(2), pp.429-39.
- Ono, K. et al., 2005. Cerebrospinal fluid of Alzheimer patients promotes beta-amyloid fibril formation in vitro. *Neurobiology of disease*, 20(2), pp.233-40.
- Paganini-Hill, A., 1996. Oestrogen replacement therapy and Alzheimer's disease. *British journal of obstetrics and gynaecology*, 103 Suppl , pp.80-6.
- Paganini-Hill, A. & Henderson, V.W., 1994. Estrogen deficiency and risk of Alzheimer's disease in women. *American journal of epidemiology*, 140(3), pp.256-61.
- Palha, J.A. et al., 2000. Transthyretin regulates thyroid hormone levels in the choroid plexus, but not in the brain parenchyma: study in a transthyretin-null mouse model. *Endocrinology*, 141(9), pp.3267-72.
- Patten, J., 2006. NETTER'S NEUROLOGY By H. Royden Jones 2005. St Louis: Saunders (Elsevier).
- Penkowa, M. et al., 1999. Distribution of metallothionein I + II and vesicular zinc in the developing central nervous system: correlative study in the rat. *The Journal of comparative neurology*, 412(2), pp.303-18.
- Penkowa, M., 2006. Metallothioneins are multipurpose neuroprotectants during brain pathology. *The FEBS journal*, 273(9), pp.1857-70.
- Penkowa, M., Cáceres, M., et al., 2006. Novel roles for metallothionein-I + II (MT-I + II) in defense responses, neurogenesis, and tissue restoration after traumatic brain injury: insights from global gene expression profiling in wild-type and MT-I + II knockout mice. *Journal of neuroscience research*, 84(7), pp.1452-74.
- Penkowa, M., Tio, L., et al., 2006. Specificity and divergence in the neurobiologic effects of different metallothioneins after brain injury. *Journal of neuroscience research*, 83(6), pp.974-84.
- Pérez, A. et al., 2000. Degradation of soluble amyloid beta-peptides 1-40, 1-42, and the Dutch variant 1-40Q by insulin degrading enzyme from Alzheimer disease and control brains. *Neurochemical research*, 25(2), pp.247-55.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), p.e45.

- Pike, C.J. et al., 2009. Protective actions of sex steroid hormones in Alzheimer's disease. *Frontiers in neuroendocrinology*, 30(2), pp.239-58.
- Pluta, R., 2007. Role of ischemic blood-brain barrier on amyloid plaques development in Alzheimer's disease brain. *Current neurovascular research*, 4(2), pp.121-9.
- Preston, J.E., 2001. Ageing choroid plexus-cerebrospinal fluid system. *Microscopy Research and Technique*, 52(1), pp.31-37.
- Qiao, H. et al., 2005. Inhibition of Alzheimer's amyloid-beta peptide-induced reduction of mitochondrial membrane potential and neurotoxicity by gelsolin. *Neurobiology of aging*, 26(6), pp.849-55.
- Qiu, W.Q. et al., 1998. Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation. *The Journal of biological chemistry*, 273(49), pp.32730-8.
- Quadros, P.S., Pfau, J.L. & Wagner, C.K., 2007. Distribution of progesterone receptor immunoreactivity in the fetal and neonatal rat forebrain. *The Journal of comparative neurology*, 504(1), pp.42-56.
- Quintela, T. et al., 2009. 17beta-estradiol induces transthyretin expression in murine choroid plexus via an oestrogen receptor dependent pathway. *Cellular and molecular neurobiology*, 29(4), pp.475-83.
- Quintela, T. et al., 2008. 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone up-regulates transthyretin levels in mice and rat choroid plexus via an androgen receptor independent pathway. *Brain Research*, 1229, pp.18-26.
- Quintela, T. et al., 2013. Analysis of the Effects of Sex Hormone Background on the Rat Choroid Plexus Transcriptome by cDNA Microarrays. *PLoS ONE*, 8(4).
- Quintela, T. et al., 2014. Gene Expression Profiling in the Hippocampus of Orchidectomized Rats. *Journal of Molecular Neuroscience*, 55(1), pp.198-205.
- Quintela, T. et al., 2011. Progesterone enhances transthyretin expression in the rat choroid plexus in vitro and in vivo via progesterone receptor. *Journal of Molecular Neuroscience*, 44(3), pp.152-158.
- Rapp, S.R. et al., 2003. Effect of estrogen plus progestin on global cognitive function in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Memory Study: a randomized controlled trial. *JAMA*, 289(20), pp.2663-72.
- Ray, I. et al., 2000. Gelsolin inhibits the fibrillization of amyloid beta-protein, and also defibrillizes its preformed fibrils. *Brain research*, 853(2), pp.344-51.
- Raz, A., Shiratori, T. & Goodman, D.S., 1970. Studies on the protein-protein and protein-ligand interactions involved in retinol transport in plasma. *The Journal of biological chemistry*, 245(8), pp.1903-12.
- Redzic, Z.B. et al., 2005. The Choroid Plexus-Cerebrospinal Fluid System: From Development to Aging. *Current Topics in Developmental Biology*, 71(05), pp.1-52.
- Redzic, Z.B. & Segal, M.B., 2004. The structure of the choroid plexus and the physiology of the choroid plexus epithelium. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(12), pp.1695-1716.
- El Refaey, H. et al., 1997. Identification of metallothionein receptors in human astrocytes. *Neuroscience letters*, 231(3), pp.131-4.

- Richardson, S.J., 2009. Evolutionary changes to transthyretin: evolution of transthyretin biosynthesis. *The FEBS journal*, 276(19), pp.5342-56.
- Riisøen, H., 1988. Reduced prealbumin (transthyretin) in CSF of severely demented patients with Alzheimer's disease. *Acta neurologica Scandinavica*, 78(6), pp.455-9.
- Ruitenbergh, A. et al., 2001. Incidence of dementia: does gender make a difference? *Neurobiology of Aging*, 22(4), pp.575-580.
- Saido, T. & Leissring, M. a, 2012. Proteolytic degradation of amyloid beta-protein. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(6), p.a006379. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22675659>.
- Santos, C.R. a, Anjos, L. & Power, D.M., 2002. Transthyretin in fish: State of the art. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 40(12), pp.1244-1249.
- Santos, C.R. & Power, D.M., 1999. Identification of transthyretin in fish (*Sparus aurata*): cDNA cloning and characterisation. *Endocrinology*, 140(5), pp.2430-3.
- Schreiber, G. et al., 1990. Thyroxine transport from blood to brain via transthyretin synthesis in choroid plexus. *The American journal of physiology*, 258(2 Pt 2), pp.R338-R345.
- Schwarzman, A.L. et al., 1994. Transthyretin sequesters amyloid beta protein and prevents amyloid formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(18), pp.8368-72.
- Segal, M.B., 2000. The choroid plexuses and the barriers between the blood and the cerebrospinal fluid. *Cellular and molecular neurobiology*, 20(2), pp.183-96.
- Segal, M.B., 2001. Transport of nutrients across the choroid plexus. *Microscopy Research and Technique*, 52(1), pp.38-48.
- Selkoe, D.J., 2015. Alzheimer Disease. In *Rosenberg's Molecular and Genetic Basis of Neurological and Psychiatric Disease*. Elsevier, pp. 753-768.
- Serot, J.-M., Béné, M.-C. & Faure, G.C., 2003. Choroid plexus, aging of the brain, and Alzheimer's disease. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 8, pp.s515-21.
- Serot, J.M. et al., 1997. Cerebrospinal fluid transthyretin: aging and late onset Alzheimer's disease. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 63(4), pp.506-8.
- Shuangshoti, S. & Netsky, M.G., 1970. Human choroid plexus: Morphologic and histochemical alterations with age. *American Journal of Anatomy*, 128(1), pp.73-95.
- Shumaker, S.A. et al., 2003. Estrogen plus progestin and the incidence of dementia and mild cognitive impairment in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Memory Study: a randomized controlled trial. *JAMA*, 289(20), pp.2651-62.
- Smith, G.S., Walter, G.L. & Walker, R.M., 2013. *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology*,
- Soprano, D.R. et al., 1985. Demonstration of transthyretin mRNA in the brain and other extrahepatic tissues in the rat. *The Journal of biological chemistry*, 260(21), pp.11793-8.

- Soprano, D.R., Soprano, K.J. & Goodman, D.S., 1986. Retinol-binding protein and transthyretin mRNA levels in visceral yolk sac and liver during fetal development in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(19), pp.7330-4.
- Sousa, J.C. et al., 2007. Transthyretin and Alzheimer's disease: where in the brain? *Neurobiology of aging*, 28(5), pp.713-8.
- Spector, R. et al., 2015. A balanced view of choroid plexus structure and function: Focus on adult humans. *Experimental Neurology*, 267, pp.78-86.
- Spector, R., 1977. Vitamin homeostasis in the central nervous system. *The New England journal of medicine*, 296(24), pp.1393-8.
- Stankovic, R.K., Chung, R.S. & Penkowa, M., 2007. Metallothioneins I and II: Neuroprotective significance during CNS pathology. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(3), pp.484-489.
- Stein, T.D. & Johnson, J.A., 2002. Lack of neurodegeneration in transgenic mice overexpressing mutant amyloid precursor protein is associated with increased levels of transthyretin and the activation of cell survival pathways. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(17), pp.7380-8.
- Stone, D.J. et al., 2000. Effects of Age on Gene Expression during Estrogen-Induced Synaptic Sprouting in the Female Rat. *Experimental Neurology*, 165(1), pp.46-57.
- Stone, D.J. et al., 1998. Increased synaptic sprouting in response to estrogen via an apolipoprotein E-dependent mechanism: implications for Alzheimer's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 18(9), pp.3180-3185.
- Surowiak, P. et al., 2005. Elevated metallothionein (MT) expression in invasive ductal breast cancers predicts tamoxifen resistance. *Histology and histopathology*, 20(4), pp.1037-44.
- Tang, Y.P. et al., 2004. Estrogen increases brain expression of the mRNA encoding transthyretin, an amyloid beta scavenger protein. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 6(4), pp.413-20; discussion 443-9.
- Tanzi, R.E., Moir, R.D. & Wagner, S.L., 2004. Clearance of Alzheimer's A $\beta$  Peptide. *Neuron*, 43(5), pp.605-608.
- Thambisetty, M. et al., 2010. Association of plasma clusterin concentration with severity, pathology, and progression in Alzheimer disease. *Archives of general psychiatry*, 67(7), pp.739-48.
- Thanos, C.G., Bintz, B. & Emerich, D.F., 2010. Epithelial Cell Transplants for Repair of the Brain.
- Tsuji, S. et al., 1992. Molecular cloning of human growth inhibitory factor cDNA and its down-regulation in Alzheimer's disease. *The EMBO journal*, 11(13), pp.4843-50.
- De Tullio, M.B. et al., 2013. Proteolytically Inactive Insulin-Degrading Enzyme Inhibits Amyloid Formation Yielding Non-Neurotoxic A $\beta$  Peptide Aggregates. *PLoS ONE*, 8(4).
- Urbanucci, A. et al., 2008. Androgen regulation of the androgen receptor coregulators. *BMC cancer*, 8, p.219.

- Vargas, T. et al., 2010. Gelsolin restores A beta-induced alterations in choroid plexus epithelium. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2010, p.805405.
- Vasák, M., 2005. Advances in metallothionein structure and functions. *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*, 19(1), pp.13-7.
- Vasák, M. & Hasler, D.W., 2000. Metallothioneins: new functional and structural insights. *Current opinion in chemical biology*, 4(2), pp.177-83.
- Vatassery, G.T. et al., 1991. A sensitive assay of transthyretin (prealbumin) in human cerebrospinal fluid in nanogram amounts by ELISA. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 197(1), pp.19-25.
- Velayudhan, L. et al., 2012. Plasma transthyretin as a candidate marker for Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 28(2), pp.369-75.
- Vepsäläinen, S. et al., 2008. Increased expression of Abeta degrading enzyme IDE in the cortex of transgenic mice with Alzheimer's disease-like neuropathology. *Neuroscience letters*, 438(2), pp.216-20.
- Wang, D. & Kaur, C., 2000. Response of epilexus cells associated with the choroid plexus in the lateral ventricles of adult rats to high altitude exposure. *Neuroscience Letters*, 285(3), pp.197-200.
- Wang, D.S., Dickson, D.W. & Malter, J.S., 2006. beta-Amyloid degradation and Alzheimer's disease. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2006(Figure 2), pp.1-12.
- Wang, S. et al., 2010. Expression and functional profiling of neprilysin, insulin-degrading enzyme, and endothelin-converting enzyme in prospectively studied elderly and Alzheimer's brain. *Journal of neurochemistry*, 115(1), pp.47-57.
- Wang, Y.-J., Zhou, H.-D. & Zhou, X.-F., 2006. Clearance of amyloid-beta in Alzheimer's disease: progress, problems and perspectives. *Drug Discovery Today*, 11(19-20), pp.931-938.
- Wen, D. et al., 1996. The plasma and cytoplasmic forms of human gelsolin differ in disulfide structure. *Biochemistry*, 35(30), pp.9700-9.
- Wen, G.Y., Wisniewski, H.M. & Kascsak, R.J., 1999. Biondi ring tangles in the choroid plexus of Alzheimer's disease and normal aging brains: A quantitative study. *Brain Research*, 832(1-2), pp.40-46.
- Whitmer, R.A. et al., 2011. Timing of hormone therapy and dementia: The critical window theory revisited. *Annals of Neurology*, 69(1), pp.163-169. Available at:
- Van de Wijngaart, D.J. et al., 2006. Novel FXXFF and FXXMF motifs in androgen receptor cofactors mediate high affinity and specific interactions with the ligand-binding domain. *The Journal of biological chemistry*, 281(28), pp.19407-16.
- Wilson, M.E., Dubal, D.B. & Wise, P.M., 2000. Estradiol protects against injury-induced cell death in cortical explant cultures: a role for estrogen receptors. *Brain research*, 873(2), pp.235-42.
- Winston, J.S. et al., 2001. Downregulation of gelsolin correlates with the progression to breast carcinoma. *Breast cancer research and treatment*, 65(1), pp.11-21.

- Won, Y.S., 2012. Effects of Female Sex Hormones on Clusterin Expression and Paclitaxel Resistance in Endometrial Cancer Cell Lines. *International Journal of Medical Sciences*, 2, p.86.
- Xie, L. et al., 2002. Alzheimer's beta-amyloid peptides compete for insulin binding to the insulin receptor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(10), p.RC221.
- Yamada, M. et al., 1996. Subcellular localization of growth inhibitory factor in rat brain: light and electron microscopic immunohistochemical studies. *Brain research*, 735(2), pp.257-64.
- Yang, D.T. et al., 2013. Transthyretin as both a sensor and a scavenger of  $\beta$ -amyloid oligomers. *Biochemistry*, 52(17), pp.2849-61.
- Yu, J.-T. & Tan, L., 2012. The role of clusterin in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis, and therapy. *Molecular neurobiology*, 45(2), pp.314-26.
- Yue, X. et al., 2005. Brain estrogen deficiency accelerates A $\beta$  plaque formation in an Alzheimer's disease animal model. *Pnas*, 102(52), pp.19198-203.
- Zandi, P.P. et al., 2002. Hormone replacement therapy and incidence of Alzheimer disease in older women: the Cache County Study. *JAMA*, 288(17), pp.2123-9.
- Zhao, L. et al., 2011. 17 $\beta$ -Estradiol regulates insulin-degrading enzyme expression via an ER $\beta$ /PI3-K pathway in hippocampus: relevance to Alzheimer's prevention. *Neurobiology of aging*, 32(11), pp.1949-63.
- Zhao, Z. et al., 2007. Insulin degrading enzyme activity selectively decreases in the hippocampal formation of cases at high risk to develop Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, 28(6), pp.824-30.
- Zheng, H. et al., 2002. Modulation of A(beta) peptides by estrogen in mouse models. *Journal of neurochemistry*, 80(1), pp.191-196.
- Zheng, W. & Zhao, Q., 2002. Establishment and characterization of an immortalized Z310 choroidal epithelial cell line from murine choroid plexus. *Brain Research*, 958(2), pp.371-380.
- Zlokovic, B. V et al., 1996. Glycoprotein 330/megalin: probable role in receptor-mediated transport of apolipoprotein J alone and in a complex with Alzheimer disease amyloid beta at the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(9), pp.4229-34.