



Universidade da Beira Interior

Departamento de Química

REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DA TRANSTIRRETINA PELO CORTISOL EM RATOS

Irina Mendes Morgado Veloso

Dissertação apresentada à Universidade da Beira Interior para obtenção do grau de mestre em Bioquímica

Orientação: Prof. Doutora Cecília Santos

Co-Orientação: Dra. Ana Martinho

Covilhã, 2010

O conteúdo da presente dissertação é da exclusiva responsabilidade da autora.

(Irina Mendes Morgado Veloso)

Todo o trabalho prático foi desenvolvido nas instalações do Centro de Investigação em Ciências da Saúde (CICS), situada na Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior.

*“Permanence, perseverance and persistence in spite of all obstacles,
discouragement, and impossibilities: It is this, that in all things distinguishes the
strong soul from the weak”*

Thomas Carlyle

Agradecimentos

Neste momento em que chega ao fim tão importante etapa do meu percurso académico, gostaria de agradecer a todos aqueles, que directamente, ou indirectamente, me apoiaram.

À Prof. Doutora Cecília Santos por toda a sua ajuda, compreensão, paciência e conselhos sábios para a realização deste trabalho.

A todos os meus amigos do CICS, especialmente à Sara, Joana, Bruno, Francisca, Carolina e Virgínia por todo o apoio e por toda a ajuda. Obrigado por terem feito este percurso comigo!

A todos aqueles que fazem parte da minha vida, principalmente à Andreia, Dani, Frida, Yasmin e ao Robert por toda a amizade, paciência, compreensão, palavras de encorajamento e principalmente por acreditarem em mim. Obrigado por estarem sempre presentes!

Aos meus pais por sempre me apoiarem, por toda a compreensão e paciência, por acreditarem em mim, por nunca me terem deixado desistir. E por todo o amor que me deram. Sem vocês nada disto era possível. OBRIGADO!!

À minha família, principalmente às minhas primas e avó por todo o apoio e carinho ao longo da minha vida.

Por fim queria agradecer à Ana Martinho por todo o apoio, paciência, compreensão, por todas as palavras valiosas e por ter estado sempre presente. Obrigado por me teres ensinado tanta coisa e por me teres ajudado a crescer. OBRIGADO! Foste uma peça fundamental e de referência ao longo deste ano.

Índice

<i>Índice de figuras</i>	<i>I</i>
<i>Lista de abreviaturas</i>	<i>III</i>
<i>Abstract</i>	<i>VI</i>
<i>Resumo</i>	<i>VII</i>
1. Introdução	1
1.1 A Transtirretina	1
1.1.1 Geral	2
1.1.2 O Gene	3
1.1.3 A Proteína	3
1.1.4 Síntese, Transporte e Secreção	4
1.1.4.1 Fígado	5
1.1.4.2 Plexo coroideu	5
1.1.5 Funções da TTR	7
1.1.6 A TTR e os seus ligandos	8
1.1.7 A TTR e doenças associadas	9
1.1.7.1 Relação entre TTR e AD	10
1.1.8 Regulação da expressão da TTR	11
1.2 O Cortisol	12
1.2.1 Geral	12
1.2.2 Síntese, Transporte e Secreção	13
1.2.3 Funções e Efeitos	14
1.3 Os efeitos da Exposição ao <i>Stress</i>	16
2. Objectivos	18
3. Metodologia	20
3.1 Cultura de Células Eucarióticas	21
3.1.1 Linha celular	21

3.2 Estimulação Hormonal com Hirdrocortisona na Linha Celular RCP	25
3.3 Extracção e Quantificação de Proteína e <i>Western blot</i>	26
3.3.1 Extracção e quantificação do extracto proteico pelo método de Bradford	26
3.3.2 <i>Western blot</i>	27
3.4 Imunocitoquímica	30
3.5 Experimentação <i>In Vitro</i>	32
4. Resultados	33
4.1 Estudos <i>In Vitro</i>	34
4.1.1 Análise do efeito da hidrocortisona na expressão da TTR por <i>Western blot</i> em células RCP	34
4.1.2 Análise do efeito da hidrocortisona na expressão da TTR por Imunocitoquímica em células RCP	37
4.2 Estudos <i>In Vivo</i>	39
4.2.1 Fígado	39
4.2.2 CSF	41
4.2.3 CP	43
5. Discussão e Conclusões	46
6. Perspectivas Futuras	55
7. Anexos	57
7.1 Imagens de Imunocitoquímica adquiridas	58
7.2 Abstract da “Short communication” feita para o <i>V Annual CICS Symposium</i>	63
8. Referências Bibliográficas	64

Índice de figuras

Figura 1.1: Gene da TTR.

Figura 1.2: Estrutura tetramérica da transtirretina.

Figura 1.3: Localização do plexo coroideu.

Figura 1.4: Distribuição da TTR sintetizada pelas células epiteliais no plexo coroideu e secretada para o líquido encefalorraquidino.

Figura 1.5: Molécula de cortisol.

Figura 1.6: Interação cortisol-cortisona.

Figura 1.7: Efeitos metabólicos do cortisol.

Figura 3.1: Morfologia das células RCP.

Figura 3.2: Câmara de Neubauer.

Figura 3.3: Esquema simplificado do aparato de uma electrotransferência de proteínas.

Figura 4.1.1: a - Análise da expressão da TTR utilizando 50 µg de proteína total de RCP. A normalização foi efectuada através da análise da expressão da β-actina. As RCP foram estimuladas com hidrocortisona às 6 (**A**), 12 (**B**), 18 (**C**), 24 (**D**) e 36 h (**E**). Para cada período de incubação foram efectuados triplicados das concentrações de 0, 10, 100 e 1000 nM de hidrocortisona (1, 2, 3, 4, respectivamente). **b** - Níveis de expressão da TTR quando estimulados com diferentes concentrações de hidrocortisona (0,10,100,1000nM) e em diferentes períodos de tempo (6h, 12h, 18h,24h,36h). Os dados apresentados são expressos em percentagem de níveis de expressão de TTR e representam a média ± SD de 3experiências independentes realizadas em triplicado. (***) - P <0.001).

Figura 4.1.2: a - Imagem de fluorescência das RCP estimuladas com hidrocortisona durante 12h e com a concentração de 0 nM de hormona. (**A**) TTR (Alexa Fluor® 488) (**B**) Retículo endoplasmático (Alexa Fluor® 546) (**C**) *Merge* + núcleo (Hoescht 33342).

b - Imagem de fluorescência das RCP estimuladas com hidrocortisona durante 12h e com a concentração de 100 nM de hormona. (**A**) TTR (Alexa Fluor® 488) (**B**) Retículo

endoplasmático (Alexa Fluor® 546) (C) *Merge* + núcleo (Hoescht 33342). Para a captura das imagens foi utilizada a objectiva com ampliação de 63x.

Figura 4.2.1: a - Análise da expressão da TTR no fígado. A normalização foi efectuada através da análise da expressão da β -actina. **(A)** ratos controlo **(B)** ratos submetidos a *stress*. **b** – Representação gráfica dos níveis de expressão da TTR no fígado de ratos controlo e de ratos submetidos a *stress*. Os dados apresentados são expressos em percentagem de níveis de expressão de TTR e representam a média \pm SD de 3 ensaios (*Western blot*) independentes. ***P <0.001. **c** – Comparação dos níveis de expressão da TTR no fígado de machos e de fêmeas submetidos a *stress*. Os dados apresentados são expressos em percentagem de níveis de expressão de TTR e representam a média \pm SD de 3 ensaios (*Western blot*) independentes. ***P <0.001.

Figura 4.2.2: a - Análise da expressão da TTR no CSF. A normalização foi efectuada através da análise da expressão da β -actina. **(A)** ratos controlo **(B)** ratos submetidos a *stress*. **b** – Representação gráfica dos níveis de expressão da TTR no fígado de ratos controlo e de ratos submetidos a *stress*. Os dados apresentados são expressos em percentagem de níveis de expressão de TTR e representam a média \pm SD de 3 ensaios (*Western blot*) independentes. ***P <0.001. **c** – Comparação dos níveis de expressão da TTR no fígado de machos e de fêmeas submetidos a *stress*. Os dados apresentados são expressos em percentagem de níveis de expressão de TTR e representam a média \pm SD de 3 ensaios (*Western blot*) independentes. ***P <0.001.

Figura 4.2.3: a - Análise da expressão da TTR no CP. A normalização foi efectuada através da análise da expressão da β -actina. **(A)** ratos controlo **(B)** ratos submetidos a *stress*. **b** – Representação gráfica dos níveis de expressão da TTR no fígado de ratos controlo e de ratos submetidos a *stress*. Os dados apresentados são expressos em percentagem de níveis de expressão de TTR e representam a média \pm SD de 3 ensaios (*Western blot*) independentes. ***P <0.001. **c** – Comparação dos níveis de expressão da TTR no fígado de machos e de fêmeas submetidos a *stress*. Os dados apresentados são expressos em percentagem de níveis de expressão de TTR e representam a média \pm SD de 3 ensaios (*Western blot*) independentes. ***P <0.001.

Figura 7.1: Imagem de fluorescência das RCP estimuladas com hidrocortisona durante 6h e com as concentrações de 0,10,10,1000 nM. (A) TTR (Alexa Fluor® 488) (B) Retículo endoplasmático (Alexa Fluor® 546) (C) *Merge* + núcleo (Hoescht 33342). Para a captura das imagens foi utilizada a objectiva com ampliação de 63x.

Figura 7.2: Imagem de fluorescência das RCP estimuladas com hidrocortisona durante 12h e com as concentrações de 0,10,10,1000 nM. (A) TTR (Alexa Fluor® 488) (B) Retículo endoplasmático (Alexa Fluor® 546) (C) *Merge* + núcleo (Hoescht 33342). Para a captura das imagens foi utilizada a objectiva com ampliação de 63x.

Figura 7.3: Imagem de fluorescência das RCP estimuladas com hidrocortisona durante 18h e com as concentrações de 0,10,10,1000 nM. (A) TTR (Alexa Fluor® 488) (B) Retículo endoplasmático (Alexa Fluor® 546) (C) *Merge* + núcleo (Hoescht 33342). Para a captura das imagens foi utilizada a objectiva com ampliação de 63x.

Figura 7.4: Imagem de fluorescência das RCP estimuladas com hidrocortisona durante 24h e com as concentrações de 0,10,10,1000 nM. (A) TTR (Alexa Fluor® 488) (B) Retículo endoplasmático (Alexa Fluor® 546) (C) *Merge* + núcleo (Hoescht 33342). Para a captura das imagens foi utilizada a objectiva com ampliação de 63x.

Figura 7.5: Imagem de fluorescência das RCP estimuladas com hidrocortisona durante 36h e com as concentrações de 0,10,10,1000 nM. (A) TTR (Alexa Fluor® 488) (B) Retículo endoplasmático (Alexa Fluor® 546) (C) *Merge* + núcleo (Hoescht 33342). Para a captura das imagens foi utilizada a objectiva com ampliação de 63x.

Lista de abreviaturas

- A β** - Péptido β -amilóide
ACTH - Hormona adrenocorticotrófica
AD - Doença de Alzheimer
AINES - Antiinflamatórios não-esteróides
AMPc - Adenosina monofosfato cíclica
APOAI - Apolipoproteína AI
AR - Receptor de androgénios
Ara-C - Citocina β -D-arabinofuranosida
Bp - Pares de bases
BSA - Albumina sérica bovina
CBG - Corticoesteróide ligado á globulina
CHR - Hormona libertadora de corticoesteróides
CP - Plexo coroideu
CSF - Líquido encefalorraquidiano
DHT - 5 α -dihidrotestoterona
DMEM - Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO - dimetilsulfóxido
DNA - Ácido desoxirribonucleico
DTT - Ditioneitol
E2 - 17 β -estradiol
EGF - Factor de crescimento epidérmico
ER - Receptor de estrogénios
FAC - Cardiomiopatias amilóides familiares
FAP - Polineuropatias amilóides familiares
FBS - Soro fetal bovino
HPA - Hipotálamo-hipófise-adrenal
IgG - Imunoglobulina G
ITS - Insulina-Transferrina-Selenito de sódio
kb - Quilopares de bases
kDa - Quilodaltos
LAMP-1 - Proteína da membrana associada ao lisossoma

MR - Receptor de mineralocorticóides
mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro
MT1 - Metalotioneína 1
MT2 - Metalotioneína 2
ORF's - "Open reading frames"
PBS - Tampão fosfato salino
PFA - Paraformaldeído
PMSF - Fluoreto de fenilmetilsulfonilo
PS - Penicilina-estreptomicina
PVDF - Polivinildieno difluorido
RBP - Proteína de ligação ao retinol
RCP - linha celular *Rat Choroid Plexus*
SDS - Dodecilsulfato de sódio
SNC - Sistema nervoso central
SSA - Amiloidose sistémica senil
T3 - Triiodotironina
T4 - Tiroxina
TBPA - Proteína de ligação a hormonas da tiróide
TTR - Transtirretina

Abstract

Transthyretin (TTR) is a 55kDa tetrameric protein, synthesized by the liver and choroid plexus (CP) which has a role in transporting thyroid hormones and retinol binding protein. It is a protein that has been associated to various neurodegenerative pathologies, such as Alzheimer`s disease (AD). It has been given special relevance to its functions in its relation to AD progression as it prevents amyloid β (A β) aggregation and fibril formation.

Cortisol is a glucocorticoid hormone synthesized by the adrenal cortex that has an important role in the metabolic, cardiovascular and central nervous systems. It is the main *stress* related hormone. In this context, we purposed to study the effect of cortisol in TTR expression in mice subject to populational *stress* and in rat CP cells (RCP) incubated with hydrocortisone.

Animals were submitted to a population *stress* experiment and rat CP cell line was stimulated, for five different time periods (6h, 12h, 18h, 24h, 36h), rat CP cell cultures with different hydrocortisone concentrations (0, 10, 100, 1000 nM). Protein extracts from these cells were collected and used to analyze the TTR expression by *Western blot*. Moreover, the same experiment was carried out to analyse TTR expression by immunocytochemistry in these cultures.

The results from the stimulation of RCP cells with hydrocortisone showed that TTR expression was up regulated after 12h, 18h and 24h using concentrations of 10, 100 and 100 nM hydrocortisone. After 12 h incubation with 100 nM hormone this up regulation was more pronounced than in any other situation (56.48%, $p < 0.001$). At 36h a significant increase for 10 nM and 100 nM concentrations was observed.

In vivo stimulation showed an increase in TTR expression in the liver and CP of rats. This increase was more pronounced in males than in females. From these results, it can be concluded that cortisol increases the expression of TTR in the liver and, particularly, in CP.

Keywords: Transthyretin, Hydrocortisone, Choroid Plexus, Stress.

Resumo

A transtirretina (TTR) é uma proteína tetramérica com um peso molecular de 55 kDa sintetizada maioritariamente no fígado e plexo coroídeo (CP) e tem um papel importante no transporte de hormonas da tiróide e de ligação ao retinol. É uma proteína que está associada a patologias neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer (AD). Tem-se dado especial relevância às funções da TTR relacionadas com a progressão da AD. Esta caracteriza-se pela deposição de fibrilhas do péptido amilóide β ($A\beta$), a qual a TTR sequestra, prevenindo a sua agregação e consequente formação de fibrilhas.

O cortisol é uma hormona glicocorticóide sintetizada no córtex, sob o controlo do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal que intervém, no sistema metabólico, cardiovascular e nervoso central. É a principal hormona relacionada com o *stress*. Neste projecto, pretendeu-se estudar o efeito do cortisol na expressão da transtirretina no CP, fígado e líquido cefalorraquidiano (CSF) de ratos submetidos a uma situação de *stress*, e numa linha celular de CP de rato (RCP) incubada com hidrocortisona.

Para tal, submeteram-se os animais a uma situação de *stress* populacional e estimulou-se com 5 períodos de tempo (6h, 12h, 18h, 24h, 36h) uma linha celular de CP de rato com várias concentrações de hidrocortisona (0, 10, 100, 1000 nM). Efectuaram-se extractos de proteína destas células e analisou-se por *Western blot* a expressão de TTR. Foi ainda efectuado o mesmo estudo por imunocitoquímica para a linha celular.

Verificou-se que na estimulação das células RCP ocorreu um aumento nos níveis da expressão da TTR às 12h, 18h e 24h para as concentrações de 10, 100 e 100 nM de hidrocortisona, sendo que, às 12 h para 100 nM de hormona esse aumento foi mais pronunciado ($p < 0.001$). Às 36h verificou-se um aumento significativo para as concentrações de 10 e 100nM.

Em relação à análise do estudo de estimulação *in vivo* obteve-se um aumento da expressão da TTR no CP, CSF e fígado dos ratos submetidos à situação de *stress* ($p < 0.001$), sendo esse aumento mais acentuado nos machos que nas fêmeas.

Pelos resultados obtidos, pode concluir-se que o cortisol tem uma acção, no aumento da expressão da TTR.

Palavras-chave: Transtirretina, Hidrocortisona, Plexo coróideu, *Stress*.

1. Introdução



1.1 A Transtirretina

1.1.1 Geral

A transtirretina (TTR) foi identificada pela primeira vez em 1942 por Kabat e seus colaboradores, no líquido cefalorraquidiano (CSF) (Kabat *et al.* 1942; Kabat *et al.* 1942) e posteriormente no soro humano por Siebert e Nelson (Siebert and Nelson 1942). Originalmente foi denominada prealbumina pois era a única proteína plasmática que migrava imediatamente à frente da albumina durante o processo electroforético (Ingbar 1958).

Na década seguinte, Ingbar e seus colegas identificaram a prealbumina como sendo uma proteína de ligação a hormonas da tiróide. Por este motivo, esta proteína passou a designar-se por proteína de ligação a hormonas da tiróide (TBPA) (Ingbar 1958). Uma década depois, Raz e Goodman mostraram que a TBPA também era uma proteína de ligação ao retinol (RBP) (Raz and Goodman 1969).

Em 1981 a designação da proteína foi novamente alterada para TTR, termo este que descreve o seu papel no transporte de hormonas da tiróide e do retinol também designada vitamina A, via ligação à RBP (Richardson 2009). Desde essa altura, diversos têm sido os estudos efectuados com a TTR e as suas funções. Para além da função de transporte, nos últimos anos, tem-se dado maior relevo ao seu papel neuroprotector e ao seu envolvimento em várias doenças neurodegenerativas nomeadamente na doença de Alzheimer (AD) (Buxbaum and Reixach 2009), tal porque, a TTR demonstra a capacidade de ligação ao péptido solúvel β -amilóide ($A\beta$) e a placas amiloidóticas prevenindo a formação de fibras amilóides (Costa *et al.* 2008).

Recentemente, outra função atribuída à TTR foi o seu envolvimento na regeneração dos nervos periféricos (Fleming *et al.* 2007).

A síntese de TTR ocorre, principalmente, no fígado e no plexo coroideu (CP) mas também nas meninges, epitélio pigmentar da retina, saco vitelino visceral, placenta, pâncreas e intestino (Richardson 2009).



1.1.2 O Gene

O gene que codifica para a TTR humana consiste numa cópia única de DNA localizado no braço longo do cromossoma 18 (*locus* 18q12.1). A sua sequência de nucleótidos, inclui 581 bp a 5' e 95 bp a 3'. O gene tem cerca de 7,0 kb, sendo constituído por quatro exões e três intrões (Tsuzuki *et al.* 1985) (fig. 1.1).

Tal como na maioria dos genes eucarióticos, as sequências TATA e CAAT encontram-se, respectivamente, a 30 e 101 nucleótidos a montante do *cap site* putativo, e a sequência sinal de poli-adenilação AATAAAA encontra-se na região 3' não traduzida. Para além disso, foram identificadas duas *ORF's* independentes, com as respectivas sequências reguladoras, inseridas no gene, estando uma no primeiro e a outra no terceiro intrão (Tsuzuki *et al.* 1985).

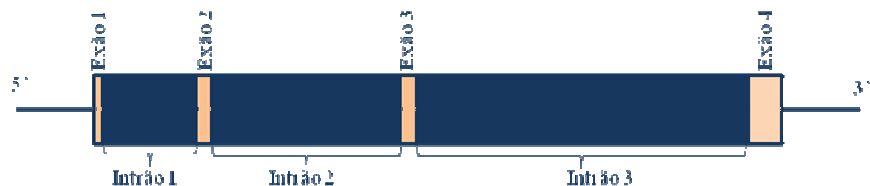


Figura 1.1: Gene da TTR (adaptado de Tsuzuki *et al.* 1985).

1.1.3 A Proteína

A TTR tem um peso molecular de aproximadamente 55 kDa e é composta por quatro subunidades idênticas com cerca de 14 kDa cada (Ingbar 1958), arrançadas à volta de um canal central no qual estão situados locais de ligação para duas moléculas de tiroxina (T4) (Tsuzuki *et al.* 1985) (fig. 1.2).

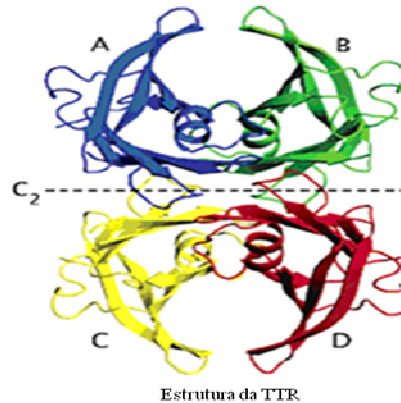


Figura 1.2: Estrutura tetramérica da TTR (adaptado de Foss *et al.* 2005).

A análise estrutural do tetrâmero da TTR revela que cada subunidade consiste numa sanduíche de folhas β , organizada em duas folhas, na qual cada uma delas é composta por quatro ligações β (DAGH e CBEF). Cada monómero exibe um único segmento de hélice α . O dímero da TTR é formado por interações de hidrogénio antiparalelas. A região de contacto entre dímeros é muito pequena e existem ligações de hidrogénio e interações hidrofóbicas entre o *loop* AB de um dímero e a cadeia H. Os *loops* em cada folha facilita a formação dos dímeros, que se associam na formação de um tetrâmero e possibilitam a disponibilização de locais de ligação da hormona (Blake *et al.* 1978).

1.1.4 Síntese, Transporte e Secreção

A TTR é sintetizada, maioritariamente, no fígado e no CP. Outros locais onde também pode ocorrer a sua síntese são as meninges, o epitélio pigmentar da retina, o saco vitelino visceral, a placenta, o pâncreas e o intestino (Richardson 2009).



1.1.4.1 Fígado

A TTR sintetizada pelo fígado é secretada para a corrente sanguínea, na qual se liga às hormonas tiroideias e à proteína de ligação ao retinol, podendo também ser secretada sob a forma de complexo (TTR-RBP/retinol). Assim, a TTR hepática está envolvida na distribuição de hormonas tiroideias e no transporte do retinol para todo o organismo pelo sangue (Wei *et al.* 1995).

1.1.4.2 Plexo coroideu

Existem quatro CP's encontrados no cérebro humano, estando, dois nos ventrículos laterais, o outro no terceiro e um no quarto ventrículo cerebral (fig. 1.3) (Redzic and Segal 2004).

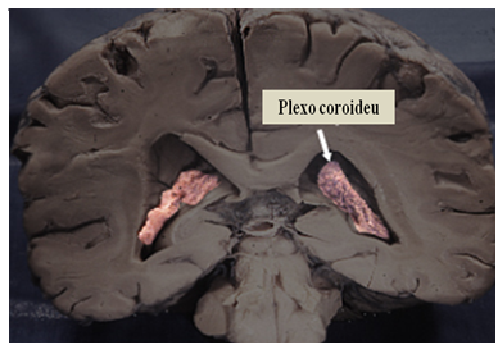


Figura 1.3: Localização do CP (adaptado de www.sci.uidaho.edu/med/Chroidplexus).

A TTR é sintetizada pelas células epiteliais do CP e secretada para o CSF. O CSF produzido nestas estruturas circula dos ventrículos laterais até ao espaço subaracnóide onde entra para o sangue venoso através das vilosidades e granulações aracnóides (Redzic and Segal 2004).



A TTR secretada para o CSF liga-se à T4. Este complexo TTR-T4, por sua vez, é secretado para o cérebro. Alguma TTR pode ser secretada, sem contacto com a T4 dentro da célula estabelecendo, o equilíbrio com a T4, apenas, no sistema ventricular (Schreiber 2002) (Figura 1.4).

Schreiber e seus colaboradores sugeriram que a síntese de TTR pelo CP é um requisito fundamental para o fornecimento de T4 para o SNC (Schreiber 2002). Contudo, estudos levados a cabo por Palha, utilizando ratos knockout para a TTR revelaram poucos efeitos resultantes da sua ausência no metabolismo das hormonas da tiróide, embora a T4 no CSF tenha sofrido uma redução. Ainda que tenha havido considerável interesse na entrada de T4 para o cérebro, tem havido poucos estudos sobre a circulação de T4 no CSF (Palha *et al.* 1997).

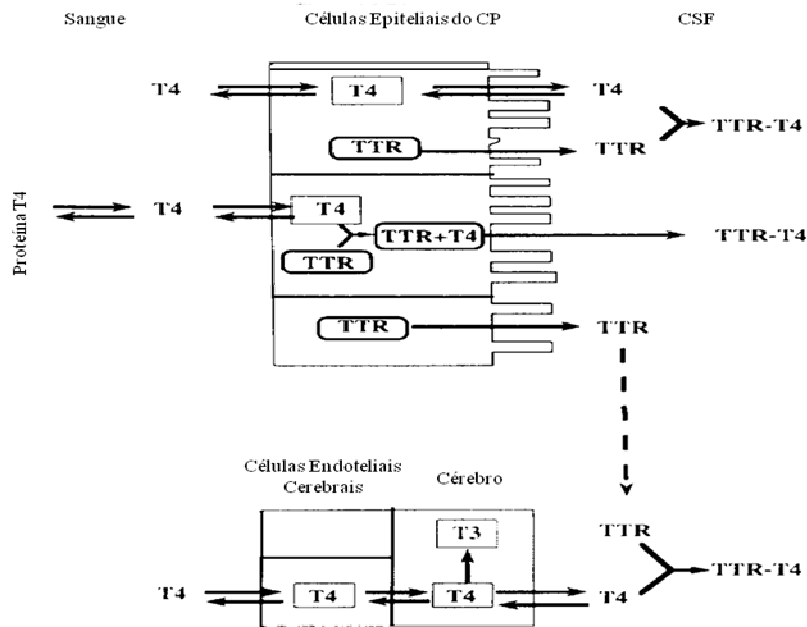


Figura 1.4: Distribuição da TTR sintetizada pelas células epiteliais no CP e secretada para o CSF (retirado de Schreiber *et al.* 1990).

1.1.5 Funções da TTR

Actualmente, são várias as funções já descritas para a TTR. No entanto, a maioria delas baseiam-se no transporte de hormonas da tiróide por via directa e do complexo de proteína ligada ao retinol por via indirecta (Goncalves *et al.* 2008).

A TTR é a maior proteína de ligação a hormonas da tiróide tanto no plasma como no CSF (Palha *et al.* 2002).

Para chegar ao cérebro, as hormonas da tiróide devem atravessar as barreiras sangue-cérebro e/ou as barreiras CP-CSF. Estudos anteriores foram consistentes com a hipótese de que a TTR pode ter um papel importante na



transferência de T4 do sangue para o cérebro através da barreira encefalorraquidiana (Dickson *et al.* 1987).

Os retinóides (vitamina A e seus análogos) são essenciais para o crescimento, reprodução e manutenção da saúde geral do organismo (Wei *et al.* 1995), a TTR tem uma elevada afinidade para um local para a T4 e um para a RBP, sendo os dois locais independentes. Postula-se, com base no tamanho molecular da RBP (21 kDa), que a formação do complexo RBP-TTR impede a filtração glomerular e catabolismo renal da RBP. Embora tenha sido proposto que a RBP e a TTR não interagem intracelularmente anteriormente à sua secreção, estudos recentes mostraram que estas proteínas secretoras podem interagir dentro da célula antes de serem secretadas (Wei *et al.* 1995).

Para além das funções de transporte anteriormente descritas foram identificadas novas funções nomeadamente no comportamento e em doenças amiloidóticas (Sousa *et al.* 2007). Nestas, a TTR mostra a capacidade de ligação ao péptido solúvel A β prevenindo a formação de fibras amilóides (Costa *et al.* 2008).

Outros estudos realizados, mostraram que pacientes que sofrem de depressão, AD ou síndrome de Down revelam uma redução dos níveis de TTR no CSF (Richardson 2009).

1.1.6 A TTR e seus Ligandos

A TTR interage com diversas substâncias, tendo até ao momento sido identificados inúmeros ligantes da TTR. Estas interações estabelecidas podem dividir-se em naturais e sintéticas (Richardson 2009).

Os ligandos naturais incluem as hormonas tiroideas (T3 e T4) (Schreiber *et al.* 1997), RBP (Mónaco *et al.* 1995), iões metálicos (Wilkinson-White *et al.* 2007), flavenóides vegetais (Koehrle *et al.* 1988), apolipoproteína AI (APOAI)



(Liz *et al* 2004) e proteína da membrana associada ao lisossoma (LAMP-1) (Chang *et al* 2004).

Os ligandos sintéticos incluem os anti-inflamatórios não-esteróides (AINES), bifenóis policlorados e poluentes industriais. Estes compostos sintéticos podem deslocar as hormonas tiroideias da TTR, podendo actuar como potentes disruptores endócrinos (Richardson 2007).

Estudos efectuados por Gonçalves e colaboradores evidenciaram que a TTR interage com a metalotioneína 2 (MT2) tanto *in vitro* com *in vivo* (Gonçalves *et al* 2007).

1.1.7 A TTR e doenças associadas

As manifestações clínicas associadas à capacidade de agregação da TTR incluem a amiloidose sistémica senil (SSA), uma doença que surge normalmente em indivíduos de faixa etária mais elevada e que se caracteriza pela deposição de proteína principalmente nas paredes do coração e do intestino e as polineuropatias amilóides familiares (FAP) e cardiomiopatias (FAC). Estas ocorrem como resultado de mutações pontuais no gene que codifica a TTR resultando na deposição de agregados em nervos periféricos e autónomos e no coração. Os indivíduos que desenvolvam FAP ou FAC, normalmente, apresentam sintomas em idade mais jovem que a SSA, provavelmente devido à diminuição da estabilidade da TTR (Buxbaum 2007).

Estudos *in vitro* demonstraram que as fibras amilóides formadas pela TTR resultam de um processo que envolve a dissociação do tetrâmero seguida, do desenrolamento dos monómeros. Os oligómeros, os agregados solúveis, os agregados insolúveis amorfos e as fibras amilóides formados sofrem, então, um processo de polimerização (Hurshman 2004).



Os estudos com cultura de tecidos que são alvos de deposição de TTR, têm demonstrado que os monómeros da TTR ou de pequenos oligómeros são citotóxicos para as células, enquanto que o tetrâmero nativo, grandes agregados solúveis (100 kDa) e fibras amilóides não revelam ser citotóxicas. Além disso, as variantes da TTR amiloidogénica são tóxicas para as células enquanto que a TTR não amiloidogénica não demonstra essa capacidade (Reixach 2004). Estes dados suportam a ideia de que a morte celular ocorrida quando estão envolvidas proteínas com *misfolding* não se deve às fibras amilóides, que são o produto final do processo de agregação, mas sim aos oligómeros intermédios formados durante esse processo (Reixach 2004).

A amiloidogenecidade da TTR é condicionada pelo pH, temperatura e concentração *in vitro* (Lai 1996). Neste contexto, várias pesquisas têm sido efectuadas sobre esta proteína, particularmente na sua estrutura e funcionalidade para entender os mecanismos subjacentes à formação das fibras amilóides. Outros estudos, porém, estão centrados na regulação da TTR no CP, devido à sua capacidade de sequestrar fibras A β , e impedir a sua deposição no SNC (Costa *et al.* 2008).

1.1.7.1 Relação entre TTR e AD

Tem se dado especial relevância às funções da TTR, nomeadamente no seu papel na progressão da AD (Sousa *et al.* 2007).

Como já foi referido anteriormente, estudos efectuados mostraram que a TTR tem um papel neuroprotector na AD (Buxbaum and Reixach 2009). A AD é uma doença neurodegenerativa caracterizada pela deposição extracelular do péptido A β e pela formação de neurofibras e placas amiloidóticas. A etiologia da AD está dividida em dois mecanismos diferentes: a superprodução *versus* acumulação do péptido A β solúvel. Em ambos os casos, os sequestradores



biológicos do péptido A β podem, contribuir para a diminuição da sua acumulação, modulando a susceptibilidade à doença (Sousa *et al.* 2007).

Estudos efectuados mostraram que as proteínas do CSF, nomeadamente, as apolipoproteínas E, J e a TTR, têm um efeito na sua ligação ao péptido A β solúvel *in vitro* evitando a formação das fibras de amilóides (Sousa *et al.* 2007).

1.1.8 Regulação da expressão da TTR

Estudos realizados por Gonçalves, Quintela e colaboradores em ratos (2008) mostraram que o 17 β -estradiol (E2) e 5 α -dihidrotestoterona (DHT) regulam positivamente a expressão de TTR no fígado, sendo esse aumento na expressão da proteína acompanhado por um aumento nos níveis de mRNA como de proteína. Destes estudos pode sugerir-se que a resposta da TTR ao E2 segue mecanismos similares no CP e fígado. Também, dos mesmos, pode concluir-se não existirem diferenças entre ambos os sexos (Goncalves *et al.* 2008 e Quintela *et al.* 2008).

Ainda, estudos realizados por Quintela e seus colegas debruçaram-se nos receptores de estrogénios (ER) (Quintela *et al.* 2009) e androgénios (AR) (Quintela *et al.* 2008). Uma das observações feitas foi que os níveis de TTR aumentavam com tratamento com DHT e que essa regulação ocorreria independentemente do receptor de AR (Quintela *et al.* 2008). Relativamente aos estudos efectuados com o E2 demonstraram que esta hormona aumentava os níveis de TTR e que esse aumento se dá via dependente do ER (Quintela *et al.* 2008).

Também, suplementos nutricionais de ácidos gordos de omega-3 mostraram a existência de uma diminuição da capacidade de aprendizagem em modelo de rato com AD, resultante da expressão elevada de TTR no hipocampo (Puskas e tal 2003). O mesmo foi observado com o uso de extracto de Ginkgo



biloba, uma planta usada para combater distúrbios neurológicos relacionados com idade (Watanabe *et al.* 2001).

1.2 O Cortisol

1.2.1 Geral

O cortisol é a hormona glucocorticóide mais importante em humanos (fig. 1.5). Cerca de 75% circula geralmente ligado a proteínas plasmáticas, nomeadamente à globulina ligada a corticosteróide (CBG), e em menos representatividade, 10%, à albumina. A fracção que circula livre é cerca de 10%. O cortisol livre plasmático é aproximadamente 1 µg/dL e este é o cortisol biologicamente activo que é regulado pela hormona adrenocorticotrófica (ACTH) (Gardner *et al.* 2007).

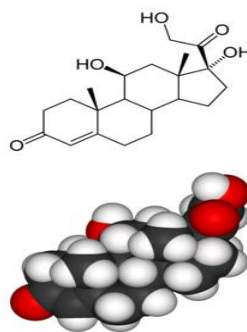
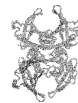


Figura 1.5: Molécula de cortisol (retirado de Brook *et al.* 2001).



A quantidade de cortisol presente no sangue sofre variação nas várias fases do dia (ritmo circadiano), tendo níveis mais altos pela manhã e mais baixos à noite, várias horas após o início do sono (Brook *et al* 2001).

1.2.2 Síntese, Transporte e Secreção

O cortisol é sintetizado na *zona fasciculata* do córtex adrenal, sob o controlo do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (Hibberd *et al.* 2000). Na síntese do cortisol, a glândula adrenal é estimulada pelo lóbulo anterior da hipófise através da ACTH. A produção da ACTH é regulada pelo hipotálamo, através da secreção da hormona libertadora de corticotrofina (CRH). A maioria do cortisol é convertido no fígado em cortisona inactiva (fig. 1.6). No plasma a razão de cortisol e cortisona é 1:2. Cerca de 95% dos metabolitos de cortisol e cortisona são conjugados com o ácido glucurónico no fígado e entram para a circulação para serem excretados através da urina como 17-hidroxicorticoesteróides e 17-esteróides cetogénicos (Gardner *et al.* 2007).

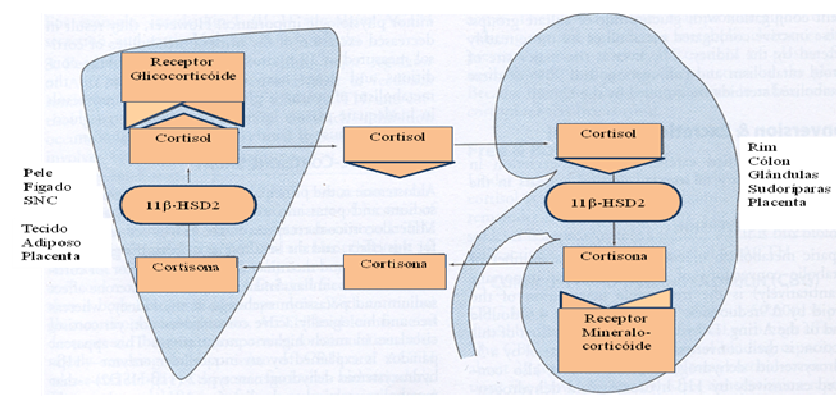


Figura 1.6: Interação cortisol-cortisona (adaptado de Gardner *et al.* 2007).



1.2.3 Funções e Efeitos

Os efeitos metabólicos do cortisol geralmente opõem-se aos da insulina por promover a quebra das moléculas de hidratos de carbono, lípidos e proteínas, mobilizando as reservas energéticas. O cortisol aumenta a concentração de glucose no sangue por estimulação da gluconeogénese no fígado (Brook *et al* 2001). Intervém de forma importante em quase todos os aspectos do metabolismo com um efeito global catabólico. O cortisol é essencial para que a adrenalina, a hormona de crescimento e péptidos lipolíticos provoquem a estimulação máxima da lipólise (Bartels *et al* 2003).

No músculo, no tecido adiposo e nos órgãos linfóides estimula a catálise, enquanto que no fígado estimula a síntese e armazenamento de glicogénio (fig. 1.7) (Brook *et al* 2001).

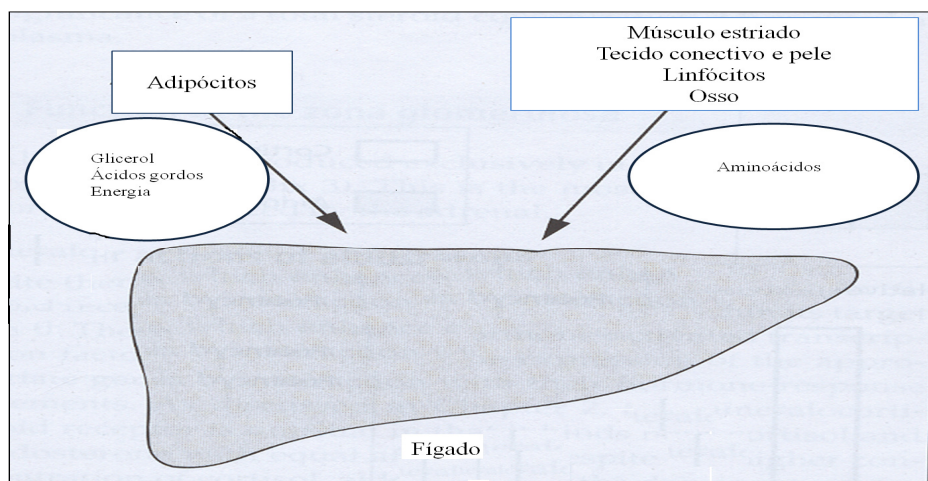


Figura 1.7: Efeitos metabólicos do cortisol (retirado de Brook *et al.* 2001)



Esta hormona esteróide também induz a síntese de mediadores, como a acetilcolina e receptores β -adrenérgicos. Alguns dos efeitos do cortisol, como a inibição da secreção de ACTH, são rápidos, manifestando-se em poucos minutos, mas na generalidade os seus efeitos precisam de horas ou dias para ocorrerem (Erickson *et al* 2003).

O cortisol, como qualquer esteróide, atravessa as membranas celulares e actua no receptor de glicocorticóides, presente no núcleo e citoplasma. Este receptor recebe a designação de receptor de glucocorticóides do tipo II. Pertence à superfamília dos receptores de esteróides, retinóides e hormonas tiroideias. Surge em praticamente todos os tecidos, mas a sua concentração varia com o tipo celular e com o grau de diferenciação da célula. Este receptor combina-se de forma não covalente alterando a sua estrutura. O complexo formado liga-se ao elemento regulador dos glucocorticóides induzindo ou reprimindo a transcrição de genes (Bartels *et al* 2003). É natural que outros mecanismos intracelulares sejam afectados pelo cortisol, pois apesar de não alterar os níveis de AMPc parece haver uma sinergia com este sistema (Kloet 2003).

Em geral, os glucocorticóides diminuem a sensibilidade dos sentidos, olfativo, gustativo, auditivo e visual. Contudo, melhoram a capacidade integrativa e geradora de respostas apropriadas. Em excesso, o cortisol pode provocar insónias e elevar ou deprimir, marcadamente, o humor (Feldman 1995).

No feto, o cortisol favorece a maturação do SNC, retina, pele, tracto gastrointestinal e pulmões. O cortisol auxilia a diferenciação da mucosa intestinal do fenótipo fetal para o fenótipo adulto, o que permite à criança usar dissacarídeos presentes no leite materno. No pulmão passa-se algo semelhante, a velocidade de desenvolvimento alveolar e do epitélio respiratório é acentuada pelo cortisol (Bartels *et al* 2003).

As mudanças na secreção de cortisol estão associadas a níveis anormais de ACTH, depressão, *stress* psicológico, *stress* fisiológico, como hipoglicemia, febre, trauma, cirurgias, medo, dor, exercícios físicos e temperaturas extremas (Gardner *et al.* 2007).



O cortisol também inibe a secreção da CRH, resultando em *feedback* negativo da secreção do ACTH. O cortisol tende a restabelecer a homeostase e o equilíbrio interno do organismo, após o *stress*. A exposição de longo prazo ao cortisol resulta na danificação das células do hipocampo (Kloet 2003).

Para além destes efeitos, o cortisol pode ter um efeito anti-inflamatório pois em concentrações moderadamente altas pode reduzir o tamanho dos nódulos linfáticos e a involução do timo. Também pode aumentar a actividade no SNC produzindo euforia e outros sintomas associados (Brook *et al* 2001).

1.3 Os efeitos da exposição ao stress

O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) é um dos maiores indutores endócrinos de *stress* nos organismos humanos. O cortisol é a principal hormona relacionada com o *stress* e a hormona final desse eixo e afecta o sistema metabólico, cardiovascular e SNC (Dedovic e tal. 2009). A resposta hormonal provocada pela activação do eixo HPA descreve-se em três fases. Na primeira fase (alarme), as mudanças fisiológicas do organismo caracterizam-se pelas reacções necessárias à satisfação das exigências do agente de *stress* (físico ou psicológico). A hipófise anterior secreta ACTH activando o córtex adrenérgico, levando à produção de cortisol. O *output* hormonal aumenta rapidamente durante esta fase. Na segunda fase (resistência), ocorre uma adaptação ao *stress* com a consequente melhoria ou desaparecimento dos sintomas. O *output* hormonal permanece alto mas estável. A terceira fase (exaustão), só acontece se o agente de *stress* for suficientemente severo e prolongado, levando à depleção das defesas somáticas. Isto é, a hipófise anterior e o córtex adrenérgico perdem a capacidade de secreção de hormonas, deixando o organismo incapaz de se adaptar. Como



consequência, os sintomas reaparecem e se a resposta de *stress* continua, órgãos vulneráveis (determinados por factores genéticos e ambientais), poderão desenvolver doença (Cohen *et al.* 1997).

A contribuição do SNC para a expressão do cortisol em resposta ao *stress* é influenciada por inúmeros factores que contribuem para a sua estimulação através da activação de regiões do cérebro envolvendo a regulação de glucocorticóides. No SNC, há diversos receptores, quer do tipo I quer do tipo II (Herman *et al.* 2003).

O cortisol regula a sua própria via de libertação por um *feedback negativo* no SNC, onde se liga a receptores específicos de todo o sistema límbico incluindo o hipocampo, amígdala e córtex prefrontal (Feldman 1995).

Outros factores podem ter um papel na regulação do cortisol nomeadamente o sexo. Os homens e as mulheres diferem na secreção de cortisol dependendo do factor de *stress*. Tal deve-se provavelmente às diferenças entre os sexos no ajuste das estruturas límbicas e frontais na regulação do cortisol (Stround *et al.* 2002).

Foi demonstrado que o *stress* provocado pela separação maternal de ratos recém-nascidos diminuí a expressão de TTR. A expressão de TTR provocava um aumento na amígdala em resposta ao *stress*, mas diminuía no hipocampo em resposta ao *stress* provocado pela separação maternal (Kohda *et al.* 2006).

Estudos relacionados com *stress* crónico demonstraram que este diminui a expressão da TTR tanto ao nível de mRNA como de proteína no córtex, mas não no CP. Estes estudos sugerem que a expressão TTR fora do CP pode ser afectada por condições de *stress* e pode ter um papel em certas condições psiquiátricas, tais como a depressão (Joo *et al.* 2009).

2. Objetivo



Como foi abordado ao longo da introdução, existem actualmente diversos estudos realizados em pacientes com AD que mostram que os níveis de TTR estão correlacionados negativamente com o grau de demência. Este efeito está associado ao facto da TTR se ligar às fibrilhas de amilóide prevenindo a sua acumulação e participando na sua remoção. Em situações de *stress* são libertados grandes quantidades de cortisol. Existem evidências que o *stress* tem impacto em várias doenças do SNC.

Neste contexto, a hipótese de estudo subjacente a este projecto foi investigar se o cortisol tem algum efeito, ou seja, se regula, a expressão da TTR em ratos adultos submetidos a uma situação de *stress*, e numa linha celular de CP de rato estimulada com a forma injectável do cortisol, a hidrocortisona.

3. *Metodologia*



3.1 Cultura de Células Eucarióticas

3.1.1 Linha celular

A linha celular utilizada foi a linha comercial RCP – *Rat Choroid Plexus* (Health Protection Agency, França), e consiste numa sub-cultura de plexo coroideu de rato, feita através da dissecção de ratos adultos *Wistar* para a obtenção do plexo coroideu a partir do quarto ventrículo dando origem a culturas primárias. Posteriormente, essas culturas foram imortalizadas por transfecção com o adenovírus *TSori*. A sub-clonagem destas células imortalizadas realizou-se seleccionando os clones que libertavam iões cálcio em resposta à vasopressina, angiotensina, serotonina, bradicinina e à estimulação endotelial. Os sub- clones que exibiram larga resposta a estes cinco factores foram seleccionados e a sub-cultura denominada RCP (fig. 3.1).

Trata-se de uma cultura de células de rato, de morfologia endotelial e com crescimento aderente quando em cultura.

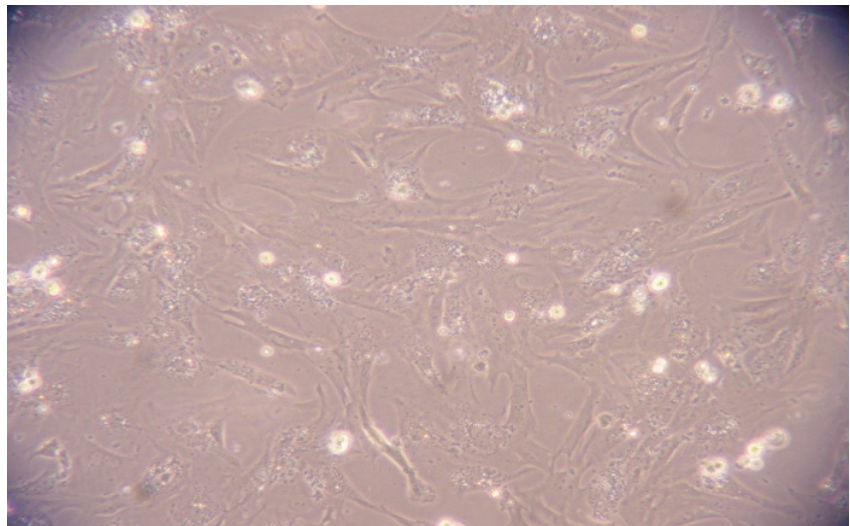


Figura 3.1: Morfologia das células RCP.



Descongelamento da linha celular RCP e Contagem de células viáveis

Um tubo criogénico contendo células RCP foi retirado de azoto líquido e o seu conteúdo descongelado num banho a 37 °C. Seguidamente ressuspenderam-se as células em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Sigma-Aldrich). Centrifugou-se a mistura a 1250 rpm durante 5 min. Eliminou-se o sobrenadante por aspiração e ressuspenderam-se as células em 2 ml de meio de cultura contendo DMEM, 10% de soro fetal bovino (FBS) (Biochrom AG), 1% de penicilina-estreptomicina (PS), 1% de suplemento de insulina-transferrina-selenito de sódio (ITS) (Sigma-Aldrich). Após a centrifugação, retiraram-se 10 µl da suspensão e colocaram-se as restantes células numa estufa a 37 °C para minimizar perdas de células viáveis. A mistura contendo as células e o azul de tripano foi colocada sobre uma câmara de *Neubauer* e, após colocação de uma lamela, foram contadas as células nos quatro quadrantes assinalados com o símbolo “L” na figura 3.2.

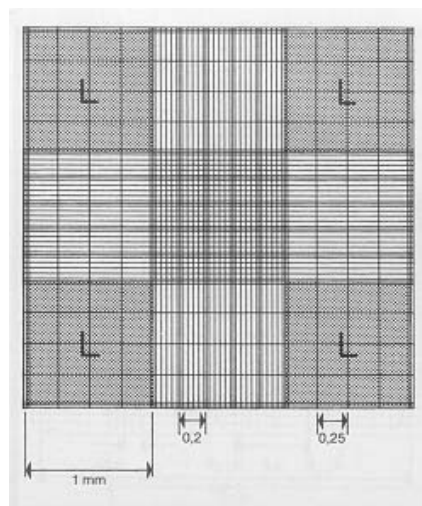


Figura 3.2: Câmara de *Neubauer*.



Após a contagem do número de células viáveis presentes nos quatro quadrantes foi feita a média do número de células e procedeu-se à sua contagem, usando as fórmulas apresentadas a seguir:

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

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

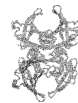
Tal porque, cada um dos quadrantes contabilizados contém 10^{-4} mL e tendo em conta que é feita uma diluição 1:2 do volume que é retirado da suspensão que contém as células.

Após a contagem do número de células, pipetou-se o volume de células corresponde a 10^6 células e adicionou-se a 5 mL de meio de cultura, tendo-se colocado a crescer num frasco de crescimento de 25 cm². Identificou-se o frasco de crescimento com a identificação da linha celular, o nº de passagem, o nome do utilizador e a data da passagem.

Passagem

O processo de passagem de células realiza-se quando a sua confluência atinge valores próximos de 100%. Com este processo pretende-se diminuir a densidade celular de forma a permitir uma contínua expansão da linha celular.

O procedimento a seguir aquando da passagem de células varia consoante a linha celular ou cultura primária em questão. Para o caso da linha celular RCP, aspirou-se o meio do frasco de crescimento que continha as células e lavaram-se as mesmas com PBS 1X (Tampão fosfato salino, pH=7.4), adicionando-o ao frasco de cultura e fazendo-o circular suavemente sobre as células. Seguidamente, aspirou-se o PBS e adicionou-se Tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich) suficiente para cobrir as células, tendo-se deixado actuar 3 a 5 min.. Durante este período,



Metodologia

auxiliou-se o descolamento das células dando suaves pancadas secas e, quando as mesmas já se encontravam em solução, adicionou-se 2x o volume de Tripsina-EDTA ao meio de cultura. Recuperou-se a suspensão para um tubo de 50 mL e centrifugou-se 5 min a 1250 rpm. De seguida, aspirou-se o sobrenadante, e ressuspendeu-se o *pellet* formado em 5 mL de meio de cultura. Centrifugou-se novamente a suspensão nas mesmas condições anteriormente referidas. Aspirou-se o sobrenadante e ressuspenderam-se as células em 1 a 5 mL de meio de cultura, consoante o tamanho do frasco no qual se encontravam as células.

Contou-se o número de células segundo o ponto 1.1.1 desta secção, identificou-se o frasco e colocaram-se as células a crescer numa estufa a 37 °C.

O número de células colocado variou consoante a área do frasco de crescimento celular: 10^6 células (frascos de cultura de 25 cm²), 3×10^6 células (frascos de 75 cm²) e 6×10^6 células (frascos de 150 cm²), $1,5 \times 10^5$ células (placas de 6 poços) e 5×10^4 células (placas de 12 poços).

Congelamento

O processo de congelamento de células foi efectuado sempre nas passagens iniciais de células (P1 a P5) de modo a assegurar a eternização da linha celular RCP.

Para tal, aspirou-se o meio do frasco de crescimento que continha as células e lavaram-se as mesmas com PBS 1X (Tampão fosfato salino, pH=7.4), adicionando-o ao frasco de cultura e fazendo-o circular suavemente sobre as células. Seguidamente, aspirou-se o PBS e adicionou-se Tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich) suficiente para cobrir as células, tendo-se deixado actuar 3 a 5 min.. Durante este período, auxiliou-se o descolamento das células dando suaves pancadas secas e, quando as mesmas já se encontravam em solução, adicionou-se 2x o volume de Tripsina-EDTA de meio de cultura. Recuperou-se a suspensão para um tubo de 50 mL e centrifugou-se 5 min a 1250 rpm. De seguida, aspirou-se o sobrenadante, e ressuspendeu-se o *pellet* formado em 5 mL de meio de



cultura. Centrifugou-se novamente a suspensão nas mesmas condições anteriormente referidas. Aspirou-se o sobrenadante e ressuspenderam-se as células em 1 a 5 mL de meio de cultura, consoante o tamanho do frasco no qual se encontravam as células.

Após o processo anteriormente descrito, procedeu-se à contagem do número de células, como constante no ponto 1.1.1 da presente secção, diluiu-se a suspensão para o equivalente a 1×10^6 células/ml em meio de cultura contendo 10% de DMSO (dimetilsulfóxido) e procedeu-se ao seu congelamento em tubos criogénicos. O processo de congelamento foi feito em 3 fases, a primeira delas durante aproximadamente 3 a 4 h a -20 °C, seguida de uma passagem de cerca de 48 h a -80 °C e uma última fase, a de armazenamento intemporal em azoto líquido.

3.2 Estimulação Hormonal com Hidrocortisona na Linha Celular RCP

Retirou-se o soro do meio das RCP 16 horas antes da estimulação. Passado esse período, estimularam-se as células com várias concentrações de hidrocortisona (Sigma-Aldrich), 0, 10, 100 e 1000 nM em DMEM, 1% PS e 1% ITS (sem FBS). A hidrocortisona foi reconstituída em etanol absoluto numa solução *stock* de 1mM. O stock foi preservado a 4°C e usou-se até perfazer duas semanas após a sua preparação. Passado esse tempo, fez-se nova solução *stock* com a mesma concentração. Incubaram-se as células durante 6h, 12h, 18h, 24h ou 36h. Terminado o período de estimulação, recolheu-se o extracto de cada uma das condições para posterior análise por *Western blot* ou procedeu-se à paragem de cada estímulo no poço através da prossecução para a técnica de imunocitoquímica.



3.3 Extracção e Quantificação de Proteína e Western blot

3.3.1 Extracção e Quantificação do Extracto Proteico pelo Método de Bradford

As amostras foram obtidas por homogeneização e lise das células em tampão de lise contendo 25 mM Tris, 2.5 mM EDTA, 0.2% Triton X-100 (Sigma-Aldrich,), 1mM DTT (ditiotreitól) (Invitrogen), 1mM PMSF (Sigma-Aldrich) e 25,57 μ M de leupeptina (Sigma-Aldrich). As amostras homogeneizadas foram centrifugadas a 14000 g durante 5 min a 4 °C e o sobrenadante foi recolhido e armazenado a -80 °C utilizado de seguida.

A concentração de proteína total foi determinada usando o método de Bradford e como referência uma recta de calibração com concentrações de albumina sérica bovina (BSA).

O método de *Bradford* é uma técnica para a quantificação de proteínas totais que utiliza o corante de *Coomassie brilliant blue*. Este método baseia-se na interacção entre o corante e as proteínas que contêm aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reacção, a interacção entre a proteína molecular e o corante *Coomassie brilliant blue* provoca um deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniónica, que absorve a 595 nm.

O método de Bradford tem sido utilizado na determinação de proteínas totais de diversos tecidos e/ou células. No entanto, apesar de se tratar de um método rápido e eficiente têm também algumas desvantagens como é o caso de variar a absorvidade específica para diferentes proteínas e de nem sempre os resultados serem reprodutíveis devido ao grau de pureza do corante *Coomassie brilliant blue* que varia consoante o lote.



3.3.2 *Western blot*

A técnica de *Western blot* é um método utilizado na detecção de proteínas a partir de um extracto de proteína total ou lisado proteico. Esta técnica amplamente usada a nível laboratorial utiliza a técnica de SDS-PAGE, ou seja, de electroforese em gel de acrilamida para, após desnaturação, separar as proteínas contidas num extracto total, pelos seus tamanhos. De seguida, as proteínas são transferidas do gel para uma membrana, normalmente de polivinildieno diflourido, e incubadas com anticorpos específicos para a proteína de interesse, de forma a detectar a presença dessa proteína na amostra.

Sumariamente, na técnica de *Western blot*, as amostras são desnaturadas numa solução desnaturante, contendo um detergente, o SDS, que como composto sulfuroso que é, rodeia as proteínas impedindo a formação de pontes de dissulfido. De seguida, as proteínas contidas na amostra são separadas de acordo com o seu peso molecular durante a electroforese num gel, normalmente de acrilamida. Num dos poços do gel adiciona-se também um marcador de pesos moleculares comercial, com os tamanhos das proteínas que o compõem conhecidos. Após a separação das proteínas segundo o seu tamanho, as mesmas são transferidas para uma membrana de nitrocelulose ou de PVDF segundo o esquema apresentado na figura 3.3.

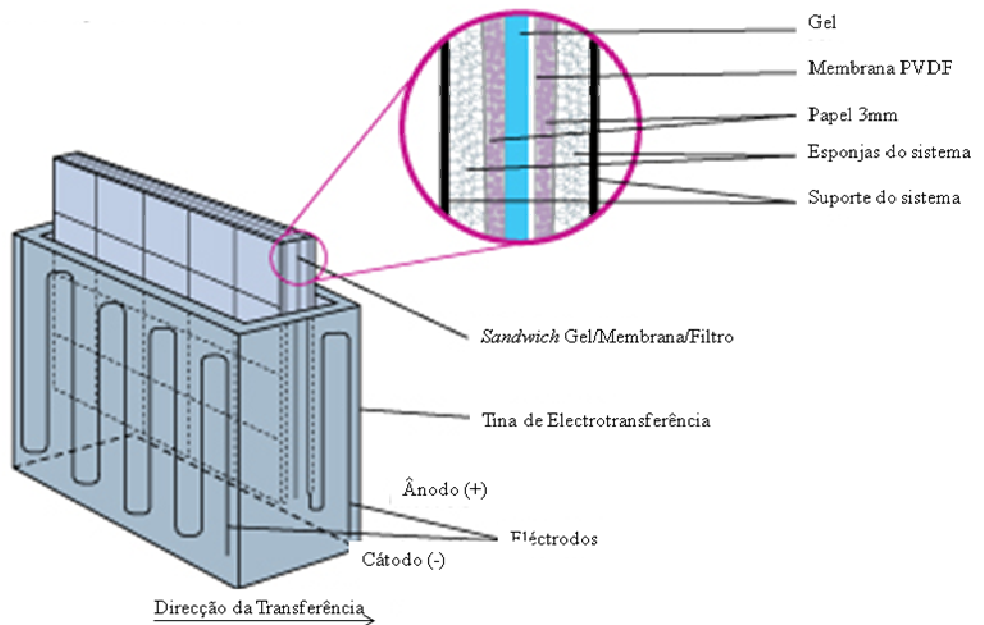


Figura 3.3: Esquema simplificado do aparato de uma electrotransferência de proteínas (Adaptado de <http://www.piercenet.com>).

Após a electrotransferência, a membrana é bloqueada de modo a impedir a ocorrência de interações inespecíficas entre a membrana e o anticorpo primário usado para a detecção da proteína de interesse. Os anticorpos primários ligam-se directamente à proteína de interesse porque estes são produzidos expondo uma determinada espécie, designada de hospedeira, à proteína de interesse, total ou parcial. Após esta incubação, a membrana é lavada num tampão salino, para remoção do anticorpo primário não ligado, e incubada com um anticorpo secundário, que reconhece o primário usado, mais concretamente a espécie hospedeira na qual o primário foi produzido e liga-se. Este anticorpo, no nosso caso, está conjugado com a fosfatase alcalina que funciona como enzima reveladora, intensificadora de sinal aquando da revelação da membrana. A revelação pode ser feita de diversas formas mas vulgarmente é feita por quimioluminescência, o que ocorreu neste caso, produzindo-se uma fluorescência



na banda directamente proporcional à quantidade de proteína presente na amostra. A imagem é de seguida analisada por densitometria, a qual quantifica a proteína presente.

Procedimento

Adicionou-se a quantidade pretendida de extracto proteico a um microtubo: 50 µg no caso da RCP, 50 µg no caso do fígado, 10 µL no caso do CSF, 10 µg no caso do plexo coroideu e 10 µL no caso do plasma sanguíneo). De seguida, adicionou-se tampão de desnaturação contendo 100mM Tris, 100mM glicina, 4% SDS (dodecilsulfato de sódio), 8M ureia e 0,01% azul de bromofenol e desnaturaram-se as amostras a 100°C durante 10 min.. O extracto proteico foi separado por SDS-PAGE usando géis desnaturantes de 12% de acrilamida a 150 V. Prosseguiu-se com a electrotransferência das proteínas contidas nos géis usando membranas de PVDF (Amersham), previamente activadas em metanol, equilibradas na solução de electrotransferência constituída por 10 mM CAPS, 10% metanol, pH=11, e cortadas numa zona intermédia à localização das duas proteínas de interesse (aproximadamente a meio da membrana). A electrotransferência foi efectuada a 750 mA durante 11 min para a TTR e 40 min para a β-actina (proteína endógena - *housekeeping*). Depois de terminada a electrotransferência, procedeu-se ao bloqueio das membranas com 5% de leite magro em TBS-T (0,1% Tween 20 em 20 mM Tris e 137 mM NaCl) durante 1 h à temperatura ambiente. Findo esse período, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário rabbit anti-human TTR (1:200, DAKO) ou mouse anti-β-actina (1:20000, Sigma-Aldrich), diluídos em TBS-T, durante 1 h à temperatura ambiente e com agitação lenta constante. Efectuaram-se 3 lavagens de 15 min. com TBS-T e incubaram-se as membranas com o anticorpo secundário correspondente: anti-*rabbit* ligado à fosfatase alcalina (1:10000) (GE Healthcare) para a detecção da TTR e com anti-*mouse* ligado à fosfatase alcalina (1:10000)



(GE Healthcare) na detecção da β -actina. Lavaram-se, 3 vezes com TBS-T as membranas e incubaram-se com o substracto ECF(*ECF Western Blotting Reagent Packs*, Amersham) durante 5 min. As bandas da proteína foram detectadas por quimioluminescência, usando o *Molecular Imager FX system* (Bio-rad) e quantificadas por análise densitométrica usando o *software Quantity One* (Bio-Rad).

3.4 Imunocitoquímica

A técnica de imunocitoquímica é utilizada na localização de determinadas proteínas ou estruturas sub-celulares em células e tem como principal fundamento a utilização de anticorpos específicos (geralmente IgG's) para a proteína a localizar, funcionando esta como antigénio.

Com esta técnica, o anticorpo marca a proteína ou estrutura de interesse na célula (anticorpo primário) e um segundo anticorpo marcado (anticorpo secundário) que se liga ao primeiro e possibilita a sua detecção. Esta, pode ser feita de várias maneiras, dependendo do marcador que se liga ao anticorpo secundário (radioactivo, visível ao microscópio óptico, ou, como no nosso estudo, fluorescente).

Com esta técnica pretende-se detectar proteínas intracelulares mas, devido ao facto dos anticorpos serem moléculas bastante grandes, e por esse motivo não entrarem com muita facilidade no citoplasma das células, é necessária a fixação e permeabilização das mesmas.

Também, antes da incubação com os anticorpos, primário e secundário, é necessário proceder-se ao bloqueio das lamelas que contêm as células a analisar, revestidas com um agente aderente (normalmente Poli-D-Lisina).



Procedimento

Aqueceram-se todas as soluções a utilizar a 37 °C. Lavaram-se as lamelas que continham as células com DMEM para remover o soro. Aspirou-se o meio e adicionou-se novamente meio, com uma gota de PFA 4% (paraformaldeído) e incubou-se 1 min. Aspirou-se o meio e adicionou-se PFA 4% durante 15 min., para a fixação das células. Aspirou-se essa solução e permeabilizaram-se as células por incubação com Triton 1% em PBS durante 5 min. De seguida, efectuou-se o bloqueio com PBS 0,1% Tween (PBS-T) com 20% FBS durante 3 horas à temperatura ambiente, em câmara húmida. Lavaram-se as lamelas e incubaram-se com os anticorpos primários em simultâneo (*rabbit anti-human TTR*, 1:200 (Dako) e mouse anti-ER, 1:1000 (Invitrogen) *overnight* a 4 °C, diluído em PBS-T com 1% de FBS. No dia seguinte, lavaram-se as lamelas 8x com PBS-T durante 15 min. e incubaram-se com o marcador (corante) de núcleos Hoescht 33342 (concentração *stock* 1 mM) durante 15 min à temperatura ambiente. Repetiu-se a lavagem das lamelas como em cima e incubaram-se com os anticorpos secundários (*goat anti-rabbit* e *goat anti-mouse*, 1:1000) conjugado com Alexa Fluor® 488 e Alexa Fluor® 546, respectivamente, durante 1 hora à temperatura ambiente, diluídos em PBS-T com 1% de FBS. Lavaram-se novamente as lamelas 8x com PBS-T durante 15 minutos. Procedeu-se à sua montagem utilizando um meio de montagem para microscopia de fluorescência (Dako Citomation). Para este processo de montagem das lamelas em lâminas: aplicou-se 1 gota de meio de montagem em cada lâmina, previamente limpa com água destilada e álcool e colocou-se cada lamela, invertida, sobre cada uma das gotas, tendo-se deixado repousar durante aproximadamente ½ h. Selaram-se com verniz das unhas, deixaram-se secar, ao ar e protegido da luz e observaram-se as lâminas ao microscópio de fluorescência.



3.5 Experimentação In Vivo

Os animais foram manipulados de acordo com os requisitos éticos nacionais para a investigação animal, e de acordo com a Convenção Europeia para a Protecção de Animais Vertebrados Usados para Fins Experimentais e Outros Fins Científicos (directiva 86/609/EEC).

Os ratos (n=30) foram mantidos em gaiolas (três por gaiola) sob temperatura controlada (ciclos 12h dia/12h noite) com comida e água disponíveis livremente, durante 3 meses. Ao fim desse tempo, provocou-se uma situação de *stress* populacional, na qual, doze animais foram mantidos sob as mesmas condições (grupo controlo) e os restantes foram colocados nove por gaiola. No dia seguinte, sacrificaram-se os animais para a experiência, tendo-se procedido à recolha de CSF, CP, fígado e sangue. As amostras foram processadas e homogeneizadas e guardadas a -80°C para posterior análise proteica por *Western blot*.

4. Resultados



4.1 Estudos *In vitro*

4.1.1 Análise do efeito da hidrocortisona na expressão da TTR por *Western blot* em células RCP

Após estabelecimento das RCP e após confirmação, por *Western blot* de que a referida linha celular expressava endogenamente TTR, estimularam-se células desta linha durante diferentes períodos de tempo (6,12,18,24 e 36 h) e com diferentes concentrações de hidrocortisona (0, 10, 100, 100 nM), a forma sintética e injectável do cortisol. Após o período de estimulação, cada um dos extractos proteicos foi preparado e posteriormente analisados por *Western blot*, considerando em todos os ensaios realizados a utilização de uma proteína endógena normalizadora, a β -actina, que, por definição, não altera a sua expressão mesmo na presença de uma situação de estimulação ou de *stress*.

Os resultados obtidos pela técnica anteriormente referida estão presentes na figura 4.1.1a. Pela observação desta figura pode constatar-se que após 6 h de estimulação, não foi observado qualquer efeito ($p > 0.05$) nos níveis da expressão da TTR (A). No entanto, após 12 h de estimulação observou-se um aumento bastante significativo ($p < 0,001$) para as três concentrações de hidrocortisona usadas (10, 100, 1000 nM), quando comparadas com o grupo controlo (B), sendo este aumento mais pronunciado para a concentração de 100nM. Na estimulação por um período de 18 h, assim como para as 24h, verificou-se também um aumento significativo da expressão de TTR para as três concentrações mas não tão acentuado como para as 12 h (C e D). Também para estes períodos de estimulação se observou que a concentração óptima de hormona era do mesmo modo 100 nM. Nas 36 h de estimulação, observou-se que as concentrações de 10



e 100 nM de hormona promoveram um aumento bastante significativo da expressão da TTR (E). Para este tempo de exposição ao estímulo, importa salientar o facto de na presença de 1000 nM de hormona, a expressão da TTR não ter sido significativamente distinta dos controlos.

Assim, o tempo de estimulação e a concentração de hidrocortisona onde se verificaram um aumento de expressão dos níveis de TTR mais significativo foi às 12h usando uma concentração de 100 nM.

Após a realização destes ensaios procedeu-se à quantificação relativa das bandas obtidas, resultando na figura 4.1.1b, no qual se pode observar que para uma concentração de 100 nM e 12 h de estimulação, o aumento da expressão de TTR foi de 56,91 %. Por sua vez, da mesma figura pode observar-se que para a mesma concentração, com períodos de estimulação de 18 e 24 h, os mesmos aumentos foram de 26,3% e 29,39 %, respectivamente. Também, para as 36 h de estimulação, o maior aumento verificou-se quando as células foram estimuladas com 100 nM de hormona.

Como já foi descrito anteriormente, nesta figura pode também observar-se que, de todas as concentrações testadas em cada um dos períodos de tempo incluídos no estudo, apenas às 6 h de estimulação, para as três concentrações usadas e às 36 h de estimulação para a concentração de hormona de 1000 nM, o cortisol não mostra efeitos muito significativos ($p > 0,001$) na regulação da expressão da TTR.

De um modo geral, na figura 4.1.1b pode observar-se que o efeito do cortisol é máximo para as 12 h de estímulo a 100 nM, sendo menor o seu efeito para as outras concentrações usadas, 10 e 1000 nM, respectivamente. Contudo, o seu efeito vai diminuindo ao longo do tempo, de forma proporcional ao observado para as 12 h.

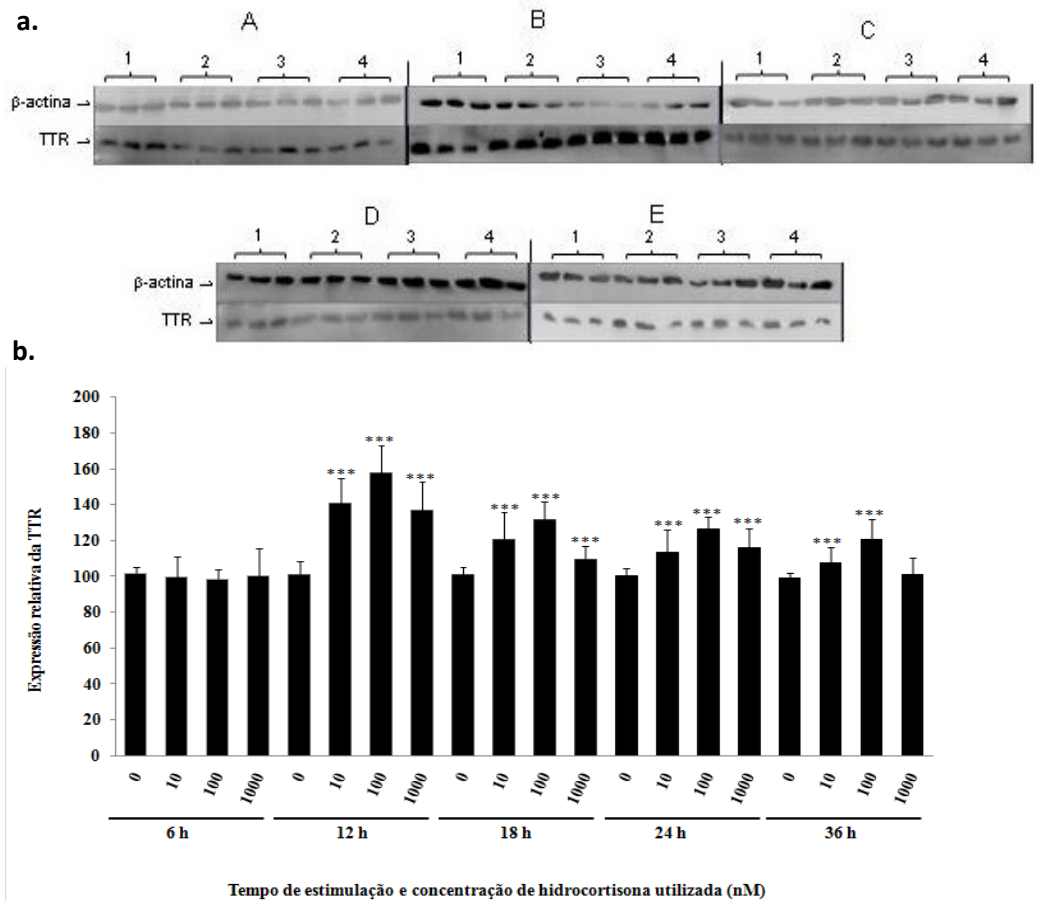


Figura 4.1.1: **a** - Análise da expressão da TTR utilizando 50 µg de proteína total de RCP. A normalização foi efectuada através da análise da expressão da β-actina. As RCP foram estimuladas com hidrocortisona às 6 (A), 12 (B), 18 (C), 24 (D) e 36 h (E). Para cada período de incubação foram efectuados triplicados das concentrações de 0, 10, 100 e 1000 nM de hidrocortisona (1, 2, 3, 4, respectivamente). **b** - Níveis de expressão da TTR quando estimulados com diferentes concentrações de hidrocortisona (0,10,100,1000nM) e em diferentes períodos de tempo (6h, 12h, 18h,24h,36h). Os dados apresentados são expressos em percentagem de níveis de expressão de TTR e representam a média ± SD de 3experiências independentes realizadas em triplicado. (***) - P <0.001).



4.1.2 Análise do efeito da hidrocortisona na expressão da TTR por Imunocitoquímica em células RCP

Após a realização dos ensaios *in vitro* com as RCP e de se ter procedido à sua análise, descrita no ponto anterior, decidiu-se confirmar os resultados por imunocitoquímica. Deste modo, repetiu-se a experiência acima referida. Dos resultados obtidos pode observar-se que, visualmente, não existiam diferenças evidentes em termos de localização subcelular quer da TTR (verde) quer do retículo endoplasmático (vermelho) entre as células estimuladas e as não estimuladas para cada um dos períodos de tempo e cada uma das concentrações incluídas (fig. 4.1.2). No entanto, visualmente, uma observação mais pormenorizada desta figura sugere que, aparentemente, as células estimuladas apresentam o seu retículo endoplasmático mais desenvolvido e que a própria localização subcelular da TTR está mais próxima do núcleo das células. No entanto, tal afirmação é puramente especulativa uma vez que, como já foi referido acima, de um modo geral, não se observou qualquer diferença notória entre as todas as imagens capturadas (Anexo 1).

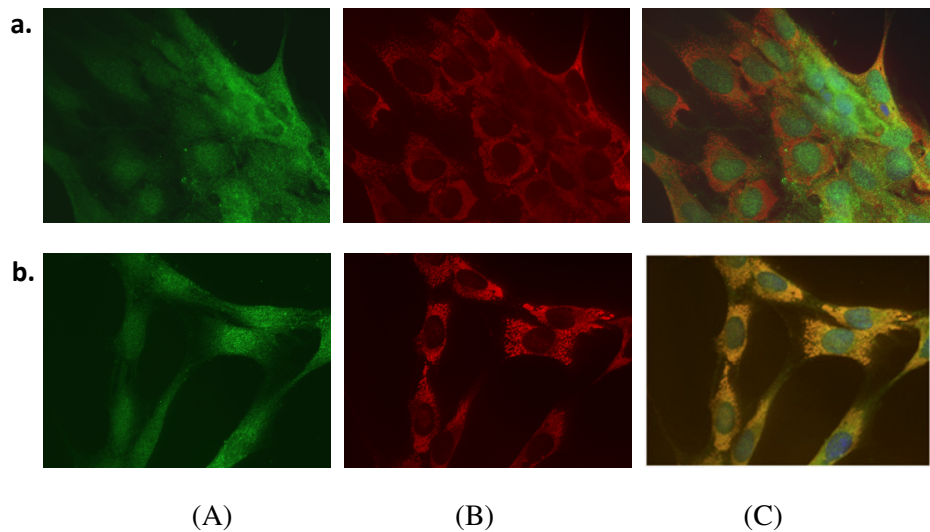


Figura 4.1.2: a - Imagem de fluorescência das RCP estimuladas com hidrocortisona durante 12h e com a concentração de 0 nM de hormona. **(A)** TTR (Alexa Fluor® 488) **(B)** Retículo endoplasmático (Alexa Fluor® 546) **(C)** Merge + núcleo (Hoescht 33342).

b - Imagem de fluorescência das RCP estimuladas com hidrocortisona durante 12h e com a concentração de 100 nM de hormona. **(A)** TTR (Alexa Fluor® 488) **(B)** Retículo endoplasmático (Alexa Fluor® 546) **(C)** Merge + núcleo (Hoescht 33342). Para a captura das imagens foi utilizada a objectiva com ampliação de 63x.



4.2 Estudos *In vivo*

No decurso deste projecto procedeu-se ainda à sujeição de ratos adultos a uma situação de *stress* populacional. Assim, como já foi descrito na metodologia da presente dissertação, induziu-se *stress* nos animais através da sua colocação, durante um dia, numa gaiola. Após este procedimento foi feita a amostragem de fígado, CP e CSF de cada animal, para posterior preparação de extracto proteico total e análise da expressão de TTR por *Western blot*. Após a análise das bandas obtidas na membrana, tendo sempre como proteína endógena normalizadora a β -actina.

4.2.1 Fígado

Após a realização de *Western blot* para os extractos de proteína de fígado (fig. 4.2.1a) verificou-se que, nos animais sujeitos a *stress* populacional houve um aumento bastante significativo (113.6% com $p < 0,001$) para os níveis de expressão de TTR, no fígado (fig. 4.2.1b). E, o referido aumento foi bastante mais significativo nos machos do que nas fêmeas, 172.08% e 43.17%, respectivamente (fig. 4.2.1c).

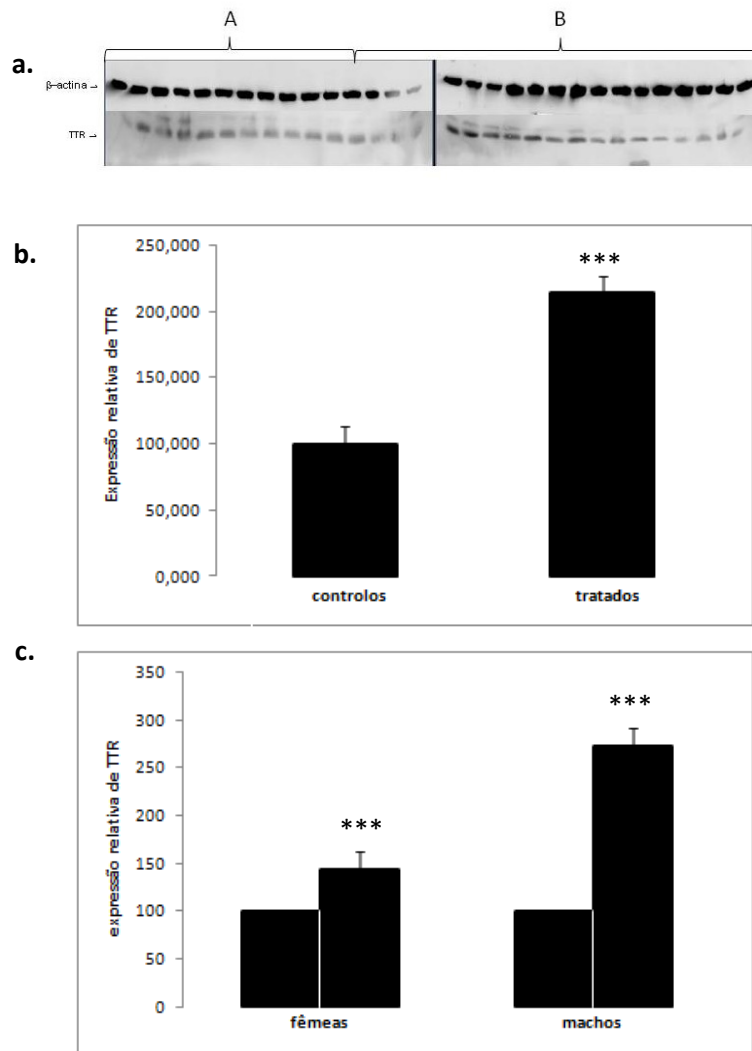


Figura 4.2.1: a - Análise da expressão da TTR no fígado. A normalização foi efectuada através da análise da expressão da β -actina. (A) ratos controlo (B) ratos submetidos a *stress*. b – Representação gráfica dos níveis de expressão da TTR no fígado de ratos controlo e de ratos submetidos a *stress*. Os dados apresentados são expressos em percentagem de níveis de expressão de TTR e representam a média \pm SD de 3 ensaios (*Western blot*) independentes. *** $P < 0.001$. c – Comparação dos níveis de expressão da TTR no fígado de machos e de fêmeas submetidos a *stress*. Os dados apresentados são expressos em percentagem de níveis de expressão de TTR e representam a média \pm SD de 3 ensaios (*Western blot*) independentes. *** $P < 0.001$.



4.2.2 CSF

Para a análise por *Western blot* no CSF (fig. 4.2.2a), observou-se também um aumento dos níveis da expressão da TTR (34.774%) (fig. 4.2.2b). Contudo, esse aumento não apresentou diferenças significativas entre machos e fêmeas (fig. 4.2.2c).

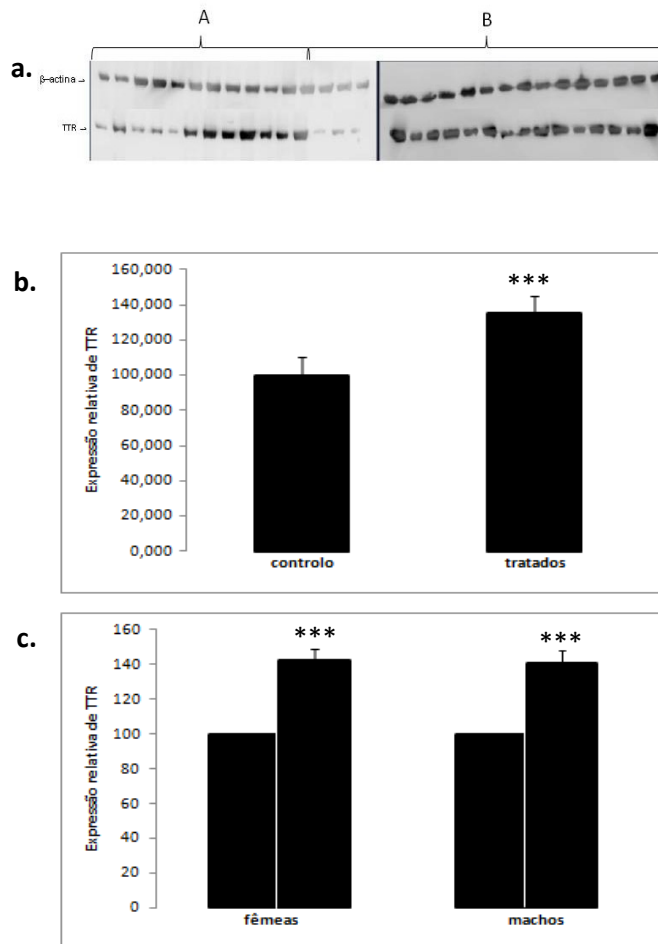
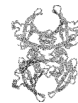


Figura 4.2.2: **a** - Análise da expressão da TTR no CSF. A normalização foi efectuada através da análise da expressão da β -actina. **(A)** ratos controlo **(B)** ratos submetidos a *stress*. **b** - Representação gráfica dos níveis de expressão da TTR no fígado de ratos controlo e de ratos submetidos a *stress*. Os dados apresentados são expressos em percentagem de níveis de expressão de TTR e representam a média \pm SD de 3 ensaios (*Western blot*) independentes. *** $P < 0.001$. **c** - Comparação dos níveis de expressão da TTR no fígado de machos e de fêmeas submetidos a *stress*. Os dados apresentados são expressos em percentagem de níveis de expressão de TTR e representam a média \pm SD de 3 ensaios (*Western blot*) independentes. *** $P < 0.001$.



4.2.3 CP

Relativamente à análise por *Western blot* dos extractos proteicos de CP (fig. 4.2.3a), o aumento que obtive nos níveis da expressão dos TTR foi bastante significativo (124.51% com $p < 0,001$) (fig. 4.2.3b) tanto nos machos como nas fêmeas (fig. 4.2.3c).

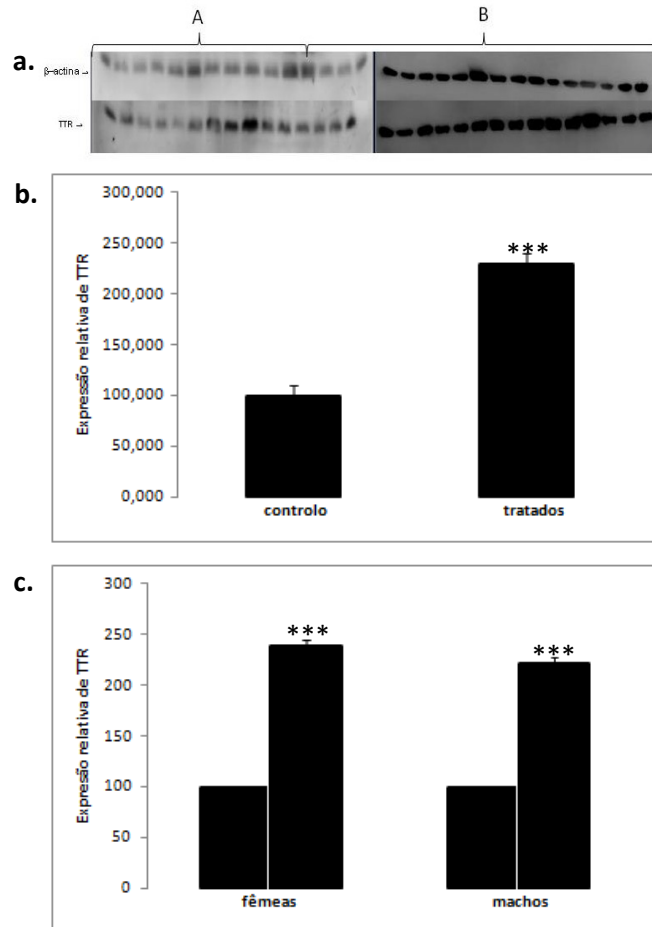


Figura 4.2.3: **a** - Análise da expressão da TTR no CP. A normalização foi efectuada através da análise da expressão da β -actina. **(A)** ratos controlo **(B)** ratos submetidos a *stress*. **b** - Representação gráfica dos níveis de expressão da TTR no fígado de ratos controlo e de ratos submetidos a *stress*. Os dados apresentados são expressos em percentagem de níveis de expressão de TTR e representam a média \pm SD de 3 ensaios (*Western blot*) independentes. *** $P < 0.001$. **c** - Comparação dos níveis de expressão da TTR no fígado de machos e de fêmeas submetidos a *stress*. Os dados apresentados são expressos em percentagem de níveis de expressão de TTR e representam a média \pm SD de 3 ensaios (*Western blot*) independentes. *** $P < 0.001$.



De um modo geral, para as estruturas analisadas nesta experiência, as maiores diferenças observadas entre ratos controlo e ratos submetidos a *stress* foi ao nível do fígado. Contudo, foi ao nível do CP que as diferenças entre sexos foram mais pronunciadas.

5. Discussão e Conclusões



A TTR é uma proteína de extrema importância no metabolismo dos mamíferos pelas funções que desempenha, quer no transporte de T4 quer no transporte indirecto de retinol, *via* ligação à sua proteína transportadora, a RBP. Nos últimos anos, tem sido também implicada em doenças neurodegenerativas, em particular, com a AD (Schwarzman e Goldgaber 1996; Merched *et al.* 1998; Stein *et al.* 2004, Costa *et al.* 2008(a) e Costa *et al.* 2008(b)). Estudos realizados mostraram a capacidade da TTR em abrandar a progressão da AD considerando-se, por esse motivo, que desempenha um papel neuroprotector (Buxbaum and Reixach 2009). Estudos efectuados no CSF de pacientes com AD mostraram a ocorrência de uma diminuição nos níveis de TTR quando comparados com os controlos e que existe uma correlação negativa entre os níveis de TTR observados e a abundância de placas amiloidóticas (Costa *et al.* 2008 e Vasak 2005).

Outros grupos têm estudado os efeitos que determinados agentes podem apresentar na regulação da TTR. Assim, várias pesquisas têm sido efectuadas no estudo da sua regulação, principalmente nos órgãos nos quais ela é maioritariamente sintetizada, o fígado e o CP. Neste contexto, Gonçalves e os seus colaboradores desenvolveram estudos em ratos (2009) nos quais provaram que o E₂ e a DHT regulam positivamente a expressão de TTR no fígado, em ambos os sexos (Gonçalves *et al.* 2009). Outros, mostraram que também os ácidos gordos ómega 3 (Puskas *et al.* 2003) e o E₂ aumentam a transcrição da TTR no cérebro, em modelos de rato adulto de AD (Tang *et al.* 2004), podendo assim dizer-se que a resposta da TTR ao E₂ segue mecanismos semelhantes no CP e no fígado.

Também, Quintela e seus colaboradores realizaram estudos dos quais concluíram que os níveis de TTR aumentavam com o tratamento quer com DHT quer com E₂ (Quintela *et al.* 2008; Quintela *et al.* 2008).

Este estudo incidiu sobre o papel do cortisol na modulação da expressão da TTR, principalmente nos seus órgãos de síntese, uma vez que se trata de uma hormona esteróide, praticamente ubíqua no organismo (Kloet, 2003) e associada à depressão, *stress* psicológico e *stress* fisiológico (Gardner *et al.* 2007).



Estudos efectuados mostraram que a indução de uma resposta ao *stress* previne algumas doenças neurodegenerativas (Kieran *et al.* 2004). Para além destes efeitos, outros estudos mostraram que, o cortisol pode ter um efeito anti-inflamatório pois em concentrações moderadamente altas pode reduzir o tamanho dos nódulos linfáticos e a involução do timo, podendo também aumentar a actividade no SNC (Brook *et al.* 2001).

Com base nos estudos efectuados anteriormente acerca da importância da TTR na progressão da AD e da sua própria regulação, principalmente por hormonas esteróides, tornou-se relevante avaliar se o cortisol tem algum papel na regulação da expressão desta proteína em ratos. Assim, foram realizados estudos *in vivo*, nos quais ratos adultos foram submetidos a uma situação de *stress* populacional durante um período de 24 horas e, estudos *in vitro* nos quais culturas da linha celular RCP foram estimuladas em diferentes períodos de tempo com diferentes concentrações de hidrocortisona por ser esta a forma injectável e sintética do cortisol.

De acordo com os resultados obtidos nos estudos *in vitro*, às 6 h de estimulação não foi observada qualquer alteração nos níveis de expressão de TTR. Por sua vez, às 12 h de estímulo verificaram-se diferenças bastante significativas ($p < 0.001$) na expressão da TTR para todas as concentrações testadas, tendo-se verificado o mesmo para os outros tempos incluídos no estudo, com excepção da maior concentração testada (1000 nM) às 36 h de estimulação. Contudo, o aumento significativamente mais acentuado foi observado às 12 h, para uma concentração de hormona de 100 nM, sendo que, a partir das 12 h, os aumentos observados foram diminuindo ao longo dos tempos testados, mantendo-se contudo bastante significativos ($p < 0.001$).

Através destes resultados pode então considerar-se que o cortisol tem um efeito directo nos níveis de expressão da TTR pois passadas apenas 12 h de estimulação foi observado o seu efeito máximo. E, segundo outros autores, quando se trata de um efeito indirecto várias vias de sinalização são activadas e,



como tal, o período de tempo necessário para que se observem alterações na expressão de proteína é, normalmente, superior ao observado.

Relativamente à concentração à qual o cortisol tem o seu efeito mais significativo na regulação da expressão da TTR, pode concluir-se que foi quando as células foram estimuladas com 100 nM de hormona, na medida em que foi com esta concentração de cortisol que se obtiveram diferenças mais significativas.

Tendo em conta os resultados acima descritos, pode inferir-se que o cortisol estimula a expressão da TTR nas células da linha RCP, e que esse aumento é mediado por dois factores: a concentração de hormona utilizada e o período de exposição ao estímulo. Assim, pode considerar-se que, o cortisol actua optimamente às 12 h de estímulo, diminuindo o seu efeito nos períodos de tempo subsequentes, embora que em todos eles seja observável um aumento significativo da expressão da TTR. Por outro lado, o segundo factor a considerar na regulação da expressão desta proteína pelo cortisol é a concentração de hormona à qual o aumento da expressão da TTR está maximizado. Neste parâmetro, de acordo com os resultados obtidos, pode concluir-se que a concentração óptima de cortisol é 100 nM, sendo menor o seu efeito para as outras concentrações testadas (10 e 1000 nM), embora mantendo-se significativas em termos de aumento da expressão da proteína TTR. Aparentemente, a concentração de hormona de 10 nM é limitante na maximização do efeito desta hormona enquanto a de 1000 nM parece ser já excessiva.

Estes resultados podem ser suportados, genericamente, por outros estudos já realizados, nomeadamente por Shelby e seus colaboradores (2001), que defendem que o efeito adaptativo ou destrutivo do cortisol pode depender da intensidade, do tipo e da duração do *stress* provocado bem como da subsequente concentração e duração da exposição do cortisol às células-alvo (Shelby *et al.* 2001).

Após a realização e análise dos resultados acima descritos efectuou-se a mesma experiência para posterior análise pela técnica de imunocitoquímica. E, dos resultados obtidos pode constatar-se que, visualmente, não foram observadas



diferenças notórias em termos de localização subcelular de TTR entre as células estimuladas e as controlo. No decorrer desta experiência procedeu-se também à marcação do retículo endoplasmático das células e, também ele não apresentava diferenças significativas. A marcação desta estrutura subcelular foi feita na medida em que a TTR é uma proteína que segue a via secretória nas células de CP e, como tal, seria expectável que, um aumento na sua expressão pudesse ser observado através do aumento da sua concentração, principalmente na proximidade da região perinuclear, em sobreposição com o retículo endoplasmático, para posterior saída da célula. Contudo, este facto não foi observado.

No entanto, e apenas visualmente, uma observação pormenorizada das fotografias capturadas sugere que, aparentemente, as células estimuladas apresentam o retículo endoplasmático com maior desenvolvimento e que a própria localização da TTR poderá estar mais sobreposta com o retículo endoplasmático e, como tal, mais próxima da membrana nuclear das células. No entanto, tal afirmação é apenas especulativa uma vez que, como já foi referido acima, de um modo geral, não foram observadas diferenças claras e inequívocas entre as células estimuladas e as não estimuladas.

Os estudos *in vivo* desenvolvidos no decorrer deste trabalho tiveram como fundamento várias observações realizadas anteriormente por outros autores, em diversos organismos.

Como foi descrito recentemente, o *stress* desencadeia respostas fisiológicas, comportamentais e metabólicas que visam restabelecer a homeostase (Dedovic *et al.* 2009), sendo o cortisol, um dos maiores indutores endócrinos de *stress* em organismos humanos, e a principal hormona relacionada com o *stress* e a hormona final do eixo HPA, que afecta o sistema metabólico, o cardiovascular e o SNC (Dedovic *et al.* 2009).

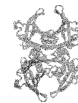
Na experiência aqui descrita, os animais foram submetidos a uma situação de *stress* populacional, tendo, para tal, sido agrupados durante um



período de 24 h numa gaiola. Através de tal procedimento, pretendeu-se criar uma situação de *stress* nos animais de modo possibilitar um aumento na libertação de cortisol, porque, de acordo com Brown e seus colegas (2000), após uma situação de *stress*, as células libertam corticotropina (CRH) para a hipófise, estimulando a secreção de ACTH na corrente sanguínea, que, por sua vez, atinge o córtex adrenal, onde se liga a receptores que estimulam a secreção de cortisol para a corrente sanguínea (Brown, 2000).

Após a experiência, analisou-se por *Western blot* a expressão da TTR no fígado, CP e CSF e, para todas as estruturas analisadas, os resultados observados, mostraram um inequívoco aumento da expressão de TTR nos animais submetidos ao *stress*, comparativamente com os controlos. Como foi descrito na secção anterior, para o fígado, os resultados obtidos mostraram que os animais sujeitos a *stress* tinham os seus valores de expressão de TTR aumentados em 113.6 %, sendo que esse aumento foi superior nos machos (172 %), comparativamente às fêmeas (43.2 %). No caso da análise da expressão da TTR no CP, a mesma encontrava-se aumentada em 124.2 %, sendo semelhante em machos e fêmeas. Por último, na análise do CSF, os resultados obtidos mostraram que houve um aumento de 34.7 % na expressão da TTR, e que esse aumento foi semelhante para ambos os sexos.

Estes resultados podem também justificar-se de acordo com estudos efectuados por outros autores, que indicaram que outros factores, como o sexo, podem ter um papel na regulação do cortisol, devido ao facto de machos e fêmeas diferirem na secreção de cortisol. O mesmo, defende que as diferenças observadas em relação aos níveis de expressão de TTR entre machos e fêmeas estão relacionadas com a própria hormona. Tal porque, ambos os sexos diferem na secreção de cortisol basal e de forma dependente do factor de *stress*, devido às diferenças existentes entre os sexos no ajuste das estruturas límbicas e frontais na secreção do cortisol. Assim, no sexo masculino ocorre uma forte desactivação do sistema límbico aquando de uma situação de *stress*, facto este não tão



pronunciado no sexo feminino (Stround *et al.* 2002). Também, estudos anteriores demonstraram que, existem diferenças entre sexos em relação ao eixo HPA e que, para além disso, a secreção inicial de ACTH em resposta ao *stress* é significativamente maior nos machos do que nas fêmeas (Roca *et al.* 2005). Recentemente, Bao e seus colaboradores (2008) identificaram diferenças na activação do eixo HPA sob condições de *stress* em adultos, sendo que esta se mostrou mais extensa nos machos que nas fêmeas. Segundo o autor, tal deve-se ao facto de nos machos haver um aumento significativo dos neurónios libertadores de ACTH que, conseqüentemente conduzem ao aumento da libertação de cortisol.

Assim, e de acordo com os resultados obtidos, pode referir-se que, a presença de uma situação de *stress* e conseqüente aumento dos níveis de cortisol provocaram o aumento da expressão da TTR, tendo esse aumento sido maior para os machos no fígado e CP e semelhante em ambos os sexos no CSF.

De acordo com outros autores o fenómeno reproduzido neste trabalho pode, de certa forma, relacionar-se com outros estudos já realizados, nomeadamente por Joo e seus colegas (2009). Este autor observou que, indivíduos sujeitos a *stress* crónico apresentavam uma diminuição da expressão da transtirretina tanto ao nível de mRNA como de proteína no córtex, mas não no CP, sugerindo assim que, a expressão de TTR fora do CP pode ser afectada por condições de *stress* (Joo *et al.* 2009). No entanto, através dos resultados obtidos, os níveis de TTR aumentaram em todas as estruturas testadas, nos animais submetidos ao *stress*. Assim, pode concluir-se que, contrariamente ao defendido por Joo e seus colaboradores (2009), a regulação da expressão da TTR pela acção do cortisol não ocorre apenas fora do CP mas também no seu interior. Tal observação pode ser corroborada ainda com um estudo desenvolvido por Sousa e seus colegas (2007) no qual se concluiu que a expressão de TTR no cérebro não ocorre no parênquima e, contrariamente ao anteriormente aceite, que indicava que a TTR era produzida apenas no CP e meninges (Dickson *et al.* 1986; Herbert *et*



al. 1986; Soprano *et al.* 1985 e Tang *et al.* 2004), ocorre também em outras regiões do cérebro como o córtex, a amígdala e no hipocampo (Carro *et al.* 2002; Stein *et al.* 2002; Puskas *et al.* 2003; Rho *et al.* 2005 e Sousa *et al.* 2007).

Importa no entanto referir que, o *stress* crónico acima referido não foi o reproduzido neste trabalho e, como tal, os resultados aqui descritos e discutidos poderiam ser distintos, caso se tratasse de um *stress* mais prolongado ou de maior intensidade.

Como já foi descrito nesta dissertação, no caso de se terem submetido os animais a um *stress* crónico, estariam envolvidas três fases: a primeira de mudança para adaptação à situação de *stress*, que leva ao aumento da produção de cortisol; a segunda de resistência que conduz à adaptação final ao *stress* e à manutenção de níveis elevados de cortisol e com melhoria ou desaparecimento de sintomas; e, a terceira de exaustão na qual o organismo se torna incapaz de se adaptar e perde a capacidade de secretar cortisol (Cohen *et al.* 1997). Neste caso em concreto, por se tratar de um *stress* pontual, esta cascata foi, provavelmente, apenas iniciada e, como tal, não se puderam observar os efeitos das fases seguintes, em concreto a redução dos níveis de expressão de TTR para restabelecimento da homeostasia do organismo (Dedovic *et al.* 2009). Por outro lado, pode estar-se apenas perante um *stress* de intensidade moderada ou baixa e, como tal, os efeitos nos níveis de cortisol possibilitaram o efeito contrário na expressão da TTR aos descritos por Joo e seus colaboradores (2009), apenas para o córtex cerebral (Joo *et al.* 2009).

Num contexto geral, sob condições basais (ausência de *stress*), o cortisol libertado liga-se preferencialmente aos receptores mineralocorticóides (MR), formando com eles um complexo e desencadeando uma cascata de sinalização, que tem um papel regulador na transcrição de certos genes. No entanto, numa situação de *stress*, a ACTH é estimulada pela CRH, levando a um aumento da secreção do cortisol. E, com os níveis de cortisol aumentados e, conseqüente preenchimento dos MR, a hormona ocupa gradualmente os receptores com os quais não possui tanta afinidade, os receptores de glucocorticóides formando



complexos estáveis com estas moléculas, que são posteriormente internalizados na célula, e aí transportados para o seu núcleo, regulando a transcrição de certos genes, quer seja a inibi-la quer seja a promovê-la. E, no caso da regulação da expressão da TTR por esta hormona, o cortisol tem um papel regulador positivo. No entanto, até ao momento o mecanismo preciso pelo qual esse aumento se dá não está ainda clarificado.

Globalmente, pode considerar-se que o cortisol tem um papel preponderante na regulação da expressão da TTR. Tal porque, nos estudos *in vivo* e nos *in vitro*, o aumento dos níveis de cortisol, quer por exposição dos animais a uma situação de *stress* quer através da estimulação directa com cortisol, levaram a aumentos bastantes significativos na expressão da proteína.

Nos últimos anos, alguns autores têm defendido que, pelo menos parcialmente, os efeitos neuroprotectores das hormonas esteróides na AD, se devem à sua regulação positiva, na expressão da TTR (Li *et al.* 2000 e Tang *et al.* 2004). Assim, apesar dos resultados não estarem directamente relacionados com a deposição de A β , são bastante promissores na medida em que o aumento da expressão da TTR observado pode conduzir a um aumento da captura de A β que, por sua vez, poderá, directa ou indirectamente, abrandar a progressão da AD. Neste sentido, estes resultados oferecem um importante ponto de partida para possíveis estudos nesta área.

6. Perspectivas futuras



O presente estudo que o cortisol regula a expressão da TTR. Contudo, estudos adicionais são requeridos de modo a completar e confirmar os resultados obtidos.

Futuramente, será importante efectuar os mesmos ensaios realizados no presente trabalho com culturas primárias de plexo coroídeo (CPEC's) (ensaios *in vitro*) de modo a confirmar os resultados apresentados. Ainda nos estudos *in vitro*, seria interessante realizar estudos de PCR em tempo real para analisar o efeito do cortisol na expressão do gene da TTR.

Relativamente aos estudos *in vivo*, seria conveniente delinear uma nova experiência na qual os animais sejam expostos, por um lado a outro tipo de *stress*, que poderia ser por exemplo químico, e, por outro, a um *stress* mais prolongado e, mais intenso. Tal seria importante na medida em que vários estudos indicam que a aplicação de um *stress* agudo intenso ou a exposição prolongada a um determinado *stress*, sem ser “agudo”, como o descrito no presente trabalho, podem ter efeitos. Ou seja, os aumentos verificados no presente trabalho poderão não coincidir com os obtidos no caso de animais sujeitos a um *stress* crónico, ou no caso de um *stress* mais intenso. Após a realização destes estudos, poderia, com ainda maior consistência, concluir-se acerca do papel que esta hormona tem na regulação da expressão da TTR.

Por último, posteriormente poderão realizar-se estudos nos quais seja avaliado não só o efeito desta hormona na regulação da expressão da TTR mas também das suas consequência em termos de agregação do A β , por quantificação, no cérebro dos animais, do A β solúvel, em modelos de AD.

7. Anexos

7.1 – Imagens de Imunocitoquímica adquiridas

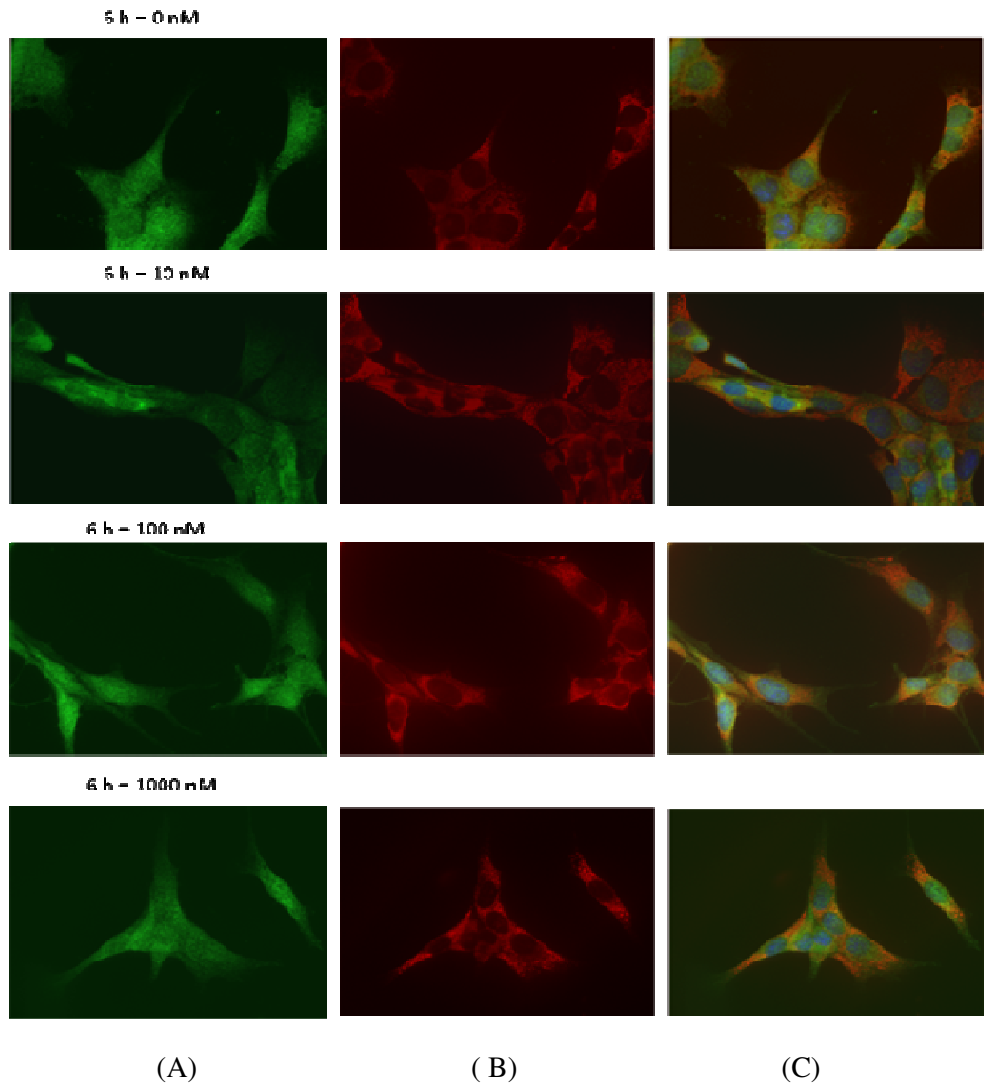


Figura 7.1: Imagem de fluorescência das RCP estimuladas com hidrocortisona durante 6h e com as concentrações de 0,10,10,1000 nM. (A) TTR (Alexa Fluor® 488) (B) Retículo endoplasmático (Alexa Fluor® 546) (C) Merge + núcleo (Hoescht 33342). Para a captura das imagens foi utilizada a objectiva com ampliação de 63x.

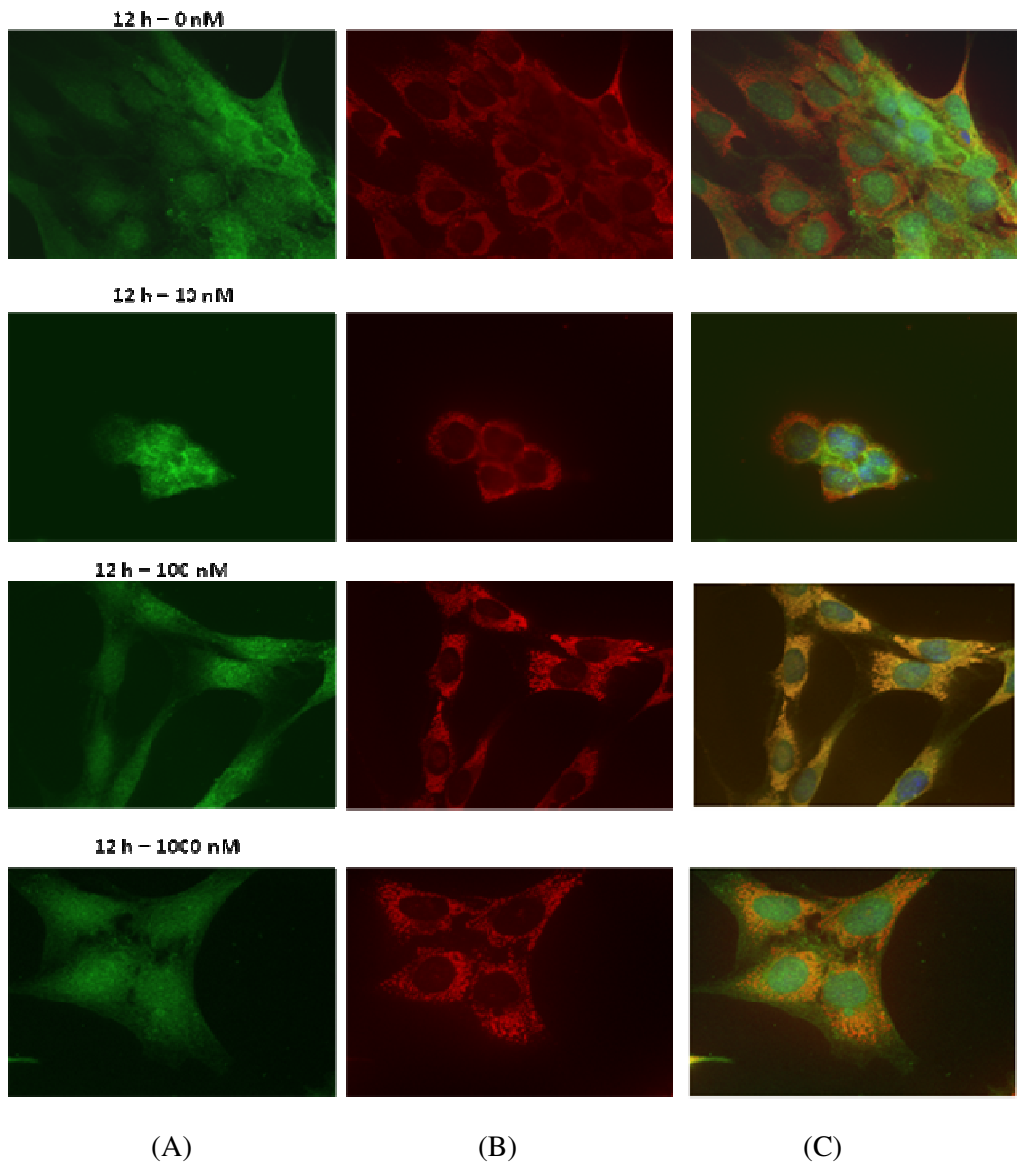


Figura 7.2: Imagem de fluorescência das RCP estimuladas com hidrocortisona durante 12h e com as concentrações de 0, 10,10,1000 nM. **(A)** TTR (Alexa Fluor® 488) **(B)** Retículo endoplasmático (Alexa Fluor® 546) **(C)** Merge + núcleo (Hoescht 33342). Para a captura das imagens foi utilizada a objectiva com ampliação de 63x.

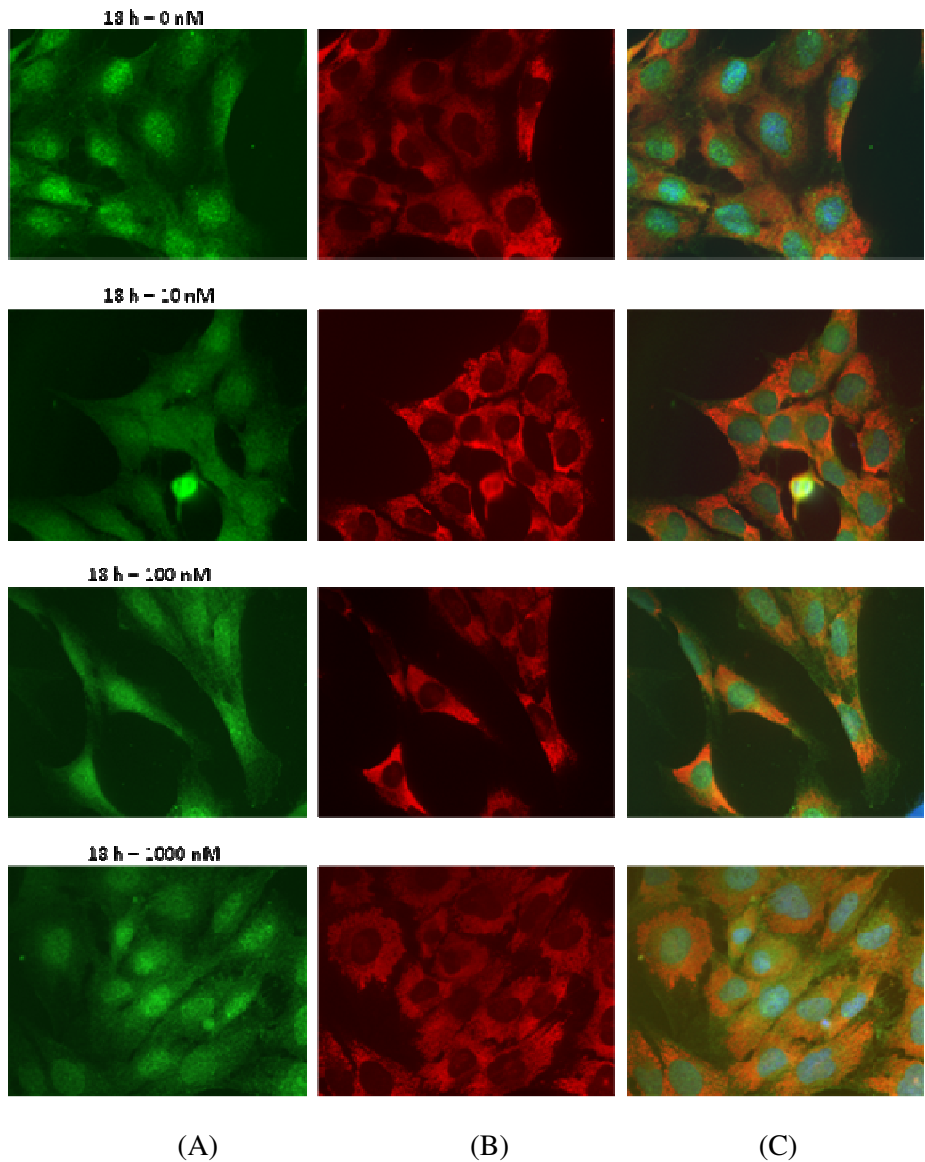


Figura 7.3: Imagem de fluorescência das RCP estimuladas com hidrocortisona durante 18h e com as concentrações de 0, 10, 10, 1000 nM. **(A)** TTR (Alexa Fluor® 488) **(B)** Retículo endoplasmático (Alexa Fluor® 546) **(C)** Merge + núcleo (Hoescht 33342) Para a captura das imagens foi utilizada a objectiva com ampliação de 63x.

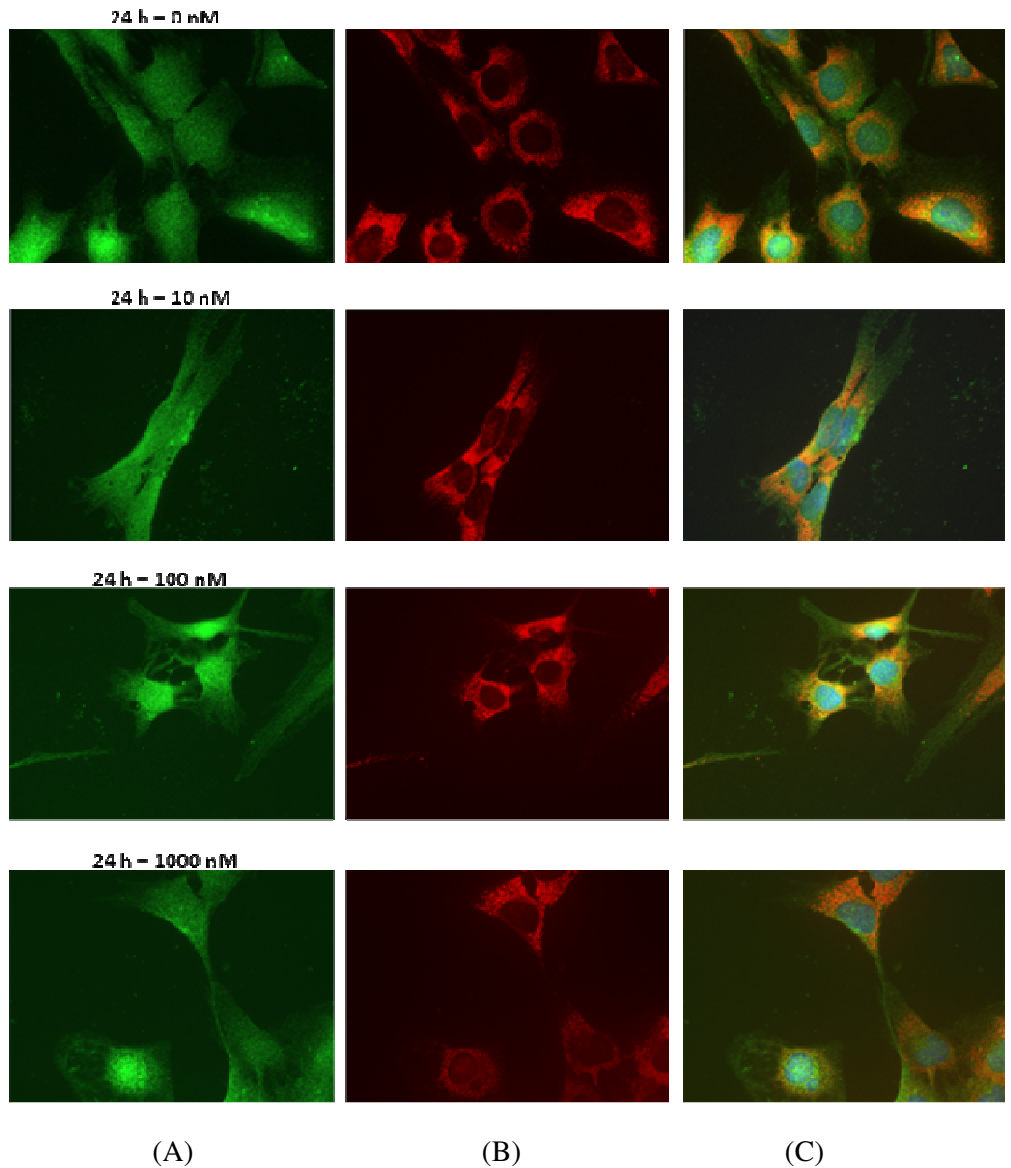


Figura 7.4: Imagem de fluorescência das RCP estimuladas com hidrocortisona durante 24h e com as concentrações de 0, 10,10,1000 nM. (A) TTR (Alexa Fluor® 488) (B) Retículo endoplasmático (Alexa Fluor® 546) (C) *Merge* + núcleo (Hoescht 33342). Para a captura das imagens foi utilizada a objectiva com ampliação de 63x.

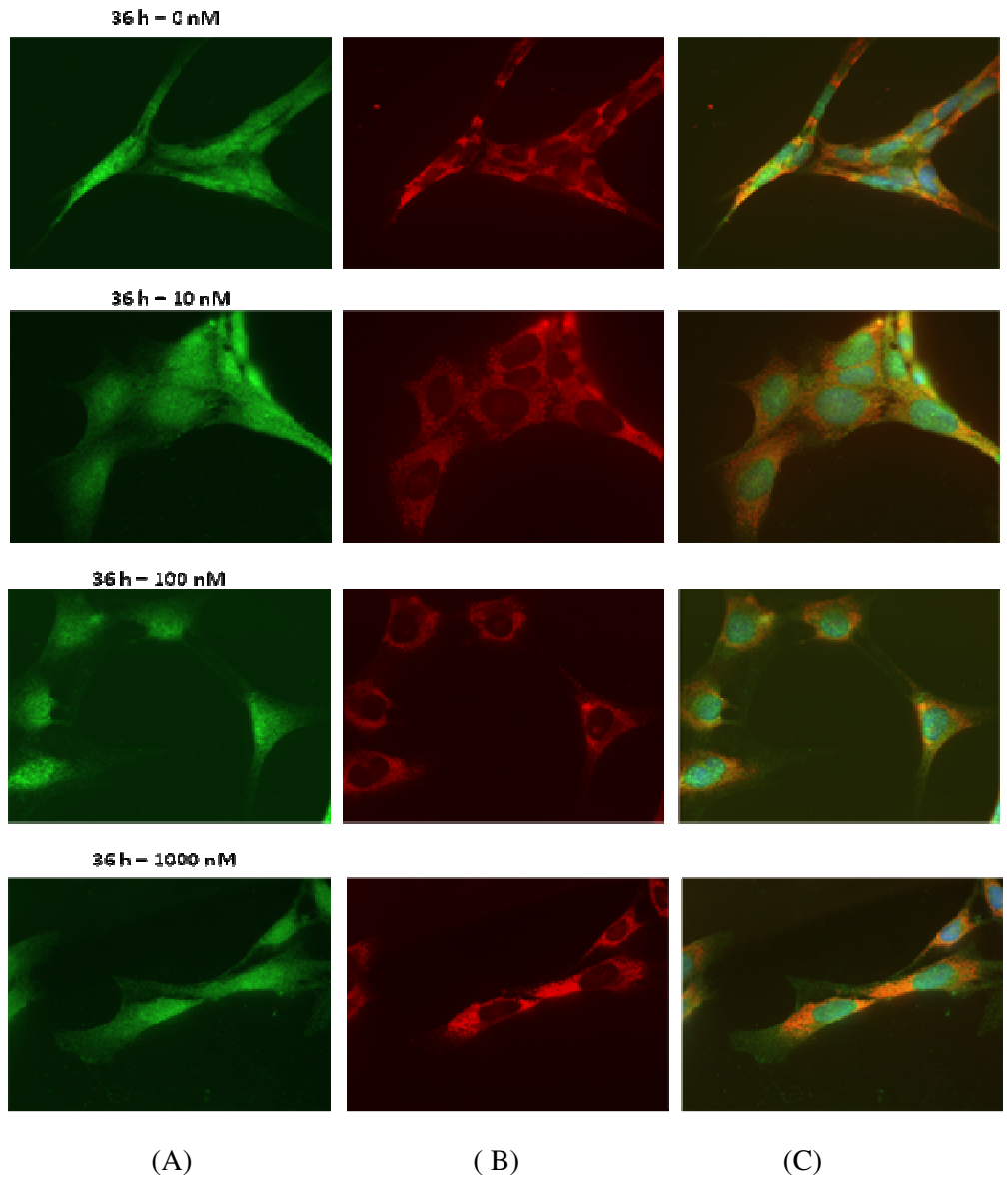


Figura 7.5: Imagem de fluorescência das RCP estimuladas com hidrocortisona durante 36h e com as concentrações de 0, 10,10,1000 nM. **(A)** TTR (Alexa Fluor® 488) **(B)** Retículo endoplasmático (Alexa Fluor® 546) **(C)** Merge + núcleo (Hoescht 33342). Para a captura das imagens foi utilizada a objectiva com ampliação de 63x.

10. REGULATION OF TRANSTHYRETIN IN THE CHOROID PLEXUS OF RATS BY CORTISOL

Veloso I.¹, Martinho A.¹, Gonçalves I.¹, Santos C.R.A.¹

¹ CICS – Centro de Investigação em Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal

Introduction: Transthyretin (TTR) has been associated to Alzheimer's disease (AD), a neurodegenerative disease, that is characterized by amyloid β ($A\beta$) fibril deposition, which TTR sequesters, preventing $A\beta$ aggregation [1].

Cortisol is a glucocorticoid hormone that has an important role in metabolism, especially in the central nervous system in which it is related to the *stress* [2]. Previous studies showed that the induction of a *stress* response was used with success to prevent some neurodegeneration [3]. In this context, we purposed to study the effects of cortisol in TTR expression in mice subjected to a populational *stress* and in a cell line of rat choroid plexus (RCP) treated with hydrocortisone.

Methods: Animals (n=30) were submitted to a population *stress* experiment, by joining them in a cage (n=9/each treated group). RCP cells were stimulated, in 5 time periods, with hydrocortisone (0, 10, 100, 1000 nM). TTR expression was analyzed by *Western blot*. Identical batches of experiments were carried out for immunocytochemistry analysis.

Results: The stimulation of RCP cells with hydrocortisone at 10, 100 and 1000 nM increased the expression levels of TTR after 12, 18 and 24 h incubations. This up regulation was more pronounced after 12 h using 100nM hydrocortisone. In the animal experiment TTR expression was increased in rats subjected to *stressful* conditions ($p < 0.001$), and it was more pronounced in males.

Conclusion: Cortisol has a role on TTR expression, increasing it. This increase is important because it could interfere with the metabolism of TTR in its neuroprotective action against AD.

[1] Sousa, J. *et al.* (2007). *Neurobiol Aging* 28(5): 713-718.

[2] Dedovic, K. *et al.* (2009). *NeuroImage* 47:864-871.

[3] Kieran D. *et al.* (2004). *Nat Med.* 10: 402-405.

Keywords: transthyretin, cortisol, choroid plexus, Alzheimer's disease

8. Referências bibliográficas



- Bao, A., M. G. Meynen, *et al.* (2008). "The stress system in depression and neurodegeneration: Focus on the human hypothalamus." Brain research 57:531-553.
- Bartels, M., M. Van Den Berg, *et al.* (2003). "Heritability of cortisol levels: review and simultaneous analysis of twin studies." Psychoneuroendocrinology 28(2):121-37.
- Blake, C. C., M. J. Geisow, *et al.* (1978). "Structure of prealbumin: secondary, tertiary and quaternary interactions determined by Fourier refinement at 1.8 Å." J Mol Biol 121(3): 339-356.
- Brook, C.G.D. and N.J. Marchall (2001). "Endocrinology". Blackwell Publishing (4th ed.). London.
- Buxbaum, J. N. and N. Reixach (2009). "Transthyretin: the servant of many masters." Cell Mol Life Sci 66(19): 3095-3101.
- Chang, M. H., C.T. Hua, *et al.* (2004). "Transthyretin interacts with the lysosome-associated membrane protein (LAMP-1) in circulation." J Biol Chem 382: 481-489.
- Carro E, JL Trejo, *et al.* (2002). "Serum insulin-like growth factor I regulates brain amyloid-beta levels." Nat Med 8(12):1390-7.
- Costa, R., F. Ferreira-da-Silva., *et al.* (2008a). "Transthyretin protects against A-beta peptide toxicity by proteolytic cleavage of the peptide: a mechanism sensitive to the Kunitz protease inhibitor." PLoS one 3, e2899.
- Costa, R., A. Gonçalves, *et al.* (2008b). "Transthyretin binding to A-beta peptide - impact on A-beta fibrillogenesis and toxicity." FEBS letters 582: 936-942.
- Dedovic, K., A. Duchesne, *et al.* (2009). "The brain and the stress axis: the neural correlates of cortisol regulation in response to stress." NeuroImage 47:864-871.



Dickson, P. W., A. R. Aldred, et al (1986). "Rat choroid plexus specializes in the synthesis and the secretion of transthyretin (prealbumin). Regulation of transthyretin synthesis in choroid plexus is independent from that in liver." J Biol Chem 261(8):3475-8.

Dickson, P. W., A. R. Aldred, *et al.* (1987). "Thyroxine transport in choroid plexus." J Biol Chem 262(29): 13907-13915.

Erickson, K., W. Drevets, *et al.* (2003). "Glucocorticoid regulation of diverse cognitive functions in normal and pathological emotional states." Neurosci Biobehav Rev 27(3):233-46.

Feldman, S., J. Weidenfeld, *et al.* (1995). "Neural mechanisms involved in the corticosteroid feedback effects on the hypothalmo-pituitary-adrenocortical axis." Prog. Neurobiol. 45: 129:141.

Fleming, C.E., M. J. Saraiva., and M. M. Sousa (2007). "Transthyretine enhances nerve regeneration ." Journal of neurochemistry 103:831-839.

Gardner, D.G. and D. Shoback (2007). "Grensplan's basic & clinical endocrinology". Mc Graw Hill Medical (8th ed.). London.

Goncalves, I., C. H. Alves, *et al.* (2008). "Transthyretin is up-regulated by sex hormones in mice liver." Mol Cell Biochem 317(1-2): 137-142.

Gonçalves, I., T. Quintela, et al (2008). " Transthyretin Interacts with Metallothionein 2." Biochemistry 47: 2244-2251

Herbert J., J.N. Wilcox, *et al.* (1986). "Transthyretin: a choroid plexus-specific transport protein in human brain." The S. Weir Mitchell award. Neurology 36(7):900-11.



Herman, P., H. Figueiredo, *et al.* (2003). "Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness." Neuroendocrinol. 24:151-180.

Hibberd, C., J. L. Yau, *et al.* (2000). "Glucocorticoids and the ageing hippocampus." J Anat 197 Pt 4: 553-562.

Hurshman, A. R., J. T. White, *et al.* (2004). "Transthyretin aggregation under partially denaturing conditions is a downhill polymerization." Biochemistry 43:7365-7381.

Ingbar, S. H. (1958). "Pre-albumin: a thyroxinebinding protein of human plasma." Endocrinology 63(2): 256-259.

Joo Y., K. M. Choi, *et al.* (2009). "Chronic immobilization stress induces anxiety- and depression-like behaviors and decreases transthyretin in the mouse cortex." Neuroscience Letters 461: 121-125

Kabat, E. A., H. Landow, *et al.* (1942). "Electrophoretic patterns of concentrated cerebrospinal fluid." Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 49(2): 260-263.

Kabat, E. A., D. H. Moore, *et al.* (1942). "An Electrophoretic Study of the Protein Components in Cerebrospinal Fluid and Their Relationship to the Serum Proteins." J Clin Invest 21(5): 571-577.

Kieran, D., B. Kalmar, *et al.* (2004). "Treatment with arimoclomol, a coinducer of heat shock proteins, delays disease progression in ALS mice." Natural Medicine 10(4): 402-405.

Kloet, E.R. (2003). "Hormones, brain and stress." Endocr Regul 37(2):51-68.



Kloet, E.R., C. P. Fitzsimons, *et al.* (2009). "Glucocorticoid signaling and stress-related limbic susceptibility pathway: About receptors, transcription machinery and microRNA." Brain research 1293: 129-141.

Koehrlé J., M. Spanka, *et al.* (1988). "Flavonoid effects on transport, metabolism and action of thyroid hormones." In *Plant Flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical, Cellular and Medicinal Properties* (Cody V, Harborne JB & Beretz A ed.), pp 323–340. Alan R Liss, New York.

Kohda, K., S. Jinde, *et al.* (2006). "Maternal separation stress drastically decreases expression of transthyretin in the brains of adult rat offspring. " the international journal of neuropsychopharmacology/ official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP) 9:201-208.

Li M.D., J.K. Kane, S.G. Matta, *et al.* (2000). "Nicotine enhances the biosynthesis and secretion of transthyretin from the choroid plexus in rats: implications for beta-amyloid formation". J Neurosci. 20:1318–23.

Liz M.A., Faro C. J., M. J. Saraiva and M. M Sousa. (2004). " Transthyretin, a new cryptic protease." J Biol Chem 79:21431–21438.

Merched, A., J.M. Serot, *et al.* (1998). "Apolipoprotein E, transthyretin and actin in the CSF of Alzheimer`s patients: relation with the senile plaques and cytoskeleton biochemistry." FEBS letters 425:225-228.

Monaco, H. L., M. Rizzi, *et al.* (1995). "Structure of a complex of two plasma proteins: transthyretin and retinol-binding protein." Science 268, 1039-1041

Palha, J. A., M. T. Hays, *et al.* (1997). "Transthyretin is not essential for thyroxine to reach the brain and other tissues in transthyretin-null mice." Am J Physiol 272(3 Pt 1): E485-493.



Palha, J. A., J. Nissanov, *et al.* (2002). "Thyroid hormone distribution in the mouse brain: the role of transthyretin." Neuroscience 113(4): 837-847.

Puskas, L.G., K. Nyakas, *et al.* (2003). "Short-term administration of omega 3 fatty acids from fish oil results in increased transthyretin transcription in old rat hippocamps." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100:1580-1585.

Quintela, T., C. H. Alves, *et al.* (2008). "5 Alpha-dihydrotestosterone up-regulates transthyretin levels in mice and rat choroid plexus via an androgen receptor independent pathway." Brain Res 1229: 18-26.

Quintela, T., I. Goncalves, *et al.* (2009). "17 beta-estradiol induces transthyretin expression in murine choroid plexus via an oestrogen receptor dependent pathway." Cell Mol Neurobiol 29(4): 475-483.

Raz, A. and D. S. Goodman (1969). "The interaction of thyroxine with human plasma prealbumin and with the prealbumin-retinol-binding protein complex." J Biol Chem 244(12): 3230-3237.

Redzic, Z. B. and M. B. Segal (2004). "The structure of the choroid plexus and the physiology of the choroid plexus epithelium." Adv Drug Deliv Rev 56(12): 1695-1716.

Reixach, N., S. Deechongkit, *et al.* (2004). "Tissue damage in the amyloidoses: transthyretin monomers and non-native oligomers are the major cytotoxic species in tissue culture." Proc Natl Acad Sci USA 101: 2817-2822.

Rho S., M. Kang, *et al.* (2005). "Effects of Yukmijihwang-tang derivatives (YMJd), a memory enhancing herbal extract, on the gene-expression profile in the rat hippocampus." Biol Pharm Bull 28(1):87-93.

Richardson, S. J. (2007). "Cell and molecular biology of transthyretin and thyroid hormones." Int Rev Cytol 258: 137-193.



Richardson, S. J. (2009). "Evolutionary changes to transthyretin: evolution of transthyretin biosynthesis." Febs Journal 276(19): 5342-5356.

Roca, C.A., P.J. Schmidt, *et al.* (2005). "Sex-related differences in stimulated hypothalamic–pituitary–adrenal axis during induced gonadalsuppression." J. Clin. Endocrinol.Metab. 90:4224-4231.

Schreiber, G. (2002). "The evolutionary and integrative roles of transthyretin in thyroid hormone homeostasis." J Endocrinol 175(1): 61-73.

Schwarzman A. L. and D. Goldgaber (1996). "Interaction of transthyretin with amyloid beta-protein: binding and inhibition of amyloid formation." Ciba Found Symp **199**: 146-160.

Seibert, F. B. and J. W. Nelson (1942). "Electrophoretic study of the blood protein response in tuberculosis." Journal of Biological Chemistry 143(1): 29-38.

Shelby, J. and L. Kathryn (2001). "Stress and Disease". In S. Huether & K. McCance (Eds.), Pathophysiology: The biologic basis for disease in adults and children (4th ed., pp. 272-289). St. Louis: C.V. Mosby.

Soprano D. R., J. Herbert, *et al.* (1985). " Demonstration of transthyretin mRNA in the brain and other extrahepatic tissues in the rat." J Biol Chem 260(21):11793–8.

Sousa, J. C., I. Cardoso, *et al.* (2007). "Transthyretin and Alzheimer's disease: where in the brain?" Neurobiol Aging 28(5): 713-718.

Stein T. D., J. A. Johnson, *et al.* (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." J Neurosci 22(17):7380–8.

Stein T. D., N. J. Johnson, *et al.* (2004). "Neutralization of transthyretin reverses the neuroprotective effects of secreted amyloid precursor protein (APP) in APPSW mice



resulting in tau phosphorylation and loss of hippocampal neurons: support for the amyloid hypothesis." J. Neurosci **24**: 7707-7717.

Stroud, L. R., P. Salovey, *et al.* (2002). "Sex differences in stress responses: social rejection versus achievement stress." Biol. Psychiatry **56**:640-650.

Tang Y. P., S. Z. Haslam, Conrad SE, Sisk CL. Estrogen increases brain expression of the mRNA encoding transthyretin, an amyloid beta scavenger protein. J Alzheimers Dis **2004**;6(4):413–20.

Tsuzuki, T., S. Mita, *et al.* (1985). "Structure of the human prealbumin gene." J Biol Chem **260**(22): 12224-12227.

Watanabe, C.M., S. Wolfram, *et al.* (2001). "The in vivo neuromodulatory effects of the herbal medicine ginkgo biloba." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**:6577-6580.

Wei, S., V. Episkopou, *et al.* (1995). "Studies on the metabolism of retinol and retinol-binding protein in transthyretin-deficient mice produced by homologous recombination." J Biol Chem **270**(2): 866-870.

Wilkinson-White, L. E. and S.B. Easterbrook-Smith (2007). "Characterization of the binding of Cu (II) and Zn (II) to transthyretin: effects on amyloid formation." Biochemistry **46**: 9132-9132.

Vasak M. (2005). "Advances in metallothionein structure and functions." J. Trace Elem Med Biol **19**: 13-17.