

UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR



Tese de Mestrado em Bioquímica

Estudo da Expressão da Transtirretina (TTR)
no Cérebro de Ratinho



Centro de Investigação em Ciências da Saúde
Health Sciences Research Centre

César Fernando de Bessa Martins

Covilhã, 2008

Estudo da Expressão da Transtirretina (TTR) no Cérebro de Ratinho

Study of the Transthyretin (TTR) Expression in Mice Brain

Tese de Mestrado em Bioquímica

César Fernando de Bessa Martins

Este projecto foi desenvolvido na Universidade da Beira Interior, no Centro de Investigação em Ciências da Saúde (CICS) durante o ano lectivo 2007/2008.

Orientação técnica e científica: Prof.^a Dr.^a Cecília Santos.

Co-orientação: Prof.^a Dr.^a Graça Baltazar.



Universidade da Beira Interior

O conteúdo desta tese é da exclusiva responsabilidade do autor,

(César Fernando de Bessa Martins)

Índice

Agradecimentos	V
Resumo	VI
Abstract	VII
Lista de Abreviaturas	VIII
1 - Introdução Geral	1
1.1 - Organização Estrutural do Sistema Nervoso Central	2
1.1.1 - Estrutura e Fisiologia do Plexo Coroideu	7
1.2 - Transtirretina - Evolução e Propriedades Moleculares e Biológicas ...	9
1.2.1 - Evolução da Estrutura da Transtirretina.....	10
1.2.2 - Organização Estrutural da Transtirretina	11
1.2.2.1 - Gene da Transtirretina	11
1.2.2.2 - Estrutura do mRNA	12
1.2.2.3 - Estrutura Molecular	12
1.2.3 - Funções Biológicas da Transtirretina	14
1.2.3.1 - Transporte das Hormonas da Tiróide	14
1.2.3.2 - Transporte do Retinol	15
1.2.3.3 - Outras Funções	17
1.2.3.3.1 - TTR e a Doença de Alzheimer	17
1.2.4 - Síntese e Expressão da Transtirretina	19
1.2.4.1 - Fígado e Plexo Coroideu	19
1.2.4.2 - Outros Tecidos	21
1.3 - Objectivos	22
2 - Material e Métodos	23
2.1 - Animais	23
2.2 - Amostras	23
2.3 - Hibridação <i>In Situ</i>	25
2.3.1 - Procedimento para a Síntese de Ribossondas	29
2.3.2 - Procedimento para a Hibridação <i>In Situ</i>	31
2.4 - Imunohistoquímica	34
2.4.1 - Procedimento para a Imunohistoquímica.....	40
2.5 - Coloração por Hematoxilina e Eosina	43

2.5.1 - Procedimento para a Coloração por Hematoxilina e Eosina	43
3 - Resultados	44
3.1 - Organização dos Cortes Histológicos	44
3.2 - Expressão do mRNA da Transtirretina em Várias Regiões do Sistema Nervoso Central	45
3.3 - Localização da Transtirretina no Encéfalo	56
4 - Discussão	59
5 - Conclusões.....	65
6 - Perspectivas Futuras	66
7 - Referências Bibliográficas.....	67
8 - Anexos	
Apêndice A	A1
Apêndice B	B1
Apêndice C	C1

Agradecimentos

Em primeiro lugar, um agradecimento muito especial aos meus pais pelo seu apoio incondicional, por estarem sempre disponíveis quando precisei e por toda a amizade e carinho. Estão sempre no meu coração.

Para a minha avó Margarida, muito obrigado por todo o amor e carinho que sempre me deu. Deixo também os meus agradecimentos à minha família, especialmente à Adriana e ao Carlos pelo apoio e principalmente pela amizade.

A todos os que ajudaram a tornar este projecto uma realidade, particularmente à Prof^a Doutora Cecília Santos e à Prof^a Doutora Graça Baltazar, os meus sinceros agradecimentos, por toda a orientação e apoio que disponibilizaram para a elaboração desta tese.

Não me posso esquecer de todos os colegas e amigos de laboratório por todos os bons momentos passados em conjunto e por me ajudarem a ultrapassar todos os obstáculos que fui enfrentando ao longo do projecto.

As nossas vitórias e sucessos só fazem sentido se tivermos alguém com quem os partilhar, por isso agradeço a todos os meus verdadeiros amigos, com quem tive o prazer de conviver durante estes últimos anos, especialmente ao Bruno Marques, João Gonçalves, Tiago Abrantes, Joana Pina, Sara Carina, Tiago Matos, Catherine Nunes, Ângela Sousa, Filomena Silva e Joana Tomás, pela sua amizade, apoio e tantas histórias que irão para sempre perdurar na minha memória.

Quero também deixar um abraço especial aos meus companheiros de residência (Mansão 59): Bin Laden Jr, Mário Gomes, Sérgio Martins, Ricardo Jardim e Bruno Horta, com os quais partilhei alegrias e tristezas, e me fizeram sempre ver o lado positivo da vida. Obrigado pelas boas recordações e momentos vividos.

Um agradecimento muito especial para a minha “*pequenina*”, Cátia Lopes, por me ter aturado ao longo deste último ano, pelo apoio que sempre me deu e por tudo o que partilhamos em conjunto.

Por último, não me posso esquecer da menina dos meus olhos, a Lia, que ilumina a minha vida com a sua alegria.

Uma palavra ainda para a cidade da Covilhã, da qual aprendi a gostar e hoje considero a minha segunda casa.

Resumo

A transtirretina (TTR) é uma proteína tetramérica, que está presente no plasma e líquido cefalorraquidiano (LCR) de vertebrados.

As suas principais funções biológicas conhecidas englobam o transporte da tiroxina (T4) e do retinol (vitamina A) através da formação de um complexo com a proteína de ligação ao retinol (RBP). Adicionalmente, tem sido demonstrado que a TTR é capaz de ligar e sequestrar o péptido beta amilóide (A-Beta), enfraquecendo a sua deposição nos tecidos nervosos, uma característica chave da doença de Alzheimer (AD). Assim, tem sido sugerido um papel protector desta proteína contra o desenvolvimento da AD, suportado por estudos que indicam uma correlação negativa entre os níveis da TTR no LCR e o grau de severidade desta doença neurodegenerativa.

O fígado e os plexos coroídeos do cérebro estão bem documentados como os principais locais de síntese da TTR, mas recentemente têm surgido evidências que apontam para a expressão desta proteína noutras regiões do cérebro, suscitando alguma controvérsia.

Numa tentativa de contribuir para a resolução desta controvérsia foram realizadas experiências de hibridação *in situ* (ISH) e imunohistoquímica (IHC) num cérebro de ratinho *wild-type* previamente seriado, de forma a caracterizar a distribuição celular da TTR neste órgão.

Os resultados obtidos indicam que para além de uma intensa marcação nas células epiteliais do PC, como esperado, o mRNA da TTR está igualmente presente em regiões específicas do parênquima cerebral, como o cerebelo e o bolbo raquidiano, com possíveis implicações nas propriedades desta proteína no cérebro.

Palavras-Chave: Transtirretina, Cérebro, Plexo Coroídeu, Expressão, Doença de Alzheimer.

Abstract

Transthyretin (TTR) is a tetrameric protein which exists in the serum and cerebrospinal fluid (CSF) of vertebrates.

It's main biological known functions comprise the transport of tyroxine (T4) and retinol (vitamin A) through the formation of a complex with the retinol binding protein (RBP). Additionally, it has been shown that TTR is capable to bind and sequester beta amyloid peptide (A-Beta), weakening it's deposition in nervous tissues, a key feature of Alzheimer's disease (AD). Consequently, it has been suggested a protective role for this protein against the development of AD, supported by reports that indicate a negative correlation between the levels of TTR in the CSF and the severity degree of this neurodegenerative disease.

The liver and the brain choroid plexus (CP) are well documented as the major sites of TTR synthesis, however recently, evidence has emerged that aim to an expression of this protein in others regions of the brain, prompting some controversy.

In an attempt to contribute to the resolution of this controversy, *in situ* hybridization (ISH) and imunohistochemical (IHC) investigations were performed in *wild-type* mice brain, previously serialized, in order to characterize the cellular distribution of TTR in this organ.

The acquired data indicates that besides an intense staining in the PC epithelial cells, as expected, the mRNA of TTR is also present in specific regions of the cerebral parenchyma, such as the cerebellum and rachidian bulb, with possible implications on the properties of this protein in the brain.

Keywords: Transthyretin, Brain, Choroid Plexus, Expression, Alzheimer's Disease.

Lista de Abreviaturas

- ✚ A-Beta - Péptido beta amilóide;
- ✚ AD - Doença de Alzheimer;
- ✚ BSA - Albumina de soro bovino;
- ✚ cDNA - Ácido desoxirribonucleico complementar;
- ✚ DEPC - Dietilpirocarbonato;
- ✚ DIG - Digoxigenina;
- ✚ DNA - Ácido desoxirribonucleico;
- ✚ DNase - Desoxirribonuclease;
- ✚ dNTP's - Desoxirribonucleotídeos fosfatados;
- ✚ EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético;
- ✚ H/E - Hematoxilina e eosina;
- ✚ IHC - Imunohistoquímica;
- ✚ ISH - Hibridação *in situ*;
- ✚ kDa - KiloDaltons;
- ✚ LCR - Líquido cefalorraquidiano;
- ✚ mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro;
- ✚ PBS - Tampão fosfato-salino;
- ✚ PBS-T - Tampão fosfato salino com Tween-20;
- ✚ PC - Plexo coroideu;
- ✚ PFA - Paraformaldeído;
- ✚ RBP - Proteína de ligação ao retinol;
- ✚ RNA - Ácido ribonucleico;
- ✚ RNases - Ribonucleases;
- ✚ SNC - Sistema nervoso central;
- ✚ SSC - Tampão citrato de sódio-salino;
- ✚ T3 - 3,5,3'-triodotironina;
- ✚ T4 - Tiroxina (3,5,3',5'-tetraiodotironina);
- ✚ TAE - Tampão tris-acetato-EDTA;
- ✚ TBG - Globulina de ligação à tiroxina;
- ✚ TBS - Tampão tris-salino;
- ✚ TH - Hormonas da tiróide;
- ✚ TTR - Transtirretina.



1. INTRODUÇÃO

1 - Introdução Geral

A transtirretina (TTR) é uma proteína homotetramérica com 55 kDa, composta por 4 subunidades idênticas de 127 aminoácidos cada (Blake *et al.*, 1978a), presente no soro e líquido cefalorraquidiano (LCR) de vertebrados.

Inicialmente foi designada de componente X (Gavrillesco *et al.*, 1955) e depois pré-albumina, devido à sua capacidade de migrar mais rápido que a albumina em electroforese em gel de proteínas séricas (Ingbar, 1958). Mais tarde chegou-se a um compromisso designando-a, *transtirretina* (Nomenclature Committee of IUB, 1981).

Esta designação reflecte a duplicidade de papéis fisiológicos desta proteína (Ingenbleek e Young, 1994). As suas principais funções biológicas conhecidas englobam a ligação, transporte e distribuição das hormonas da tiróide (TH), a 3,5,3'-triodotironina (T3) e a 3,5,3',5'-tetraiodotironina (tiroxina, T4) (Hamilton e Benson, 2001), e indirectamente da vitamina A (retinol) através de um complexo macromolecular com a proteína de ligação ao retinol (RBP) (Monaco *et al.*, 1995).

A TTR é sintetizada e secretada principalmente pelo fígado para a circulação sistémica (Felding e Fex, 1982) e pelo plexo coroideu (PC) para o LCR (Soprano *et al.*, 1985; Herbert *et al.*, 1986). Estes tecidos constituem as principais fontes documentadas da TTR.

Adicionalmente, a TTR é uma das mais de 20 proteínas humanas que se podem dissociar em monómeros amiloidogénicos (Mitsuhashi *et al.*, 2005) com baixa estabilidade conformacional (Quintas *et al.*, 2001). Até à data, foram identificadas mais de 100 mutações pontuais diferentes na sequência do gene da TTR em humanos (Connors *et al.*, 2003) que aumentam a susceptibilidade da proteína à formação de estruturas fibrilares insolúveis denominadas de amilóide (Bonifácio *et al.*, 1996). As variantes da TTR resultam na sua maioria em patologias humanas, como a cardiomiopatia amilóide hereditária (Jacobson *et al.*, 1997), a amiloidose sistémica senil (Westermarck *et al.*, 1990) e a paramiloidose familiar (Sousa *et al.*, 1995). Destas, a mais comum é a paramiloidose familiar, uma doença neurodegenerativa (Saraiva, 2001), caracterizada pela deposição extracelular de material fibrilar insolúvel contendo a TTR, em vários órgãos e tecidos ao longo do organismo (Saraiva, 2002), particularmente no sistema nervoso periférico (SNP) (Andrade, 1952; Coimbra e Andrade, 1971).

Para além destas características, a TTR tem a capacidade de se ligar ao péptido beta amilóide (A-Beta) (Schwarzman *et al.*, 1994; Golabek *et al.*, 1995; Costa *et al.*, 2008). Assim, tem sido sugerido um papel protector para a TTR contra a deposição do

A-Beta, que constitui uma característica patológica chave na doença de Alzheimer (AD) (Hardy e Higgins, 1992).

A suportar esta hipótese estão os níveis reduzidos de TTR encontrados no LCR de pacientes com AD (Riisøen, 1988; Serot *et al.*, 1997), assim como estudos em modelos de ratos com AD que apresentaram uma expressão alterada da TTR no córtex e hipocampo (Puskas *et al.*, 2003).

Desta forma, e apesar das caracterizações iniciais da distribuição da TTR terem revelado o PC como o único local de síntese da TTR no cérebro (Sousa *et al.*, 2007), permanece uma grande controvérsia sobre os locais exactos de síntese da proteína dentro do cérebro, que por sua vez poderão influenciar as suas propriedades protectoras de sequestração do A-Beta, e consequentemente a progressão da AD.

1.1 - Organização Estrutural do Sistema Nervoso Central

O sistema nervoso central (SNC) é composto pelo cérebro e medula espinal, e estes são constituídos por uma rede intercomunicadora de células especializadas denominadas neurónios, células de suporte do SNC (células gliais) e vasos sanguíneos. Macroscopicamente, todas as partes do SNC são constituídas por áreas de massa cinzenta e massa branca. A cinzenta contém a maioria dos corpos celulares dos neurónios e a branca os axónios, cujos lípidos da mielina são os responsáveis pela sua aparência branca. O tecido nervoso central é composto de um vasto número de neurónios e está embutido numa massa de células de suporte, conhecida como *neuroglia*, que compreende todas as células não-neuronais do SNC. São reconhecidos 4 tipos de neuroglia: oligodendrócitos, astrócitos, microglia e células endoteliais (Young e Heath, 2000).

O cérebro e a medula espinal estão investidos por 3 camadas de tecido de suporte denominado colectivamente de meninges. A superfície do tecido nervoso está coberta por uma delicada camada, a *pia-máter*. Por cima desta está uma camada fibrosa mais densa, a *aracnoideia-máter*. Em função da sua estrutura contínua, estas duas camadas são frequentemente consideradas como uma única unidade denominada de *leptomeninges*. Entre elas encontra-se o espaço subaracnoideu. Externa à *aracnoideia-máter* está uma camada fibro-elástica compacta conhecida por *dura-mater* (Young e Heath, 2000).

Anatomicamente, o cérebro é constituído por 3 partes principais: prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo. O prosencéfalo divide-se em duas metades, os hemisférios cerebrais esquerdo e direito (Figura 1.1; Abrahams, 2002).

Os hemisférios cerebrais constituem a maior porção do prosencéfalo. A sua superfície externa enruga-se numa série de circunvalações e sulcos que aumentam muito a sua área. Grande parte da superfície de cada hemisfério está oculta no interior dos sulcos (Abrahams, 2002).

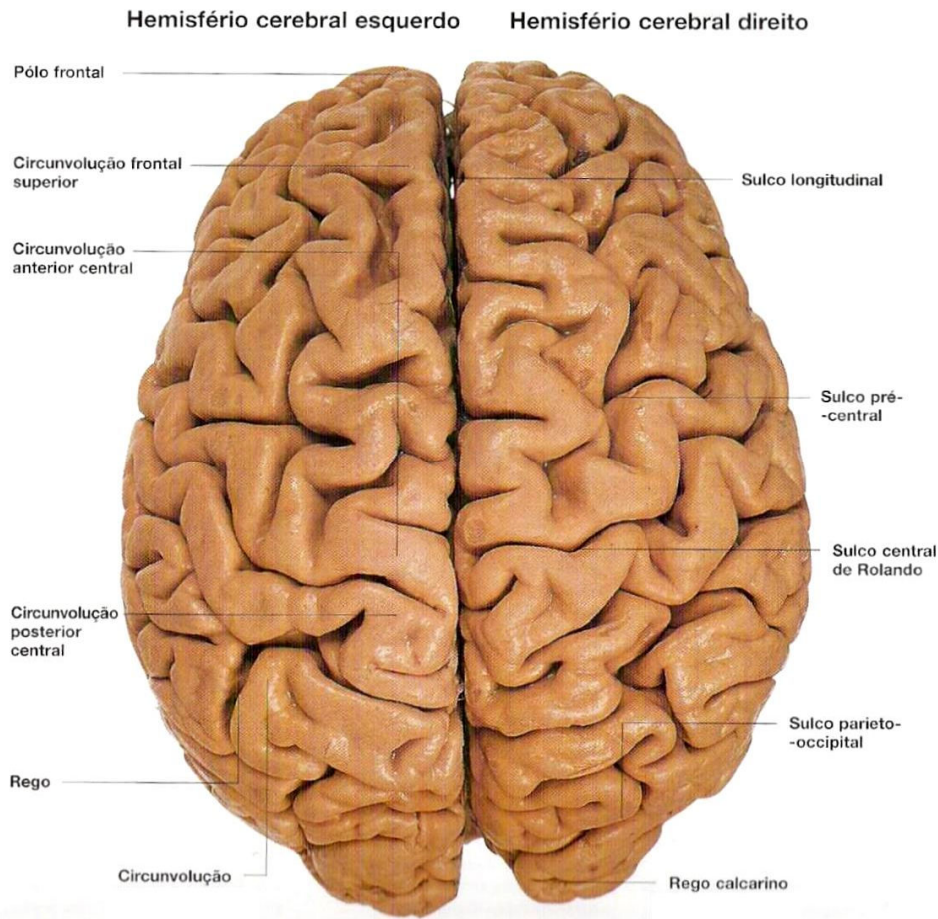


Figura 1.1 - Representação dos dois hemisférios cerebrais. Adaptado de: Abrahams, 2002.

Cada hemisfério divide-se nos lóbulos frontal, parietal, occipital e temporal, designados relativamente aos ossos contíguos do crânio. A ligar os dois hemisférios está o corpo caloso, um espesso feixe de fibras no fundo da fissura longitudinal (Abrahams, 2002).

Um corte longitudinal entre os dois hemisférios revela as suas principais estruturas (Figura 1.2) que controlam uma grande quantidade de actividades corporais. Enquanto determinadas zonas vigiam a informação sensorial e motora, outras controlam a fala e o sono (Abrahams, 2002).

A parte medial do prosencéfalo inclui as estruturas que rodeiam o terceiro ventrículo. Estas formam o diencéfalo que inclui o tálamo, o hipotálamo, o epitálamo e o subtálamo de cada lado. O tálamo é a última estação retransmissora da informação do tronco cerebral e da medula espinal antes desta alcançar o córtex. O

hipotálamo situa-se sob o tálamo, na base do diencéfalo e intervém numa variedade de mecanismos homeostáticos (Abrahams, 2002).

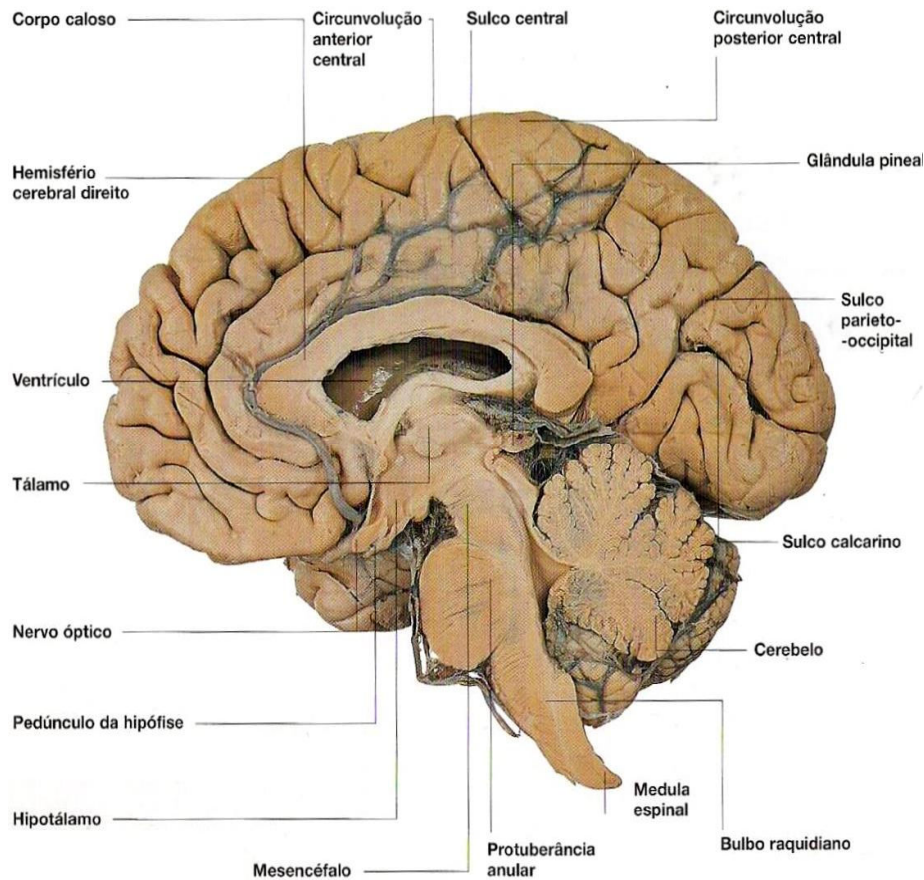


Figura 1.2 - Corte longitudinal entre os dois hemisférios cerebrais.

Adaptado de: Abrahams, 2002.

O lóbulo anterior da hipófise segrega substâncias que influenciam as glândulas tiróide e supra-renais, bem como as gónadas, e produz factores de crescimento. O lóbulo posterior produz hormonas que aumentam a tensão arterial, reduzem a produção de urina e provocam a contracção uterina. O hipotálamo influencia também os sistemas nervosos simpático e parassimpático e controla a temperatura do corpo, o apetite e o estado de vigília. O epitélamo é uma parte relativamente pequena do diencéfalo dorso-caudal que inclui a glândula pineal, a qual sintetiza a melatonina e intervém no controlo do ciclo sono/vigília (Abrahams, 2002).

Ventrículos Cerebrais

O cérebro “flutua” numa camada protectora de LCR que é um fluido aquoso produzido num sistema de cavidades do cérebro e do tronco cerebral. As cavidades comunicantes que constituem este sistema são denominadas de ventrículos. Existem 4 ventrículos no interior do cérebro e do tronco cerebral, segregando cada um LCR,

que circunda e atravessa o cérebro e a medula espinal, protegendo-os de lesões e infecções (Abrahams, 2002).

Três dos ventrículos, nomeadamente os dois ventrículos laterais (emparelhados) e o terceiro ventrículo, situam-se no prosencéfalo. Os ventrículos laterais são os maiores e residem em cada um dos hemisférios cerebrais. Cada um deles é constituído por um “corpo” e 3 “cornos” - anterior (situado no lóbulo frontal), posterior (lóbulo occipital) e inferior (lóbulo temporal) (Figura 1.3). O terceiro ventrículo é uma cavidade estreita entre o tálamo e o hipotálamo. O quarto ventrículo situa-se no rombencéfalo, junto do cerebelo. Quando visto de cima, tem forma de diamante, mas em corte sagital é triangular. A cobertura do quarto ventrículo é incompleta, permitindo-lhe comunicar com o espaço subaracnoideu (Abrahams, 2002).

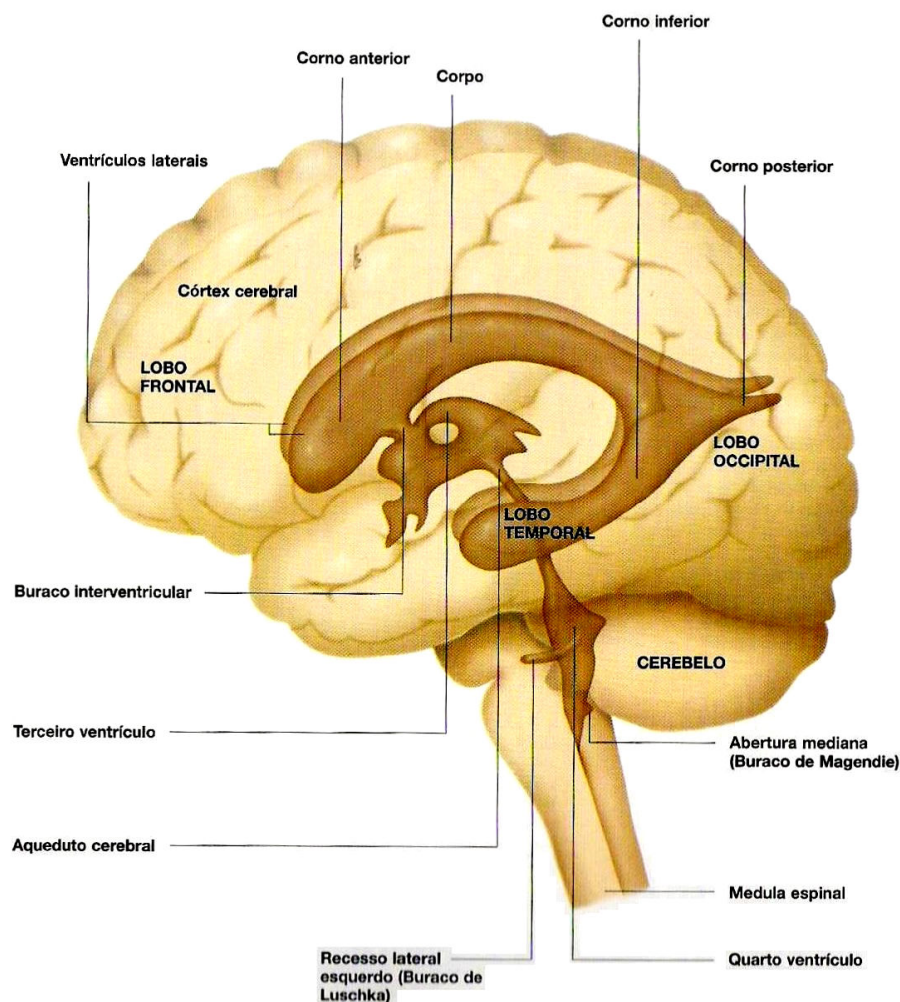


Figura 1.3 - Secção sagital do cérebro e do tronco cerebral, representando os 4 ventrículos e as ligações entre eles. **Adaptado de:** Abrahams, 2002.

No interior de cada ventrículo existe uma rede de vasos sanguíneos designada por PC. O LCR é produzido pelo PC, enche os ventrículos e também o espaço

subaracnoideu que circunda o cérebro e a medula espinal, onde actua como um tampão protector. A partir dos plexos coroideus dos dois ventrículos laterais, o LCR passa para o terceiro ventrículo através da passagem interventricular. O LCR passa então através do aqueduto cerebral do mesencéfalo para o quarto ventrículo, cujo PC também produz LCR adicional. Do quarto ventrículo, o LCR passa finalmente para o espaço subaracnoideu que rodeia o cérebro através de aberturas no quarto ventrículo - uma abertura mediana (buraco de Magendie) e duas laterais (buracos de Luschka). Uma vez no espaço subaracnoideu, o LCR circula para envolver o SNC (Figura 1.4; Abrahams, 2002).

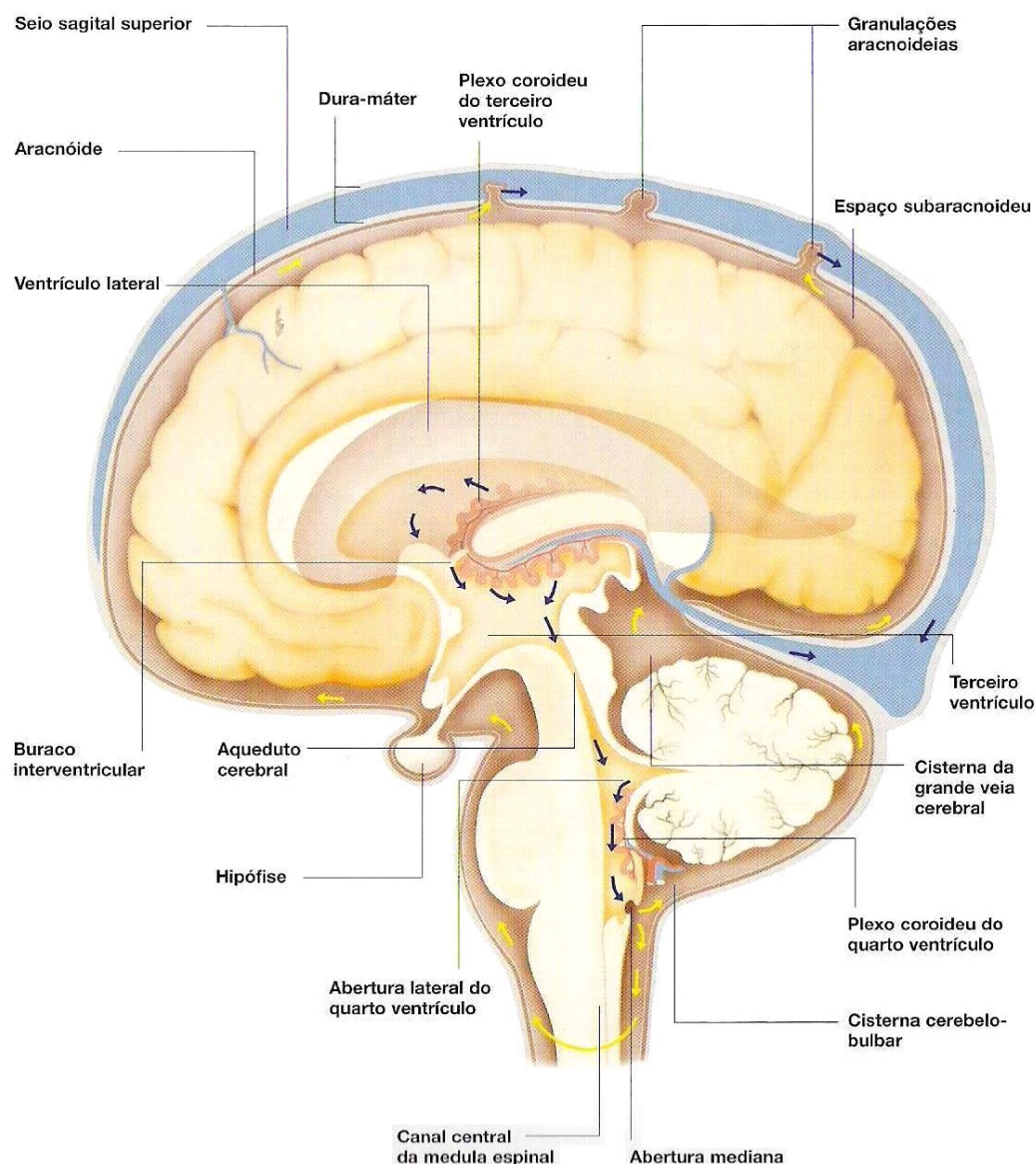


Figura 1.4 - Representação da circulação do LCR no cérebro e tronco cerebral (as setas azuis indicam o percurso do LCR através do sistema ventricular e as amarelas correspondem ao trajecto no espaço subaracnoideu). **Adaptado de:** Abrahams, 2002.

1.1.1 - Estrutura e Fisiologia do Plexo Coroideu

Os plexos coroideus constituem sistemas ricos de vasos sanguíneos provenientes da *pia-máter*, o mais interior dos tecidos que envolvem o cérebro (Abrahams, 2002). Apesar de os estudos sobre a fisiologia do PC estarem no seu início, diversas linhas de evidências convergentes sugerem que o PC desempenha papéis fundamentais numa ampla variedade de processos que estabelecem, monitorizam e mantêm o status celular e bioquímico do SNC sob condições normais e patológicas (Emerich *et al.*, 2005).

Estrutura do Plexo Coroideu

Dentro dos ventrículos estão estruturas secretoras “tipo-folha” especializadas e altamente vascularizadas, os plexos coroideus (Redzic e Segal, 2004) que formam uma interface única entre o sangue periférico e o LCR, a barreira sangue-LCR (Emerich *et al.*, 2005). A integridade estrutural e funcional desta barreira é crucial para a homeostase do *milieu* interno do SNC (Chodobski e Szmydynger-Chodobska, 2001; Segal, 2001).

De uma forma geral, o PC (Figura 1.5) é uma estrutura lobulada com uma única camada contínua de células (frequentemente referidas como células epiteliais coroidais) derivadas do revestimento interno ependimal dos ventrículos (Emerich *et al.*, 2005). As células ependimárias apresentam uma forma cuboidal ou colunar e formam um epitélio especializado que delimita os ventrículos cerebrais (Young e Heath, 2000).

As células epiteliais coroidais estão depositadas numa lâmina basal, contêm grandes núcleos centrais esféricos com citoplasma abundante e possuem numerosas vilosidades na sua superfície luminal (Dohrmann, 1970). Por outro lado, as células epiteliais adjacentes estão ligadas por junções apertadas de forma a restringir fisicamente o movimento de substâncias para e do LCR, e encontram-se no estroma macrófagos globulares, células dendríticas e fibroblastos (Emerich *et al.*, 2005). Estas células epiteliais contêm ainda numerosas mitocôndrias necessárias para manter o seu elevado metabolismo respiratório e requisitos energéticos (Cornford *et al.*, 1997). Subjacente a estas células e à lâmina basal está uma “cama” vascular densa que fornece um fluxo sanguíneo até sete vezes maior que no resto do cérebro (Chodobski e Szmydynger-Chodobska, 2001).

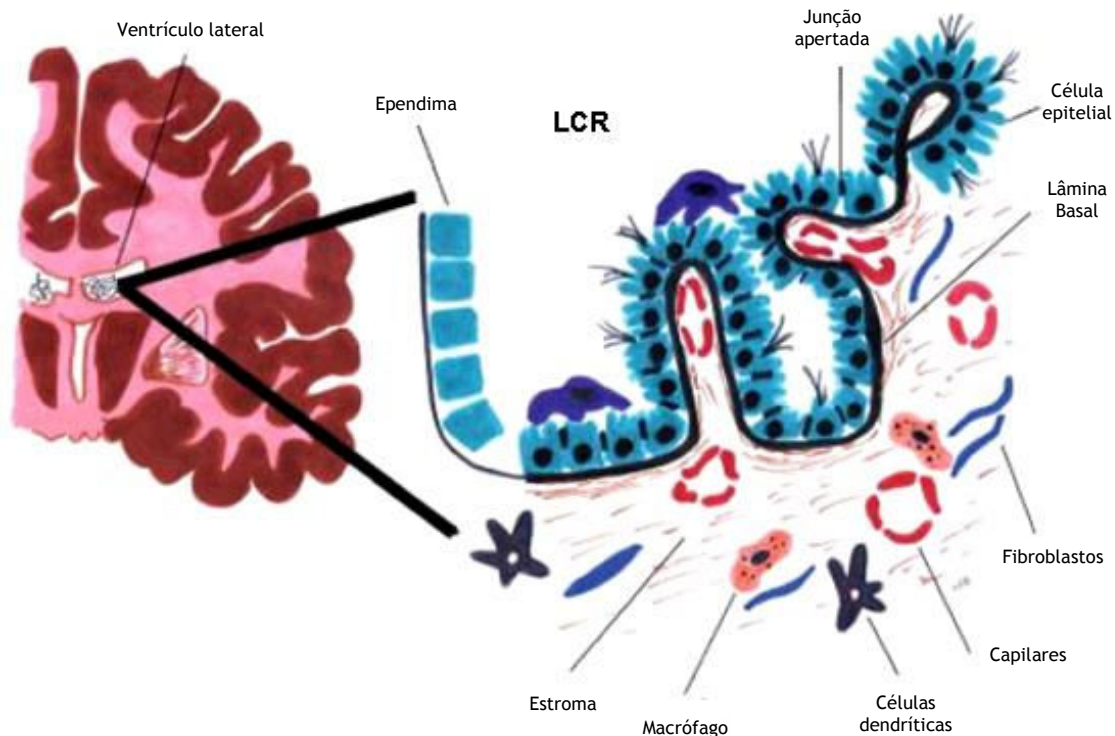


Figura 1.5 - Ilustração morfológica do plexo coroideu dentro do ventrículo lateral.

Adaptado de: Emerich *et al.*, 2005.

Fisiologia do Plexo Coroideu

Apesar dos plexos terem uma distribuição única de transportadores/canais de iões, o mecanismo de produção do LCR é similar à produção de fluidos noutros epitélios e baseia-se na energia libertada pela hidrólise de adenosina trifosfato (ATP), que conduz o fluxo unidireccional de iões acompanhado pelo movimento da água por osmose (Redzic e Segal, 2004). O LCR é assim produzido principalmente por secreção activa com a água a entrar no LCR, desde o sangue, através de um gradiente osmótico ou por canais de água específicos como a aquaporina (Oshio *et al.*, 2003). No homem, o LCR é formado a uma taxa de 0,4 mL/min, com um volume total de cerca de 150-270 mL, mas deste apenas 25% está nos ventrículos (Redzic e Segal, 2004).

Para além de ser um líquido claro, o LCR é ligeiramente viscoso, com poucas células e proteínas (Rall, 1964). Tem um pH mais baixo que o plasma do sangue, assim como concentrações mais baixas de glucose, potássio, cálcio, bicarbonato e aminoácidos. Em contraste, o conteúdo de sódio, cloreto e magnésio é maior no LCR que no plasma (Emerich *et al.*, 2005). A proteína tetramérica do plasma humano, TTR, constitui 25% de todas as proteínas do LCR (Weisner e Roethig, 1983).

Funções do Plexo Coroideu

Os plexos coróides estão envolvidos nos aspectos mais básicos da função neural, incluindo a manutenção da homeostase do *milieu* extracelular do cérebro ao modular activamente a troca química entre o LCR e o parênquima cerebral, monitorizando o status químico e imunológico do cérebro, destoxificando o cérebro, secretando um “cocktail” nutritivo de polipéptidos e participando nos processos de reparação após trauma (Emerich *et al.*, 2005).

As funções regulatórias do PC são alcançadas por dois mecanismos: o acesso selectivo e limitado de substâncias provenientes do sangue para o compartimento cerebral e pela síntese de componentes específicos essenciais para a nutrição e integridade do cérebro (Segal, 2001). Esta diversidade de funções pode significar que até pequenas mudanças no PC podem ter efeitos de longo alcance. De facto, mudanças na anatomia e fisiologia do PC têm sido associadas com diversas doenças neurológicas do SNC (Emerich *et al.*, 2005).

A função mais reconhecida do PC é a produção activa e secreção do LCR para o compartimento cerebral (Speake *et al.*, 2001). O PC constitui igualmente o principal local para a transferência das TH do sangue para o cérebro, e até $1/5$ da T4 no cérebro passa através do PC (Chanoine *et al.*, 1992).

Vários estudos demonstraram que o tecido do PC expressa diversos receptores, que medeiam a acção de diferentes hormonas no PC, afectando tanto o metabolismo local do PC como a secreção/composição do LCR (Chodobski e Szmydynger-Chodobska, 2001). Existem também evidências crescentes de que o PC sintetiza e secreta para o LCR um número de polipéptidos bioactivos, incluindo alguns factores de crescimento como o factor II de crescimento *insulin-like* (IGF II), a vasopressina e o factor de crescimento B1 (TGF-B1). Os plexos também sintetizam a proteína transportadora, TTR, e a transferrina (Redzic e Segal, 2004).

Finalmente, entre as funções do PC inclui-se também um papel purificador devido à remoção de materiais indesejados do LCR (Zheng e Zhao, 2002), como por exemplo através da sua acção na quelação de metais pesados que pode ajudar na protecção do cérebro da toxicidade destes metais (Redzic e Segal, 2004).

1.2 - Transtirretina - Evolução e Propriedades Moleculares e Biológicas

A TTR tem sido identificada em todas as classes de vertebrados (Richardson *et al.*, 2005), nos quais apresenta um elevado grau de conservação da sua estrutura (Richardson, 2002).

Por outro lado, estudos evolutivos revelaram a existência de proteínas similares à TTR em espécies de invertebrados (Lundberg *et al.*, 2006). Desta forma, a TTR constitui um excelente modelo para o estudo da evolução da estrutura, função e localização de proteínas (Richardson, 2007).

Durante as últimas décadas a TTR tem sido extensivamente estudada e caracterizada. A TTR pertence a um grupo de proteínas que inclui a globulina de ligação à tiroxina (TBG) e a albumina, que ligam e transportam as TH no sangue (Larsson *et al.*, 1985) e foi identificada pela primeira vez em 1942 no soro (Seibert e Nelson, 1942) e LCR (Kabat *et al.*, 1942) de humanos. Apesar dos humanos com falta de albumina ou TBG serem aparentemente saudáveis, não há nenhum caso conhecido de humanos desprovidos de TTR (Schreiber, 2002b).

1.2.1 - Evolução da Estrutura da Transtirretina

A comparação das sequências de aminoácidos da TTR de várias espécies confirma a elevada conservação que ocorreu nesta proteína, uma vez que existe mais de 80% de identidade entre mamíferos (Schreiber e Richardson, 1997), e sugere que as propriedades químicas gerais da TTR foram preservadas durante a sua evolução (Power *et al.*, 2000).

A região mais bem conservada da sua cadeia polipeptídica engloba a estrutura primária das zonas de contacto das subunidades e em particular o canal central do tetrâmero da TTR, que contém os locais de ligação para as TH (Schreiber e Richardson, 1997).

Uma excepção ao elevado nível de conservação que a sequência de aminoácidos da proteína apresenta, encontra-se na região N-terminal de cada subunidade, localizada próximo da entrada para o canal central da TTR (Blake *et al.*, 1978a). Estudos sobre a organização estrutural do gene da TTR indicam que estas secções constituem inequivocamente o local onde se verificou uma maior frequência de substituições dos aminoácidos durante a evolução (Schreiber e Richardson, 1997).

A análise das sequências de nucleótidos do cDNA da TTR de diversos vertebrados, demonstram que ao longo da evolução ocorreram sistematicamente mudanças por pequenos passos, que originaram alterações estruturais na fronteira entre o exão 1 e 2 da região N-terminal, conduzindo a uma diminuição do comprimento e ao aumento da hidrofobicidade destas secções das subunidades do gene da TTR (Aldred *et al.*, 1997). A região N-terminal apresenta em répteis, aves, peixes (*Sparus aurata*) e anfíbios (*Rana catesbeiana*) 3 aminoácidos adicionais relativamente à TTR de mamíferos (Power *et al.*, 2000).

Simultaneamente, ocorreu uma mudança na função: a TTR de répteis (Prapunpoj *et al.*, 2002), aves (Chang *et al.*, 1999), peixes (Santos e Power, 1999; Yamauchi *et al.*, 1999) e anfíbios (Yamauchi *et al.*, 1993; Prapunpoj *et al.*, 2000), liga preferencialmente a T3, enquanto que em mamíferos a TTR apresenta uma maior afinidade para a T4 (Chang *et al.*, 1999). Esta alteração nas afinidades para as TH tem sido associada com a mudança na hidrofiliicidade da região N-terminal (Chang *et al.*, 1999).

As transformações na molécula da TTR resultaram provavelmente de uma sequência de mutações individuais (Schreiber *et al.*, 2001) e poderão constituir um exemplo de um mecanismo molecular de evolução positiva Darwiniana (Aldred *et al.*, 1997).

1.2.2 - Organização Estrutural da Transtirretina

A estrutura e propriedades químicas da TTR humana estão bem caracterizadas em função da sua estabilidade e relativa abundância, tornando-a fácil de purificar em quantidades suficientes para estudo (Power *et al.*, 2000).

1.2.2.1 - Gene da Transtirretina

As estruturas genómicas da TTR com as respectivas sequências de aminoácidos foram descritas para diversas espécies de vertebrados entre as quais: humanos (Figura 1.6; Kanda *et al.*, 1974), coelhos (Sundelin *et al.*, 1985), ratos (Fung *et al.*, 1988), ratinhos (Costa *et al.*, 1986), peixes (*Sparus aurata*; Santos e Power, 1999) e anfíbios (*Rana catesbeiana*; Yamauchi *et al.*, 1998).

G P T G T G E S K C P L M V K V L D A V R G S P A	25
I N V A V H V F R K A A D D T W E P F A S G K T S	50
E S G E L H G L T T E E E F V E G I Y K V E I D T	75
K S Y W K A L G I S P F H E H A E V V F T A N D S	100
G P R R Y T I A A L L S P Y S Y S T T A V V T N P	125
K E	127

Figura 1.6 - Representação da sequência de aminoácidos da TTR humana.

Adaptado de: Kanda *et al.*, 1974.

A estrutura completa do gene da TTR humana foi revelada em 1985 (Sasaki *et al.*, 1985; Tsuzuki *et al.*, 1985). A proteína é codificada por um único gene localizado no braço comprido do cromossoma 18 (Wallace *et al.*, 1985), na região 18q11.2-q12.1

(Sparkes *et al.*, 1987), enquanto que em ratos está presente no cromossoma 4 (Qiu *et al.*, 1992). Adicionalmente, o gene da TTR humana é composto por 4 exões (cada um com aproximadamente 200 pares de bases), 3 intrões e expande-se por cerca de 7 kilobases (Sasaki *et al.*, 1985; Tsuzuki *et al.*, 1985; Wallace *et al.*, 1985).

O primeiro exão codifica para um péptido sinalizador com 20 aminoácidos, assim como para os 3 primeiros resíduos de aminoácidos da proteína madura, enquanto que o exão 2 codifica para os resíduos 4 a 47, o exão 3 para os resíduos 48 a 92 e o exão 4 para os resíduos de aminoácidos 93 a 127 (Sasaki *et al.*, 1985; Tsuzuki *et al.*, 1985).

Os genes de rato e ratinho também consistem de 4 exões e têm uma organização ao nível genómico similar à do gene humano (Power *et al.*, 2000).

1.2.2.2 - Estrutura do mRNA

As sequências de nucleótidos para o cDNA da TTR foram elucidadas para um vasto número de espécies. O cDNA para a TTR já foi clonado e sequenciado a partir de mais de 10 espécies diferentes (Schreiber e Richardson, 1997) incluindo humanos (Mita *et al.*, 1984), ratos (Dickson *et al.*, 1985a) e ratinhos (Wakasugi *et al.*, 1985).

Consiste geralmente de uma região 5' não traduzida (14-30 nucleótidos), uma região codificadora que corresponde a 127-130 aminoácidos, e uma região 3' não traduzida (115-181 nucleótidos) (Power *et al.*, 2000).

O tamanho da proteína madura é de 130 aminoácidos em porcos (Duan *et al.*, 1995), galinhas (Duan *et al.*, 1991), lagartos (Achen *et al.*, 1993) e peixes teleósteos (Santos e Power, 1999) e de 127 aminoácidos nos ratos (Dickson *et al.*, 1985a), humanos (Mita *et al.*, 1984) e ratinhos (Wakasugi *et al.*, 1985).

1.2.2.3 - Estrutura Molecular

Estudos estruturais através de raios X forneceram informações sobre a conformação activa da proteína e os locais de ligação para os seus ligandos (Hamilton e Benson, 2001).

A TTR plasmática humana foi cristalizada em 1966 a partir de soluções de sulfato de amónio (Haupt e Heide, 1966) e a sua estrutura cristalina de raios-X foi determinada em 1971 (Blake *et al.*, 1971). Demonstrou-se que a TTR é uma proteína tetramérica com um peso molecular total de aproximadamente 55 kDa, composta por 4 subunidades idênticas (monómeros) com um peso molecular individual de 13,7 kDa, unidas por ligações não covalentes e com 127 aminoácidos cada (Blake *et al.*, 1971; Kanda *et al.*, 1974).

A TTR apresenta uma extensa conformação de folhas B (Blake *et al.*, 1978a) que constitui o teor predominante da sua estrutura secundária e um pequeno comprimento de hélices α (Hamilton e Benson, 2001).

A conformação de tetrâmero (Figura 1.7), que constitui a forma biologicamente activa da proteína, é obtida a partir da associação entre dois dímeros diferentes através de interações hidrofóbicas e numerosas ligações de hidrogénio (Blake *et al.*, 1978a; Hamilton e Benson, 2001).

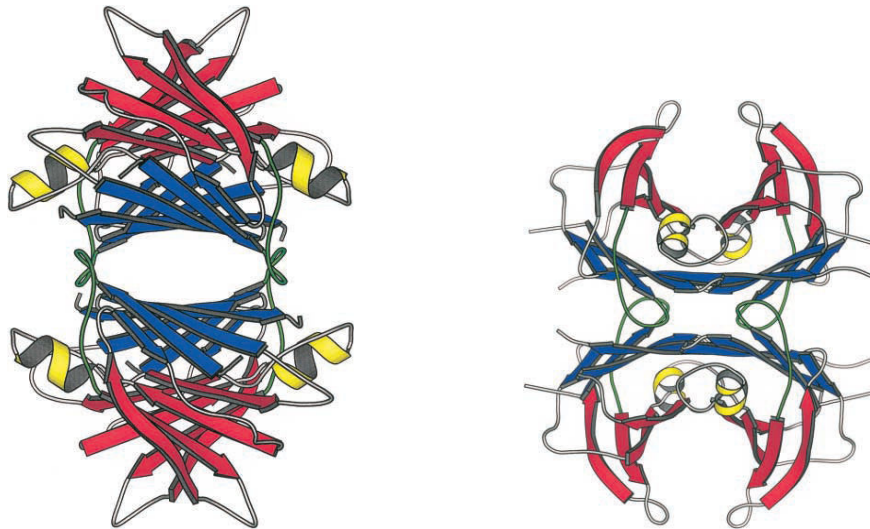


Figura 1.7 - Representação do tetrâmero da TTR humana. A extensa folha B interior está representada a azul e a exterior a vermelho. As hélices α estão a amarelo.

Adaptado de: Hamilton e Benson, 2001.

As 4 subunidades da TTR formam uma molécula de forma oval que contém um canal hidrofóbico central, no qual estão situados os dois locais estruturalmente idênticos de ligação para a T4 (Blake *et al.*, 1978b).

No entanto, estes locais apresentam uma cooperatividade negativa entre eles (Ferguson *et al.*, 1975; Neumann *et al.*, 2001), de tal forma que a ligação de uma molécula impede a ligação de outra molécula de T4 (Blake *et al.*, 1974; Neumann *et al.*, 2001), o que implica que sob condições fisiológicas apenas um dos locais é ocupado (Schreiber *et al.*, 2001).

A estrutura química do canal consiste de 3 elementos principais. O primeiro é um centro hidrofílico formado a partir dos grupos hidroxilo da Ser 112, Ser 115, Ser 117, Thr 119 e moléculas ligadas a água associadas. O segundo elemento é um centro hidrofóbico formado pelos grupos metilo da Leu 17, Thr 106, Ala 108, Leu 110 e Val 121. Um grupo de resíduos carregados englobando a Lys 15, Glu 54 e His 56 constituem o terceiro elemento localizado à entrada do canal (Blake *et al.*, 1978b). A

proximidade das cadeias laterais unidas da Leu 110, Ser 115 e Ser 117 causam uma constrição local vincada (Power *et al.*, 2000).

Adicionalmente aos locais de ligação para a T4, a TTR também possui dois locais de ligação para a RBP na superfície externa (Blake *et al.*, 1978b; Monaco *et al.*, 1995).

1.2.3 - Funções Biológicas da Transtirretina

A TTR é uma proteína plasmática (Blake *et al.*, 1978a) que apresenta uma duplicidade de funções fisiológicas conhecidas (Ingenbleek e Young, 1994) embora o seu papel no metabolismo permaneça controverso (Palha, 2002).

1.2.3.1 - Transporte das Hormonas da Tiróide

A TTR está bem documentada como transportador das TH. O primeiro estudo sobre a ligação das TH pela TTR foi publicado em 1958 (Ingbar, 1958).

As TH (T3; 3',3,5-triiodotironina e T4; 3',5',3,5-tetraiodotironina; Figura 1.8) são sintetizadas na glândula tiróide e secretadas para a corrente sanguínea (Mendel, 1989), onde têm sido identificadas no plasma de todos os grupos de vertebrados (Power *et al.*, 2000).

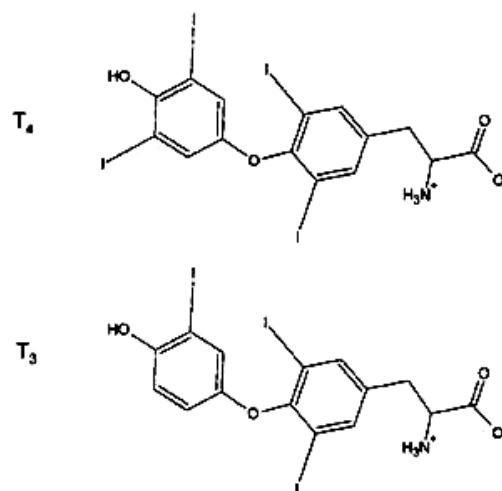


Figura 1.8 - Estrutura das hormonas da tiróide.

Adaptado de: Power *et al.*, 2000.

Estas hormonas são compostos chave em muitos sistemas regulatórios do organismo, tanto durante o desenvolvimento como na vida adulta, influenciando a proliferação e diferenciação de muitos e diferentes genes em diversos tecidos (Schreiber *et al.*, 2001). Relativamente ao SNC, as TH são essenciais para o seu normal desenvolvimento (Porterfield e Hendrich, 1993) e têm efeitos importantes para a sua homeostase (Hulbert, 2000).

A síntese e secreção das TH parecem ser similares em todos os vertebrados estudados. Estas estão armazenadas ligadas à tiroglobulina no colóide folicular. A hidrólise da iodotiroglobulina na camada de células epiteliais liberta principalmente

a T4, que se difunde para os capilares envolventes e divide-se rapidamente nas membranas celulares lipídicas, devido à sua maior solubilidade em lípidos do que na água (Hillier, 1970; Eales, 1985; Dickson *et al.*, 1987). Para contrariar este efeito e assegurar a distribuição correcta das TH nos tecidos (Mendel *et al.*, 1987), estas são geralmente transportadas no sangue, ligadas a proteínas do soro (Larsson *et al.*, 1985; Robbins e Edelhoeh, 1986). Mais de 99% das TH circulam ligadas a proteínas (Mendel, 1989), com apenas 0,03% de T4 e 0,3% de T3 a circularem na forma livre (Bartalena, 1990).

Em grandes mamíferos, foram identificadas 3 proteínas principais de ligação às TH no plasma: a TBG, a TTR e a albumina (Larsson *et al.*, 1985), que formam em conjunto uma rede de distribuição das TH ao longo do corpo (Schreiber e Richardson, 1997).

A TTR liga a T4 com elevada afinidade e com cerca de 10 vezes mais força que a T3, a forma metabolicamente activa da hormona (Robbins e Edelhoeh, 1986; Schreiber e Richardson, 1997).

No plasma humano, a TTR liga e transporta apenas 15 a 20% da T4 total circulante (Kanai *et al.*, 1968; Hagen e Elliot, 1973), uma vez que a TBG é o maior portador da T4 no soro (Nilsson *et al.*, 1975). Em contraste, no LCR, a TTR constitui a principal proteína transportadora da T4 e é responsável pelo transporte de 80% da T4 no SNC (Hagen e Elliot, 1973).

A TTR actua como transportador principal da T4 no plasma de roedores (Davies *et al.*, 1970; Goodman, 1984) e é a principal proteína de ligação à T4 no LCR tanto em roedores como em humanos (Hagen e Elliot, 1973).

O cérebro é um dos principais órgãos alvos das TH. A partir da corrente sanguínea, estas devem atravessar a barreira sangue-cérebro e/ou sangue-LCR para atingir o cérebro, o que sugere um possível contributo da TTR no transporte activo das TH até ao LCR do cérebro (Dickson *et al.*, 1987), através das barreiras acima referidas (Schreiber *et al.*, 1990).

1.2.3.2 - Transporte do Retinol

Para além de desempenhar um importante papel no transporte das TH, a TTR também está indirectamente envolvida no transporte e fornecimento do retinol (vitamina A), desde o fígado até às células alvo dos tecidos periféricos, através da ligação à RBP, o portador plasmático específico de moléculas de retinol no sangue (Kanai *et al.*, 1968; Raz e Goodman, 1969; Muto e Goodman, 1972).

A vitamina A é um nutriente indispensável para o normal crescimento fetal e desenvolvimento em muitas espécies de animais (Wilson *et al.*, 1953).

A RBP é uma cadeia polipeptídica única de 182 resíduos (Rask *et al.*, 1979) presente em todos os vertebrados estudados (Bellovino *et al.*, 2003) com um peso molecular de 21 kDa (Kanai *et al.*, 1968).

A TTR transporta virtualmente toda a RBP do soro (Buxbaum e Tagoe, 2000) e pode ligar-se a esta proteína plasmática com uma afinidade particularmente elevada (Berni *et al.*, 1990). Em condições nutricionais normais, cerca de 90% da RBP está saturada com retinol (Bellovino *et al.*, 2003).

Após a libertação pelo fígado (Blaner, 1989), o retinol é transportado na corrente sanguínea, por via da formação, sob condições fisiológicas, de um complexo macromolecular entre a TTR tetramérica e a RBP acoplada ao retinol (Figura 1.9) (Kanai *et al.*, 1968; Raz e Goodman, 1969; van Jaarsveld *et al.*, 1973), no retículo endoplasmático dos hepatócitos (Ingenbleek e Young, 1994).

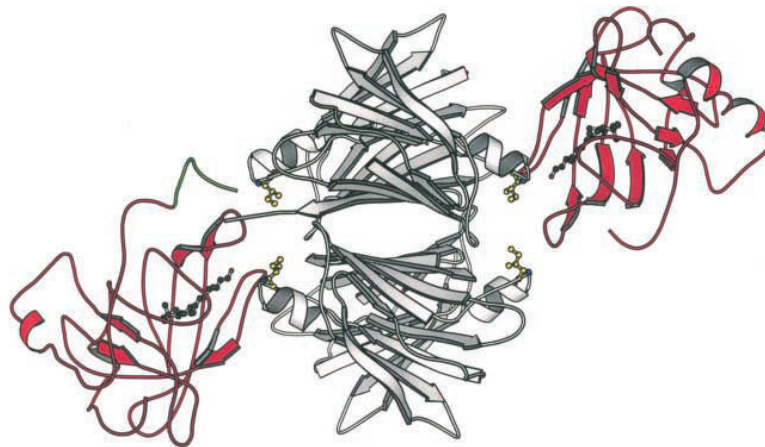


Figura 1.9 - Diagrama do complexo da TTR humana com a RBP humana.

Adaptado de: Hamilton e Benson, 2001.

A presença do retinol ligado à RBP é essencial para a estabilidade deste complexo e pensa-se que a estequiometria máxima do complexo é de duas moléculas de RBP por tetrâmero de TTR (Monaco *et al.*, 1995).

Por outro lado, tem sido sugerido que a formação deste complexo desempenha outro importante papel fisiológico, ao prevenir a eliminação renal da RBP, do plasma para a urina por filtração glomerular (Kanai *et al.*, 1968; Peterson, 1971; Goodman, 1984), a qual seria rapidamente eliminada devido ao seu baixo peso molecular (Hamilton e Benson, 2001). A TTR desempenha assim um importante papel fisiológico na homeostase da vitamina A (Mónaco, 2000).

No entanto, a TTR não parece ser essencial à vida. Apesar de alguns estudos em ratinhos TTR *knockout* terem detectado uma diminuição nos níveis plasmáticos totais da T4 e do complexo retinol-RBP (Episkopou *et al.*, 1993; Wei *et al.*, 1995), observaram também que os animais em estudo têm um fenótipo normal e não

apresentam alterações significativas no transporte da T4 (Palha *et al.*, 1994; Wei *et al.*, 1995). Foi igualmente demonstrada que a ausência genética da proteína é compatível com um normal desenvolvimento fetal e expectativa de vida (Episkopou *et al.*, 1993; Wei *et al.*, 1995).

Estes resultados levaram à sugestão de que os componentes individuais do sistema de proteínas de ligação às TH são funcionalmente redundantes e que existem mecanismos compensatórios eficientes para o transporte do retinol e das TH. A perda de uma das proteínas devido a factores genéticos poderá ser contrabalançada pelo aumento da ligação às restantes proteínas plasmáticas (Episkopou *et al.*, 1993; Palha *et al.*, 1994).

1.2.3.3 - Outras Funções

A TTR também liga outras moléculas biológicas como a apolipoproteína A (apo-A; Sousa *et al.*, 2000), as pterinas (Ernstrom *et al.*, 1995) e as metalotioneinas (Gonçalves *et al.*, 2008), apesar do seu exacto papel no metabolismo destes ligandos permanecer desconhecido.

Adicionalmente, a TTR poderá ter um importante papel no sistema nervoso (Saraiva, 2002) tendo sido recentemente sugerido que a TTR poderá exercer funções neuroprotectoras (Sousa *et al.*, 2004; Stein *et al.*, 2004).

Embora a literatura ainda refira essencialmente o papel da TTR como transportador para a T4 e retinol, nos últimos anos tem-se dado atenção a novas funções da proteína, nomeadamente no comportamento e em particular na AD (Sousa *et al.*, 2007).

1.2.3.3.1 - TTR e a Doença de Alzheimer

Entre as doenças amilóides conhecidas está uma das mais proeminentes do nosso tempo: a AD (Figura 1.10) (Serpell *et al.*, 1997).

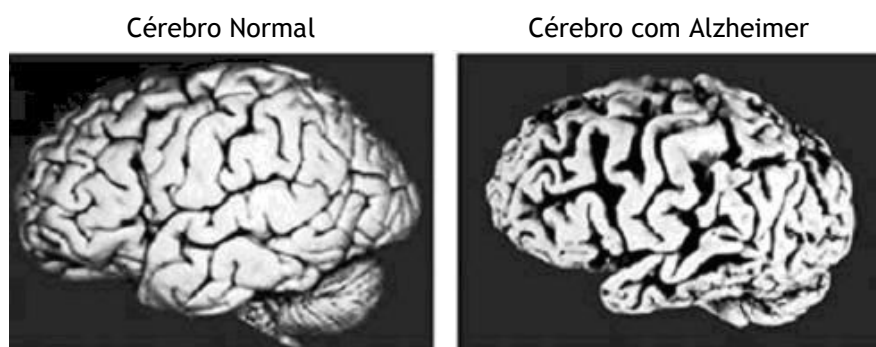


Figura 1.10 - Comparação entre um cérebro normal de uma pessoa saudável e outro de um paciente com AD. A AD provoca uma diminuição das regiões cerebrais envolvidas na aprendizagem e memória. **Adaptado de:** Matson, 2004.

Existem evidências que suportam a hipótese de que a TTR poderá desempenhar um papel significativo na patogénese da AD, embora o mecanismo preciso desta interação permaneça desconhecido (Merched *et al.*, 1998).

A AD é uma desordem neurodegenerativa, caracterizada por dois eventos centrais: a deposição extracelular do A-Beta na forma de placas amilóides e a formação de emaranhados neurofibrilares intracelulares (Kang *et al.*, 1987; Dickson, 2004).

O A-Beta é um péptido com 37 a 43 aminoácidos e 4 kDa, produzido por clivagem proteolítica de um grande precursor transmembranar, a proteína precursora do amilóide (APP) (Verdier *et al.*, 2004) e está normalmente presente na sua forma solúvel em fluidos biológicos como o sangue e o LCR (Palha *et al.*, 1996). Contudo, na AD o A-Beta deposita-se como amilóide e é conhecido como o maior componente das placas de amilóide (senis) da AD (Wisniewski *et al.*, 1994).

Existem diversos estudos que estabelecem uma ligação entre a TTR, o A-Beta e a AD. Estudos *in vitro* demonstraram que a TTR humana purificada pode ligar e sequestrar o A-Beta e inibir a formação de fibrilas amilóides (Schwarzman *et al.*, 1994; Golabek *et al.*, 1995).

Por outro lado, alguns estudos detectaram uma redução significativa da TTR no LCR de pacientes com AD em comparação com controlos saudáveis da mesma faixa etária (Riisøen, 1988; Serot *et al.*, 1997). Outro estudo estabeleceu igualmente uma relação entre a abundância das placas de amilóide e o nível médio de TTR no LCR dos mesmos pacientes, sugerindo que a TTR apresenta uma correlação negativa entre os seus níveis no LCR e a progressão da doença (Merched *et al.*, 1998).

Experiências *in vivo* foram também realizadas de forma a investigar o possível efeito protector da TTR. Estudos realizados num transgénico *Caenorhabditis elegans* tanto para o A-Beta como para a TTR humana, também sugeriram que a TTR pode inibir a fibrilhogénese do A-Beta (Link, 1995). Da mesma forma, estudos num ratinho transgénico com sobreexpressão da APP mutada revelaram uma lenta diminuição da progressão da AD e uma ausência de neurodegeneração atribuída à expressão de TTR (Stein e Johnson, 2002). Em concordância com estes resultados foi sugerido que a TTR pode funcionar como sequestrador do A-Beta, apresentando assim um papel protector contra a sua deposição e modulando a progressão/aparecimento da AD (Sousa *et al.*, 2007). Finalmente, um estudo recente confirmou a TTR como um ligando do A-Beta e indicou a inibição/disrupção das fibrilhas do A-Beta como possíveis mecanismos subjacentes à sua função protectora na AD (Costa *et al.*, 2008).

1.2.4 - Síntese e Expressão da Transtirretina

TTR é sintetizada como uma pré-proteína, apresentando uma sequência sinalizadora na região N-terminal que é removida durante a translocação no retículo endoplasmático. O tetrâmero da TTR é constituído pouco depois da translocação (Bellovino *et al.*, 2003).

Nos últimos anos, a síntese e expressão da TTR no fígado e cérebro têm sido estudadas num grande número de espécies (Schreiber e Richardson 1997). A presença da proteína foi demonstrada em mais de 15 espécies de vertebrados (Schreiber, 2002b).

A síntese do gene da TTR ocorre numa fase inicial durante o desenvolvimento embrionário e permanece bem conservada durante a evolução ao longo da vida (Fung *et al.*, 1988; Schreiber *et al.*, 1993).

1.2.4.1 - Fígado e Plexo Coroideu

A expressão e síntese da TTR são reguladas de forma independente no sangue e LCR (Dickson *et al.*, 1986).

A TTR apresenta uma expressão génica relativamente restrita, existindo uma imensa diversidade de estudos que detectaram a sua síntese principalmente no fígado, assim como em níveis muito elevados no PC de ratos (Dickson *et al.*, 1985a,b; Soprano *et al.*, 1985; Kato *et al.*, 1986; Stauder *et al.*, 1986; Fung *et al.*, 1988; Schreiber *et al.*, 1990), humanos (Dickson e Schreiber, 1986; Herbert *et al.*, 1986; Mita *et al.*, 1986), ovelhas (Schreiber *et al.*, 1990), porcos (Duan *et al.*, 1995), galinhas (Southwell *et al.*, 1991) e no fígado de marsupiais (Richardson *et al.*, 1994).

A partir do fígado, a TTR é secretada para a corrente sanguínea (Dickson *et al.*, 1982) enquanto que a proteína produzida pelas células epiteliais do PC é secretada para o LCR (Dickson *et al.*, 1987), fornecendo TTR para distribuição no cérebro (Schreiber e Richardson, 1997).

A TTR constitui a proteína mais abundantemente sintetizada e secretada pelo PC (Schreiber *et al.*, 2001), onde apresenta uma concentração de mRNA muito superior à observada no fígado (Schreiber e Richardson, 1997). De facto, a TTR representa cerca de 20% da síntese total de proteínas e 50% das proteínas secretadas pelo PC (Dickson *et al.*, 1986).

Todo o mRNA da TTR encontrado no PC está localizado na camada de células epiteliais que formam a superfície ventricular do PC (Stauder *et al.*, 1986) e estão entre as células mais especializadas do nosso organismo na síntese de uma proteína específica (Dickson *et al.*, 1986).

Em mamíferos e aves, os principais locais de síntese e expressão do gene da TTR são o fígado e o PC do cérebro (Schreiber e Richardson 1997). A TTR é a principal proteína sintetizada pelo PC em mamíferos, aves e répteis (Achen *et al.*, 1993; Aldred *et al.*, 1995), onde é a única proteína de ligação às TH sintetizada (Schreiber, 1987).

Em répteis, o gene da TTR está presente no cérebro, sendo fortemente expresso no PC de lagartos adultos (*Tiliqua rugosa*; Achen *et al.*, 1993), tartarugas (*Trachemys scripta*; Richardson *et al.*, 1997) e crocodilos jovens (*Crocodylus porosus*; Prapunpoj *et al.*, 2002), embora permaneça por detectar qualquer expressão no fígado (Power *et al.*, 2000).

A clonagem da TTR da dourada (*Sparus aurata*) forneceu evidências experimentais definitivas de que a TTR é expressa em peixes e permitiu detectar em particular a expressão do mRNA desta proteína no fígado da dourada jovem. No entanto, a proteína parece estar ausente do PC deste peixe (Santos e Power, 1999).

Em anfíbios, o mRNA da TTR foi observado no fígado durante a metamorfose, nomeadamente em girinos de rã (*Rana catesbeiana*; Yamauchi *et al.*, 1998) e no sapo Africano com garras (*Xenopus laevis*; Prapunpoj *et al.*, 2000), mas não se observou nenhuma expressão no cérebro de girinos ou em qualquer outro dos tecidos de anfíbios adultos estudados (Yamauchi *et al.*, 1998).

A TTR permanece por identificar no LCR de anfíbios ou peixes (Richardson *et al.*, 1994; Schreiber, 2002a).

Níveis Plasmáticos e do Líquido Cefalorraquidiano da Transtirretina

A TTR é sintetizada no fígado em resposta ao fornecimento nutricional. Assim, os seus níveis plasmáticos têm sido propostos como um parâmetro bioquímico de subnutrição, uma vez que a síntese hepática da TTR é extremamente sensível aos níveis de proteína e influxo de energia (Ingenbleek e Young, 1994).

Em geral, os níveis da TTR plasmática aumentam gradualmente após o nascimento até atingirem a concentração máxima na vida adulta e depois decrescem a partir da quinta década de vida (Stabilini *et al.*, 1968). A TTR está presente no plasma humano com uma concentração normal entre 0,1 a 0,4mg/mL e de aproximadamente 0,017mg/mL no LCR (Sousa e Saraiva, 2003).

No entanto, a TTR é conhecida como uma proteína de fase aguda negativa e assim verifica-se uma depressão significativa do seu nível plasmático em resposta a lesões e em condições de subnutrição ou inflamação crónica (Dickson *et al.*, 1982). Em contraste, a concentração de mRNA da TTR no PC permanece constante durante inflamações agudas (Dickson *et al.*, 1986).

1.2.4.2 - Outros Tecidos

Para além do fígado, têm sido identificados diversos tecidos extrahepáticos que também sintetizam a TTR.

Foram detectadas pequenas quantidades de mRNA da TTR no coração, músculo-esquelético, estômago e baço (Soprano *et al.*, 1985) e também em células renais (Wakasugi *et al.*, 1986). A síntese da TTR foi também detectada no olho, mais especificamente nas células do pigmento epitelial da retina em gado, ratos e carneiros (Martone *et al.*, 1988; Cavallaro *et al.*, 1990; Mizuno, *et al.*, 1992). Culturas *in vitro* do pigmento epitelial da retina de rato apresentaram síntese e secreção da TTR no espaço inter-fotoreceptor da retina (Ong *et al.*, 1994). Adicionalmente, a proteína da TTR foi detectada em vários tecidos oculares: camada de fibras nervosas da retina, células ganglionares da retina, camada do fotoreceptor, epitélio ciliar, epitélio da íris, endotélio da córnea e epitélio das glândulas lacrimais (Inada, 1988; Dwork *et al.*, 1990).

Similarmente, foram observados níveis baixos de mRNA de TTR expressos na placenta de rato (Fung *et al.*, 1988), assim como no pâncreas humano e de rato (Soprano *et al.*, 1985; Jacobsson *et al.*, 1990). As células dos ilhéus pancreáticos adultos também contêm TTR (Kameko *et al.*, 1986) e o feto humano sintetiza-a nos ilhéus pancreáticos de Langerhans e na mucosa gastrointestinal (Gray *et al.*, 1985). A expressão da TTR foi ainda detectada noutros tecidos como os rins, ovários e células de Sertoli dos testículos (Soprano e Blaner, 1994).

Outros estudos reportaram a síntese de TTR na vesícula visceral vitelina durante o desenvolvimento fetal de rato (Soprano *et al.*, 1986), assim como no olho em formação de rato (Mizuno *et al.*, 1992) e durante a embriogénese do coração da galinha (Barron *et al.*, 1998), apesar da sua função durante o desenvolvimento permanecer por identificar (Power *et al.*, 2000). A TTR foi igualmente encontrada na glândula pineal (Martone *et al.*, 1992) e recentemente, o órgão subcomissural no cérebro foi também identificado como fonte de TTR (Montecinos *et al.*, 2005).

As caracterizações iniciais da distribuição da TTR revelaram o PC como o local exclusivo da síntese da TTR no cérebro (Sousa *et al.*, 2007).

No entanto, vários estudos indicam uma expressão da TTR no cérebro extra PC. As meninges do cérebro foram descritas como capazes de expressar o gene da TTR, embora em níveis significativamente mais baixos que no PC (Soprano *et al.*, 1985; Blay *et al.*, 1994), apresentando um sinal muito fraco através de hibridação *in situ* (Stauder *et al.* 1986) e níveis baixos de mRNA por análise de *Northern blot* (Herbert *et al.*, 1986; Blay *et al.*, 1993).

Recentemente, utilizando métodos de *Real Time PCR* e *microarrays*, a TTR originada de várias regiões do parênquima cerebral tem sido implicada na degeneração do SNC (Sousa *et al.*, 2007). Especificamente, um fornecimento nutricional de ácidos gordos polinsaturados ómega-3, uma dieta que foi demonstrada como capaz de reduzir o debilitamento da capacidade de aprendizagem num modelo de rato com AD, resultou numa expressão elevada da TTR no hipocampo (Puskas *et al.*, 2003). Um efeito similar foi observado com o uso de *ginkgo biloba*, um extracto de uma planta medicinal, utilizado para contrariar desordens neurológicas associadas à idade (Watanabe *et al.*, 2001).

Estes estudos sugerem novos locais de síntese da TTR no cérebro, onde até agora, apenas se tinha verificado a sua expressão no PC e nas meninges (Dickson *et al.*, 1985a).

1.3 - Objectivos

O presente trabalho científico teve como objectivos primordiais a caracterização da distribuição celular e expressão da TTR no cérebro de ratinho a fim de esclarecer se existem outras regiões no cérebro para além do PC e das meninges a produzirem esta proteína.



2. MATERIAL E MÉTODOS

2 - Material e Métodos

Ao longo deste trabalho científico foi estudada a distribuição e expressão da TTR no cérebro de ratinho através de ensaios experimentais de hibridação *in situ* (ISH) e imunohistoquímica (IHC).

2.1 - Animais

Neste estudo foi usado como modelo um ratinho *wild-type*, a partir do qual foram obtidos os tecidos examinados.

Os animais foram colocados em gaiolas apropriadas à temperatura de 22°C, num ciclo de 12h com luz e 12h no escuro, com fornecimento laboratorial padrão de comida e água *ad libitum*. A eutanásia foi realizada sob anestesia de cetamina (Clorketam 1000; Vétoquinol, Lure, France) e os tecidos cerebrais para estudo foram colhidos, congelados em nitrogénio líquido e posteriormente guardados a -80°C para análises futuras.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas Nacionais e da União Europeia para o cuidado e manuseamento de animais de laboratório (Directiva 86/609/EEC).

2.2 - Amostras

As amostras para os exames histológicos provenientes de tecidos do cérebro, foram fixadas em paraformaldeído (PFA) 4% em PBS, tanto para os estudos de ISH como para os ensaios de IHC, incluídas em parafina, cortadas em secções coronais com 5µm de espessura e montadas em lâminas de vidro. Utilizaram-se diversas lâminas com diferentes zonas do cérebro.

Fixação de Tecidos em Secções de Parafina

Uma parte essencial de todas as técnicas histológicas é a preservação da morfologia das células e tecidos analisados, através da sua fixação. Uma preparação incorrecta da amostra pode bloquear ou impedir a identificação de antígenos alvo em tecidos e células (Atwood, 2001).

Usualmente, as secções de tecido são imersas num fluido fixador. Os fixadores empregues previnem a autólise pela inactivação de enzimas lisossomais e inibição do crescimento de bactérias. Para além disso, estabilizam as células e tecidos, e assim têm um efeito protector das “agressões” subsequentes das técnicas de processamento e marcação tecidulares. Não há nenhum fixador ideal, o processo fixativo deve ser optimizado em função dos tecidos em estudo, para preservar a

posição do antígeno, tanto nuclear como citoplasmática ou de ligação membranar e a sua estrutura secundária e terciária, assim como as restantes estruturas celulares de forma a minimizar a dissimulação dos epítomos. Os fixadores mais populares contêm formalina (40% w/v formaldeído em água). Estes são bem tolerados pelos tecidos e têm uma boa penetração (Atwood, 2001).

A maior proporção de amostras usadas em imunomarcção é incluída em parafina porque para além das suas propriedades de preservação, fornece um excelente detalhe morfológico e uma óptima resolução, tendo-se tornado num padrão na histologia e patologia sempre que é necessário arquivar a informação imunohistoquímica. A parafina é um excelente meio de inclusão porque pode ser aquecido até ao estado líquido, dissolvido por xileno para infiltrar o tecido e depois voltar de forma relativamente rápida ao estado sólido para proporcionar o melhor suporte estrutural durante o seccionamento. Tipicamente, os tecidos são fixados até 24 horas, depois da recolha. Depois são infiltrados e incluídos em parafina, cortados em secções e montados em lâminas de vidro. No final deste processo, as lâminas podem ser armazenadas indefinidamente até ser necessária a imunomarcção. Nessa altura a parafina tem de ser removida do tecido para permitir que tampões com água e anticorpos possam penetrar nos tecidos em estudo (Farmilo, 2006).

A necessidade de uma análise funcional precisa de células e tecidos teve importantes consequências na prática das ciências morfológicas, estimulando o desenvolvimento de novas técnicas que permitem a análise *in situ* da expressão de genes. Assim, nas últimas duas décadas têm sido desenvolvidas várias poderosas ferramentas de investigação pela adaptação a preparações celulares e tecidulares de técnicas usadas inicialmente na biologia celular e molecular. Estas novas técnicas tornaram possível o estudo da expressão *in situ* de proteínas específicas ou de ácidos nucleicos aos níveis tecidual e celular. Entre elas incluem-se a IHC e a ISH (Scoazec *et al.*, 2003).

2.3 - Hibridação *In Situ*

A distribuição e localização da TTR ao longo do cérebro foram investigadas através de ensaios de ISH para identificar células que expressam mRNA da TTR.

A ISH é uma técnica única que permite observar a localização e expressão precisa de um determinado gene específico ou dos seus transcritos (mRNA) dentro de células individuais em amostras de tecido (Jin e Lloyd, 1997). Este método foi descrito pela primeira vez em 1969 (Gall e Pardue, 1969) e baseia-se na ligação (emparelhamento) entre uma sonda de nucleótidos marcados e sequências “alvo” complementares e específicas de DNA ou RNA na célula (McNicol e Farquharson, 1997). Desde então foram desenvolvidas muitas variações da técnica. No entanto, apenas na década de 80 a ISH despertou o interesse da área médica e recentemente tem-se tornado uma importante ferramenta na investigação científica, contribuindo também para a melhoria da qualidade dos diagnósticos clínicos (Jin e Lloyd, 1997).

A ISH é um método que combina técnicas de biologia molecular com a análise histológica (Jin e Lloyd, 1997). Em 1989, descreveu-se o uso simultâneo da reacção de ISH com a IHC (Young, 1989), ampliando o campo de aplicação desta reacção (Silva-Valenzuela *et al.*, 2006).

Princípios da Hibridação *In Situ*

Como já foi referido, as técnicas de ISH têm por objectivo demonstrar a presença de sequências específicas de ácidos nucleicos, que codificam a expressão de proteínas singulares, podendo assim ser usada na detecção de sequências tanto de DNA como de RNA (Scoazec *et al.*, 2003).

O princípio básico das técnicas de ISH é simples: a) ocorre uma reacção de hibridação entre uma sonda molecular específica e marcada de ácidos nucleicos (Scoazec *et al.*, 2003) e uma sequência alvo complementar de DNA ou RNA em células ou tecidos fixados (Jin e Lloyd, 1997); b) os híbridos formados *in situ* entre a sonda e o seu “alvo” podem ser visualizados por um método que permita a sua detecção por visualização ao microscópio (Scoazec *et al.*, 2003), como por exemplo através do desenvolvimento de um cromogéneo histoquímico para sondas não-radioactivas. Podem ocorrer diversos tipos de reacções de ISH entre cadeias complementares, designadamente DNA-DNA, DNA-RNA, RNA-DNA e RNA-RNA, dependendo da sonda utilizada e do “alvo” em estudo (Jin e Lloyd, 1997).

O sucesso deste método está directamente relacionado com a preparação e preservação do tecido, preparação das sondas e reagentes e optimização das condições da reacção (Silva-Valenzuela *et al.*, 2006). Por outro lado, o

emparelhamento e separação das cadeias hibridadas dependem de vários factores como a temperatura, pH, natureza das sondas e moléculas alvo e a composição das soluções de hibridação e lavagem (Jin e Lloyd, 1997). Outra variável importante a ter em consideração é que ao contrário do DNA que é uma molécula estável e de fácil preservação, o RNA é facilmente degradado pela acção das ribonucleases (RNases), que são extremamente abundantes no meio ambiente e difíceis de inactivar (Harvey, 2001), razão pela qual é necessário o uso de material estéril (autoclavado) durante o procedimento para evitar a contaminação das amostras de tecido em estudo.

Marcação e Detecção do Sinal

Existe uma grande variedade de marcadores para sondas em experiências de ISH. Os dois métodos principais utilizados para a marcação e detecção são: a marcação radioactiva, usando isótopos como ^3H , ^{35}S , ^{125}I , ^{32}P e ^{33}P ; e a marcação não-radioactiva, utilizando moléculas como a biotina e a digoxigenina (DIG), que são visualizadas por sistemas de detecção imunohistoquímicos (Jin e Lloyd, 1997).

As sondas não-radioactivas permitem a detecção do mRNA com uma resolução celular melhorada, mas com uma sensibilidade inferior às sondas radioactivas e os resultados da hibridação são difíceis de quantificar (Jin e Lloyd, 1997). Os procedimentos não-radioactivos requerem que a sonda contenha uma molécula “repórter”, introduzida quimicamente ou enzimaticamente, que pode ser detectada por IHC e portanto deve ser acessível a anticorpos, e assim permite a detecção da sonda, devolvendo informações relevantes sobre a localização e abundância do “alvo” (Harvey, 2001).

Marcação por Digoxigenina

Alguns dos sistemas mais populares de marcação são os métodos que usam a DIG detectada por anticorpos específicos. As sondas marcadas com DIG apresentam maior sensibilidade e menor marcação de fundo em comparação com as sondas marcadas com biotina (Komminoth *et al.*, 1992). Este método de marcação é baseado num esteróide isolado de plantas (*Digitalis purpúrea* e *Digitalis lanata*). Estas plantas são a única fonte natural de DIG e desta forma o anticorpo anti-DIG não se liga a qualquer outro material biológico. As sondas hibridadas marcadas com a DIG podem ser detectadas com anticorpos anti-DIG de elevada afinidade conjugados com fosfatase alcalina. Este complexo (anti-DIG + fosfatase alcalina) é visualizado através de substratos colorimétricos para esta enzima como o 4-nitro azul tetrazólio (NBT) e o 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP), originando um produto corado e insolúvel (McNicol e Farquharson, 1997).

Preparação e Tratamento do Tecido

A ISH tem sido aplicada a espécimes celulares e a secções de tecido em parafina ou congeladas, apesar dos ácidos nucleicos serem melhor preservados nestas últimas. As células intactas são ideais para a ISH, uma vez que têm menos sequências de nucleótidos danificadas (Wilcox, 1993).

Uma fixação ideal para esta técnica deve preservar tanto o RNA como o DNA e conservar a estrutura morfológica do tecido (Basyuk *et al.*, 2000). Os fixadores mais usados são a formalina e o PFA a 4% (Jin e Lloyd, 1997).

Diversos passos de pré-tratamento anteriores à hibridação contribuem para o aumento da eficácia da reacção e para a redução da marcação de fundo não-específica (Jin e Lloyd, 1997).

Tratamento das Proteases

O tratamento das proteases, com proteinase K, é considerado um dos passos mais importantes para aumentar a acessibilidade dos ácidos nucleicos para a hibridação, especialmente para sondas não-radioactivas em secções de parafina, através da digestão da proteína que rodeia o “alvo”. A incubação prolongada pode resultar numa digestão excessiva provocando uma perda de sinal e da integridade morfológica (Jin e Lloyd, 1997).

Este passo é normalmente seguido de uma suave pós-fixação em PFA, para prevenir a perda de sequências “alvo” (McNicol e Farquharson, 1997).

Preparação de Sondas

A escolha e síntese das sondas para a reacção de ISH são duas das partes principais do planeamento de experiências de ISH (Silva-Valenzuela *et al.*, 2006) e devem ter em consideração vários factores como a sensibilidade e especificidade da sonda assim como a penetração do tecido e estabilidade dos híbridos (McNicol e Farquharson, 1997).

Existem diferentes tipos de sondas disponíveis para a ISH, incluindo DNA, cDNA, RNA e sondas oligonucleótidas sintéticas (Jin e Lloyd, 1997).

As sondas de RNA, normalmente referidas como “ribossondas” constituem materiais de cadeia única que são tipicamente sintetizadas a partir de um vector por via de uma RNA polimerase. O seu tamanho pode variar desde pequenos oligonucleótidos até várias kilobases. Estas sondas são mais eficientes devido à sua maior capacidade de emparelhamento, uma vez que já possuem uma cadeia única, e assim não precisam de desnaturação inicial. Por outro lado, uma das principais

desvantagens destas sondas é a sua inerente instabilidade devido à presença ubíqua das RNases (Harvey, 2001).

As ribossondas podem ser preparadas por reacção de transcrição *in vitro* a partir de sequências de cDNA que funcionam como molde, as quais têm de ser subclonadas num vector próprio para transcrição, e cujo local de clonagem seja flanqueado pelos locais de iniciação de RNA polimerases diferentes (SP6, T3 e T7), permitindo a síntese de sondas *sense* e *antisense*. A sonda *sense* é normalmente utilizada como controlo negativo. Os transcritos sintetizados são uma cópia exacta da sequência desde o local do promotor até ao local de restrição usado para a linearização (Wilcox, 1993).

Pré-Hibridação

A incubação das secções com um tampão de pré-hibridação, contendo normalmente 50% de formamida e todos os componentes da mistura de hibridação com excepção da sonda, é muitas vezes útil para prevenir a marcação de fundo e em conjunto com outros factores como a temperatura de hibridação, influenciam significativamente as condições de estringência da reacção de hibridação (Jin e Lloyd, 1997).

Lavagens Pós-Hibridação

As sondas marcadas podem hibridar de forma não específica a sequências que são parcialmente, mas não completamente homólogas à sequência da sonda (Figura 2.1). Estes híbridos são menos estáveis que os híbridos totalmente complementares e podem ser dissociados pela realização de lavagens de várias estringências (McNicol e Farquharson, 1997).

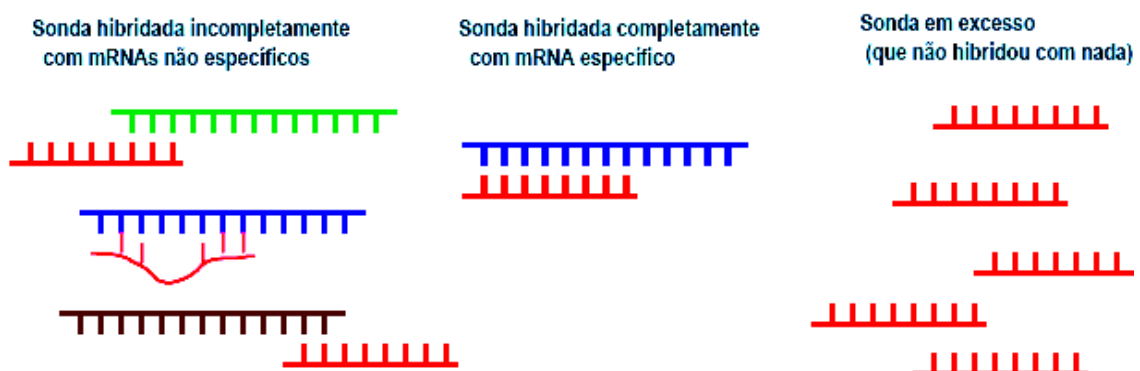


Figura 2.1 - Representação da hibridação específica e não-específica das sondas.

Adaptado de: Junqueira e Carneiro, 2004.

Detecção Imunológica com Enzimas

Para a detecção imunológica podem ser utilizadas enzimas normalmente usadas em IHC. Por exemplo, para a fosfatase alcalina é utilizado o nitro-azul tetrazólio/5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (NBT/BCIP) como substrato cromogénico para que ocorra reacção. O BCIP actua como substrato para a fosfatase alcalina e o NBT acentua a coloração púrpura do precipitado que se forma (Silva-Valenzuela *et al.*, 2006).

As principais vantagens deste método de detecção colorimétrico são as boas propriedades de localização, elevada sensibilidade e estabilidade dos precipitados obtidos (Straus, 1982; De Jong *et al.*, 1985).

Os tempos da reacção são determinados por avaliação do sinal, que deve ser observado ao microscópio durante a reacção enzimática. O meio no qual ocorre a reacção é estável quando incubado no escuro.

2.3.1 - Procedimento para a Síntese de Ribossondas

Foram geradas sondas senso e anti-senso (“*sense* e *antisense*”) marcadas com DIG para a TTR, por transcrição *in vitro* (Roche, Basel, Suíça) a partir de um vector pGEM[®]-T Easy Vector (Figura 2.3; Promega, Estados Unidos).

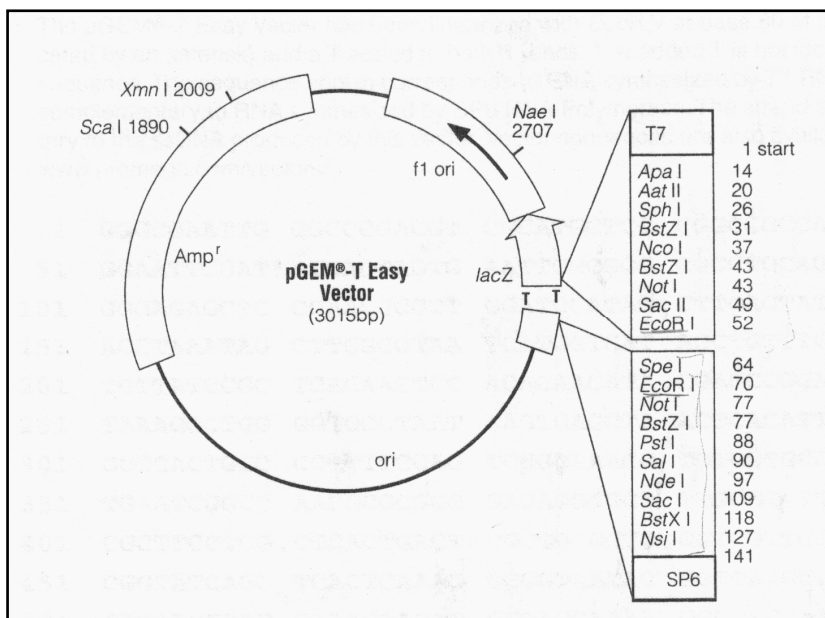


Figura 2.2 - Mapa do vector pGEM-T Easy Vector. Estão demonstradas as zonas promotoras SP6 e T7. Adaptado de: Promega Technical Manual N°042.

Linearização e Purificação do Plasmídeo

Foram efectuadas duas digestões do plasmídeo TTR: uma com a enzima de restrição *Nco* I e outra com a enzima *Spe* I, com os correspondentes tampões K e M, respectivamente.

Adicionaram-se em dois tubos *ependorf* os reagentes na seguinte ordem: 30 μ l de plasmídeo; 13 μ l de H₂O estéril; 5 μ l de tampão K ou 5 μ l de tampão M e 2 μ l da respectiva enzima de restrição *Nco* I ou *Spe* I, num volume total de 50 μ l.

Os *ependorfs* foram incubados durante 2 horas a 37°C e em seguida purificou-se através de um kit de purificação de DNA (Wizard SV gel and PCR Clean-up system; Promega, Estados Unidos). A linearização do molde de DNA foi confirmada por electroforese em gel de agarose (apêndice C).

Síntese de Ribossondas - DIG RNA Labelling Kit (SP6/T7)

Adicionaram-se em dois tubos *ependorf* os reagentes na seguinte ordem: 4 μ l do plasmídeo purificado (DNA); 2 μ l de nucleótidos (dNTP's); 2 μ l de tampão 10X (tampão de transcrição); 10 μ l de H₂O-DEPC e 2 μ l da RNA polimerase específica (SP6 ou T7), num volume final de 20 μ l. Agitou-se. Incubou-se 2 horas a 37°C.

De seguida incubou-se durante 15 minutos com 2 μ l de DNase I a 37°C. Parou-se a reacção por adição de 2 μ l de EDTA 0,2M (pH=8,0). A formação das ribossondas foi confirmada por electroforese em gel de agarose.

Purificação e Análise

As ribossondas foram precipitadas por adição de 2,5 μ l de cloreto de lítio (LiCl) 4M e 75 μ l de etanol absoluto (100%). Incubou-se “*overnight*” a -80°C.

Centrifugou-se a 12000rpm durante 15 minutos a 4°C e eliminou-se o sobrenadante. Lavou-se o “*pellet*” formado com 50 μ l de etanol 70% com H₂O-DEPC. Centrifugou-se novamente a 12000rpm durante 15 minutos a 4°C e eliminou-se o sobrenadante. Deixou-se o “*pellet*” secar (5 minutos em gelo com tampa aberta) e ressuspendeu-se em 44 μ l de H₂O-DEPC.

A qualidade dos transcritos de RNA formados foi analisada por electroforese em gel de agarose. As sondas foram armazenadas em alíquotas de 5 μ l a -80°C.

O protocolo que é descrito a seguir para a ISH compreende, em síntese, quatro etapas principais: a) preparação do tecido em estudo; b) reacção de hibridação, onde há o emparelhamento da sonda com a sequência “alvo”; c) lavagens dos híbridos formados e d) detecção imunológica dos híbridos.

2.3.2 - Procedimento para a detecção da TTR por Hibridação *In Situ*

A hibridação *in situ* foi realizada em secções de parafina (5µm) fixadas em PFA, correspondentes às diferentes zonas do tecido cerebral. Para cada amostra de tecido, foram utilizadas duas lâminas: uma para a sonda anti-senso (*antisense*) T7 e outra para a sonda senso (*sense*) SP6 (controlo negativo). Cada lâmina foi analisada em 3 secções diferentes. Na figura 2.3 está sumarizado o procedimento a seguir descrito.

Preparação do Tecido

Procedeu-se à desparafinação das lâminas em estudo: as lâminas foram colocadas num banho de xileno durante 5 minutos. Repetiu-se este passo.

De seguida as secções foram re-hidratadas: as lâminas foram colocadas em etanol absoluto (Riedel-de Haën, Alemanha) durante 2 minutos. Repetiu-se este passo. O excesso de etanol foi retirado e procedeu-se à colocação das lâminas em etanol a 95% durante 5 minutos. Repetiu-se o processo com etanol a 70% e 50%.

Depois procedeu-se à lavagem rápida (≈ 15 segundos) das lâminas em H₂O-DEPC (apêndice B). Repetiu-se este passo. As lâminas foram em seguida colocadas em DEPC-PBS durante 5 minutos. Repetiu-se este passo.

Posteriormente as secções foram permeabilizadas com uma solução de permeabilização (apêndice B) a 37°C durante 30 minutos. No final da incubação, as lâminas foram lavadas em PBS+2mg/ml glicina, durante 1 minuto.

Depois as lâminas foram fixadas em PFA 4% (apêndice B) durante 10 minutos. Em seguida foram lavadas com PBS-1X durante 5 minutos. Repetiu-se este passo.

Hibridação

Após este tempo, limpou-se cuidadosamente à volta das secções de tecido, e incubou-se cada secção com $\approx 150\mu\text{L}$ da solução de pré-hibridação (apêndice B) contendo 50% de formamida (Sigma, Saint Louis, Estados Unidos) durante 2 horas a 45°C, na câmara de hibridação.

De seguida, limpou-se novamente à volta das secções e estas foram hibridadas com a solução de pré-hibridação suplementada com as ribossondas sintetizadas, durante ≈ 18 horas a 45°C, na câmara de hibridação.

Nota: As sondas foram desnaturadas a 80°C, durante 5 minutos e imediatamente colocadas em gelo antes da sua aplicação.

Lavagens

No final da hibridação, as lâminas foram lavadas à temperatura ambiente durante ≈30 segundos em SSC-1X. Depois foram lavadas em SSC-1X a 65°C durante 15 minutos. Repetiu-se este passo. As lâminas foram de seguida imersas em SSC-0,5X a 65°C durante 15 minutos. Repetiu-se este passo. Depois as lâminas foram lavadas em SSC-0,5X durante 10 minutos à temperatura ambiente.

Detecção Imunológica

A seguir, as lâminas foram imersas em TBS-1X durante 5 minutos. Repetiu-se este passo 2 vezes. Posteriormente as secções de tecido foram incubadas com ≈150µL da solução de bloqueio com soro de ovelha (apêndice B) durante 30 minutos à temperatura ambiente.

Depois limpou-se cuidadosamente à volta das secções de tecido, e incubou-se cada secção com ≈150µL de solução de bloqueio com anticorpo anti-DIG (Roche, Basel, Suíça; apêndice B) durante 4 horas à temperatura ambiente. Fez-se uma nova lavagem em TBS-1X durante 5 minutos. Repetiu-se este passo 2 vezes.

Em seguida as secções foram incubadas com a solução 100mM Tris-HCl (pH≈9,5), 100mM NaCl, 50mM MgCl₂ durante 5 minutos à temperatura ambiente.

Procedeu-se à incubação no escuro das secções com ≈150µL de solução de marcação (*staining solution*; apêndice B), que consiste de uma pastilha de NBT/BCIP (4-nitro azul tetrazólio/5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato; Roche, Basel, Suíça) dissolvida em 10mL de água estéril.

Quando as secções adquiriram a intensidade desejada (coloração azul) terminou-se a reacção lavando as lâminas em tampão TE (pH≈7,4).

Finalmente, as lâminas foram lavadas brevemente em H₂O-DEPC, desidratadas em concentrações graduais de etanol e em xilol e de seguida montadas em meio Entellan® (Merck, Alemanha) com lamelas de vidro.

As lâminas com os híbridos formados durante a reacção de ISH foram visualizadas usando um microscópio Carl Zeiss Primo Star, equipado com câmara Canon Power Shot A640, num computador com o software AxioVision Release 4.6.3.

Secção de tecido

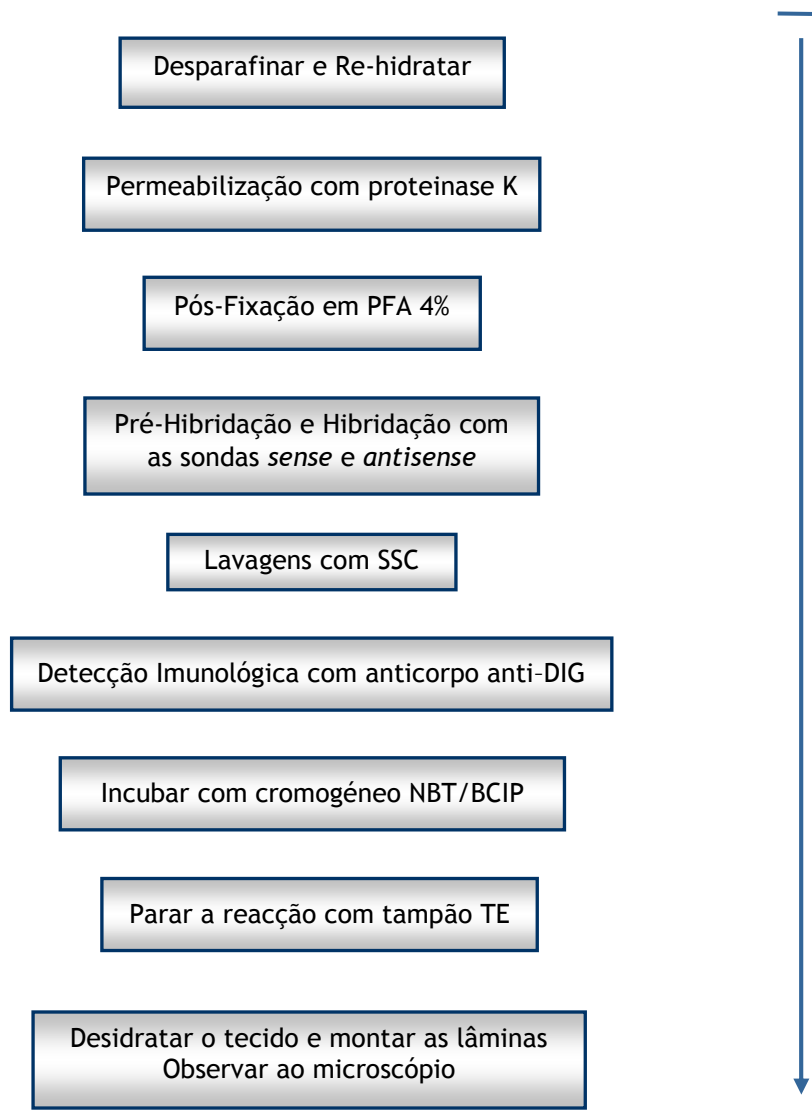
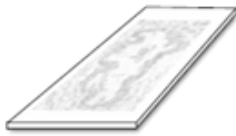


Figura 2.3 - Diagrama global da técnica de hibridação *in situ* utilizada.

2.4 - Imunohistoquímica

Para complementar as experiências de ISH foram realizados ensaios imunohistoquímicos utilizando anticorpos policlonais anti-TTR para tentar confirmar a distribuição e localização da TTR ao longo dos tecidos cerebrais.

A IHC tem-se tornado uma técnica crucial e é largamente utilizada tanto em laboratórios de investigação médica como no diagnóstico clínico (Gown, 2002). Este método teve origem no trabalho de Albert Coons à mais de 60 anos atrás (Coons *et al.*, 1941) e tornou-se largamente aceite nos anos 90, permanecendo até à actualidade como um dos mais eficazes instrumentos de investigação disponíveis (Johnson, 1999).

A IHC é um processo em múltiplos passos, particularmente sensível, cujo objectivo principal é a detecção da presença de uma proteína específica em células e tecidos (Scoazec *et al.*, 2003). Todas as técnicas imunohistoquímicas baseiam-se nos mesmos princípios básicos: a) um anticorpo específico gerado para a proteína de interesse reage com o tecido em estudo, ligando-se ao antigénio celular; b) o complexo anticorpo-antigénio formado é visualizado por métodos de detecção colorimétricos ou fluorescentes (Gown, 2002), que permitem a detecção da marcação originada, a qual pode ser observada e compreendida de forma mais detalhada ao microscópio (Scoazec *et al.*, 2003).

As condições óptimas para a detecção imunohistoquímica devem ser determinadas para cada situação individual, dependo de diversas variáveis como o tipo de amostra e anticorpo, disponibilidade de antigénios, afinidade antigénio-anticorpo e método de detecção (Boenisch, 2001).

As diluições do anticorpo, assim como a temperatura e tempo de incubação, estão proximamente interligadas nos efeitos produzidos na qualidade da marcação imunohistoquímica. Estes factores podem ser alterados independentemente ou de forma complementar, de forma a provocar alterações na marcação obtida, com a finalidade de obter uma marcação específica óptima com uma interferência mínima da marcação de fundo (Boenisch, 2001).

Anticorpos

Os reagentes “pivot” comuns a todas as técnicas imunohistoquímicas são os anticorpos. Estes são proteínas produzidas por células do nosso sistema imunitário (linfócitos B) em resposta à invasão por moléculas estranhas, denominadas de antigénios, aos quais se ligam permitindo a sua eliminação da corrente sanguínea e linfa (Boenisch, 2001).

Os anticorpos pertencem a um grupo de proteínas denominadas de imunoglobulinas (Figura 2.4) que englobam 5 classes principais: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. Cada imunoglobulina é composta por 4 cadeias polipeptídicas: duas cadeias pesadas (H) idênticas e duas cadeias leves (L) também idênticas, interligadas por ligações covalentes de pontes de dissulfeto que conferem maior estabilidade à molécula de imunoglobulina. O anticorpo mais usado em procedimentos imunoquímicos é o da classe IgG, que é a predominante no soro humano, constituindo aproximadamente 75% das imunoglobulinas totais (Boenisch, 2001).

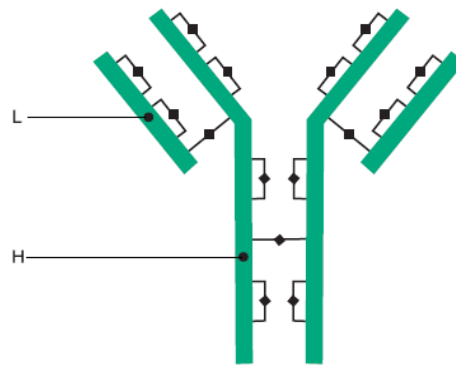


Figura 2.4 - Diagrama com a estrutura de uma molécula de imunoglobulina.

Adaptado de: Boenisch, 2001.

O local estrutural de um antígeno ao qual um anticorpo complementar pode ligar-se especificamente é denominado de epítipo. A gama de possíveis locais de ligação é enorme. Cada potencial local de ligação possui as suas próprias propriedades estruturais derivadas de ligações covalentes, iónicas e interacções hidrofílicas e hidrofóbicas. Para ocorrer uma interacção eficiente entre o antígeno e o anticorpo (Figura 2.5), o epítipo deve estar imediatamente disponível para ligação. Se a molécula alvo está desnaturada, por exemplo devido à fixação ou mudança de pH, o epítipo pode ficar alterado e desta forma afectar a sua capacidade para interagir com um anticorpo (Boenisch, 2001).

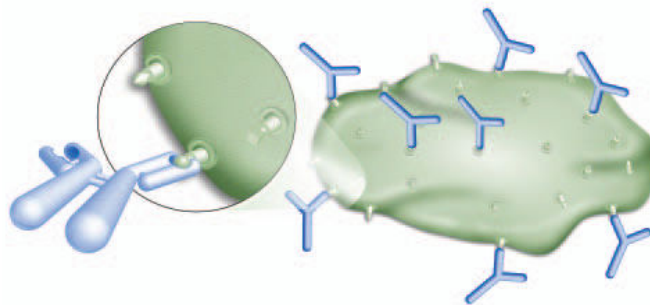


Figura 2.5 - Diagrama representativo da ligação do anticorpo a um epítipo do antígeno.

Adaptado de: Boenisch, 2001.

Os anticorpos são produzidos e purificados em duas formas básicas para uso como reagentes em imunoenaios: policlonais e monoclonais (Boenisch, 2006).

Anticorpos Policlonais

Muitos dos anticorpos utilizados nas técnicas imunológicas são produzidos por imunização repetida de um animal como por exemplo o coelho, cabra ou ovelha com uma suspensão do antígeno em estudo, embora o mais frequentemente utilizado na produção de anticorpos policlonais seja o coelho. A mistura de anticorpos policlonais (Figura 2.6) resultante é imunologicamente diferente e desta forma pode reconhecer e reagir com vários epítopos no antígeno contra o qual foram gerados (Boenisch, 2006).

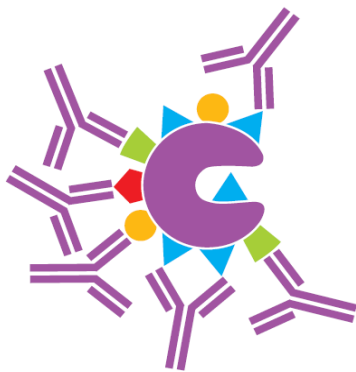


Figura 2.6 - Diagrama da ligação de anticorpos policlonais a vários epítopos de um antígeno.

Adaptado de: Boenisch, 2006.

Anticorpos Monoclonais

Os anticorpos monoclonais (Figura 2.7) são o produto de um clone individual de células do plasma e consequentemente são idênticos imunologicamente, ou seja possuem especificidade de ligação para um epítipo particular no antígeno contra o qual foram gerados (Boenisch, 2006).

Por outro lado, embora apresentem elevada homogeneidade e ausência de anticorpos não específicos, são mais vulneráveis à perda do epítipo mediante tratamento químico do antígeno, relativamente aos anticorpos policlonais (Boenisch, 2006).

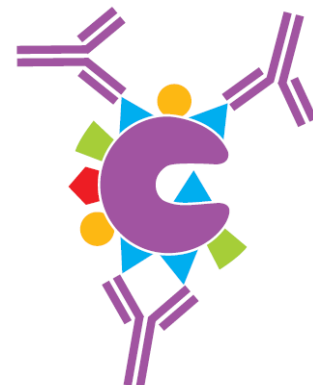


Figura 2.7 - Diagrama da reação de um anticorpo monoclonal com um epítipo específico de um antígeno.

Adaptado de: Boenisch, 2006.

Os anticorpos usados nas técnicas de IHC podem ser detectados utilizando um método directo e/ou indirecto (Boenisch, 2001).

Método Directo

O método directo (Figura 2.8) baseia-se numa reacção entre um anticorpo primário ligado a uma enzima e o antigénio presente no tecido em estudo (Boenisch, 2001).



Figura 2.8 - Diagrama representativo do método directo: o anticorpo primário ligado à enzima reage com o antigénio do tecido¹.

Adaptado de: Boenisch, 2001.

O uso subsequente de um substrato cromogénico finaliza a sequência da reacção. A activação enzimática do cromogénico resulta num produto visível da reacção no local do antigénio (Boenisch, 2001).

Uma vez que este método utiliza apenas um anticorpo, pode ser completado rapidamente, limitando as reacções não-específicas. No entanto, dado que a marcação envolve apenas um anticorpo ligado, obtém-se um pequeno sinal de amplificação e este método deixou de ser suficientemente sensível para as exigências actuais (Boenisch, 2001).

Método Indirecto

Relativamente ao método indirecto, este pode ser dividido em dois ou três passos (Boenisch, 2001).

No método indirecto em dois passos (Figura 2.9), um anticorpo primário não conjugado liga-se primeiramente ao antigénio. Depois aplica-se um anticorpo secundário ligado a enzima, direccionado contra o anticorpo primário (agora antigénio), seguido da aplicação de uma solução substrato-cromogénico. Por exemplo, se o anticorpo primário é feito a partir de coelho ou rato, o anticorpo secundário tem de ser dirigido contra imunoglobulinas de coelho ou rato, respectivamente (Boenisch, 2001).





Figura 2.9 - Diagrama representativo do método indirecto em dois passos: o anticorpo *secundário* ligado a enzima reage com anticorpo primário ligado ao antígeno do tecido¹.

Adaptado de: Boenisch, 2001.

Este método é mais versátil que o método directo devido à diversidade de anticorpos primários da mesma espécie que podem ser usados com o mesmo anticorpo secundário conjugado. O procedimento também é mais sensível que o método directo na medida em que diversos anticorpos secundários são prováveis de reagir com vários epítomos diferentes do anticorpo primário, amplificando assim o sinal, ao aumentar o número de moléculas de enzima ligadas por cada local “alvo” (Boenisch, 2001).

No método indirecto em três passos (Figura 2.10) é adicionado um segundo anticorpo conjugado com enzima relativamente ao método indirecto descrito anteriormente. Os dois anticorpos secundários conjugados com enzima são aplicados sequencialmente e têm de estar conjugados com a mesma enzima (Boenisch, 2001).



Figura 2.10 - Diagrama representativo do método indirecto em três passos: o anticorpo *terciário* ligado a enzima reage com o anticorpo secundário ligado a enzima¹.

Adaptado de Boenisch, 2001.

A adição de uma terceira camada de anticorpo favorece a amplificação do sinal, uma vez que mais anticorpos são capazes de estabelecer ligação ao reagente

¹

Antígeno tecidual Anticorpo primário Anticorpo secundário Enzima fosfatase alcalina Biotina Streptavidina

secundário ligado previamente. Este procedimento é particularmente útil quando são marcados antígenos com um número limitado de epítomos (Boenisch, 2001).

Métodos Avidina - Biotina

A maioria dos métodos de marcação imunohistoquímica utilizada nos dias de hoje baseia-se na elevada afinidade que a (*strept*) *avidin* (*streptomyces avidini*; streptavidina) e a *avidin* (avidina) têm pela biotina. Ambas possuem quatro locais de ligação para a biotina mas, devido à orientação molecular dos locais de ligação, menos de quatro moléculas vão realmente ligar-se. A avidina é muito solúvel em água e soluções de sais aquosas, é estável numa ampla gama de pH e temperatura e as modificações químicas têm pouco efeito na sua actividade, tornando-a útil na detecção e purificação de proteínas. A elevada afinidade com que a streptavidina e a avidina ligam a biotina leva a que nestes métodos se liguem especificamente aos anticorpos secundários *biotinylated*. A streptavidina produz uma menor marcação de fundo que a avidina e tem vindo a substituir largamente os métodos que usam esta última (Key, 2006).

A molécula de biotina conjuga-se facilmente com anticorpos e enzimas. No método do complexo avidina-biotina (ABC; Figura 2.11), os anticorpos secundários estão conjugados com a biotina e funcionam como elos de ligação entre os anticorpos primários que estão ligados ao tecido e o complexo avidina-biotina-peroxidase (Key, 2006).

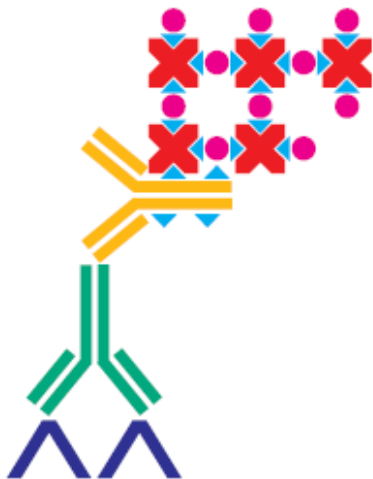


Figura 2.11 - Diagrama representativo do método do complexo avidina-biotina (ABC)¹.

Adaptado de: Key, 2006.



A *Horseradish peroxidase* (HRP) é a enzima mais usada para estes métodos. Esta tem um grupo heme (hematina) no seu sítio activo e, em solução adquire coloração castanha. A hematina da HRP forma em primeiro lugar um complexo com o peróxido de hidrogénio e depois causa a sua decomposição em água e oxigénio atómico, oxidando ao mesmo tempo um dador de electrões: 3,3'- diaminobenzidina (DAB) (Boenisch, 2006).

Existem vários dadores de electrões, que quando oxidados, tornam-se produtos insolúveis com coloração, razão pela qual são denominados cromogéneos. Estas propriedades tornam estes dadores muito úteis nas técnicas imunohistoquímicas, como por exemplo a DAB que produz um produto castanho altamente insolúvel em álcool e outros solventes orgânicos (Boenisch, 2006).

2.4.1 - Procedimento para a detecção imunohistoquímica da TTR utilizando o Rabbit ExtrAvidin® Peroxidase staining kit (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Estados Unidos)

A IHC foi realizada em secções de parafina (5µm) fixadas em PFA, correspondentes a diferentes zonas do cérebro dos animais em estudo.

Este kit consiste de *ExtrAvidin® Peroxidase e Biotinylated goat anti rabbit IgG*. A *ExtrAvidin* é um reagente *avidin* que combina a elevada actividade específica e sensibilidade da *avidin* com uma baixa marcação da *streptavidin* (informação do produto).

Para cada amostra de tecido, foram utilizadas duas lâminas: uma para o controlo negativo e a outra para a marcação imunohistoquímica. Cada lâmina foi analisada em 3 secções diferentes. A figura 2.12 sistematiza todo o procedimento descrito a seguir.

As secções em estudo foram desparafinadas e re-hidratadas numa série de soluções de etanol com concentrações decrescentes: as lâminas foram colocadas num banho de xilol durante 5 minutos. Repetiu-se este passo. O excesso de xilol foi retirado e as lâminas foram colocadas em etanol absoluto (Riedel-de Haën, Alemanha) durante 3 minutos. Repetiu-se este passo. O excesso de etanol foi retirado e procedeu-se à colocação das lâminas em etanol a 95%, durante 3 minutos. Repetiu-se o processo com etanol a 80%. Seguidamente colocaram-se as lâminas sob água corrente da torneira durante 30 segundos.

As secções de tecido foram delimitadas e de seguida cada secção foi incubada com ≈150µL de peróxido de hidrogénio (H₂O₂ 3%; apêndice A) durante 5 minutos à temperatura ambiente, de forma a inibir a actividade da peroxidase endógena.

Procedeu-se à lavagem das lâminas em PBS com Tween[®]-20 (PBS-T; Amresco, Estados Unidos; apêndice A). Este detergente é utilizado de forma a diminuir a marcação de fundo inespecífica dos tecidos. Depois as lâminas foram colocadas num banho com agitação durante 2 minutos.

Posteriormente cada secção de tecido foi incubada com soro de cabra durante 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS-T e colocadas num banho com agitação durante 5 minutos.

Passado este tempo, limpou-se cuidadosamente à volta das secções, e incubou-se cada secção com $\approx 150\mu\text{L}$ de anticorpo primário policlonal de coelho anti-TTR (DakoCytomation, Carpinteria, Estados Unidos, 1:200 em PBS com 1% BSA; apêndice A) durante 1 hora. O controlo negativo foi realizado em PBS com 1% BSA em vez de anticorpo. As lâminas foram imersas em PBS-T e depois foram colocadas num banho com agitação durante 5 minutos.

As secções foram depois incubadas com $\approx 150\mu\text{L}$ de anticorpo secundário (*biotinylated goat anti-rabbit IgG*; 1:20 em PBS com 1% BSA; apêndice A), durante 1 hora à temperatura ambiente. De seguida, as lâminas foram lavadas em PBS-T e colocadas num banho com agitação durante 5 minutos.

Incubaram-se as secções com o conjugado (*ExtrAvidin-Peroxidase*; 1:20 em PBS com 1% BSA; apêndice A), durante 30 minutos à temperatura ambiente. Fez-se uma nova lavagem em PBS-T e depois um banho com agitação durante 5 minutos.

Limpou-se cuidadosamente à volta das secções e cobriu-se cada secção com $\approx 150\mu\text{L}$ de uma solução substrato que consiste de uma pastilha de diaminobenzidina (DAB, Sigma, Estados Unidos), dissolvida em 15mL de TBS (pH=7,6). Depois adicionou-se, aquando da utilização, 6 μL de H₂O₂ a 100%; apêndice A.

Quando as secções adquiriram a intensidade desejada (coloração castanha) terminou-se a reacção com o uso de água corrente da torneira durante 30 segundos.

As lâminas foram depois imersas em hematoxilina (Richard-Allan Scientific, Estados Unidos) durante 3 minutos e seguidamente lavadas com água corrente da torneira durante 10 minutos. Depois, procedeu-se à desidratação das secções em concentrações graduais de etanol e em xilol. Finalmente, as lâminas foram montadas em meio Entellan[®] (Merck, Alemanha), com lamelas de vidro.

As lâminas dos ensaios imunohistoquímicos contra-coradas com hematoxilina (permite a marcação dos núcleos das células e a observação da histologia normal de cada tecido) foram visualizadas usando um microscópio Carl Zeiss Primo Star, equipado com câmara Canon Power Shot A640, num computador com o software AxioVision Release 4.6.3.

Secção de tecido

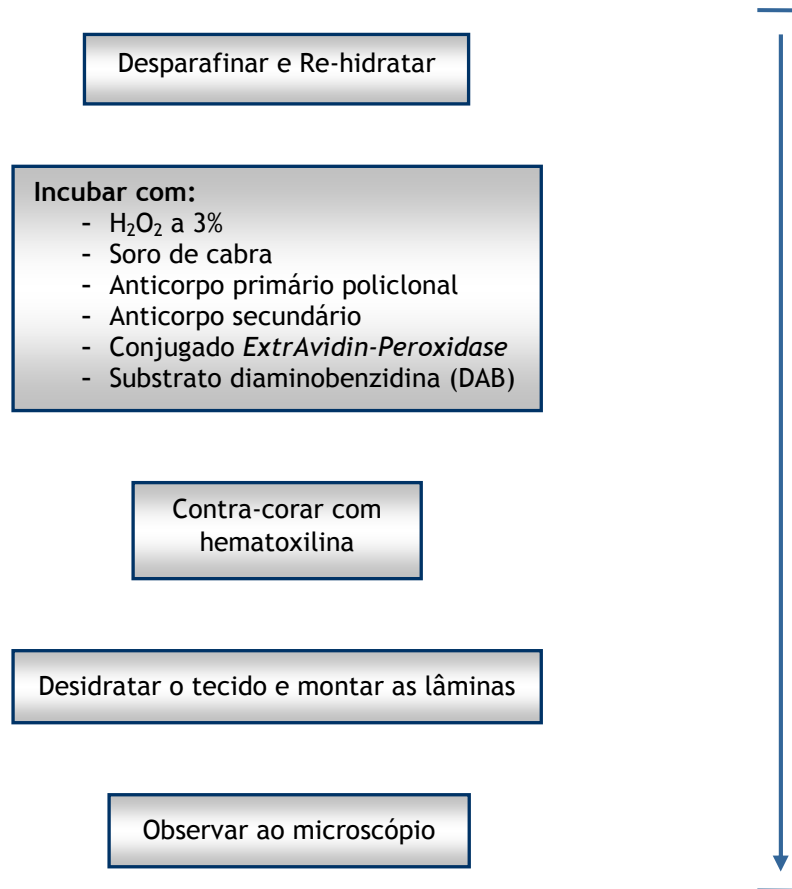
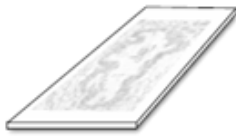


Figura 2.12 - Diagrama global da técnica de imunohistoquímica utilizada. Entre cada incubação foram efectuadas lavagens em PBS com Tween[®]-20.

2.5 - Coloração por Hematoxilina e Eosina

A marcação por hematoxilina e eosina (H/E) é a técnica mais comum usada em histologia animal e patologia de rotina (Young e Heath, 2000).

A hematoxilina é um corante básico que marca as estruturas ácidas com uma coloração azul-púrpura. Os núcleos, ribossomas e o retículo endoplasmático rugoso têm uma forte afinidade para este corante devido ao seu elevado conteúdo de ácidos nucleicos (DNA e RNA). Em contraste a eosina é um corante ácido que cora as estruturas básicas de vermelho ou rosa, como acontece com o citoplasma (Young e Heath, 2000).

2.5.1 - Procedimento para a coloração por Hematoxilina e Eosina

Lâminas representativas de diferentes secções do cérebro foram coradas com hematoxilina e eosina para observar a histologia normal de cada secção de tecido. A hematoxilina marca os núcleos das células, enquanto a eosina cora o citoplasma.

As secções foram desparafinadas em xilol e re-hidratadas em concentrações graduais de etanol (100, 95 e 70%) durante 1 minuto. Em seguida as lâminas foram lavadas em água corrente durante 3 minutos e depois imersas em hematoxilina de Harris (Richard-Allan Scientific, Estados Unidos) por 5 minutos.

Posteriormente as lâminas foram novamente lavadas em água corrente durante 5 minutos (para o desenvolvimento da cor azul). Após este tempo as lâminas foram mergulhadas rapidamente no diferenciador (etanol 70% com 1% de HCl) para remover marcações inespecíficas. De seguida foram lavadas em água corrente por 5 minutos (quanto mais tempo, mais intenso é o azul). As lâminas foram mergulhadas ≈ 2-3 vezes em etanol 70% e em seguida foram coradas com eosina alcoólica (Thermo Shandon, Inglaterra) durante 1 minuto.

Em seguida as secções foram desidratadas em concentrações graduais de etanol (70, 95 e 100%) por 1 minuto e em xilol durante 5 minutos (pode ser mantido no xilol até à montagem). Finalmente, as lâminas foram montadas em meio Entellan® (Merck, Alemanha) com lamelas de vidro.



3. RESULTADOS

3 - Resultados

Ao longo deste trabalho experimental foi estudada a distribuição e expressão da TTR no cérebro de ratinho por ISH em conjunto com IHC.

3.1 - Organização dos Cortes Histológicos

Para este estudo foi efectuada a seriação do cérebro de ratinho desde o lóbulo frontal até ao cerebelo. Na figura 3.1 estão representadas imagens de cortes coronais com 5µm de espessura, correspondentes às secções analisadas, nas quais se obtiveram resultados mais relevantes.

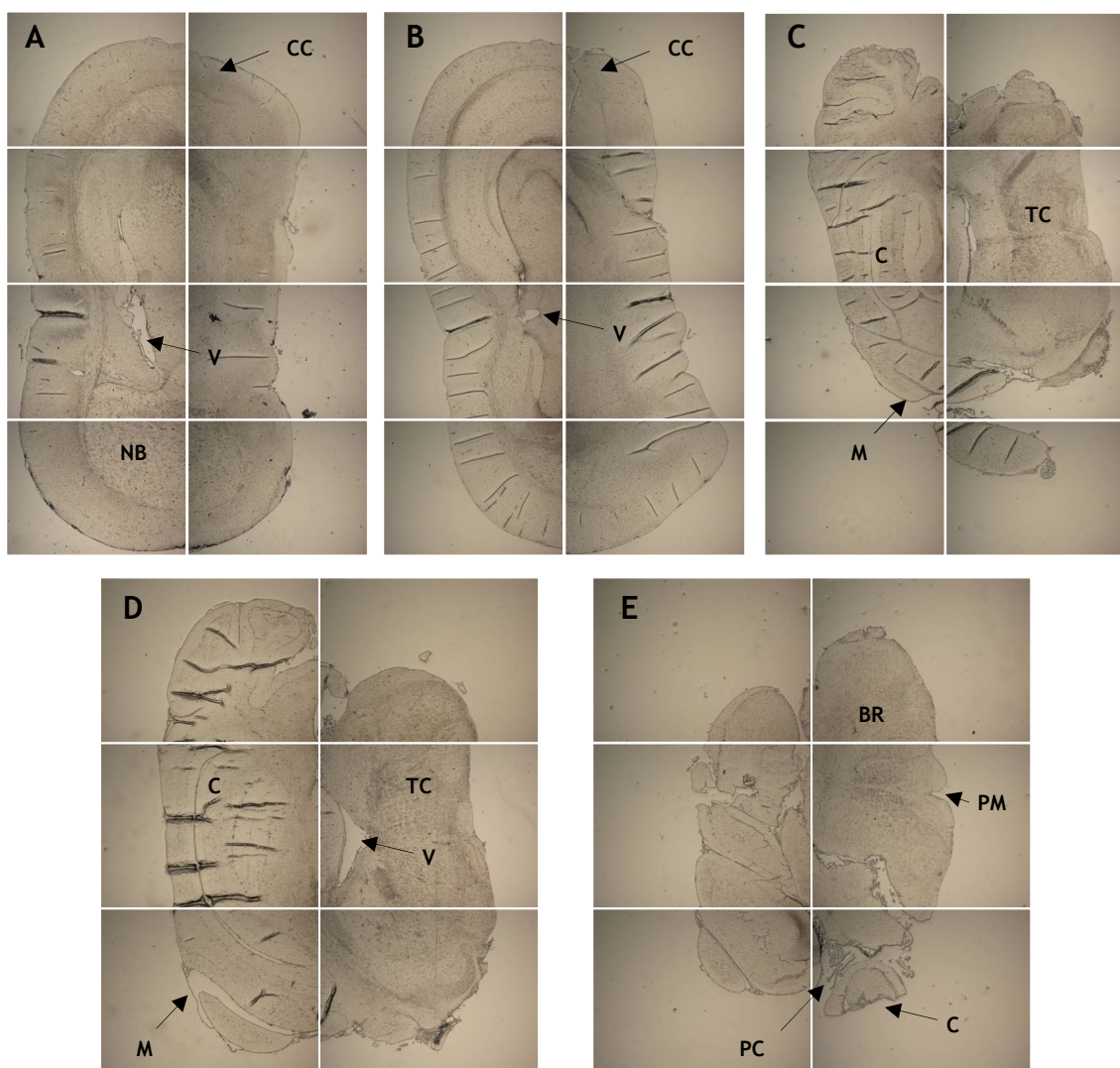


Figura 3.1 - Cortes histológicos coronais das secções mais representativas dos tecidos analisados. A descrição das diferentes secções a seguir referida foi realizada de acordo com o Atlas (Paxinos e Watson, 1998), tendo em consideração a posição do Bregma e Lambda. **A e B** - Secções posteriores ao Bregma onde são visíveis os ventrículos laterais, os núcleos da base e o córtex cerebral; **C e D** - Nestas secções identificam-se o cerebelo

unido ao tronco cerebral. As meninges e o quarto ventrículo cerebral são outras estruturas detectadas; E - Nesta secção é possível reconhecer o bolbo raquidiano, as pirâmides, o cerebelo e o PC do quarto ventrículo. BR - Bolbo raquidiano; C - Cerebelo; CC - Córtex cerebral; M - Meninges; NB - Núcleos da base; PC - Plexo coroideu; PM - Pirâmides; TC - Tronco cerebral; V - Ventrículo cerebral. Ampliação 4x.

3.2 - Expressão do mRNA da Transtirretina em Várias Regiões do Sistema Nervoso Central

A distribuição e localização da TTR foram estudadas ao longo do cérebro de ratinho através de experiências de ISH, que permitiram caracterizar a expressão de transcritos de mRNA para a proteína em estudo.

Plexo Coroideu

Na secção do cérebro correspondente à imagem A da figura 3.1, observa-se a expressão da TTR no PC localizado nos ventrículos laterais (Figura 3.2). Uma análise histológica mais aprofundada permite identificar uma marcação intensa e restrita às células epiteliais da estrutura do PC (Figura 3.3).

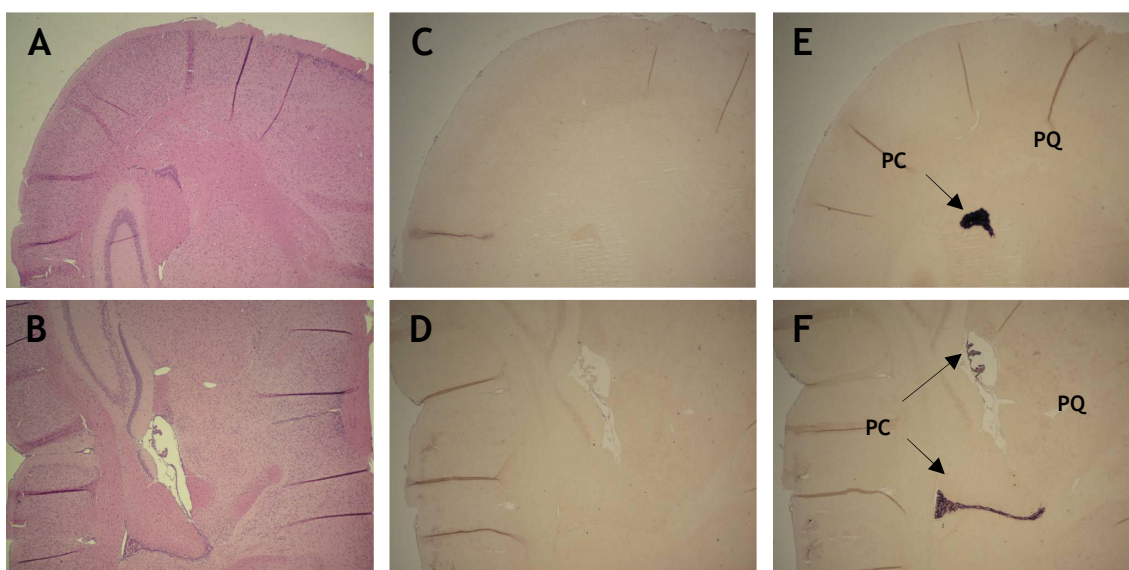


Figura 3.2 - Marcação obtida com H/E (A, B). Expressão da TTR por ISH na secção A da figura 3.1. C, D - Controlo Negativo com sonda *sense* SP6; E, F - Marcação com sonda não radioactiva *antisense* T7. PC- Plexo coroideu; PQ - Parênquima cerebral. Ampliação 4x.

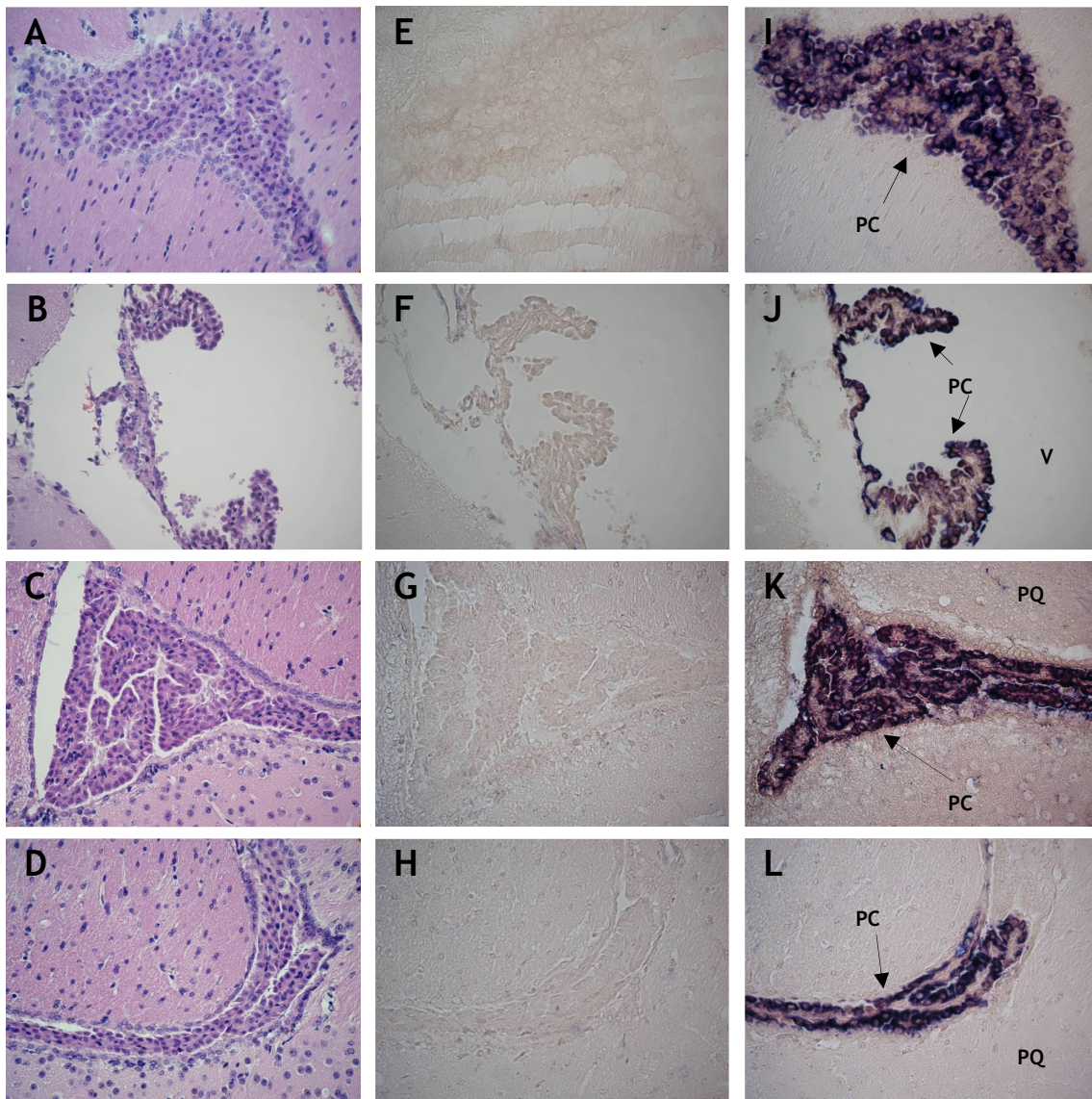


Figura 3.3 - Marcação obtida com H/E (A, B, C, D). Expressão da TTR por ISH na secção A da figura 3.1. E, F, G, H - Controlo Negativo com sonda *sense* SP6; I, J, K, L - Marcação com sonda *antisense* T7. PC- Plexo coroideu; PQ - Parênquima cerebral; V - Ventriculo cerebral. Ampliação 40x.

Similarmente à secção A da figura 3.1, a análise da presença dos transcritos de mRNA na imagem B da mesma figura indica que a TTR está situada nesta secção, também no PC dos ventrículos laterais (Figura 3.4), mais especificamente nas células epiteliais do PC, onde apresenta uma marcação muito intensa (Figura 3.5). Por outro lado não é visível nesta secção do cérebro a expressão do mRNA da proteína nas células endimárias que delimitam os ventrículos, apesar destas possuírem uma morfologia semelhante às células epiteliais do PC (Figura 3.5). A TTR está igualmente ausente de qualquer outra estrutura celular do parênquima cerebral.

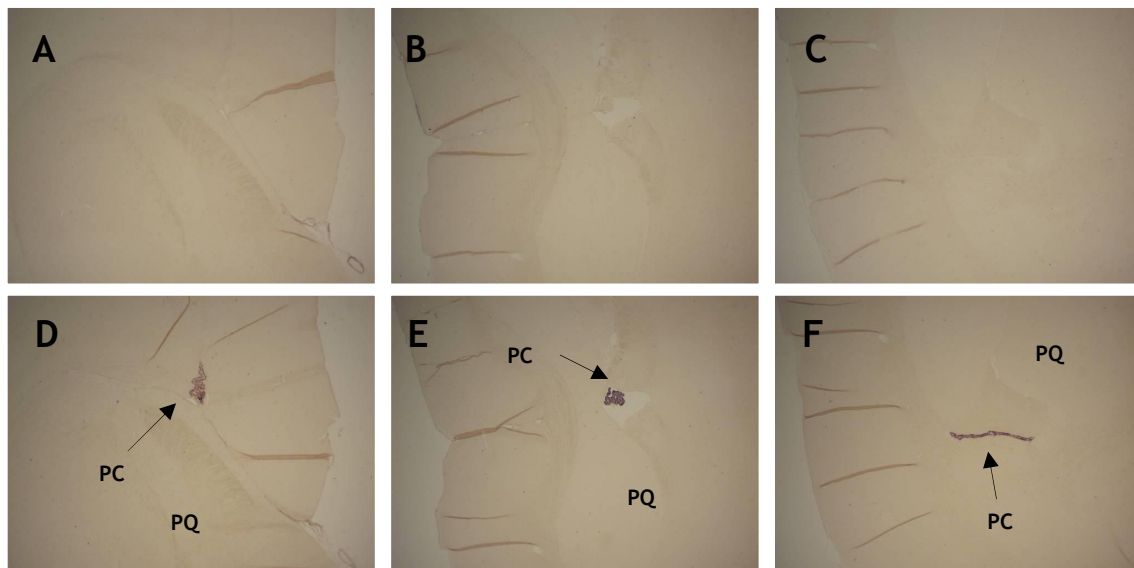


Figura 3.4 - Expressão da TTR por ISH na secção B da figura 3.1. A, B, C - Controlo Negativo com sonda *sense* SP6; D, E, F - Marcação com sonda não radioactiva *antisense* T7. PC- Plexo coroideu; PQ - Parênquima cerebral. Ampliação 4x.

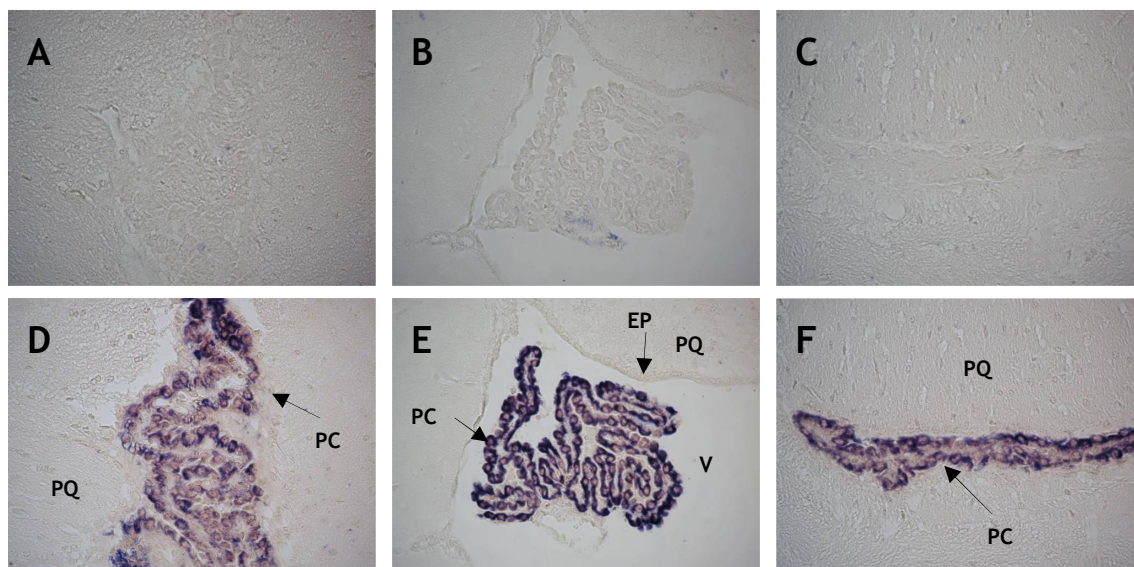


Figura 3.5 - Expressão da TTR por ISH na secção B da figura 3.1. A, B, C - Controlo Negativo com sonda *sense* SP6; D, E, F - Marcação com sonda não radioactiva *antisense* T7. EP - Células ependimárias; PC- Plexo coroideu; PQ - Parênquima cerebral; V - Ventrículo cerebral. Ampliação 40x.

Cerebelo

Para além da marcação obtida para o PC dos ventrículos cerebrais, que constitui a principal fonte estabelecida da TTR no cérebro, foi igualmente observada na secção correspondente à imagem C da figura 3.1 uma expressão desta proteína na

substância cinzenta do córtex cerebeloso (Figura 3.6). Uma análise mais pormenorizada permite identificar a TTR nas células de *Purkinje*, que constituem uma única camada de grandes corpos celulares de neurónios, localizada entre a camada molecular e a camada celular granular (Figuras 3.7 e 3.8).

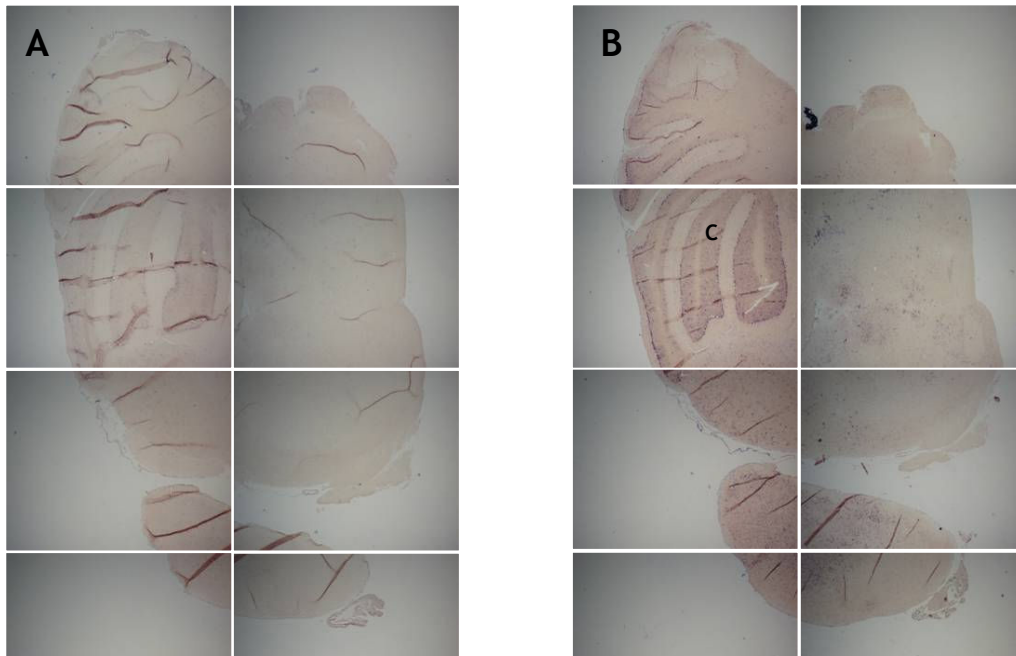


Figura 3.6 - Visão global da expressão da TTR na secção C da figura 3.1. A - Controlo Negativo com sonda *sense* SP6; B - Marcação com sonda *antisense* T7. C - Cerebelo. Ampliação 4x.

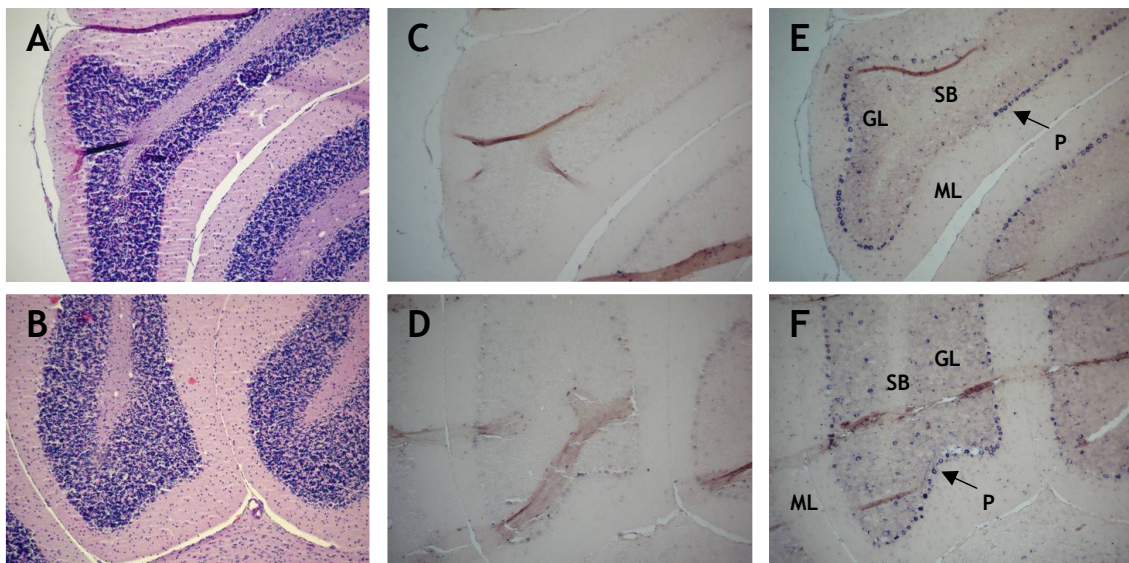


Figura 3.7 - Marcação obtida com H/E (A, B). Expressão da TTR por ISH na secção C da figura 3.1. C, D - Controlo Negativo com sonda *sense* SP6; E, F - Marcação com sonda não

radioactiva *antisense* T7. GL - Camada celular granular; ML - Camada molecular; P- Células de *Purkinje*; SB - Substância Branca. Ampliação 10x.

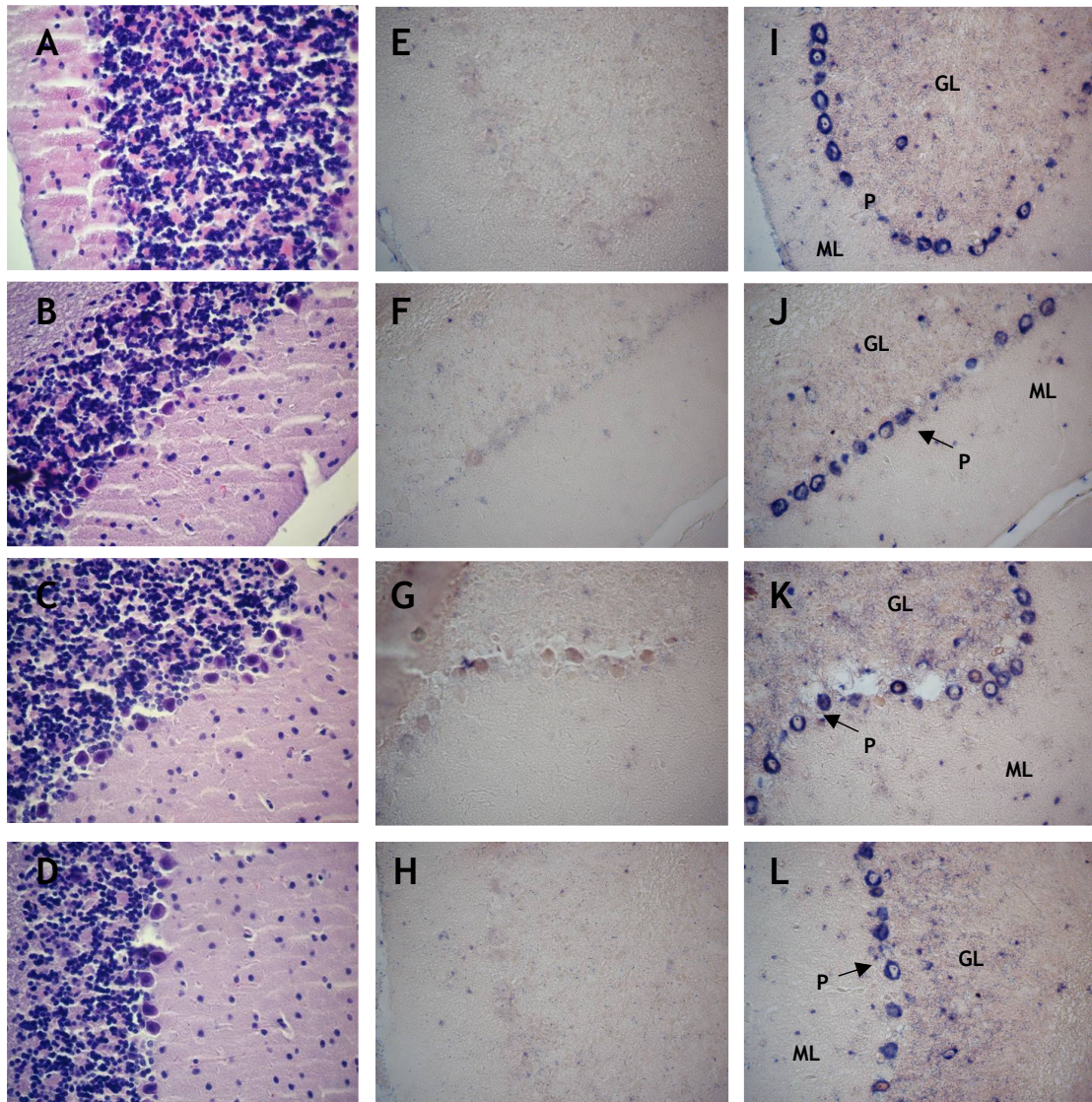


Figura 3.8 - Marcação obtida com H/E (A, B, C, D). Expressão da TTR por ISH na secção C da figura 3.1. E, F, G, H - Controlo Negativo com sonda *sense* SP6; I, J, K, L - Marcação com sonda *antisense* T7. GL - Camada celular granular; ML - Camada molecular; P- Células de *Purkinje*. Ampliação 40x.

Estas evidências foram confirmadas pela expressão obtida para a TTR na imagem D da figura 3.1. Nesta secção visualiza-se de forma análoga à secção anterior, a presença do mRNA da TTR no cerebelo (Figura 3.9). Mais uma vez a TTR está localizada nas células de *Purkinje*, situadas entre as outras duas camadas do córtex cerebeloso já referidas: a camada molecular e a camada celular granular (Figuras 3.10 e 3.11). Adicionalmente a TTR está também presente no PC, localizado no interior do quarto ventrículo cerebral (Figura 3.9 e 3.10). Por último a proteína parece também ser expressa nos núcleos do tronco cerebral (Figura 3.10).

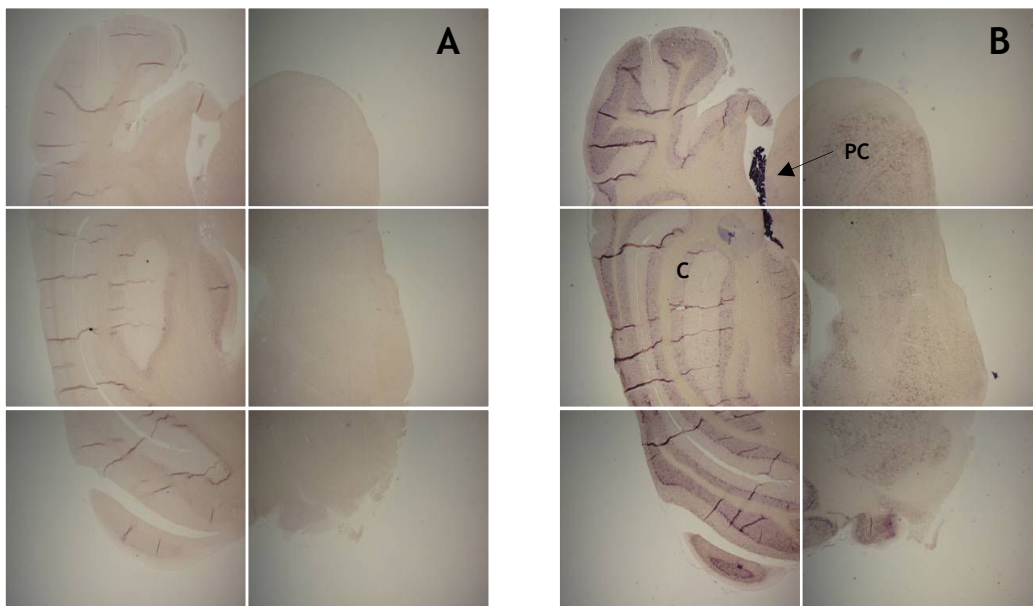


Figura 3.9 - Visão global da expressão da TTR na secção D da figura 3.1. **A** - Controlo Negativo com sonda *sense* SP6; **B** - Marcação com sonda *antisense* T7. **C** - Cerebelo; **PC** - Plexo coroideu do quarto ventrículo cerebral. Ampliação 4x.

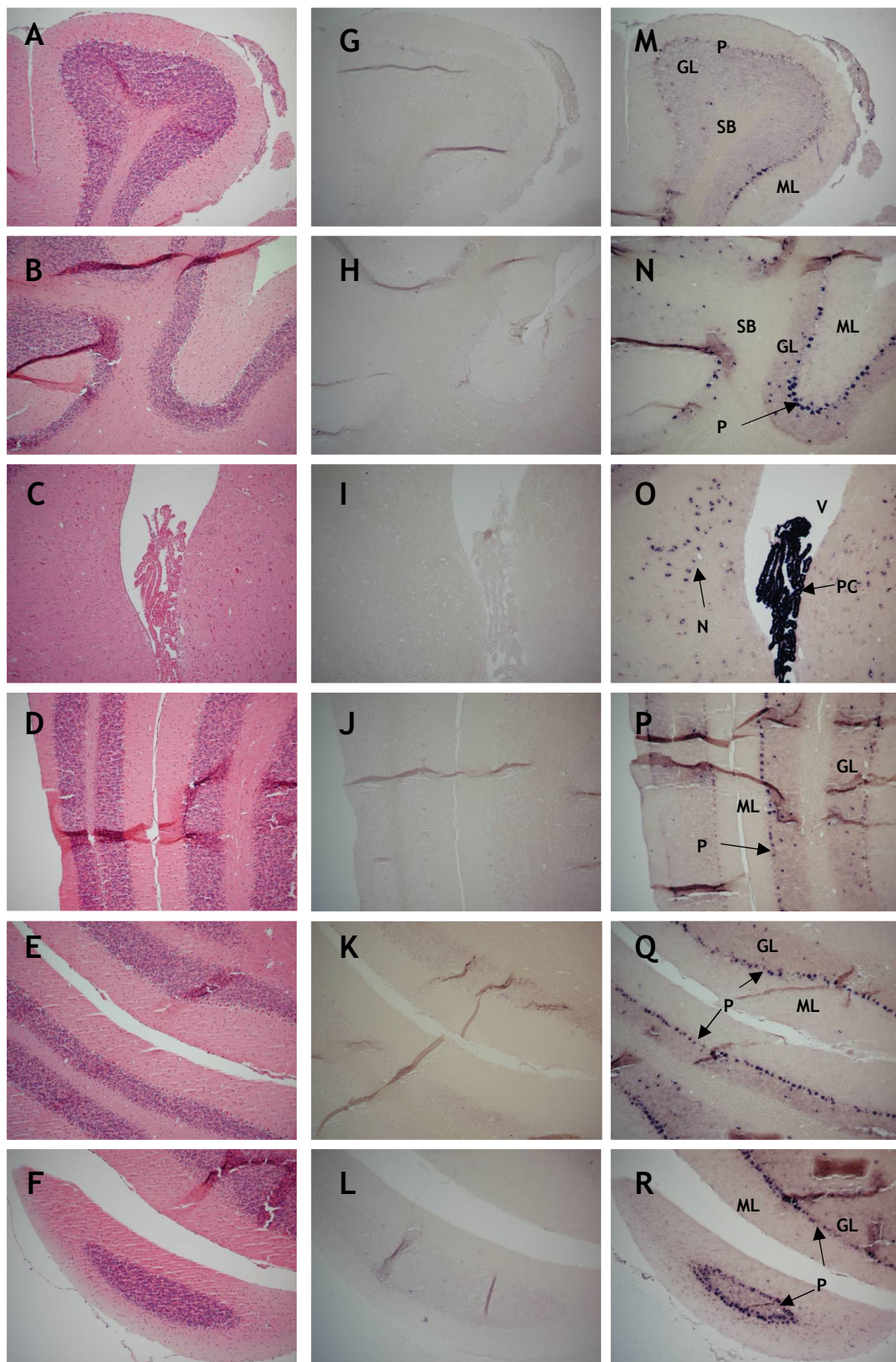


Figura 3.10 - Marcação obtida com H/E (A, B, C, D, E, F). Expressão da TTR por ISH na secção D da figura 3.1. G, H, I, J, K, L -Controlo Negativo com sonda *sense* SP6; M, N, O, P, Q, R - Marcação com sonda *antisense* T7. GL - Camada celular granular; ML - Camada

molecular; N - Núcleos do tronco cerebral; P- Células de *Purkinje*; PC - Plexo coróideu do quarto ventrículo cerebral; SB - Substância Branca; V - Ventrículo cerebral. Ampliação 10x.

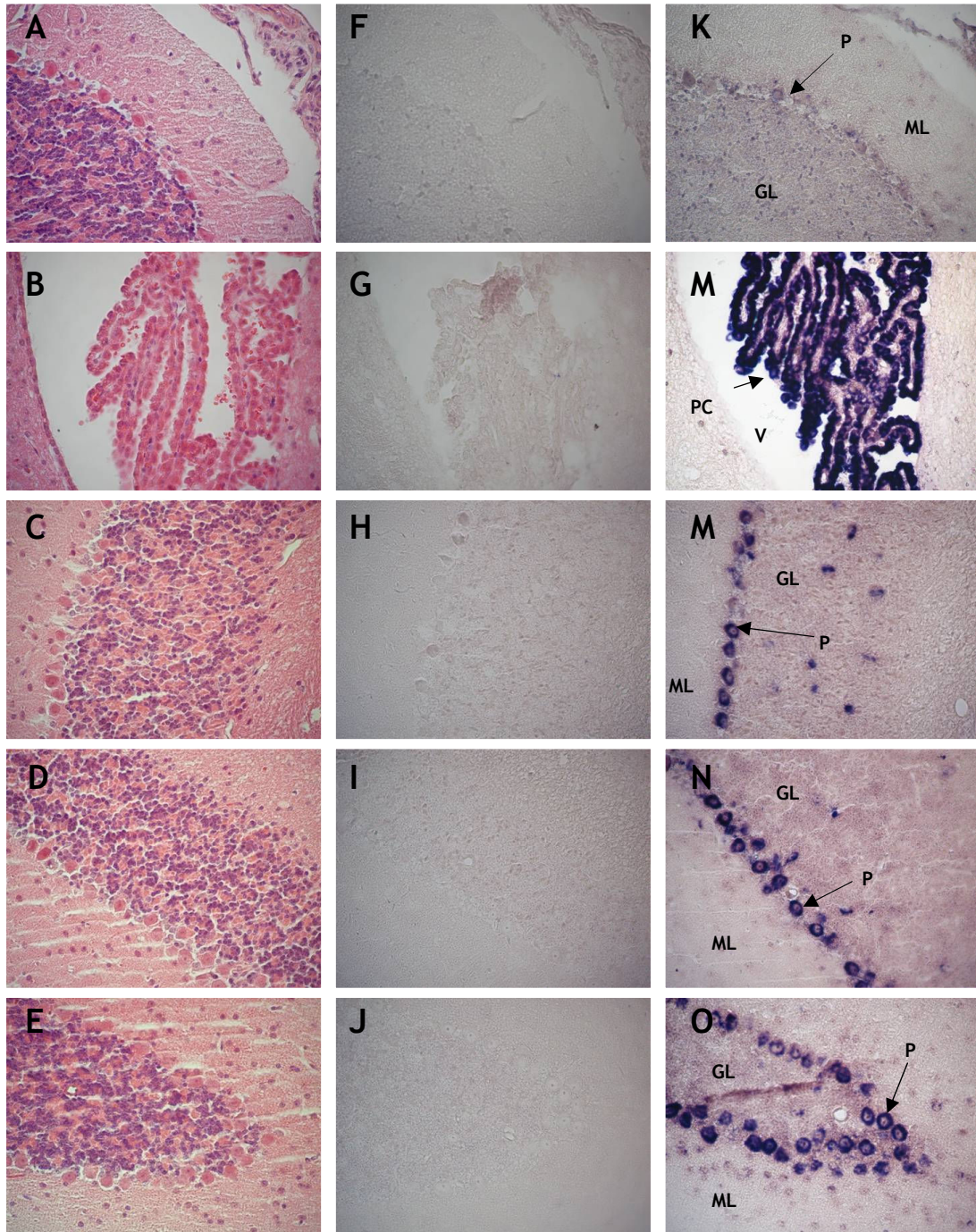


Figura 3.11 - Marcação obtida com H/E (A, B, C, D, E). Expressão da TTR por ISH na secção D da figura 3.1. F, G, H, I, J -Controlo Negativo com sonda *sense* SP6; K, L, M, N, O - Marcação com sonda *antisense* T7. GL - Camada celular granular; ML - Camada molecular; P- Células de *Purkinje*; PC - Plexo coróideu; V - Ventrículo cerebral. Ampliação 40x.

Bolbo Raquidiano

A marcação obtida para o mRNA da TTR na secção E da figura 3.1 apresenta indícios de uma expressão desta proteína distribuída ao longo de outra estrutura do encéfalo, o bolbo raquidiano (Figura 3.12). Uma análise mais detalhada sugere que esta expressão está localizada nos núcleos olivares e dorsais (Figuras 3.13 e 3.14). Nesta secção é ainda visível a expressão da TTR nas células de *Purkinje* do cerebello (Figura 3.14).

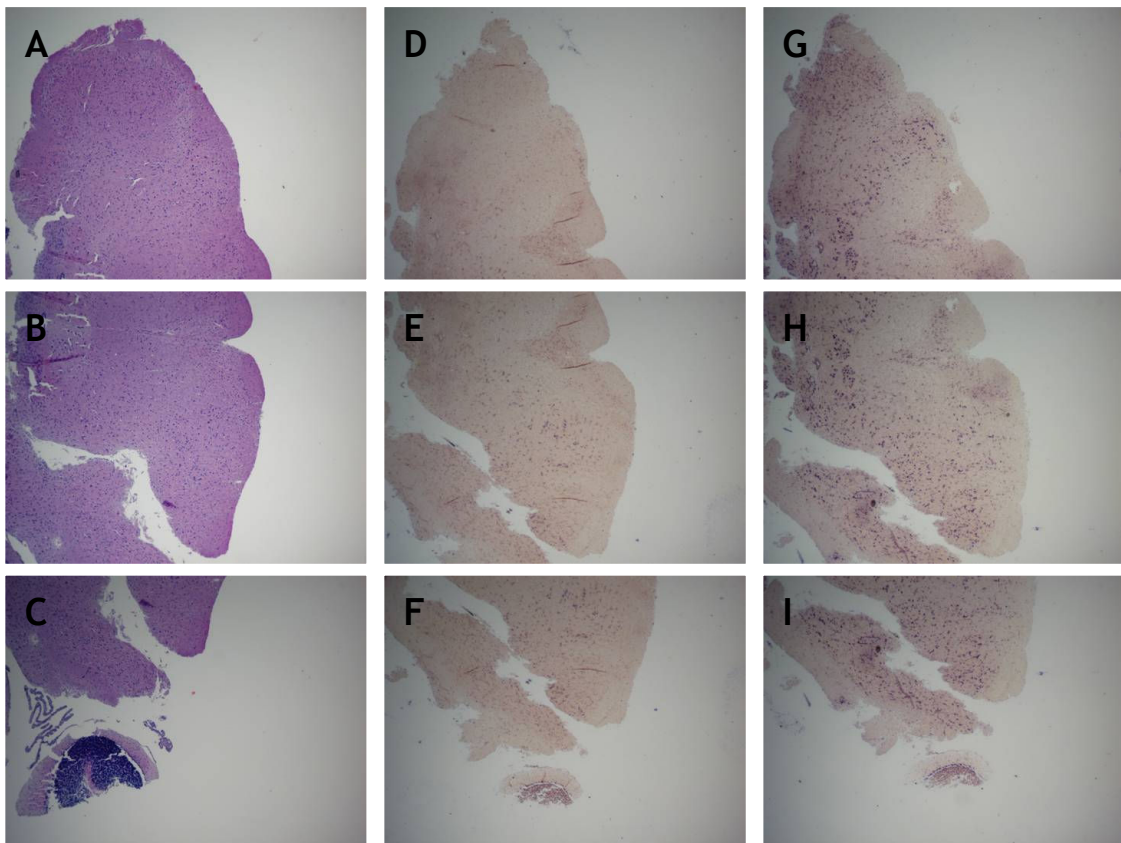


Figura 3.12 - Marcação obtida com H/E (A, B, C). Expressão da TTR por ISH na secção E da figura 3.1. D, E, F - Controlo Negativo com sonda *sense* SP6; G, H, I - Marcação com sonda *antisense* T7. Ampliação 4x.

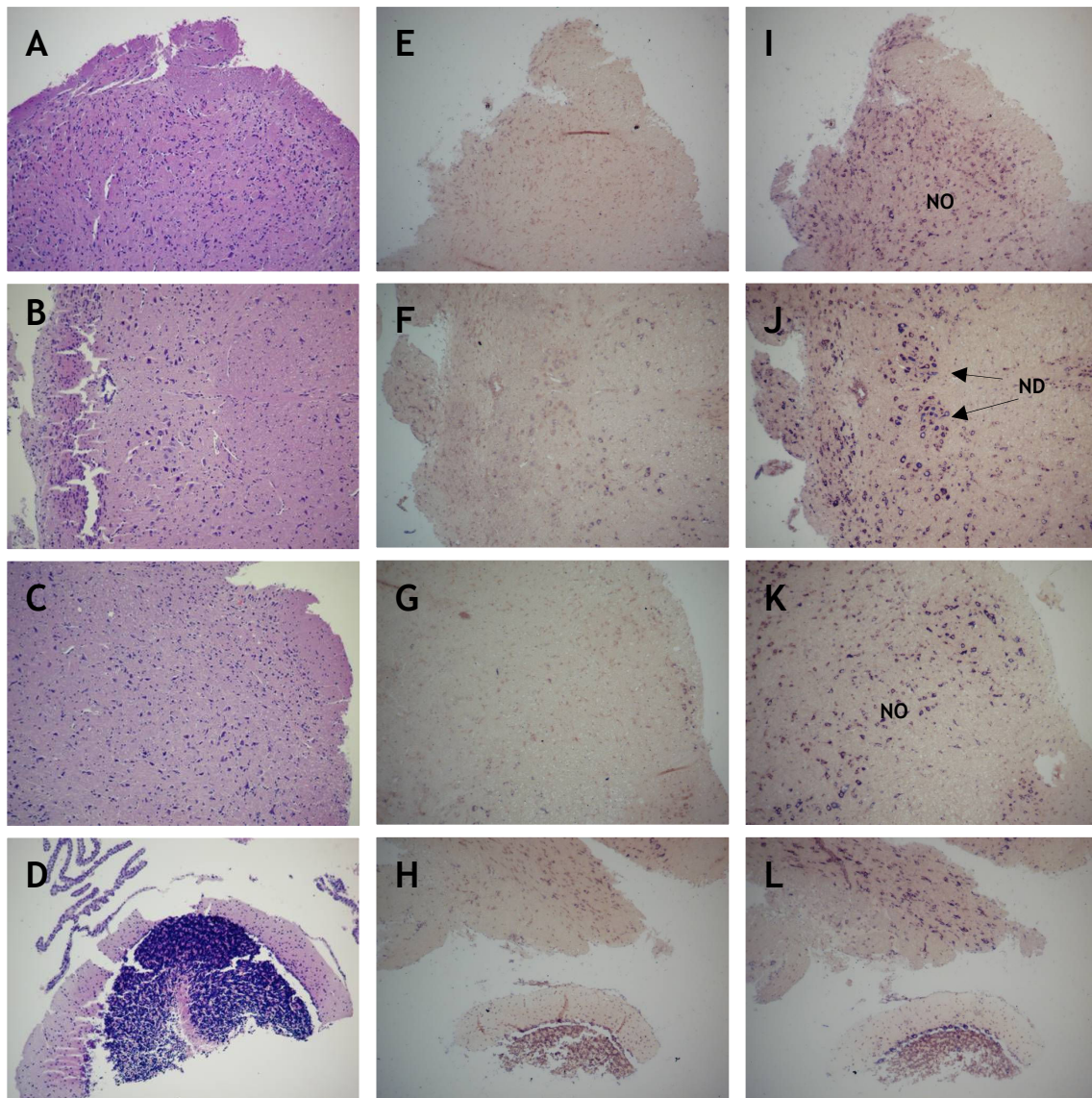


Figura 3.13 - Marcação obtida com H/E (A, B, C, D). Expressão da TTR por ISH na secção E da figura 3.1. E, F, G, H - Controle Negativo com sonda *sense* SP6; I, J, K, L - Marcação com sonda *antisense* T7. ND - Núcleos dorsais; NO - Núcleos olivares. Ampliação 10x.

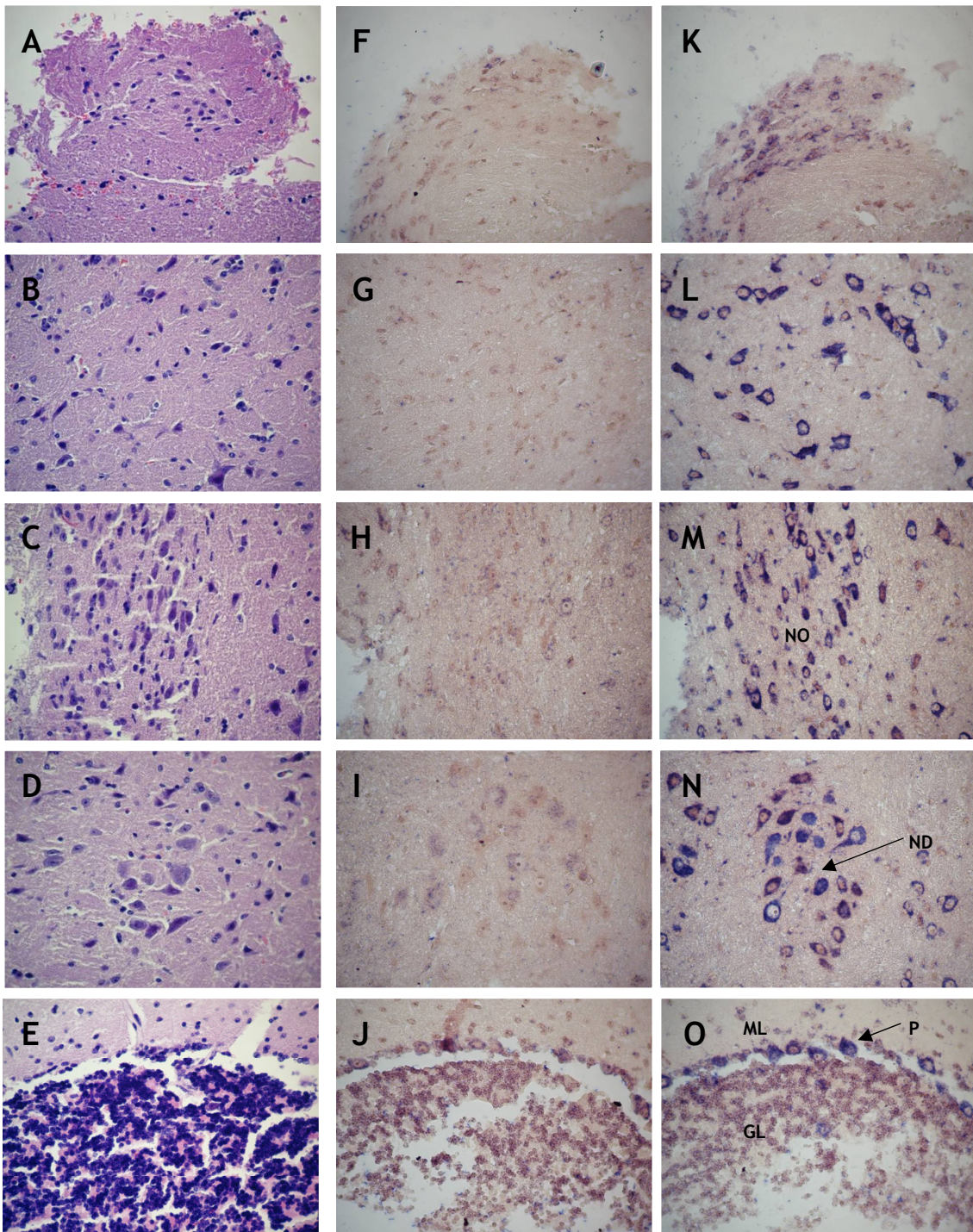


Figura 3.14 - Marcação obtida com H/E (A, B, C, D, E). Expressão da TTR por ISH na secção E da figura 3.1. F, G, H, I, J - Controlo Negativo com sonda *sense* SP6; K, L, M, N, O - Marcação com sonda *antisense* T7. GL - Camada celular granular; ML - Camada molecular; ND - Núcleos dorsais; NO - Núcleos olivares; P- Células de *Purkinje*. Ampliação 40x.

3.3 - Localização da TTR no Encéfalo

Para complementar os testes de ISH foram realizados ensaios de IHC, utilizando um anticorpo primário policlonal anti-TTR com uma diluição de 1:200, de forma a investigar a presença e localização da proteína no encéfalo.

As várias experiências realizadas com esta técnica experimental revelaram uma localização da TTR no cérebro limitada às estruturas associadas com os ventrículos cerebrais. Assim, foi identificada alguma marcação nas células endoteliais que rodeiam os ventrículos (Figuras 3.15 e 3.16) e uma marcação para a TTR mais intensa nos plexos coróides localizados nas paredes dos ventrículos cerebrais (Figuras 3.16 e 3.17). Não se observa a presença da TTR em qualquer outra estrutura celular do parênquima cerebral.

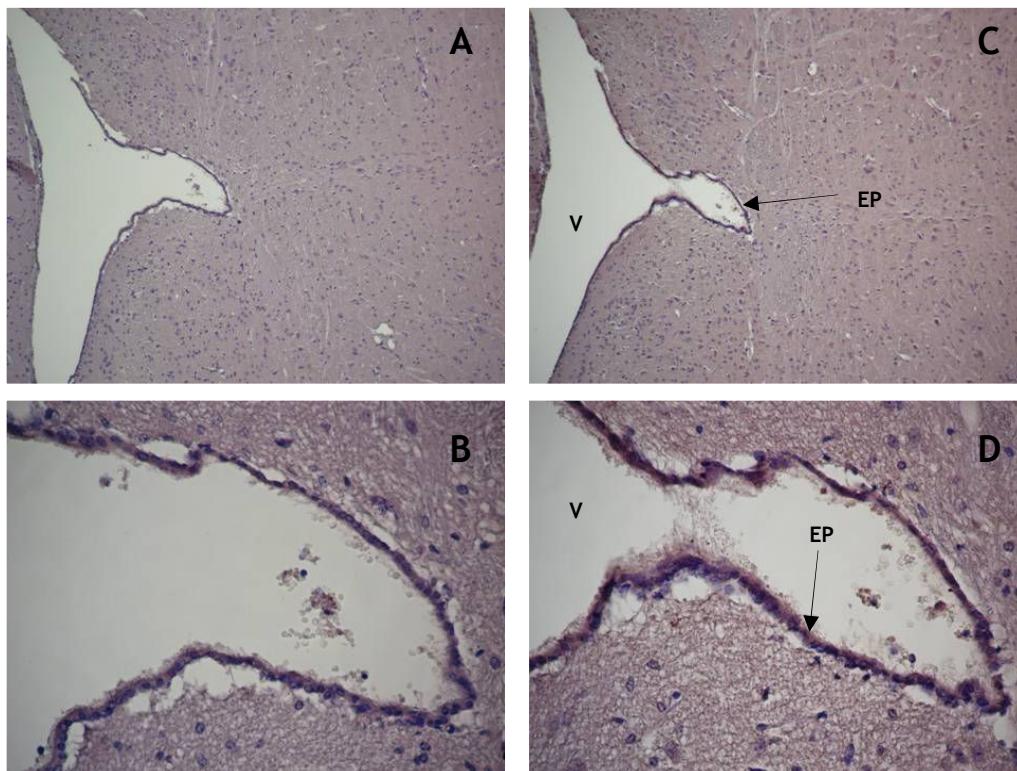


Figura 3.15 - Imunolocalização da TTR no cérebro de ratinho. **A, B** - Controlo negativo (PBS com 1% BSA). **C, D** - Marcação para a TTR. **EP** - Células endoteliais; **V** - Ventrículo cerebral. **A e C** - Ampliação 10x. **B e D** - Ampliação 40x.

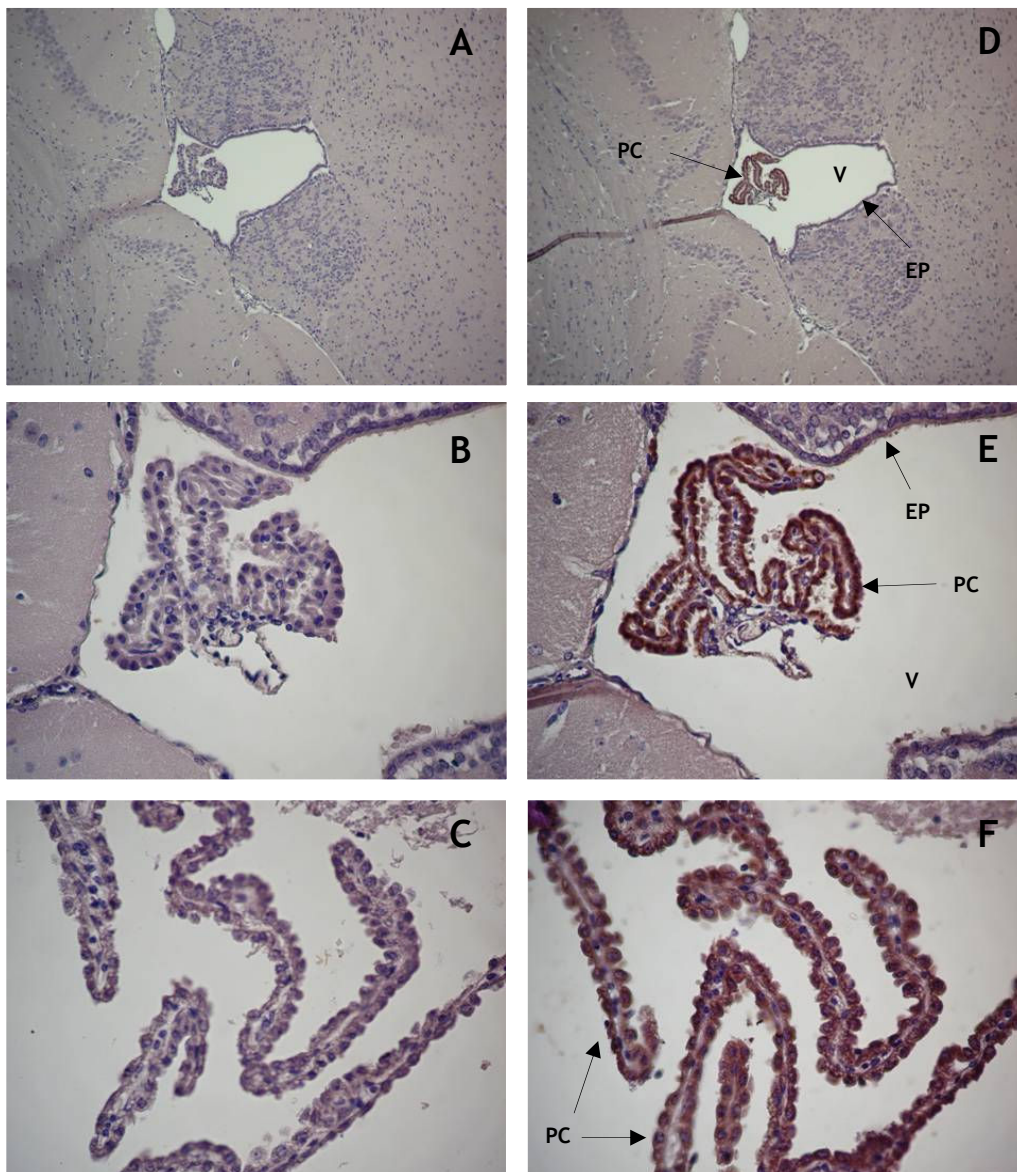


Figura 3.16 - Imunolocalização da TTR no cérebro de ratinho. **A, B, C** - Controlo negativo (PBS com 1% BSA). **D, E, F** - Marcação para a TTR. EP - Células endimárias; PC - Plexo coroideu; V - Ventrículo cerebral. **A e D** - Ampliação 10x. **B, C, E e F** - Ampliação 40x.

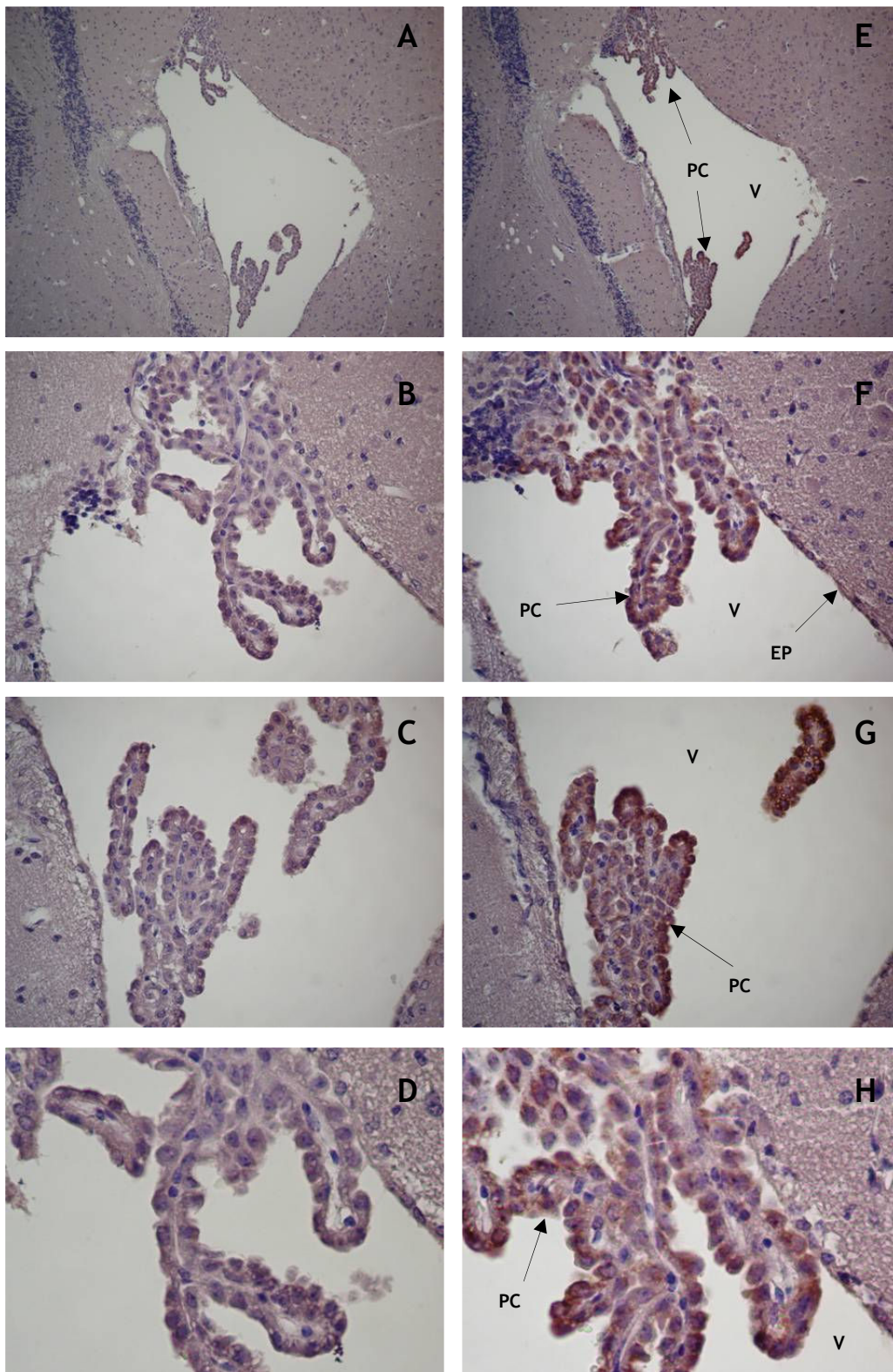


Figura 3.17 - Imunolocalização da TTR no cérebro de ratinho. **A, B, C, D** - Controlo negativo (PBS com 1% BSA). **E, F, G, H** - Marcação para a TTR. **EP** - Células endodimárias; **PC** - Plexo corioideu; **V** - Ventrículo cerebral. **A e E** - Ampliação 10x. **B, C, F e G** - Ampliação 40x. **D e H** - Ampliação 72x.



4. DISCUSSÃO

4 - Discussão

Os resultados obtidos no decorrer deste estudo científico sugerem uma expressão da TTR no cérebro no parênquima cerebral em estruturas celulares adicionais ao PC, que poderá eventualmente interferir na homeostase da TTR neste órgão. Esta observação está de acordo com algumas informações recentes presentes na literatura sobre este tema.

Apesar das principais funções da TTR estarem presumivelmente relacionadas com o transporte das TH e do retinol, existem evidências de que a TTR poderá também desempenhar um importante papel no sistema nervoso (Saraiva, 2002), nomeadamente no comportamento, devido à observação de que ratinhos TTR *knockout* (KO) estão menos deprimidos que ratinhos normais de controlo (Sousa *et al.*, 2004).

Por outro lado, tem havido recentemente um crescente reconhecimento da interferência da TTR na AD, uma das doenças mais prevalentes em todo o mundo que afecta actualmente entre 20 a 30 milhões de indivíduos (Matson, 2004).

A formação e deposição no cérebro de placas extracelulares insolúveis amilóides ou senis, cujo principal componente é o A-Beta (Wisniewski *et al.*, 1994; Selkoe, 2004), em agregados fibrilares (formados a partir da forma solúvel do A-Beta; Puskas *et al.*, 2003), constituem passos cruciais na etiologia desta desordem neurodegenerativa.

O A-Beta está presente nos fluidos extracelulares do cérebro incluindo o LCR que suporta o cérebro e circula nos ventrículos cerebrais e o fluido intersticial que rodeia os neurónios e as células gliais nos lóbulos do cérebro (Vigo-Pelfrey *et al.*, 1993).

A discussão em torno da etiologia da AD tem sido dividida em dois diferentes mecanismos: sobreprodução versus acumulação dos péptidos A-Beta solúveis no cérebro de pacientes com AD (Selkoe, 2001). Em ambos os casos, os sequestradores biológicos do A-Beta poderão contribuir para a sua remoção do cérebro e protecção contra a acumulação, modulando assim a susceptibilidade à doença (Sousa *et al.*, 2007).

Algumas moléculas extracelulares do LCR como as apolipoproteínas E, J e a TTR são capazes de se ligarem ao péptido solúvel A-Beta *in vitro* e prevenir o A-Beta de formar fibrilhas amilóides (Schwarzman *et al.*, 1994; Golabek *et al.*, 1995). Destas, a TTR tem sido recentemente alvo de muita atenção e apesar de não ser a única, tem sido indicada como a principal proteína portadora do A-Beta no LCR, promovendo a sua solubilidade, transporte e eliminação (Schwarzman *et al.*, 1994; Carro *et al.*,

2002), e têm sido realizadas tentativas de relacionar os níveis de TTR/A-Beta no LCR e na AD (Costa *et al.*, 2008).

Estudos *in vitro* utilizaram LCR humano incubado com A-Beta sintético e demonstraram que a TTR purificada pode ligar o A-Beta e inibir a sua fibrilhogénese, tendo observado uma diminuição no estado de agregação do péptido assim como da sua toxicidade na presença da TTR (Schwarzman *et al.*, 1994).

Níveis progressivamente reduzidos da TTR foram detectados no LCR em pacientes com AD em comparação com controlos saudáveis da mesma faixa etária, os quais têm sido associados com uma crescente severidade da doença (Riisøen, 1988; Serot *et al.*, 1997). Estes resultados podem reflectir a absorção da TTR pelo amiloide depositado nas placas senis (Puskas *et al.*, 2003).

Outro estudo indicou de forma análoga que existe uma correlação negativa entre a abundância de placas senis e o nível médio da TTR no LCR dos mesmos pacientes. Os níveis de TTR eram significativamente maiores no LCR de pacientes com AD que tinham menor quantidade de placas senis (Merched *et al.*, 1998). Em estudos *in vivo* efectuados num transgénico (*Caenorhabditis elegans*) que expressava o A-Beta humano, a TTR anulou a neurodegeneração despoletada pelo péptido tóxico, sugerindo que a TTR pode inibir a fibrilhogénese do A-Beta (Link, 1995).

Um estudo recente confirmou a TTR como um ligando do A-Beta e indicou que para além de inibir a oligomerização do A-Beta, a TTR também pode provocar a disrupção das suas fibrilhas, contrariando estudos anteriores que apenas detectaram o efeito inibitório (Costa *et al.*, 2008).

Todas estas observações convergem para a hipótese da TTR funcionar como sequestrador do A-Beta no LCR, prevenindo assim a citotoxicidade do péptido e a sua deposição, agregação e conseqüente formação de fibrilhas amilóides, que ocorre em caso de falha deste mecanismo (Schwarzman e Goldgaber, 1996).

Por outro lado, alterações nas concentrações e afinidades dos portadores do A-Beta nos fluidos do organismo e no parênquima cerebral podem constituir factores muito importantes na regulação da deposição do A-Beta no cérebro (Li *et al.*, 2000).

Assim, um aumento dos níveis da TTR no LCR pode provocar uma alteração no equilíbrio entre o péptido A-Beta livre e ligado e a sua interacção com outras proteínas portadoras, reduzindo assim a agregação do A-Beta no parênquima cerebral (Li *et al.*, 2000). Desta forma, é concebível que a expressão da TTR no cérebro possa influenciar as suas propriedades sequestradoras.

Alguns estudos sugerem que a expressão da TTR pode ser aumentada por indutores naturais como extractos de folhas de *Ginkgo biloba*, frequentemente

utilizados para combater uma variedade de desordens neurológicas, e que podem ser efectivos na prevenção da AD (Watanabe *et al.*, 2001). A indução da expressão e secreção da TTR foi também demonstrada após administração de nicotina (Li *et al.*, 2000), um dos principais componentes do fumo de cigarro.

Recentemente, um estudo indicou que os estrogénios podem reduzir o risco de AD ao actuarem nas células do PC levando a um aumento da expressão do gene da TTR, fomentando assim um aumento da sequestração e reduzindo a agregação dos péptidos de A-Beta (Tang *et al.*, 2004).

Por outro lado, a discussão em torno da interacção TTR/A-Beta levantou a hipótese de que as mutações no gene da TTR ou modificações conformacionais na proteína induzidas pelo envelhecimento, podem influenciar as suas propriedades sequestradoras do A-Beta. No entanto, ainda não foram encontradas mutações no gene da TTR em pacientes com AD (Palha *et al.*, 1996).

Um estudo recente concluiu que as variantes da TTR ligam-se diferentemente ao A-Beta, sugerindo que a capacidade entre elas de sequestrar o péptido é variável e pode ter implicações na sua deposição no cérebro (Costa *et al.*, 2008).

Neste contexto, e tendo em consideração que a TTR é uma das proteínas mais prevalentes do LCR (Schussler, 2000), é importante a localização exacta dos locais de expressão desta proteína no cérebro.

Ao longo das últimas décadas, foi assumido que a TTR do cérebro tinha origem exclusivamente a partir do PC. No entanto, alguns estudos têm fornecido evidências sobre potenciais locais de expressão da TTR no cérebro, em adição ao PC, sugerindo que a sua expressão neste órgão não está restringida aos PC.

Um estudo mostrou por ISH, um sinal, embora bastante fraco, para o mRNA da TTR localizado nas meninges do cérebro (Stauder *et al.*, 1986). Este resultado foi confirmado por estudos que indicaram as meninges como capazes de expressar o gene da TTR, através de análises por *Northern blot* (Herbert *et al.*, 1986; Blay *et al.*, 1993). Da mesma forma, outro estudo sugeriu através da mesma técnica experimental, uma expressão do mRNA desta proteína nas *leptomeninges* (Tang *et al.*, 2004). Adicionalmente, vários estudos recentes implicaram a expressão da TTR no cérebro em regiões como o hipocampo, córtex e amígdala de animais *wild-type* (Watanabe *et al.*, 2001; Carro *et al.*, 2002), mas também em modelos de roedores com AD (Stein e Johnson, 2002; Puskas *et al.*, 2003).

Apesar do fígado e PC permanecerem os principais locais estabelecidos de síntese da TTR, estes estudos sugerem novos locais de expressão da TTR e reforçam o papel protector da TTR no SNC. Contudo, tendo em consideração toda a literatura

prévia sobre a TTR, estas observações exigem uma cuidadosa análise sobre a questão/controvérsia da síntese da TTR no cérebro.

De forma a tentar contribuir para a clarificação desta questão, foi investigada a presença, localização e expressão da TTR num cérebro de ratinho *wild-type* previamente seriado, com particular enfoque numa possível síntese da proteína em estruturas celulares extra PC. Assim, foram realizadas numa abordagem inicial, várias experiências de ISH em diferentes secções do tecido cerebral de ratinho, com o intuito de identificar a proteína ao nível do seu mRNA.

A ISH é uma técnica que permite detectar a localização celular dos transcritos do mRNA para um gene particular, através do emparelhamento específico de uma sonda a sequências complementares dos ácidos nucleicos alvo, seguido da detecção e visualização dos híbridos formados por métodos citológicos (Yang *et al.*, 1999).

Não há nenhum procedimento padrão para este método. Existem diversos parâmetros em cada etapa que podem ser otimizados de acordo com o tipo de amostra em análise, contribuindo assim para a qualidade e fiabilidade dos resultados obtidos. Entre os mais relevantes estão: a escolha das sondas a utilizar; a preparação e pré-tratamento das secções de tecido, como por exemplo a permeabilização com proteinase K, responsável pela digestão da proteína em redor das células alvo, aumentando a acessibilidade dos ácidos nucleicos para a hibridação; tratamento de pré-hibridação contendo formamida, que reduz a marcação de fundo ao facilitar a remoção, após a hibridação, das sondas que não hibridaram completa e especificamente; condições de hibridação e lavagens pós-hibridação com diferentes stringências que permitem a dissociação dos híbridos que não são totalmente complementares. No presente estudo foram utilizadas ribossondas não radioactivas marcadas com digoxigenina e posteriormente detectadas por métodos cromogénicos.

Tal como era esperado, estes ensaios demonstraram a presença de uma intensa expressão da TTR nas células epiteliais do PC, que constitui o seu principal local de síntese no cérebro. Adicionalmente, a expressão do mRNA da proteína foi também detectada noutras estruturas do parênquima cerebral. Assim, e de acordo com estudos recentes (Sousa *et al.*, 2007), o mRNA da TTR foi identificado no cerebelo, mais especificamente nas células de *Purkinje*, constituídas por grandes corpos celulares de neurónios, e que estão localizadas entre as outras duas camadas do córtex cerebeloso: a camada granular e a camada molecular. Outra zona do encéfalo, para a qual os resultados obtidos parecem indicar uma forte possibilidade de presença de transcritos do mRNA da TTR é o bolbo raquidiano com particular ênfase nos seus núcleos olivares e dorsais, o que sugere um novo local de possível

síntese da proteína, uma vez que até à data não existem registos de estudos que indiquem esta estrutura como local de expressão da TTR.

No entanto, é importante realçar que estudos anteriores referem que relativamente ao local de síntese, deve-se ter cuidado na interpretação dos dados obtidos a partir da dissecação convencional de regiões cerebrais na fronteira do PC e meninges (Barlow e Lockhart, 2002), existindo inclusivamente estudos que atribuem a expressão da TTR em estruturas do cérebro como o córtex, hipocampo e cerebelo a um possível efeito de contaminação pelo PC e/ou meninges do cérebro, que poderá levar a interpretações erradas na análise da expressão da proteína. Ao contrário da dissecação convencional, o advento da microdissecção por laser aplicada no isolamento das regiões do cérebro, representa uma nova e poderosa técnica que permitirá determinar a distribuição da expressão de um determinado gene em regiões particulares do cérebro, ajudando a obter resultados mais precisos e inequívocos (Sousa *et al.*, 2007).

Outro factor importante a ter em consideração é a possibilidade de patologias específicas poderem induzir uma expressão alterada da TTR em diferentes regiões cerebrais. Um exemplo especialmente relevante é a implicação da TTR como neuroprotector na AD (Sousa *et al.*, 2007).

As lâminas com as secções do cérebro mais relevantes foram também coradas com hematoxilina e eosina, permitindo uma correcta observação das estruturas celulares presentes em cada secção de tecido analisado.

Para complementar e tentar confirmar as evidências obtidas por ISH, foram também realizados ensaios de IHC. Esta técnica possibilita a detecção de uma determinada proteína em células e tecidos e baseia-se na capacidade de ligação dos anticorpos a antigénios tecidulares, formando complexos anticorpo-antigénio exclusivos (Scoazec *et al.*, 2003). Adicionalmente, e tal como todos os outros métodos imunoenzimáticos de marcação, a IHC utiliza reacções enzima-substrato para converter cromogénios incolores em produtos corados permitindo a visualização dos resultados obtidos (Boenisch, 2006).

Existem diversas variáveis como as diluições do anticorpo, ou a temperatura e tempo de incubação, que podem ser alterados independentemente ou de forma complementar, com a finalidade de, em conjunto com os diferentes reagentes usados no decorrer da técnica como o peróxido de hidrogénio (usado para bloquear a actividade das peroxidases endógenas) e o soro de cabra (ajuda a bloquear ligações não-específicas do anticorpo), obter uma óptima marcação específica para a TTR e minimizar a interferência da marcação de fundo.

A TTR imunoreactiva foi localizada com um anticorpo policlonal para a TTR. Nas diferentes secções de tecido do cérebro analisadas verificou-se a presença da TTR nas células epiteliais do PC e também alguma marcação nas células endimárias que revestem os ventrículos cerebrais, onde estão situados os plexos coroídeos. No entanto, ao contrário dos resultados obtidos por ISH não se verificou a presença da TTR noutras regiões do parênquima do SNC. Este facto poderá estar associada a vários factores. Em primeiro lugar por razões inerentes à própria técnica, pois a IHC apenas permite detectar a presença de uma proteína num determinado tecido em estudo, e não o mRNA que contém a informação para a sua síntese. Não se pode também excluir a possibilidade de ocorrer a degradação do mRNA, ou da secreção da proteína entretanto sintetizada, impedindo a sua acumulação nos tecidos e conseqüente visualização. Outro factor a considerar é a forte possibilidade da TTR ser produzida em quantidades muito reduzidas nestas estruturas, tornando muito difícil a sua detecção.

Embora, os resultados obtidos não sejam conclusivos, fornecem mais dados sobre a controversa questão da síntese/expressão da TTR no cérebro, reforçando a hipótese da sua expressão em regiões adicionais ao PC.

Tendo em consideração que a deposição do A-Beta no cérebro constitui um dos marcos bioquímicos da AD e as possíveis propriedades neuroprotectoras da TTR como portador do A-Beta, a existência de locais adicionais ao PC que expressem o gene da TTR no cérebro, poderá influenciar os níveis da proteína no LCR e ter um impacto na patologia da AD, reduzindo a agregação do A-Beta e a conseqüente formação de placas amilóides.

Apesar das possíveis limitações metodológicas, o papel da TTR no SNC e na AD continua longe da compreensão total e a atenção sobre esta tema deverá ser refocada para os locais de síntese da TTR no cérebro.

A expressão da TTR no cérebro representa um alvo molecular para a investigação sobre a etiologia e tratamento da AD.



5. CONCLUSÕES

5 - Conclusões

No âmbito deste estudo científico foi realizada uma tentativa de caracterizar o mapa de distribuição da expressão da TTR no cérebro de ratinho.

As evidências obtidas sugerem novos locais de síntese da TTR em adição ao PC, que constitui o principal local no cérebro que expressa a TTR e representa a única estrutura celular deste órgão unanimemente estabelecida como fonte desta proteína. O mRNA da TTR foi detectado em regiões específicas do parênquima do SNC, como o cerebelo e bulbo raquidiano.

A análise da distribuição da TTR descrita no presente trabalho fornece mais dados para aprofundar o conhecimento sobre a localização desta proteína no cérebro e poderá contribuir para a resolução da controvérsia em torno da expressão da proteína neste órgão.

Por outro lado, a localização da síntese da TTR no parênquima cerebral pode ajudar na percepção do seu contributo para a fisiologia do cérebro e mais especificamente nalgumas propriedades que lhe têm sido atribuídas como a ligação e sequestração do A-Beta, cuja deposição constitui um acontecimento chave na AD.



6. PERSPECTIVAS FUTURAS



6 - Perspectivas Futuras

No seguimento dos ensaios já realizados, as pesquisas futuras poderão incidir nos seguintes campos de acção:

- Realizar investigações suplementares aplicando outras técnicas experimentais como a hibridação *in situ* de fluorescência (FISH) em ratinhos e noutros modelos de animais, de forma a determinar inequivocamente as estruturas celulares responsáveis pela síntese e expressão da TTR no cérebro;

- Tentar correlacionar a expressão da proteína com a sua capacidade de retardar e/ou inibir a deposição do A-beta e a sua potencial utilização como agente terapêutico na AD ao prevenir a formação das placas amilóides;

- Por fim, será fundamental solucionar o mecanismo subjacente ao papel protector da TTR contra a toxicidade do A-beta.

A resolução destas questões representa um grande desafio para o futuro nesta área e permitirá compreender a relevância fisiológica desta proteína na homeostase do cérebro e na AD.



7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



7 - Referências Bibliográficas

- ☞ Abrahams, P., (2002), “The Atlas of the Human Body”, *Amber Books Ltd*, Inglaterra.
- ☞ Achen, M.G., Duan, W., Pettersson, T.M., Harms, P.J., Richardson, S.J., Lawrence, M.C., Wettenhall, R.E.H., Aldred, A.R. e Schreiber, G., (1993), “Transthyretin gene expression in choroid plexus first evolved in reptiles”, *American Journal of Physiology*, **265**:R982-R989.
- ☞ Aldred, A.R., Brack, C.M. e Schreiber, G., (1995), “The cerebral expression of plasma protein genes in different species”, *Comparative Biochemistry and Physiology*, **111**:1-15.
- ☞ Aldred, A.R., Prapunpoj, P. e Schreiber, G., (1997), “Evolution of shorter and more hydrophilic transthyretin N-termini by stepwise conversion of exon 2 into intron 1 sequences (shifting the 3' splice site of intron 1)”, *European Journal of Biochemistry*, **246**:401-409.
- ☞ Andrade, C., (1952), “A peculiar form of peripheral neuropathy. Familial atypical generalized amyloidosis with special involvement of the peripheral nerves”, *Brain*, **75**:408-427.
- ☞ Atwood, K.N., (2001), “Fixation”, págs: 18-22, Em: “Immunohistochemical Staining Methods”, 3ª Edição, Boenisch, T., (Editor), *Dako Corporation*, Carpinteria, Estados Unidos.
- ☞ Barlow, C. e Lockhart, D.J., (2002), “DNA arrays and neurobiology—what's new and what's next?”, *Current Opinion in Neurobiology*, **12**:554-561.
- ☞ Barron, M., McAllister, D., Smith, S.M. e Lough, J., (1998), “Expression of retinol binding protein and transthyretin during early embryogenesis”, *Developmental Dynamics*, **212**:413-422.
- ☞ Bartalena, L., (1990), “Recent achievements in studies on thyroid hormone binding proteins”, *Endocrinology Reviews*, **11**:47-64.
- ☞ Basyuk, E., Bertrand, E. e Journot, L., (2000), “Alkaline fixation drastically improves the signal of *in situ* hybridization”, *Nucleic Acids Research*, **28**:E46.
- ☞ Bellovino, D., Apreda, M., Gragnoli, S., Massimi, M. e Gaetani, S., (2003), “Vitamin A transport: in vitro models for the study of RBP secretion”, *Molecular Aspects of Medicine*, **24**:411-420.
- ☞ Berni, R., Stoppini, M., Zapponi, M.C., Monaco, H.L. e Zanotti, G., (1990), “The bovine plasma retinol-binding protein-amino acid sequence, interaction with transthyretin, crystallization and preliminary X-ray data”, *European Journal of Biochemistry*, **192**:507-513.
- ☞ Blake, C.C.F., Burridge, J.M. e Oatley, S.J., (1978b), “X-ray analysis of thyroid hormone binding to prealbumin”, *Biochemical Society Transactions*, **6**:114-118.
- ☞ Blake, C.C.F., Geisow, M.J., Oatley, S.J., Rérat, B. e Rérat, C., (1978a), “Structure of prealbumin: Secondary, tertiary and quaternary interactions determined by Fourier refinement at 1.8 Å”, *Journal of Molecular Biology*, **121**:339-356.
- ☞ Blake, C.C.F., Geisow, M.J., Swan, I.D.A., Rérat, C. e Rérat, B., (1974), “Structure of human plasma prealbumin at 2.5 Å resolution. A preliminary report on the polypeptide chain conformation, quaternary structure and thyroxine binding”, *Journal of Molecular Biology*, **88**:1-12.

- ☞ Blake, C.C.F., Swan, I.D.A., Rérat, C., Berthou, J., Laurent, A. e Rérat, B., (1971), “An X-ray study of the subunit structure of prealbumin”, *Journal of Molecular Biology*, **61**:217-224.
- ☞ Blaner, W.S., (1989), “Retinol-binding protein: the serum transport protein for vitamin A”, *Endocrine Reviews*, **10**:308-316.
- ☞ Blay, P., Nilsson, C., Hansson, S., Owman, C., Aldred, A.R. e Schreiber, G., (1994), “An in vivo study of the effect of 5-HT and sympathetic nerves on transferring and transthyretin mRNA expression in rat choroid plexus and meninges”, *Brain Research*, **662**:148-154.
- ☞ Blay, P., Nilsson, C., Owman, C., Aldred, A. e Schreiber, G., (1993), “Transthyretin expression in the rat brain—effect of thyroid functional state and role in thyroxine transport”, *Brain Research*, **632**:114-120.
- ☞ Boenisch, T., (2001), “Antibodies”, págs: 5-11, Em: “Immunohistochemical Staining Methods”, 3ª Edição, Boenisch, T., (Editor), *Dako Corporation*, Carpinteria, Estados Unidos.
- ☞ Boenisch, T., (2001), “Basic Immunochemistry”, págs: 12-14, Em: “Immunohistochemical Staining Methods”, 3ª Edição, Boenisch, T., (Editor), *Dako Corporation*, Carpinteria, Estados Unidos.
- ☞ Boenisch, T., (2001), “Staining Methods”, págs: 26-31, Em: “Immunohistochemical Staining Methods”, 3ª Edição, Boenisch, T., (Editor), *Dako Corporation*, Carpinteria, Estados Unidos.
- ☞ Boenisch, T., (2006), “Basic Enzymology”, págs: 19-25, Em: “Education Guide - Immunohistochemical Staining Methods”, 4ª Edição, Key, M., (Editor), *Dako Corporation*, Carpinteria, Estados Unidos.
- ☞ Bonifácio, M.J., Sakaki, Y. e Saraiva, M.J., (1996), “In vitro amyloid formation from transthyretin: the influence of ions and the amyloidogenicity of TTR variants”, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1316**:35-42.
- ☞ Buxbaum, J.N. e Tagoe, C.E., (2000), “The genetics of the amiloidoses”, *Annual Review of Medicine*, **51**:543-569.
- ☞ Carro, E., Trejo, J.L., Gomez-Isla, T., LeRoith, D. e Torres-Aleman, I., (2002), “Serum insulin-like growth factor I regulates brain amyloid-beta levels”, *Nature Medicine*, **8**:1390-1397.
- ☞ Cavallaro, T., Martone, R.L., Goodman, D.S., Schon, E.A. e Herbert, J., (1990), “Distribution of transthyretin in the rat eye”, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **31**:489-496.
- ☞ Chang, L., Munro, S.L.A., Richardson, S.J. e Schreiber, G., (1999), “Evolution of thyroid hormone binding by transthyretins in birds and mammals”, *European Journal of Biochemistry*, **259**:534-542.
- ☞ Chanoine, J.P., Alex, S., Fang, S.L., Stone, S., Leonard, J.L., Kohrle, J. e Braverman, L.E., (1992), “Role of transthyretin in the transport of thyroxine from the blood to the choroid plexus, the cerebrospinal fluid, and the brain”, *Endocrinology*, **130**:933-938.
- ☞ Chodobski, A. e Szmydynger-Chodobska, J., (2001), “Choroid plexus: Target for polypeptides and site of their synthesis”, *Microscopy Research and Technique*, **52**:65-82.

- Coimbra, A. e Andrade, C., (1971), "Familial amyloid polyneuropathy, an electron microscope study of the peripheral nerve in five cases", *Brain*, **94**:199-212.
- Connors, L.H., Lim, A., Prokaeva, T., Roskens, V.A. e Costello, C.E., (2003), "Tabulation of human transthyretin (TTR) variants", *Amyloid*, **10**:160-184.
- Coons, A.H., Creech, H.J. e Jones, R.N., (1941), "Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group", *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, **47**:200-202.
- Cornford, E.M., Varesi, J.B., Hyman, S., Damian, R.T. e Raleigh, M.J., (1997), "Mitochondrial content of choroid plexus epithelium", *Experimental Brain Research*, **116**:399-405.
- Costa, R., Gonçalves, A., Saraiva, M.J. e Cardoso, I., (2008), "Transthyretin binding to A-Beta peptide - Impact on A-Beta fibrillogenesis and toxicity", *FEBS Letters*, **582**:936-942.
- Costa, R.H., Lai, E. e Darnell, J.E., (1986), "Transcriptional control of the mouse prealbumin (transthyretin) gene: Both promoter sequences and a distinct enhancer are cell specific", *Molecular and Cellular Biology*, **6**:4697-4708.
- Davies, P.J., Spaulding, S.W. e Gregerman, R.I., (1970), "The three thyroxine binding proteins in rat serum: binding capacities and effects of binding inhibitors", *Endocrinology*, **87**:978-986.
- De Jong, A.S.H., Van Kessel-Van Vark, M. e Raap, A.K., (1985), "Sensitivity of various visualization methods for peroxidase and alkaline phosphatase activity in immunoenzyme histochemistry", *The Histochemical Journal*, **17**:1119-1130.
- Dickson, D.W., (2004), "Apoptotic mechanisms in Alzheimer neurofibrillary degeneration: cause or effect?", *Journal of Clinical Investigation*, **114**:23-27.
- Dickson, P.W., Aldred, A.R., Marley, P.D., Bannister, D. e Schreiber, G., (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", *Journal of Biological Chemistry*, **261**:3475-3478.
- Dickson, P.W., Aldred, A.R., Marley, P.D., Guo-Fen, T., Howlett, G.J. e Schreiber, G., (1985b), "High prealbumin and transferrin mRNA levels in the choroid plexus of rat brain", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **127**:890-895.
- Dickson, P.W., Aldred, A.R., Menting, J.G.T., Marley, P.D., Sawyer, W.H. e Schreiber, G., (1987), "Thyroxine transport in choroid plexus", *Journal of Biological Chemistry*, **262**:13907-13915.
- Dickson, P.W., Howlett, G.J. e Schreiber, G., (1982), "Metabolism of prealbumin in rats and changes induced by acute inflammation", *European Journal of Biochemistry*, **129**:289-293.
- Dickson, P.W., Howlett, G.J. e Schreiber, G., (1985a), "Rat transthyretin (prealbumin). Molecular cloning, nucleotide sequence, and gene expression in liver and brain", *Journal of Biological Chemistry*, **260**:8214-8219.
- Dickson, P.W. e Schreiber, G., (1986), "High levels of messenger RNA for transthyretin (prealbumin) in human choroid plexus", *Neuroscience Letters*, **66**:311-315.
- Dohrmann, G.J., (1970), "The choroid plexus: a historical review", *Brain Research*, **18**:197-218.

- ☞ Duan, W., Achen, M.G., Richardson, S.J., Lawrence, M.C., Wettenhall, R.E.H., Jaworowski, A. e Schreiber, G., (1991), "Isolation, characterisation, cDNA cloning and gene expression of an avian transthyretin", *European Journal of Biochemistry*, **200**:679-687.
- ☞ Duan, W., Richardson, S.J., Kohrle, J., Chang, L., Southwell, B.R., Harms, P.J., Brack, C.M., Pettersson, T.M. e Schreiber, G., (1995), "Binding of thyroxine to pig transthyretin, its cDNA structure, and other properties", *European Journal of Biochemistry*, **230**:977-986.
- ☞ Dwork, A.J., Cavallaro, T., Martone, R.L., Goodman, D.S., Schon, E.A. e Herbert, J., (1990), "Distribution of transthyretin in the rat eye", *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **31**:489-496.
- ☞ Eales, J.G., (1985), "The peripheral metabolism of thyroid hormones and regulation of thyroidal status in poikilotherms", *Canadian Journal of Zoology*, **63**:1217-1231.
- ☞ Emerich, D.F., Skinner, S.J.M., Borlongan, C.V., Vasconcellos, A.V. e Thanos, C.G., (2005), "The choroid plexus in the rise, fall and repair of the brain", *BioEssays*, **27**:262-274.
- ☞ Episkopou, V., Maeda, S., Nishiguchi, S., Shimada, K., Gaitanaris, G.A., Gottesman, M.E. e Robertson, E.J., (1993), "Disruption of the transthyretin gene results in mice with depressed levels of plasma retinol and thyroid hormone", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **90**:2375-2379.
- ☞ Ernstrom, U., Pettersson, T. e Jornvall, H., (1995), "A yellow component associated with human transthyretin has properties like a pterin derivative, 7,8-dihydropterin-6-carboxaldehyde", *FEBS Letters*, **360**:177-182.
- ☞ Farmilo, A.J., (2006), "Fixation and Processing", págs: 27-33, Em: "Education Guide - Immunohistochemical Staining Methods", 4ª Edição, Key, M., (Editor), *Dako Corporation*, Carpinteria, Estados Unidos.
- ☞ Felding, P. e Fex, G., (1982), "Cellular origin of prealbumin in the rat", *Biochimica et Biophysica Acta*, **716**:446-449.
- ☞ Ferguson, R.N., Edelhoach, H., Saroff, H.A. e Robbins, J., (1975), "Negative cooperativity in the binding of thyroxine to human serum prealbumin", *Biochemistry*, **14**:282-289.
- ☞ Fung, W., Thomas, T., Dickson, P.W., Aldred, A.R., Milland, J., Dziadek, M., Powers, B., Hudson, P. e Schreiber, G., (1988), "Structure and Expression of the Rat Transthyretin (Prealbumin) Gene", *Journal of Biological Chemistry*, **263**:480-488.
- ☞ Gall, J.G. e Pardue, M.G., (1969), "Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparation", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **63**:378-383.
- ☞ Gavrilisco, K., Courcon, J., Hillion, P., Uriel, J., Lewin, J. e Grabar, P., (1955), "A study of normal human cerebrospinal fluid by the immuno-electrophoretic method", *Nature*, **176**:976.
- ☞ Golabek, A., Marques, M.A., Lalowski, M. e Wisniewski, T., (1995), "Amyloid beta binding proteins in vitro and in normal human cerebrospinal fluid", *Neuroscience Letters*, **191**:79-82.
- ☞ Gonçalves, I., Quintela, T., Baltazar, G., Almeida, M.R., Saraiva, M.J.M. e Santos, C.R., (2008), "Transthyretin Interacts with Metallothionein 2", *Biochemistry*, **47**:2244-2251.
- ☞ Goodman, D.S., (1984), "Vitamin A and retinoids in health and disease", *The New England Journal of Medicine*, **310**:1023-1031.

- ☞ Gown, A.M., (2002), “Genogenic immunohistochemistry: a new era in diagnostic immunohistochemistry”, *Current Diagnostic Pathology*, **8**:193-200.
- ☞ Gray, H.D.A., Gray, E.S. e Horne, C.H.W., (1985), “Sites of prealbumin production in the human fetus using indirect immunoperoxidase technique”, *Virchows Archiv*, **406**:463-473.
- ☞ Hagen, G.A. e Elliot, W.J., (1973), “Transport of thyroid hormones in serum and cerebrospinal fluid”, *Journal of Clinical Endocrinology*, **37**:415-422.
- ☞ Hamilton, J.A. e Benson, M.D., (2001), “Transthyretin: a review from a structural perspective”, *Cellular and Molecular Life Sciences*, **58**:1491-1521.
- ☞ Hardy, J.A. e Higgins, G.A., (1992), “Alzheimer’s disease: the amyloid cascade hypothesis”, *Science*, **256**:184-185.
- ☞ Harvey, R., (2001), “In Situ Hybridization”, págs: 41-43, Em: “Immunohistochemical Staining Methods”, 3ª Edição, Boenisch, T., (Editor), *Dako Corporation*, Carpinteria, Estados Unidos.
- ☞ Haupt, H. e Heide, K., (1966), “Kristallisation des Prealbumins aus humanserum”, *Experientia*, **22**: 449-451.
- ☞ Herbert, J., Wilcox, J.N., Pham, K.T., Freneau, Jr., Zeviani, M., Dwork, A., Soprano, D.R., Makover, A., Goodman, D.S., Zimmerman, E.A., Roberts, J.L. e Schon, E.A., (1986), “Transthyretin: a choroid plexus-specific transport protein in human brain”, *Neurology*, **36**:900-911.
- ☞ Hillier, A.P., (1970), “The binding of thyroid hormones to phospholipid membranes”, *The Journal of Physiology*, **211**: 585-597.
- ☞ Hulbert, A.J., (2000), “Thyroid hormones and their effects: a new perspective”, *Biological Reviews*, **75**:519-631.
- ☞ Inada, K., (1988), “Localization of prealbumin in human eye”, *Japanese Journal of Ophthalmology*, **32**:438-443.
- ☞ Ingbar, S.H., (1958), “Pre-albumin: a thyroxine-binding protein of human plasma”, *Endocrinology*, **63**:256-259.
- ☞ Ingenbleek, Y. e Young, V., (1994), “Transthyretin (prealbumin) in health and disease: Nutritional implications”, *Annual Review of Nutrition*, **14**:495-533.
- ☞ Jacobsson, B., Carlstrom, A., Platz, A. e Collins, V.P., (1990), “Transthyretin messenger ribonucleic acid expression in the pancreas and in endocrine tumours of the pancreas and gut”, *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **71**:875-880.
- ☞ Jacobson, D.R., Pastore, R.D., Yaghoubian, R., Kane, I., Gallo, G., Buck, F.S. e Buxbaum, J.N., (1997), “Variant-sequence transthyretin (isoleucine 122) in late-onset cardiac amyloidosis in black Americans”, *The New England Journal of Medicine*, **336**:466-473.
- ☞ Jin, L. e Lloyd, R.V., (1997), “In Situ Hybridization: Methods and Applications”, *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, **11**:2-9.
- ☞ Johnson, C.W., (1999), “Issues in immunohistochemistry”, *Toxicologic Pathology*, **27**:246-248.
- ☞ Junqueira, L.C. e Carneiro, J., (2004), “Histologia Básica: Texto & Atlas”, 10ª Edição, *Guanabara Koogan*, Brasil.

- ☞ Kabat, E.A., Landow, H. e Moore, D.H., (1942), "Electrophoretic patterns of concentrated cerebrospinal fluid", *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, **49**:260-263.
- ☞ Kameko M., Ichikawa M., Katsuyama T., Kanai M., Kato M. e Akamatsu, T., (1986), "Immunohistochemical localization of plasma retinol-binding protein and prealbumin in human pancreatic islets", *The Histochemical Journal*, **18**:164-168.
- ☞ Kanai, M., Raz, A. e Goodman, D.S., (1968), "Retinol-binding protein: The transport protein for vitamin A in human plasma", *The Journal of Clinical Investigation*, **47**:2025-2044.
- ☞ Kanda, Y., Goodman, D.S., Canfield, R.E. e Morgan, F.J., (1974), "The amino acid sequence of human plasma prealbumin", *Journal of Biological Chemistry*, **249**: 6796-6805.
- ☞ Kang, J., Lemaire, H.G., Unterbeck, A., Salbaum, J.M., Masters, C.L. e Grzeschik, K.H., (1987), "The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor", *Nature*, **325**:733-736.
- ☞ Kato, M., Soprano, D.R., Makover, A., Kato, K., Herbert, J. e Goodman, D.S., (1986), "Localization of immunoreactive transthyretin (prealbumin) and of transthyretin mRNA in fetal and adult rat brain", *Differentiation*, **31**:228-235.
- ☞ Key, M., (2006), "Immunohistochemistry Staining Methods", págs: 47-53, Em: "Education Guide - Immunohistochemical Staining Methods", 4ª Edição, Key, M., (Editor), *Dako Corporation*, Carpinteria, Estados Unidos.
- ☞ Komminoth, P., Merk, F.B., Leav, I., Wolfe, H.J. e Roth, J., (1992), "Comparison of ³⁵S and digoxigenin-labeled RNA and oligonucleotide probes for in situ hybridization. Expression of mRNA of the seminal vesicle secretion protein II and androgen receptor genes in the rat prostate", *Histochemistry*, **98**:217-228.
- ☞ Larsson, M., Petterson, T. e Carlstrom, A., (1985), "Thyroid-hormone binding in the serum of 15 vertebrate species: Isolation of thyroxine binding globulin and prealbumin analogs", *General and Comparative Endocrinology*, **58**:360-375.
- ☞ Li, M.D., Kane, J.K., Matta, S.G., Blaner, W.S. e Sharp, B.M., (2000), "Nicotine Enhances the Biosynthesis and Secretion of Transthyretin from the Choroid Plexus in Rats: Implications for β -Amyloid Formation", *The Journal of Neuroscience*, **20**:1318-1323.
- ☞ Link, C.D., (1995), "Expression of human beta-amyloid peptide in transgenic *Caenorhabditis elegans*", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**:9368-9372.
- ☞ Lundberg, E., Bäckström, S., Sauer, U.H. e Sauer-Eriksson, E.S., (2006), "The transthyretin-related protein: Structural investigation of a novel protein family", *Journal of Structural Biology*, **155**:445-457.
- ☞ Martone, R.L., Herbert, J., Dwork, A. e Schon, E.A., (1988), "Transthyretin is synthesized in the mammalian eye", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **151**:905-912.
- ☞ Martone, R.L., Mizuno, R. e Herbert, J., (1992), "The mammalian pineal is a synthetic site for transthyretin and retinol-binding protein", *2nd International Symposium on Familial Amyloidotic Polyneuropathy and Other Transthyretin Related Disorders*, Skelleftea, Sweden. Program and Abstracts, 0.3, p 15.

- ☞ Mattson, M.P., (2004), "Pathways towards and away from Alzheimer's disease", *Nature*, **430**: 631-639.
- ☞ Mcnicol, A.M. e Farquharson, M.A., (1997), "In situ hybridization and its diagnostic applications in pathology", *Journal of Pathology*, **182**:250-261.
- ☞ Mendel, C.M., (1989), "The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model", *Endocrine Reviews*, **10**:232-274.
- ☞ Mendel, C.M., Weisiger, R.A., Jones, A.L. e Cavalieri, R.R., (1987), "Thyroid hormone-binding proteins in plasma facilitate uniform distribution of thyroxine within tissues: A perfused rat liver study", *Endocrinology*, **120**:1742-1749.
- ☞ Merched, A., Serot, J.M., Visvikis, S., Aguilon, D., Faure, G. e Siest, G., (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.
- ☞ Mita, S., Maeda, S., Shimada, K. e Araki, S., (1984), "Cloning and sequence analysis of cDNA for human prealbumin", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **124**:558-564.
- ☞ Mita, S., Maeda, S., Shimada, K. e Araki, S., (1986), "Analyses of prealbumin mRNAs in individuals with familial amyloidotic polyneuropathy", *Journal of Biochemistry*, **100**:1215-1222.
- ☞ Mitsuhashi, S., Yazaki, M., Tokuda, T., Sekijima, Y., Washimi, Y., Shimizu, Y., Ando, Y., Benson, M.D. e Ikeda, S., (2005), "Biochemical characteristics of variant transthyretins causing hereditary leptomeningeal amyloidosis", *Amyloid*, **12**:216-225.
- ☞ Mizuno, R., Cavallaro, T. e Herbert, J., (1992), "Temporal expression of the transthyretin gene in the developing rat eye", *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **33**:341-349.
- ☞ Monaco, H.L., Rizzi, M. e Coda, A., (1995), "Structure of a complex of two plasma proteins: Transthyretin and retinol-binding protein", *Science*, **268**:1039-1041.
- ☞ Montecinos, H.A., Richter, H., Caprile, T. e Rodríguez, E.M., (2005), "Synthesis of transthyretin by the ependymal cells of the subcommissural organ", *Cell and tissue research*, **320**:487-499.
- ☞ Muto, Y. e Goodman, D.S., (1972), "Vitamin A transport in rat plasma. Isolation and characterization of retinol-binding protein", *Journal of Biological Chemistry*, **247**:2533-2541.
- ☞ Neumann, P., Cody, V. e Wojtczak, A., (2001), "Structural basis of negative cooperativity in transthyretin", *Acta Biochimica Polonica*, **48**:867-875.
- ☞ Nilsson, S.F., Rask, L. e Peterson, P.A., (1975), "Studies on thyroid hormone-binding proteins", *Journal of Biological Chemistry*, **250**:8554-8563.
- ☞ Nomenclature Committee of IUB (NC-IUB), (1981), "IUB-IUPAC Joint Commission on Biochemical Nomenclature", *Journal of Biological Chemistry*, **256**:12-14.
- ☞ Ong, D.E., Davis, J.T., O'Day, W.T. e Bok, D., (1994), "Synthesis and secretion of retinol-binding protein and transthyretin by cultured retinal pigment epithelium", *Biochemistry*, **33**:1835-1842.

- ☞ Oshio, K., Song, Y., Verkman, A.S., e Manley, G.T., (2003), “Aquaporin-1 deletion reduces osmotic water permeability and cerebrospinal fluid production”, *Acta Neurochirurgica. Supplementum*, **86**:525-528.
- ☞ Pace, G.E., (2006), “Ancillary Methods in Immunohistochemistry”, págs: 71-87, Em: “Education Guide - Immunohistochemical Staining Methods”, 4ª Edição, Key, M., (Editor), *Dako Corporation*, Carpinteria, Estados Unidos.
- ☞ Palha, J.A., (2002), “Transthyretin as a thyroid hormone carrier: function revisited”, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, **40**:1292-1300.
- ☞ Palha, J.A., Episkopou, V., Maeda, S., Shimada, K., Gottesman, M.E. e Saraiva, M.J.M., (1994), “Thyroid hormone metabolism in a transthyretin-null mouse strain”, *Journal of Biological Chemistry*, **269**:33135-33139.
- ☞ Palha, J.A., Moreira, P., Wisniewski, T., Frangione, B. e Saraiva, M.J.M., (1996), “Transthyretin gene in Alzheimer’s disease patients”, *Neuroscience Letters*, **204**:212-214.
- ☞ Paxinos, G. e Watson, C., (1998), “The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates”, 4ª Edição, *Academic Press*, California, Estados Unidos.
- ☞ Peterson, P.A., (1971), “Studies on the interaction between prealbumin, retinol-binding protein, and vitamin A”, *Journal of Biological Chemistry*, **246**:44-49.
- ☞ Porterfield, S.P. e Hendrich, C.E., (1993), “The role of thyroid hormones in prenatal and neonatal neurological development—current perspectives”, *Endocrinology Reviews*, **14**:94-106.
- ☞ Power, D.M., Elias, N.P., Richardson, S.J., Mendes, J., Soares, C.M. e Santos, C.R.A., (2000), “Evolution of the Thyroid Hormone-Binding Protein, Transthyretin”, *General and Comparative Endocrinology*, **119**:241-255.
- ☞ Prapunpoj, P., Richardson, S.J. e Schreiber, G., (2002), “Crocodile transthyretin: structure, function, and evolution”, *American Journal of Physiology. Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, **283**:R885-R896.
- ☞ Prapunpoj, P., Yamauchi, K., Nishiyama, N., Richardson, S.J. e Schreiber, G., (2000), “Evolution of structure, ontogeny of gene expression, and function of *Xenopus laevis* transthyretin”, *American Journal of Physiology. Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, **279**:R2026-R2041.
- ☞ Puskas, L.G., Kitajka, K., Nyakas, C., Barcelo-Coblijn, G. e Farkas, T., (2003), “Short-term administration of omega 3 fatty acids from fish oil results in increased transthyretin transcription in old rat hippocampus”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**:1580-1585.
- ☞ Qiu, H., Shimada, K. e Cheng, Z., (1992), “Chromosomal localization of the mouse prealbumin gene (Ttr) by in situ hybridization”, *Cytogenetics and Cell Genetics*, **61**:186-188.
- ☞ Quintas, A., Vaz, D.C., Cardoso, I., Saraiva, M.J. e Brito, R.M., (2001), “Tetramer dissociation and monomer partial unfolding precedes protofibril formation in amyloidogenic transthyretin variants”, *Journal of Biological Chemistry*, **276**:27207- 27213.
- ☞ Rall, D.P., (1964), “The structure and function of the cerebrospinal fluid”, págs: 269-282, Em: “Cellular functions of membrane transport”, Hoffman, J., (Editor), *Prentice-Hall*, NJ.

- ☞ Rask, L., Anundi, H. e Peterson, P.A., (1979), "The primary structure of the human retinol-binding protein", *FEBS Letters*, **104**:55-58.
- ☞ Raz, A. e Goodman, D.S., (1969), "The interaction of thyroxine with human plasma prealbumin and with the prealbumin-retinol-binding protein complex", *Journal of Biological Chemistry*, **244**:3230-3237.
- ☞ Redzic, Z.B. e Segal, M.B., (2004), "The structure of the choroid plexus and the physiology of the choroid plexus epithelium", *Advanced Drug Delivery Reviews*, **56**:1695-1716.
- ☞ Richardson, S.J., (2002), "The evolution of transthyretin synthesis in vertebrate liver, in primitive eukaryotes and in bacteria", *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, **40**:1191-1199.
- ☞ Richardson, S.J., (2007), "Cell and Molecular Biology of Transthyretin and Thyroid Hormones", *International Review of Cytology*, **258**:137-193.
- ☞ Richardson, S.J., Bradley, A.J., Duan, W., Wettenhall, R.E.H., Harms, P.J., Babon, J.J., Southwall, B.R., Nicol, S., Donnellan, S.C. e Schreiber, G. (1994), "Evolution of marsupial and other vertebrate thyroxine-binding plasma proteins", *American Journal of Physiology*, **266**:R1359-R1370.
- ☞ Richardson, S.J., Hunt, J.L., Aldred, A.R., Licht, P. e Schreiber, G., (1997), "Abundant synthesis of transthyretin in the brain but not in the liver, of turtles", *Comparative Biochemistry and Physiology*, **117**:421-429.
- ☞ Richardson, S.J., Monk, J.A., Shepherdley, C.A., Ebbesson, L.O., Sin, F., Power, D.M., Frappell, P.B., Kohrle, J. e Renfree, M.B., (2005), "Developmentally regulated thyroid hormone distributor proteins in marsupials, a reptile and fish", *American Journal of Physiology*, **288**:R1264-R1272.
- ☞ Riisoen, H., (1988), "Reduced prealbumin (transthyretin) in CSF of severely demented patients with Alzheimer's disease", *Acta Neurologica Scandinavica*, **78**:455-459.
- ☞ Robbins, J. e Edelhoeh, H., (1986), "Thyroid hormone transport proteins: Their nature, biosynthesis, and metabolism", págs: 116-127, Em: "Werner's The Thyroid", 5ª Edição, Ingbar, S.H. e Braverman, L.E., (Editores), *Lippincott*, Philadelphia.
- ☞ Sambrook e Russel, (2001), "Molecular Cloning. A laboratory manual", 3ª Edição, *CSHL Press*, New York, Estados Unidos.
- ☞ Santos, C.R.A. e Power, D.M., (1999), "Identification of transthyretin in fish (*Sparus aurata*): cDNA cloning, and characterization", *Endocrinology*, **140**:2430-2433.
- ☞ Saraiva, M.J., (2001), "Transthyretin mutations in hyperthyroxinemia and amyloid diseases", *Human Mutation*, **17**:493-503.
- ☞ Saraiva, M.J., (2002), "Hereditary transthyretin amyloidosis: molecular basis and therapeutical strategies", *Expert Reviews in Molecular Medicine. Cambridge University Press*.
- ☞ Sasaki, H., Yochioka, N., Takagi, Y. e Sakaki, Y., (1985), "Structure of the chromosome gene for human serum prealbumin", *Gene*, **37**:191-197.
- ☞ Schreiber, G., (1987), "Synthesis, processing and secretion of plasma proteins by the liver and other organs and their regulation", págs: 293-363, Em: "The Plasma Proteins", 2ª Edição, Putnam, F.W., (Editor), *Academic Press*, New York.

- ☞ Schreiber, G., (2002a), “The evolution of transthyretin synthesis in the choroid plexus”, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, **40**:1200-1210.
- ☞ Schreiber, G., (2002b), “The evolutionary and integrative roles of transthyretin in thyroid hormone homeostasis”, *Journal of Endocrinology*, **175**:61-73.
- ☞ Schreiber, G., Aldred, A.R., Jaworowski, A., Nilsson, C., Achen, M.G. e Segal, M.B., (1990), “Thyroxine transport from blood to brain via transthyretin synthesis in choroid plexus”, *American Journal of Physiology*, **258**:R338-R345.
- ☞ Schreiber, G., Pettersson, T.M., Southwell, B.R., Aldred, A.R., Harms, P.J., Richardson, S.J., Wettenhall, R.E., Duan, W. e Nicol, S.C., (1993), “Transthyretin expression evolved more recently in liver than in brain”, *Comparative Biochemistry and Physiology*, **105**:317-325.
- ☞ Schreiber, G. e Richardson, S., (1997), “The evolution of gene expression, structure and function of transthyretin”, *Comparative Biochemistry and Physiology*, **116B**:137-160.
- ☞ Schreiber, G., Richardson, S.J. e Prapunpoj, P., (2001), “Structure and Expression of the Transthyretin Gene in the Choroid Plexus: A Model for the Study of the Mechanism of Evolution”, *Microscopy Research and Technique*, **52**:21-30.
- ☞ Schussler, G.C., (2000), “The thyroxine-binding proteins”, *Thyroid*, **10**:141- 149.
- ☞ Schwarzman, A.L. e Goldgaber, D. (1996), “Interaction of transthyretin with amyloid beta-protein: binding and inhibition of amyloid formation”, *Ciba Foundation Symposium*, **199**:146-160.
- ☞ Schwarzman, A.L., Gregori, L., Vitek, M.P., Lyubski, S., Strittmatter, W.J., Enghilde, J.J., Bhasin, R., Silverman, J., Weisgraber, K.H. e Coyle, P.K., (1994), “Transthyretin sequesters amyloid beta protein and prevents amyloid formation”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**:8368-8372.
- ☞ Scoazec, J.Y., (2003), “Tissue and cell imaging in situ: potential for applications in pathology and endoscopy”, *Gut*, **52**:1-6.
- ☞ Segal, M.B., (2001), “Transport of nutrients across the choroid plexus”, *Microscopy Research and Technique*, **52**:38-48.
- ☞ Seibert, F.B. e Nelson, J.W., (1942), “Electrophoretic study of the blood protein response in tuberculosis”, *Journal of Biological Chemistry*, **143**:29-38.
- ☞ Selkoe, D.J., (2001), “Alzheimer’s disease: genes, proteins, and therapy”, *Physiological Reviews*, **81**:741-766.
- ☞ Selkoe, D.J., (2004), “Alzheimer disease: mechanistic understanding predicts novel therapies”, *Annals of Internal Medicine*, **140**:627-638.
- ☞ Serot, J.M., Christmann, D., Dubost, T. e Couturier, M., (1997), “Cerebrospinal fluid transthyretin: aging and late onset Alzheimer’s disease”, *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, **63**:506-508.
- ☞ Serpell, L.C., Sunde, M. e Blake, C.C.F., (1997), “The molecular basis of amyloidosis”, *Cellular and Molecular Life Sciences*, **53**:871-887.
- ☞ Silva-Valenzuela, M.G., Almeida F.C.S.; Matizonkas-Antonio, L.F., Libório, T.N., Acquafreda, T., Cazal, C., Ferraz, A. e Nunes, F.D., (2006), “In situ hybridization with non-

- radioactive riboprobes: principles and applications in pathology”, *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, **42**:207-213.
- ☞ Soprano, R.D. e Blaner, W.S., (1994), “Plasma retinol-binding protein”, págs: 257-282, Em: “The Retinoids Biology, Chemistry and Medicine”, Sporn, M.B., Roberts, A.B. e Goodman, D.W.S., (Editores), *Raven Press*.
- ☞ Soprano, D.R., Herbert, J., Soprano, K.J., Schon, E.A. e Goodman, D.S., (1985), “Demonstration of transthyretin mRNA in the brain and other extrahepatic tissues in the rat”, *Journal of Biological Chemistry*, **260**:11793-11798.
- ☞ Soprano, D.R., Soprano, K.J. e Goodman, D.S., (1986), “Retinol binding protein and transthyretin mRNA levels in visceral yolk sac and liver during fetal development in the rat”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **83**:7330-7334.
- ☞ Sousa, M.M., Berglund, L. e Saraiva, M.J., (2000), “Transthyretin in high density lipoproteins: association with apolipoprotein A-I”, *Journal of Lipid Research*, **41**:58-65.
- ☞ Sousa, J.C., Cardoso, I., Marques, F., Saraiva, M.J. e Palha, J.A., (2007), “Transthyretin and Alzheimer’s disease: Where in the brain?”, *Neurobiology of Aging*, **28**:713-718.
- ☞ Sousa, A., Coelho, T., Barros, J. e Sequeiros, J., (1995), “Genetic epidemiology of familial amyloidotic polyneuropathy (FAP)-type I in Póvoa do Varzim and Vila do Conde (north of Portugal)”, *American Journal of Medical Genetics*, **60**:512-521.
- ☞ Sousa, J.C., Grandela, C., Fernandez-Ruiz, J., Miguel, R., Sousa, L., Magalhães, A.I., Saraiva, M.J., Sousa, N. e Palha, J.A., (2004), “Transthyretin is involved in depression-like behaviour and exploratory activity”, *Journal of Neurochemistry*, **88**:1052-1058.
- ☞ Sousa, M.M. e Saraiva, M.J., (2003), “Neurodegeneration in familial amyloid polyneuropathy: from pathology to molecular signalling”, *Progress in Neurobiology*, **71**:385-400.
- ☞ Southwell, B.R., Duan, W., Tu, G.F. e Schreiber, G., (1991), “Ontogenesis of transthyretin gene expression in chicken choroid plexus and liver”, *Comparative Biochemistry and Physiology*, **100B**:329-338.
- ☞ Sparkes, R.S., Sasaki, H., Mohandas, T., Yoshioka, K., Klisak, I., Sakaki, Y., Heinzmann, C. e Simon, M., (1987), “Assignment of the prealbumin (PALB) gene (familial amyloidotic polyneuropathy) to human chromosome region 18q11.2-q12.1”, *Human Genetics*, **75**:151-154.
- ☞ Speake, T., Whitwell, C., Kajita, H., Majid, A. e Brown, P.D., (2001), “Mechanisms of CSF-secretion by the choroid plexus”, *Microscopy Research and Technique*, **52**:49-59.
- ☞ Stabilini, R., Vergani, C., Agostoni, A. e Agostoni, R.P.V. (1968), “Influence of age and sex on prealbumin levels”, *Clinica Chimica Acta*, **20**:358-359.
- ☞ Stauder, A.J., Dickson, P.W., Aldred, A.R., Schreiber, G., Mendelsohn, F.A.O. e Hudson, P., (1986), “Synthesis of transthyretin (prealbumin) mRNA in choroid plexus epithelial cells, localised by in situ hybridisation in the rat brain”, *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, **34**:949-952.
- ☞ Stein, T.D., Anders, N.J., DeCarli, C., Chan, S.L., Mattson, M.P. e Johnson, J.A., (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”, *The Journal of Neuroscience*, **24**:7707-7717.
- ☞ Stein, T.D. e Johnson, J.A., (2002), “Lack of neurodegeneration in transgenic mice overexpressing mutant amyloid precursor protein is associated with increased levels of transthyretin and the activation of cell survival pathways”, *Journal of Neuroscience*, **22**:7380-7388.
- ☞ Straus, W., (1982), “Imidazole increases the sensitivity of the cytochemical reaction for peroxidase with diaminobenzidine at a neutral pH”, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, **30**:491-493.
- ☞ Sundelin, J., Melhus, H., Das, S., Eriksson, U., Lind, P., Tragardh, L., Peterson, P.A. e Rask, L., (1985), “The primary structure of rabbit and rat prealbumin and a comparison with the tertiary structure of human prealbumin”, *Journal of Biological Chemistry*, **260**:6481-6487.
- ☞ Surzycki, S., (2000), “Basic Techniques in Molecular Biology”, *Springer Lab Manual*, Alemanha.
- ☞ Tang, Y.P., Haslam, S.Z., Conrad, S.E. e Sisk, C.L., (2004), “Estrogen increases brain expression of the mRNA encoding transthyretin, an amyloid beta scavenger protein”, *Journal of Alzheimer’s Disease*, **6**:413-20.
- ☞ Tsuzuki, T., Mita, S., Maeda, S., Araki, S. e Shimada, K., (1985), “Structure of the human prealbumin gene”, *Journal of Biological Chemistry*, **260**:557-561.
- ☞ van Jaarsveld, P.P., Edelhoch, H., Goodman, D. S. e Robbins, J. (1973), “The interaction of human plasma retinol-binding protein and prealbumin”, *Biological Chemistry*, **248**:4698-4705.
- ☞ Verdier, Y., Zarandi, M. e Penke, B., (2004), “Amyloid beta-peptide interactions with neuronal and glial cell plasma membrane: binding sites and implications for Alzheimer’s disease”, *Journal of Peptide Science*, **10**:229-248.
- ☞ Vigo-Pelfrey, C., Lee, D., Keim, P., Lieberburg, I. e Schenk, D.B., (1993), “Characterization of beta-amyloid peptide from human cerebrospinal fluid”, *Journal of Neurochemistry*, **61**:1965-1968.
- ☞ Wakasugi, S., Maeda S. e Shimada, K., (1986), “Structure and expression of the mouse prealbumin gene”, *Journal of Biochemistry*, Tokyo, **100**:49-58.
- ☞ Wakasugi, S., Maeda, S., Shimada, K., Nakashima, H. e Migita, S., (1985), “Structural comparisons between mouse and human prealbumin”, *Journal of Biochemistry*, **98**:1707-1714.
- ☞ Wallace, M.R., Naylor, S.L., Kluge-Beckerman, B., Long, G.L., McDonald, L., Shows, T.B. e Benson, M.D., (1985), “Localization of the human prealbumin gene to chromosome 18”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **129**:753-758.
- ☞ Watanabe, C.M., Wolffram, S., Ader, P., Rimbach, G., Packer, L. e Maguire, J.J., (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., Episkopou, V., Piantedosi, R., Maeda, S., Shimada, K., Gottesman, M.E. e Blaner, W.S., (1995), “Studies on the metabolism of retinol and retinol-binding protein in

- transthyretin-deficient mice produced by homologous recombination”, *Journal of Biological Chemistry*, **270**:866-870.
- ☞ Weisner, B. e Roethig, H.J., (1983), “The concentration of prealbumin in cerebrospinal fluid (CSF), indicator of CSF circulation disorders”, *European Neurology*, **55**:96-105.
- ☞ Wendelboe, H.G. e Bisgaard, K., (2006), “Background”, págs: 119-130, Em: “Education Guide - Immunohistochemical Staining Methods”, 4ª Edição, Key, M., (Editor), *Dako Corporation*, Carpinteria, Estados Unidos.
- ☞ Westermark, P., Sletten, K., Johansson, B. e Cornwell, G.G., (1990), “Fibril in senile systemic amyloidosis is derived from normal transthyretin”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **87**:2843-2845.
- ☞ Wilcox, J.N., (1993), “Fundamental principles of in situ hybridization”, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **41**:1725-1733.
- ☞ Wilson, J.G., Roth, C.B. e Warkany, J., (1953), “An analysis of the syndrome of malformations induced by maternal vitamin A deficiency. Effects of restoration of vitamin A at various times during gestation”, *American Journal of Anatomy*, **92**:189-217.
- ☞ Wisniewski, T., Ghiso, J. e Frangione, B., (1994), “Alzheimer’s disease and soluble A β ”, *Neurobiology of Aging*, **15**:143-152.
- ☞ Yamauchi, K., Kasahara, T., Hayashi, H. e Horiuchi, R., (1993), “Purification and characterization of a 3,5,3’-L-triiodothyronine specific binding protein from bullfrog tadpole plasma: a homolog of mammalian transthyretin”, *Endocrinology*, **132**:2254-2261.
- ☞ Yamauchi, K., Nakajima, J.I., Hayashi, H. e Hara, A., (1999), “Purification and characterization of thyroid hormone binding protein from masu salmon serum: A homolog of higher-vertebrate transthyretin”, *European Journal of Biochemistry*, **265**:944-949.
- ☞ Yamauchi, K., Takeuchi, H., Overall, M., Dziadek, M., Munro, S.L.A. e Schreiber, G., (1998), “Structural characteristics of bullfrog (*Rana catesbeiana*) transthyretin and its cDNA - comparison of its pattern of expression during metamorphosis with that of lipocalin”, *European Journal of Biochemistry*, **256**:287-296.
- ☞ Yang, H., Wanner, B., Roper, S.D. e Chaudhari, N., (1999), “An Optimized Method for In Situ Hybridization with Signal Amplification That Allows the Detection of Rare mRNAs”, *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, **47**:431-445.
- ☞ Young, W.S., (1989), “Simultaneous use of digoxigenin and radiolabeled oligodeoxyribonucleotide probes for hybridization histochemistry”, *Neuropeptides*, **13**:271-275.
- ☞ Young, B. e Heath, J.W., (2000), “Wheater’s Functional Histology - A Text and Colour Atlas”, 4ª Edição, *Churchill Livingstone*, Sydney, Austrália.
- ☞ Zheng, W. e Zhao, Q., (2002), “Establishment and characterization of an immortalized Z310 choroidal epithelial cell line from murine choroid plexus”, *Brain Research*, **958**:371-380.



8. ANEXOS

8 - Anexos

Apêndice A - Soluções utilizadas para a Imunohistoquímica.

A.1 - Peróxido de Hidrogênio a 3%

Para preparar 2mL de solução de H₂O₂ a 3%, diluir 60μL de H₂O₂ em 1940μL de água estéril.

Os tampões de lavagem são úteis em IHC para remover o excesso e/ou reagentes indesejados e ainda complexos formados em cada passo da técnica. Entre os tampões mais comuns estão o Tampão Fosfato Salino (PBS) e o Tampão Tris Salino (TBS) (Pace, 2006).

A.2 - Tampão Fosfato Salino (PBS) 10X

Para preparar 1L de tampão PBS-10X, dissolver 8g de NaCl, 2g de KCl, 14,4g de Na₂HPO₄ e 2,4g de KH₂PO₄ em 800mL de H₂O-DEPC.

Ajustar o pH a 7,4 com HCl. Adicionar H₂O-DEPC até perfazer um volume final de 1L. Autoclavar.

Nota: Para preparar 1L de PBS-1X, dissolver 100mL de PBS-10X em H₂O-DEPC até perfazer um volume final de 1L.

A.3 - Tampão Tris Salino (TBS) 10X

Para preparar 1L de tampão TBS-10X, dissolver 8g de NaCl, 0,2g de KCl e 3g de base Tris em 800mL de H₂O-DEPC.

Ajustar o pH a 7,4 com HCl. Adicionar H₂O-DEPC até perfazer um volume final de 1L. Autoclavar.

Nota: Para preparar 1L de TBS-1X, dissolver 100mL de TBS-10X em H₂O-DEPC até perfazer um volume final de 1L.

A.4 - PBS com Tween-20 a 0,05% (PBS-T)

Para preparar 1,5L de PBS-1X com Tween[®]-20, misturar 150mL de PBS-10X com 1350mL de água destilada e 750μL de Tween[®]-20.

A.5 - Tampão Fosfato Salino (PBS) com 1% BSA

Para preparar 10mL de PBS com 1% BSA, misturar 1mL de PBS-10X com 100μL de BSA 10% e 8,9mL de água estéril.

A.6 - Anticorpo Primário

Um anticorpo policlonal de coelho gerado contra a TTR foi usado para detectar a presença desta proteína em secções de tecido.

Para preparar 1mL de anticorpo diluído de 1:200, dissolver 5µL de anticorpo em 995µL de PBS com 1% BSA.

Nota: A adição de anticorpo primário diluído em 1% BSA é provavelmente o método mais utilizado para reduzir as ligações não específicas devido a interações hidrofóbicas (Wendelboe e Bisgaard, 2005).

A.7 - Anticorpo Secundário (Biotinylated Goat Anti-Rabbit IgG)

Para preparar 2mL de solução de trabalho de anticorpo secundário diluída de 1:20, dissolver 100µL de reagente *Biotinylated Goat Anti-Rabbit IgG* (Sigma-Aldrich) em 1,9mL de PBS com 1% BSA.

A.8 - ExtrAvidin Peroxidase

Para preparar 2mL de solução de trabalho de conjugado diluída de 1:20, dissolver 100µL de reagente *ExtrAvidin Peroxidase* (Sigma-Aldrich) em 1,9mL de PBS com 1% BSA.

A.9 - Solução de Coloração

Para preparar 15mL de solução substrato, dissolver uma pastilha de diaminobenzidina (DAB) em 15mL de TBS (pH≈7,6) e adicionar 6µL de H₂O₂ a 100%.

Apêndice B - Soluções utilizadas para a Hibridação *In Situ*.

B.1 - Água tratada com DEPC

As ribonucleases (RNases) são enzimas omnipresentes que degradam o RNA. Um ambiente livre de RNases é essencial para a extração de RNA (Sambrook e Russel, 2001).

O dietilpirocarbonato (DEPC; Figura B.1) é um inibidor de ribonucleases frequentemente usado. O DEPC provoca a inativação enzimática por desnaturação de proteínas. A inativação das RNases é irreversível. Este composto é utilizado para remover as RNases de soluções e materiais de vidro usados na preparação de RNA. O reagente deve ser completamente inativado antes da sua utilização, ao autoclavar, uma vez que o DEPC carboxila o RNA, o que inibe as transcriptases reversas e consequentemente a síntese de cDNA. Por outro lado deve ser usado com cuidado, uma vez que é inflamável e suspeita-se que possa ser carcinogénico. É utilizado para tratar água, que pode depois ser utilizada na preparação de tampões e géis de agarose entre outras aplicações (Surzycki, 2000).

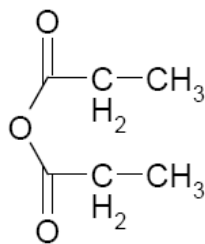


Figura B.1 - Estrutura molecular do dietilpirocarbonato (DEPC).

Adaptado de: Sambrook e Russel, 2001.

Adicionar 0,1mL de DEPC por 100ml de água bidestilada, numa concentração final de 0,1%.

Incubar durante a noite, com agitação (para dissolver completamente o DEPC), à temperatura ambiente e autoclavar durante 30 minutos para remover vestígios de DEPC.

B.2 - Tampão Fosfato Salino (PBS) 10X

Para preparar 1L de tampão PBS-10X, dissolver 8g de NaCl, 2g de KCl, 14,4g de Na₂HPO₄ e 2,4g de KH₂PO₄ em 800mL de H₂O-DEPC.

Ajustar o pH a 7,4 com HCl. Adicionar H₂O-DEPC até perfazer um volume final de 1L. Autoclavar.

Nota: Para preparar 1L de PBS-1X, dissolver 100mL de PBS-10X em H₂O-DEPC até perfazer um volume final de 1L.

B.3 - Tampão TE

Preparar uma solução 10mM Tris-HCl pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0. Autoclavar.

B.4 - Solução de Permeabilização

Para preparar a solução de permeabilização, dissolver 2 μ L de proteinase K em 2mL de tampão TE. Conservar a 37 °C até à utilização.

B.5 - Tampão Fosfato (PB) 0,2M

Para preparar 1L de tampão fosfato 0,2M; dissolver 21,8g de Na₂HPO₄ e 6,4g de NaH₂PO₄ em 800mL de H₂O-DEPC.

Ajustar o pH a 7,4 e adicionar H₂O-DEPC até perfazer um volume final de 1L. Autoclavar.

B.6 - Paraformaldeído (PFA) a 4% em PB

Para preparar 250mL de fixador PFA a 4%, dissolver 8g de PFA em 100mL de água estéril (adicionar NaOH para ajudar à dissolução).

Ajustar o pH a 7,4 e adicionar tampão PB 0,2M até perfazer um volume final de 250mL. Armazenar a 4°C.

B.7 - Tampão de Pré-Hibridação

Para preparar 10mL do tampão de pré-hibridação, adicionar num tubo falcon, 5mL de formamida com 2,5mL de SSC-20X e perfazer 10mL com H₂O-DEPC. Conservar a 4°C.

B.8 - Solução de Pré-Hibridação

Para preparar a solução de pré-hibridação, transferir 4mL do tampão de pré-hibridação para outro tubo falcon e adicionar 16 μ L de esperma de peixe (*fish sperm* DNA). Manter à temperatura utilizada para a pré-hibridação.

B.9 - Solução de Hibridação

Para preparar a solução de hibridação, adicionar a quantidade adequada de sonda SP6 (*sense*) e T7 (*antisense*) à solução de pré-hibridação. Antes da sua aplicação, desnaturar as sondas por incubação a 80°C, durante 5 minutos e colocar em gelo.

B.10 - SSC-20x

Para preparar 1L de SSC-20X, dissolver 175,3g de NaCl e 88,2g de Citrato sódico ($C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$) em 800ml de água bidestilada. Ajustar o pH a 7,0 com NaOH 10N e perfazer o volume até 1L. Autoclavar.

B.11 - Soluções de Lavagem

Para preparar as soluções de lavagem SSC-0,5X e SSC-1X, diluir o SSC-20X para a concentração desejada.

B.12 - Tampão Tris Salino (TBS) 10X

Para preparar 1L de tampão TBS-10X, dissolver 8g de NaCl, 0,2g de KCl e 3g de base Tris em 800mL de H_2O -DEPC.

Ajustar o pH a 7,4 com HCl. Adicionar H_2O -DEPC até perfazer um volume final de 1L. Autoclavar.

Nota: Para preparar 1L de TBS-1X, dissolver 100mL de TBS-10X em H_2O -DEPC até perfazer um volume final de 1L.

B.13 - Solução de Bloqueio

Para preparar a solução de permeabilização, dissolver 3 μ L de Triton-X em 3mL de TBS-1X.

Para obter a solução de bloqueio com soro de ovelha e com o anticorpo anti-DIG, respectivamente; transferir 1,5mL de solução de bloqueio para dois tubos *eppendorf* e dissolver 30 μ L de soro de ovelha num *eppendorf* e no outro 7,5 μ L de anticorpo anti-DIG.

B.14 - Solução de Marcação

Para preparar 10mL de *staining solution*, dissolver uma pastilha de 4-nitro azul tetrazólio/5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (NBT/BCIP) em 10mL de água estéril.

B.15 - Soluções Utilizadas na Electroforese em Gel de Agarose

B.15.1 - Brometo de Etídio

O brometo de etídio (Figura B.2) é um composto com a capacidade de se intercalar entre bases de ácidos nucleicos. Sob luz ultravioleta (302nm), os complexos ácido nucleico-brometo de etídio emitem uma forte fluorescência, que permite a detecção e quantificação de ácidos nucleicos em géis de agarose (Surzycki, 2000).

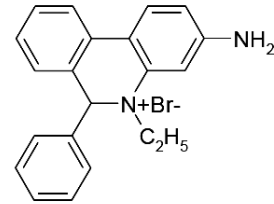


Figura B.2 - Estrutura molecular do brometo de etídio.

Adaptado de: Sambrook e Russel, 2001.

Para preparar brometo de etídio a 500 µg/mL, dissolver 0,05g de brometo de etídio (Amresco, Estados Unidos) em água, sob agitação magnética durante algumas horas, de forma a permitir que a solução fique homogênea.

A solução é envolvida em papel de alumínio e transferida para um frasco escuro. Armazenar à temperatura ambiente.

B.15.2 - Tampão Tris-Acetato-EDTA 10X (TAE-10X)

Para preparar 1L de tampão TAE-10X, juntar 48,4g de base Tris, 11,42mL de ácido acético (Merck, Alemanha) e 40mL de EDTA 0,5M (pH 8,0) a aproximadamente 800mL de água bidestilada e agitar até dissolução completa.

Adicionar água destilada até perfazer um volume final de 1L. Ajustar o pH a 8,0 com ácido acético. Autoclavar.

Nota: Para preparar 1L de TAE-1X, dissolver 100mL de TAE-10X em água destilada até perfazer um volume final de 1L.

B.15.3 - 10X Loading Buffer (Takara)

O *loading buffer* Takara é constituído por SDS 1%, glicerol 50% e azul bromofenol 0,05%.

Em géis de agarose 1%, “correr” com tampão TAE; o azul bromofenol é um indicador de pH, que a pH básico como o do tampão de electroforese TAE adquire carga negativa e migra à mesma velocidade que um fragmento de DNA com 500 pares de bases.

Apêndice C - Procedimento para a Electroforese em Gel de Agarose

A visualização dos produtos de digestão e das amostras de RNA foi efectuada por electroforese em gel de agarose contendo brometo de etídio.

Os géis foram preparados com tampão TAE-1X (apêndice B) contendo 1% de agarose (Eurobio, França). Esta foi dissolvida em tampão TAE-1X na concentração desejada, por exemplo, para 1g de gel de agarose, pesou-se 1g de agarose dissolvido em 100mL de tampão TAE-1X); seguidamente, aqueceu-se a mistura no microondas.

A solução foi arrefecida e de seguida foi adicionado 100µl de brometo de etídio (500µg/ml; Sigma). Depois montou-se um molde para o gel de electroforese (Bio-Rad) e verteu-se o gel no molde com um “pente” com o número apropriado de pocetos e deixou-se gelatinar.

Após a polimerização do gel, retirou-se cuidadosamente o pente e colocou-se o gel na tina contendo tampão TAE-1X. Carregou-se os poços com 10µl de amostra mais 2µl de *loading buffer* e 12µl de marcador de DNA (1Kilobase Plus DNA Ladder, Invitrogen); de modo a poder estimar o tamanho das bandas observadas no gel. Depois correu-se o gel de agarose aplicando-se uma voltagem de 100 Volts para a migração das amostras.

Finalmente, os géis e as respectivas bandas obtidas, foram analisados e fotografados sob luz ultravioleta através de um transiluminador ultravioleta equipado com câmara, usando o software BIO-CAPT (Vilber Lormat, Alemanha).