

Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto
Instituto Politécnico do Porto

Susete Marlene Machado Costelha

**Expressão de Transtirretina no Sistema
Gastrointestinal do Murganho**

Dissertação de Mestrado em
Tecnologia Bioquímica em Saúde

Setembro de 2011

ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE
DO PORTO
INSTITUTO POLITÉCNICO DO PORTO

Susete Marlene Machado Costelha

Expressão de Transtirretina no Sistema Gastrointestinal do Murganho

Dissertação submetida à Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Tecnologia Bioquímica em Saúde, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Maria João Saraiva (Professora Catedrática; Área das Neurociências; Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto) e sob co-orientação da Prof.^a Doutora Cecília Santos (Professora Associada; Área das Ciências da Saúde; Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior) e Prof.^o Doutor Rúben Fernandes (Professor Adjunto; Área de Bioquímica; Unidade de Mecanismos Moleculares da Doença do Centro de Investigação em Saúde e Ambiente - ESTSP e Centro de Farmacologia e Biopatologia Química – FMUP)

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos os que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Em especial:

À Professora Maria João Saraiva por me ter possibilitado os meios para a execução desta tese e por toda a orientação e atenção que dedicou à mesma.

À Professora Cecília pela orientação e por todo o apoio durante todo este tempo. Pela boa disposição e enorme optimismo em relação a tudo.

Ao Professor Rúben e Professora Cristina por terem organizado este mestrado e estarem sempre disponíveis para tudo o que fosse necessário.

A todos os meus amigos do laboratório (vocês sabem quem são), o meu muito obrigado pelo apoio, boa disposição (que seria de mim sem os nossos almoços). Por terem tornado mais fácil todo este processo de aprendizagem e por serem sobretudo uns amigos muito especiais.

Um agradecimento especial à Anabela e ao Paul, pela paciência e dedicação com que me ajudaram sempre que necessário. É tudo mais fácil quando existem pessoas assim.

Um obrigado especial à Paula, Francisco, Tânia, Doutora Rosário Almeida e Doutora Isabel Cardoso por toda a ajuda e apoio.

Aos meus pais e avós, por serem as pessoas mais especiais deste mundo, não seria nada sem vocês.

À minha irmã, por ter dado um significado ainda mais especial à minha vida e por garantir que todos os dias são uma animação. És sem dúvida uma estrela ☺

Ao Filipe, por todo o apoio, dedicação e amor, por estar sempre ao meu lado, por ser a minha fonte de optimismo.

A todos os meus amigos o meu obrigado por estarem comigo em todas as fases da minha vida, esta não é excepção. O meu agradecimento especial a todos vós.

Resumo

A transtirretina (TTR) é uma proteína plasmática constituída por quatro subunidades idênticas de aproximadamente 14KDa e de massa molecular de 55 KDa (Blake et al., 1978).

A TTR é responsável pelo transporte de tiroxina (T4) (Andrea et al., 1980) e retinol (vitamina A), neste último tipo de transporte através da ligação à proteína de ligação ao retinol (RBP) (Kanai et al., 1968). É sintetizada principalmente pelo fígado e secretada para o sangue (Murakami et al., 1987) e também sintetizada pelas células epiteliais do plexo coróide e secretada para o líquido cefaloraquidiano (LCR) (Aleshire et al., 1983). Existem outros locais que expressam TTR mas em menor quantidade, nomeadamente: a retina do olho (Martone et al., 1988), o pâncreas (Kato et al., 1985), o saco vitelino visceral (Soprano et al., 1986) o intestino (Loughna et al., 1995); o estômago, coração, músculo e baço (Soprano et al., 1985). A TTR é uma proteína, do ponto de vista filogenético, extremamente conservada o que já de si é um indicador da sua importância biológica (Richardson, 2009)

O objectivo deste trabalho foi avaliar a expressão de transtirretina ao longo do sistema gastrointestinal do murganho, nos seguintes órgãos esófago, estômago, duodeno, cólon e também bexiga, com cerca de 3 meses de idade. O segundo objectivo foi identificar as células responsáveis por essa expressão, nos órgãos em estudo.

Foi possível verificar que apenas o estômago apresenta valores de expressão normalizada de TTR diferente de zero, expressão essa muito inferior à do fígado, tal como se esperava. Por imunohistoquímica/imunofluorescência foi possível determinar que as células que expressam TTR são pouco abundantes e estão presentes na região glandular do estômago do murganho e também do humano. Para além disto, verificou-se que a TTR co-localiza com somatostatina e que as células que sintetizam TTR correspondem às células D, responsáveis pela secreção de somatostatina.

Palavras-chave: Transtirretina; Polineuropatia Familiar Amiloidótica; Sistema Gastrointestinal

Abstract

Transthyretin (TTR) is a plasma protein composed of four identical subunits of approximately 14 KDa and molecular mass of 55 KDa (Blake et al., 1978).

TTR is responsible for the transport of thyroxine (T4) (Andrea et al., 1980) and retinol (vitamin A) by binding to the retinol binding protein (RBP) (Kanai et al., 1968). It is synthesized primarily by the liver and secreted into the blood (Murakami et al., 1987) and also synthesized by epithelial cells of the choroid plexus and secreted into the cerebrospinal fluid (CSF) (Aleshire et al., 1983). There are other sites that express TTR, but in smaller quantities, namely: the retina of the eye (Martone et al., 1988), pancreas (Kato et al., 1985), visceral yolk sac (Soprano et al., 1986), intestine (Loughna et al., 1995), stomach, heart, muscle and spleen (Soprano et al., 1985).

TTR is a highly conserved protein which from a phylogenetic standpoint is itself an indicator of its biological importance (Richardson, 2009).

The aim of this study was to evaluate the expression of transthyretin along the gastrointestinal tract of mice (3 months old) – esophagus, stomach, duodenum, colon and bladder as well. The second aim was to identify the cells responsible for this expression in the organs under study.

It was possible to verify that only the stomach showed values of normalized expression different from zero. This expression was lower than in the liver, as expected.

By immunohistochemistry / immunofluorescence it was determined that cells expressing TTR are present in the glandular region of the stomach of mice and also in human stomach. It was also determined that D cells, responsible for secretion of somatostatin, synthesize TTR.

Key-words: Transthyretin, Familial Amyloid Polyneuropathy, Gastrointestinal Tract

Índice

Abreviaturas	vii
Introdução	1
Capítulo I – Revisão Bibliográfica	3
1 – Transtirretina	4
i - Estrutura do gene da transtirretina e a sua regulação	4
ii - Expressão de TTR	5
iii - Estrutura da TTR	5
iv - Funções fisiológicas da TTR	7
v - Metabolismo da TTR	10
vi - Variantes da TTR	11
2 - Sistema Gastrointestinal do murganho	14
Capítulo II – Métodos	17
1- Animais	18
2 - Extracção de RNA total e síntese de cDNA	18
3 - Reacção em cadeia da Polimerase (PCR) de cDNA	19
4 - PCR em Tempo Real	20
5 - Imunohistoquímica	20
6 - Hibridização <i>in situ</i>	22
Capítulo III – Resultados	24
1 - PCR de cDNA	25
2 - PCR em Tempo Real	25
3 - Imunohistoquímica	28
4 - Imunofluorescência	29
5 - Hibridação <i>in situ</i>	31
Capítulo IV – Discussão	32
Conclusão	37
Bibliografia	39

Abreviaturas

A β – Péptido β -amilóide

Apo A1 – Apolipoproteína A1

BSA – Albumina Sérica Bovina

cDNA – Ácido dexossiribonucleico complementar

CT – *Threshold cycle*

DEPC – Dietilpirocarbonato

FBS – Soro fetal bovino

HDL - Lipoproteína de elevada densidade

hTTR – Transtirretina humana

LCR – Líquido cefaloraquidiano

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

ORF – Quadro de leitura independente

mTTR – Transtirretina de murganho

PAF – Polineuropatia amiloidótica familiar

PBS – Tampão fosfato pH 7,5

PCR – Reacção em Cadeia da Polimerase

RBP – Proteína de ligação ao retinol

RNA – Ácido ribonucleico

SSC – Tampão citrato de sódio

T3 – Triiodotironina

T4 – Tiroxina

TBG – Globulina de ligação à tiroxina

TTR – Transtirretina

TTR KO – Murganho deficiente em TTR

Introdução

A descoberta da transtirretina (TTR) no plasma (Seibert and Nelson, 1942) e no líquido cefaloraquidiano (LCR) (Kabat et al., 1942) humano ocorreu em 1942. Esta é uma proteína constituída por quatro subunidades idênticas de 14 KDa cada e com uma massa molecular de 55 KDa (Soprano et al., 1985). É principalmente sintetizada pelo fígado, e secretada para o sangue (Murakami et al., 1987), mas também, ao nível do sistema nervoso, pelas células epiteliais do plexo coróide e secretada para o LCR (Aleshire et al., 1983). Em menor quantidade, verifica-se síntese noutros locais: meninges cerebrais (Herbert et al., 1986), células epiteliais da retina do olho (Martone et al., 1988), pâncreas (Kato et al., 1985), saco vitelino visceral (Soprano et al., 1986), placenta (McKinnon et al., 2005), intestino (Loughna et al., 1995) e em pequena escala no estômago, coração, músculo e baço (Soprano et al., 1985).

É uma proteína que possui duas funções principais: transporta a tiroxina (Andrea et al., 1980) e a vitamina A (retinol) através da proteína de ligação ao retinol (RBP) (Kanai et al., 1968). Os níveis elevados de conservação desta proteína, entre os mamíferos e outros vertebrados, são indicativos da sua importância a nível biológico (Richardson, 2009).

São conhecidas mais de 100 mutações associadas a TTR com propriedades amiloidogénicas. A primeira mutação descrita foi associada à polineuropatia amiloidótica familiar (PAF) e foi identificada em 1952, por Corino de Andrade (Andrade, 1952); é uma patologia neurodegenerativa fatal e caracterizada pela deposição de fibras de TTR mutada principalmente no sistema nervoso periférico e autónomo (Coimbra e Andrade, 1971). A sintomatologia inclui disfunção do sistema nervoso sensorial e autónomo bem como dos sistemas urogenital, gastrointestinal e cardíaco.

Apesar de existirem referências à expressão de TTR no sistema gastrointestinal, desconhece-se a contribuição da produção desta proteína para a etiopatologia de PAF, em particular no que se refere às perturbações gastrointestinais observadas nesta doença.

Neste âmbito os principais objectivos do presente trabalho foram: (i) avaliar a expressão de transtirretina ao longo do tracto gastrointestinal – esófago, estômago, duodeno, cólon e também da bexiga, de murganhos com cerca de 3 três meses de idade e (ii) identificar

quais os locais, principalmente no estômago e intestino, onde ocorre a expressão da proteína.

Capítulo I – Revisão Bibliográfica

1 – Transtirretina

A proteína plasmática transtirretina (TTR) foi inicialmente designada de prealbumina devido ao facto de migrar electroforéticamente antes da albumina. Foi descoberta em 1942 no plasma (Seibert e Nelson, 1942) e líquido cefaloraquidiano (LCR) (Kabat et al., 1942) humano. O nome desta proteína resulta da sua dupla função fisiológica como transportadora de tiroxina (Andrea et al., 1980) e de retinol (Vitamina A) (Kanai et al., 1968), através da proteína de ligação ao Retinol (RBP) (Raz et al., 1970).

i - Estrutura do gene da transtirretina e a sua regulação

O gene da TTR está localizado no cromossoma 18, mais especificamente no 18q11.2-q12.1 (Whitehead et al., 1984) e a proteína é codificada por uma simples cópia genética (Tsuzuki et al., 1985). O gene é composto por 6,9 kilobases (kb) e consiste em 4 exões (E1 a E4), cada um com cerca de 200 pares de bases (pb), 3 intrões (I1 a I3), uma sequência TATA *box* na posição de -30 a -24 pb seguida de uma região rica em GC de aproximadamente 20 pb, uma sequência CAAT *box* na posição -101 a -96 pb. O sinal de poliadenilação (AATAAA) encontra-se a 123 pb a jusante da região codificante (Sasaki et al., 1985). Os intrões I1 e I3 contêm dois quadros de leitura independentes (*ORFs*), contudo a sua função é ainda desconhecida (Tsuzuki et al., 1985). Foi sugerido que estes *ORFs* podiam ser responsáveis pela expressão de uma sequência reguladora. Mais tarde foi demonstrado que estes *ORFs* correspondem a transcritos de TTR, que não foram sujeitos a *splicing* ou foram sujeitos a um *splicing* incompleto e que por isso não são expressos nem como parte de um polipéptido ou independentemente (Soares et al., 2003).

Estão identificados dois locais principais de regulação no gene da TTR: uma sequência promotora proximal de -50 a -150 pb e um *enhancer* distal localizado entre 1,6 e 2,5 kb a montante da região codificante (Costa et al., 1986). As mesmas sequências reguladoras estão presentes no gene humano.

O cDNA de TTR no murganho apresenta 82% de homologia com o cDNA humano e 90% com o de rato. A sequência de aminoácidos apresenta ainda maior homologia: 91% com o humano e 96% com a sequência de rato (Costa et al., 1986).

De um ponto de vista filogenético verifica-se que esta proteína é extremamente conservada. O gene da TTR está expresso nos peixes (Santos et al., 1999), anfíbios, répteis, pássaros e ancestrais dos actuais mamíferos (Richardson et al., 1994).

ii - Expressão de TTR

A TTR é expressa principalmente pelos hepatócitos do fígado (Murakami et al., 1987) e secretada para o sangue, atingindo níveis plasmáticos entre os 170 e 420 mg/L (Vatassery et al., 1991). A concentração plasmática de TTR é dependente da idade, os recém nascidos saudáveis apresentam metade da concentração encontrada nos adultos (Vahlquist et al., 1975) e após os 50 anos verifica-se uma diminuição dos níveis desta proteína (Ingenbleek et al., 1979). O fígado é responsável pela produção de cerca de 90% da TTR presente no sangue. Adicionalmente, a TTR é também, activamente, sintetizada pelas células epiteliais do plexo coróide e secretada, de forma unidireccional, para o líquido cefaloraquidiano (Aleshire et al., 1983). Esta síntese representa cerca de 20% do total da proteína no LCR (Dickson et al., 1986). O plexo coróide apresenta os níveis mais elevados de RNA mensageiro, cerca de 4,4 µg de mRNA por grama de peso corporal comparativamente aos níveis expressos pelo fígado, 0,30 µg/g (Schreiber et al., 1990).

Nos mamíferos, o gene da TTR é também expresso nas meninges cerebrais (Herbert et al., 1986); nos ilhéus de Langerhans do pâncreas (Kato et al., 1985); nas células do epitélio da retina do olho (Martone et al., 1988); no saco vitelino visceral (Soprano et al., 1986); na placenta (McKinnon et al., 2005); glândula pineal (Martone et al., 1993) e em menores quantidades no estômago, coração, músculo esquelético e baço (Soprano et al., 1985).

iii - Estrutura da TTR

A estrutura da TTR foi determinada por cristalografia de raios X em 1974 (Blake et al., 1974). É uma proteína tetramérica constituída por quatro monómeros idênticos distribuídos em torno de um canal central. A massa molecular da proteína é 55 KDa, sendo que cada monómero tem de massa molecular 14KDa (Soprano et al., 1985) e é constituído por 127 aminoácidos (Kanda et al., 1974).

Em 1978 foi determinada, por difracção de raio X, a estrutura secundária e terciária de cada monómero (Blake et al., 1978). Verifica-se que 55% dos aminoácidos de cada monómero estão associados à formação de estruturas do tipo de folha β e 5% estão localizados no segmento de hélice α . Cada monómero é constituído por 8 cadeias β que dão origem a duas folhas de quatro cadeias cada (Blake et al., 1978).

Da associação de dois monómeros resulta um dímero formado por ligações de hidrogénio entre as cadeias F e H de duas folhas β , de cada monómero. Os dois dímeros associam-se originando um tetrâmero, por interacções do tipo dímero-dímero entre os dois *loops* no topo de cada cadeia (Figura 1).

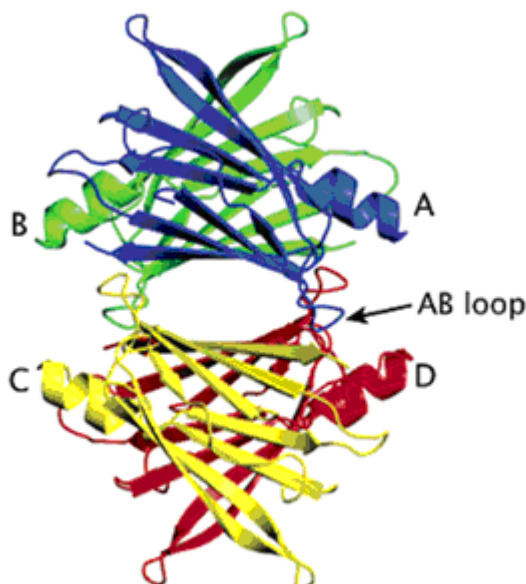


Figura 1: Representação da estrutura quaternária da molécula de TTR (subunidade A – cor azul; subunidade B - cor verde; subunidade C – cor amarela; subunidade D – cor vermelha). Adaptado de (Foss et al., 2005).

A formação específica deste tetrâmero conduz à existência de um canal central, hidrofóbico, que atravessa a molécula (Blake et al., 1978; Nilsson e Peterson, 1971), onde ocorre a ligação das hormonas da tiróide.

iv - Funções fisiológicas da TTR

A TTR tem duas funções principais, transporta a tiroxina – T_4 (3,5,3',5' – tetraiodo-L-tiroxina) (Andrea et al., 1980) e a vitamina A (retinol), através da proteína de ligação ao Retinol (RBP) (Kanai et al., 1968).

Transporte das hormonas da tiróide

É hoje reconhecida a enorme importância que as hormonas da tiróide têm sobre o crescimento, desenvolvimento, metabolismo, fertilidade, sistema cardiovascular e homeostasia do sistema nervoso central (Hulbert, 2000).

A glândula da tiróide sintetiza tiroxina (T_4), que sofre deionização, nos tecidos alvo, dando origem à forma biologicamente activa desta hormona, a triiodotironina (T_3) (Köhrle, 1994). No homem, após ser secretada, a hormona circula associada a três proteínas plasmáticas: transtirretina (TTR), globulina de ligação à tiroxina e albumina (TBG) (Robbins, 1991). Embora a TBG seja a proteína plasmática que existe em maior quantidade nos humanos, a TTR é a maior transportadora de tiroxina no plasma de roedores e no LCR quer de roedores quer de humanos. Em humanos, a TTR é responsável pelo transporte de 15% de T_4 no plasma e 80% no LCR (Robbins, 1991).

A TTR apresenta, no canal central de carácter hidrofóbico, dois locais de ligação para a T_4 (Nilsson e Peterson, 1971; Blake et al., 1978). Contudo, após ligação de uma molécula de T_4 , a afinidade da TTR para a segunda molécula reduz-se drasticamente, fazendo com que cada tetrâmero de TTR apenas transporte uma molécula de T_4 (Robbins, 1991). Verifica-se também que devido à elevada afinidade para a T_4 , a TTR não liga à T_3 (Andrea et al., 1980). Para além da função de transporte, esta proteína parece mediar a transferência da tiroxina sérica, para os tecidos alvo, principalmente no cérebro, através das barreiras sangue-cérebro e sangue-plexo coróide (Schreiber et al., 1990; Hagen e Solberg, 1974) (Figura 2).

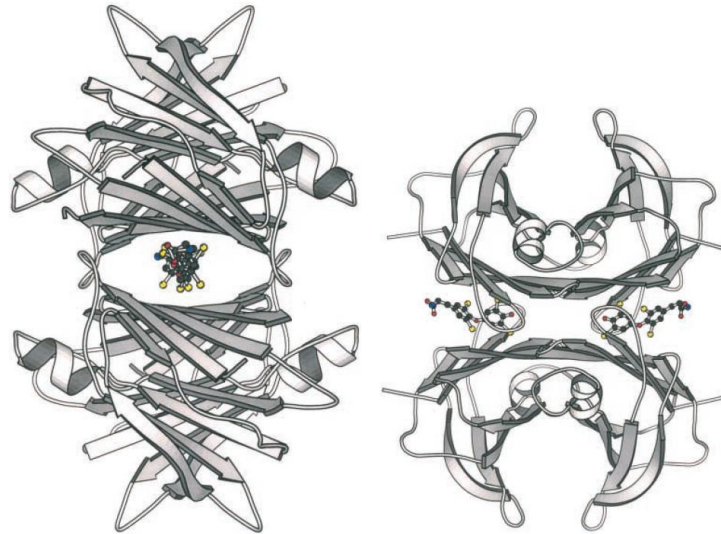


Figura 2: Representação do complexo TTR – tiroxina, Adaptado de (Hamilton e Benson, 2001).

Contudo, embora os murganhos deficientes para TTR (TTR KO) apresentem diminuição dos níveis de retinol e tiroxina, apresentam um fenótipo normal; a ausência de TTR não impede o transporte de tiroxina até ao cérebro (Palha et al., 1997) bem como não provoca sinais de hipotireoidismo, nem mesmo no parênquima cerebral (Palha et al., 2000), sugerindo a existência de um mecanismo compensatório no metabolismo e transporte de tiroxina que ocorrerá na ausência de TTR.

Transporte de Retinol

O retinol, também designado de vitamina A, é um micronutriente essencial envolvido em inúmeras funções fisiológicas, nomeadamente, diferenciação celular, reprodução, visão e desenvolvimento. A TTR é a proteína transportadora de retinol no plasma, através da proteína de ligação ao retinol (RBP) (Kanai et al., 1968). O RBP é uma proteína monomérica de massa molecular de 21 kDa e consiste numa sequência de 182 aminoácidos (Rask et al., 1979). A ligação do RBP à TTR aumenta a estabilidade do complexo (Goodman, 1984) e reduz os níveis de filtração glomerular da proteína, de baixo peso molecular, nos rins (Noy et al., 1992) (Figura 3). O RBP previne a oxidação do retinol e a sua insolubilidade no plasma.

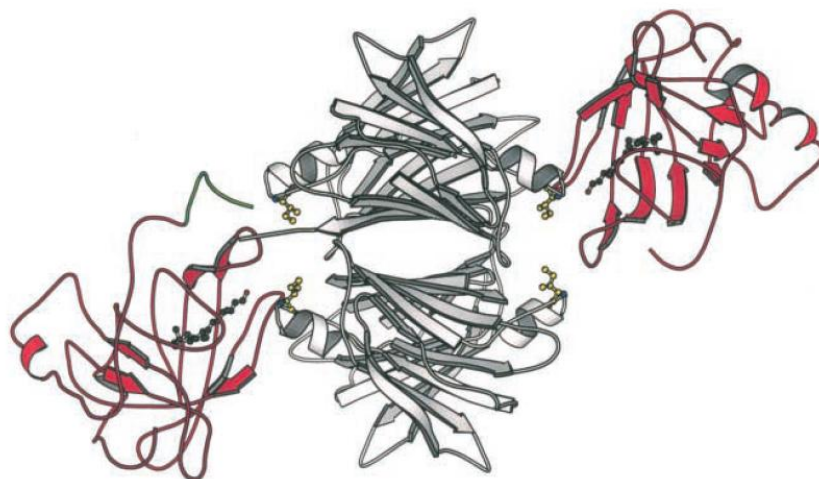


Figura 3: Representação do complexo TTR – RBP. O tetrâmero de TTR (cinzento) com o resíduo 84 a amarelo e as duas moléculas de ligação (vermelho) e o retinol (preto). Adaptado de (Hamilton e Benson, 2001).

A concentração de RBP no plasma humano é de cerca de 2 μM (Goodman, 1984) enquanto que a de TTR é de cerca de 45 μM (Ingenbleek et al., 1994) e o complexo TTR:RBP:Retinol está presente no plasma na razão de 1:1:1 (Blaner, 1989).

Outras funções da TTR

Recentemente têm sido descritas outras funções importantes da TTR ao nível do sistema nervoso central. Verificou-se que, em animais TTR KO, ocorre um aumento da actividade exploratória e redução de sinais depressivos provavelmente explicados por uma modulação do sistema noradrenérgico (Sousa et al., 2004). A TTR está também envolvida na manutenção dos processos cognitivos durante o envelhecimento por actuação na via de sinalização do retinol (Brouillette et al., 2008). Foi também reportado que estes animais apresentam níveis de neuropeptido Y superiores aos animais normais, sendo este um neuropeptido com propriedades antidepressivas (Nunes et al., 2006). A TTR tem também um papel importante no processo de regeneração do nervo periférico, *in vivo*, após lesão (Fleming et al., 2007).

Outra função descrita da TTR é a capacidade de modular a agregação do péptido β -amilóide (A β), formando complexos estáveis com o A β o que previne a formação de amilóide (Schwarzman et al., 1994). Para além disso, os níveis plasmáticos de TTR estão

significativamente diminuídos em doentes com Alzheimer (Riisøen, 1988; Serot et al., 1997)

A TTR associa-se a lipoproteínas, nomeadamente lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e de elevada densidade (HDL) (Tanaka et al., 1994) e encontra-se também associada à apolipoproteína AI (apo AI). Estas observações sugerem uma relação entre a TTR e a biologia das lipoproteínas (Sousa et al., 2000).

Para além das funções acima descritas, a TTR está directamente envolvida nas fases de resposta ao stress (Bernstein et al., 1989) e em condições agudas de stress (Ingenbleek et al., 1994). Durante as fases de desnutrição ocorre uma diminuição dos níveis de TTR (Ingenbleek et al., 2002). O mesmo acontece durante os processos inflamatórios onde se verifica que os níveis de TTR mRNA no fígado decrescem (Qian et al., 1995).

Outros estudos mostram a importância do papel da TTR nos processos imunológicos (Burton et al., 1985). A TTR é capaz de inibir a secreção de interleucina I (Borish et al., 1992) bem como estabelecer ligações com produtos de oxidação da norepinefrina (Boomsma et al., 1991), com o ácido retinóico (Smith et al., 1994) flavonoides presentes nas plantas (Lueprasitsakul et al., 1990); contudo a importância destas ligações não é ainda conhecida.

v - Metabolismo da TTR

Em humanos a renovação total de TTR é de cerca de 250-300 mg/m²/dia (Vahlquist et al., 1973). O tempo médio de vida desta proteína é de 2 a 3 dias no ser humano (Vahlquist et al., 1973; Socolow et al., 1965) e cerca de 29 horas em ratos (Dickson et al., 1982). No rato, os principais locais de degradação de TTR (proveniente do fígado e do LCR) são o fígado (36-38%), o músculo (12-15%) e a pele (8-10%). Os rins, tecido adiposo, testículos e tracto gastrointestinal são responsáveis pela degradação de cerca de 1-8% de TTR. Menos de 1% desta proteína é degradada noutros tecidos (Makover et al., 1988).

O mecanismo que conduz à internalização e degradação de TTR ainda não é conhecido. Alguns estudos indicam a existência de um receptor responsável por mediar o transporte de TTR para o meio intracelular (Divino e Schussler, 1990; Vieira et al., 1995). O receptor designado de megalina, pertencente à família de receptores das lipoproteínas de baixa

densidade está associado à internalização de TTR no rim, prevenindo a sua filtração a nível glomerular (Sousa et al., 2000). A internalização de TTR ao nível das células do fígado está provavelmente associada ao metabolismo das lipoproteínas, e parece ser mediada por um receptor, ainda não identificado, sensível para a proteína RAP (Sousa et al., 2001).

vi - Variantes da TTR

Até agora são conhecidas mais de 100 variantes de TTR com propriedades amiloidogénicas (<http://amyloidosismutations.com>). Há excepção de uma variante que resulta de uma deleção de um aminoácido na posição 122, todas as outras resultam de mutações pontuais na cadeia polipeptídica.

São conhecidas inúmeras mutações no gene de TTR sem qualquer manifestação clínica, um exemplo desta situação é a mutação Gly6Ser presente em 12% da população caucasiana podendo por isso ser considerada um polimorfismo (Jacobson et al., 1995). Outras têm efeitos protectores como é o caso da mutação Thr119Met, esta forma de TTR apresenta um aumento da afinidade de ligação à T4 *in vitro* (Almeida et al., 1997) e uma maior capacidade de resistir à formação de amiloide (McCutchen et al., 1995).

A maioria destas mutações conduz a situações de neuropatias periféricas mas também a cardiomiopatias, síndrome do túnel cárpico e vítreopatia. As mutações Leu55Pro e Leu12Pro provocam quadros mais severos de doença e aparecem mais precocemente. As diferenças resultam, muito provavelmente, da instabilidade conformacional da proteína mutada (Brett et al., 1999; Jacobson et al., 1992). Algumas mutações no gene da TTR resultam num grupo heterogéneo de doenças designadas por amiloidoses hereditárias. Em 1952, Corino de Andrade identificou a primeira forma destas doenças e designou-a de **polineuropatia amiloidótica familiar** (PAF) (Andrade, 1952). PAF é uma doença neurodegenerativa fatal caracterizada pela deposição extracelular de fibras de TTR mutada principalmente nos nervos e gânglios do sistema nervoso periférico e autónomo (Coimbra e Andrade 1971). A forma mais comum de PAF (nos doentes portugueses) resulta da substituição de uma valina por uma metionina na posição 30 do gene da TTR (Val30Met) (Saraiva et al., 1984). Na região de Portugal onde a doença é mais comum a frequência desta mutação está estimada em 1 para 625 (Alves et al., 1997). Para além do norte de Portugal, existem outros locais do mundo onde surgem doentes com PAF, com a mutação

Val30Met, nomeadamente no Norte da Suécia, Japão e Maiorca (Andersson, 1970; Ando et al., 2000; Munar-Qués et al., 1988).

De salientar também, que em alguns casos, quando surge uma mutação patogénica e outra não patogénica, esta última parece ter um efeito protector contra o desenvolvimento de PAF (Coelho et al., 1996). É de notar também que a TTR normal tem pouca tendência a depositar-se sobre a forma de fibras de amilóide e a acontecer ocorre, preferencialmente, no coração numa patologia designada de amiloidose sistémica senil em doentes muito idosos (Westermarck et al., 1990).

Alguns estudos apontam no sentido do potencial amiloidogénico da TTR resultar das fracas interacções entre as subunidades desta proteína. O tetrâmero de TTR, na forma mutada, é pouco estável, ocorrendo a dissociação do mesmo em monómeros com elevada tendência para se agregarem, originando assim fibras de amilóide insolúveis (Quintas et al., 2001).

In vivo, a formação de amilóide parece depender de outros factores para além do potencial amiloidogénico da proteína (Cardoso et al., 2008). Os depósitos de amilóide não são constituídos apenas por monómeros de TTR mas também por outros componentes, nomeadamente: (i) componente amilóide P sérico (Pepys, 1988) (ii) glicosaminoglicanos sulfonados (Snow et al., 1987) (iii) apolipoproteína E (Gallo et al., 1994) e J (Choi-Miura et al., 1992); (iv) α 1-antiquimiotripsina (Abraham et al., 1988); (v) componentes da membrana – fibronectina, laminina e colagénio tipo IV (Scott et al., 1983); (vi) proteínas complementares (Rogers et al., 1992) e (vii) iões metálicos (Bush et al., 1994).

Os depósitos de amilóide podem ser facilmente identificados por coloração de vermelho de Congo, observados com luz polarizada. A existência de depósitos provoca birrefringência de cor verde (figura 4). A acumulação de fibras de amilóide nos tecidos provoca danos estruturais e funcionais nos mesmos.

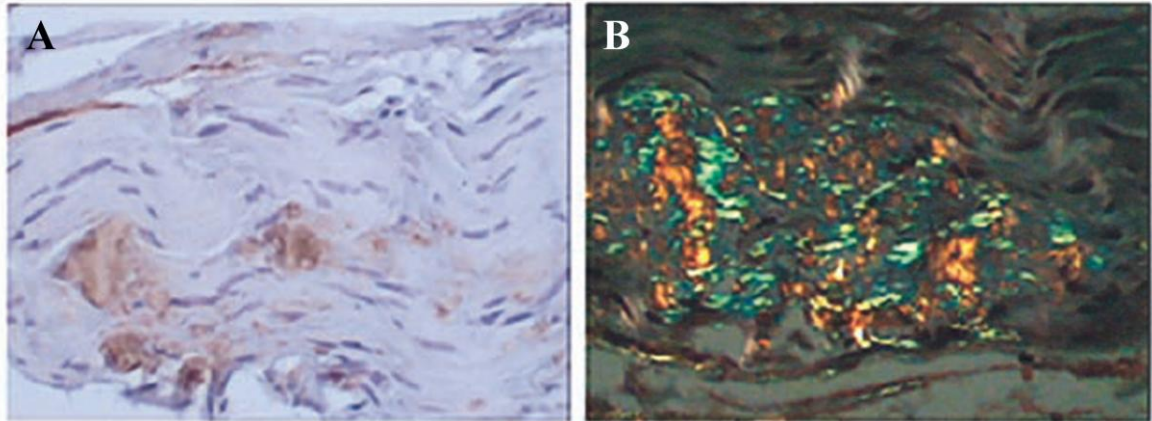


Figura 4: Deposição de TTR no nervo periférico de um doente PAF. (A) Imunohistoquímica para TTR. (B) Coloração de Congo red. Adaptado de (Sousa et al., 2001).

Sintomatologia de PAF

Os sintomas clínicos de PAF surgem na terceira/quarta década de vida do indivíduo. Os sintomas iniciais estão associados a uma disfunção do sistema nervoso sensorial e autónomo e incluem a perda de sensação de dor e de temperatura nas extremidades corporais. É uma doença que afecta sobretudo o sistema nervoso periférico (Sousa e Saraiva, 2003) mas também os sistemas urogenital, gastrointestinal e coração.

No sistema urogenital surgem sintomas de disfunção eréctil e do sistema excretor, que se traduzem por uma urgência em urinar e ao mesmo tempo em dificuldade na micção. O mecanismo responsável por esta disfunção do sistema excretor parece envolver os nervos aferentes somáticos e pós-ganglionares colinérgicos (Ito et al., 2006). Com o evoluir da doença surgem também sintomas de disfunção renal (Ando et al., 1993).

O sistema gastrointestinal é extremamente afectado em PAF. As fibras de amilóide surgem em torno dos plexos mientéricos em muito maior quantidade do que em outro tipo de amiloidose (Yoshimatsu et al., 1998). No esófago ocorre uma diminuição dos movimentos peristálticos e um relaxamento anormal do esfíncter esofágico inferior (Bjerle et al., 1993). Foi também reportado que doentes com PAF apresentam um número reduzido de células endócrinas que secretam serotonina, colecistoquinina, gastrina e secretina, no duodeno, o que pode provocar uma desregulação neuro-endócrina responsável pela diminuição da motilidade intestinal (El-Salhy et al., 1994). As perturbações no trânsito intestinal são

muito comuns, tanto a diarreia como a obstipação podem surgir em alternância no mesmo paciente. A diarreia parece resultar de um crescimento bacteriano excessivo associado à redução da motilidade (Feurle, 1987) e à redução da absorção dos ácidos biliares (Suhr et al., 1992). A obstipação parece estar associada ao fenómeno de neuropatia entérica (Ito et al., 2006) bem como a uma diminuição do número de células endócrinas no intestino grosso, tal como já tinha sido proposto para o intestino delgado (El-Salhy e Suhr, 1996).

Até ao momento o único tratamento para a PAF passa pelo transplante de fígado que elimina a produção de TTR mutada no fígado e reduz drasticamente os seus níveis no plasma dos doentes (Holmgren et al., 1991). Após o transplante ocorre uma melhoria clínica muito significativa na função autónoma, bem como ao nível dos sintomas gastrointestinais. O transplante deve ser realizado o mais cedo possível após o início dos primeiros sintomas clínicos, se possível logo no primeiro ano (Holmgren et al., 1991).

2 - Sistema Gastrointestinal do murganho

O sistema gastrointestinal do murganho é similar ao dos restantes mamíferos, à excepção dos ruminantes, e consiste no esófago, estômago, duodeno, jejuno, íleo, ceco, cólon e recto.

O estômago encontra-se dividido em duas áreas distintas, uma zona glandular e outra não glandular. (Figura 5).

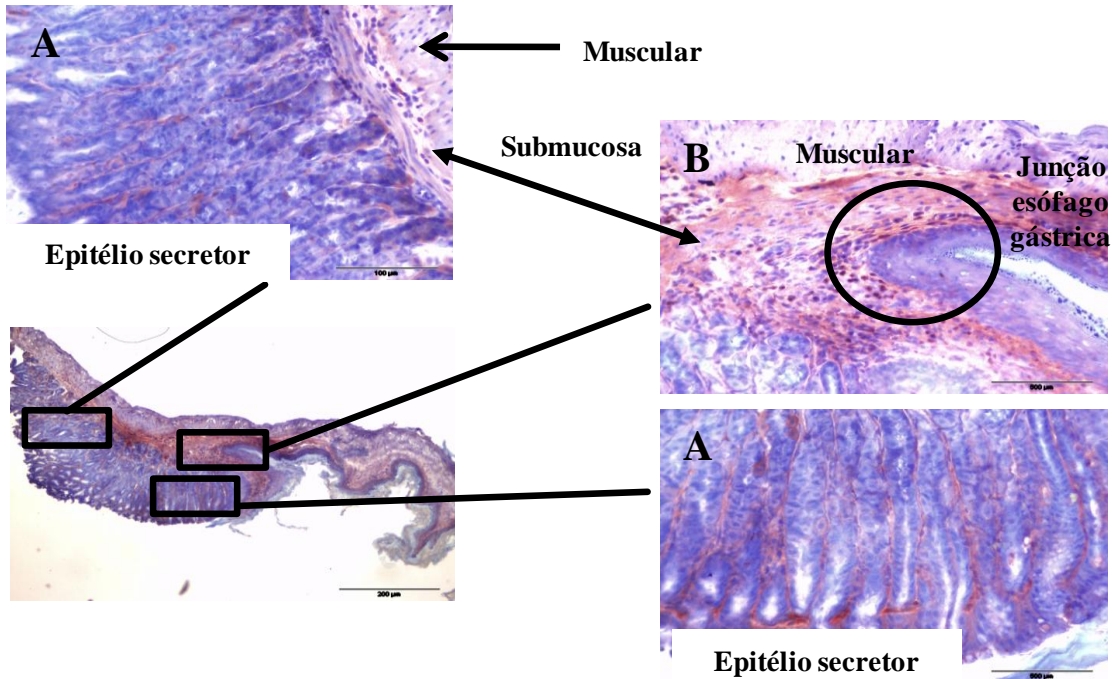


Figura 5: Histologia do estômago. A – Zona glandular, B – Zona não glandular.

Todo o aparelho gastrointestinal, desde o estômago ao cólon, possui inúmeras células endócrinas. As células enteroendócrinas, constituem cerca de 1% das células epiteliais presentes neste sistema e encontram-se rodeadas pelas células parietais, células principais e células produtoras de muco no estômago. Ao nível do intestino, para além das células enteroendócrinas existem também células de goblet, enterócitos e células de Paneth (May e Kaestner, 2010) (Figura 6).

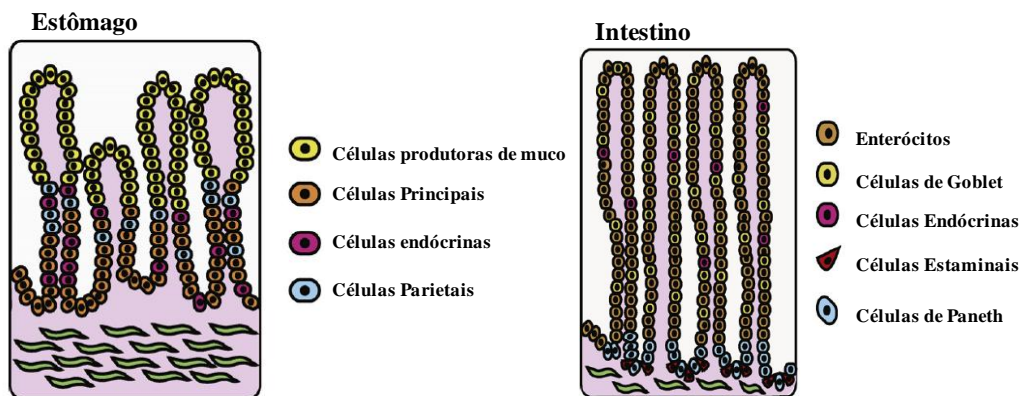


Figura 6: Ilustração dos principais tipos de células presentes no epitélio gastrointestinal. Adaptado de (May e Kaestner, 2010).

Existem, pelo menos, 15 tipos diferentes de células enteroendócrinas classificadas de acordo com o tipo de produtos hormonais e da ultraestrutura dos grânulos secretores (Rindi et al., 2004). Cada célula enteroendócrina pode secretar uma ou mais hormonas bem como substâncias semelhantes a hormonas, directamente para a lâmina própria do órgão em questão e ser difundida até aos capilares. Essas hormonas incluem a gastrina, histamina, serotonina, colecistoquina, somatostatina e péptidos semelhantes ao glucagon (Rindi et al., 2004). Embora estas células estejam presentes em pequena quantidade regulam a digestão, a motilidade intestinal, o apetite e o metabolismo (May e Kaestner, 2010).

Capítulo II – Métodos

1- Animais

Foram utilizados murganhos de background genético Sv129 e murganhos *knockout* para a TTR (Episkopou et al., 1993). Toda a manipulação animal decorreu de acordo com as directrizes e regras estipuladas pela União Nacional e Europeia para os cuidados e manipulação de animais de laboratório (Directiva 2010/63/EU). Os animais foram instalados em gaiolas apropriadas, com uma temperatura ambiente constante (22°C) e um fotoperíodo de 12h de luz/ 12h de ausência de luz. A água e ração foram disponibilizadas *ad libitum*. Toda a manipulação animal decorreu de forma a minimizar a dor e stress dos animais envolvidos na experiência bem como o número de animais utilizados.

A recolha de tecidos ocorreu após os animais serem anestesiados com uma mistura de 1mg/Kg de medetomidina (Sedorm) e 75 mg/Kg de ketamina (Clorketam 100).

Foram recolhidos os seguintes órgãos: esófago, estômago, duodeno, cólon, fígado, cérebro e bexiga. Metade de cada órgão foi imediatamente fixado em formalina neutra tamponada e, posteriormente, os tecidos foram processados e incluídos em parafina. Após inclusão os tecidos foram cortados em secções de 5 µm. A outra metade foi, imediatamente, congelada em gelo seco e mantida a -80°C até ser usado.

2 - Extração de RNA total e síntese de cDNA

O RNA (ácido ribonucleico) total foi extraído de cada órgão, após homogeneização, com Reagente TRIzol (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Foram usados dois sistemas de homogeneização: manual e com ultra turax (modelo VDI12; VWR). A avaliação quantitativa e qualitativa do RNA extraído foi realizada por espectrometria (Nanodrop), e por electroforese em gel de agarose com brometo de etídeo (Sigma).

A síntese de cDNA foi feita a partir de 1 µg de RNA total de cada uma das amostras. A esta quantidade de RNA foram adicionados 50 ng/ µl de Random hexâmeros (Invitrogen), 10 mM de dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) e água até perfazer um volume de reacção de 10 µl. As amostras foram incubadas a 65°C, durante 5 minutos para ocorrer desnaturação. De seguida foram colocadas sobre o gelo durante 1 minuto para manter a desnaturação das cadeias de RNA. Após, arrefecimento, foi adicionado, a cada volume de reacção: 10X RT buffer (Invitrogen), 25 mM de MgCl₂ (Fermentas), 0,1M DTT

(invitrogen) e 40 U/ µl de RnaseOUT (invitrogen). Procedeu-se a uma incubação a 25°C durante 2 minutos e adicionou-se a cada tubo 50U de Superscript II (Invitrogen). Procedeu-se a três ciclos de incubação: no primeiro as amostras foram mantidas a 25°C durante 10 minutos, no segundo foram mantidas a 42°C durante 50 minutos, durante estes dois ciclos ocorreu síntese de cDNA; no terceiro ciclo, as amostras, foram mantidas a 70°C durante 15 minutos, ocorrendo assim a reacção de terminação. Após o último ciclo procedeu-se ao arrefecimento em gelo. Adicionou-se ainda, a cada tubo, 2U de RNase H (New England Biolabs) e fez-se um último ciclo de aquecimento a 37°C durante 20 minutos, para remover todo o RNA não convertido em cDNA. Após arrefecimento, as amostras foram conservadas a -80°C.

3 - Reacção em cadeia da Polimerase (PCR) de cDNA

As sequências de *primers* utilizadas foram desenhadas pelo Laboratório e são as seguintes: gene de estudo – mTTR 5'CCTTTGCCTCGCTGGACTGGTAT 3' (sequência *sense*) e 5' AATTCTGGGGGTTGCTGACGACA 3' (sequência *antisense*); gene de referência – HPRT (Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase) 5' GTAATGATCAGTCAACGGGGGAC 3' (sequência *sense*) e 5' CCAGCAAGCTTGCAACCTTAACCA 3' (sequência *antisense*). O gene de estudo conduz a uma banda de 419 e o de referência a uma banda de 177 pares de bases. Para um volume de reacção de 50 µl por amostra foram utilizados: 3 µl de cDNA; 5 µl de 10X Taq Buffer (Fermentas); 3 µl de Mgcl₂ a 25 mM (Fermentas); 1 µl de dNTPs a 10mM (Fermentas); 1 µl de cada um dos *primers* à concentração de 10 OD; 0,25 µl de Taq Polimerase (Fermentas). O volume foi completado com água estéril.

A reacção de amplificação ocorreu num termociclador (STRATAGENE): desnaturação inicial a 95°C durante 5 min; 40 ciclos onde ocorreu uma desnaturação a 95°C durante 30 s, um emparelhamento a 55°C durante 1 min e uma extensão a 72°C durante 1min e 30 s (por ciclo) e finalmente uma extensão final a 72°C durante 6 min.

Após adição de *loading* buffer a cada amostra foi realizada uma electroforese em gel de agarose a 2% com brometo de etídeo (Sigma).

4 - PCR em Tempo Real

Os *primers* utilizados foram desenhados usando o software Beacon: gene de estudo - mTTR 5'-AGCCCTTTGCCTCTGGGAAGAC-3' (sequência *sense*) e 5'-TGCGATGGTGTAGTGGCGATGG-3' (sequência *antisense*); gene de referência - 18S 5'- AAATCAGTTATGGTTCCTTTGGTC-3' (sequência *sense*) e 5'-GCTCTAGAATTACCACAGTTATCCAA-3' (sequência *antisense*).

Os *primers sense* e *antisense* emparelham em diferentes exões. O PCR em tempo real foi executado num termociclador IQ5 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Para um volume final de reacção de 20 µl adicionou-se 10 µl de SYBR Green master mix (Bio-Rad); 0,25 µl de cada *primer* de mTTR a 20 mM e 0,30 µl de cada *primer* de 18S a 10mM; 1 µl de cada amostra de cDNA diluída num factor de 1:10 e água estéril. As condições estabelecidas para o PCR foram: desnaturação inicial a 95°C durante 10 segundos, seguido de 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos e de 20 segundos a 60°C (temperatura de hibridação). A medição do produto fluorescente ocorreu num único modo de aquisição a 72°C após cada ciclo.

As curvas de calibração, do gene de estudo e do gene de referência, foram efectuadas usando um conjunto de diluições seriadas de factor 1:4, em triplicado. Foram aceites os valores de eficiência compreendidos entre 90% e 105%. Os controlos negativos (onde se substituiu cDNA por água estéril) foram feitos para cada conjunto de reacções. Procedeu-se à quantificação da expressão do gene de mTTR pelo método de ΔC_T (*threshold cycle*) usando um gene de referência. Os resultados foram apresentados em unidades arbitrárias e correspondem à média \pm desvio padrão. Os grupos de órgãos em estudo foram comparados através da utilização do teste t *Student's*. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

5 - Imunohistoquímica

As secções dos diferentes tecidos recolhidos foram analisados quanto à expressão de TTR utilizando para isso um anticorpo produzido em coelho contra TTR recombinante de rato - mTTR - (1:1500; Q-Biogen, Ilkirch Cedex, France) e também quanto à expressão de cromogranina A (1:400; Abcam, Cambridge, UK). As secções dos tecidos dos animais TTR KO (TTR *-/-*) funcionaram como controlos negativos de toda a análise histoquímica.

Os procedimentos para a imunohistoquímica envolveram a desparafinização de cerca de 30 min em HistoClear (National Diagnostics); hidratação dos tecidos, a partir de uma série decrescente de álcoois (100% - 90% - 80% - 70%, as lâminas permaneceram 10 min em cada álcool); após hidratação os tecidos foram imersos em tampão fosfato a pH 7.5 (PBS). A actividade da peroxidase endógena foi bloqueada com uma solução de 3% de H₂O₂ em PBS. De seguida procedeu-se à incubação dos tecidos com um tampão de bloqueio contendo 1% de albumina sérica bovina (BSA) e 4% de soro fetal bovino (FBS) em PBS, durante 1h à temperatura ambiente. O anticorpo primário foi diluído no mesmo tampão de bloqueio e a incubação ocorreu durante toda a noite a 4°C. Após lavagens em PBS, procedeu-se à incubação das lâminas com o anticorpo secundário – anti-coelho IgG (Sigma, St Louis, MO, USA) 1h à temperatura ambiente e posteriormente, com Extravidina peroxidase (Sigma) nas mesmas condições. Como substrato de cor foi utilizada a diaminobenzidina (DAB – Sigma) e como contrastante nuclear uma solução de hematoxilina modificada segundo Gill II (Merck). Após lavagem em água corrente, procedeu-se à desidratação dos tecidos, a partir de uma série crescente de álcoois (70% - 80% - 90% - 100%). De seguida, as lâminas foram colocadas novamente em HistoClear durante cerca de 30 min e, finalmente foram montadas utilizando para isso meio de montagem não aquoso – Entellan (Merck).

Para a técnica de imunofluorescência foram utilizadas secções dos tecidos dos animais em estudo e estômago humano (cedido pelo Laboratório de Histologia do Centro de Investigação em Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior). Procedeu-se a uma dupla marcação destas secções utilizando os seguintes conjuntos de anticorpos: anti-mTTR (1:1500) com anti-Somatostatina (1:50; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) ou com anti-Beta ATPase de hidrogénio e potássio (1:50; Abcam, Cambridge, UK). No tecido humano apenas se realizou uma dupla marcação com um anticorpo anti prealbumina humana (1: 200; Dako, Denmark) e o anticorpo anti-Somatostanina já referido. Os anticorpos secundários incluem: (i) um anticorpo anti-coelho 488; (ii) um anticorpo anti-murganho 594 e (iii) um anticorpo anti-cabra 568 e foram utilizados numa diluição de 1:500. O procedimento experimental envolveu a desparafinização; hidratação dos tecidos; incubação com o tampão de bloqueio e posterior incubação com os anticorpos primários, durante toda a noite a 4°C (procedimentos idênticos aos realizados para imunohistoquímica). Os anticorpos secundários foram incubados durante 2h à temperatura

ambiente. De seguida procedeu-se à montagem das lâminas em meio de montagem para fluorescência – Vectashield (Vector laboratories, Inc, Burlingame). As lâminas de tecido de ratinho foram observadas com um microscópio de fluorescência AxioImager Z1 (Carl Zeiss, Germany) enquanto as lâminas de tecido humano foram observadas com um microscópio confocal Leica SP2 AOBS SE (Leica Microsystems, Germany), as imagens foram analisadas com os programas associados a cada microscópio.

6 - Hibridização *in situ*

Para a hibridização *in situ* foram utilizadas lâminas contendo tecido incluído em parafina. Todo o processamento, manuseamento e corte dos tecidos decorreu de forma a minimizar possíveis contaminações com RNA. Foram utilizados secções de cérebro contendo plexo coróide, que serviram de controlo positivo, e secções de estômago, todos os tecidos eram provenientes de animais com TTR endógena (TTR+/+).

A detecção do RNA mensageiro (mRNA) de TTR foi realizada pelo método da digoxigenina (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN, USA). As sondas de mTTR foram transcritas a partir de um plasmídeo PGEM-4 (Promega) contendo o cDNA completo de mTTR. A sonda *antisense* foi transcrita a partir do promotor SP6 após linearização do plasmídeo com a enzima de restrição Hind III (New England) e a sonda *sense* a partir do promotor T3 após linearização do plasmídeo com a enzima de restrição Sma I (New England).

Após desparafinização e hidratação dos tecidos (processos previamente descritos) os slides foram tratados com uma solução de HCl 0,2 M durante 10 min à temperatura ambiente, 50 µg/mL de proteinase K durante 10 min a 37°C, 0,2% de glicina durante 5 min, 4% de paraformaldeído pH 7 durante 1 min e 1,33% de trietanolamina, 0,25% de anidrido acético durante 10 min. Entre cada solução os slides foram imersos, duas vezes, em PBS tratado com Dietilpirocarbonato (DEPC). A pré-hibridação ocorreu durante 4h à temperatura de 58°C no tampão de hibridização [10X cloreto de sódio, tampão citrato de sódio (SSC), 50% formamida] e a hibridação ocorreu a 55°C durante toda a noite; foi utilizada uma concentração de 2,5 ng/ µl de ribosondas. No dia seguintes as lâminas foram imersas em 4X, 2X e 1X SSC, durante 10 min e tratados com 20 µg/mL de RNase A durante 30 min a 37°C. De seguida foram colocados numa solução contendo 2xSSC e 50% de formamida

durante 1h a 52°C. A detecção da hibridação ocorreu utilizando um anticorpo conjugado com fosfatase alcalina anti digoxigenina (Roche) de acordo com as instruções do fabricante. Foram realizados 6 ensaios para otimizar as condições de hibridação, fazendo variar a temperatura de hibridação entre os 55°C e os 60°C e também o tempo de exposição à proteinase K, que variou entre os 10 min e os 30 min. O ensaio descrito foi o único onde ocorreu detecção de hibridação.

Capítulo III – Resultados

1 - PCR de cDNA

Numa primeira fase, para determinar se a TTR é expressa no tracto gastrointestinal de murganho, foi realizado um PCR para detecção de cDNA dos seguintes tecidos: cólon, estômago, pâncreas, bexiga, esófago, duodeno e fígado. Os tecidos foram provenientes de um murganho TTR +/+ de 3 meses de idade (figura 7).

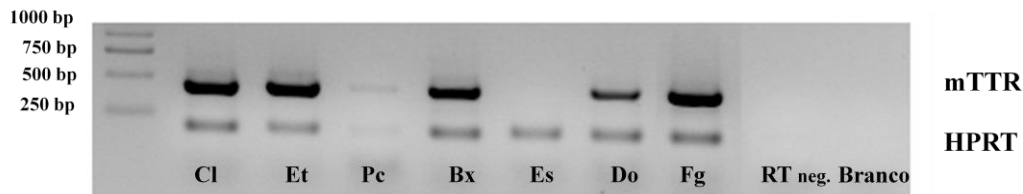


Figura 7: PCR de cDNA de um animal TTR+/+. Legenda: Cl – Cólon; Et – Estômago; Pc – Pâncreas; Bx: Bexiga; Es – Esófago; Do – Duodeno; Fg – Fígado; RT neg. – Controlo negativo do RT-PCR.

Verificou-se que a banda correspondente a mTTR estava presente no cólon, estômago e bexiga com uma intensidade muito semelhante. Essa intensidade estava diminuída no duodeno. O fígado funcionou, neste PCR, como um controlo positivo uma vez que se sabe ser um local de expressão abundante de TTR. Não se observou banda de TTR no esófago. A banda de HPRT (gene de referência) estava presente em todas as amostras. As bandas de mTTR e HPRT não apareceram no pâncreas, sendo este resultado inesperado sabendo que o pâncreas é também um local de síntese de TTR. Este resultado pode ter ficado a dever-se à fraca qualidade do mRNA de pâncreas, usado no RT-PCR e devido ao facto deste tecido ser rico em nucleases.

Este resultado permitiu seleccionar os órgãos a utilizar nos procedimentos experimentais seguintes, tendo sido escolhidos o estômago, cólon, duodeno e bexiga. O pâncreas deixou de ser usado como controlo positivo passando a ser o fígado o controlo seleccionado.

2 - PCR em Tempo Real

Após análise qualitativa pretendeu-se avaliar de forma quantitativa e comparativa a expressão de TTR nos tecidos em estudo. Para este ensaio foi utilizado um grupo de 5 animais (3 fêmeas e 2 machos) de 3-4 meses de idade.

O primeiro ensaio realizado mostrou uma enorme variabilidade, na expressão de TTR, entre os animais, pelo que se tentou perceber o que poderia estar na base destas observações. Os RNA extraídos tinham sido quantificados por espectrometria e a sua qualidade avaliada através do parâmetro 260/280. Procedeu-se por isso a uma electroforese em gel de agarose com brometo de etídeo para determinar a qualidade do RNA que estava a ser usado. O gel de agarose mostrou que os RNA extraídos estavam muito degradados, não sendo possível distinguir as bandas correspondes às subunidades ribossomais (Figura 8). Voltou-se, por isso, a extrair RNA, dos órgãos em estudo. Esta nova extracção foi realizada após homogeneização dos tecidos com um homogeneizador Ultra Turax que permite uma homogeneização muito mais rápida do que o método usado na extracção das amostras anteriores. Após extracção, o RNA foi quantificado por espectrometria e a sua integridade avaliada por electroforese em gel de agarose (Figura 8).

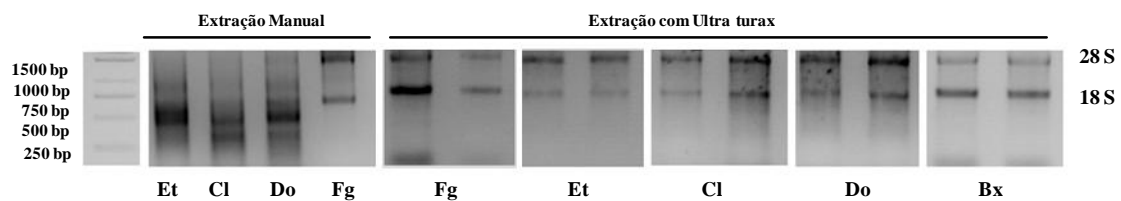


Figura 8: Integridade das amostras de RNA obtida a partir de dois sistemas diferentes de homogeneização. Legenda: Et – Estômago; Cl – Cólon; Do – Duodeno; Fg – Fígado e Bx – Bexiga.

O PCR em tempo real foi repetido com as novas amostras de RNA. Em cada ensaio foi realizada uma curva de calibração para o gene de estudo (mTTR) e gene de referência (18S), os ensaios foram validados quando os valores de eficiência estavam compreendidos entre 90 e 105% (Figura 9).

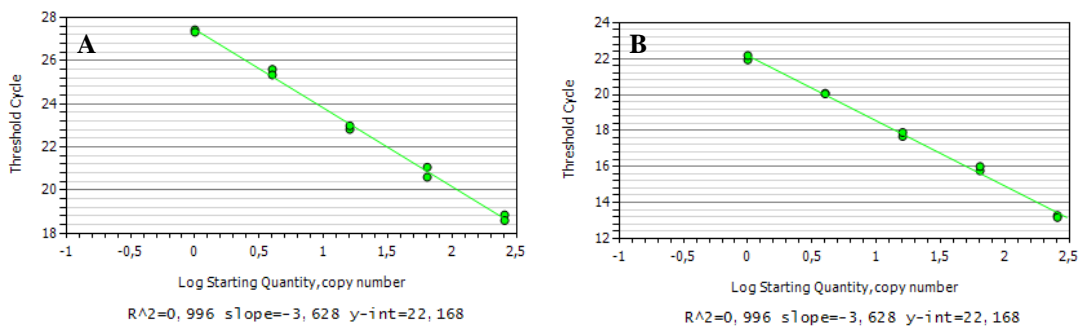


Figura 9: Curvas de calibração para mTTR (A) e 18S (B).

A especificidade da reacção foi confirmada através da curva de fusão, que é um indicador da temperatura de dissociação dos *primers* específicos para as sequências de mTTR e 18S (Figura 10). Para cada amostra foram realizados triplicados e depois de analisados foram descartados os valores de CT (*threshold cycle*) que diferissem entre si mais de 0,5 unidades.

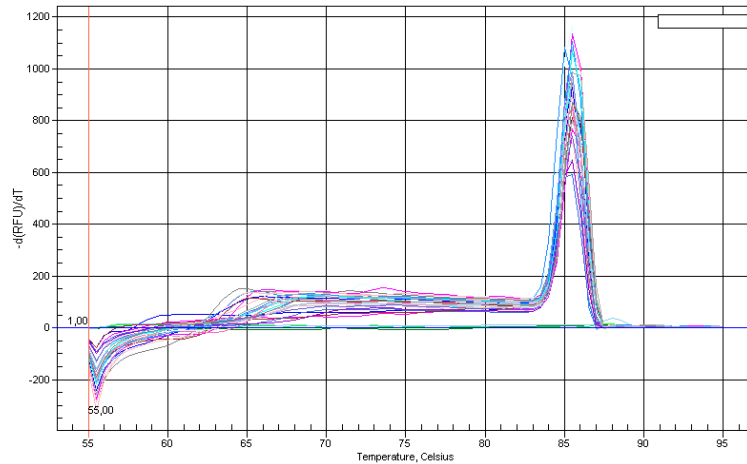


Figura 10: Exemplo de uma curva de fusão para mTTR.

A expressão de TTR foi determinada por aplicação do método de ΔC_T e conduziu ao seguinte resultado (Figura 11).

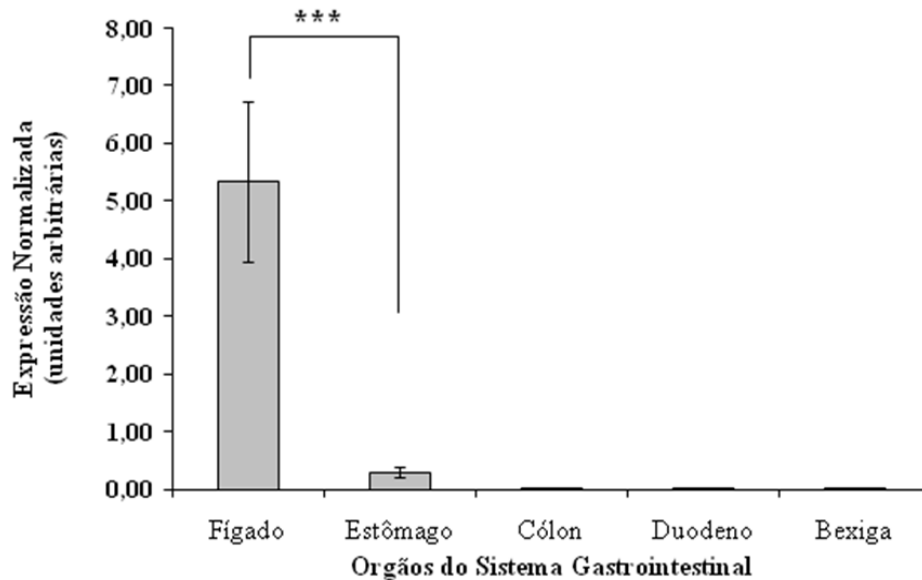


Figura 11: Expressão normalizada de TTR no sistema gastrointestinal. Os dados encontram-se em unidades arbitrárias e correspondem à média \pm desvio padrão (***) $p < 0,001$).

O PCR em tempo real permitiu determinar a expressão de TTR no estômago do murganho, embora esta expressão, tal como se esperava, seja muito inferior aos níveis encontrados no fígado. Nos restantes órgãos em estudo – cólon, duodeno e bexiga, verificou-se que essa expressão ou não existia ou era muito residual, não tendo por isso qualquer importância estatística. Assim, os ensaios seguintes incidiram apenas sobre estômago e fígado.

3 - Imunohistoquímica

Após determinação quantitativa da expressão de mRNA de TTR no estômago do murganho, pretendeu-se determinar se esta expressão de mRNA correspondia à presença de proteína e no caso de ocorrer qual seria a localização celular/histológica dessa síntese. Para este efeito usaram-se técnicas de imunohistoquímica/imunofluorescência.

Na técnica de imunohistoquímica foi usado um anticorpo anti-TTR em lâminas contendo secções transversais de estômago e pâncreas. O pâncreas foi utilizado como controlo positivo por ser mais fácil identificar, neste órgão, os locais de síntese de TTR. O controlo negativo correspondeu aos mesmos órgãos (estômago e pâncreas) de um animal TTR^{-/-} (Figura 12).

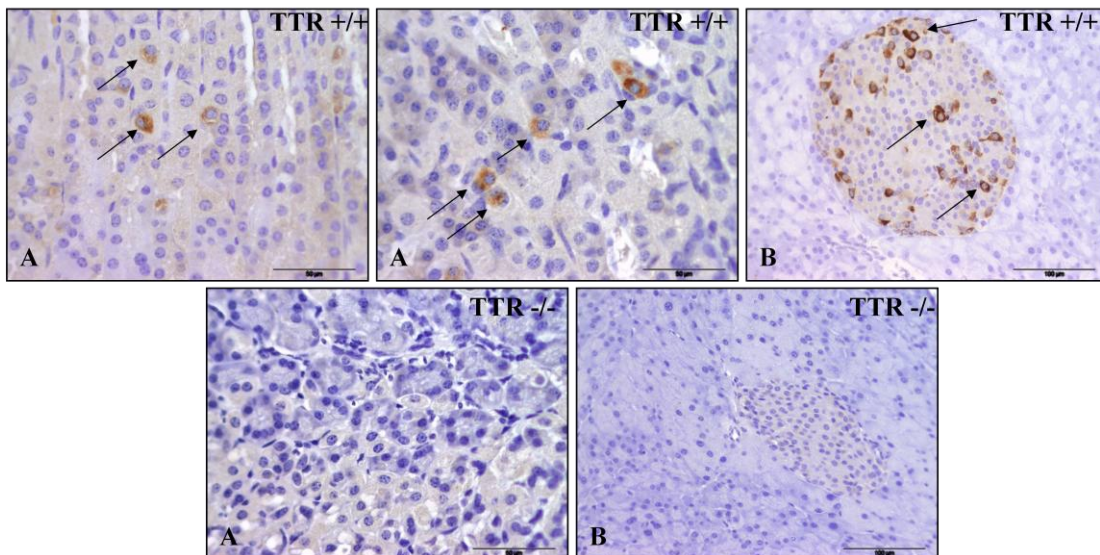


Figura 12: Imunohistoquímica para mTTR de (A) epitélio secretor do estômago e (B) ilhéus de Langerhans do pâncreas. As setas indicam o local de imunoreactividade positiva para TTR.

A marcação de TTR, no animal TTR+/+, surge na zona glandular do estômago do murganho e parece coincidir com células muito específicas. Não é uma marcação muito abundante o que vem de encontro aos resultados obtidos com o PCR em tempo real. O animal TTR-/- não continha nenhuma marcação para TTR como esperado.

Com estes resultados surgiu a necessidade de identificar as células com reactividade para o anticorpo anti-TTR. A morfologia das células positivas para TTR parecia indicar tratar-se de células endócrinas. Realizou-se por isso uma imunohistoquímica para cromogranina A, marcador de células enteroendócrinas, e TTR em lâminas contendo secções sucessivas do mesmo órgão, contudo nada foi possível concluir acerca da co-localização entre as duas proteínas. Para co-localizar dois antigénios numa mesma lâmina optou-se pela técnica de imunofluorescência, que o permite fazer de uma forma simples e eficaz.

Não foi possível proceder a ensaios de imunofluorescência com o anticorpo de cromogranina A e mTTR porque os anticorpos são produzidos no mesmo animal.

4 - Imunofluorescência

O primeiro ensaio consistiu na localização de mTTR e de Beta ATPase de hidrogénio e potássio. Este último anticorpo permite identificar as células parietais do estômago, responsáveis pela produção e secreção de ácido clorídrico bem como de factor intrínseco. Não se verificou qualquer co-localização a partir dos anticorpos utilizados (dados não apresentados).

Num segundo ensaio procedeu-se à localização de mTTR em células secretoras de somatostatina, utilizando para isso o anticorpo anti-mTTR e o anticorpo anti-somatostatina (Figura 13).

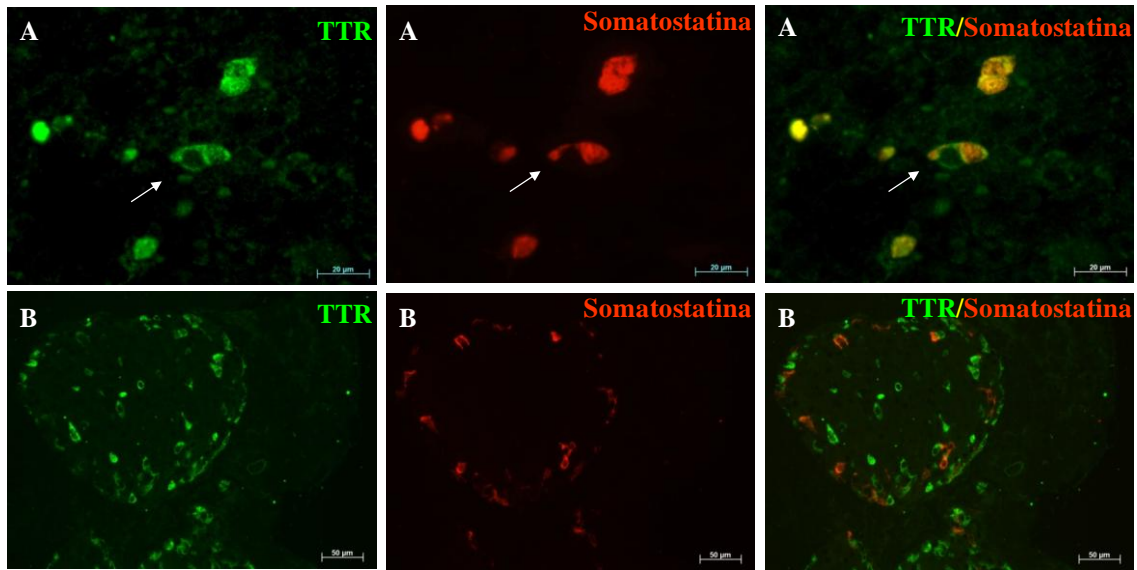


Figura 13: Imunofluorescência para mTTR e somatostatina em (A) estômago e (B) pâncreas.

Verificou-se a localização de TTR nas células que secretam somatostatina no estômago. Mais uma vez o pâncreas funcionou como controlo positivo da técnica e verifica-se que neste órgão as células que sintetizam TTR são diferentes das que secretam somatostatina. Foi utilizado um animal TTR^{-/-} como controlo negativo tendo-se verificado que não surgia qualquer tipo de marcação para TTR (dados não apresentados).

Com estes resultados questionou-se a hipótese da localização de TTR nas células secretoras de somatostatina ocorrer também no estômago humano. Pelo que se repetiu a imunofluorescência em lâminas contendo tecido de estômago humano, usando agora um anticorpo anti-hTTR e o mesmo anticorpo anti-somatostatina (Figura 14). Foi possível verificar que também neste tecido ocorria co-localização entre TTR e somatostatina.

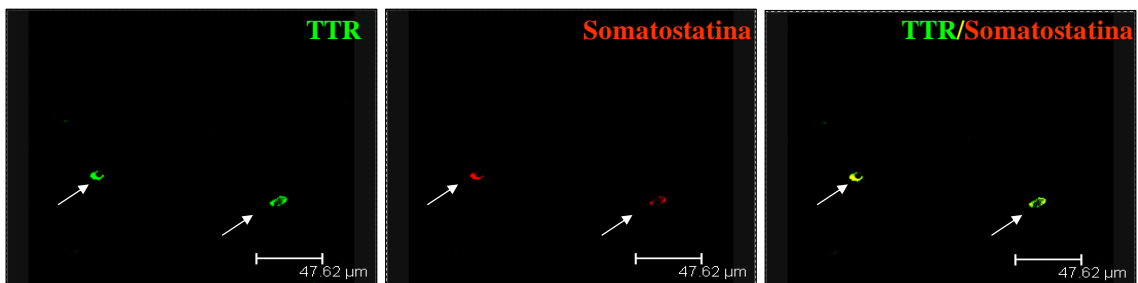


Figura 14: Imunofluorescência para hTTR e somatostatina em estômago humano.

5 - Hibridação *in situ*

O último procedimento experimental consistiu numa hibridação *in situ*, para confirmar a síntese de TTR em células secretoras de somatostatina. Esta técnica foi aplicada a lâminas contendo estômago e cérebro, com plexo coróide (como controlo positivo), incluídos em parafina. Com esta técnica é possível detectar a presença de mRNA de TTR de murganho e ao mesmo tempo identificar o local onde esse mRNA se encontra (Figura 15).

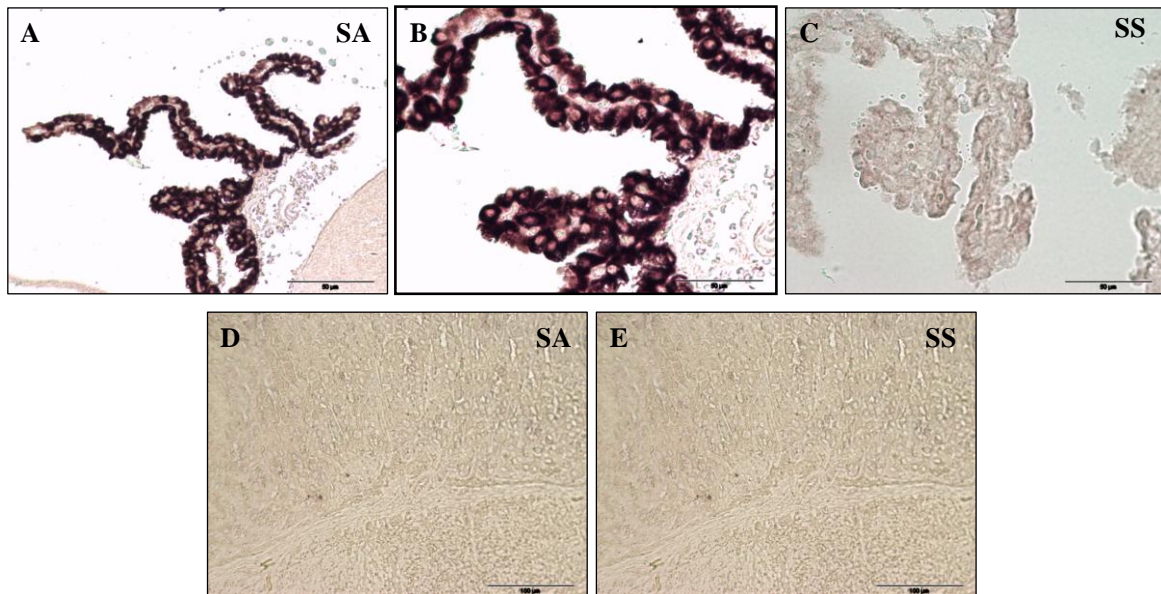


Figura15: Hibridação *in situ* com uma sonda anti-mTTR. (A) Plexo coróide hibridado com sonda *antisense* (AS). (B) Ampliação da imagem (A). (C) Plexo coróide hibridado com sonda *sense* (SS). (D) Estômago hibridado com sonda *antisense* (AS). (E) Estômago hibridado com sonda *sense* (SS).

A sonda *antisense* é complementar ao mRNA de TTR, existente no murganho, ocorrendo emparelhamento das duas sequências. Esse emparelhamento é visível na imagem A, onde todo o plexo coróide aparece marcado, tal como era espectável. A sonda *sense* tem a mesma sequência do mRNA pelo que não ocorre emparelhamento, funciona por isso como um controlo negativo de todo o processo (imagens C e E). Na imagem D seria de esperar observar marcação, das células identificadas anteriormente, quando o slide foi incubado com a sonda *antisense*, mas tal não se verificou.

Capítulo IV – Discussão

A primeira parte deste trabalho visava sobretudo avaliar a expressão de TTR ao longo do tracto gastrointestinal de murganhos com cerca de 3 meses de idade. Para isso foram realizados dois tipos de procedimentos experimentais: PCR de cDNA e PCR em tempo real.

A realização do PCR de cDNA de murganho permitiu, de uma forma qualitativa, determinar que, à excepção do esófago, todos os restantes órgãos do sistema gastrointestinal investigado apresentavam a banda de mTTR bem como a do gene de referência. Sabendo que o fígado é um dos maiores sintetizadores de TTR do organismo, seria de esperar que a intensidade da banda de mTTR nos órgãos em estudo estivesse diminuída em relação ao fígado mas tal não se verificou. Estes resultados permitem concluir que este tipo de PCR tradicional apenas indica a existência de cDNA de mTTR sem estabelecer qualquer relação entre a presença e a quantidade de mRNA. A expressão de TTR no estômago tinha já sido referida (Soprano et al., 1985), embora na mesma publicação seja referido o facto de o pâncreas não expressar TTR, o que se sabe hoje de facto acontecer.

Após análise qualitativa foi necessário de uma forma quantitativa determinar a expressão de mRNA de TTR presente no estômago, duodeno, cólon e bexiga. A quantificação foi realizada por PCR em tempo real. Esta técnica permite a amplificação, detecção e quantificação de DNA numa única etapa, tornando mais rápido todo o processo de obtenção de resultados e minimizando o risco de possíveis contaminações. A curva de fusão é uma medida da especificidade da reacção e indica o ponto correspondente à temperatura de dissociação dos *primers* específicos para as sequências em estudo. O primeiro ensaio realizado conduziu a resultados pouco concordantes que se ficaram a dever ao processo de homogeneização inicialmente utilizado. Com a alteração do método de extracção verificou-se que os resultados passaram a ser muito mais concordantes e com uma menor variabilidade entre o grupo de animais, uma vez que o RNA utilizado estava integro. Conclui-se portanto que é fundamental assegurar que o RNA, a utilizar neste tipo de técnica, seja de óptima qualidade, para garantir precisão e exactidão dos resultados. Tal como se esperava, o fígado foi o órgão onde a expressão normalizada de TTR foi superior. Nos restantes órgãos em estudo (estômago, cólon, duodeno e bexiga) apenas o estômago apresentou valores de expressão diferentes de zero.

Os resultados obtidos através dos dois tipos de PCR são claramente distintos. A ocorrência de bandas no PCR tradicional para cólon, duodeno e bexiga pode ter ficado a dever-se a uma contaminação e por isso quando se passa para uma técnica muito mais sensível (PCR em tempo real) não se verificam sinais de expressão de TTR nestes órgãos. O PCR em tempo real é por isso uma técnica muito mais precisa e reprodutível do que o PCR convencional.

A segunda parte deste trabalho tinha como objectivo identificar quais os locais, principalmente no estômago e intestino, onde ocorre a expressão da proteína. Para isso procederam-se a técnicas de imunohistoquímica e imunofluorescência.

A imunohistoquímica forneceu dados importantes acerca da localização histológica da TTR enquanto proteína, a imunoreactividade encontrada foi muito específica e pouco abundante, surgindo na mucosa do estômago do murganho, tal como tinha sido previamente descrito para o tecido humano (Liddle et al., 1985) As células marcadas poderiam por isso ser de quatro tipos diferentes: células produtoras de muco, células principais, células endócrinas ou células parietais. Foi necessário determinar que tipo de célula, presente na zona glandular do estômago, expressava TTR. A morfologia das células marcadas para TTR era idêntica à das células endócrinas, o que, posteriormente, se veio a verificar. Por imunohistoquímica foi realizada uma marcação para cromogranina A, marcador de células enteroendócrinas, e para TTR, em lâminas contendo secções sucessivas de estômago, contudo nada foi possível concluir acerca da co-localização entre as duas proteínas. Não se procederam a ensaios de imunofluorescência devido ao facto de ambos os anticorpos serem produzidos no mesmo animal.

A partir de ensaios de co-localização, por imunofluorescência, verificou-se que a TTR não se localiza em células parietais ocorrendo a sua localização nas células produtoras de somatostatina – células D (células endócrinas) tanto no murganho como no humano. Estas células possuem extensões citoplasmáticas onde estão armazenados os grânulos de somatostatina (Lucey, 1986). Um estudo realizado em 1992 (Kameko et al., 1992) admitia já a existência de células reactivas para TTR no estômago e intestino humano e mostrava a ocorrência de co-localização entre TTR e RBP, sendo que as células que continham as duas proteínas apresentavam características morfológicas semelhantes às das células endócrinas. Neste presente trabalho experimental não se verificou a existência de células

marcadas para TTR quer no intestino do murganho quer no intestino humano. A importância biológica da expressão da TTR neste tipo de células não é ainda conhecida. A somatostatina funciona como um neurotransmissor inibitório do sistema nervoso e tem um papel na regulação neurohormonal (Sternini et al., 1997). Da sua expressão resulta a inibição de secreções endócrinas e exócrinas, de secreções enzimáticas e de electrólitos, da contracção muscular e proliferação celular (Sternini et al., 1997). No sistema digestivo, a somatostatina é expressa em neurónios, fibras e nas células D (Costa et al., 1977; Costa et al., 1980; Ekblad et al., 1988) e está também envolvida na regulação da peristalsia e motilidade interdigestiva, confirmada pela presença de neurónios imunoreactivos a somatostatina no plexo mientérico e através de estudos funcionais (McIntosh, 1985). A somatostatina é um regulador fisiológico da secreção de ácido gástrico, por efeito directo, desta proteína, ao nível das células parietais e, de forma indirecta, por inibição da libertação de histamina e gastrina (McIntosh, 1985). Será por isso importante perceber se existe alguma interacção entre a TTR e a somatostatina e, a existir, de que forma a TTR poderá estar também envolvida nas funções acima mencionadas. Tal como previamente descrito (Liddle et al., 1985) não ocorreu co-localização entre TTR e somatostatina no pâncreas, uma vez que neste órgão são as células α (sintetizadoras de glucagon) as responsáveis pela expressão de TTR.

No estômago, não é conhecida de que forma poderá a expressão de TTR estar associada à sintomatologia gastrointestinal característica de PAF, nomeadamente: retenção gástrica associada a náuseas e vómitos, bem como fenómenos de obstipação, diarreia. A nível histológico verifica-se que, neste órgão, ocorre deposição extracelular de fibras de TTR mutada na camada submucosa e em torno dos plexos mientéricos (Yoshimatsu et al., 1998). Ocorre também a deposição de amilóide a nível glandular, originando depósitos que alteram a estrutura celular e morfológica das glândulas presentes no estômago. A deposição de TTR provoca danos estruturais e também funcionais nos tecidos. A expressão da proteína mutada no estômago poderá de alguma forma condicionar os processos bioquímicos, que decorrem neste órgão, e assim influenciar os mecanismos biológicos característicos deste sistema conduzindo aos sintomas referidos anteriormente. Não é também de descartar uma possível interacção entre a TTR na forma mutada e a somatostatina, podendo conduzir esta interacção à severidade dos sintomas gastrointestinais característicos desta doença.

A última metodologia experimental consistiu numa hibridação *in situ*. Com esta técnica apenas foi possível detectar a presença de mRNA de TTR de murganho no plexo coróide, utilizando a sonda *antisense*. No estômago não foi possível detectar qualquer tipo de marcação. Estes resultados podem ter ficado a dever-se aos níveis de expressão de TTR nos dois órgãos em questão. A sonda, embora muito específica, não detectou a presença de mRNA na mucosa do estômago, muito provavelmente devido ao reduzido número de células e à própria estrutura histológica do tecido em questão. O plexo coróide está muito mais acessível pelo que o processo de hibridação ocorre naturalmente.

O presente estudo permitiu detectar a expressão de TTR no estômago bem como a localização histológica da mesma. Conduziu também a novas questões, que descrevemos anteriormente e que terão de ser respondidas em estudos futuros.

Conclusão

A transtirretina é uma proteína extremamente conservada, nos mamíferos, ao longo da evolução pelo que deverá ser uma proteína importante para a funcionalidade biológica dos organismos. São conhecidas as duas principais funções da TTR – transportar a tiroxina e a vitamina A, contudo sabe-se hoje que esta proteína intervém noutros processos biológicos importantes, quer por associação a outros péptidos quer por ser um indicador de processos inflamatórios, de stress, etc. Conhecer as interações que a TTR estabelece, nos indivíduos portadoras de TTR não mutada, permite perceber que tipo de funções poderão estar alteradas nos indivíduos portadores de TTR mutada, nomeadamente em PAF, e se é a ausência ou disfunção dessas interações que conduz a muitos dos sintomas associados à doença.

Com este projecto foi possível investigar e caracterizar a expressão de TTR ao longo do tracto gastrointestinal do murganho, nomeadamente no esófago, estômago, duodeno, cólon e também na bexiga. Verificou-se que de todos os órgãos em estudo apenas o estômago apresentou níveis de expressão normalizada de TTR com valores diferentes de zero. Conclui-se também que a metodologia do PCR em tempo real é muito mais precisa e específica do que o PCR convencional, conduzindo este último a muitos falsos positivos.

Foi também possível determinar que, tal como já tinha sido descrito, as células que expressam TTR no estômago do murganho e humano existem em pequena quantidade e estão presentes na mucosa do órgão em questão. Estas células co-localizam com as células D, responsáveis pela secreção de somatostatina no estômago, não sendo ainda conhecida nenhuma interação funcional entre estes dois péptidos. Neste estudo não se observou quaisquer tipos de marcação no intestino, quer no murganho quer em tecidos humanos.

Os resultados obtidos entre as metodologias utilizadas (PCR em tempo real e imunohistoquímica/imunofluorescência) são concordantes entre si.

A hibridação *in situ* permitiu detectar a presença de mRNA de TTR no plexo coróide do murganho, não sendo visível qualquer tipo de marcação em células do estômago.

Todos estes resultados colocam novas questões. Ocorrerá interação entre TTR e somatostatina? De que tipo será essa interação? Será que na presença de TTR mutada essa interação é alterada conduzindo à sintomatologia do sistema gastrointestinal característico de PAF?

Seria por isso interessante estudar, futuramente, a expressão de TTR num modelo animal de PAF embora o ideal seria poder utilizar o modelo humano, para determinar se, de alguma forma, esta expressão pode estar aumentada e se ocorre nos mesmos locais.

Bibliografia

- Abraham, C.R., Selkoe, D.J., Potter, H. "Immunochemical identification of the serine protease inhibitor alpha 1-antichymotrypsin in the brain amyloid deposits of Alzheimer's disease." *Cell*, 1988: 52(4):487-501.
- Aleshire, S.L., Bradley, C.A., Richardson, L.D., Parl, F.F. "Localization of human prealbumin in choroid plexus epithelium." *J Histochem Cytochem*, 1983: 31(5):608-12.
- Almeida, M.R., Damas, A.M., Lans, M.C., Brouwer, A., Saraiva, M.J. "Thyroxine binding to transthyretin Met 119. Comparative studies of different heterozygotic carriers and structural analysis." *Endocrine*, 1997: 6(3):309-15.
- Alves, I.L., Altland, K., Almeida, M.R., Winter, P., Saraiva, M.J. "Screening and biochemical characterization of transthyretin variants in the Portuguese population." *Hum Mutat*, 1997: 9(3):226-33.
- Andersson, R. "Hereditary amyloidosis with polyneuropathy." *Acta Med Scand*, 1970: 1-2(1):85-94.
- Ando, Y., Araki, S., Ando, M. "Transthyretin and familial amyloidotic polyneuropathy." *Intern Med*, 1993: 32(12):920-2.
- Ando, Y., Ohtsu, Y., Terazaki, H., Kibayashi, K., Nakamura, M., Ando, E., Matsunaga, N., Obayashi, K., Uchino, M., Ando, M., Tsunenari, S. "Japanese monozygotic twins with familial amyloidotic polyneuropathy (FAP) (ATTR Val30Met)." *Amyloid*, 2000: 7(2):133-6.
- Andrade, C. "A peculiar form of peripheral neuropathy; familiar atypical generalized amyloidosis with special involvement of the peripheral nerves." *Brain*, 1952: 75(3):408-27.
- Andrea, T.A., Cavalieri, R.R., Goldfine, I.D., Jorgensen, E.C. "Binding of thyroid hormones and analogues to the human plasma protein prealbumin." *Biochemistry*, 1980: 19(1):55-63.
- Bernstein, L.H., Leukhardt-Fairfield, C.J., Pleban, W., Rudolph, R. "Usefulness of data on albumin and prealbumin concentrations in determining effectiveness of nutritional support." *Clin Chem*, 1989: 35(2):271-4.
- Bjerle, P., Ek, B., Linderholm, H., Steen, L. "Oesophageal dysfunction in familial amyloidosis with polyneuropathy." *Clin Physiol*, 1993: 13(1):57-69.
- Blake, C.C., Geisow, M.J., Oatley, S.J., Rérat, B., Rérat, C. "Structure of prealbumin: secondary, tertiary and quaternary interactions determined by Fourier refinement at 1.8 Å." *J Mol Biol*, 1978: 121(3):339-56.
- Blake, C.C., Geisow, M.J., Swan, I.D., Rerat, C., Rerat, B. "Structure of human plasma prealbumin at 2.5 Å resolution. A preliminary report on the polypeptide chain conformation, quaternary structure and thyroxine binding." *J Mol Biol*, 1974: 88(1):1-12.
- Blaner, W.S. "Retinol-binding protein: the serum transport protein for vitamin A." *Endocr Rev*, 1989: 10(3):308-16.
- Boomsma, F., Man in 't Veld, A.J., Schalekamp, M.A. "Not norepinephrine but its oxidation products bind specifically to plasma proteins." *J Pharmacol Exp Ther*, 1991: 259(2):551-7.
- Borish, L., King, M.S., Mascali, J.J., Johnson, S., Coll, B., Rosenwasser, L.J. "Transthyretin is an inhibitor of monocyte and endothelial cell interleukin-1 production." *Inflammation*, 1992: 16(5):471-84.
- Brett, M., Persey, M.R., Reilly, M.M., Revesz, T., Booth, D.R., Booth, S.E., Hawkins, P.N., Pepys, M.B., Morgan-Hughes, J.A. "Transthyretin Leu12Pro is associated with systemic, neuropathic and leptomeningeal amiloidosis." *Brain*, 1999: 122 (Pt 2):183-90.
- Brouillette, J., Quirion, R. "Transthyretin: a key gene involved in the maintenance of memory capacities during aging." *Neurobiol Aging*, 2008: 29(11):1721-32.

- Burton, P.M., Hung, P., Lin, T., Lovelace, C., White, A. "The effects of homogeneous human prealbumin on in vitro and in vivo immune responses in the mouse." *Int J Immunopharmacol*, 1985: 7(4):473-81.
- Bush, A.I., Pettingell, W.H., Multhaup, G., d Paradis, M., Vonsattel, J.P., Gusella, J.F., Beyreuther, K., Masters, C.L., Tanzi, R.E. "Rapid induction of Alzheimer A beta amyloid formation by zinc." *Science*, 1994: 265(5177):1464-7.
- Cardoso, I., Brito, M., Saraiva, M.J. "Extracellular matrix markers for disease progression and follow-up of therapies in familial amyloid polyneuropathy V30M TTR-related." *Dis Markers*, 2008: 25(1):37-47.
- Choi-Miura, N.H., Ihara, Y., Fukuchi, K., Takeda, M., Nakano, Y., Tobe, T., Tomita, M. "SP-40,40 is a constituent of Alzheimer's amyloid." *Acta Neuropathol*, 1992: 83(3):260-4.
- Coelho, T., Choro, R., Sousa, A., Alves, I.L., Torres, M.F., Saraiva, M.J. "Compound heterozygote of transthyretin Met30 and transthyretin Met119 are protected from the devastating effects of familial amyloidotic polyneuropath." *Neuromusc Disord*, 1996: 6: 20.
- Coimbra, A., Andrade, C. "Familial amyloid polyneuropathy: an electron microscope study of the peripheral nerve in five cases. II. Nerve fibre changes." *Brain*, 1971: 94(2):207-12.
- Costa, M., J.B. Furness, I.J. Llewellyn-Smith, B. Davies, and J. Oliver. "An immunohistochemical study of the projections of somatostatin-containing neurons in the guinea-pig intestine." *Neuroscience*, 1980: 5:841-852.
- Costa, M., Y Patel, J.B. Furness, and A. Arimura. "Evidence that some intrinsic neurons of the intestine contain somatostatin." *Neurosci. Lett.*, 1977: 6:215-222.
- Costa, R.H., Lai, E., Darnell, J.E. Jr. "Transcriptional control of the mouse prealbumin (transthyretin) gene: both promoter sequences and a distinct enhancer are cell specific." *Mol Cell Biol*, 1986: 6(12):4697-708.
- Dickson, P.W., Aldred, A.R., Marley, P.D., Bannister, D., Schreiber, G. "Rat choroid plexus specializes in the synthesis and the secretion of transthyretin (prealbumin). Regulation of transthyretin synthesis in choroid plexus is independent from that in liver." *J Biol Chem*, 1986: 261(8):3475-8.
- Dickson, P.W., Howlett, G.J., Schreiber, G. "Metabolism of prealbumin in rats and changes induced by acute inflammation." *Eur J Biochem*, 1982: 129(2):289-93.
- Divino, C.M., Schussler, G.C. "Receptor-mediated uptake and internalization of transthyretin." *J Biol Chem*, 1990: 265(3):1425-9.
- Ekblad, E., Ekman, R., Hakanson, R., Sundler, F. "Projections of peptide-containing neurons in rat colon." *Neuroscience*, 1988: 27:655-674.
- El-Salhy, M., Suhr, O. "Endocrine cells in rectal biopsy specimens from patients with familial amyloidotic polyneuropathy." *Scand J Gastroenterol*, 1996: 31(1):68-73.
- El-Salhy, M., Suhr, O., Stenling, R., Wilander, E., Grimelius, L. "Impact of familial amyloid associated polyneuropathy on duodenal endocrine cells." *Gut*, 1994: 35(10):1413-8.
- Feurle, G.E. "Pathophysiology of diarrhea in patients with familial amyloid neuropathy." *Digestion*, 1987: 36(1):13-7.
- Fleming, C.E., Saraiva, M.J., Sousa, M.M. "Transthyretin enhances nerve regeneration." *J Neurochem*, 2007: 103(2):831-9.
- Foss, T.R., Wiseman, R.L., Kelly, J.W. "The pathway by which the tetrameric protein transthyretin dissociates." *Biochemistry*, 2005: 44(47):15525-33.
- Gallo, G., Wisniewski, T., Choi-Miura, N.H., Ghiso, J., Frangione, B. "Potential role of apolipoprotein-E in fibrillogenesis." *Am J Pathol*, 1994: 145(3):526-30.

- Goodman, D.S. "Vitamin A and retinoids in health and disease." *N Engl J Med*, 1984: 310(16):1023-31.
- Hagen, G.A., Solberg, L.A. Jr. "Brain and cerebrospinal fluid permeability to intravenous thyroid hormones." *Endocrinology*, 1974: 95(5):1398-410.
- Hamilton, J.A., Benson, M.D. "Transthyretin: a review from a structural perspective." *Cell Mol Life Sci*, 2001: 58(10):1491-521.
- Herbert, J., Wilcox, J.N., Pham, K.T., Freneau, R.T. Jr., Zeviani, M., Dwork, A., Soprano, D.R., Makover, A., Goodman, D.S., Zimmerman, E.A., et al. "Transthyretin: a choroid plexus-specific transport protein in human brain. The 1986 S. Weir Mitchell award." *Neurology*, 1986: 36(7):900-11.
- Holmgren, G., Steen, L., Ekstedt, J., Groth, C.G., Ericzon, B.G., Eriksson, S., Andersen, O., Karlberg, I., Nordén, G., Nakazato, M., et al. "Biochemical effect of liver transplantation in two Swedish patients with familial amyloidotic polyneuropathy (FAP-met30)." *Clin Genet*, 1991: 40(3):242-6.
- Hulbert, A.J. "Thyroid hormones and their effects: a new perspective." *Biol Rev Camb Philos Soc*, 2000: 75(4):519-631.
- Ingenbleek, Y., De Visscher, M. "Hormonal and nutritional status: critical conditions for endemic goiter epidemiology?" *Metabolism*, 1979: 28(1):9-19.
- Ingenbleek, Y., Young, V. "Transthyretin (prealbumin) in health and disease: nutritional implications." *Annu Rev Nutr*, 1994: 14:495-533.
- Ingenbleek, Y., Young, V.R. "Significance of transthyretin in protein metabolism." *Clin Chem Lab Med*, 2002: 40(12):1281-91.
- Ito, T., Sakakibara, R., Ito, S., Uchiyama, T., Liu, Z., Yamamoto, T., Yamaguchi, T., Odaka, T., Higashi, M., Hattori, T. "Mechanism of constipation in familial amyloid polyneuropathy: a case report." *Intern Med*, 2006: 45(20):1173-5.
- Ito, T., Sakakibara, R., Yamamoto, T., Uchiyama, T., Liu, Z., Asahina, M., Higashi, M., Arai, K., Ito, S., Awa, Y., Yamamoto, K., Kinou, M., Yamanishi, T., Hattori, T. "Urinary dysfunction and autonomic control in amyloid neuropathy." *Clin Auton Res*, 2006: 16(1):66-71.
- Jacobson, D.R., Alves, I.L., Saraiva, M.J., Thibodeau, S.N., Buxbaum, J.N. "Transthyretin Ser 6 gene frequency in individuals without amyloidosis." *Hum Genet*, 1995: 95(3):308-12.
- Jacobson, D.R., McFarlin, D.E., Kane, I., Buxbaum, J.N. "Transthyretin Pro55, a variant associated with early-onset, aggressive, diffuse amyloidosis with cardiac and neurologic involvement." *Hum Genet*, 1992: 89(3):353-6.
- Kabat, E.A., Moore, D.H., Landow, H. "An electrophoretic study of the protein components in cerebrospinal fluid and their relationship to the serum proteins." *J Clin Invest.*, 1942: 21(5):571-7.
- Kameko M, Ota H, Ishii K, Nakayama J, Katsuyama T, Kanai M, Tsutsumi Y. "Distribution of retinol-binding protein in the human digestive tract." *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.*, 1992: 61(5):315-22.
- Kanai, M., Raz, A., Goodman, D.S. "Retinol-binding protein: the transport protein for vitamin A in human plasma." *J Clin Invest*, 1968: 47(9):2025-44.
- Kanda, Y., Goodman, D.S., Canfield, R.E., Morgan, F.J. "The amino acid sequence of human plasma prealbumin." *J Biol Chem*, 1974: 249(21):6796-805.
- Kato, M., Kato, K., Blaner, W.S., Chertow, B.S., Goodman, D.S. "Plasma and cellular retinoid-binding proteins and transthyretin (prealbumin) are all localized in the islets of Langerhans in the rat." *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1985: 82(8):2488-92.

- Köhrle, J. "Thyroid hormone deiodination in target tissues--a regulatory role for the trace element selenium?" *Exp Clin Endocrinol.*, 1994: 102(2):63-89.
- Liddle CN, Reid WA, Kennedy JS, Miller ID, Horne CH. "Immunolocalization of prealbumin: distribution in normal human tissue." *J Pathol*, 1985: 146(2):107-13.
- Loughna, S., Bennett, P., Moore, G. "Molecular analysis of the expression of transthyretin in intestine and liver from trisomy 18 fetuses." *Hum Genet*, 1995: 95(1):89-95.
- Lucey, M R. "Endogenous somatostatin and the gut." *Gut*, 1986: 27(4):457-67.
- Lueprasitsakul, W., Alex, S., Fang, S.L., Pino, S., Irmscher, K., Köhrle, J., Braverman, L.E. "Flavonoid administration immediately displaces thyroxine (T4) from serum transthyretin, increases serum free T4, and decreases serum thyrotropin in the rat." *Endocrinology*, 1990: 126(6):2890-5.
- Makover, A., Moriwaki, H., Ramakrishnan, R., Saraiva, M.J., Blaner, W.S., Goodman, D.S. "Plasma transthyretin. Tissue sites of degradation and turnover in the rat." *J Biol Chem*, 1988: 263(18):8598-603.
- Martone, R.L. and Herbert, J. "Transthyretin interacts with globin to form protein complexes with heme-dependent solubility." *Amyloid and Amyloidosis*, 1993: 532-534.
- Martone, R.L., Herbert, J., Dwork, A., Schon, E.A. "Transthyretin is synthesized in the mammalian eye." *Biochem Biophys Res Commun*, 1988: 151(2):905-12.
- May, C.L., Kaestner, K.H. "Gut endocrine cell development." *Mol Cell Endocrinol*, 2010: 323(1):70-5.
- McCutchen, S.L., Lai, Z., Miroy, G.J., Kelly, J.W., Colón, W. "Comparison of lethal and nonlethal transthyretin variants and their relationship to amyloid disease." *Biochemistry*, 1995: 34(41):13527-36.
- McIntosh, C.H.S. "Minireview. Gastrointestinal somatostatin: Distribution, secretion and physiological significance. ." *Life Sci.*, 1985: 37: 2043-2058.
- McKinnon, B., Li H., Richard, K., Mortimer, R. "Synthesis of thyroid hormone binding proteins transthyretin and albumin by human trophoblast." *J Clin Endocrinol Metab*, 2005: 90(12):6714-20.
- Munar-Qués, M., Costa, P.P., Saraiva, M.J., Viader-Farré, C., Munar-Bernat, C. "[Familial type I (Portuguese form) amyloidotic polyneuropathy in Majorca. Study using the TTR (Met30) genetic marker." *Med Clin (Barc)*, 1988: 91(12):441-4.
- Murakami, T., Yasuda, Y., Mita, S., Maeda, S., Shimada, K., Fujimoto, T., Araki, S. "Prealbumin gene expression during mouse development studied by in situ hybridization." *Cell Differ*, 1987: 22(1):1-9.
- Nilsson, S.F., Peterson, P.A. "Evidence for multiple thyroxine-binding sites in human prealbumin." *J Biol Chem*, 1971: 246(19):6098-105.
- Noy, N. Slosberg, E., Scarlata, S. "Interactions of retinol with binding proteins: studies with retinol-binding protein and with transthyretin." *Biochemistry*, 1992: 31(45):11118-24.
- Nunes, A.F., Saraiva, M.J., Sousa, M.M. "Transthyretin knockouts are a new mouse model for increased neuropeptide Y." *FASEB J*, 2006: 20(1):166-8.
- Palha, J.A., Fernandes, R., de Escobar, G.M., Episkopou, V., Gottesman, M., Saraiva, M.J. "Transthyretin regulates thyroid hormone levels in the choroid plexus, but not in the brain parenchyma: study in a transthyretin-null mouse model." *Endocrinology*, 2000: 141(9):3267-72.
- Palha, J.A., Hays, M.T., Morreale, de Escobar. G., Episkopou, V., Gottesman, M.E., Saraiva, M.J. "Transthyretin is not essential for thyroxine to reach the brain and other tissues in transthyretin-null mice." *Am J Physiol*, 1997: 272(3 Pt 1):E485-93.
- Pepys, M.B. "Amyloidosis: some recent developments." *Q J Med*, 1988: 67(252):283-98.

- Qian, X., Samadani, U., Porcella, A., Costa, R.H. "Decreased expression of hepatocyte nuclear factor 3 alpha during the acute-phase response influences transthyretin gene transcription." *Mol Cell Biol*, 1995: 15(3):1364-76.
- Quintas, A., Vaz, D.C., Cardoso, I., Saraiva, M.J., Brito, R.M. "Tetramer dissociation and monomer partial unfolding precedes protofibril formation in amyloidogenic transthyretin variants." *J Biol Chem*, 2001: 276(29):27207-13.
- Rask, L., Anundi, H., Peterson, P.A. "The primary structure of the human retinol-binding protein." *FEBS Lett.*, 1979: 104(1):55-8.
- Raz, A., Shiratori, T., Goodman, D.S. "Studies on the protein-protein and protein-ligand interactions involved in retinol transport in plasma." *J Biol Chem*, 1970: 245(8):1903-12.
- Richardson, S.J. "Evolutionary changes to transthyretin: evolution of transthyretin biosynthesis." *FEBS J*, 2009: 276(19):5342-56.
- Richardson, S.J., Bradley, A.J., Duan, W., Wettenhall, R.E., Harms, P.J., Babon, J.J., Southwell, B.R., Nicol, S., Donnellan, S.C., Schreiber, G. "Evolution of marsupial and other vertebrate thyroxine-binding plasma proteins." *Am J Physiol*, 1994: 266, 1359-1370.
- Riisøen, H. "Reduced prealbumin (transthyretin) in CSF of severely demented patients with Alzheimer's disease." *Acta Neurol Scand*, 1988: 78(6):455-9.
- Rindi, G., Leiter, A.B., Kopin, A.S., Bordi, C., Solcia, E. "The "normal" endocrine cell of the gut: changing concepts and new evidences." *Ann N Y Acad Sci*, 2004: 1014:1-12.
- Robbins, J. "Thyroid hormone transport proteins and the physiology of hormone binding." In *The Thyroid*, de L.E. and Utiger, R.D. Braverman, pp 111-125. Philadelphia: JB Lippincott Company, 1991.
- Rogers, J., Cooper, N.R., Webster, S., Schultz, J., McGeer, P.L., Styren, S.D., Civin, W.H., Brachova, L., Bradt, B., Ward, P., et al. "Complement activation by beta-amyloid in Alzheimer disease." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992: 89(21):10016-20.
- Santos, C.R., Power, D.M. "Identification of transthyretin in fish (*Sparus aurata*): cDNA cloning and characterisation." *Endocrinology*, 1999: 140(5):2430-3.
- Saraiva, M.J., Birken, S., Costa, P.P., Goodman, D.S. "Amyloid fibril protein in familial amyloidotic polyneuropathy, Portuguese type. Definition of molecular abnormality in transthyretin (prealbumin)." *J Clin Invest*, 1984: 74(1):104-19.
- Sasaki, H., Yoshioka, N., Takagi, Y., Sakaki, Y. "Structure of the chromosomal gene for human serum prealbumin." *Gene*, 1985: 37(1-3):191-7.
- Schreiber, G., Aldred, A.R., Jaworowski, A., Nilsson, C., Achen, M.G., Segal, M.B. "Thyroxine transport from blood to brain via transthyretin synthesis in choroid plexus." *Am J Physiol*, 1990: 258, 338-345.
- Schwarzman, A.L., Gregori, L., Vitek, M.P., Lyubski, S., Strittmatter, W.J., Enghilde, J.J., Bhasin, R., Silverman, J., Weisgraber, K.H., Coyle, P.K., et al. "Transthyretin sequesters amyloid beta protein and prevents amyloid formation." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994: 91(18):8368-72.
- Scott, D.L., Marhaug, G., Husby, G. "Comparative studies of the high molecular weight amyloid fibril proteins and similar components from normal tissues." *Clin Exp Immunol*, 1983: 52(3):693-701.
- Seibert, F.B., Nelson, J.W. "Electrophoretic study of the blood response in tuberculosis." *J Biol Chem*, 1942: 143, 29-38.
- Serot, J.M., Christmann, D., Dubost, T., Couturier, M. "Cerebrospinal fluid transthyretin: aging and late onset Alzheimer's disease." *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1997: ;63(4):506-8.

- Smith, T.J., Davis, F.B., Deziel, M.R., Davis, P.J., Ramsden, D.B., Schoenl, M. "Retinoic acid inhibition of thyroxine binding to human transthyretin." *Biochim Biophys Acta*, 1994: 1199(1):76-80.
- Snow, A.D., Willmer, J., Kisilevsky, R. "Sulfated glycosaminoglycans: a common constituent of all amyloids?" *Lab Invest*, 1987: 56(1):120-3.
- Soares, M.L., Centola, M., Chae, J., Saraiva, M.J., Kastner, D.L. "Human transthyretin intronic open reading frames are not independently expressed in vivo or part of functional transcripts." *Biochim Biophys Acta*, 2003: 1626(1-3):65-74.
- Socolow, E.L., Woeber, K.A., Purdy, R.H., Holloway, M.T., Ingbar, S.H. "Preparation of I-131-labeled human serum prealbumin and its metabolism in normal and sick patients." *J Clin Invest*, 1965: 44(10):1600-9.
- Soprano, D.R., Herbert, J., Soprano, K.J., Schon, E.A., Goodman, D.S. "Demonstration of transthyretin mRNA in the brain and other extrahepatic tissues in the rat." *J Biol Chem.*, 1985: 260(21):11793-8.
- Soprano, D.R., Soprano, K.J., Goodman, D.S. "Retinol-binding protein and transthyretin mRNA levels in visceral yolk sac and liver during fetal development in the rat." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986: 83(19):7330-4.
- Sousa, J.C., Grandela, C., Fernández-Ruiz, J., de Miguel, R., de Sousa, L., Magalhães, A.I., Saraiva, M.J., Sousa, N., Palha, J.A. "Transthyretin is involved in depression-like behaviour and exploratory activity." *J Neurochem*, 2004: 88(5):1052-8.
- Sousa, M.M., Berglund, L., Saraiva, M.J. "Transthyretin in high density lipoproteins: association with apolipoprotein A-I." *J Lipid Res*, 2000: 41(1):58-65.
- Sousa, M.M., Cardoso, I., Fernandes, R., Guimarães, A., Saraiva, M.J. "Deposition of transthyretin in early stages of familial amyloidotic polyneuropathy: evidence for toxicity of nonfibrillar aggregates." *Am J Pathol*, 2001: 159(6):1993-2000.
- Sousa, M.M., Du Yan, S., Fernandes, R., Guimaraes, A., Stern, D., Saraiva, M.J. "Familial amyloid polyneuropathy: receptor for advanced glycation end products-dependent triggering of neuronal inflammatory and apoptotic pathways." *J Neurosci*, 2001: 21(19):7576-86.
- Sousa, M.M., Saraiva, M.J. "Neurodegeneration in familial amyloid polyneuropathy: from pathology to molecular signaling." *Prog Neurobiol*, 2003: 71(5):385-400.
- Sternini C, Wong H, Wu SV, de Giorgio R, Yang M, Reeve J Jr, Brecha NC, Walsh JH. "Somatostatin 2A receptor is expressed by enteric neurons, and by interstitial cells of Cajal and enterochromaffin-like cells of the gastrointestinal tract." *J Comp Neurol*, 1997: 386(3):396-408.
- Suhr, O., Danielsson, A., Steen, L. "Bile acid malabsorption caused by gastrointestinal motility dysfunction? An investigation of gastrointestinal disturbances in familial amyloidosis with polyneuropathy." *Scand J Gastroenterol*, 1992: 27(3):201-7.
- Tanaka, Y., Ando, Y., Kumamoto, T., Miyazaki, A., Nakamura, M., Nakayama, M., Araki, S., Ando, M. "Changed affinity of apolipoprotein AII to high density lipoprotein (HDL) in patients with familial amyloidotic polyneuropathy (FAP) type I." *Biochim Biophys Acta*, 1994: 1225(3):311-6.
- Tsuzuki, T., Mita, S., Maeda, S., Araki, S., Shimada, K. "Structure of the human prealbumin gene." *J Biol Chem*, 1985: 260(22):12224-7.
- Vahlquist, A., Peterson, P.A., Wibell, L. "Metabolism of the vitamin A transporting protein complex. I. Turnover studies in normal persons and in patients with chronic renal failure." *Eur J Clin Invest*, 1973: 3(4):352-62.

- Vahlquist, A., Rask, L., Peterson, P.A., Berg, T. "The concentrations of retinol-binding protein, prealbumin, and transferrin in the sera of newly delivered mothers and children of various ages." *Scand J Clin Lab Invest*, 1975: 35(6):569-75.
- Vatassery, G.T., Quach, H.T., Smith, W.E., Benson, B.A., Eckfeldt, J.H. "A sensitive assay of transthyretin (prealbumin) in human cerebrospinal fluid in nanogram amounts by ELISA." *Clin Chim Acta*, 1991: 197(1):19-25.
- Vieira, A.V., Sanders, E.J., Schneider, W.J. "Transport of serum transthyretin into chicken oocytes. A receptor-mediated mechanism." *J Biol Chem*, 1995: 270(7):2952-6.
- Westermarck, P., Sletten, K., Johansson, B., Cornwell, G.G. 3rd. "Fibril in senile systemic amyloidosis is derived from normal transthyretin." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990: 87(7):2843-5.
- Whitehead, A.S., Skinner, M., Bruns, G.A., Costello, W., Edge, M.D., Cohen, A.S., Sipe, J.D. "Cloning of human prealbumin complementary DNA. Localization of the gene to chromosome 18 and detection of a variant prealbumin allele in a family with familial amyloid polyneuropathy." *Mol Biol Med*, 1984: 2(6):411-23.
- Woeber, K.A., Ingbar, S.H. "The contribution of thyroxine-binding prealbumin to the binding of thyroxine in human serum, as assessed by immunoadsorption." *J Clin Invest*, 1968: 47(7):1710-21.
- Yoshimatsu, S., Ando, Y., Terazaki, H., Sakashita, N., Tada, S., Yamashita, T., Suga, M., Uchino, M., Ando, M. "Endoscopic and pathological manifestations of the gastrointestinal tract in familial amyloidotic polyneuropathy type I (Met30)." *J Intern Med*, 1998: 243(1):65-72.

