

ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DO PORTO

INSTITUTO POLITÉCNICO DO PORTO

Helena Sofia Teixeira Rodrigues Martins

Polineuropatia Amiloidótica Familiar
Estudo da eficácia de um tratamento combinado
em animais transgênicos V30M/Hsf1

Dissertação submetida à Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica em Saúde, realizada sob orientação científica da Professora Doutora Maria João Saraiva (Professora Catedrática; Área das Neurociências; Instituto de Investigação e Inovação em Saúde; Instituto de Biologia Molecular e Celular) e co-orientada pelo Professor Doutor Rúben Fernandes (Professor Adjunto; Área de Bioquímica; Unidade de Mecanismos Moleculares da Doença do Centro de Investigação em Saúde e Ambiente e Centro de Farmacologia e Biopatologia Química; Instituto de Investigação e Inovação em Saúde e Centro de Investigação Biomédica (CINBIO)).

Agradecimentos

Quero agradecer a todos os envolvidos direta e indiretamente na elaboração da minha tese de mestrado.

Começo por agradecer à Professora Maria João Saraiva, por me ter dado a oportunidade de realizar a tese de mestrado, pelo seu apoio e a sua disponibilidade.

Ao Professor Rúben Fernandes e à Professora Cristina Prudêncio pela disponibilidade que sempre demonstraram durante o mestrado.

A todos os meus colegas de laboratório, pelo apoio, motivação e boa energia. À Paula e à Susete pelos almoços cheios de boa disposição, pelo apoio que deram e sobretudo pela amizade. À Cristina (a minha sócia) e ao João pela boa "onda", disponibilidade e amizade. À Anabela, pelas palavras sábias, conversas "psico-científicas" e essencialmente pela energia positiva que me transmite. Ao Paul, à Diana, à Professora Rosário, à Doutora Isabel, pela simpatia e disponibilidade.

Por fim, gostaria de fazer uns agradecimentos especiais:

Aos meus amigos do coração, eles sabem quem são... por me ouvirem, pelos conselhos e essencialmente pela amizade.

Aos meus pais, pelo apoio e amor incondicional, pela motivação e exemplo de vida.

Ao meu marido pela motivação, pela amizade, pelo apoio constante e essencialmente por me fazer sentir amada todos os dias.

Aos meus filhos por me fazerem sentir a mãe mais orgulhosa e feliz do mundo, e por serem a minha fonte de vida.

Resumo

A Polineuropatia amiloidótica familiar (PAF) é uma doença neurodegenerativa fatal com transmissão hereditária autossômica dominante. A substituição de uma valina por uma metionina na posição 30 (V30M) é a mutação da proteína transtirretina (TTR) é uma das principais variantes que conduz à deposição extracelular, multi-sistêmica, de agregados fibrilares e não fibrilares de TTR. O transplante hepático é o tratamento comumente utilizado no tratamento da PAF, no entanto, na última década vários fármacos têm sido estudados como possíveis alternativas terapêuticas.

Neste estudo propusemo-nos a avaliar a deposição de transtirretina no sistema vascular cerebral, leptomeninges e sistema gastrointestinal, assim como, a concentração de TTR no plasma em animais transgênicos para mutação humana da TTR (V30M), sem TTR endógena, deficientes para o *Heat shock transcription factor 1* V30M/Hsf1, após a administração de um tratamento combinado. Para determinar a eficácia deste tratamento neste modelo animal foram utilizadas técnicas imunohistoquímicas, de imunofluorescência, *western blot* e imunodifusão radial.

Os resultados obtidos no sistema gastrointestinal revelam que o tratamento combinado foi eficaz na disrupção e remoção de depósitos fibrilares. No cérebro (sistema vascular cerebral), os animais tratados apresentaram uma tendência para a diminuição de deposição de agregados de TTR. Foi igualmente observado que a transtirretina plasmática encontrava-se aumentada em animais tratados.

Em suma, o tratamento combinado revelou ser eficaz na disrupção de fibrilas amilóides e remoção de agregados não fibrilares no sistema gastrointestinal. No sistema vascular cerebral, os animais tratados apresentaram uma tendência para a diminuição de deposição de agregados de TTR, sugerindo que tratamento combinado pode ter atuado nestes animais. O *status* nutricional dos animais tratados melhorou, sugerido pela elevação de TTR plasmática, comparativamente aos animais controle.

Palavras-chave: Polineuropatia amiloidótica familiar, neurodegenerativa, transtirretina, plasma, V30M, tratamento combinado

Abstract

The familial amyloid polyneuropathy (FAP) is a neurodegenerative disease with autosomal-dominant inheritance. The substitution of a valine for a methionine at position 30 (V30M) is the most frequently known mutation that causes a systemic extracellular deposition of transthyretin amyloid fibrils and non-fibrillar aggregates. The current treatment for FAP is liver transplantation, however in the last decade several drugs have been studied as possible therapeutic alternatives.

In this study we proposed to evaluate the deposition of transthyretin in the cerebral vascular system, the meninges and gastrointestinal system as well as the concentration of transthyretin in transgenic mice for human TTR V30M, endogenous *TTR* null background, deficient for the heat shock factor-1 (*Hsf-1*), (V30M/*Hsf1*), after administration of a combined treatment. To determine the efficacy of the treatment in this animal model, we used different techniques: immunohistochemistry, immunofluorescence, western blot and radial immunodiffusion.

The results show that combined treatment was effective in disrupting and removing fibrillar deposits. In the brain (cerebral vascular system), treated animals revealed a tendency to decrease non-fibrillar aggregates. It was also observed that plasma transthyretin was increased in treated animals.

In conclusion, the combination therapy in gastrointestinal system proved to be effective in disrupting amyloid fibrils and removing non-fibrillar aggregates. In the cerebral vascular system the combined therapy show that maybe treatment have some influence in reducing TTR deposition in treated animals. The nutritional status of the treated animals improved as suggested by elevated plasma TTR compared to control animals.

Key words: Familial amyloidotic polyneuropathy, neurodegenerative, transthyretin, plasma, Heat shock transcription 1, V30M, combined treatment.

ÍNDICE

Índice de figuras	vi
Lista de acrónimos	vii
Introdução	1
Capítulo 1	2
Revisão bibliográfica	2
Transtirretina	5
Função biológica da TTR	7
Variantes da TTR	9
Fisiopatologia da PAF	10
Diagnóstico da PAF	11
Terapêutica da PAF	11
Modelos animais	16
Anatomia do murganho	17
Capítulo 2	21
Materiais e métodos	21
Animais	22
Colheita e preparação das amostras	22
Descalcificação	23
Imunohistoquímica	23
Imunofluorescência	24
Vermelho do Congo	25
Western Blot	25
Imunodifusão Radial	26
Estatística	26
Capítulo 3	27
Resultados	27
Imunohistoquímica	28
Imunofluorescência	29
Vermelho do Congo	33
Western blot	33
Imunodifusão Radial	34
Capítulo 4	37
Discussão de resultados	37
Conclusão	43
Referências Bibliográficas	47
Anexos	55

Índice de figuras

Figura 1. Imagem representativa da transmissão autossômica dominante da PAF.	3
Figura 2. Esquema representativo da localização do gene transtirretina no braço longo do cromossoma 18.....	5
Figura 3. Representação da estrutura quaternária da proteína transtirretina.....	7
Figura 4. Representação do complexo transtirretina - tiroxina.....	7
Figura 5. Imagem representativa da estrutura da ligação da TTR com o complexo RBP- retinol.	9
Figura 6. Modelo de formação de fibras amiloides da proteína TTR.....	10
Figura 7. Representação esquemática da atuação dos diferentes fármacos nas diversas conformações da transtirretina.....	15
Figura 8. Imagem representativa das diferentes áreas que constituem o tecido cerebral.	17
Figura 9. Imagem representativa da distribuição das meninges cerebrais.....	18
Figura 10. Imagens representativas da marcação de TTR através da técnica de imunohistoquímica em diferentes órgãos do sistema gastrointestinal.....	30
Figura 11. Imagens representativas da marcação de TTR através da técnica de imunohistoquímica em tecido cerebral.	31
Figura 12. Imagens representativas de um vaso sanguíneo localizado à periferia do cérebro visualizado pela técnica de imunofluorescência.....	32
Figura 13. Imagens representativas de um vaso sanguíneo localizado à periferia do cérebro visualizado pela técnica de imunofluorescência.....	32
Figura 14. Imagens representativas do plexo coroide	33
Figura 15. Imagens representativas da coloração de hematoxilina eosina e vermelho do congo no tecido gástrico de animais tratados e animais controles.....	34
Figura 16. <i>Western blot</i> dos plasmas de animais V30M/Hsf1	34
Figura 17. Imagens histológicas de crânio e tecido neuronal representativas da imunohistoquímica utilizando o anticorpo anti-TTR humana.....	56
Figura 18. Imagens histológicas de tecido neuronal representativas da técnica de imunofluorescência. ...	58

Lista de acrónimos

- APES - 3-Aminopropil-trietoxissilano
- BSA - albumina sérica bovina
- DAB - 3,3- diaminobenzidina
- DAPI - 4,6-diamino-2-fenilindol
- DNA - ácido desoxirribonucleico
- EDTA - ácido etilenodiaminotetracético
- FBS - soro fetal bovino
- H₂O₂ - peróxido de hidrogénio
- HSF1- fator de choque térmico 1 - *heat shock transcription factor 1*
- IDR – Imunodifusão Radial
- IHQ - Imunohistoquímica
- LCR - líquido cefalorraquidiano
- PAF - Polineuropatia Amiloidótica Familiar
- PBS - solução de tampão fosfato
- PBS-T - solução de tampão fosfato com *tween 20*
- PC – Plexo coróide
- RBP - Proteína de ligação ao retinol
- RNAm – RNA mensageiro
- RNA - ácido ribonucleico
- siRNA - RNA de interferência; *Small interfering RNA*
- SNP - Sistema Nervoso Periférico
- SNC - Sistema Nervoso Central
- SNA - Sistema Nervoso Autónomo
- T4 – tetraiodotironina ou tiroxina
- TH – Tiroxina hidroxilase
- TH – Transplante hepático
- THS - transplante hepático sequencial
- TUDCA - ácido tauroursodesoxicólico
- TTR – Transtirretina
- TTR KO - *knok-out* para TTR
- WB - *western blot*
- VC – Vermelho do Congo

Introdução

A Polineuropatia Amiloidótica Familiar (PAF) é uma neuropatia progressiva sistêmica, caracterizada pela deposição extracelular de agregados amilóides. A formação destes agregados amilóides estão, frequentemente, associados à mutação da proteína transtirretina (TTR). A TTR é constituída por quatro subunidades, a sua forma biológica ativa, sendo responsável pelo transporte plasmático de tiroxina (T4) e indiretamente da vitamina A (ou retinol). A mutação da TTR promove a formação de agregados fibrilares, constituídos por fibras amilóides maduras, que se depositam em vários órgãos e tecidos, alterando a arquitetura tecidual, provocando a sua disfunção. A mutação pontual mais frequente na TTR é a substituição da uma valina por uma metionina na posição 30 (V30M).

O tratamento comumente utilizado na PAF é o transplante hepático. No entanto nas últimas décadas foram desenvolvidas várias alternativas terapêuticas que podem ser utilizadas como estratégias terapêuticas em doentes com PAF. Para tal, foi fulcral gerar modelos animais transgênicos que permitissem mimetizar a doença tal como em humanos. Inicialmente foram gerados modelos animais com a mutação V30M, no entanto estes não apresentavam deposição do sistema nervoso periférico (SNP) condicionando os estudos neste sistema. No presente laboratório foi gerado um modelo animal transgênico para TTR com a mutação humana V30M e heterozigóticos para o gene *heat shock transcription factor 1* (Hsf1). Nestes modelos, além da deposição em idades precoces de agregados não fibrilares de TTR, há deposição no sistema nervoso periférico, resultando num excelente modelo de estudo deste sistema.

As alternativas terapêuticas conhecidas englobam a inibição da síntese de TTR plasmático nos hepatócitos; a estabilização de tetrâmeros de TTR, impedindo a dissociação dos tetrâmeros em monómeros; disrupção de fibras amilóides, atuando nos depósitos extracelulares promovendo a sua disrupção e remoção.

Este trabalho visou em avaliar o efeito multi-sistémico de um tratamento combinado (com ação disruptora) em modelos animais transgênicos V30M/Hsf1.

Capítulo 1

Revisão bibliográfica

A Polineuropatia Amiloidótica Familiar (PAF) foi caracterizada pelo Professor Corino de Andrade em 1952. Este descreveu a doença como uma forma de neuropatia periférica peculiar até à data desconhecida (Andrade, 1952). A PAF é caracterizada pela deposição extracelular de proteínas amiloidóticas e pela neuropatia progressiva que resulta na disfunção do sistema nervoso periférico (SNP) e/ou autónomo.

A PAF é uma doença hereditária com transmissão autossómica dominante (Saraiva, Costa, & Goodman, 1985) (Figura 1). A penetrância da doença é incompleta, o que explica que um indivíduo pode expressar a doença só em idade adulta avançada (Benson & Kincaid, 2007). A penetrância pode variar de acordo com o tipo de mutação, região geográfica ou grupo étnico (Hellman et al., 2008). A variabilidade na penetrância da doença influencia as manifestações clínicas dos indivíduos com PAF.

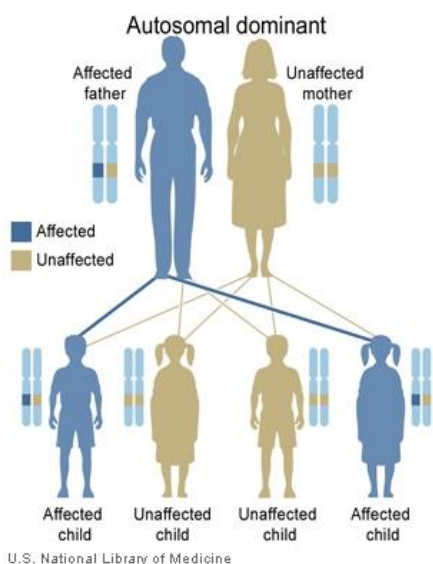


Figura 1. Imagem representativa da transmissão autossómica dominante da PAF. Disponível *online* em [<http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/illustrations/autodominant>]

Na Europa, estima-se que a prevalência da mutação da transtirretina (TTR) associada à PAF é cerca de 100.00 indivíduos. Em Portugal estima-se que existam cerca de 1600 indivíduos com PAF, encontrando-se distribuídos, maioritariamente, na zona norte do país. A mutação pontual mais frequente da PAF está associada à proteína TTR. Esta consiste na substituição de uma valina por uma metionina na posição 30 (V30M) (Saraiva et al., 1985). Esta mutação está presente igualmente na Suécia e Japão. A PAF é uma doença neurodegenerativa fatal que se caracteriza pela deposição extracelular de fibras amilóides provocadas pela mutação de TTR. As manifestações clínicas surgem

entre os 25 e 35 anos e envolvem o sistema nervoso autónomo e periférico (sensorial e motor).

No sistema nervoso periférico (SNP), as fibras amiloides depositam-se nos nervos periféricos, afetando as camadas constituintes do nervo sendo mais acentuada a acumulação no endonervo (Andrade, 1952). Neste, os depósitos estão associados com as células de Schwann (Coimbra e Andrade, 1971). A degeneração axonal associada à PAF afeta inicialmente as fibras não mielinizadas e mielinizadas de pequeno diâmetro, e com a progressão da doença, afeta as fibras mielinizadas de grande calibre (Coimbra e Andrade 1971, Guimarães et al 1990). As alterações causadas pelos depósitos de amiloide nas fibras não mielinizadas e mielinizadas de pequeno diâmetro traduzem-se clinicamente, numa fase inicial da doença, como uma diminuição de sensação de dor e temperatura dos membros inferiores (Andrade, 1952). Na progressão da doença, e de acordo com a deposição de amiloide nas fibras mielinizadas de grande calibre, as manifestações clínicas aumentam afetando a capacidade de locomoção, a diminuição da massa muscular e a caquexia.

Relativamente à sintomatologia relacionada com sistema nervoso autónomo (SNA), as manifestações englobam: anidrose; disfunção da motilidade gastrointestinal; cardiopatia amiloidótica.

Para melhor conhecer a progressão e manifestações clínicas da PAF, *Coutinho et al* classificaram o estadiamento dos doentes com PAF associada à mutação da TTR/V30M (Coutinho et al.,1980).

O estadiamento da PAF engloba quatro estádios. O estadio 0 (PAF-0) é considerado assintomático; o estadio I (PAF-1) os sintomas envolvem o SNP e/ou SNA, no entanto sem manifestações clínicas; o estadio II (PAF-II), evolução progressiva do envolvimento do SNP e SNA; O estadio III (PAF-III) os pacientes estão visivelmente afetados, sem motricidade.

O estadio 0 é considerado assintomático, o paciente apesar de não revelar sintomatologia, apresenta a mutação no gene TTR (associado à PAF) e depósitos de amiloide. No estadio I, os pacientes apresentam, para além da mutação no gene TTR e deposição de amiloide, sintomatologia típica da PAF (anteriormente descritos), afetando o SNP e SNA. Neste estadio, os pacientes são aprovados para tratamento farmacológico

e incluídos na lista de transplante hepático. O estadios II é considerado moderado, os pacientes apresentam alterações progressivas nos membros e são, igualmente, incluídos na lista de transplante hepático. O estadios III, considerado o mais severo, os doentes apresentam alterações neuropáticas severas afetando o sistema nervoso periférico e autónomo.

Transtirretina

A proteína TTR é codificada pelo gene localizado no braço longo do cromossoma 18, na região 18q11.2-q12.1 (figura 1). O gene da TTR humana é constituído por quatro exões e três intrões (Wallace et al., 1985). Os primeiros 3 aminoácidos são codificados pelo exão 1; o exão 2 codifica os resíduos aminoácido 4 a 47; o exão 3 codifica os resíduos 48 a 92 e o exão 4 codifica os resíduos aminoácidos 93 a 127 (Hiroyuki et al., 1985; Tsuzuki et al., 1985).

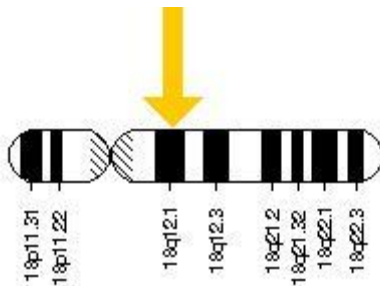


Figura 2. Esquema representativo da localização do gene transtirretina no braço longo do cromossoma 18. Disponível *online* [<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/TTR>].

A TTR é uma proteína com 127 aminoácidos, em cada uma das suas quatro subunidades (Kanda & Morgan, 1974). Através de estudos de cristalografia e difração por raio X foi possível observar a estrutura tridimensional da proteína TTR permitindo adquirir informações sobre a sua conformação, assim como, os locais de ligação aos seus ligandos (Blake et al., 1978; Blake et al., 1971).

A TTR apresenta uma conformação tetramérica com 55kDa que constitui a forma biologicamente ativa da proteína. Os quatro monómeros idênticos, pertencentes às quatro subunidades, formam uma proteína oval que contém um canal hidrofóbico central, onde estão localizados os dois locais de ligação à tiroxina (T4) (Blake et al., 1978; Blake et al., 1974). A TTR, para além dos locais de ligação para a T4, detém

igualmente dois locais de ligação para a proteína de ligação ao retinol (RBP) na superfície externa (Blake et al., 1978).

a) Síntese e expressão

A TTR é sintetizada no fígado (Stabilini et al., 1968), plexo coroide (PC) (P W Dickson et al., 1985), saco vitelino (Soprano et al., 1986) e no epitélio pigmentado da retina (Martone, Herbert, & Schon, 1988). A expressão de TTR está presente no desenvolvimento embrionário e durante a vida adulta, apesar de estudos em murganhos demonstrarem que esta proteína não é essencial para desenvolvimento (Episkopou & Robertson, 1993). A TTR é sintetizada como uma pré-proteína monomérica que após modificações pós-translocação no retículo endoplasmático forma o tetrâmero (Bellovino et al., 2003).

No plexo coroide (PC) a proteína TTR é sintetizada pelas células epiteliais constituintes do plexo e secretada para o líquido cefalorraquidiano (LCR) (Weisner & Roethig, 1983), onde é distribuída pelo cérebro (Schreiber & Richardson, 1997). A TTR é a proteína mais abundante no LCR (Dickson & Schreiber, 1986). A sua concentração de RNA mensageiro (RNAm) é superior, em termos relativos, quando comparada com a observada no fígado (Schreiber, Richardson, & Prapunpoj, 2001). A TTR representa 50% das proteínas secretadas pelo plexo coroide e aproximadamente 20% da síntese total de proteínas (Dickson & Schreiber, 1986)

b) Transtirretina plasmática e LCR

No fígado é sintetizado cerca de 90% da TTR que circula no sangue (Seibert et al., 1942). No plasma a concentração de TTR em adultos 0,1 a 0,4 mg/m. Os níveis de TTR plasmáticos aumentam gradualmente após o nascimento até à idade adulta, sendo que a partir dos cinquenta anos tende a diminuir (Stabilini et al., 1968).

Em situação de inflamação crónica ou subnutrição verifica-se uma diminuição da concentração de TTR plasmática em resposta a estas agressões (Schreiber et al, 1982). Pelo contrário, em situações de indivíduos com inflamações agudas a concentração de mRNA da TTR no PC permanece constante. Assim pensa-se que a regulação da expressão e síntese de TTR produzida no fígado e no plexo coroide é independente (Dickson & Schreiber, 1986).

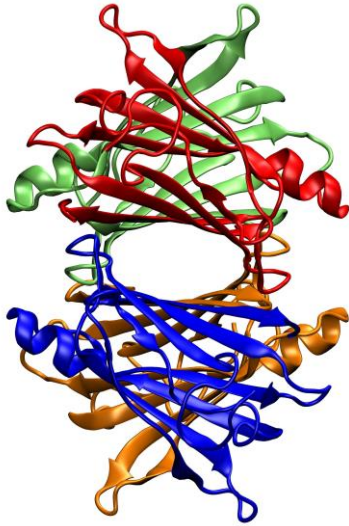


Figura 3. Representação da estrutura quaternária da proteína transtirretina. Os quatro monómeros estão representados com as cores azul, vermelho, verde e castanho. Adaptado de Humphrey et al 1996



Figura 4. Representação do complexo transtirretina - tiroxina. Adaptado de (Richardson, 2015)

Função biológica da TTR

a) Transporte de tiroxina

A etimologia da palavra transtirretina determina a sua função: "trans" - transporte; tir - tiroxina e retina - retinol. A TTR é uma proteína plasmática solúvel (Blake et al., 1978), que apresenta duas funções biológicas conhecidas, apesar do seu papel permanecer controverso (Palha et al., 1997).

As duas principais funções da TTR descritas na literatura englobam a ligação e transporte/distribuição da T4 (Woeber & Ingbar, 1968) e indiretamente de retinol (vitamina A) (Soprano et al., 1988) através de um complexo macromolecular com a proteína de ligação ao retinol (RBP). Em condições fisiológicas, apenas uma hormona T4 pode ser transportada pelo tetrâmero da TTR, uma vez que a ligação possui elevada afinidade impedindo que sejam ligadas duas moléculas em simultâneo (Wojtczak et al., 2001).

A T4 é uma hormona, sintetizada pela glândula tiroide e secretada para a corrente sanguínea, onde atua de forma sistémica. A T4 tem um papel fundamental na homeostasia, metabolismo, crescimento e desenvolvimento do ser humano. (Richardson, 2015). As hormonas da tiroide estão armazenadas no coloide folicular e encontram-se ligadas à tiroglobulina. A hidrólise da tiroglobulina, nas células epiteliais, liberta principalmente a T4 que apresenta uma estrutura lipofílica. Para contrariar este efeito e assegurar a distribuição sistémica, a T4 liga-se a proteínas plasmáticas. O transporte desta hormona é realizado por três proteínas plasmáticas: TTR, globulina de ligação à tiroxina (GLT) e albumina (Köhrle, 1994) (Larsson, Pettersson, & Carlström, 1985). A TTR liga-se à T4 com elevada afinidade. Esta ligação é realizada num dois canais de ligação localizados na cavidade central e hidrofóbica da TTR (Wojtczak et al., 2001). Esta ligação permite manter a estabilidade para o seu transporte nos fluidos (sangue e LCR) (Blake et al., 1978).

A TTR é considerada a principal transportadora de T4 no LCR (Herbert et al., 1986) (Herbert et al., 1986) e é o principal transportador de T4 no plasma dos roedores (Davis et al., 1970).

b) Transporte de retinol e complexo proteína de ligação ao retinol

Para além do transporte de T4 a TTR está igualmente envolvida no fornecimento sistémico de retinol (forma ativa da vitamina A). O retinol é uma vitamina essencial para o desenvolvimento fetal em inúmeras espécies animais (Goodman, 1984).

O retinol é sintetizado no fígado e transportado na corrente sanguínea, sob condições fisiológicas, forma-se um complexo macromolecular entre a TTR tetramérica e a proteína transportadora do retinol (RBP) acoplada ao retinol (Bern et al., 1990).

A TTR tem um papel fundamental no transporte de retinol na estabilização do complexo retinol - RBP (Yamamoto et al., 1997). A ligação do retinol à RBP facilita a solubilidade e transporte da mesma (Peterson et al., 1971). O RBP é uma cadeia polipeptídica com cento e oitenta e dois aminoácidos, com afinidade elevada para a TTR. Cerca de 90% da RBP encontra-se saturada com retinol (Bellovino et al., 2003).

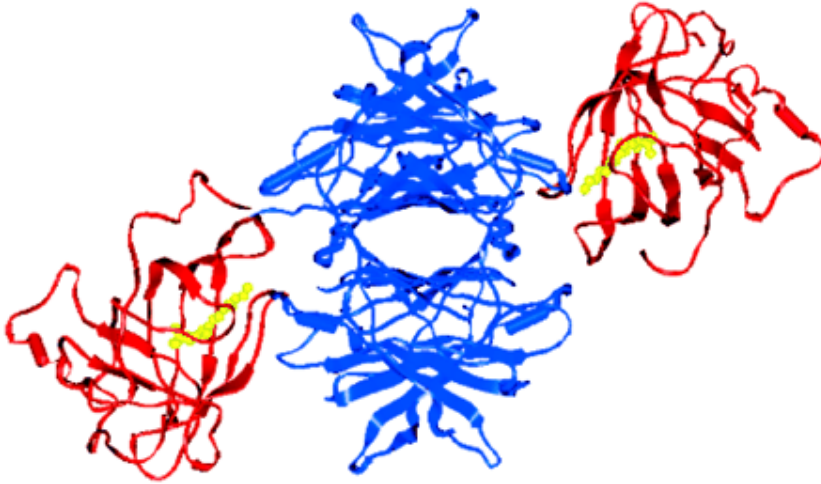


Figura 5. Imagem representativa da estrutura da ligação da TTR com o complexo RBP- retinol. Adaptado de (White & Kelly, 2001)

Os modelos animais, sem síntese de TTR, apesar de terem níveis de diminuição de tiroxina e retinol, apresentam um fenótipo sem alterações. Estes dados sugerem, que na ausência de TTR, existiram mecanismos de compensação no metabolismo e transporte de tiroxina (Palha et al., 1997)

Variantes da TTR

Atualmente foram descritas mais de 120 mutações pontuais diferentes na sequência do gene da TTR em humanos. A maioria das mutações resulta da simples substituição de um nucleótido no gene TTR.

As variantes de TTR resultam, maioritariamente, em patologias familiares, sendo a PAF a patologia neurodegenerativas mais comum.

Mutações patogénicas causam a alteração da conformação da proteína TTR, provocando a sua instabilidade tornando-a mais suscetível à dissociação em monómeros de TTR. A mutação V30M é a mais estudada em todo o mundo, tendo como focos importantes os seguintes países: Portugal, Suécia e Japão (Soares et al., 2004).

Fisiopatologia da PAF

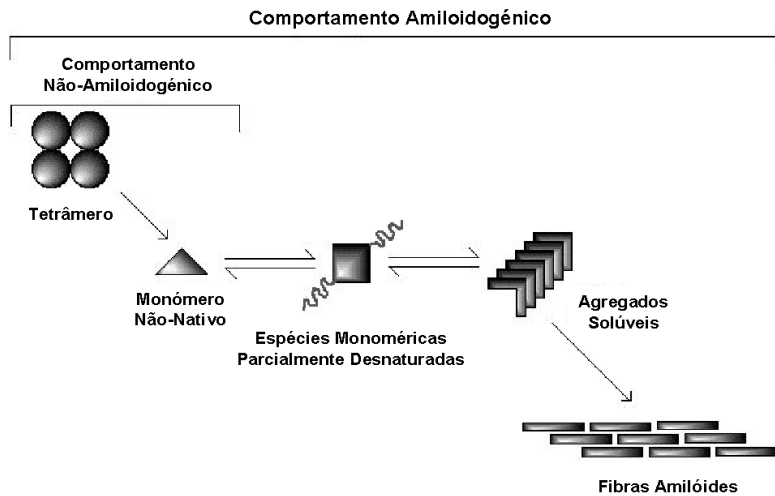


Figura 6. Modelo de formação de fibras amiloides da proteína TTR. Adaptado de (Quintas, Vaz, Cardoso, Saraiva, & Brito, 2001)

A amiloidogénese é um processo fisiopatológico caracterizado pela deposição de fibras amiloides extracelulares, provocados pela agregação de proteínas *misfolded* (i.e. cuja conformação foi alterada), que provocam a alteração da arquitetura tecidual com perda de função (Soto et al, 2008).

Mais de vinte proteínas estão descritas como potenciais amiloidogénicas, capazes de formar fibrilas amiloides morfologicamente distintas. Independentemente do tipo de proteína potenciadora, as estruturas fibrilares são constituídas predominantemente por folhas β pregueadas, de diâmetro variável compreendido entre os 70-100 Å, não ramificadas, de comprimento variável e altamente resistentes à proteólise (Cardoso et al., 2002).

Estudos *in vitro* demonstram que os fatores ambientais podem promover a agregação de proteínas com potencial amiloidogénico (Soto et al, 2003). No entanto, estudos *in vivo*, indicam que as condições ambientais (temperaturas elevadas, pH ácido, condições de oxidação e alteração das forças iónicas) são consideradas extremas e contribuem para a agregação de proteínas amiloidóticas (Quintas et al., 2001).

Quintas *et al.*, propuseram o modelo, atualmente aceite, de fibrilogénese das fibras amiloides (Quintas et al., 2001). Este modelo é baseado na dissociação do tetrâmero em monómeros nativos, que ocorre em condições fisiológicas. Os monómeros nativos através de alterações da conformação e reações químicas dão origem a espécies

monoméricas não nativas. Estas promovem a formação de agregados protofibrilares ou pré-fibrilares que sofrem alterações na sua conformação, provocando perda de estabilidade e, ainda que solúveis, são potenciadores fulcrais na irreversibilidade do processo amiloidogénico, ou seja, na formação de fibrilas maduras amilóides. (Quintas et al., 2001).

As características singulares dos agregados amiloides resultam na afinidade seletiva para o corante histoquímico - vermelho do congo (VC). Na visualização dos tecidos no microscópio ótico sob luz polarizada, após a coloração de VC, os depósitos de amiloide apresentam uma coloração birrefringente verde-maçã.

Diagnóstico da PAF

No diagnóstico da PAF é importante identificar o tipo de mutação presente no gene TTR, quer em doentes pré-sintomáticos quer em doentes sintomáticos. Para a avaliação histopatológica da deposição de fibras amiloides nos doentes, são realizadas biopsias de tecido proveniente das glândulas salivares e tecido celular subcutâneo dos pacientes. Assim, como confirmação do diagnóstico de PAF é necessário a demonstração da deposição de amiloide em biopsias, através da coloração de vermelho do congo e por técnicas imunohistoquímicas. Com a coloração de vermelho do congo, os depósitos de amiloide adquirem características birrefringentes verde observada através de luz polarizada. No entanto a técnica ideal para detetar o tipo de agregados amiloidóticos de TTR é a imunohistoquímica através de anticorpos específicos anti-TTR (Gertz, 2004).

O diagnóstico de PAF é suspeito em adultos com os seguintes sintomas: neuropatia sensorial motora e/ou autónoma lentamente progressiva que frequentemente é acompanhada de cardiomiopatia e nefropatia e ou opacidade vítrea; historia familiar consistente com herança autossómica dominante que suporta o diagnóstico;

Terapêutica da PAF

Nos últimos anos, novas estratégias terapêuticas foram estudadas e implementadas em ensaios clínicos em doentes com PAF. A terapêutica para a PAF

consiste no tratamento sistémico dos órgãos afetados e o tratamento da sintomatologia e consequências da doença, com a finalidade de melhorar a sua qualidade de vida dos pacientes (Ueda & Ando, 2014).

a. Transplante hepático

O transplante hepático (TH) foi proposto como prevenção na formação de amiloide e diminuição a progressão da doença (Adam et al., 2013) (Holmgren et al., 1991). Atualmente, o transplante hepático continua a ser uma terapia de referência na diminuição da sintomatologia da PAF (Barreiros, Geber, Birklein, Galle, & Otto, 2010), sendo Portugal o país com maior taxa de TH em doentes com PAF. O TH tem como objetivo a eliminação da síntese de TTR mutada no fígado e a substituição por TTR selvagem (não mutada). Após o TH, a redução da TTR mutada é significativa.

A médio prazo, observou-se a regressão dos depósitos de amiloide nos nervos periféricos em doentes de estadió inicial (Adams et al., 2014). Em estudos a longo prazo, os doentes com PAF sujeitos a TH associado à mutação val30met têm uma taxa de sobrevivência de 80%, sendo que doentes com outras mutações a taxa de sobrevivência é cerca de 50%. Os benefícios do TH são influenciados pelo tipo de mutação associado à PAF e pelo estadió da doença, sendo o estadió precoce o que apresenta melhores benefícios (Wilczek, Larsson, & Ericzon, 2011). Num estudo retrospectivo das duas últimas décadas de realização de transplantes hepáticos, os autores revelam que os pacientes em estadió inicial têm uma resposta excelente ao tratamento (Ericzon et al., 2015).

O transplante hepático sequencial (dominó)

O transplante hepático sequencial (THS) tem como objetivo compensar a escassez de doadores de fígado para transplantes. Desta forma são utilizados fígados de doentes com PAF, que são funcionais com a exceção de produzirem a proteína mutante amiloidogénica, em doentes com patologias hepáticas severas. Geralmente os doentes encaminhados para receber um transplante hepático sequencial estão referenciados como tendo um período médio/curto de vida. Estudos revelam que estes doentes correm o risco de desenvolverem neuropatia amiloidótica a longo prazo (Sousa et al., 2003).

Há terapias alternativas em estudo, baseadas em estratégias farmacológicas tendo em consideração: o bloqueio da síntese de TTR nos hepatócitos; a estabilização de tetrâmeros de TTR e disrupção das fibrilas de amiloide –TTR.

b) Bloqueio da síntese de TTR no fígado

O silenciamento de genes é uma terapêutica proposta como supressão de síntese de TTR no fígado. Métodos com recurso a oligonucleotidos *antisense* (*Isis Pharmaceuticals*) e *Small interfering RNA* (*Alnylam Pharmaceuticals*) são ferramentas efetivas utilizadas em terapias génicas (Benson et al., 2006).

Oligonucleotidos *antisense* provocam a degradação enzimática de RNA mensageiro (RNAm), reduzindo os níveis de RNAm TTR no fígado e no plexos coroide (Benson et al., 2010).

O RNA interferência (RNAsi) tem a sequencia específica do silenciamento de gene pós-transcripto. Diferentes tipos de RNAsi silenciam seletivamente a expressão do gene TTR, *in vivo* e *in vitro* (Kurosawa, Igarashi, Nishizawa, & Onodera, 2005). Relativamente aos resultados do ensaio clínico de fase II em doentes com PAF, os autores revelam que o fármaco ALN-TTR02 (RNAsi) reduz significativamente a TTR plasmática e é geralmente bem tolerado pelos doentes.

c) Estabilizador de tetrâmeros de TTR

Os estabilizadores de tetrâmeros da TTR atuam através da ligação à estrutura tetramérica da proteína, impedindo que esta se dissocie em estruturas monoméricas com potencial amiloidogénico (figura 6).

Tafamidis, comercializado pela *Pfizer*, é um potente e seletivo estabilizador de TTR na forma tetramérica. Após um estudo sobre os efeitos do Tafamidis a longo-prazo em doentes com PAF, os investigadores concluíram que o fármaco é bem tolerado pelos doentes e reduz ligeiramente a taxa de degeneração neurológica, no entanto só em 40% dos doentes (Coelho et al., 2013; Merlini et al., 2013). Este fármaco foi aprovado na

Europa e Japão para o tratamento de doentes sintomáticos (precoces) com PAF (Coelho et al., 2012).

d) Disrupção de fibrilas de TTR amiloide

A doxiciclina é um antibiótico que pertence ao grupo de medicamentos denominados tetraciclinas. A doxiciclina demonstrou, em estudos *in vitro* e *in vivo*, disromper as fibras de amiloide depositadas em tecidos do sistema gastrointestinal (Cardoso, Merlini, & Saraiva, 2003). No entanto este fármaco não demonstrou ser capaz de remover a TTR não-fibrilar (Cardoso & Saraiva, 2006).

O ácido tauroursodesoxicólico (TUDCA) é um ácido biliar endógeno produzido em pequenas quantidades. É utilizado como estratégia terapêutica em indivíduos com disfunções biliares. O TUDCA é um potente inibidor da apoptose e da produção de radicais livres de oxigénio reduzindo o *stress* no reticulo endoplasmático e estabilizando a resposta a proteínas *unfolded*. O TUDCA demonstrou ser neuroprotetor em diversos modelos animais de doenças neurodegenerativas (Ward et al., 2015).

A administração de TUDCA em animais transgênicos TTR val30met, reduziu significativamente os agregados tóxicos em tecidos, causados pela deposição de TTR. Demonstrou igualmente ser capaz de diminuir agregados não fibrilares, *in vivo*, em animais jovens (Macedo, Batista, Ferreira, Almeida, & Saraiva, 2008).

Estudos revelam que a sinergia dos dois fármacos (Doxi-TUDCA) atua na diminuição significativa da deposição fibrilar de TTR e normaliza os níveis de biomarcadores de *stress* oxidativo e de matriz extracelular, em animais transgênicos V30M (Cardoso, Martins, Ribeiro, Merlini, & Saraiva, 2010) (Figura 6).

A combinação da doxiciclina e o ácido tauroursodesoxicólico encontra-se em ensaios clínicos de fase II (Figura 6). Os resultados, após um ano, demonstram que os pacientes, em geral, encontram-se estáveis, sendo um tratamento igualmente bem tolerado.

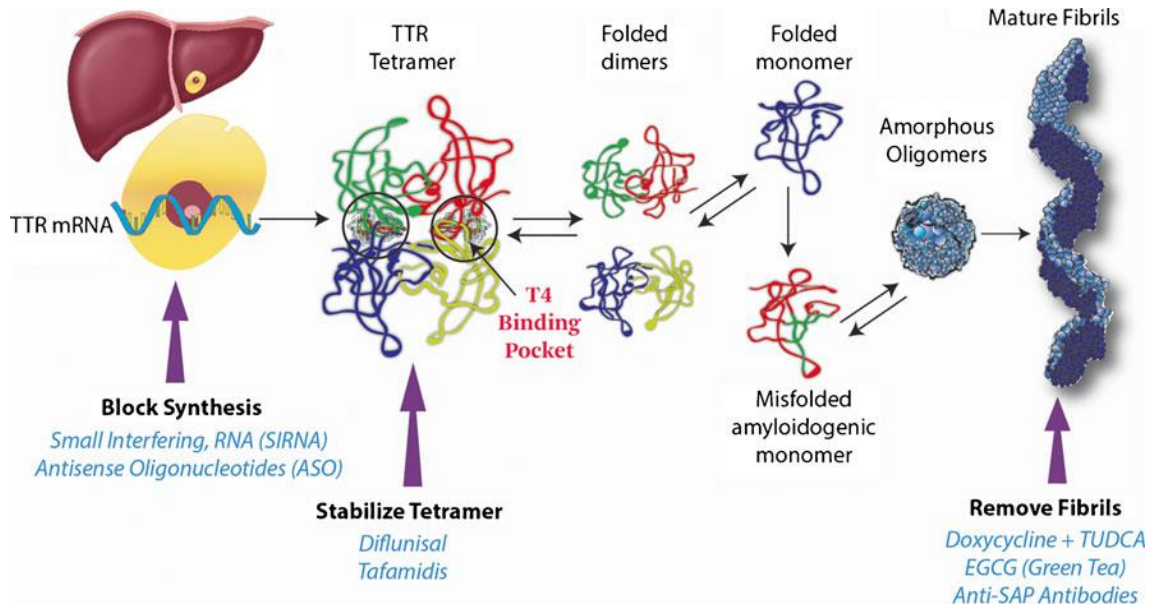


Figura 7. Representação esquemática da atuação dos diferentes fármacos nas diversas conformações da transtirretina. Adaptado de (Hanna, 2014)

Modelos animais

A utilização de modelos animais data de 500 a.C., em que se comparava a morfologia dos órgãos humanos com a dos animais com o objetivo de formular hipóteses sobre a fisiologia e interação dos vários sistemas (Miziara & Oliveira, 2012).

Atualmente os modelos animais têm um papel fundamental na investigação científica, uma vez que mimetizam a interação entre os vários sistemas, aproximando-se dos sistemas humanos. Os modelos animais são utilizados para o estudo de diversas patologias, permitindo esclarecer os mecanismos que levam à progressão da patologia e desenvolver agentes farmacológicos que previnem e/ou retardam o desenvolvimento da patogênese. O sucesso dos resultados das experiências com modelos animais está inteiramente relacionado com a escolha do modelo animal.

Em 1986, Sakaki et al., gerou o primeiro modelo animal com a patologia PAF. Para estudar a patogênese da variante da TTR humana associada à PAF, foram gerados modelos animais (murganhos) transgênicos que produzissem o gene TTR humano mutado. E desde então, foram criados diversos modelos animais que detêm a mutação TTR humana, V30M, (Yamamura et al., 1991) e a forma mais agressiva da variante de TTR, Leu55Pro (L55P) (Sousa et al., 2002).

Os modelos animais inicialmente descritos com a mutação TTR val30met, apresentaram precocemente a presença de TTR não fibrilar e, tal como nos humanos, com o envelhecimento originam depósitos de amiloide. No entanto não apresentavam deposição de TTR mutada no tecido nervoso periférico, o que condicionava o estudo sistêmico da PAF em modelos animais.

No presente laboratório foi gerado um novo modelo animal transgênico, capaz de expressar a variante mutada de TTR humana (V30M), sem produção de TTR endógena, e heterozigótico para o gene *heat shock transcription factor 1* (Hsf1). Estes animais apresentam deposição precoce de agregados não fibrilares de TTR mutada nos gânglios nervosos e tecido nervoso periférico (Santos, Fernandes & Saraiva, 2010). Estes modelos revelaram-se fundamentais para o estudo da PAF em modelos animais, uma vez que em humanos a neuropatia periférica e autossômica constituem as principais manifestações clínicas.

avançado. Na maioria dos casos, a variante mutada de TTR está associada à síntese da proteína no plexos coroide (Mitsubishi et al., 2005).

Nos casos em que os doentes apresentam deposição de amiloide no sistema vascular cerebral está descrita como angiopatia amiloidótica cerebral (Maia, Mackenzie, & Feldman, 2015). A amiloidose leptomeningeal apresenta deposição de TTR nas membranas pia-mater e aracnoidea-mater (leptomeninges), assim como na parede dos vasos do cortex e do espaço subaracnoideu.

Estão descritas algumas mutações na TTR associada à amiloidose leptomeningeal, como *Leu12Pro* (Brett et al., 1999)(McColgan et al., 2015), *Asp18Gly* (Jin et al., 2004), *Ala25Thr* (Shimizu, Takeuchi, Matsumura, Tokuda, & Iwata, 2006), *Val30Met* (Herrick et al., 1996), *Gly53Glu* (Ellie et al., 2001), *Phe64Ser* (Uemichi, RJ, AH, JR, & MD, 1999), *Tyr69His* (Azevedo et al., 2013; Blevins et al., 2003; M. J. M. Saraiva, 2001), entre outras. Os indivíduos com amiloidose leptomeningeal apresentam manifestações clínicas associadas a psicose, deficiência visual, cefaleias, convulsões, paralisia motora, ataxia, mielopatia, hidrocefalia ou hemorragia intracraniana (Ando et al., 2013; Maia et al., 2015) . Na amiloidose leptomeningeal a concentração de TTR mutada no líquido cefalorraquidiano é geralmente elevada (Adams et al., 2014) (Weisner & Roethig, 1983).

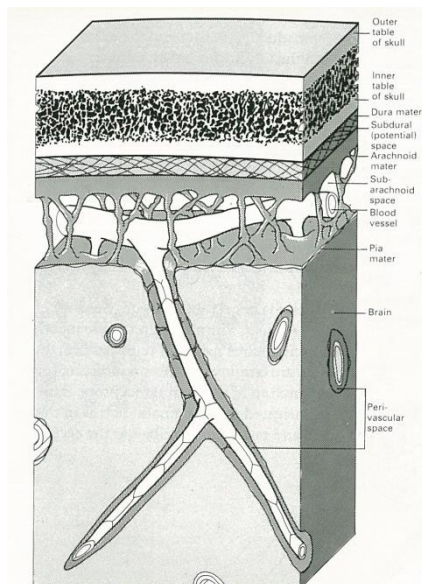


Figura 9. Imagem representativa da distribuição das meninges cerebrais. Adaptado de Wheater's Functional Histology- A texto and Colours Atlas.

Objetivo do estudo

O transplante hepático continua a ser a terapêutica de eleição para o tratamento da PAF, no entanto vários fármacos são estudados como possíveis tratamentos alternativos.

No presente estudo, propusemo-nos a avaliar a presença de TTR em animais transgênicos para TTR com a mutação V30M, sem produção endógena de TTR, e heterozigóticos para o gene Hsf1, tratados com um combinado farmacológico constituído por um disruptor fibrilar de amiloide e um ácido biliar endógeno. Seguidamente foram avaliados os seguintes parâmetros:

1. A deposição de TTR no sistema vascular cerebral e leptomeninges. Foi necessário otimizar determinados procedimentos para a avaliação da deposição de TTR no tecido neuronal e sistema vascular cerebral, tais como:
 - a. Protocolo de descalcificação que permita preservar a integridade das meninges cerebrais;
 - b. Técnica de imunofluorescência no tecido neuronal.
2. A deposição de agregados não fibrilares de TTR e amilóide no sistema gastrointestinal.
3. A concentração de TTR no plasma.

Capítulo 2

Materiais e métodos

Animais

Neste estudo foram utilizados 18 murganhos transgênicos da estirpe 129/SV, sem produção endógena de TTR, que sintetizam a variante da TTR humana com a mutação V30M e heterozigóticos para *heat shock transcription factor 1* (Hsf-1) (denominados V30M/Hsf1). Os animais, com idades compreendidas entre os 23 e 27 meses, foram tratados durante 4 semanas com uma combinação de dois fármacos: um disruptor de fibrilas amilóides maduras (designado a montante por fármaco A) e um ácido biliar endógeno (designado a montante por fármaco B). Os fármacos foram administrados em simultâneo, um deles na água com a concentração de 8mg/kg/dia, sendo substituída semanalmente; o outro foi administrado por via intraperitoneal com a concentração de 500mg/kg/dia em solução de tampão fosfato (PBS) estéril, administrado 2 vezes por semana. Os animais controlos (n=7) foram administrados com PBS estéril por via intraperitoneal e bebiam água da torneira. Todos os animais foram alojados em caixas apropriadas em condições livres de patogénicos, temperatura controlada (22°C), mantendo ciclos de 12h de luz e 12h com ausência de luz, com o fornecimento *ad libitum* de comida e água.

Todos os procedimentos animais cumpriram as normas estabelecidas pelo decreto-lei 113/2013, segundo a diretiva Europeia 2010/63/EU.

Colheita e preparação das amostras

Os animais foram anestesiados com uma mistura de Cetamina e Medetomidina, administrados por via intraperitoneal. Foi colhido sangue através da veia cava inferior com seringas contendo o agente anticoagulante - ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Após centrifugação (14500 RPM, 10 minutos) à temperatura ambiente, o plasma foi removido e congelado a -80°C para posterior análise. Seguidamente os animais foram sujeitos a perfusão transcardíaca com 4% de paraformaldeído, segundo a técnica já descrita (Gregory et al, 2012).

Posteriormente procedeu-se à recolha dos vários órgãos para análise histológica: sistema gastrointestinal, baço, bexiga e fígado. Os tecidos colhidos foram fixados em 10% de formaldeído tamponado durante 24h à temperatura ambiente. Seguidamente procedeu-se à decapitação do animal, com o objetivo de remover o crânio de forma a

preservar as estruturas cerebrais, incluindo as meninges. Assim após a dissecação da pele, músculos faciais e estruturas inerentes à cabeça (dentes, língua, olhos, mandíbula), o cérebro com crânio foi fixado em 10% de formaldeído tamponado, durante 2 semanas, à temperatura ambiente. Seguindo o processamento histológico e a inclusão em parafina.

Descalcificação

Após a descalcificação com a solução B (anexo1), as amostras foram sujeitas ao processamento histológico, de forma a serem observadas na microscopia ótica. O processamento histológico foi iniciado com a imersão das amostras em gradiente crescente de etanol (70%, 80%, 95% e 100%), permanecendo 2 horas em cada solução, com exceção do último etanol onde as amostras ficaram imersas durante a noite a 4°C. Posteriormente as amostras foram colocadas em xilol, durante 3 horas. Todo o processamento foi realizado com agitação. Seguindo-se por fim, a impregnação em parafina.

Imunohistoquímica

A presença de TTR foi avaliada através de estudos imunohistoquímicos. O controlo positivo utilizado foi o plexo coroide e fígado, locais de síntese de TTR. Para controlo negativo foram utilizados os mesmos tecidos de animais sem produção de TTR (TTR *Knock-out*).

Foram utilizadas secções de tecido com espessura de 3 µm, em lâminas adesivadas com 3-Aminopropil-trietoxisilano (APES). Procedeu-se à desparafinação das secções de tecido em xilol (Fisher) durante 30 minutos; seguidamente as secções de tecido foram hidratadas, a partir de uma serie decrescente de etanol (100%, 90%, 80% e 70%) até à água corrente. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com uma solução de 3% de peróxido de hidrogénio (H₂O₂) em metanol, durante 30 minutos. Seguindo-se o bloqueio de reações inespecíficas com 1% albumina sérica bovina (BSA) e 4% de soro fetal bovino (FBS) em PBS (1h à temperatura ambiente); O anticorpo primário policlonal anti-TTR humana utilizado foi produzido em coelho (1:600; DAKO, Glostrup, Denmark) diluído em soro de bloqueio com incubação durante a noite a 4°C; Posteriormente foi realizada a incubação do anticorpo secundário anti-coelho IgG biotinilado (1:200, vector lab) à temperatura ambiente, durante 45 minutos; o método de

deteção utilizado foi o complexo ABC (vector lab) seguindo as instruções do fornecedor; Após a realização de lavagens, foi utilizado como cromogénio o 3,3-diaminobenzidina (DAB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO); as secções de tecido foram contrastadas com hematoxilina de *Gill* II durante 15 segundos, desidratadas, diafanizadas e montadas individualmente com meio de montagem sintético (entellan) para posterior observação em microscopia ótica.

As secções de cérebro foram posteriormente observadas ao microscópio ótico (Olympus Optical) e foram recolhidas imagens de toda a periferia do cérebro utilizando a objetiva de 10x. A análise semi-quantitativa foi realizada no programa Image-Pro plus, no qual, a área de interesse (revelada por DAB) é convertida a pixéis e normalizada relativamente à área total. Os resultados encontram-se em percentagem de área marcada e correspondem à média e erro padrão da média.

Imunofluorescência

Foram utilizadas secções de tecido de cérebro de animais anteriormente descritos. Para o controlo negativo foram utilizadas secções de tecido de animais TTR/*Knock-out*). Foram utilizadas secções de tecido com espessura de 3 µm, em lâminas adesivadas com APES. Procedeu-se à desparafinação das secções de tecido em xilol (Fisher) durante 30 minutos; seguidamente as secções de tecido foram hidratadas, utilizando uma serie decrescente de etanol (100%, 90%, 80% e 70%) até à água corrente. Seguidamente foi realizada a recuperação antigénica com tampão citrato pH 6, durante 5 minutos no micro-ondas. Seguiu-se a permeabilização celular com 0,25% de triton em PBS, durante 10 minutos. Posteriormente os cortes foram incubados em tampão de bloqueio de reações inespecíficas 1% BSA em PBS-T durante 30 minutos. As secções de tecido foram incubadas com os seguintes anticorpos primários: anticorpo policlonal anti-pre-albumina produzido em coelho (1:100; Abcam, U.S.A.); anticorpo policlonal anti-PECAM1 produzido em cabra (1:50; santa cruz, USA; anticorpo monoclonal anti-colagénioIV produzido em ratinho (1:100; Abcam, U.S.A.), diluídos em tampão de bloqueio com incubação durante a noite a 4°C; De seguida as secções foram incubadas com anticorpo secundário anti-coelho 488 (1:1000, Alexa Fluor, 488) juntamente com o anticorpo secundário anti-cabra 568 (1:1000, Alexa Fluor, 568) ou com o anticorpo secundário anti-mouse 568 (1:1000, Alexa Fluor, 568), durante 45

minutos, à temperatura ambiente. Posteriormente as secções de cérebro foram coradas com 0,3% negro do sudão (Merck) em 70% de etanol, durante 5 minutos, seguindo uma passagem em água destilada e 8 lavagens em PBS durante 5 minutos cada. Após as lavagens procedeu-se à montagem das lâminas meio de montagem com 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI) - *Vectashield* (Vector laboratories, Inc, Burlingame).

As lâminas foram observadas com um microscópio confocal Leica TCS SP5 II (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany).

Vermelho do Congo

A presença de agregados de amiloide em secções de tecidos (5µm) foi realizada através da coloração histoquímica de vermelho do congo (Puchtler H, 1965). As secções de tecido foram desparafinadas e hidratadas, seguidamente foram incubadas numa solução saturada de NaCl em 80% de etanol, durante 20 minutos. Em seguida, as secções de tecido foram emersas numa solução de 1% do corante vermelho do congo numa solução saturada de NaCl em 80% de etanol durante 20 minutos. Posteriormente as secções de tecido foram analisadas no microscópio ótico com luz polarizada. A presença de amiloide foi identificada pelas suas características birrefringentes de coloração verde.

A análise da coloração do vermelho do congo foi realizada recorrendo a uma avaliação qualitativa quanto à presença ou ausência de coloração birrefringente verde no microscópio ótico (Olympus Optical).

Western Blot

Para a técnica de *western blot* (WB) foram utilizados plasmas de animais tratados (n=5) e animais controlo (n=5). Foi utilizado 1 µL de plasma de amostra, sendo fervido durante 5 minutos em tampão SDS (125mM Tris pH 6,8; 4% SDS; 20% glicerol; 10% β-mercaptoetanol e 0,08% de azul de bromofenol) e separadas por eletroforese num gel de 15% SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) a 25 miliamperes (mA), durante 2 horas. As proteínas foram posteriormente transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Schleicher and Schuell; 0,2 mm), durante 1 hora, a 400mA, 100 volts, a 4°C. A determinação da transferência foi confirmada através da coloração de *Ponceau S*, seguindo de descoloração da mesma e secagem da membrana. Posteriormente foi efetuado o

bloqueio de ligações inespecíficas com 10% de leite em pó magro em tampão fosfato contendo 0,05% de Tween-20 (PBS-T), durante 1 hora à temperatura ambiente. Seguidamente a membrana foi incubada com o anticorpo primário anti-TTR (1:350; DAKO, Glostrup, Denmark) diluído em 10% de leite em pó magro em PBS-T, com agitação, durante a noite a 4°C. Após as lavagens da membrana com PBS-T, foi incubado o anticorpo secundário anti-coelho (1:5000, *The Binding Site Group*) diluído em 3% de leite de pó magro, durante 1 hora, à temperatura ambiente. Após as lavagens com PBS-T a membrana foi revelada com reagente ECL (BioRad). As proteínas foram visualizadas com um sistema de deteção de quimiluminescência.

Imunodifusão Radial

Para a técnica de imunodifusão radial (IDR) foi utilizado um *kit* de deteção da concentração de prealbumina humana (ou TTR) (Kit Bindarid, Binding Site, UK), no qual foram utilizados os plasmas dos mesmos animais descritos na técnica anterior. Foram utilizados 5 µL de plasma de amostra, sendo que este foi diluído (1:2) em 7% BSA. Foram utilizadas três concentrações diferentes de soluções padrão e uma amostra conhecida para validar a técnica. O procedimento foi realizado de acordo com o fornecedor.

A concentração de prealbumina no plasma foi determinada pela curva de calibração, utilizando três concentrações diferentes de solução padrão.

Estatística

Os dados relativos à quantificação da técnica de imunohistoquímica em tecido neuronal e gastrointestinal foram expressos em média e desvio padrão da média. O teste *t – student's* foi usado para comparar os dois grupos (tratados e controlos). Foi considerado estatisticamente significativo o valor de *p* igual ou inferior a 0,05.

Capítulo 3

Resultados

Imunohistoquímica

Para a análise do efeito do tratamento combinado na deposição de TTR, foi utilizada a técnica de imunohistoquímica. Esta técnica reconhece segmentos da proteína TTR, sendo que não discrimina a conformação (não-fibrilar e fibrilar) dos agregados proteicos constituídos pela mesma. A imunohistoquímica é uma técnica amplamente utilizada na rotina diagnóstica e encontra-se descrita por Albert Coons (Coons, Creech, & Jones, 1941).

Inicialmente foi avaliado o efeito do tratamento combinado na deposição de agregados amiloides em secções de tecido do sistema gastrointestinal (estômago, colon e duodeno) em animais tratados (n=11) e animais controlo (n=7) (figura 10). Como controlo positivo foram utilizadas secções de fígado (local de produção de TTR). Após a semi-quantificação da deposição de TTR no sistema gastrointestinal, verificou-se que no colón, os animais tratados apresentaram diferenças estatisticamente significativas comparativamente aos animais controlo (gráfico 1). Relativamente aos restantes órgãos não demonstraram diferenças estatísticas significativas entre os animais tratados e os animais controlos. Estes resultados sugerem que, no colon, o tratamento combinado foi eficaz na disrupção e remoção de depósitos de TTR.

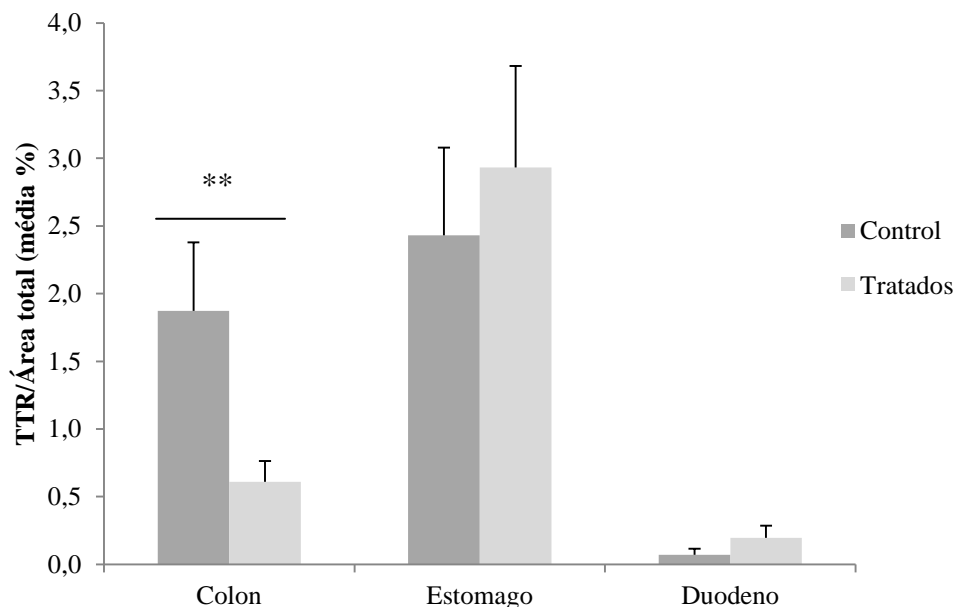


Gráfico 1. Deposição de TTR no sistema gastrointestinal. Os dados encontram-se apresentados em percentagem de marcação e correspondem à média e desvio padrão da média (** p igual ou inferior a 0,01).

Posteriormente foi avaliada a eficácia do tratamento na deposição de TTR no cérebro, nomeadamente no sistema vascular cerebral e leptomeninges (gráfico 2). Foram utilizados animais controlo (n=2) e animais tratados (n=5), nos quais se observou a deposição de agregados de TTR no sistema vascular cerebral e /ou meninges (figura 11). Após a avaliação semi-quantitativa verificou-se que havia uma tendência para a diminuição da deposição de agregados de TTR no sistema vascular cerebral e leptomeninges, nos animais tratados.

Imunofluorescência

Após a análise da deposição de TTR no sistema vascular cerebral e leptomeninges pela técnica de imunohistoquímica, houve a necessidade de determinar a localização exata da deposição de TTR no sistema vascular cerebral. Desta forma foi realizada a técnica de imunohistoquímica com dupla marcação, utilizando marcadores específicos da camada endotelial (PECAM1) e camada adventícia (colagénio IV) dos vasos.

Ao analisar a figura 12 verifica-se que há co-localização entre a marcação de TTR (verde) e marcação de colagénio (vermelho) no vaso sanguíneo extra-cortical. Por sua vez, na figura 13 não há evidência de co-localização entre os dois marcadores utilizados, PECAM1 (vermelho) e TTR (verde). A figura 14 representa o plexo coroide de um animal com produção de TTR e outro sem produção de TTR.

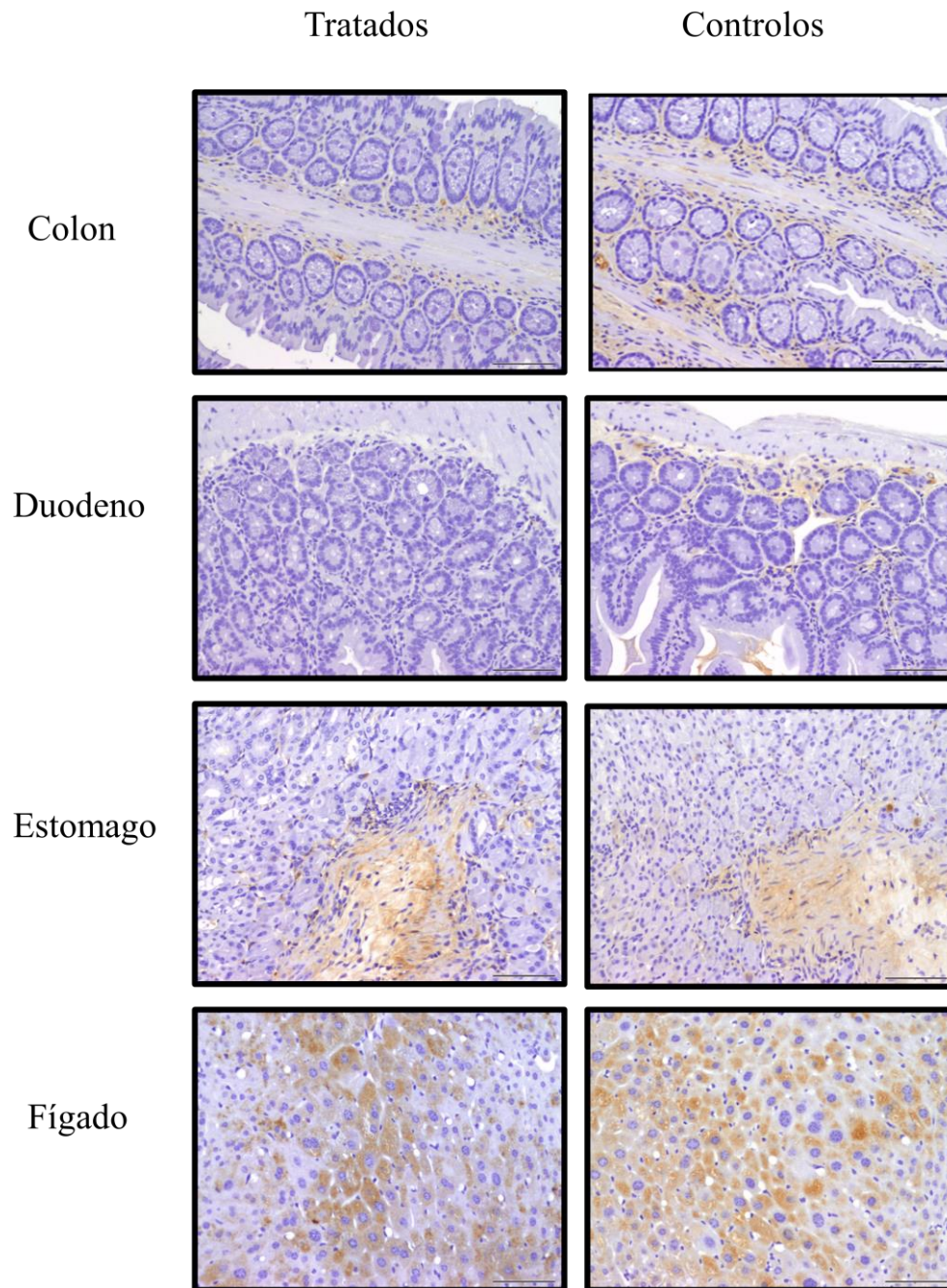


Figura 10. Imagens representativas da deposição de agregados de TTR em animais tratados e animais controlo, através da técnica de imunohistoquímica, em diferentes órgãos do sistema gastrointestinal. O controlo positivo utilizado foi o fígado (local de produção de TTR). Barra de escala 100 μ m.

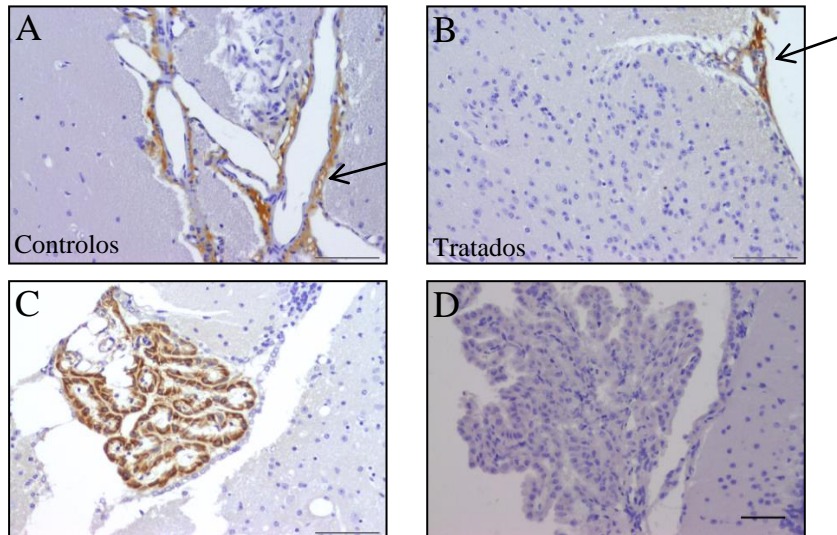


Figura 11. Imagens representativas da marcação de TTR através da técnica de imunohistoquímica em tecido cerebral. As setas nas figuras A e B identificam os depósitos extracelulares de TTR localizados no sistema vascular cerebral e ou meninges. As figuras A e B referem-se a animais controlos e animais tratados, respetivamente. As imagens C e D, plexo coróide, representam o controlo positivo e negativo, respetivamente. Barra de escala 100 μ m.

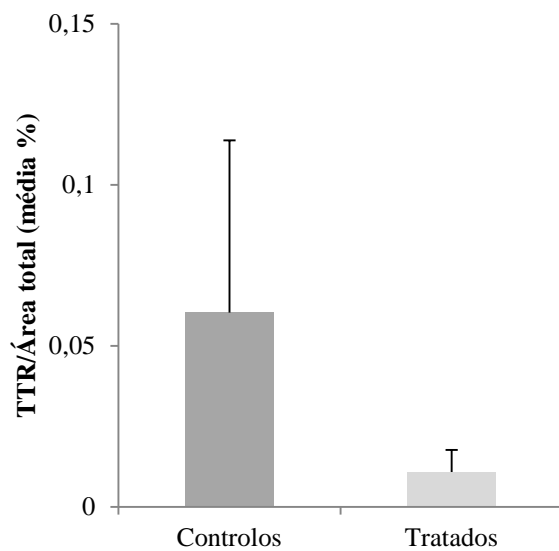


Gráfico 2. Deposição de TTR no sistema vascular cerebral e leptomeninges. Os dados encontram-se em percentagem de marcação e correspondem à média e desvio padrão da média. Foi considerado estatisticamente significativo o valor de p igual ou inferior a 0,05.

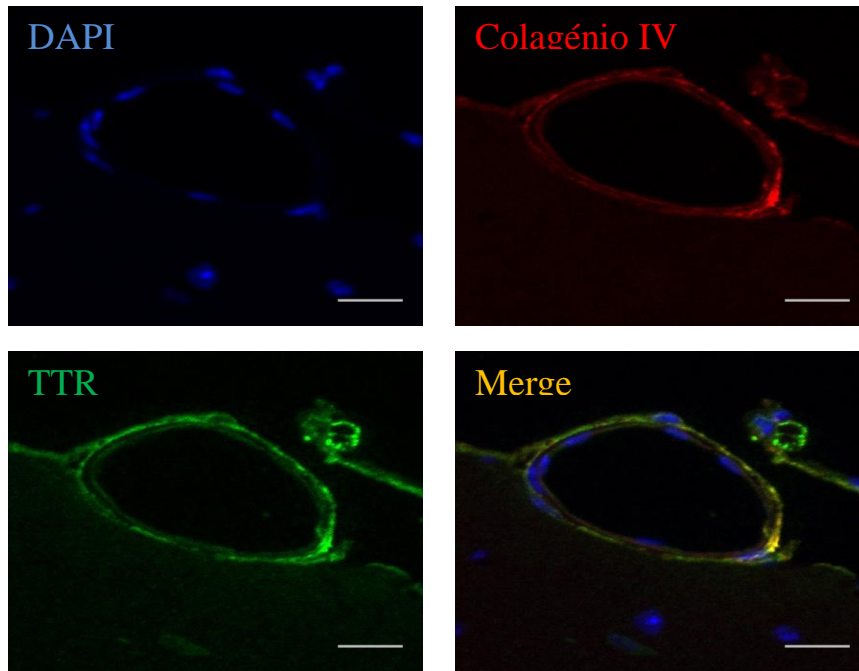


Figura 12. Imagens representativas de um vaso sanguíneo localizado à periferia do cérebro. Na imunofluorescência com dupla marcação foram utilizados os anticorpos anti-colagénio IV (vermelho) e anti-TTR (verde), a sobreposição com DAPI e com duas marcações é visualizada pelo *merging*. Barra de escala 10 μ m.

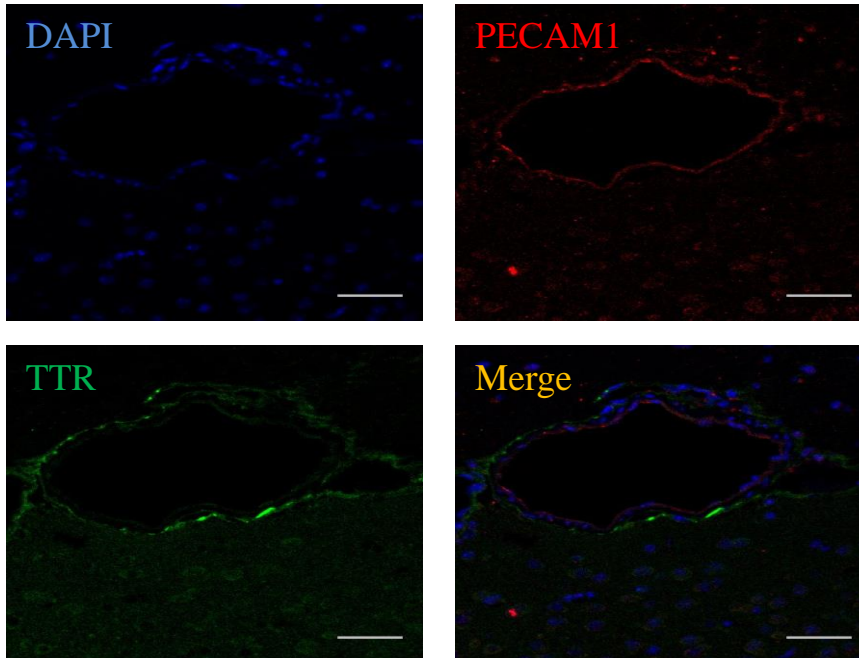


Figura 13. Imagens representativas de um vaso sanguíneo localizado à periferia do cérebro. Na imunofluorescência com dupla marcação foram utilizados os anticorpos anti-PECAM1 (vermelho) e anti-TTR (verde), a sobreposição com DAPI e com duas marcações é visualizada pelo *merging*. Barra de escala 10 μ m.

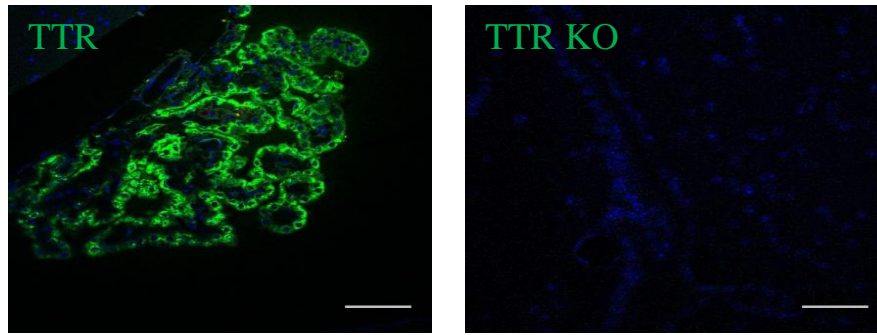


Figura 14. Imagens representativas do plexo coróide, utilizado como controlo positivo (animais V30M/Hsf-1) e controlo negativo (animais sem produção de TTR (TTR KO)). Barra de escala 10 μ m.

Vermelho do Congo

A análise da deposição de TTR, através da técnica de imunohistoquímica, não discrimina a presença de depósitos de amiloides. Assim, para determinar a forma dos agregados amiloides, nomeadamente as fibrilas amilóides maduras, foi utilizada a coloração de histoquímica de vermelho do congo.

O único tecido que demonstrou ter áreas birrefringentes (de coloração verde) foi o estomago. Nos animais não tratados foram detetados agregados de fibrilas amilóides em 4 dos 7 animais (4/7). Por sua vez, nos animais tratados foi detetado um único animal positivo para o VC (1/11). Assim os resultados sugerem que o tratamento foi capaz de disromper fibrilas amilóides maduras (figura 15), tal como descrito anteriormente no presente laboratório (Cardoso et al., 2010).

Western blot

A TTR funcional circula na corrente sanguínea e no líquido cefalorraquidiano sob a forma tetramérica. A concentração de TTR no plasma varia entre 0,1 a 0,4 mg/mL (Stabilini et al., 1968). A técnica de western blot foi utilizada para avaliar qualitativamente a concentração de TTR no plasma de animais tratados (n=5) e animais controlo (n=5). Ao analisar a figura 16, verifica-se que o grupo dos animais tratados apresenta níveis superiores de TTR no plasma relativamente ao grupo dos animais controlo.

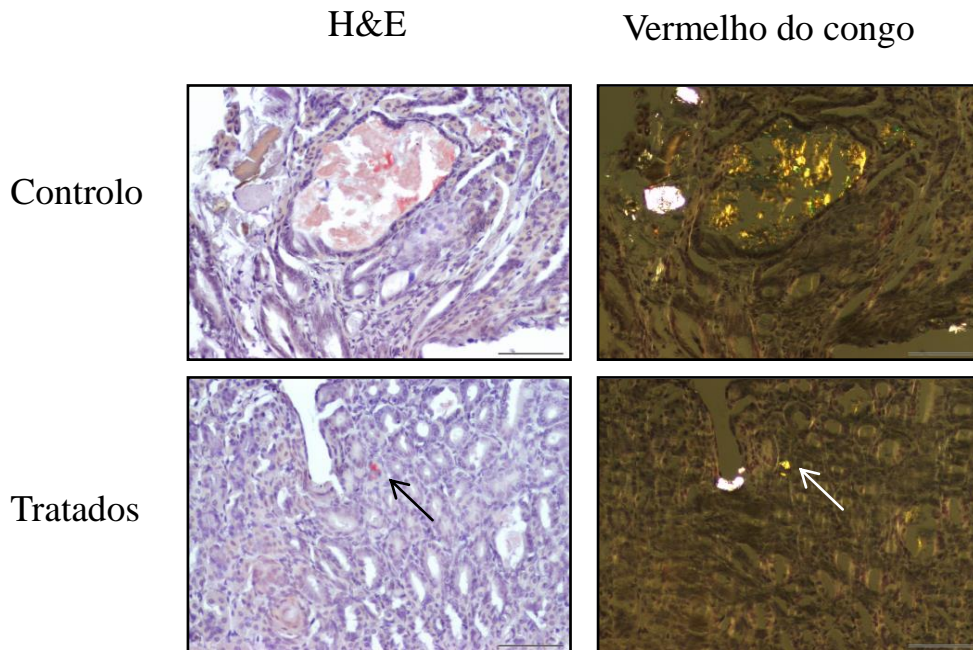


Figura 15. Imagens representativas da coloração de hematoxilina eosina e vermelho do congo no tecido gástrico de animais controle e animais tratados. As setas representam a coloração verde-maçã característica da propriedade birrefringente dos depósitos de amilóide. Barra de escala 100 μ m.

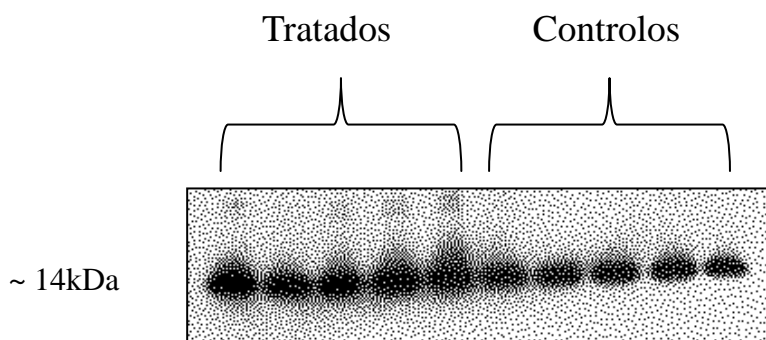


Figura 16. *Western blot* de plasma de animais V30M/Hsf-1 tratados (n=5) e animais controle (n=5) reconhecidos pelo anticorpo anti-TTR humano.

Imunodifusão Radial

A técnica de Imunodifusão radial (Mancini et al, 1965) foi utilizada para determinar a concentração de prealbumina (ou TTR) no plasma dos animais estudados. Para este ensaio foi realizada uma curva de calibração utilizando três valores padrão com concentrações conhecidas. Após a determinação da concentração de TTR no plasma, verificou-se que os animais tratados apresentam uma concentração de TTR plasmática superior (estatisticamente significativa) quando comparados com os animais controles (gráfico 3). Resultado que corrobora com a técnica anterior.

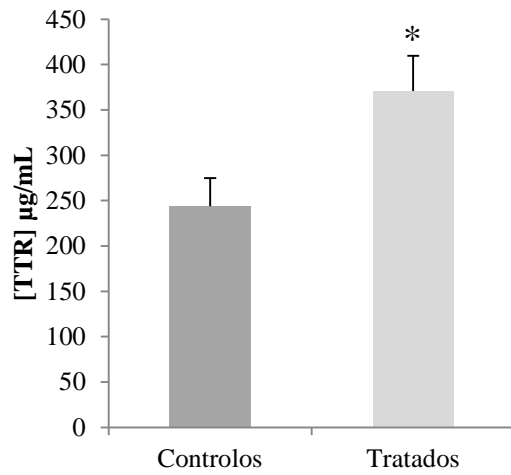


Gráfico 3. Concentração de TTR no plasma de animais tratados e animais controlo (V30M/Hsf-1). Os dados encontram-se ug/ml e correspondem à média e desvio padrão da média (* p igual ou inferior a 0,05).

Capítulo 4

Discussão de resultados

A PAF é uma neuropatia progressiva fatal que afeta vários órgãos. É caracterizada pela deposição extracelular de agregados amilóides provocados pela mutação da proteína TTR, sendo esta a causa mais frequente. Os mecanismos fisiopatológicos que levam à deposição de TTR não se encontram totalmente esclarecidos. De modo a expandir o conhecimento molecular e terapêutico da PAF foram gerados vários modelos animais com TTR mutante. Inicialmente os modelos animais transgênicos gerados eram portadores da mutação V30M na proteína TTR, que apesar da deposição precoce de agregados amiloides, não apresentavam deposição no sistema nervoso periférico. No presente laboratório foi gerado um modelo animal capaz de depositar TTR não fibrilar em vários órgãos incluindo o sistema nervoso periférico. Este animal, para além de ser portador da mutação V30M na proteína TTR apresenta heterozigotia do gene Hsf1 (V30M/Hsf1) (Santos et al., 2010). Este modelo animal foi utilizado no presente estudo.

Cardoso e Saraiva descreveram a ação de um antibiótico como sendo um fármaco promissor na disrupção de formações fibrilares de TTR *in vitro* (fármaco A) (Cardoso, Merlini e Saraiva, 2003) e *in vivo* (Cardoso & Saraiva, 2006). Segundo estes estudos, o fármaco A, apesar da eficácia na disrupção de agregados fibrilares de TTR, não demonstrou ser capaz de remover agregados não fibrilares, em animais transgênicos V30M. Outros estudos realizados no presente laboratório, revelam que a administração de um ácido biliar endógeno (fármaco B), com propriedades antioxidantes e antiapoptóticas, foi eficaz na diminuição de agregados não fibrilares (Macedo et al., 2008). Recentemente, Cardoso e Saraiva estudaram a sinergia dos fármacos A e B, os resultados revelam que a administração deste tratamento combinado diminui significativamente a deposição de TTR em animais V30M. Baseado nestes estudos, o presente trabalho experimental visou em testar a eficácia de um tratamento combinado com os fármacos A e B em animais transgênicos V30M/Hsf1 de 23 a 27 meses, relativamente à disrupção de agregados fibrilares e não-fibrilares e a sua remoção no sistema gastrointestinal e cérebro (leptomeninges e sistema vascular cerebral (figuras 10 e 11). Foi igualmente avaliada a concentração de TTR no plasma de animais tratados e animais controlos.

Para a avaliação da eficácia do tratamento no sistema gastrointestinal foram utilizadas secções de tecido de estômago, duodeno e colon. Nestes são observados depósitos extracelulares de agregados de TTR visualizados pela técnica de

imunohistoquímica (figura 10). Relativamente à eficácia do tratamento nos tecidos do sistema gastrointestinal, nomeadamente no colon, verificou-se uma diminuição de marcação de TTR nos animais tratados comparativamente aos animais controlo (gráfico 1). Este resultado, após a semi-quantificação sugere que, no colon, o tratamento combinado foi eficaz na remoção de agregados não-fibrilares de TTR. Relativamente aos outros dois órgãos estudados (duodeno e estômago) não demonstraram diferenças estatísticas relevantes nos dois grupos de animais (tratados e controlos) (gráfico 1).

A técnica de imunorreacção apenas deteta o epítipo antigénio, neste caso a proteína TTR, a qual se liga ao anticorpo primário, não sendo possível detetar especificamente o tipo de agregado amiloide (fibrilar ou não-fibrilar). Desta forma, os resultados de imunohistoquímica apenas vão determinar a presença ou ausência de deposição de agregados amiloides da proteína TTR. De modo a diferenciar o tipo de fibras amiloides que constituem os agregados de TTR foi utilizada a coloração de vermelho do congo. Esta coloração histoquímica deteta fibras amiloides maduras, estas apresentam uma propriedade tintorial única que, ao ser visualizada ao microscópio com luz polarizada, emite coloração verde-maçã, como é demonstrada na figura 15.

A coloração vermelho do congo foi realizada nas secções de tecido do sistema gastrointestinal, a coloração verde (característica de fibras de amiloide maduras) só foi visualizada em secções de estomago (figura 15). Os resultados da avaliação qualitativa da coloração de vermelho do congo indicam que no grupo dos animais tratados apenas houve uma secção, correspondendo a um animal, apresentou a coloração verde-maçã, quando observada ao microscópio ótico com luz polarizada. Estes dados sugerem que o tratamento foi eficaz na disrupção de fibras amiloides maduras que são positivas na coloração vermelho do congo. Estes resultados são corroborantes com os estudos anteriores, realizados no presente laboratório, utilizando animais transgénicos V30M (Cardoso & Saraiva, 2010).

No modelo animal utilizado (V30M/Hsf1) observou-se que, histologicamente, os depósitos de TTR, visualizados pela técnica de imunohistoquímica no sistema gastrointestinal, localizam-se na camada muscular e submucosa. Por sua vez, os depósitos de amiloide visualizados pela coloração vermelho do congo localizam-se preferencialmente na porção glandular do estomago. Nos pacientes humanos, a localização dos depósitos de amiloides é visualizada ao longo do trato gastrointestinal,

envolvendo, preferencialmente, estruturas nervosas, resultando nas severas manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes (Yoshimatsu et al., 1998).

Analisando individualmente a ação dos fármacos do modelo animal utilizado, os resultados obtidos sugerem que o fármaco A foi capaz de disromper as fibras amilóides maduras (vermelho do congo positivas). Estes resultados levam a crer que o fármaco atua seletivamente nas fibras amiloides maduras, provocando a sua disrupção. Estes resultados foram corroborantes com estudos anteriores utilizando outro modelo animal (Cardoso & Saraiva, 2006; Cardoso & Saraiva, 2010).

Relativamente ao fármaco B, encontra-se aprovado pela *US Food and Drug Administration* como terapia em doenças colestáticas hepáticas. No entanto vários estudos sugerem que as suas potentes ações anti-apoptóticas e antioxidantes reduzem a citotoxicidade em doenças neurodegenerativas (Chen, M. et al., 2000). Encontra-se descrito que este fármaco atua a vários níveis nos mecanismos apoptóticos e de *stress* oxidativo, associados a um estadio inicial da PAF. A utilização deste fármaco na PAF é eficaz na redução da citotoxicidade provocada pelos depósitos amiloides pré-fibrilares, diminuindo conseqüentemente a deposição extracelular dos mesmos. Sendo que, em estudos anteriores, o fármaco B mostrou ter capacidade de diminuir os depósitos pré-fibrilares de TTR em animais jovens com a mutação V30M (Macedo et al., 2008). Relativamente ao presente estudo, os resultados sugerem que o fármaco B foi capaz de remover agregados não fibrilares de TTR no sistema gastrointestinal (detetados pela técnica de imunohistoquímica), no entanto os resultados não foram extensíveis a todo o sistema gastrointestinal, uma vez que, apenas no colon foram obtidas diferenças estatisticamente significativas na marcação de resíduos de TTR. Tal como descrito anteriormente, a eficácia deste fármaco está demonstrada em animais jovens (Macedo et al., 2008). Desta forma, julgamos que a idade dos animais, para além da estirpe, pode explicar a atuação heterogénea do fármaco nos órgãos avaliados.

Os resultados obtidos relativamente à atuação do fármaco B podem igualmente ser explicados pela heterozigotia do gene *hsf-1* no modelo animal utilizado. A proteína Hsf1 atua como um mecanismo de defesa celular, na presença de depósitos amilóides extracelulares, a diminuição da proteína *hsf1* agrava e promove a deposição de TTR. Sabendo que estes animais transgênicos V30M/Hsf1 (heterozigóticos para o gene *hsf1*) apresentam deposição de agregados não-fibrilares em idade precoce (cerca de 1 mês de

idade) (Santos et al., 2010), pode sugerir que esta condição possa ter influenciado a formação de agregados amiloides, impedindo assim a ação uniforme dos fármacos.

A amiloidose leptomeningeal, considerada uma variante de patologias amiloides, é caracterizada pela deposição de amiloide nos vasos sanguíneos (intracorticais e extracorticais) e leptomeninges (Blevins et al., 2003). A amiloidose leptomeningeal está presente em cerca de 20% dos casos de doentes com amiloidose e manifesta um fenótipo agressivo com consequências vasculares cerebrais graves (Benson et al., 2007). O mecanismo molecular que leva à deposição de amiloide no sistema meníngeo-vascular não se encontra totalmente elucidado. Nos vasos sanguíneos a deposição de amiloide afeta pequenas e médias artérias, arteríolas, veias e capilares. Relativamente à sua localização, está delimitada na camada adventícia e na lâmina basal do sistema vascular cerebral (Sekijima, 2015).

Com o objetivo de determinar se o modelo animal estudado tinha deposição de TTR mutada (no sistema vascular cerebral e leptomeninges) foi necessário proceder à otimização de alguns procedimentos (anexos 1 e 2). Após a avaliação, pela técnica de imunohistoquímica e imunofluorescência, confirmou-se que no tecido cerebral, os animais V30M/Hsf1, como demonstra a figura 11, apresentam agregados de TTR, que se localizam predominantemente nos vasos periféricos extracorticais e leptomeninges. De forma a ser avaliada a localização, preferencial, dos depósitos de amiloide nos vasos sanguíneos cerebrais foi realizada a técnica de imunofluorescência, recorrendo à dupla marcação. Foram utilizados anticorpos específicos para a diferenciação de camadas dos vasos sanguíneos cerebrais: PECAM1 (deteta a camada endotelial), colagénio IV (constituente predominante da camada adventícia) e o anticorpo anti-TTR humana (figuras 12-14). Os resultados da dupla marcação TTR/PECAM1 indicam que a deposição de TTR não se localiza na camada endotelial (figura 13), uma vez que a marcação específica de TTR não co-localiza com a marcação da camada endotelial. Por sua vez, os resultados da dupla marcação de TTR/colagénio IV sugerem, após ser demonstrado pela co-localização de ambos os marcadores (figura 12), sugerem que a marcação de TTR localiza-se predominantemente da camada adventícia. Assim, no presente estudo foi observado que a deposição de TTR em animais transgênicos Hsf-1/V30M ocorre, tal como descrita em pacientes humanos, no sistema vascular cerebral e leptomeninges. Sugerindo a camada adventícia como local preferencial de deposição de agregados de TTR no sistema vascular cerebral.

De seguida procedeu-se à avaliação da eficácia do tratamento combinado no cérebro quanto à deposição de TTR, apesar dos resultados da semi-quantificação não demonstrarem diferenças significativas, é visível no gráfico apresentado (gráfico 2), que há uma tendência para a diminuição de deposição de agregados de TTR. Este dado sugere que o tratamento possa ter atuado na remoção de depósitos de TTR. Vários fatores podem ter influenciado os resultados obtidos, nomeadamente o número de controlos utilizados (n=2) face ao número de animais tratados (n=5); assim como a idade avançada dos animais, uma vez que em pacientes humanos a deposição de TTR no sistema vascular e leptomeninges associada a estadios avançados da doença PAF com a mutação V30M (Ando et al., 2013); a ausência de uma cópia do gene Hsf1, tal como referido anteriormente, pode ter influenciado a ação dos fármacos na disrupção dos depósitos de TTR nas leptomeninges e sistema vascular cerebral.

A técnica de *western blot* foi realizada com o objetivo de avaliar qualitativamente as diferenças de concentração de TTR no plasma. Analisando a figura 16 observam-se diferenças na quantidade de TTR plasmática de animais tratados e animais controlo. Com base nestes resultados foi realizada a técnica IRD para determinar a concentração de TTR no plasma, utilizando os mesmos animais que na técnica de *western blot*. Os resultados obtidos pela técnica IRD indicam que há uma concentração superior de TTR no plasma de animais tratados comparativamente a animais controlo (gráfico 3). Desta forma os resultados obtidos através das duas técnicas são corroborantes. Encontra-se descrito na literatura que a TTR, para além das funções anteriormente descritas, é conhecida como um biomarcador do *status* nutricional (Ingenbleek Y et al, 2002), sendo que, nos casos de má nutrição os níveis plasmáticos de TTR estão diminuídos, e consequentemente valores superiores de TTR no plasma indicam uma melhoria do *status* nutricional (Ingenbleek Y, 1994). Tendo em consideração que a concentração plasmática de TTR foi superior nos animais tratados, julgamos que este resultado seja devido à melhoria do estado nutricional destes animais após o tratamento, tal como acontece com outros tratamentos (Suhr et al, 2014).

Conclusão

A polineuropatia amiloidótica familiar é uma doença progressiva e fatal. O transplante hepático é reconhecido globalmente como sendo a terapia mais eficaz no tratamento da PAF. O transplante hepático cessa a síntese de TTR mutada nos hepatócitos retardando a progressão da doença. No entanto a TTR mutada continua a ser produzida no plexo coroide, não sendo uma terapia eficaz em todos os doentes.

Na última década, vários estudos foram realizados com o objetivo de desenvolver estratégias terapêuticas que inibam a produção de TTR no fígado, ou inibam a formação de agregados amiloides promovendo a sua degradação e a estabilização de tetrâmeros. O tafamidis é um estabilizador de tetrâmeros de TTR, aprovado em 2011, como possível estratégia terapêutica em pacientes com estadio 1 (segundo o estadiamento da PAF designado por Coutinho *et al*). Atualmente todos os pacientes em estadio assintomático ou inicial (estadio 0 ou estadio 1) são encaminhados para o transplante hepático e, em simultâneo, avaliados para possíveis estratégias terapêuticas.

Neste trabalho experimental foi avaliado a eficácia de um tratamento combinado na ação disruptora de fibras amiloides no sistema gastrointestinal e cérebro, em animais V30M/Hsf1. Os resultados obtidos no sistema gastrointestinal sugerem que o tratamento combinado foi eficaz na disrupção de fibras amilóides maduras e na remoção de agregados não fibrilares, tal como descrito anteriormente no presente laboratório.

Neste estudo foi, igualmente, avaliada a localização da deposição de TTR nas leptomeninges e sistema vascular cerebral, sendo uma área ainda pouco estudada. Através da otimização do protocolo de descalcificação do crânio, realizado neste estudo, foi possível a visualização da integridade das meninges. Sendo, desta forma, observada a deposição de agregados de TTR no sistema vascular cerebral e leptomeninges, dado que não tinha ainda sido observado até à data neste modelo animal. Quanto à eficácia do tratamento combinado no cérebro, os resultados sugerem que este tratamento possa ter alguma influência na diminuição da deposição de TTR no cérebro, uma vez que os animais tratados apresentam uma tendência para a diminuição da deposição de TTR no sistema vascular cerebral e leptomeninges.

Como perspectivas futuras é importante a replicação deste estudo, utilizando a mesma estirpe mas visando: o estudo individual de cada fármaco e administração em diferentes concentrações; a utilização de diferentes idades, para desta forma determinar

a idade em que os fármacos atuam sinergicamente na disrupção e remoção de depósitos amilóides; uma maior representatividade histológica do sistema gastrointestinal, para assim eventualmente, estudar sobre a ação dos fármacos em diferentes segmentos do trato gastrointestinal; a avaliação no decorrer do estudo: da concentração de TTR no plasma, índice de massa corporal e concentração de albumina sérica no sentido de determinar a evolução da melhoria do *status* nutricional.

Referências Bibliográficas

- Adams, D. (2013). Recent advances in the treatment of familial amyloid polyneuropathy. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 6(2), 129–39.
- Adams, D., Théaudin, M., Cauquil, C., Algalarrondo, V., & Slama, M. (2014). FAP Neuropathy and Emerging Treatments. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 14(3), 1–12.
- Ando, Y., Coelho, T., Berk, J. L., Cruz, M. W., Ericzon, B.-G., Ikeda, S., Salvi, F. (2013). Guideline of transthyretin-related hereditary amyloidosis for clinicians. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 8, 31.
- Andrade, C. (1952). A Peculiar form of peripheral neuropathy. *Brain*, 75(3), 408–427.
- Azevedo, E. P., Ledo, J. H., Barbosa, G., Sobrinho, M., Diniz, L., Fonseca, a C. C., Foguel, D. (2013). Activated microglia mediate synapse loss and short-term memory deficits in a mouse model of transthyretin-related oculoleptomeningeal amyloidosis. *Cell Death & Disease*, 4, e789.
- Barreiros, A. P., Geber, C., Birklein, F., Galle, P. R., & Otto, G. (2010). Clinical symptomatic de novo systemic transthyretin amyloidosis 9 years after domino liver transplantation. *Liver Transplantation*, 16(1), 109.
- Bellovino, D., Apreda M., Gragnoli S., Massimi M. & Gaetani S. (2003). Vitamin A transport : in vitro models for the study of RBP secretion. *Molecular Aspects of Medicine*, 24(6), 411–420.
- Benson, M. D., & Kincaid, J. C. (2007). The Molecular Biology and Clinical Features of Amyloid Neuropathy. *Muscle & Nerve*, 411–423.
- Benson, M. D., Kluve-Beckerman, B., Zeldenrust, S. R., Siesky, A. M., Bodenmiller, D. M., Showalter, A. D., & Sloop, K. W. (2006). Targeted suppression of an amyloidogenic transthyretin with antisense oligonucleotides. *Muscle & Nerve*, 33(5), 609–618.
- Benson, M. D., Smith, R. A., Hung, G., Kluve-Beckerman, B., Showalter, A. D., Sloop, K. W., & Monia, B. P. (2010). Suppression of choroid plexus transthyretin levels by antisense oligonucleotide treatment. *Amyloid*, 17(2), 43–49.
- Berni, R., Stoppini, M., Zapponi, M. C., Meloni, M. L., Monaco, H. L., & Zanott, G. (1990). The bovine plasma retinol-binding protein Amino acid sequence , interaction with transthyretin, crystallization and preliminary X-ray data. *European Journal of Biochemistry/FEBS*, 192 (2), 507-513.
- Blake, C. C. F., Geisow, M. J., Oatley, S. J., Rérat, B., & Rérat, C. (1978). 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., Rerat, C., & Rerat, 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., Rerat, C., Berthou, J., Laurent, A., & Rerat, B. (1971). An X-ray study of the subunit structure of prealbumin. *Journal of Molecular Biology*, 61(1), 217–224.

- Blevins, G., Macaulay, R., Harder, S., Fladeland, D., Yamashita, T., Yazaki, M., Donat, J. R. (2003). Oculoleptomeningeal amyloidosis in a large kindred with a new transthyretin variant Tyr69His. *Neurology*, *60*, 1625–1630.
- Brett, M., Persey, M. R., Reilly, M. M., Revesz, T., Booth, D. R., Booth, S. E., Pepys, M. B. and Morgan-Hughes J.A. (1999). Transthyretin Leu12Pro is associated with systemic, neuropathic and leptomeningeal amyloidosis. *Brain*, *122*, 183–190.
- Brizzee, K. R., Ordy, J. M., & Kaack, B. (1974). Early Appearance and Regional Differences in Intra-neuronal and Extra-neuronal Lipofuscin Accumulation with Age in the Brain of a Nonhuman Primate (*Macaca mulatta*). *Journal of Gerontology* , *29* (4), 366–381.
- Cardoso, I., Goldsbury, C. S., Müller, S. A., Olivieri, V., Wirtz, S., Damas, A. M., Aebi U. & Saraiva, M. J. (2002). Transthyretin fibrillogenesis entails the assembly of monomers: a molecular model for in vitro assembled transthyretin amyloid-like fibrils. *Journal of Molecular Biology*, *317*(5), 683–695.
- Cardoso, I., Martins, D., Ribeiro, T., Merlini, G., & Saraiva, M. J. (2010). Synergy of combined Doxycycline / TUDCA treatment in lowering Transthyretin deposition and associated biomarkers : studies in FAP mouse models. *Journal of Translational Medicine*, *8*:74
- Cardoso, I., Merlini, G., & Saraiva, M. J. (2003). 4'-iodo-4'-Deoxydoxorubicin and tetracyclines disrupt transthyretin amyloid fibrils in vitro producing noncytotoxic species: screening for TTR fibril disrupters. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *17*, 803–809.
- Cardoso, I., & Saraiva, M. J. (2006). Doxycycline disrupts transthyretin amyloid: evidence from studies in a FAP transgenic mice model. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *20*(2), 234–9.
- Chen, M., Ona, V. O., Li, M., Ferrante, R. J., Fink, K. B., Zhu, S., Bian, J., Guo, L., Farrell, L. A., Hersch, S. M., et al. (2000). Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. *Nature*, *399*, 263–267.
- Coelho, T., Maia, L. F., da Silva, A. M., Cruz, M. W., Planté-Bordeneuve, V., Suhr, O. B., ... Grogan, D. R. (2013). Long-term effects of tafamidis for the treatment of transthyretin familial amyloid polyneuropathy. *Journal of Neurology*, *260*(11), 2802–14.
- Coelho, T., Maia, L. F., Waddington, M., Kelly, J. W., Chan, J., & Grogan D. R. (2012). Tafamidis for transthyretin familial amyloid polyneuropathy. *Neurology*, *79* (8) 785–792.
- Coons, A. H., Creech, H. J., & Jones, R. N. (1941). Immunological Properties of an Antibody Containing a Fluorescent Group. *Experimental Biology and Medicine* , *47* (2), 200–202.
- Davis, P. J., Spaulding, S. W., & Gregerman, R. I. (1970). The Three Thyroxine-Binding Proteins in Rat Serum: Binding Capacities and Effects of Binding Inhibitors. *Endocrinology*, *87*(5), 978–986.
- Dickson, P. W., Aldred, A. R., Marley, P. D., Tu, G. F., Howlett, G. J., & Schreiber, G. (1985). High prealbumin and transferrin mRNA levels in the choroid plexus of rat brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *127*(3), 890—895.

- Dickson, P. W., Howlett, G. J., & Schreiber, G. (1982). Metabolism of Prealbumin in Rats and Changes Induced by Acute Inflammation. *European Journal of Biochemistry*, 129(2), 289–293.
- Dickson, P. W., & Schreiber, G. (1986). High levels of messenger RNA for transthyretin (prealbumin) in human choroid plexus. *Neuroscience Letters*, 66(3), 311–315.
- Doyle, D. (1978). The Fine Structure of the Nervous System: The Neurons and Supporting Cells. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 41(2), 191–192.
- Ellie, E., Camou, F., Vital, A., Rummens, C., Grateau, G., Delpech, M., & Valleix, S. (2001). Recurrent subarachnoid hemorrhage associated with a new transthyretin variant (Gly53Glu). *Neurology*, 57(1), 135–137.
- Ericzon, B.G., Wilczek, H. E., Larsson, M., Wijayatunga, P., Stangou, A., Pena, J. R., & Suhr, O. (2015). Liver Transplantation for Hereditary Transthyretin Amyloidosis: After 20 Years Still the Best Therapeutic Alternative? *Transplantation*, 99(9), 1847–1854.
- Episkopou V., Maeda S., Nishiguchi S., Shimada K., Gaitanaris G. A., Gottesman M. 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 Science*, 90, 2375–2379.
- Gertz, M. a. (2004). The Classification and Typing of Amyloid Deposits. *American Journal of Clinical Pathology*, 121(6), 787–789.
- Goodman, D. S. (1984). Vitamin A and Retinoids in Health and Disease. *New England Journal of Medicine*, 310(16), 1023–1031.
- Gregory et al. (2012). Whole animal perfusion fixation for rodents. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (65), 1–9.
- Hanna, M. (2014). Novel drugs targeting transthyretin amyloidosis. *Current Heart Failure Reports*, 11(1), 50–7.
- Hellman, U., Alarcon, F., Lundgren, H. E., Suhr, O., Bonaïti-Pellié, C., & Planté-Bordeneuve, V. (2008). Heterogeneity of penetrance in familial amyloid polyneuropathy, ATTR Val30Met, in the Swedish population. *Amyloid*, 15(3), 181–186.
- Herbert, J., Wilcox, J. N., Pham, K.-T. C., Fremeau, R. T., Zeviani, M., Dwork, A., & Schon, E. A. (1986). Transthyretin: A choroid plexus specific transport protein in human brain: The 1986 S. Weir Mitchell Award. *Neurology*, 36(7), 900.
- Herrick, M. K., DeBruyne, K., Horoupian, D. S., Skare, J., Vanefsky, M. A., & Ong, T. (1996). Massive leptomeningeal amyloidosis associated with a Val30Met transthyretin gene. *Neurology*, 47(4), 988–992.
- Hiroyuki, S., Naoko, Y., Yasuyuki, T., & Yoshiyuki, S. (1985). Structure of the chromosomal gene for human serum prealbumin. *Gene*, 37(1–3), 191–197.
- Holmgren, G., Steen, L., Ekstedt, J., Groth, C.-G., Ericzon, B.-G., Eriksson, S., & Pepys, M. (1991). Biochemical effect of liver transplantation in two Swedish patients with familial amyloidotic polyneuropathy (FAP-met30). *Clinical Genetics*, 40(3), 242–246.

- Ingenbleek Y. & Young V. (1994). Transthyretin in health and disease: nutritional implications. *Annual Review of Nutrition*, 14, 495–533.
- Ingenbleek, Y. & Young, V. R. (2002). Significance of transthyretin in protein metabolism. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 40(12), 1281–1291.
- Jin, K., Sato, S., Takahashi, T., Nakazaki, H., Date, Y., Nakazato, M., & Ikeda, S. (2004). Familial leptomeningeal amyloidosis with a transthyretin variant Asp18Gly representing repeated subarachnoid haemorrhages with superficial siderosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 75(10), 1463–6.
- Kanda Y., Goodman D. S., Canfield R. E. & Morgan F. J. (1974). The Amino Acid Sequence of Human Plasma Prealbumin. *The Journal of Biological Chemistry*, 249(21), 6796–6806.
- Köhrle, J. (1994). Thyroid hormone deiodination in target tissues--a regulatory role for the trace element selenium? *Experimental and Clinical Endocrinology*, 102(2), 63–89.
- Kurosawa, T., Igarashi, S., Nishizawa, M., & Onodera, O. (2005). Selective silencing of a mutant transthyretin allele by small interfering RNAs. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 337(3), 1012–1018.
- Larsson, M., Pettersson, T., & Carlström, A. (1985). Thyroid hormone binding in serum of 15 vertebrate species: Isolation of thyroxine-binding globulin and prealbumin analogs. *General and Comparative Endocrinology*, 58(3), 360–375.
- Macedo, B., Batista, A. R., Ferreira, N., Almeida, M. R., & Saraiva, M. J. (2008). Anti-apoptotic treatment reduces transthyretin deposition in a transgenic mouse model of Familial Amyloidotic Polyneuropathy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1782(9), 517–22.
- Maia, L. F., Mackenzie, I. R. A., & Feldman, H. H. (2015). Clinical phenotypes of Cerebral Amyloid Angiopathy. *Journal of the Neurological Sciences*, 257(1), 23–30.
- Mancini, G., Carbonara A.O., Heremans J.F. (1965). Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry*, 2, 235-254.
- Martone, R. L., Herbert, J., Dwork A. & Schon, E. A. (1988). Transthyretin is synthesized in the mammalian eye. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 151(2), 905–912.
- McColgan, P., Viegas, S., Gandhi, S., Bull, K., Tudor, R., Sheikh, F., & Reilly, M. M. (2015). Oculoleptomeningeal Amyloidosis associated with transthyretin Leu12Pro in an African patient. *Journal of Neurology*, 262(1), 228–34.
- Merlini, G., Planté-Bordeneuve, V., Judge, D. P., Schmidt, H., Obici, L., Perlini, S. & Grogan, D. R. (2013). Effects of tafamidis on transthyretin stabilization and clinical outcomes in patients with non-Val30Met transthyretin amyloidosis. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, 6(6), 1011–20.
- Mitsuhashi, S., Yazaki, M., Tokuda, T., Sekijima, Y., Washimi, Y., Shimizu, Y. & Ikeda, S.-I. (2005). Biochemical characteristics of variant transthyretins causing hereditary leptomeningeal amyloidosis. *Amyloid*, 12(4), 216–225.

- Miziara, I. D., Magalhães A. T., Santos M. D. Gomes E. F. & Oliveira, R. A. (2012). Research ethics in animal models. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, 78(2), 128-131.
- Muzioł, T., Cody, V., Luft, J. R., Pangborn, W., & Wojtczak, A. (2001). Complex of rat transthyretin with tetraiodothyroacetic acid refined at 2.1 and 1.8 Å resolution. *Acta Biochimica Polonica*, 48(4), 877–884.
- Palha, J. A., Hays, M. T., Morreale de Escobar, G., Episkopou, V., Gottesman, M. E., & Saraiva, M. J. (1997). Transthyretin is not essential for thyroxine to reach the brain and other tissues in transthyretin-null mice. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 272(3), E485–E493.
- Peterson, P. A. (1971). Studies Protein on the Interaction Between Prealbumin, Retinol-binding Protein, and Vitamin A. *The Journal of Biological Chemistry*, 246, 44–49.
- Puchtler H. & Sweat F. (1965). Congo Red as a stain for fluorescence microscopy of amyloid. *J Histochem Cytochem*, 13 (8), 693–4.
- Quintas, A., Vaz D. C., Cardoso, I., Saraiva, M. J., & Brito, R. M. (2001). Tetramer dissociation and monomer partial unfolding precedes protofibril formation in amyloidogenic transthyretin variants. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(29), 27207–27213.
- Richardson, S. J. (2015). Tweaking the Structure to Radically Change the Function: The Evolution of Transthyretin from 5-Hydroxyisourate Hydrolase to Triiodothyronine Distributor to Thyroxine Distributor. *Frontiers in Endocrinology*, 5:245, 1–9.
- Richardson, S. J., Wijayagunaratne, R. C., D'Souza, D. G., Darras, V. M., & Van Herck, S. L. J. (2015). Transport of thyroid hormones via the choroid plexus into the brain: the roles of transthyretin and thyroid hormone transmembrane transporters. *Frontiers in Neuroscience*, 9:66.
- Riga, D. A., Riga, S., Halalau, F., & Schneider, F. (2006). Brain Lipopigment Accumulation in Normal and Pathological Aging. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1067(1), 158–163.
- Santos, S. D., Fernandes, R., & Saraiva, M. J. (2010). The heat shock response modulates transthyretin deposition in the peripheral and autonomic nervous systems. *Neurobiology of Aging*, 31(2), 280–9.
- Saraiva, M. J., Costa, P. P., & Goodman, D. S. (1985). Biochemical marker in familial amyloidotic polyneuropathy, Portuguese type. Family studies on the transthyretin (prealbumin)-methionine-30 variant. *The Journal of Clinical Investigation*, 76 (6), 2171–2177.
- Saraiva, M. J. M. (2001). Transthyretin mutations in hyperthyroxinemia and amyloid diseases. *Human Mutation*, 17(6), 493–503.
- Schnell, S. A., Staines, W. A., & Wessendorf, M. W. (1999). Reduction of Lipofuscin-like Autofluorescence in Fluorescently Labeled Tissue. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 47 (6), 719–730.

- Schreiber, G., & Richardson, S. J. (1997). The Evolution of Gene Expression, Structure and Function of Transthyretin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 116(2), 137–160.
- Schreiber, G., Richardson, S. J., & 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(1), 21–30.
- Seibert, F.B. e Nelson, J. W. (1942). Electrophoretic study of the blood protein response in tuberculosis. *Journal of Biological Chemistry*, 143, 29–38.
- Sekijima, Y. (2015). Transthyretin (ATTR) amyloidosis: clinical spectrum, molecular pathogenesis and disease-modifying treatments. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 86 (9), 1036-1043.
- Shimizu, Y., Takeuchi, M., Matsumura, M., Tokuda, T., & Iwata, M. (2006). A case of biopsy-proven leptomeningeal amyloidosis and intravenous Ig-responsive polyneuropathy associated with the Ala25Thr transthyretin gene mutation. *Amyloid*, 13(1), 37–41.
- Soares, M. L., Coelho, T., Sousa, A., Holmgren, G., Saraiva, M. J., Kastner, D. L., & Buxbaum, J. N. (2004). Haplotypes and DNA sequence variation within and surrounding the transthyretin gene: genotype-phenotype correlations in familial amyloid polyneuropathy (V30M) in Portugal and Sweden. *European Journal of Human Genetics : EJHG*, 12(3), 225–37.
- Soprano, D. R., Soprano, K. J., Wyattn, M. L., & Goodman, D. S. (1988). Induction of the expression of retinol-binding protein and transthyretin in F9 embryonal carcinoma cells differentiated to embryoid bodies. *The Journal of Biological Chemistry*, 263 (34), 17897-17900.
- Soprano, D. R., Soprano, K. J., & Goodman, D. S. (1986). Retinol-binding protein and transthyretin mRNA levels in visceral yolk sac and liver during fetal development in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(19), 7330–7334.
- Soto C. (2003). Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nature reviews. Neuroscience*, 4(1), 49–60.
- Soto, C., & Estrada L. D. (2008). Protein misfolding and neurodegeneration. *Archives of Neurology*, 65(2), 184–189.
- Sousa, M. M. & Saraiva M. J. (2003). Neurodegeneration in familial amyloid polyneuropathy : from pathology to molecular signaling. *Elsevier - Progress in Neurobiology*, 71 (5), 385–400.
- Sousa, M. M., Fernandes, R., Palha, J. A., Taboada, A., Vieira, P., & Saraiva, M. J. (2002). Evidence for Early Cytotoxic Aggregates in transgenic mice for human transthyretin Leu55Pro. *The American Journal of Pathology*, 161(5), 1935–1948.
- Suhr, O. B., Conceição I. M., Karayal O. N., Mandel F. S., Huertas P. E. & Ericzon B. G. (2014). Post Hoc Analysis of Nutritional Status in Patients with Transthyretin Familial Amyloid Polyneuropathy: Impact of Tafamidis. *Neurology and Therapy*, 3(2), 101-112.

- Stabilini, R., Vergani, C., Agostoni, A., & Agostoni, R. P. V. (1968). Influence of age and sex on prealbumin levels. *Clinica Chimica Acta*, 20(2), 358–359.
- Terman, A., & Brunk, U. L. (1998). Lipofuscin: Mechanisms of formation and increase with age. *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, 106(2), 265–276.
- Tsuzuki, T., Mitas, S., Maeda, S., Arakis, S. & Shimada, K. (1985). Structure of the Human Prealbumin Gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 260(22), 12224–12227.
- Ueda, M. & Ando, Y. (2014). Recent advances in transthyretin amyloidosis therapy. *Translational Neurodegeneration*, 3(1), 19.
- Uemichi, T., Uitti R. J., Koeppen A. H., Donat J. R. & Benson M. D. (1999). Oculoleptomeningeal amyloidosis associated with a new transthyretin variant ser64. *Archives of Neurology*, 56(9), 1152–1155.
- Wallace, M. R., Naylor, S. L., Kluge-Beckerman, B., Long, G. L., McDonald, L., Shows, T. B., & Benson, M. D. (1985). Localization of the human prealbumin gene to chromosome 18. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 129(3), 753–758.
- Ward, J. E., Ren, R., Toraldo, G., Soohoo, P., Guan, J., Hara, C. O. & Seldin, D. C. (2011). Doxycycline reduces fibril formation in a transgenic mouse model of AL amyloidosis. *Blood*, 118(25), 6610–6617.
- Weisner, B., & Roethig, H. J. (1983). The Concentration of Prealbumin in Cerebrospinal Fluid (CSF), Indicator of CSF Circulation Disorders. *European Neurology*, 22(2), 96–105.
- Wilczek, H. E., Larsson, M., & Ericzon, B.-G. (2011). Long-term data from the Familial Amyloidotic Polyneuropathy World Transplant Registry (FAPWTR). *Amyloid*, 18(1), 193–195.
- Woeber, K. A., & Ingbar, S. H. (1968). The Contribution of Thyroxine-Binding Prealbumin to the Binding of Thyroxine in Human Serum, as Assessed by Immunoabsorption. *The Journal of Clinical Investigation*, 47(7), 1710-1721.
- Wojtczak, A., Neumann, P., & Cody, V. (2001). Structure of a new polymorphic monoclinic form of human transthyretin at 3 Å resolution reveals a mixed complex between unliganded and T4-bound tetramers of TTR. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 57(7), 957-967.
- Yi, S., Takahashi, K., Maeda, S., Shimada, K., & Yamamura, K. (1991). Systemic amyloidosis in transgenic mice carrying the human mutant transthyretin (Met30) gene. Pathologic similarity to human familial amyloidotic polyneuropathy, type I. *The American Journal of Pathology*, 138(2), 403–412.
- Yoshimatsu, S., Ando, Y., Terazaki, H., Sakashita, N., Tada, S., Yamashita, T. & Ando, M. (1998). Endoscopic and pathological manifestations of the gastrointestinal tract in familial amyloidotic polyneuropathy type I (Met30). *Journal of Internal Medicine*, 243(1), 65–72.

Anexos

Anexo 1

Otimização do protocolo de descalcificação no crânio

Durante o trabalho experimental foi realizada a otimização de um novo método de processamento do cérebro, com o objetivo de preservar a integridade das leptomeninges em cortes histológicos para posterior análise. Desta forma, foi determinante proceder à descalcificação do crânio, impedindo que as meninges se destaquem e/ou desagreguem do cérebro aquando a remoção do crânio. Assim a primeira etapa iniciou-se pela determinação de um agente descalcificador que melhor preservasse a morfologia celular e arquitetura tecidual. Com base na literatura, o agente descalcificador quelante escolhido para este trabalho foi o ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) com pH 7.3. Foram testadas 2 soluções A e B com concentrações diferentes de EDTA 0.5 M e 0.25 M, respetivamente. A solução A foi composta por 0.5 M de EDTA (pH 7,4) e 7% sucrose. A solução B foi composta por 0.25M de EDTA (pH 7,3) e 10% de glicerol. As amostras que foram descalcificadas 7 dias com solução A; 24 dias com a solução B. Semanalmente as amostras foram avaliadas quanto ao ponto de descalcificação, recorrendo a testes físicos (com bisturi). Após a avaliação histológica concluiu-se que os tecidos que foram sujeitos à descalcificação com a solução descalcificadora B, apresentavam a morfologia celular e arquitetura tecidual preservada, assim como, a preservação da integridade das leptomeninges (figura 17B).

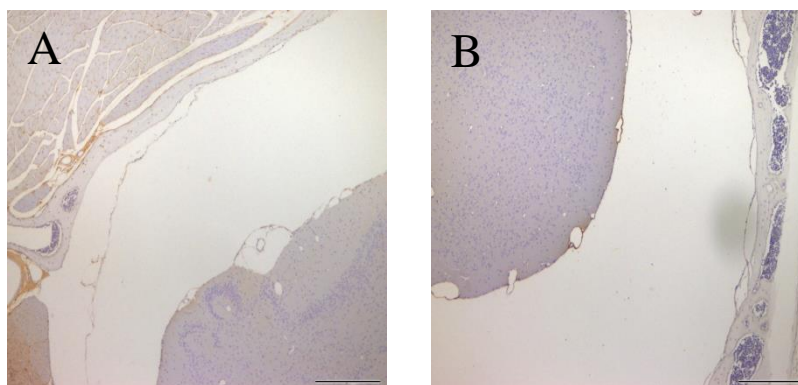


Figura 17. Imagens histológicas de crânio e tecido neuronal, representativas da imunohistoquímica utilizando o anticorpo anti-TTR humana. **A.** Imagem representativa da utilização da solução descalcificadora A. **B.** Imagem representativa da utilização da solução descalcificadora B. Barra de escala 1000 μ m.

Anexo 2

Otimização do protocolo de imunofluorescência em tecidos neuronais

Procedeu-se igualmente à otimização do protocolo utilizado na técnica de imunofluorescência, com o objetivo de minimizar a autofluorescência do tecido neural.

A autofluorescência deste tecido pode ser induzida através de artefactos de fixação com agentes fixadores aldeídos (como a formalina) e/ou causas endógenas, como exemplo do pigmento fluorescente das lipofuscinas (que se acumula no citoplasma das células envelhecidas). O agente fixador mais comumente utilizado em tecidos é o formaldeído. Os aldeídos têm a capacidade de formar pontes de ligações covalentes entre proteínas. Como forma de inibir as consequências dos agentes fixadores aldeídos, utilizados na perfusão dos animais e na posterior fixação dos órgãos *postmortem*, foi testado uma solução de bloqueio de reações inespecíficas 10% FBS+ 1% tween 20 + 0,3M de glicina em TBS, 1 hora à temperatura ambiente. Este método não se mostrou reduzir a autofluorescência do tecido neural como é demonstrado na figura 18. Seguidamente procedeu-se ao bloqueio da autofluorescência, como sendo, provocada pelas lipofuscinas (Brizzee, Ordy, & Kaack, 1974). As lipofuscinas são pigmentos fluorescentes que se acumulam em células envelhecidas (Terman & Brunk, 1998), sendo mais frequentes em neurónios e cardiomiócitos (Doyle, 1978). Na visualização ao microscópio de fluorescência, os grânulos de lipofuscinas localizam-se geralmente na área perinuclear (Riga, Riga, Halalau, & Schneider, 2006) (figura 18), apresentando uma coloração amarela forte, com forma ponteadada intracelular e com um ramo espectral emissão entre os 400nm e 650nm. De forma a minimizar a autofluorescência das lipofuscinas em secções de tecido neuronal, foi utilizado o corante negro sudão B (Schnell, Staines, & Wessendorf, 1999). Como demonstram as figuras 12 e 13 a autofluorescência diminuiu drasticamente.

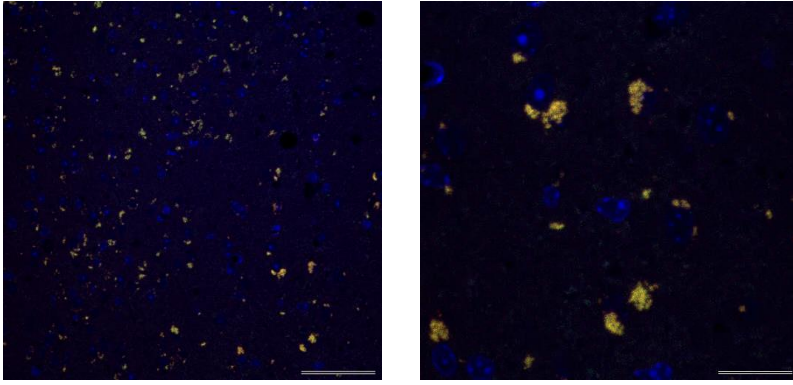


Figura 18. Imagens histológicas de tecido neuronal, representativas da técnica de imunofluorescência. Barra de escala 100 e 10 μ m.