

ARTÍCULO ORIGINAL

Western blot parcialmente desnaturizante de Transtirretina en plasmas de portadores de la mutación V30M

Cardini, Juan¹; Sáez, María Soledad¹; Llanos, Macarena¹; Sorroche, Patricia Beatriz¹; Lorenzón, María Victoria¹; Wilda, Maximiliano²; Grigera, Pablo Rafael².

¹ Instituto Universitario y Laboratorio Central (IUHI, LCHI), Hospital Italiano, Buenos Aires, Argentina.

² CEVAN/ ICT Milstein-CONICET, Buenos Aires, Argentina.

Dirección de correspondencia: prgrigera@conicet.gov.ar

Resumen

La transtirretina humana (TTR) es una proteína homotetramérica esencial para el transporte de tiroxina y retinol en individuos sanos. Mutaciones puntuales, particularmente sustituciones de valina por metionina en posición 30 (V30M), desestabilizan los complejos de TTR y dan lugar a la liberación de monómeros (14 Kd, TTRm), responsables de la creación de depósitos amiloideos en el intersticio de tejidos cardiacos y cerebrales. El análisis en Western inmunoblot de plasmas humanos desnaturizados por alta temperatura (95 C°, 10 minutos) en presencia del detergente iónico dodecyl sulfato de sodio (SDS) y utilizando anticuerpos monoclonales (Mabs) contra la molécula total o suero policlonal p71/98 dirigido contra la secuencia de aminoácidos 71 a 98 de TTR, detectan la presencia de TTRm, tanto en individuos positivos (portadores) como negativos para la mutación V30M. El suero policlonal p71/98 también identifica un polipéptido de 55-60 KD (TTRt) que corresponde a tetrámeros de TTR resistentes al tratamiento combinado de SDS y alta temperatura. El procesamiento de las muestras en presencia de SDS, pero a temperatura ambiente, (desnaturización parcial) produce un notable incremento de TTRt y desaparición paralela de la banda correspondiente a TTRm en plasmas de individuos normales, pero no en plasma de portadores V30M-positivos, en los que TTRm continúa siendo claramente detectable. Los resultados sugieren que una simple modificación en el procesamiento de las muestras plasmáticas puede convertir al Western inmunoblot en una herramienta de utilidad para el screening de plasmas de portadores de ésta y otras mutaciones desestabilizantes de la estructura multimérica de TTR en el laboratorio clínico.

Palabras clave: amiloidea, transtirretina, Western inmunoblot, plasma humano, tetrámeros.

Abstract

Human transthyretin (TTR) is a homotetrameric protein essential for the transport of thyroxine and retinol in plasma of healthy individuals. Point mutations, mainly a substitution of valine to methionine at position 30 (V30M), result in disruption of TTR complexes and release of TTR monomers responsible for building amyloid deposits in the interstice of heart and brain tissues. Denaturing immunoblot analysis of plasma samples, with either monoclonal antibodies (MABs) raised against the whole TTR molecule or with monospecific serum directed to the C-terminal track containing amino acid residues 71 to 98 (p71/98), readily identified the 14 Kd monomeric form of TTR in both V30M mutant-carrier and in non-carrier individuals. P71/98 also identified a 55-60 Kd polypeptide (TTRt) corresponding to a fraction of TTR tetramers that either escape disruption by the combined use of SDS and heat treatment and/or refolded during the first stages of PAGE/SDS running. A milder treatment avoiding the heating of plasma samples prior to immunoblot resulted in a notable increase in TTRt and disappearance of monomeric TTR in samples from V30M-negative individuals but not in those from V30M-positive carriers where free TTR monomers are systematically detected by p71/98 serum. Our results suggest that minimizing the TTR complex disruption before PAGE-SDS/ immunoblot analysis could be simple strategy to sort plasmas from V30M-positive and V30M-negative individuals in the clinical laboratory.

Keywords: amyloid, transthyretin, Western immunoblot, human plasma, tetramers

Introducción

La polineuropatía amiloidótica familiar (FAP) es una enfermedad autosómica dominante caracterizada por el depósito de material fibrilar formado por moléculas de TTR (TTR, 14 Kd, transportador plasmático de tiroxina y retinol), que se acumulan en el espacio intersticial de nervios periféricos y tejido muscular cardíaco. Mutaciones de sustitución en la secuencia de TTR interfieren con su capacidad para asociarse en tetrámeros estables, dando por resultado un exceso relativo de monómeros libres, disponibles para la formación de depósitos amiloideos y el subsiguiente daño tisular [2,3,4]. La más común, entre cientos de mutaciones puntuales ya descritas, es la que codifica para la sustitución Val30Met en el extremo N terminal de la secuencia TTR [5,6].

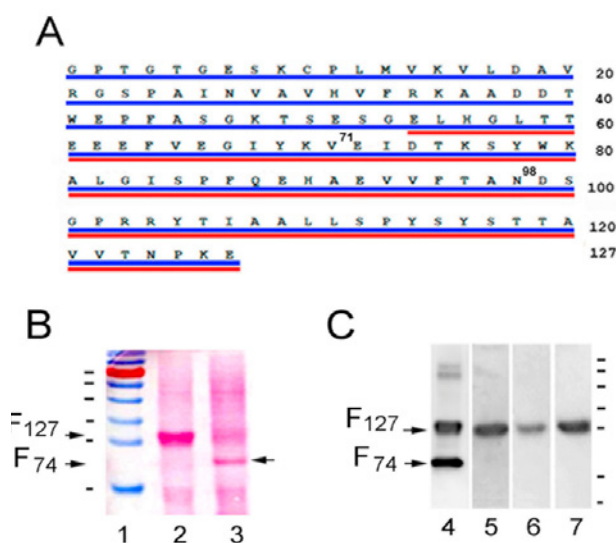
Entre las principales contribuciones del laboratorio clínico al diagnóstico de la enfermedad amiloidótica se destacan la inmunohistoquímica (IHC) y la espectroscopía de masas (MS), en la identificación de TTR en biopsias; así como también la secuenciación del ADN genómico en sangre periférica para detectar posibles portadores mutantes [7,8,9,10,11]. El Western blot desnaturizante (SDS-PAGE seguido de inmunoblot) [12] también ha demostrado ser una herramienta analítica útil para detectar e identificar la TTR monomérica en plasma y material amiloideo [13,14]. Sin embargo, esta técnica es inadecuada para diferenciar moléculas de TTR mutantes de las formas no mutadas, ya que en general no muestran diferencias en su comportamiento migratorio ni inmunológico. Por lo tanto, se describe aquí una modificación simple en el protocolo de Western blot, con potencial para identificar plasmas de portadores de la mutación V30M y eventualmente otras también desestabilizantes de la estructura multimérica de TTR.

Materiales y métodos

Muestras de plasma: se obtuvieron plasmas de pacientes positivos o negativos para la mutación V30M según la secuenciación del genoma del exón 2 del gen de la TTR en el Laboratorio Central del Hospital Italiano de la Ciudad de Buenos Aires, a partir de muestras de sangre entera con EDTA, y se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

-Análisis en SDS-PAGE e inmunotransferencia: el procedimiento general para el análisis SDS-PAGE e inmunoblots en un formato mini Bio-Rad se describió anteriormente [15]. En un experimento típico, 10 µl de plasma de portadores V30M e individuos control (negativos para la mutación V30M) se mezclaron independientemente con 10 µl de buffer muestra 2X Laemmli (Tris 0,05 M pH: 6,5, SDS 6%, mercaptoetanol al 10%) seguido de la adición de 80 µl de 1X del mismo tampón. La mezcla de 100 µl se dividió luego en dos alícuotas idénticas que se calentaron a 95°C durante 10-15 minutos (muestra desnaturizada, D) o se dejaron a temperatura ambiente (parcialmente desnaturizadas, PD) hasta la carga del gel. Aproximadamente 20-25 µl de la muestra total (equivalente a 2-3 µl de la muestra de plasma

Figura 1.



- A) Secuencia completa de TTR (ácidos 1 a 127) expresada en células BL21DE3. Se destacan en azul y rojo las secuencias de aminoácidos correspondientes a las proteínas recombinantes F127 y F74, respectivamente. B) Perfil de tinción con Ponceau Red de proteínas recombinantes, F127 y F74 que expresan la secuencia completa y 71 aminoácidos C terminales de TTR (calles 2 y 3, respectivamente) y transferidos a nitrocelulosa después del análisis en 12% PAGE-SDS y antes de la incubación con anticuerpos apropiados. Las bandas de marcador en la calle 1 corresponden a pesos moleculares de 17, 25, 35, 40, 55, 70, 100 y 130 Kd, respectivamente. C) Reactividad de F127 y F74 con anticuerpos comerciales. Se mezclaron alícuotas equivalentes de lisados de bacterias que expresan independientemente F127 y F74, se procesaron en PAGE / SDS, se transfirieron y se analizaron contra el suero p71 / 98 (calle 4) y los anticuerpos monoclonales MAbs #A, #B y #C (ver Mat y Métodos, en calles 5, 6 y 7, respectivamente).

inicial) se cargaron en mini PAGE-SDS 12% y se transfirieron a nitrocelulosa (80mA / 17 V, 12 hs), que se bloqueó con BSA al 3% PBS seguido de incubación con anticuerpos primarios conjugados correspondientes, y desarrollo de señal con quimioluminiscencia (Pierce-ECL) y registro de datos con GBox (Syngene-Sinoptics). Se usaron eventualmente peines de gel más anchos (12 mm en lugar de los 5 mm normales) para permitir la carga de mayores volúmenes de muestras de plasma (ver Figura 3A).

- Clonación y expresión en bacterias BL21-DE3: los fragmentos de ADN que codifican para la secuencia de la TTR completa de 127 aminoácidos o aminoácidos terminales 74-C, se amplificaron mediante la técnica de la cadena de la polimerasa (PCR, polymerase chain reaction) usando un ADN sintético (IDT) que contiene la secuencia de codificación TTR [16] como templado. Los fragmentos amplificados se clonaron en sitios Bam HI-Hind III del vector pET30a (Novagen-RifeSciences) y se expresaron como proteínas recombinantes F127 y F74 en bacterias BL21-DE3 tras la inducción con IPTG.

- Anticuerpos: cuatro anticuerpos comerciales dirigidos contra la TTR humana, un anticuerpo policlonal de conejo y 3 MAb de ratón, se ensayaron frente a fragmentos recombinantes F127 y F74 en Western inmunoblot. Los anticuerpos monoclonales se codificaron con letras en el texto como: #A: MAb 7505 RyD, #B: clon MAb 10E1, Santa Cruz y #C: Universidad Estatal de Iowa-MAb CPTC-TTR-1. Los tres MAb se generaron contra la molécula de TTR completa utilizada como inmunógeno de acuerdo con sus respectivos proveedores. El conejo policlonal p71 / 98 (PAS 35315, Thermo) se generó contra un péptido sintético que contiene los residuos de ácidos 71 a 98 de la mitad C-terminal de TTR.

Resultados y discusión

Reactividad de anticuerpos comerciales frente a TTR recombinante

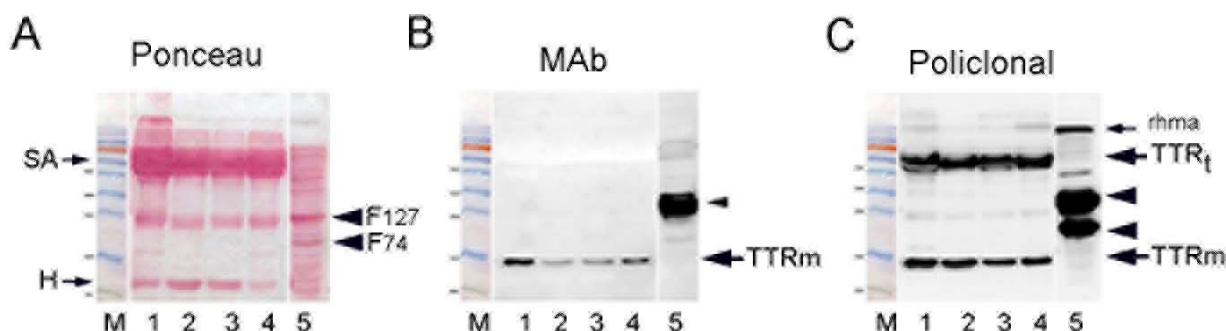
La Figura 1A representa 74 residuos de aminoácidos del C-terminal y la secuencia completa de TTR (127 aminoácidos) en azul y rojo, respectivamente. Ambas secuencias se expresaron en los polipéptidos recombinantes F74 y F127, respectivamente. Las respectivas secuencias de ADN se clonaron en el plásmido de expresión pET30a bajo el promotor T7 y se expresaron en bacterias BL21DE3 tras la inducción con IPTG (véase Materiales y Métodos). La tinción de Ponceau en la Figura 1B muestra el perfil de ambos recombinantes después de corrida por separado en PAGE/SDS y transferencia a membrana de nitrocelulosa (F127 y F74, calles 2 y 3, respectivamente). La Figura 1C muestra el perfil inmunorreactivo del par recombinante F127 y F74

ante 4 anticuerpos específicos anti TTR. El anticuerpo de conejo mono específico P71/98 producido contra un péptido sintético que contiene los restos de aminoácidos 71 a 98 de la secuencia de TTR, reaccionó con ambos recombinantes F127 y F74 (calle 4). Cada uno de los otros tres MAb alternativos, generados contra TTR entera, mostraron reactividad con F127, pero no con F74, sugiriendo que su sitio de unión mapea en los primeros 53 aminoácidos N-terminales de TTR. Los resultados demuestran que el suero p71/98 es el anticuerpo de elección para la identificación de fragmentos C terminales de TTR (8).

Western blot de muestras de plasma post desnaturalización completa o parcial

Se probó la reactividad del suero p71/98 y una mezcla de los tres MAb anti TTR (MAb) contra 4 muestras de plasma de individuos V30M-negativos, obtenidos en el LCHI. La Figura 2A muestra el perfil del polipéptidos totales teñido con rojo Ponceau correspondientes a las alícuotas de cuatro plasmas independientes desnaturalizados (D) por calentamiento en buffer de Laemmli (95-98°C 10 min), separadas en SDS-PAGE al 12% y transferidas a nitrocelulosa. Se detectan una banda mayoritaria entre los marcadores de 55 y 70 Kd correspondiente a seroalbúmina (SA) y una banda menor que corre más rápido que el marcador de 17 Kd e identificada como subunidad de hemoglobina (H). Las Figuras 2B y 2C muestran el perfil de quimioluminiscencia después de incubaciones secuenciales con la mezcla MAb y con suero p71 / 98, respectivamente. Como se esperaba la mezcla de MAb detectó una sola banda ligeramente más rápida que el marcador de 17 Kd e identificada como el

Figura 2.



- A) Perfil de tinción de Ponceau Red de muestras plasmáticas. Cuatro muestras de plasma de individuos V30M negativos se desnaturalizaron con calor [95-100 C°, 10 minutos] en buffer reductor de Laemmli, se analizaron en un mini gel SDS PAGE al 12%, se transfirieron a nitrocelulosa y se tiñeron (ver Mat y Métodos). La seroalbúmina (SA, 65 Kd) y la cadena de hemoglobina (H, 12 Kd) son componentes principales (calles 1 a 4). En la calle 5, una mezcla de lisados desnaturalizados de bacterias BL21-DE3 que expresan F127 y F74 después de la inducción con IPTG. Las puntas de flecha apuntan a los dos fragmentos expresados teñidos con reactivo Ponceau Red. B) Inmunorreactividad con MAb anti TTR. Perfil de quimioluminiscencia obtenido después de la incubación de la membrana mostrada en A, con una mezcla equivalente de los tres MAb anti-TTR #A #B, y #C (1: 200 cada uno, ver Mat y Métodos). TTRm: TTR monomérica y punta de flecha para el F127 detectado por la mezcla de MAb en la calle 5. C) Inmunorreactividad contra suero de conejo p71 / 98. Perfil quimio luminiscente obtenido después de una segunda incubación seguida a la descrita en el punto B, con anticuerpo policlonal de conejo dirigido a la secuencia aminoacídica 71-98 en el C-terminal de TTR (ver Materiales y Métodos). Las puntas de flecha apuntan a F127 y F74, ambas reaccionan con pol 71/98. TTRt y TTRm son las formas tetraméricas y monoméricas de TTR, respectivamente.

monómero plasmático de TTR de 14 Kd [Fig. 2B, TTRm en las calles 1 a 4]. En la calle 5 se muestra la fuerte reactividad de la mezcla de MAb con la recombinante F127, pero no con la F74.

El policlonal p71-98 mostró reactividad con TTR monomérico, pero también con una banda heterogénea de 55-60 Kd (TTRt) correspondiente a TTR tetramérica, que escapa a la ruptura con el tratamiento desnaturizante y/o que se reasocia durante las primeras etapas de la corrida en SDS-PAGE [Figura 2C, policlonal, calles 1 a 4; 10,17].

Los resultados muestran la presencia de cantidades significativas de TTR tetramérica, a pesar de las condiciones relativamente drásticas del procesamiento de las muestras. El carácter específico de la banda designada como TTRt esta justificada por su marcada disminución cuando la corrida se hace en presencia de urea 6M en el gel separador y por la falta de reactividad del policlonal p71/98 con cantidades equivalentes o incluso mayores de BSA, que muestran una migración similar a la TTRt en estos geles [resultados no mostrados].

Por otra parte, los resultados confirman que tanto los MAb anti TTR, como el suero p71/98 son capaces de detectar TTR monomérica en muestras de plasma desnaturizado por tratamiento térmico y con SDS. También muestran la presencia de moléculas de TTR tetraméricas resistentes al tratamiento combinado con SDS, calor y agente reductor destinado, al menos en

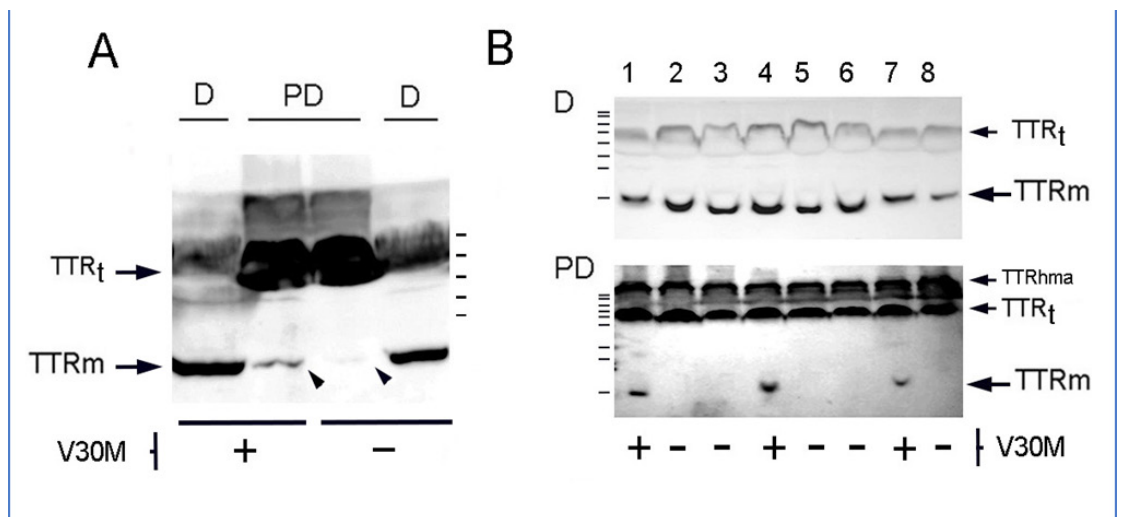
teoría, a maximizar la ruptura de estructuras cuaternaria, terciaria y secundarias y a generar monómeros de TTR [12].

A continuación, se indagó si un tratamiento menos drástico de las muestras podría tener un impacto diferencial en el perfil inmunológico de los plasmas provenientes de individuos positivos (portadores) y negativos para la mutación V30M.

La Figura 3A muestra el perfil inmunorreactivo con antisuero p71/98 de plasmas provenientes de un individuo V30M-positivo y otro negativo para la mutación después de tratamiento con buffer, muestra con SDS y calentamiento a 95-100 C° (desnaturizados, D) o incubación a temperatura ambiente (desnaturización parcial, PD) por 15 minutos previos al análisis con SDS-PAGE (ver Materiales y Métodos). De acuerdo con lo esperado, se observó la presencia de monómeros y tetrámeros de TTR en ambos plasmas procesados en condiciones de desnaturización total (calles D). El análisis de idénticas alícuotas de los mismos plasmas, después de desnaturización parcial (Figura 3A, calles PD) se detectó TTR monomérico sólo en la muestra del portador positivo de la mutación V30M. La intensidad de las bandas correspondientes a TTRt fue significativamente mayor en ambas muestras, en comparación con sus respectivas contrapartes sujetas a alta temperatura.

El resultado sugiere que minimizar la ruptura de oligómeros de TTR durante el procesamiento de la muestra podría ser

Figura 3.



► A) Western blotting de plasmas procesados por separado en condiciones desnaturizantes (D) y parcialmente desnaturizantes (PD). Alícuotas de plasmas pertenecientes a un portador V30M positivo (V30M+) y a un individuo negativo para la mutación (V30M-) se mezclaron respectivamente con volúmenes equivalentes de buffer muestra 2X conteniendo SDS y beta-mercaptoetanol, se dividieron en dos y se calentaron durante 10 minutos a 95-100 Co o se mantuvieron a temperatura ambiente (D y PD, respectivamente (véase Materiales y Métodos) previo a su análisis por separado en inmunoblot con suero policlonal p71 / 98. TTRhma: agregados de alto peso molecular. TTRt: TTR tetramérica. TTRm: TTR monomérica. Las cabezas de flechas en las dos calles centrales de PD señalan la banda de TTR monomérica claramente detectable en la muestra V30M positiva pero apenas detectable, en niveles de background, en la control V30M negativa. Las bandas TTR monoméricas mostraron un comportamiento de migración idéntico independientemente del origen de la muestra o del tipo de procesamiento. B) Análisis de inmunoblot de alícuotas plasmáticas idénticas (3 ul equivalentes) obtenidas de 8 individuos independientes, tres portadores de la mutación V30M y 5 controles negativos analizados en condiciones desnaturizantes (D) y parcialmente desnaturizantes (PD). La fracción de marca específica asociada a las formas monoméricas (TTRm) fue consistentemente menor a la de las formas poliméricas (TTRt y TTRhma), pero siempre claramente superior al basal definido por los las muestras provenientes de carriers V30M negativos. Además, la detección diferencial de TTRm en muestras plasmáticas de 6 carriers V30M positivos, analizadas bajo condiciones parcialmente desnaturizantes (PD) al tiempo del procesamiento editorial de este manuscrito (no mostrado), confirma en su totalidad la hipótesis postulada en este trabajo.

una estrategia válida para evidenciar el exceso de monómeros libres esperable en plasmas de portadores con mutaciones como la V30M, desestabilizadora de su estructura cuaternaria.

Esta hipótesis fue testeada con tres muestras alternativas de plasmas provenientes de individuos no relacionados e identificados como portadores de V30M por secuenciación genómica.

La Figura 3B (panel superior D) muestra el perfil inmunorreactivo de ocho alícuotas idénticas de plasmas de tres portadores V30M-positivos y de cinco controles negativos, analizados en condiciones de desnaturización (D). Como se esperaba, las ocho muestras desnaturizadas por calor muestran presencia de TTRm y una banda relativamente más débil de TTRt (distorsionada por la sobrecarga de HSA en las calles respectivas). Por el contrario, el análisis de alícuotas idénticas procesadas a temperatura ambiente (panel PD) revelan bandas de TTRm de 14 Kd sólo en las calles 1, 4 y 7 correspondientes a plasmas de portadores V30M-positivos. Como se mostró en la Figura 3A, la cantidad de formas poliméricas de TTR (principalmente TTRt y hma) está claramente aumentada en comparación con las muestras desnaturizadas por calor.

Los resultados sugieren que una simple modificación en el procesamiento de plasmas provenientes de individuos en estudio puede convertir al Western blot en una herramienta útil para identificar a los portadores de la mutación V30M, y eventualmente a portadores con mutaciones alternativas que tengan impacto en la estabilidad de TTRt.

A diferencia de la secuenciación genómica y la asignación de mutaciones, que no son predictores absolutos de la formación de amiloides [18], la modificación del protocolo de Western blot propuesta aquí, apunta al análisis de una característica fenotípica directamente relacionada con el potencial para formación de amiloides, es decir la cantidad efectiva de TTR monomérica libre en plasma. El análisis de un mayor número de muestras es necesario para validar este protocolo para su uso clínico y confirmar si es capaz de detectar cambios en función del tiempo en la concentración de monómeros de TTR libres en plasma de individuos tratados con estabilizadores TTR [19] y/o establecer una correlación significativa con la progresión de la enfermedad.

Agradecimientos

Este trabajo fue parcialmente financiado por STAN 1464/2480, otorgado a P.R.G. en el CEVAN/ICTMilstein- CONICET. J.C. y M.L. son estudiantes de posgrado de la Carrera de Bioquímica en el Instituto Universitario del Hospital Italiano (IUHI). M.S.S y P.B.S son Bioquímicos (UBA), directora y profesional asociado respectivamente, de la División de Proteínas del Laboratorio Central del Hospital Italiano de Buenos Aires (LCHI). M.W y P.R.G son miembros de la Carrera del Investigador en el CEVAN-ICT Milstein, CONICET, Argentina.

Referencias bibliográficas

- Merlin G, Seldin DC, Geertz MA. Amyloidosis: pathogenesis and new therapeutic options. *J Clin Uncool* 2011; 29:1924–33.
- Jiang X, Buxbaum JN, Kelly JW. The V122I cardiomyopathy variant of transthyretin increases the velocity of rate limiting tetramer dissociation, resulting in accelerated amyloidosis. *Proc. Natl Acad Sic USA*. 2001; 98:14943–8.
- Kelly JW. Alternative conformations of amiloidogénica proteins govern their behavior. *Cur Open Strict Boil* 1996; 6:11–17.
- Purification and characterization of amyloid-related transthyretin associated with familial amiloidoti cacardiomyopathy. Leonia F. Hermapjisen', Tomas Bergman', Hans Jornvall', Gunnar Husby', Ida Ranlov, and Knut Sletten, *Eur. J. Biochem.* 227, 772-779 (1995).
- Anabela C. Teixeira a, María J. Saraiva. Presence of N-glycosylated transthyretin in plasma of V30M carriers in familial amyloidotic polyneuropathy: an escape from ERAD. *J. Cell. Mol. Med.* Vol 17, No 3, 2013 pp. 429-4352.
- Thomas Rudolph, Martin Wilhelm Kurz, and Elisabeth Farbu. Late-Onset Familial Amyloid Polyneuropathy (FAP) Val30Met without Family History. *Clin Med Res*. 2008 Sep; 6(2): 80–82.
- Per Westermark, Eva Davey, Karolina Lindbom, Stina Enqvist. Subcutaneous fat tissue for diagnosis and studies of systemic amyloidosis. *Acta histochemica* 108 (2006) 209–213.
- Elisabeth Ihse, Ole B. Suhr, Ulf Hellman and Per Westermark. Variation in amount of wild-type transthyretin in different fibril and tissue types in ATTR amyloidosis. *J Mol Med* (2011) 89:171–180.
- Diana Canetti, Nigel Brian Rendell, Lucia Di Vagno, Janet A. Gilbertson, Dorota Rowczenio, Tamar Rezk, Julian D. Gillmore, Phillip N. Hawkins, Guglielmo Verona, Palma Patrizia Mangione, Sofia Giorgetti, Pierluigi Mauri, Sara Motta, Antonella De Palma, Vittorio Bellotti & Graham W. Taylor. Misidentification of transthyretin and immune globulin variants by proteomics due to methyl lysine formation in formalin-fixed paraffine embedded amyloid tissue. *Amyloid* Vol. 24, Iss. 4, 2017.
- Jeffrey N. Higaki, AviChakrabarty, Natalie J. Galant, Kevin C. Hadley, Bradley Hammerson, Tarlochan Nijjar, Ronald Torres, Jose R. Tapia, Joshua Salmans, Robin Barbour, Stephen J. Tam, Ken Flanagan, Wagner Zago, and Gene G. Kinney. Novel conformation-specific monoclonal antibodies against amyloidogenic forms of transthyretin. *Amyloid*, 2016; 23(2): 86–97.
- Lendoire JC, Trigo P, Aziz H, Romero MC, Inventarza O, Ando Y, Tashima K, Ohlsson P-I, Cederquist K, Holmgren G, Suhr OB. Variant transthyretin (TTR) amyloidosis in Argentina. Detection of the trait by electrospray ionization mass spectrometry of lyophilized TTR immune precipitate. *Scand J Clin Lab Invest* 1999; 59: 613.
- Blackshear, P. Systems for Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Methods in enzymology*, vol. 104. 1984.
- Asa Gustavsson, Ulla Engstrom and Per Westermark. Mechanisms of Transthyretin Amyloidogenesis Antigenic Mapping of Transthyretin Purified from Plasma and

- Amyloid Fibrils and within in Situ Tissue Localizations. *American Journal of Pathology*, Vol. 144, No. 6, June 1994.
14. Hans E. Purkey, Michael I. Dorrell, and Jeffery W. Kelly. Evaluating the binding selectivity of transthyretin amyloid fibril inhibitors in blood plasma. *PNAS* u May 8, 2001 u vol. 98.
 15. Sorroche, P.B.; Cucci, M., Wilda, M.; Ruggiero, M. F.; Bettini, M.; Giménez, M.I.; Christiansen, S; P.R. Grigera. Uso del inmunoblot (Western blot) en el laboratorio clínico para la detección de distrofina, disferlina y calpaína 3: tres proteínas de relevancia en el diagnóstico de miopatías hereditarias. *Bioquímica y Patología Clínica* 80(2), Mayo-Agosto 2016.
 16. Kimiaki Matsubara, Mineyuki Mizuguchi, and Keiichi Kawano. Expression of a synthetic gene encoding human transthyretin in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* 30 (2003) 55–61.
 17. Christine E. Bulawaa, Stephen Connelly, Michael DeVit, Lan Wang, Charlotte Weigel, James A. Fleming, Jeff Packman, Evan T. Powerse, R. Luke Wiseman, Theodore R. Foss, Ian A. Wilson, Jeffery W. Kellye and Richard Labaudinière . Tafamidis, a potent and selective transthyretin kinetic stabilizer that inhibits the amyloid cascade. *PNAS*, June 12, 2012, vol. 109, 24, 9629–9634.
 18. da Costa G, Gomes RA, Guerreiro A, Mateus E ´, Monteiro E, et al. (2011) Beyond Genetic Factors in Familial Amyloidotic Polyneuropathy: Protein Glycation and the Loss of Fibrinogen's Chaperone Activity. *PLoS ONE* 6(10).
 19. Laura Obici and Giampaolo Merlini (2014). An overview of drugs currently under investigation for the treatment of transthyretin-related hereditary amyloidosis. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, Volume 231.