

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



Ciências
ULisboa

Estudo da estabilidade da TTR após o transplante hepático em doentes PAF

Marisa Monteiro Magalhães

Mestrado em Bioquímica
Bioquímica

Dissertação orientada por:
Gonçalo Costa

2016

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostava de fazer um agradecimento especial à Professora Ana Ponces, assim como ao restante Grupo de Enzimologia, por me ter acolhido no seu seio de investigação.

Ao meu orientador, Dr. Gonçalo da Costa, quero agradecer a paciência, dedicação e pela oportunidade única de poder aprender com ele e crescer como cientista. Este ano que passou foi um ponto de viragem na minha vida, e sem o Dr. Gonçalo não teria sido possível.

Aos meus amigos de Lisboa, sem os quais eu não teria conseguido terminar esta etapa tão desgastante da minha, nomeadamente ao Bruno Coucello, Mariana Ramos e à Alexandra Oliveira. A ti Coucello a todos os momentos em que só o fato de me ouvires, de me deixares a falar durante 10 minutos de coisas sem nexos e de no fim me fazeres sorrir. A ti Mariana por seres o meu ombro, o meu pilar que tem sempre um lado positivo para me mostrar. Por fim, a ti Xana por seres o meu exemplo, por me ensinares a cada dia a crescer mais um pouco.

À minha colega de laboratório que se tornou tão ou mais importante nesta etapa que qualquer outro meu amigo de longa data. Obrigado Sara Jogo, por me teres aturado todos os dias, teres aturado o meu mau-feitio e mesmo assim seres sempre parvinha o suficiente para me animar. Sem ti, sem dúvida alguma, eu não teria terminado. À amiga que o mestrado me trouxe e que eu levo para a vida, Catarina Grazina pela paciência e por todos os risos e almoços!

Aos meus amigos de Aveiro, que apesar de estarem longe estão sempre comigo e a incentivarem o meu sucesso. A ti Miguel Paiva, Bruno Silva, Ruben Lopes, Tiago Cardozo, José Martins e José Santos pelo companheirismo e amizade que sempre demonstraram. A ti minha irmã, Cláudia Salgueiro há tanto para dizer e tão poucas palavras que dignifiquem esta amizade de quase 24 anos, obrigado por me chamares sempre à razão mesmo quando não quero ouvir.

A ti Micael Vieira, que infelizmente partiste antes de poderes me ver Mestre. Sei que me acompanhas aí do céu. Obrigado por tudo, fazes-me falta!

A ti Lord, meu companheiro canino, que estás sempre lá no fim do dia, com os teus olhinhos brilhantes por me ver, que me consolaste cada lágrima e cada tristeza que esta etapa me trouxe, bem como saltaste de alegria comigo com todas as vitórias que alcancei para chegar hoje aqui.

Por fim, e por serem as pessoas mais importantes, que mais me amam e que mais lutam por mim nesta vida, quero agradecer à minha família, em especial ao meu pai e à minha mãe por lutarem, me levantarem a cabeça e festejar comigo cada vitória da minha vida. Por nunca desistirem mesmo quando para mim era a única solução. Por fazerem deste mundo um lugar especial para se estar. Obrigado pela paciência, por não ligarem ao meu mau humor, às minhas frustrações e acreditarem sempre que eu iria conseguir.

A todos os que passaram na minha vida nesta fase, o meu sincero obrigado!

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	i
RESUMO.....	vii
SUMMARY.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E NOMENCLATURA.....	xi
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	xiii
I – INTRODUÇÃO.....	1
1. Doenças Amilóides e PAF.....	2
1.1. Doenças Amilóides.....	2
1.2. Polineuropatia Amiloidótica Familiar (PAF) – contexto histórico e geográfico.....	4
1.2.1. Sintomatologia da PAF.....	5
2. Transtirretina (TTR).....	5
2.1. O gene, a proteína e a respetiva função.....	5
2.2. Mutações e amiloidogenicidade.....	7
2.3. Patogénese: os modelos de agregação da TTR.....	7
3. A TTR e outras doenças degenerativas.....	9
4. Glicação.....	9
5. Tratamentos.....	11
5.1. Transplantes.....	11
5.1.1. Transplante hepático de cadáver (CLT).....	11
5.1.2. Transplante hepático sequencial (dominó) (DLT).....	11
5.2. Outros tratamentos.....	12
6. Turnover proteico.....	13
II – MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
1. Obtenção das amostras de plasma e sangue humano.....	17
1.1. Colheita.....	17
2. Eletroforese desnaturante unidimensional: SDS-PAGE.....	19
2.1. Fundamentos teóricos.....	19
2.2. Os géis.....	21

2.3. Tratamento e aplicação das amostras.....	21
2.3.1. Amostras de plasma e de sangue.....	21
2.4. Corrida eletroforética.....	21
2.5. Coloração dos géis.....	22
3. Western Blot.....	22
3.1. Fundamentos teóricos.....	22
3.2. Transferência.....	24
3.3. Bloqueio e incubação com anticorpos 1º e 2º.....	24
3.4. Revelação.....	25
3.5. Análise por ImageJ.....	26
4. Purificação da TTR e identificação dos interactuantes da TTR.....	26
4.1 Fundamentos teóricos.....	26
4.2 Crescimento de bactérias e expressão da TTR.....	27
4.3. Identificação e purificação dos interactuantes da TTR.....	28
5. Espectrometria de massa.....	29
5.1. Fundamentos teóricos.....	29
5.1.1. Métodos de ionização.....	29
5.1.1.1. MALDI.....	30
5.1.2. Analisadores de massa.....	31
5.1.2.1. FT-ICR.....	31
5.1.3. Detetores.....	31
5.2 Preparação e análise da amostra.....	32
5.2.1 Digestão in gel das proteínas.....	32
5.2.2 Digestão com tripsina.....	32
5.2.3 Aplicação dos digeridos na placa de MALDI.....	32
5.2.4 Obtenção dos espectros de massa.....	33
5.2.5 Identificação das proteínas por PMF.....	33
5.2.6 Quantificação relativa das formas wild-type e mutante da TTR plasmática.....	33

II -RESULTADOS.....	35
1. Determinação do tempo de desaparecimento da TTR V30M em doentes PAF transplantados com fígado cadaver.....	37
1.1 – Separação da TTR e identificação por Western Blot.....	37
1.2. Quantificação da TTR V30M e respetivo tempo de meia vida.....	38
2.Determinação dos interactuantes.....	44
2.1. <i>Pulldown</i> dos possíveis interactuantes e respetiva identificação.....	44
3. A glicação na PAF: análise dos níveis de glicação diferencial proteica no plasma e em Red blood cells.....	48
3.1. Níveis de glicação diferenciais em indivíduos transplantados BH4, BH5 e BH7.....	48
3.2.– Níveis de glicação diferenciais associados aos interactuantes da TTR.....	49
IV - DISCUSSÃO.....	53
V – CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	59
VI – REFERÊNCIAS.....	63
VII- ANEXOS.....	73
1. Figuras.....	75
2. Tabelas.....	80

RESUMO

A Polineuropatia Amiloidótica Familiar (PAF) é uma doença autossómica dominante progressiva caracterizada pela deposição de fibras amilóides formadas pela proteína Transtirretina (TTR). É uma patologia severa e que constitui um paradigma, uma vez que existem observações fenotípicas que sugerem um modelo de patogénese mais complexo do que a simples presença de mutações na cadeia polipeptídica da TTR.

De modo a tentar compreender de que forma outros fatores não genéticos podem alterar a progressão desta doença, o presente trabalho apostou na análise de vários estados de progressão da PAF, para o qual se utilizou amostras de plasma de indivíduos portadores heterozigóticos da mutação V30M sintomáticos e indivíduos que sofreram um transplante de fígado cadáver. Foram avaliados os interactuantes da TTR e os níveis de glicação.

O trabalho desenvolvido mostrou inequivocamente que o tempo de meia vida da TTR ronda os 3 dias, sendo que ao fim do sexto dia a variante mutada já foi totalmente substituída pela variante WT em indivíduos transplantados com fígado cadáver. Já os interactuantes da TTR identificados neste trabalho em pacientes PAF não transplantados foram a albumina, o retinol-binding protein, urocortino-3 e IgG1, sendo que a albumina e o retinol-binding protein já tinham sido descritos na literatura. Contudo, nos pacientes transplantados e monitorizados estavam apenas presentes a albumina, a IgG1 e o urocortino-3.

A execução deste trabalho permite reforçar o envolvimento de fatores não genéticos no modelo de patogénese da PAF, nomeadamente um modelo multifatorial.

Palavras-chave: Polineuropatia amiloidótica familiar, Transtirretina, V30M, interactuantes, glicação

SUMMARY

Familial Amyloid Polyneuropathy (FAP) is a progressive autosomal dominant disease characterized by the deposition of amyloid fibrils formed by the protein transthyretin (TTR). It is a severe disease and it is a paradigm, since there are phenotypic observations which suggest a more complex model of pathogenesis, with more than the presence of mutations in the polypeptide chain of TTR.

In order to try to understand how other non-genetic factors can alter the progression of this disease, this study bet on the analysis of various progression states of PAF, for which was used plasma samples from heterozygous carries of V30M mutation with symptoms and individuals who have undergone a liver transplant. We evaluated the molecules that interact with TTR and glycation levels.

The work clearly showed that the half-life of TTR was around 3 days, and at the end of the sixth day the mutated variant has been completely replaced by the WT variant. The interacting molecules of TTR identified in this study in non-transplanted PAF patients were albumin, retinol-binding protein, urocortino-3 and IgG1, wherein the albumin and retinol-binding protein were already described in the literature. However, in transplanted patients were present only albumin, IgG1 and urocortino-3.

The execution of this work reinforces the involvement of non-genetic factor in the pathogenesis model of FAP.

LISTA DE ABREVIATURAS E NOMENCLATURA

LISTA DE ABREVIATURAS E NOMENCLATURA

2D	Electroforese Bidimensional
3-DG	<i>3-Deoxyglucosone</i>
A25T	Substituição da alanina na posição 25 por uma treonina
A β	Péptido β -amilóide
ACN	Acetonitrilo
AGEs	do inglês, <i>glycation end products</i>
AGP	Argpirimidina
APP	Proteína Amilóide Percursora (do inglês <i>Amyloid precursor protein</i>)
APS	Persulfato de amónio
BSA	do inglês, <i>bovine serum albumin</i>
CHCA	do inglês, α -cyano-4-hydroxycinnamic acid
CLTs	Portadores heterozigóticos sintomáticos da mutação V30M da TTR que receberam um fígado de cadáver <i>wild-type</i>
CNSA	do inglês, <i>Central Nervous System selective Amyloidosis</i>
C/EBP	do inglês, <i>CCAAT/enhancer-binding protein</i>
D18G	Substituição do aspartato na posição 18 por uma glicina
DHB	do inglês, <i>2,5-dihydroxybenzoic acid</i>
DLTs	Pacientes que receberam um fígado PAF por sofrerem de uma patologia hepática grave não relacionada
DTT	Ditiotreitol
EEC	do inglês, <i>Executive Ethics Commission</i>
ERKs	do inglês, <i>extracellular signal-regulated kinases</i>
ESI	do inglês, <i>Electrospray ionisation</i>
FAC	Cardiomiopatia Amiloidótica Familiar
FAOXs	do inglês, <i>fructosyl-amine oxidases</i>
FT-ICR	do inglês, <i>Fourier-transform ion cyclotron resonance</i>
GSH	Glutathione
GST	do inglês, <i>glutathione s-transferase</i>
HFN-1	do inglês, <i>hepatocyte nuclear factor - 1</i>
HFN-3	do inglês, <i>hepatocyte nuclear factor - 3</i>
HFN-4	do inglês, <i>hepatocyte nuclear factor - 4</i>
HRP	do inglês, <i>horseradish peroxidase</i>
I68L	Substituição da isoleucina na posição 68 por uma leucina
IDP	do inglês, <i>intrinsically disordered proteins</i>
IEF	do inglês <i>Isoelectric Focusing</i>
IgG1	Imunoglobulina G 1
IPTG	do inglês, <i>Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid</i>
JUNK	do inglês, <i>c-Jun N-terminal kinases</i>
L111M	Substituição da leucina na posição 111 por uma metionina
L55P	Substituição da leucina na posição 55 por uma prolina
LB	do inglês, <i>Luria-Bertani</i>
MALDI	do inglês, <i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
MAPK	do inglês, <i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>
MCP	do inglês, <i>microchannel plate detectors</i>

LISTA DE ABREVIATURAS E NOMENCLATURA

MGO	do inglês, <i>Methylglyoxal</i>
NFKB	do inglês, <i>factor nuclear kappa B</i>
NFTs	do inglês, <i>neurofibrillary tangles</i>
ON	do inglês, <i>over night</i>
PAF	Polineuropatia Amiloidótica Familiar
PAFNT	Portadores heterozigóticos da mutação V30M da TTR com sintomas, mas não transplantados
PBS	Tampão Fosfato
PI	Ponto isoelétrico
PMF	do inglês, <i>peptide mass fingerprinting</i>
PSEN1	Presenilina 1 (do inglês <i>Presenilin-1</i>)
PSEN2	Presenilina 2 (do inglês <i>Presenilin-2</i>)
PVDF	do inglês, <i>Polyvinylidene fluoride</i>
RAGE	do inglês, <i>receptor for advanced glycation endproducts</i>
RBC	do inglês, <i>Red Blood Cells</i>
RBP	do inglês, <i>retinol binding protein</i>
ROS	do inglês, <i>reactive oxygen species</i>
S77Y	Substituição da serina na posição 77 por uma tirosina
SDS	do inglês, <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	do inglês, <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SEM	do inglês, <i>secondary electron multipliers</i>
SILAC	do inglês, <i>Stable isotope labeling with amino acids in cell culture</i>
T119M	Substituição da treonina na posição 119 por uma metionina
T4	Tiroxina
T60A	Substituição da treonina na posição 60 por uma alanina
TBG	do inglês, <i>thyroxine-binding globulin</i>
TBS	do inglês, <i>tris-buffered saline</i>
TEMED	O N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina
TFA	Ácido trifluoracético
TOF	do inglês, <i>Time-of-flight</i>
TTR	Transtirretina
V122I	Substituição da valina na posição 122 por uma isoleucina
V30M	Substituição da valina na posição 30 por uma metionina
WT	do inglês, <i>wild-type</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura I-1 - Evolução de monómero, proteína sem estrutura nativa associada até à formação de fibras amilóides.....2

Figura I-2 - Fases da sintomatologia da PAF.....5

Figura I-3 - Diagrama da estrutura nativa da TTR, em que cada monómero se encontra marcado com uma cor diferente (subunidade α : azul; subunidade β : verde; subunidade γ : amarelo e subunidade δ : vermelho). A linha representa o eixo cristalográfico sobre o qual uma rotação de 180° converte o dímero AB em CD.....6

Figura I-4 - Modelo de formação de fibras amilóides da TTR.....8

Figura I-5 - Reação de Maillard.....10

Figura I-6 - Esquema de transplante em dominó.....12

Figura II-7 - Esquema de uma separação proteica num gel de poliacrilamida.....20

Figura II-8 - Dois tipos de marcação de anticorpos, direta e indireta.....23

Figura II-9 - Montagem da sandwich num Western Blot.....23

Figura II-10 - Reação entre o H₂O₂ e o luminol, catalisada pelo HRP com a formação de 3-aminofalato que emite luz ao decair para estados de energia mais baixos.....25

Figura II-11 - Constituição do plasmídeo pGEX 4T.2.....27

Figura II-12 - Exemplificação dos 3 componentes principais de um espectrómetro de massa simples.....29

Figura II-13 - Ionização através da técnica de MALDI.....30

Figura II-14 - Representação de uma célula de FT-ICR.....31

Figura III-15 - Análise das proteínas do plasma dos pacientes transplantados com fígados cadáver por SDS-PAGE, coloração com Azul de Coomassie (topo), Western Blot do monómero da TTR.....37

Figura III-16a- Ilustração da distribuição do pico 1394,6223 observado no paciente BH7, pico relativo à TTR WT.....39

Figura III-16b- Ilustração da distribuição do pico 1398,7311 observado no paciente BH7, pico relativo à TTR V30M.....40

Figura III-17 - Quantificação da razão entre a quantidade de TTR V30M e a quantidade de TTR WT presente nos pacientes transplantados com fígado cadáver a vários tempos de biópsia.....42

Figura III-18 - Purificação da TTR após ensaio de pulldown beads de GST com amostra de controlo (amostra C8) e de indivíduos sintomáticos não transplantados (PAFNT 4A).....45

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura III-19 - Purificação da TTR após ensaio de pulldown e incubação com amostras de indivíduo BH7 com vários tempos de colheita após transplante (tempo A, tempo D e tempo E)..46	
Figura III-20 - Análise por SDS-PAGE (à esquerda) e Western Blot (à direita) dos níveis de glicação derivada da Argpirimidina (AGP) em amostras de plasma de paciente BH7 transplantado com fígado cadáver.....48	
Figura III-21 - Análise por Western Blot dos níveis de glicação derivada da Argpirimidina (AGP) em amostras de RBC do paciente BH7.....49	
Figura III-22 - Análise por SDS-PAGE (esquerda) e Western Blot (direita) de Pulldown de controlo e PAFNT.....50	
Figura III-23 - Análise por SDS-PAGE (esquerda) e Western Blot (direita) de Pulldown de paciente BH7.....50	
Figura VII-24 - Purificação da TTR após ensaio de pulldown.....75	
Figura VII-25 - Purificação da TTR após ensaio de pulldown beads de GST com amostras de indivíduos doente com PAF transplantados com fígado de cadáver (CLT 23 G) e doentes não PAF transplantados com fígado de doente PAF (DLT 18E).....76	
Figura VII-26 - Purificação da TTR após ensaio de pulldown e incubação com amostras de indivíduo BH4 com vários tempos de colheita após transplante (tempo A, tempo D e tempo E).....76	
Figura VII-27 - Purificação da TTR após ensaio de pulldown e incubação com amostras de indivíduo BH5 com vários tempos de colheita após transplante (tempo A, tempo D e tempo E).....77	
Figura VII-28 - Análise por Western Blot dos níveis de glicação derivada da Argpirimidina (AGP) em amostras de plasma.....77	
Figura VII-29 - Análise por Western Blot dos níveis de glicação derivada da Argpirimidina (AGP) em amostras de RBC do paciente BH4.....78	
Figura VII-30 - Gráfico da quantificação da glicação associada às RBC do paciente BH4.....78	
Figura VII-31 - Análise por Western Blot dos níveis de glicação derivada da Argpirimidina (AGP) em amostras de RBC do paciente BH5.....78	
Figura VII-32 - Gráfico da quantificação da glicação associada às RBC do paciente BH5.....79	
Figura VII-33 - Análise por SDS-PAGE (esquerda) e Western Blot (direita) de Pulldown de paciente BH4.....79	
Figura VII-34 - Análise por SDS-PAGE (esquerda) e Western Blot (direita) de Pulldown de paciente BH5.....80	

LISTA DE TABELAS

Tabela II-1 - Descrição das amostras de plasma e/ou de sangue humano utilizadas durante o trabalho experimental. NA - não aplicável.....	17,18
Tabela II-2 - Composição dos géis de concentração e separação à % de acrilamida indicada. Volumes indicados para 1 gel.....	21
Tabela II-3 - Anticorpos primários e secundários utilizados nas deteções por Western blotting e diluições optimizadas utilizadas. P = policlonal. M = monoclonal.....	25
Tabela III – 4 – Péptidos presentes nas amostras no momento do transplante, nomeadamente pacientes PAF transplantados com fígado cadáver (BH4, BH5 e BH7).....	38
Tabela III-5 - Resultados obtidos após análise por MALDI.....	41
Tabela III-6 – Resultados do cálculo do tempo de meia vida.....	42
Tabela III- 7 - Resultado da identificação das bandas retiradas dos géis da figura III, nomeadamente resultante do pulldown de indivíduos controlo e indivíduos PAFNT. Considera-se que uma identificação é significativa, nas condições utilizadas, quando o score é superior a 75.....	46
Tabela VII-8 - Quantificação de cada banda marcada no western blot da figura VII-26 dos anexos, quer com AGP quer com β -actina.....	80
Tabela VII-9 - Cálculos dos rácios entre as áreas ou a percentagem do pico de cada amostra da tabela VII-8, sendo o rácio calculado como (banda marcada com AGP)/(banda marcada com β -actina) do paciente BH4.....	81
Tabela VII-10 - Quantificação de cada banda marcada no western blot da figura VII-28 dos anexos, quer com AGP quer com β -actina do paciente BH5.....	81
Tabela VII-11 - Cálculos dos rácios entre as áreas ou a percentagem do pico de cada amostra da tabela VII-10, sendo o rácio calculado como (banda marcada com AGP)/(banda marcada com β -actina) do paciente BH5.....	82

I – INTRODUÇÃO

Neste primeiro capítulo apresenta-se informação importante no contexto da PAF, focando aspectos que vão desde a descrição da patologia a nível clínico, como o seu modelo de patogénese molecular a factores não genéticos que se encontram relacionados com a mesma. O plano de trabalhos desenvolvido teve particular incidência sobre os factores não genéticos que podem comprometer a progressão da doença tendo por base indivíduos portadores da mutação amiloidogénica da transtirretina, pelo que o breve estado da arte que se segue pretende uma contextualização adequada ao problema abordado no laboratório, a relevância que ele apresenta na problemática da PAF, assim como à abordagem escolhida para o estudar.

1. Doenças Amilóides e PAF

1.1 Doenças amilóides

O termo amilóide foi introduzido pela primeira vez por Rudolph Virchow em 1854 (tal como revisto por Cohen, 1986). Este corresponde a uma proteína insolúvel, sem estrutura nativa associada (em inglês *misfolding*), a qual agrega e forma fibras que podem apresentar dimensões variadas (entre os 6 e os 12 nm). Estas fibras apresentam um padrão em estrutura de folha pregueada beta que reflete uma estrutura secundária rearranjada na qual as folhas β estão dispostas de forma perpendicular ao eixo das fibras. São formadas através de um processo designado por nucleação. Este processo inicia-se com a perda de estrutura das proteínas, dissociando-se em monómeros que se aglomeram formando os oligómeros ou também designados por sementes. Posteriormente ocorre a adição de novos monómeros às sementes que corresponde ao passo de crescimento ou alongação. Dá-se ainda um processo de fragmentação no qual ocorre uma quebra nas fibras amilóides, aumentando a quantidade total de fibras podendo ocorrer de novo alongação, tal como revisto por Härd & Lendel, 2012, e por Knowles *et al.*, 2014. Este processo está resumidamente exemplificado na figura I-1. Os oligómeros são agregados solúveis formados a partir de proteínas misfolded, tal como revisto por Härd & Lendel, 2012.

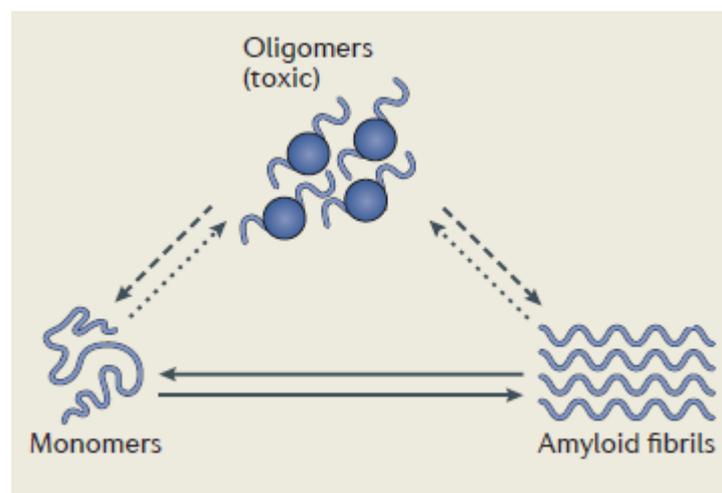


Figura I-1. Evolução de monómero, proteína sem estrutura nativa associada até à formação de fibras amilóides. Adaptado de Knowles *et al.*, 2014

As fibras amilóides consistem em estruturas com elevado grau de organização e empacotamento. Estão associadas à perda de função da proteína e por vezes à formação de intermediários tóxicos, como revisto por Knowles *et al.*, em 2014. Todas as fibras amilóides são passíveis de serem visíveis através da marcação com o vermelho do Congo resultando numa birrefringência verde após a coloração permitindo verificar a estrutura em folha β ao longo das fibras (tal como revisto por Serpell 2000).

As doenças amilóides são um grupo de patologias caracterizadas pela deposição extracelular destas fibras em diversos órgãos (revisto por Sikora *et al.*, 2015 e por X. Hou *et al.*, 2007). Estas podem ser doenças genéticas herdadas a partir dos progenitores ou ocorrer de forma esporádica, tal como descrito por Johnson *et al.*, 2012. Existem aproximadamente 50 doenças amilóides cada uma delas associada a uma proteína diferente, entre elas destacam-se a polineuropatia amiloidótica familiar (PAF) que se encontra associada à transtirretina (TTR), a doença do Alzheimer que se encontra associado ao péptido β -amilóide (A β), a doença do Parkinson que se encontra associado à proteína α -sinucleína (tal como revisto por Knowles *et al.*, em 2014).

A Doença de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa amilóide, descrita pela primeira vez por Alois Alzheimer em 1907 (Alzheimer A. 1907). Possui um age onset tardio, rondando os 65 anos. Pode também possuir uma componente genética que desencadeia uma doença com age onset mais precoce, apesar de não ser uma doença hereditária. Apresenta mutações na proteína amilóide precursora (APP), e nas proteínas presenilina 1 e 2 (PSEN1 e PSEN2) (tal como revisto por Reitz 2012). É caracterizada pela deterioração cognitiva, tendo como indicadores de doença a formação de placas senis e NFTs (do inglês *neurofibrillary tangles*), tal como descrito por Reitz 2012. As placas senis são formadas pelo péptido β -amilóide (A β), que é composto por 39-43 aminoácidos e corresponde a um produto clivado da proteína amilóide precursora (APP). Este perde a sua forma em hélice α adquirindo uma estrutura em folha β , a qual forma agregados que se depositam como fibras amilóides ou placas senis (tal como descrito por Serpell 2000). A formação das placas senis segue um mecanismo de nucleação (tal como revisto por Serpell 2000), já descrito acima.

A Doença de Parkinson é uma doença neurodegenerativa amilóide tal como a doença de Alzheimer. Possui também um age onset tardio, que ronda os 80 anos (tal como revisto por C. A. Davie 2008). É normalmente uma patologia esporádica tal como a doença de Alzheimer, contudo pode estar associada a mutações nomeadamente à A53T, A30P e à E46K no gene da α -sinucleína (tal como revisto por Dikiy & Eliezer 2012). É caracterizada pela presença de corpos de Lewis (do inglês *Lewy bodie's*), que correspondem a fibras amilóides de sinucleína com estrutura em folha β (tal como revisto por Dikiy & Eliezer 2012). A sinucleína foi descrita pela primeira vez por Maroteaux *et al.*, 1988 e é uma proteína solúvel pré-sináptica com 14.5 kDa. Esta é uma proteína que pertence ao grupo das proteínas intrinsecamente desordenadas (IDP), tal como revisto por Dikiy & Eliezer 2012. As proteínas intrinsecamente desordenadas não possuem uma estrutura nativa definida ou possuem regiões sem estrutura definida, mas que, no entanto, são proteínas funcionais (tal como revisto por P. Tompa 2012). A formação de fibras amilóides neste caso é semelhante à Doença de Alzheimer, seguindo o modelo de nucleação (tal como revisto por Dikiy & Eliezer 2012). As mutações associadas ao gene da sinucleína potenciam a agregação desta proteína, favorecendo o desenvolvimento da doença (tal como revisto por Dikiy & Eliezer 2012).

Como se pode verificar, não existe uma semelhança nas sequências, estruturas nativas ou funções das proteínas associadas às doenças amilóides, no entanto todas apresentam um padrão em estrutura de folha beta pragueada nas fibras amiloides formadas que lhes confere uma grande estabilidade (tal como revisto por Knowles *et al.*, em 2014 e Serpell 2000).

1.2 Polineuropatia amiloidótica familiar (PAF) – contexto histórico e geográfico

A Polineuropatia amiloidótica familiar, doença dos pezinhos ou Paramiloidose é uma doença autossômica dominante progressiva caracterizada pela deposição de fibras amilóides. Estas fibras são formadas pela proteína transtirretina (TTR), uma proteína plasmática composta por 127 aminoácidos, responsável pelo transporte da tiroxina (T4) e da vitamina A (Ando *et al.*, 2013; Parman *et al.*, 2016). Foi descrita pela primeira vez por Corino de Andrade em 1952 no norte de Portugal, mais concretamente na Póvoa do Varzim. É uma neuropatia periférica senso-motora que inicialmente começa com distúrbios nos membros inferiores e que vai degradando a qualidade de vida do paciente num espaço temporal de uma década, terminando numa morte precoce (Ando *et al.*, 2013; Parman *et al.*, 2016). Pode também afetar outros órgãos como o coração, trato gastrointestinal, rins e olhos, tal como descrito por Suhr *et al.*, 2000.

Possui mais de 100 mutações identificadas (Connors *et al.*, 2003), sendo a V30M a mutação mais comum e que corresponde à substituição de uma valina por uma metionina na posição 30 da sequência da TTR (Ando *et al.*, 2013; Parman *et al.*, 2016). A mutação V30M está presente em Portugal, Suécia e Japão (revisto por Carvalho *et al.*, 2015). Tal como revisto por X. Hou *et al.*, 2007, a presença de uma mutação leva à destabilização da estrutura nativa da TTR, induzindo alterações conformacionais na proteína. Estas alterações terminam na dissociação do tetrâmero em espécies sem estrutura associada, que por fim se agregam em fibras. As variantes mutadas da TTR possuem uma baixa estabilidade termodinâmica, o que pode ser crucial para a perda de estrutura e consequente formação de fibras amilóides (X. Hou *et al.*, 2007).

A PAF é uma patologia endémica em Portugal e na Suécia. A média de idades de aparecimento dos primeiros sintomas (do inglês age onset) em Portugal e no Japão é de 33 anos, um age onset precoce relativamente ao da população sueca que ronda os 56 anos, tal como revisto por Ando *et al.*, 2013 e Parman *et al.*, 2016. Por outro lado, possui uma penetrância variável, o que indica que é uma patologia que não depende apenas de fatores genéticos. Em Portugal existe uma elevada penetrância (80% aos 50 anos) enquanto que no norte da Suécia a penetrância é reduzida (os 11% aos 50 anos), tal como revisto em Ando *et al.*, 2013. A penetrância corresponde à probabilidade genética de uma característica ser expressa num indivíduo que possua uma mutação (Ando *et al.*, 2013; Parman *et al.*, 2016).

1.2.1 Sintomatologia da PAF

Esta doença afeta primeiramente o sistema nervoso simpático e parassimpático, podendo também afetar outros órgãos como o coração, sistema gastrointestinal e rins. O padrão de sintomas inicia-se por distúrbios sensoriais nas extremidades inferiores do corpo, nomeadamente

desconforto, dormência, sensibilidade ao nível da temperatura e dor espontânea. Estes sintomas vão se agravando e progredindo para os membros superiores, tal como revisto por Ando *et al.*, 2013. Um dos primeiros sintomas é o síndrome do túnel carpal (tal como revisto por Ando *et al.*, 2013 e por X. Hou *et al.*, 2007). Pode ser dividida em 3 fases, as quais estão brevemente resumidas na **figura I-2**:

- I. Polineuropatia sensorial;
- II. Perda das capacidades motoras;
- III. Incapacidade total, sendo necessário apoio de cadeira de rodas (Ando *et al.*, 2013; Parman *et al.*, 2016).

Signs and symptoms	Stage 1	Stage 2	Stage 3
Motor	Mild	Mild/moderate	Severe
Limb involvement	Lower	Lower/upper	Lower/upper
Autonomic	Mild	Moderate	Severe
Activities of daily living	None/minimal	Significant	Profound
Ambulation	No assistance required	Assistance required	Wheelchair/bed-bound

Figura I-2 Fases da sintomatologia da PAF (Barreiros et al., 2015)

Apresenta ainda como sintomas secundários: impotência sexual, distúrbios gastrointestinais, hipotensão ortostática, diminuição da temperatura corporal, atrofia muscular, perda de peso, distúrbios oculares e urinários (Ando *et al.*, 2013; Planté-Bordeneuve & Said 2011). Para além destes, possui uma correlação de 50% com doenças cardíacas, uma vez que a maioria das mutações associadas à TTR causam cardiomiopatia amilóide, tal como revisto por Ando *et al.*, 2013.

2. Transtirretina (TTR)

2.1. O gene, a proteína e a respetiva função

A transtirretina (TTR), também conhecida como pré-albumina, foi descoberta pela primeira vez em 1942 por Kabat *et al.*, 1942 e o seu nome, transtirretina, foi introduzido pela primeira vez em 1981, sendo uma junção de sílabas alusivas à sua função (trans = transporte; ti= tiroxina e retina = retinol), tal como revisto por Landers *et al.*, 2013. Esta proteína possui uma massa molecular de 55 kDa, é sintetizada no fígado, plexos coróide e retina e circula principalmente no plasma e no fluído cérebroespinal (tal como revisto por Buxbaum & Reixach 2009; por Ueda & Ando 2014). É uma proteína homotetramérica composta por quatro subunidades, cada uma com 127 aminoácidos que formam uma cavidade de ligação para a tiroxina. Esta cavidade possui dois locais de ligação que possuem cooperatividade negativa resultante de um efeito alostérico após a ligação do primeiro substrato. Cada monómero contém 8 folhas β denominadas de A-H e uma pequena hélice entre as folhas E-F. Estas reorganizam-se

em duas folhas β denominadas DAGH e CBEH que interagem através de ligações de hidrogénio entre as cadeias HH' e FF' para formar um dímero (tal como revisto por X. Hou *et al.*, 2007). A estrutura da TTR foi determinada pela primeira vez por Blake *et al.*, em 1970 (Blake *et al.*, 1974) e apresenta-se na **figura I-3**:

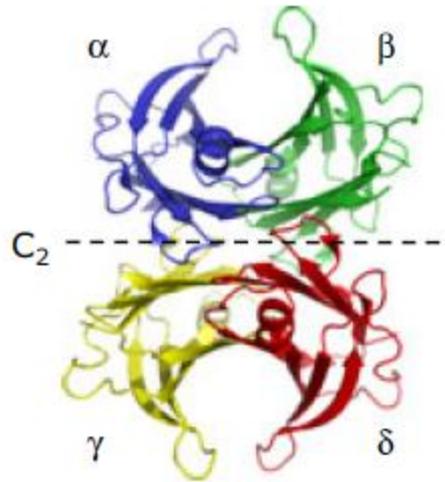


Figura I-3 Diagrama da estrutura nativa da TTR, em que cada monómero se encontra marcado com uma cor diferente (subunidade α : azul; subunidade β : verde; subunidade γ : amarelo e subunidade δ : vermelho). A linha representa o eixo cristalográfico sobre o qual uma rotação de 180° converte o dímero AB em CD (Y. Sekijima 2014)

A sequência da TTR está localizada no cromossoma 18q11-q12.1 (S. Sparkes *et al.*, 1987), o qual possui um promotor proximal, 4 exões, 3 intrões e um tamanho em sequência de 7 Kb. O exão 1 codifica um péptido sinal de 20 aminoácidos e os 3 primeiros aminoácidos da proteína madura, o exão 2 codifica para o intervalo de aminoácidos 4-47, o exão 3 codifica o intervalo de aminoácidos 47-92 e por último o exão 4 codifica o intervalo de aminoácidos 93-127, tal como revisto por Y. Sekijima 2014. Foram identificados alguns elementos na sua sequência como a TATA e a CAAT boxes, locais de ligação para os fatores de transcrição HNF-1, C/EBP, HFN-3 e HNF-4 (Sakaki *et al.*, 1989). Relativamente à sequência desta proteína encontra-se altamente conservada ao longo da evolução, apresentando 80% de identidade com as restantes sequências mamíferas, tal como revisto por X. Hou *et al.*, 2007.

Tem como função o transporte de tiroxina (T4) e de retinol (que corresponde à vitamina A) através da formação de um complexo com o retinol binding protein (RBP) (Ueda & Ando 2014). Para além do transporte de tiroxina e vitamina A, a TTR possui atividade proteolítica. São conhecidos alguns substratos, nomeadamente o péptido β -amilóide ($A\beta$), apolipoproteína A-I e o neuropéptido Y amidado (tal como revisto por Prapunpoj & Leelawatwattana 2009). A TTR sequestra e cliva o $A\beta$ no fluído cerebrospinal, impedindo que este agregue, o que diminui a progressão da doença do Alzheimer (tal como revisto por Prapunpoj & Leelawatwattana 2009). Quanto à apolipoproteína A-I, a TTR cliva o seu C-terminal, diminuindo a sua habilidade de promover o fluxo de colesterol. Por último, o neuropéptido Y é o neuropéptido mais abundante do cérebro e do sistema nervoso autónomo, que ao ser clivado na sua forma amidada promove a regeneração axonal dos neurónios, tal como revisto por Prapunpoj & Leelawatwattana 2009.

Possui uma concentração plasmática de 0.25g/L (revisto por X. Hou *et al.*, 2007). É ainda importante referir que possui um tempo de meia vida de 2-3 dias, sendo degradada no fígado (Makover *et al.*, 1988).

2.2. Mutações e amiloidogenicidade

A mutação mais comum no gene da TTR como causa da PAF é a V30M, que corresponde à substituição de uma valina por uma metionina na posição 30 (tal como revisto por Ando *et al.*, 2013 e por Parman *et al.*, 2016). Esta mutação força a separação de duas folhas β de cada monómero, resultando numa distorção da cavidade de ligação da tiroxina. Esta alteração na estrutura da cavidade diminui a sua afinidade para o ligando e altera a sua função, tal como revisto por X. Hou *et al.*, 2007. Contrariamente à mutação V30M, a mutação L55P, que corresponde à substituição de uma leucina por uma prolina na posição 55 possui um age onset na casa dos 20 anos, tal como revisto por Johnson *et al.*, 2012. Por sua vez, Coelho *et al.*, em 1996 identificou uma mutação benigna numa família Portuguesa. Esta mutação, a T119M estabiliza o tetrâmero e suprime o carácter amiloidogénico da PAF.

As mutações que mais perturbam a estrutura do tetrâmero da TTR são também as que possuem um age onset inferior, isto é, cujos sintomas da patologia aparecem em idades entre os 20-40 anos. No entanto, as mutações que alteram mais a estrutura da TTR (D18G e A25T) não são as mais patogénicas, tal como revisto por Johnson *et al.*, 2012.

2.3. Patogénese: os modelos de agregação da TTR

Atualmente, o modelo aceite para descrever a toxicidade da PAF consiste na perda de estabilidade do tetrâmero da TTR devido à presença de mutações pontuais, que culminam na dissociação em dímero e monómero. O processo de agregação da TTR inicia-se com a dissociação da estrutura tetramérica da TTR em monómeros. Estes adquirem um carácter amiloidogénico, uma vez que perdem a sua estrutura. Este passo necessita de condições desnaturantes para ocorrer. Estes formam agregados rapidamente, uma vez que a forma desnaturada dos monómeros é mais estável que a forma com estrutura definida. Assim que se formam os agregados (também designados por oligómeros) formam-se as fibras amilóides como se pode verificar na **figura I-4**, tal como revisto por Hurshman *et al.*, 2004 e por Johnson *et al.*, 2012. O processo de agregação da TTR comparativamente ao descrito no capítulo 1 (formação geral de fibras amilóides) não possui a fase de nucleação, tal como revisto por Johnson *et al.*, 2012. Cada passo deste processo é irreversível e termodinamicamente estável e a concentração de monómeros propensa a agregação, tal como revisto por Hurshman *et al.*, 2004 e por Johnson *et al.*, 2012.

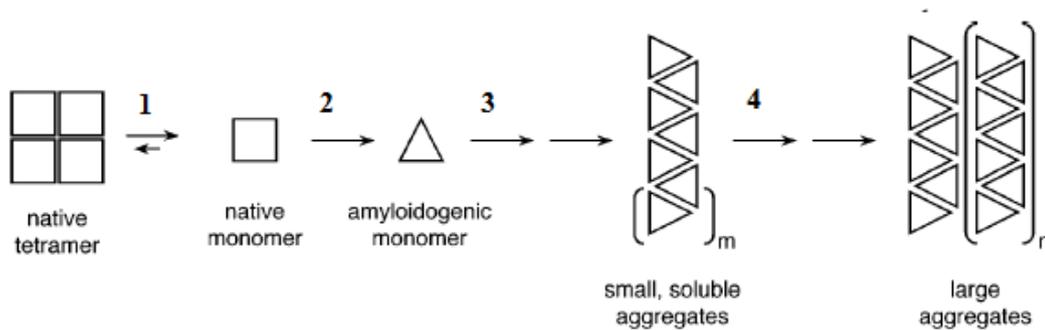


Figura I-4 Modelo de formação de fibras amilóides da TTR (Adaptado de Hurshman *et al.*, 2004)

A eficiência da amiloidogenicidade é dominada pela extensão da destabilização termodinâmica, a qual determina a concentração de monómeros existentes. Por exemplo, a mutação V122I é amiloidogénica porque forma tetrâmeros instáveis e que se dissociam rapidamente, apesar dos monómeros serem tão estáveis quanto a TTR-WT. Um exemplo oposto é a mutação L55P, cujos tetrâmeros são estáveis enquanto que os monómeros associados são extremamente instáveis, tal como revisto por Johnson *et al.*, 2012.

Ainda não é conhecida qual a causa que desencadeia a dissociação do tetrâmero da TTR, no entanto, considera-se que o carácter ácido das vesículas de transporte da TTR quer para fora quer para dentro da célula possam potenciar a sua dissociação e consequente perda de estrutura dos monómeros (Johnson *et al.*, 2012).

Os oligómeros e as fibras amilóides são responsáveis por diversas questões de toxicidade. Nomeadamente, as fibras amilóides são estruturas com alguma rigidez e interferem com a integridade da bicamada lipídica e podem mesmo levar à rutura da mesma, o que em último caso poderá levar à morte celular. Já os oligómeros são por si só uma fonte de toxicidade. Esta questão prende-se com o fato de não possuírem uma estrutura nativa correta e de terem os grupos hidrofóbicos expostos podendo desta forma interagir inapropriadamente com componentes celulares tais como lípidos e ácidos nucleicos, tal como revisto por Knowles *et al.*, 2014. Além do mais, aumentam a permeabilidade iónica, nomeadamente o transporte de cálcio que causa a degeneração das sinapses nervosas, o que em último caso poderá conduzir à morte celular. Para além do aumento da permeabilidade iónica, levam à desregulação das funções mitocondriais e induzem a formação de espécies reativas de oxigénio (ROS), as quais induzem o stress celular e danificam lípidos, proteínas e DNA. Por fim, são na realidade os oligómeros os responsáveis pelo desenvolvimento de diversas doenças como a doença de Parkinson, a doença de Alzheimer, PAF e Doença de Huntington, tal como revisto por Fändrich 2012.

3. A TTR e outras doenças degenerativas

Para além da PAF, a TTR está também associada a outras doenças neurodegenerativas, nomeadamente a Amiloidose Sistémica Senil, também designada por SSA, a Cardiomiopatia Amiloidótica Familiar (também designada por FAC) e a Amiloidose associada ao sistema nervoso central (CNSA).

A Amiloidose Sistémica Senil apresenta também depósitos amilóides de TTR-WT, mas não está associado a nenhuma mutação. Possui em age onset perto dos 80 anos, sendo que afeta 25% da população com idade superior a 80 anos e um dos órgãos mais afetados é o coração, como revisto por Johnson *et al.*, 2012, Landers *et al.*, 2013 e por Kelly 1997. A Cardiomiopatia Amiloidótica Familiar é uma manifestação clínica dominante em pacientes com a mutação V122I, sendo esta a mais comum. Pode também ocorrer em pacientes com as mutações T60A, I68L, L111M ou S77Y. Esta patologia está associada a um age onset tardio e é caracterizada uma deposição amilóide progressiva de TTR no miocárdio levando ao aumento da espessura das paredes dos ventrículos, culminando numa severa falha do coração, tal como revisto por Alina Tantau *et al.*, 2015. A Amiloidose associada ao sistema nervoso central é causada pela deposição de fibras amilóides nas leptomeninges do cérebro que culmina em demência.

4. Glicação

O modelo atual de agregação da TTR não explica totalmente os aspetos que levam à formação de fibras amilóides. Existem vários pontos ainda sem explicação. Nomeadamente, as mutações não são um requisito para a formação de fibras amilóides. Para além disso, a TTR-WT é responsável por depósitos amilóides que resulta na doença Amiloidose Sistémica Senil (Westermarck *et al.*, 1990). Por fim, existem um número considerado de portadores de mutações de TTR que são assintomáticos a vida toda. Outro ponto importante a ter em conta é a variação de age onset entre pacientes portadores da mesma mutação (Rudolph *et al.*, 2008) sem haver explicação plausível. Gomes *et al.*, 2005 descobriram que as fibras amilóides de pacientes PAF apresentam níveis elevados de argpirmidina e da Costa *et al.*, 2011 verificou que os pacientes sintomáticos PAF possuíam níveis de glicação no plasma superiores aos pacientes controlo e PAF assintomáticos. Portanto, é importante perceber qual o papel da glicação na formação de fibras amilóides de TTR e se esta pode ser considerada um fator não-genético potenciador da PAF. Mais ainda Fonseca *et al.*, 2016 mostraram que um dos interactuantes da TTR está diferencialmente glicado em pacientes sintomáticos de PAF e que esta modificação altera a sua capacidade para estabilizar o tetramero de TTR.

A glicação, também designada por reação de Maillard, é uma reação não enzimática entre açúcares redutores (como por exemplo a glucose) e outras moléculas (como por exemplo proteínas, lípidos e ácidos nucleicos) dando origem a produtos avançados de glicação (AGEs) (revisto por Gkogkolou & Böhm 2012 e por R. Singh *et al.*, 2001). A presença e interação dos AGEs altera as propriedades químicas e funcionais das moléculas, modifica interações enzimáticas, interações proteína-DNA, interações proteína-proteína, regulação de DNA e

modulação epigenética (revisto por Gkogkolou & Böhm 2012). Foi descrita pela primeira vez por Louis Camille Maillard em 1912. Durante a reação de Maillard, os grupos carbonil dos açúcares reagem com resíduos de lisina ou arginina (grupos livres de aminoácidos), formando uma base de Schiff não-estável. De seguida dá-se o rearranjo para um composto mais estável, o produto de Amadori, terminando no AGE (**figura I-5**) (revisto por Gkogkolou & Böhm 2012). Alguns dos compostos mais importantes resultantes desta reação são o 3-deoxyglucosono (3-DG) e o metilglioxal (MGO), tal como revisto por R. Singh *et al.*, 2001.

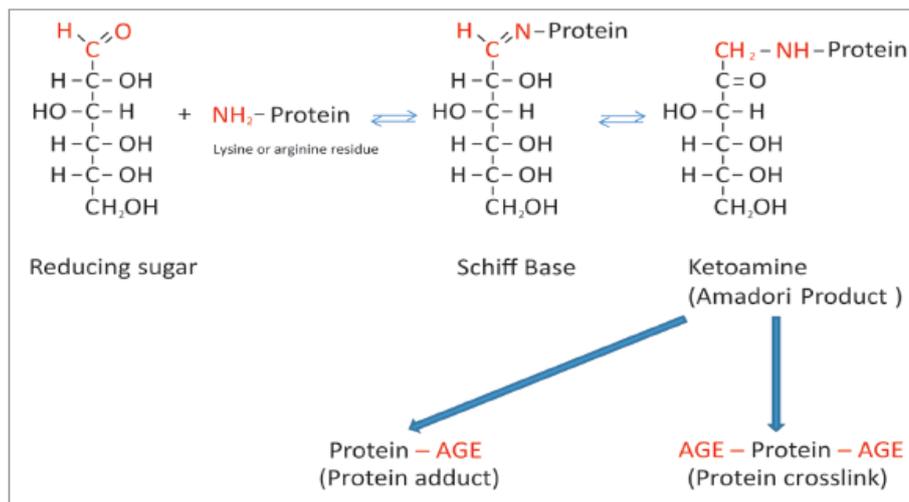


Figura I-5 Reação de Maillard (Gkogkolou & Böhm 2012)

As bases de Schiff e os produtos de Amadori são produtos reversíveis. No entanto, podem reagir irreversivelmente com resíduos de aminoácidos ou proteínas formando aductos ou proteínas com crosslinks, como exemplificado na **figura I-5**. Podem também sofrer alterações devido a processos como a oxidação, desidratação e polimerização, dando origem a AGEs. As espécies reativas de oxigénio (ROS) ou metais redox activos podem também acelerar o processo de formação de AGEs (revisto por Gkogkolou & Böhm 2012).

Os AGEs podem ser ingeridos através da dieta ou então produzidos endogenamente. A formação endógena está aumentada em pessoas com diabetes e é também influenciada por fatores ambientais como a dieta e o tabaco (revisto por Gkogkolou & Böhm 2012 e por R. Singh *et al.*, 2001). São formados em grandes quantidades também como resultado dos processos de envelhecimento. O envelhecimento é definido como a acumulação progressiva de danos ao longo do tempo, levando ao distúrbio das funções celulares. É um processo complexo, sujeito a diversas variáveis como por exemplo variações genéticas endógenas e fatores ambientais. (revisto por Gkogkolou & Böhm 2012).

A quantidade de AGEs no organismo não é apenas definida pela velocidade de formação mas também pela velocidade de degradação. As vias de destoxificação são uma forma de eliminar os AGEs, sendo um exemplo o sistema dos glioxalases dependente de glutatióno. Este sistema possui dois tipos de glioxalases (Glioxalase I e Glioxalase II) que usam o glutatióno reduzido (GSH) para converter glioxal e metilglioxal em D-lactato, composto menos tóxico. Existem

outros sistemas de degradação, nomeadamente os FAOXs (fructosil-amina oxidases), mas que são apenas expressos em bactérias, leveduras e fungos (revista por Gkogkolou & Böhm 2012).

A ligação dos AGEs aos seus recetores (RAGE) propencia as suas atividades. O RAGE é um ligando que pertence à superfamília das imunoglobulinas, codificado no cromossoma 6. Este liga-se e ativa vias de sinalização de resposta ao stress. São exemplos as vias de sinalização de cinases (ERK e MAPK), o fator de transcrição NFkB. A ativação de RAGE inicia cascatas de sinalização (MAPK, JUNK) que influenciam vários processos celulares (ciclo celular, proliferação, expressão génica, inflamação e síntese da matriz celular), induz o stress oxidativo, diminui a atividade do superóxido dismutase e diminui a atividade antioxidante da célula (revisto por Gkogkolou & Böhm 2012 e por X. Hou *et al.*, 2007).

5 – Tratamentos

5.1 Transplantes

5.1.1 Transplante hepático de cadáver (CLT)

A transplantação veio revolucionar o curso da medicina, possibilitando a substituição de um órgão danificado ou com patologias associadas. O primeiro transplante foi efetuado por Starzl em 1963 na Universidade do Colorado, Estados Unidos da América (Starzl *et al.*, 1963). Esta técnica foi iniciada na PAF em 1990 na Suécia (Holmgren *et al.*, 1991) na tentativa de regredir os sintomas da doença. Trata-se de um tratamento eficaz uma vez que a produção de TTR mutada é cessada e substituída por TTR WT (à exceção da porção de TTR sintetizada na retina e no plexos coróide) devido ao seu curto tempo de meia vida, tal como revisto por Ueda & Ando 2014 e por Carvalho *et al.*, 2015. Para isso, o transplante deverá ser feito o mais cedo possível, de preferência assim que apareçam os primeiros sintomas, os quais terão de ser confirmados com biópsias, tal como revisto por Ando *et al.*, 2013. No entanto, a doença pode persistir uma vez que pode ocorrer deposição de TTR-WT nas fibras amilóides pré-existentes (Carvalho *et al.*, 2015). Contudo, a função neuronal raramente sofre melhoras após o transplante (Ando *et al.*, 2013).

5.1.2 Transplante hepático sequencial (dominó) (DLT)

Os pacientes que recebem um transplante em dominó (DLT) normalmente são doentes com patologias hepáticas à exceção da PAF, como por exemplo carcinomas e hepatites, tal como revisto por Suhr *et al.*, 2000. A técnica consiste na remoção de um fígado de um doente PAF que é inserido num doente com distúrbios metabólicos enquanto que o paciente PAF recebe um fígado novo (Wilczek *et al.*, 2008), tal como representado na **figura I-6** e foi realizada pela em Portugal a 1995 por Alexandre Furtado e a sua equipa no Hospital da Universidade de Coimbra (Furtado *et al.*, 1997).

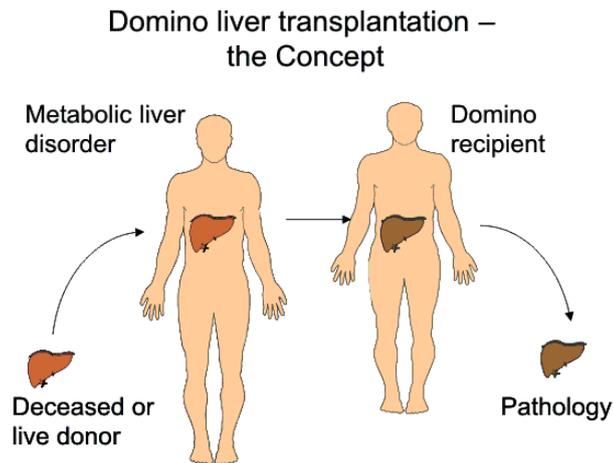


Figura I-6 Esquema de transplante em dominó (Adaptado de I)

Esta metodologia veio tentar contrabalançar a escassez de fígados disponíveis para transplante. No entanto, alguns pacientes que receberam um fígado DLT começaram a desenvolver depósitos amiloides após cerca de 5 a 10 anos após o transplante, tal como revisto por Planté-Bordeneuve & Said 2011 e Ueda e Ando 2014.

5.2. Outros tratamentos

O transplante de fígado é a terapia mais eficaz e mais utilizada em doentes PAF. No entanto, é de máxima urgência encontrar terapias mais simples, menos evasivas e que permitam substituir o transplante hepático devido à sua escassez. Estas terapias podem ter como objetivo estabilizar a TTR, de forma a que ela mantenha a sua estrutura nativa através da ligação de um ligando, evitando que esta agregue (tal como revisto por Härd and Lendel 2012). Este princípio foi demonstrado pela primeira vez em 1996 com a tiroxina (T4), o ligando natural da TTR e com o 2,4,6-triiodofenol, tal como revisto por Johnson *et al.*, 2012. Ou então podem ainda ter como objetivo manter a forma monomérica sequestrada por uma proteína de ligação, impedindo que esta promova a agregação, tal como revisto por Härd and Lendel 2012. Enumeram-se de seguida algumas terapias:

- Tafamidis é um agente que estabiliza cineticamente a TTR, limitando a sua dissociação em monómeros, um passo crítico na formação de fibras amiloides (Ando *et al.*, 2013). Possui como efeitos secundários infeções urinárias frequentes e diarreia (Barreiros *et al.*, 2015). É até ao momento o único fármaco aprovado pela European Medical Authority (EMA) (Barreiros *et al.*, 2015)
- Diflunisal é um agente não-esteróide com propriedades anti-inflamatórias que estabiliza os tetrâmeros da TTR *in vitro* através da ligação ao centro de ligação para a T4, prevenindo a sua agregação e consequente formação de fibras amiloides (Ando *et al.*, 2013; Barreiros *et al.*, 2015). Ainda não se encontra aprovado pela EMA (Barreiros *et al.*, 2015).
- ALN-TTR01/02 são moléculas de RNA interferência, que suprimem a expressão da TTR (Ando *et al.*, 2013). Estas ligam-se à porção não-translocada do

mRNA da TTR o que resulta na sua degradação (impede a transdução da TTR quer mutada quer WT) (Barreiros *et al.*, 2015).

- ISIS-TTRRx é uma terapia antisense que suprime a expressão do RNA que codifica a TTR (Ando *et al.*, 2013; Barreiros *et al.*, 2015).

6. Turnover proteico

Após o transplante hepático com o objetivo de controlar o desenvolvimento da PAF é esperado uma diminuição da TTR V30M na circulação. Esta será degradada e substituída por TTR-WT sintetizada pelo novo fígado. A TTR é uma proteína importante para o correto transporte de vitamina A e de tiroxina pelo que a sua concentração total não pode ser extinta. Assim sendo, as proteínas tal como o DNA, lípidos, RNA são de extrema importância para o correto funcionamento celular. Posto isto, deve ocorrer um balanço exato dos níveis proteicos entre a síntese e a degradação de proteínas que corresponde ao turnover proteico, o qual difere entre compartimentos celulares, tecidos e órgãos. (Kuhar 2010). O total de proteínas sintetizadas num homem adulto por dia está na ordem dos 3 g/kg enquanto que o total de proteínas degradadas num homem é 5.7 g/kg (J.R. Poortmans *et al.*, 2012). Este processo é de extrema importância para a resposta da célula a uma alteração no seu metabolismo, pelo que é expectável que uma proteína com elevado turnover seja uma proteína reguladora uma vez que precisa de ter uma resposta rápida face a alterações celulares. Por outro lado, proteínas com baixo turnover poderão estar associadas a proteínas de elevada abundância e responsáveis pela manutenção dos constituintes celulares. Por último é também de extrema importância na remodelação de tecidos e na remoção de proteínas degradadas, tal como revisto por Claydon & Beynon 2012. O turnover da TTR é de 2/3 dias (Makover *et al.*, 1988), pelo que após o transplante é suposto haver uma eliminação da TTR mutada da circulação após esse intervalo.

Para calcular o turnover basta dividir a taxa de síntese da proteína pela taxa de degradação da mesma tal como elucidado na equação 1 (Claydon & Beynon):

$$\textit{Turnover} = \frac{k_{\textit{síntese}}}{k_{\textit{degradação}}} \quad \textit{equação 1}$$

A análise do turnover é feita através da ingestão de isótopos estáveis, o qual foi Schoenheimer que iniciou em 1935 (Claydon & Beynon 2012). Esta técnica é baseada na ingestão de isótopos estáveis, por exemplo água marcada ($^2\text{H}_2\text{O}$), e pode ser analisada de duas formas: monitorizando a marcação de proteínas ou então o desaparecimento desta marcação que foi feita *à priori*. Desta forma, mesmo que os níveis totais proteicos não variem, é possível seguir o turnover proteico. Por fim, as amostras são analisadas por espectrometria de massa para quantificar a marcação através da técnica SILAC que permite comparar amostras marcadas com isótopos pesados e leves. Como inicialmente todas as amostras são marcadas com um tipo de isótopo e em seguida este é substituído por outro tipo, as proteínas sintetizadas de novo irão apresentar a segunda marcação, enquanto que as proteínas que ainda não foram degradadas nem sintetizadas de novo vão ter ainda a marcação com o primeiro isótopo, tal como revisto por Claydon & Beynon 2012.

I - INTRODUÇÃO

Outro conceito importante a aprofundar é o tempo de meia vida de uma proteína. O tempo de meia vida ou $t_{1/2}$ corresponde ao tempo para o qual ocorre a substituição de metade das moléculas desse compartimento. Este parâmetro pode também sofrer alterações ao nível dos seus valores se analisarmos a mesma proteína em compartimentos celulares diferentes. O turnover proteico bem como o tempo de meia vida são marcadores importantes no acompanhamento de tratamentos, uma vez que sofrem sempre variações mesmo quando os níveis totais de proteína não se alteram. Estes dois parâmetros podem ser associados, isto é, uma proteína com um turnover rápido possui um tempo de meia vida curto e uma proteína com um turnover lento possui um tempo de meia vida mais longo, tal como revisto por Kuhar 2010. O tempo de meia vida médio para uma proteína é de $\pm 10h$ (Claydon & Beynon 2012)

II – MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo apresenta-se uma introdução aos aspectos básicos das metodologias utilizadas no desenvolvimento do trabalho prático, os protocolos experimentais otimizados e a proveniência dos materiais utilizados.

1 - Obtenção das amostras de plasma e sangue humano

1.1 Colheita

Foram realizadas colheitas de sangue em indivíduos não portadores de mutações conhecidas da TTR (controlos), em indivíduos não transplantados com manifestações clínicas da doença (PAFNT), em pacientes que foram sujeitos a um transplante de fígado de cadáver (designados por CLT, por possuírem sintomas da PAF) e em pacientes que foram sujeitos a um transplante de fígado PAF (designados por DLT, uma vez que sofrem de uma patologia hepática não relacionada com a PAF). Para além destes, foram usadas amostras de pacientes denominados BH, que foram sujeitos a um transplante de fígado cadáver e que correspondem a vários tempos de transplantação, o que permite monitorizar a variação dos constituintes no plasma e no sangue

Tabela II-1 Descrição das amostras de plasma e/ou de sangue humano utilizadas durante o trabalho experimental. NA - não aplicável.

Nome amostra	Tipo de amostra	Portador TTR V30M	Idade	Género	Tempo recolha após transplante
C6	Plasma	NÃO	23	F	NA
C8	Plasma	NÃO	23	F	
PAFNT 3A	Plasma	SIM	36	F	
PAFNT 4A	Plasma	SIM	31	M	
PAFNT 6	Plasma	SIM	39	F	
CLT 16A	Plasma	SIM	34	M	34 meses
CLT 23G	Plasma	SIM	28	M	120 horas
DLT 10A	Plasma	SIM	55	M	4 anos
DLT 13A	Plasma	SIM	31	F	3 anos
DLT 18E	Plasma	SIM	62	M	120 horas
BH4	BH4A	Plasma e RBC	45	M	0 horas
	BH4B	Plasma e RBC			24 horas
	BH4C	Plasma e RBC			48horas

II – MATERIAIS E MÉTODOS

	BH4D	Plasma e RBC	SIM			72 horas
	BH4E	Plasma e RBC	SIM			96 horas
	BH4F	Plasma e RBC	SIM			120 horas
	BH4G	Plasma e RBC	SIM			144 horas
BH5	BH5A	Plasma e RBC	SIM	43	M	0 horas
	BH5B	Plasma e RBC	SIM			24 horas
	BH5C	Plasma e RBC	SIM			48horas
	BH5D	Plasma e RBC	SIM			72 horas
	BH5E	Plasma e RBC	SIM			96 horas
	BH5F	Plasma e RBC	SIM			120 horas
BH7	BH7A	Plasma e RBC	SIM	41	M	0 horas
	BH7B	Plasma e RBC	SIM			24 horas
	BH7C	Plasma e RBC	SIM			48horas
	BH7D	Plasma e RBC	SIM			72 horas
	BH7E	Plasma e RBC	SIM			96 horas
	BH7F	Plasma e RBC	SIM			120 horas
	BH7G	Plasma e RBC	SIM			144 horas

Para controlos e doentes PAFNT colheram-se amostras de 3 sujeitos representativos de cada grupo, com uma faixa etária compreendida entre os 18 e os 37 anos. Em transplantados, usaram-se 4 amostras por grupo (CLT e DLT) provenientes de indivíduos com idades compreendidas entre os 24 e 61 anos. Nos indivíduos BH transplantados com fígado cadáver, as colheitas foram feitas 2, 10, 26 e 48 meses após a intervenção cirúrgica, tendo as colheitas dos pacientes BH4, BH5 e BH7 sido a 7 tempos diferentes (A= dia do transplante; B = 24 horas após o transplante; C = 48 horas após o transplante; D = 72 horas após o transplante; E = 96 horas após o transplante; F = 120 horas após o transplante e G = 144 horas após o transplante). Todos os sujeitos são portadores heterozigóticos para a mutação V30M, há exceção de controlos e pacientes DLT que não possuem nenhuma mutação conhecida para a TTR (**Tabela II-1**).

As amostras de foram centrifugadas a 1,800 g durante 5 minutos a 4°C, e o plasma (sobrenadante) foi armazenado em alíquotas de 200µL a -80°C, já ao *pellet* foi adicionado um tampão de lavagem, de forma a recuperar as *red blood cells*. Todos os sujeitos deram o seu consentimento por escrito, e o protocolo foi aprovado de acordo com as regras éticas de EEC (*Executive Ethics Commission*).

2. Eletroforese desnaturante unidimensional: SDS-PAGE

2.1 Fundamentos teóricos

O termo eletroforese refere-se ao movimento de moléculas carregadas em resposta a um campo elétrico, resultando assim na sua separação em que as moléculas mais pequenas migram mais rápido e mais longe no gel (Adaptado de II; Adaptado de III; Hames 1990). Neste campo elétrico, as moléculas irão migrar para o elétrodo com carga oposta, como ilustrado na **figura II-7**. Eletroforese pode também ser comumente designada por SDS-PAGE (do inglês, *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) e foi descrita pela primeira vez por Laemmli em 1970, uma vez que este adicionou o SDS ao PAGE (Adaptado de II, Hames 1990). Pode ser usado de forma a purificar de proteínas, verificar a regulação da expressão proteica ou determinar atividade enzimática, ponto isoelétrico (PI) ou tamanho da proteína. Dentro deste processo é possível englobar diversas técnicas, nomeadamente eletroforese em gel, focagem isoelétrica (IEF), transferência de eletroforese (*Blotting*) ou a eletroforese a duas dimensões (2-D). É, portanto, um método simples, rápido e altamente sensível para o estudo proteico. Existem diversos fatores que afetam este processo, nomeadamente a força/intensidade do campo elétrico, o pH, força iónica, a concentração do tampão usado, e a forma, carga e tamanho das próprias proteínas. Nesta técnica a amostra corre num suporte feito em poliacrilamida ou em agarose, sendo que a agarose é maioritariamente usada para separar moléculas grande, como por exemplo DNA (>300kDa) e a poliacrilamida é usada para moléculas mais pequenas (5-250kDa). (Adaptado de II; Hames 1990).

Existem dois tipos de sistemas de eletroforese:

- Sistema contínuo: usam o mesmo tampão a pH constante quer no gel, amostra e reservatório do elétrodo. Este método não é comum ao nível do estudo proteico, mas é usado na análise de ácidos nucleicos.
- Sistema descontínuo: neste método, o gel é composto por duas porções (porção de resolução a pH 6.8 e a porção de concentração a pH 8.8) sendo que o tampão usado no reservatório é diferente também (Adaptado de II; Adaptado de III; Hames 1990).

O sistema descontínuo é o mais eficiente, possui maior resolução e é também o mais comum (Adaptado de II; Adaptado de III).

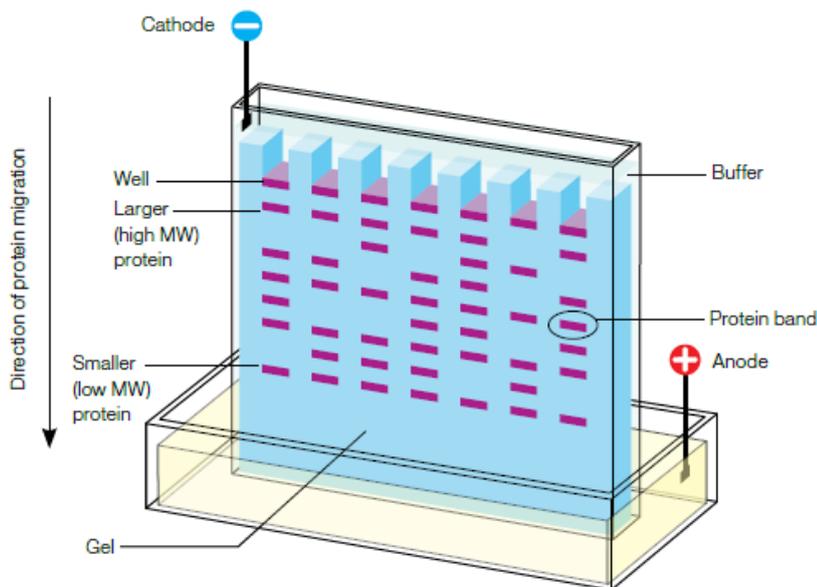


Figura II-7 Esquema de uma separação proteica num gel de poliacrilamida (Adaptado de II)

Os compostos que formam a poliacrilamida são a acrilamida monomérica e o *N,N'*-methylene-bisacrylamide (bisacrilamida) e precisam de um sistema de formação de radicais livres, nomeadamente o tetrametiletenodiamina (TEMED) e o persulfato de amónio (APS). O APS ao se dissolver na água forma radicais livres de persulfato que ativam o monómero da acrilamida; por sua vez o TEMED serve de acelerador catalítico uma vez que possui a habilidade de transportar eletrões. O monómero da acrilamida ativado pode por sua vez interagir com os monómeros inativos enquanto a bisacrilamida promove interações de *cross-link* com a acrilamida e produz assim uma longa cadeia de poliacrilamida. A riboflavina também pode ser usada como gerador de radicais livres. O tamanho do poro do gel é definido pela quantidade total de acrilamida usada por unidade de volume e também pelo nível de *cross-linkage*. Quanto maior o *cross-linkage* menor será o tamanho do poro e conseqüentemente a velocidade de polimerização condiciona também o tamanho do poro, uma vez que velocidades elevadas de polimerização resultam num poro menos poroso. A composição da resolução dos géis é feita com base nas letras T e C, isto é T correspondem à percentagem da concentração total de ambos os monómeros (acrilamida e bisacrilamida) em gramas por 100 mL. Já a letra C corresponde à percentagem de *cross-linkage* relativo face ao total dos monómeros. Desta forma, o ajuste entre ambas as letras e a concentração de acrilamida deverá ser equilibrada para que o processo seja o mais eficiente possível (Hames 1990). (Adaptado de II, Hames 1990).

O SDS é um detergente aniónico que é utilizado no gel para desnaturar e promover a dissociação da estrutura tridimensional das proteínas, adquirindo uma “linear” através da ruptura das interações hidrófobas que mantêm a forma globular. Para além disso, tendo em conta que mascara a carga de todas as proteínas negativamente ainda se liga com uma estequiometria constante para qualquer uma, atribuindo uma relação carga/massa uniforme (Adaptado de II). A utilização de agentes redutores na preparação de amostras, como por exemplo o β -mercaptoetanol, que rompe as ligações persulfureto intra e intermoleculares, favorecendo assim o completo *unfolding* das proteínas e no estado reduzido (Adaptado de II).

2.2. Os géis

As proteínas foram separadas por SDS-PAGE num sistema Mini-PROTEAN® 3 Cell (Bio-Rad) ou Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad). Os mini-géis de concentração e de resolução (com 8.3cm de largura, 7.3cm de altura e 1 mm de espessura) foram feitos com uma percentagem de acrilamida de 4 e 12, tendo por base a tabela (**Tabela II-2**).

Tabela II-2 Composição dos géis de concentração e separação à % de acrilamida indicada. Volumes indicados para 1 gel.

<u>Reagentes [l]</u>	<u>Gel Concentração (4%)</u>	<u>Gel Separação (12%)</u>	<u>Marca</u>
Água	1,59 mL	2,175 mL	
0,5M Tris-HCl pH 6,8	630 uL	-	
1,5M Tris-HCl pH 8,8	-	1,25 mL	
Acrilamida/Bis 40%	250 uL	1,5 mL	NZYtech
SDS 10%	25 uL	50 uL	NZYtech
APS 10%	25 uL	50 uL	Bio-Rad
TEMED	2,5uL	5uL	Merck

2.3 Tratamento e aplicação das amostras**2.3.1 Amostras de plasma e de sangue**

As amostras de plasma e de sangue foram diluídas 10 vezes em água do tipo I (ultrafiltrada e esterilizada produzida em equipamento MilliPore). A 20µg de proteína total adicionaram-se 10µL de *Loading buffer* (62.5mM Tris-HCl pH 6.8, 20% glicerol, 2% SDS, 5% β-mercaptoetanol, 0.01% azul bromofenol). As amostras foram aplicadas no gel. O glicerol, o β –mercaptoetanol o Azul de bromofenol foram adquiridos à Merck.

2.4 Corrida eletroforética

Após aplicadas as amostras e os marcadores de massa molecular de 245 a 11kDa (5µL, NZYColour Protein Marker II, NZYtech), a electroforese foi efectuada em Tampão de Corrida

Desnaturante (25mM Tris, 192 mM glicina, 0.1% SDS; pH \approx 9), com uma fonte de alimentação PowerPac Basic Power Supply™ (Bio-Rad). A separação foi realizada a uma diferença de potencial de 50 V. A separação foi concluída quando o *loading buffer* atingiu o fim do gel de resolução.

2.5 Coloração dos géis

As bandas contendo proteína foram visualizadas após coloração com o Azul Coomassie (50% água, 40% metanol, 10% ácido acético glacial, 0,1% (m/v) Coomassie R-250) O/N (do inglês, *overnight*) com agitação constante seguida de descoloração em Solução Descorante (50% água, 40% metanol, 10% ácido acético glacial). O metanol e o ácido acético glacial são da Merck, a água utilizada foi do tipo II e o Coomassie R-250 adquirido à Bio-Rad. Foram também corados alguns géis com prata de acordo com o kit Silver Staining Kit, Protein da GE Healthcare Sciences. Os géis foram digitalizados no aparelho Image Quant LAS 500 da GE Healthcare Sciences.

3. Western Blot

3.1. Fundamentos teóricos

O termo blotting corresponde à transferência de amostras biológicas separadas previamente num gel SDS-PAGE para uma membrana, na qual será possível fazer a sua identificação e quantificação através da marcação de anticorpos específicos. Foi introduzida pela primeira vez por Towbin *et al.*, em 1979. Esta técnica permite uma abordagem qualitativa e semi-quantitativa da presença de proteínas numa mistura biológica (Adaptado de III, Mahmood & Yang 2012). A largura da banda apresentada após a deteção corresponde à quantidade de proteína presente. A marcação por anticorpos pode seguir um método direto ou indireto, também ilustrados na **figura II-8**:

- Método direto: a marcação é feita por apenas um anticorpo que se encontra marcado e ao reagir com o substrato cria um sinal luminoso;
- Método indireto: a marcação é feita por dois anticorpos, um primeiro anticorpo que reconhece a proteína de interesse, mas que não se encontra marcado, e um segundo anticorpo marcado que reconhece o anticorpo primário e que reage com o substrato.

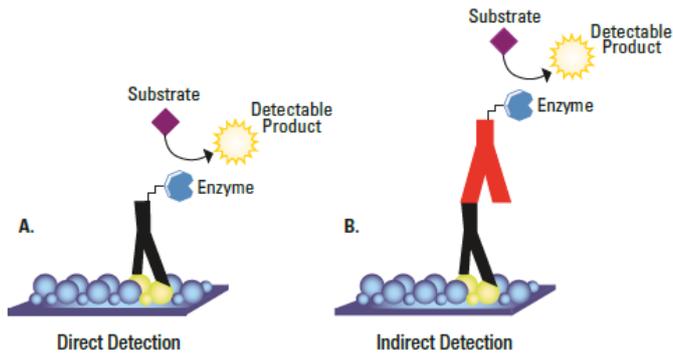


Figura II-8. Dois tipos de marcação de anticorpos, direta e indireta (Adaptado de III)

Após a separação da mistura proteica através de SDS-PAGE, esta é transferida para uma membrana através de um campo magnético orientado perpendicularmente. A membrana deve ser colocada entre a superfície do gel (cujo polo negativo se encontra antes) e o polo positivo para garantir o sucesso do blotting como ilustrado na **figura II-9**.

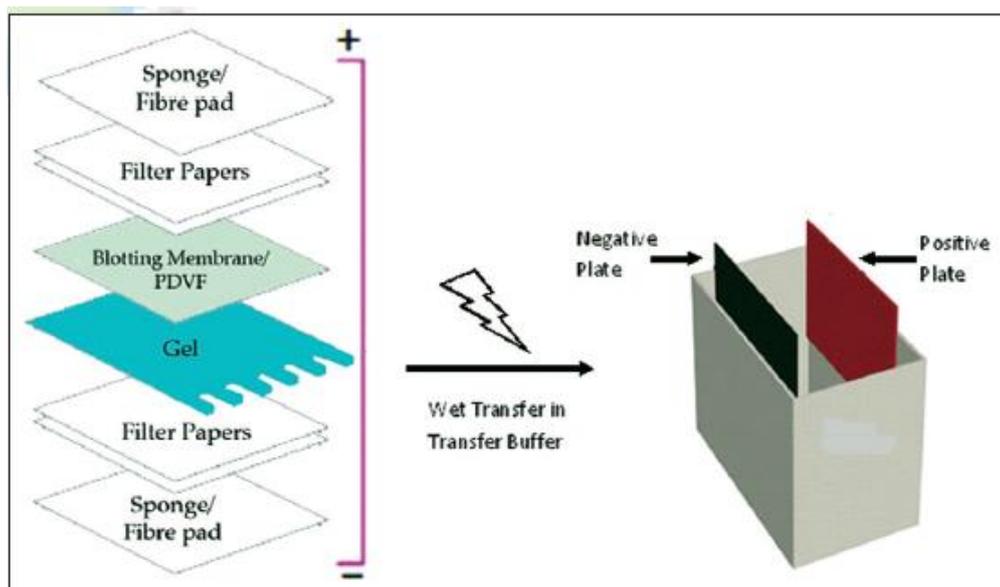


Figura II-9. Montagem da sandwich num Western Blot (Mahmood & Yang 2012)

Esta membrana pode ser de nitrocelulose ou de PVDF. A membrana de nitrocelulose é usada por possuir elevada afinidade para proteínas, no entanto não permite o *reprobing*, isto é, voltar a marcar como novo anticorpo após revelação. Por sua vez, a membrana de PVDF já o permite apesar de ser uma membrana que retém maior ruído. Concluído o *blotting*, é necessário bloquear a membrana de forma a evitar interações não-específicas entre o anticorpo e a membrana. Pode ser feito com BSA 5% ou com leite magro em pó, sendo o último mais comum por ser barato, acessível e inespecífico (Adaptado de III; Mahmood & Yang 2012). Após o bloqueio, que pode ter duração variável, incuba-se a membrana ON com o anticorpo primário

seguinte o passo crucial de lavagem que desta forma elimina os reagentes que não se ligaram à membrana e reduz o ruído que possa advir. Contudo, se ocorrerem passos insuficientes de lavagem poderá advir um elevado ruído aquando da revelação e se ocorrerem demasiados passos de lavagem poderá reduzir a sensibilidade do anticorpo (adaptado de III; Mahmood & Yang 2012). Após este passo de lavagem incuba-se a membrana com o anticorpo secundário que permite amplificar o sinal dado que várias moléculas de anticorpo secundário podem se ligar a uma só molécula de anticorpo primário. A marcação necessária dos anticorpos para que possam ser detetados é normalmente feita através de enzimas ou *dyes* fluorescentes, sendo os enzimas os mais comuns e destacam-se os exemplos o HRP (do inglês *horseradish peroxidase*) e o AP (do inglês, *alkaline phosphatase*). Estes podem ter substratos cromogénicos ou substratos luminescentes (Adaptado de III).

3.2. Transferência

As proteínas foram separadas por SDS-PAGE e em seguida procedeu-se à sua transferência para uma membrana de PVDF (Millipore) previamente ativada em metanol e equilibrada em tampão de transferência, usando o sistema Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad). Dispõe-se a membrana junto ao gel e os dois são empacotados entre materiais absorventes, como esponjas e papel 3MM (esponja, papel, gel, membrana, papel, esponja) como indicado na **figura II-9**. Esta “*sandwich*” é acondicionada por um suporte sólido para assegurar um contacto firme entre o gel e a membrana e submersa em Tampão de Transferência (39mM glicina, 48mM Tris, 0.0375% SDS (m/v), 20% metanol (v/v)). A transferência ocorre a 100V durante 65 minutos. É necessário usar uma cuvette de gelo na tina de electroforese para assegurar a refrigeração do tampão e compensar a produção de calor durante o processo, o qual é prejudicial à eficiência da transferência.

3.3. Bloqueio e incubação com anticorpos 1º e 2º

As membranas foram incubadas 4°C ON (do inglês, *over night*) com agitação constante numa Solução de Bloqueio composta por 5% (m/v) leite em pó dissolvido em TBS-T (10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH 7.5, 0.1% (v/v) Tween 20). Adquiriu-se à Fluka o NaCl e à Sigma o Tween 20. Incubaram-se as membranas em anticorpo primário O/N a 4°C com agitação constante, numa Solução de Incubação com 1% (m/v) de leite em pó em TBS-T. As membranas foram lavadas 4x durante 15 minutos com TBS-T com agitação à temperatura ambiente. Foram depois incubadas com o anticorpo secundário durante 3 horas à temperatura ambiente e com agitação, com a solução de incubação com 1% (m/v) de leite em pó em TBS-T. Por fim, são de novo lavadas com TBS-T 4x durante 15 minutos à temperatura ambiente e com agitação. As diluições dos vários anticorpos utilizados encontram-se na **Tabela II-3**.

Tabela II-3 Anticorpos primários e secundários utilizados nas detecções por Western blotting e diluições otimizadas utilizadas. P = policlonal. M = monoclonal.

Anticorpo	Tipo	Diluição	Marca	Anticorpo Secundário
Transtirretina	P	1/1000	Santa Cruz Biotechnology	Coelho
Argpirimidina	M	1/1000	JaICA	Ratinho
Tetrahidropirimidina	M	1/1000	Santa Cruz	Ratinho
B-actina		1/7000	Sigma	
Coelho	P	1/5000	Sigma	-
Ratinho	P	1/5000	Calbiochem	-

3.4. Revelação

Utilizando um substrato quimioluminescente, o sinal detetado corresponde a um produto transiente, presente apenas enquanto o enzima reage com o substrato (produto limitante da reação). Este sinal diminui de forma progressiva (Adaptado de III). Os anticorpos secundários utilizados no decorrer deste trabalho encontram-se conjugados com o enzima HRP, sendo por isso o luminol o substrato quimioluminescente utilizado para a detecção. Esta reação baseia-se na oxidação do luminol pelo H₂O₂, catalisada pelo HRP, com formação de um produto no seu estado excitado (3-aminofalato). Este produto ao decair para estados de energia mais baixos, liberta fótons com emissão de luz (**figura II-4**) (Adaptado de III).

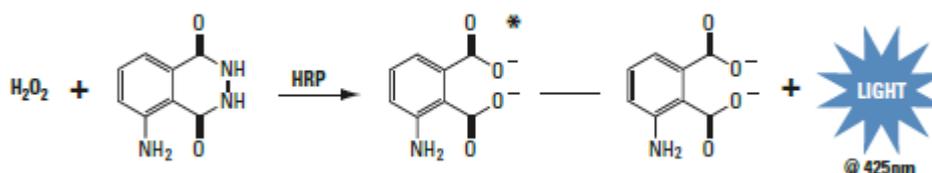


Figura II-10 Reação entre o H₂O₂ e o luminol, catalisada pelo HRP com a formação de 3-aminofalato que emite luz ao decair para estados de energia mais baixos. (Adaptado de III)

Ao longo do trabalho desenvolvido foi utilizado o *kit* de quimioluminescência baseados na reacção acima descrita: ECL™ Prime Western blotting Detection Reagent da GE Healthcare Sciences.

A fase de revelação foi realizada o aparelho Image Quant LAS 500 da GE Healthcare Life Sciences.

3.5. Análise por ImageJ

A contribuição dos sinais obtidos por Western Blot, nomeadamente o sinal da glicação por Argpirimidina e o sinal fornecido pela β -actina como controlo positivo foi avaliada com recurso ao software ImageJ a partir dos dados obtidos no Image Quant LAS 500 da GE Healthcare Sciences. Com o programa mediu-se a intensidade do sinal ao longo de cada *lane*, retirando a fração relativa ao sinal da β -actina permitindo aferir a proporção de glicação presente nas amostras.

4. Purificação da TTR e identificação dos interactuantes da TTR

4.1 Fundamentos teóricos

Por forma a ser possível identificar os interactuantes da TTR V30M, é necessário possuir a proteína purificada, sendo esta obtida através do crescimento de bactérias que possuem a sequência da TTR no seu genoma. O processo de síntese de proteínas *in vitro* é feito através do crescimento de bactérias ou leveduras (a escolha vai depender do trabalho em questão), o qual necessita de ser moldado para que ‘trabalhe’ para nós. Sendo assim, ao inserir um fragmento de DNA que codifica para a proteína em questão, fará com que a bactéria coloque toda a sua maquinaria celular a produzir a proteína codificada do fragmento de DNA, também designado por plasmídeo.

A escolha do plasmídeo é de extrema importância, uma vez que este apresenta diversos constituintes nomeadamente: replicação, promotor, marcador de resistência, etiquetas de afinidade (do inglês *tags*) (Rosano & Ceccarelli 2014). O plasmídeo escolhido para o desenvolvimento deste projeto possui um marcador de resistência à ampicilina, e uma *tag* de Glutathione S-transferase (GST). Desta forma irá ser possível purificar a proteína de interesse e analisar possíveis interactuantes.

O plasmídeo pGEX 4T.2-TTR foi obtido através da clonagem do plasmídeo p426GPD no pGEX 4T.2. A constituição do pGEX 4T.2 apresenta-se na **figura II-11**:

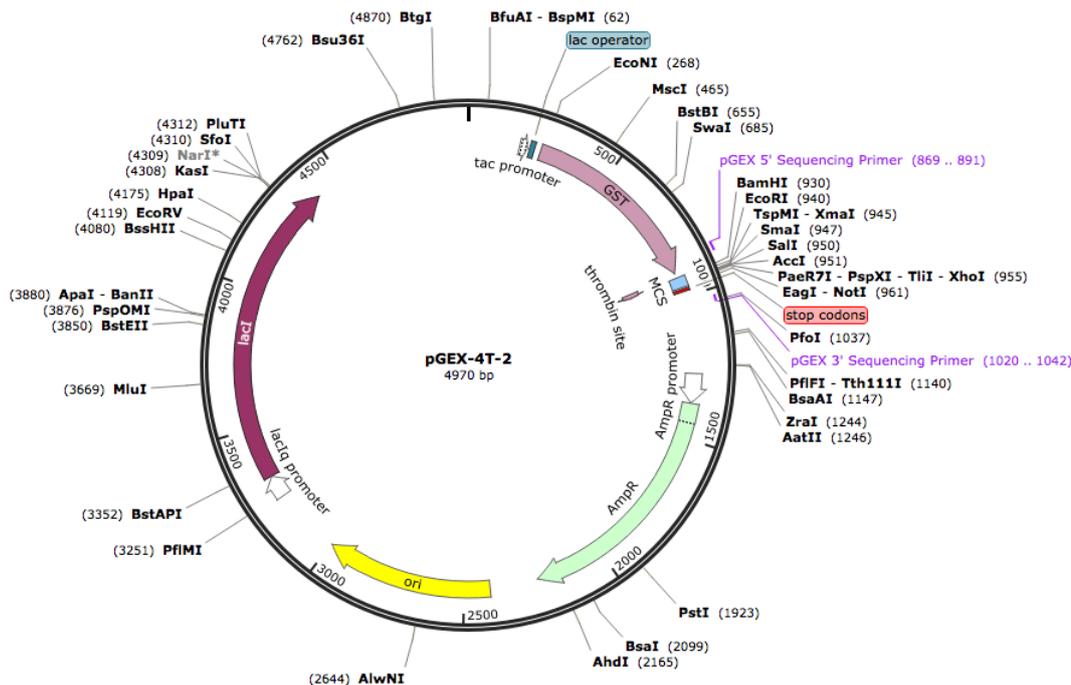


Figura II-11 Constituição do plasmídeo pGEX 4T.2 (Adaptado de IV).

Após a obtenção da proteína produzida pela bactéria e de forma a proceder à identificação de interactuantes da proteína em estudo, pode-se recorrer a técnicas de purificação ou também designadas por cromatografia. Neste trabalho, procedeu-se à realização da técnica de pulldown. Esta técnica é utilizada para identificar a presença de interações proteína-proteína ou para confirmar a presença de interações proteína-proteína já identificadas por outras técnicas, nomeadamente co-immunoprecipitação ou centrifugação por gradiente de densidade) (Adaptado de V). Esta técnica é também designada por purificação de afinidade. Necessita de ter uma proteína de interesse purificada e marcada com uma etiqueta de afinidade (neste caso o GST) que corresponde a um isco, por forma a agarrar as proteínas que interagem com a de interesse. Esta é capturada por uma superfície imóvel, nomeadamente as beads de GST, isto é, as proteínas sintetizadas pelas bactérias são marcadas por GST e ligam-se às beads criando um suporte de afinidade imobilizado. Este suporte é incubado com as possíveis proteínas interactuantes, sendo possíveis identificar através de um SDS-PAGE (Adaptado de V).

4.2 Crescimento de bactérias e expressão da TTR

Por forma a se obter a proteína TTR, inoculou-se uma colónia de bactérias *E. coli* BL21plus com o plasmídeo pGEX 4T.2-TTR em 10 mL de meio Luria Broth (LB) obtido NZYTech suplementado com 50 µg/mL de ampicilina a 37°C, ON e com agitação constante de 250 rpm. À cultura que cresceu ON, foram retirados 4 ml para inocular em 400 ml de meio LB suplementado com 50 µg/mL de ampicilina a 37°C com agitação constante. A expressão proteica da TTR foi induzida com 1mM de IPTG (do inglês *isoprenil-β-D-thiogalactopyranoside*) quando a absorvência a 600 nm atingiu o valor de 0.4. Após 3 horas de crescimento, as células foram

centrifugas a 15000g durante 20 minutos a 4°C. O pellet foi recolhido e congelado a -20°C. Posteriormente, o pellet foi ressuscitado em 4 ml de tampão fosfato (PBS, do inglês *phosphate-buffered saline*) a pH 7,4, sonicado 10 vezes durante 30 segundos e centrifugado novamente a 14000g a 4° durante 20 min. O sobrenadante e o pellet foram recolhidos e guardados a -20°C. O sobrenadante corresponde à fração solúvel onde se encontra a TTR e o pellet corresponde à fração insolúvel.

Para além do plasmídeo pGEX4T.2-TTR, foi também utilizado o plasmídeo pGEX 4T.2 que corresponde ao controlo negativo do processo de expressão da TTR. Este foi também inoculado uma colónia de BL21 plus com o plasmídeo pGEX 4T.2 em 10 mL de LB suplementado com 50 µg/mL de ampicilina a 37°C, ON e com agitação constante de 250 rpm. Estas células após crescerem ON foram inoculadas em novo meio, 4 ml de cultura em 400 ml de LB suplementado com 50 µg/mL de ampicilina a 37°C com agitação constante. Assim que a cultura atingiu a absorvência de 0.4 aos 600nm foi induzida com 1mM de IPTG. Após 3 horas de crescimento, as células foram centrifugas a 15000g durante 20 minutos a 4°C. O pellet foi recolhido e congelado a -20°C. Posteriormente, o pellet foi ressuscitado em 4 ml de PBS a pH 7,4, sonicado 10 vezes durante 30 segundos e centrifugado novamente a 14000g a 4° durante 20 min. O sobrenadante e o pellet foram recolhidos e guardados a -20°C.

As amostras foram sonicadas no aparelho UP200S da Hielshcer Ultrasound Technology.

4.3. Identificação e purificação dos interactuantes da TTR

De forma a purificar a TTR, proteína de interesse, do sobrenadante procedeu-se à técnica de Pulldown. Deste modo, a TTR ligada ao GST (sobrenadante do pGEX 4T.2-TTR) e o GST sozinho (sobrenadante do pGEX 4T.2) foram purificados com 40 µl de esferas (do inglês *beads*) sepharose 4BT (Amersham). Estas foram incubadas com sobrenadante com uma diluição 1:2 com PBS durante 2 horas com rotação constante. Após o passo de incubação, procedeu-se à lavagem com PBS-T 1x (tampão fosfato com 1% de Tween) durante 10 minutos com rotação constante. Foram ainda realizadas 6 lavagens com PBS durante 30 segundos, sendo que entre cada lavagem foi realizada uma centrifugação durante 30 segundos à velocidade mínima. Seguiu-se novo passo de incubação, mas desta vez com amostras de plasma de pacientes com uma diluição de 1:100 em PBS. A incubação foi realizada durante a noite, a 4°C numa câmara fria com rotação constante. Por fim, foram ainda realizadas 6 lavagens com PBS durante 30 segundos. Após a lavagem, as proteínas ligadas às beads foram eluídas com a solução *Loading buffer* (62.5mM Tris-HCl pH 6.8, 20% glicerol, 2% SDS, 5% β-mercaptoetanol, 0.01% azul bromofenol) e separadas através de um gel SDS-PAGE, o qual foi corado com prata.

5 – Espectrometria de massa

5.1. Fundamentos teóricos

O termo proteômica descreve a identificação da sequência e função proteica, a qual pode ser realizada através da espectrometria de massa. Esta técnica foi inventada em 1905 (tal como revisto por S. Schuchardt & A. Sickmann 2007) e consiste em 3 componentes principais, nomeadamente fonte de ionização, a qual converte as moléculas em iões de fase gasosa. Assim que estes iões são criados, são separadas por razão massa/carga (m/z) por um segundo componente, o analisador de massa e por fim transferidos para um segundo componente, o detetor de iões como exemplificado na **figura II-12**, tal como revisto por J. R. Yates 2000.

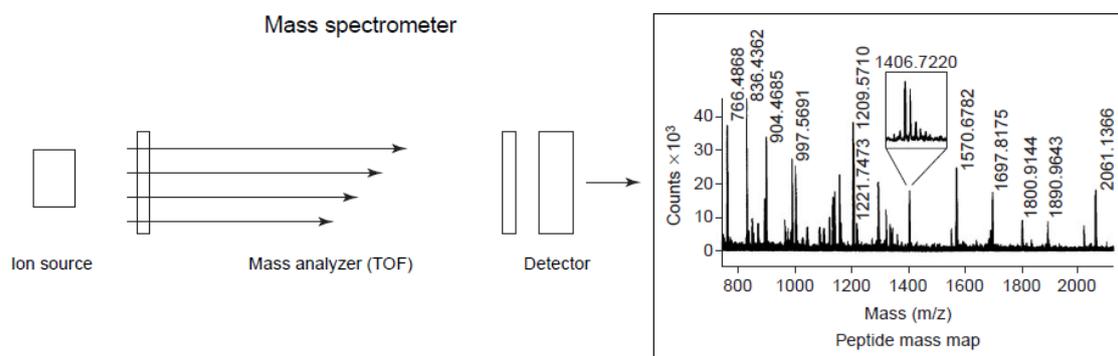


Figura II-12 Exemplificação dos 3 componentes principais de um espectrómetro de massa simples (J. R. Yates 2000).

A identificação de uma proteína é feita através da digestão/fragmentação da proteína com auxílio de um enzima que corta a sequência peptídica em locais conhecidos. As massas dos péptidos obtidos são comparadas com massas moleculares de péptidos teóricos fragmentados com o mesmo enzima registados numa base de dados. Através da massa molecular de vários péptidos é possível prever a sua sequência, uma vez que a massa molecular de um péptido não é restrita a uma só proteína. Para se poder fazer essa analogia é necessário pelo menos uma combinação de três péptidos para que seja fidedigna a associação (tal como revisto por J. R. Yates 2000). Nesta técnica existem dois conceitos de extrema importância: resolução e exatidão da massa. A resolução é importante na determinação de diferentes estados de carga e em conseguir distinguir os diferentes picos numa distribuição isotópica, tal como revisto por J. R. Yates 2004.

5.1.1. Métodos de ionização

A fonte de iões tem como função transformar a amostra em iões e transferi-los para a fase gasosa, sendo que os iões podem ser gerados por perda ou ganho de carga, tal como revisto por S. Schuchardt & A. Sickmann 2007. Atualmente existem duas técnicas inovadoras e robustas que permitem a ionização de moléculas grandes, as quais foram desenvolvidas no fim dos anos 80, tal como revisto por Domon & Aebersold 2006. Designam-se por técnica MALDI (do inglês *Matrix-*

assisted laser desorption ionization) e técnica ESI (do inglês *Electrospray ionization*). A técnica de MALDI cria iões através da excitação de moléculas que são isoladas do laser através da energia de uma matriz absorvente. O laser incide sobre a matriz cristalina, causando uma excitação rápida da matriz e consequente ejeção dos iões para a fase gasosa tal como ilustrado na **figura II-13** (tal como revisto por J. R. Yates 2000). É uma técnica robusta, mas muito sensível, tal como revisto por Domon & Aebersold 2006. Por outro lado, a técnica de ESI cria os iões aplicando um potencial a um fluxo líquido, levando à aquisição de carga. Esta técnica cria pequenas gotículas que contêm solvente e os iões de interesse, o qual é removido e as gotículas contendo apenas os iões entram no espectrómetro de massa através de uma fonte, por exemplo de calor (tal como revisto por J.R. Yates 2000).

5.1.1.1. MALDI

Esta metodologia de ionização baseia-se na co-cristalização da amostra com uma matriz, a qual permite a formação de iões com carga positiva.

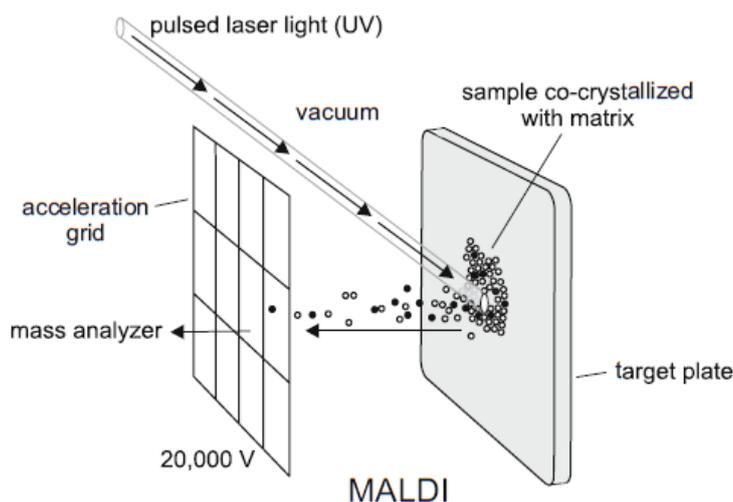


Figura II-13 Ionização através da técnica de MALDI (revisto por S. Schuchardt & A. Sickmann 2007)

A matriz deve ser um composto ligeiramente ácido para que possa ser um bom doador de prótons para propiciar a formação de iões positivos, deve também possuir uma baixa massa molecular, uma vez que esta deve estar presente em grandes quantidades (Adaptado de livro) e possuem normalmente um composto aromático sensível às radiações UV (revisto por S. Schuchardt & A. Sickmann 2007). Existe uma vasta gama de compostos adequados para o uso como matriz, nomeadamente o CHCA (do inglês, *α -cyano-4-hydroxycinnamic acid*) e o DHB (do inglês, *2,5-dihydroxybenzoic acid*), os quais são utilizados na fragmentação de péptidos e proteínas, sendo a matriz CHCA mais sensível. Uma solução destes compostos é feita de água do tipo I, solvente orgânico (normalmente acetonitrilo) e ácido fórmico. Esta técnica é realizada em condições com elevado vácuo (normalmente com valores inferiores a 10^{-6} mbar) de modo a garantir a transmissão de iões (Adaptado de Lovric 2011)

5.1.2. Analisadores de massa

Após a formação dos iões, é necessária a presença de um aparelho com elevada precisão que seja eficiente na análise da massa que cada ião possui. Todos os analisadores usam a aplicação de forças de campos elétricos ou magnéticos por forma a separá-los com base na sua razão m/z , tal como revisto por J. R. Yates 2004.

Com a necessidade de melhorar a eficiência da separação e da qualidade da identificação, diversos aparelhos são já conhecidos, tais como os quadrapólos, *ion traps*, TOFs (do inglês *Time-of-flight*) e FT-ICR (do inglês *Fourier-transform ion cyclotron resonance*). Variam na sua exatidão de massa, na sua resolução, velocidade de scan, robustez e *mass range* (tal como revisto por J. R. Yates 2004).

5.1.2.1. FT-ICR

Este tipo de analisador oferece uma resolução e exatidão muito superiores aos restantes aparelhos. Funciona através do aprisionamento dos iões dentro de uma célula com um campo magnético aplicado perpendicularmente a um campo elétrico, dentro do qual os iões adquirem um movimento circular (também designado por frequência ciclotrónica) tal como ilustrado na **figura II-14**. Um pulso eletrónico é gerado de forma a perturbar o movimento dos iões de forma coerente que é detetado por placas detetoras (adaptado de S. Schuchardt & A. Sickmann 2007).

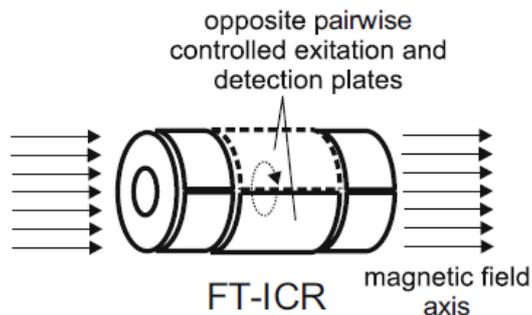


Figura II-14 Representação de uma célula de FT-ICR (S. Schuchardt & A. Sickmann 2007)

A razão m/z é calculada com base na frequência do movimento dos iões, tal como revisto por J. R. Yates 2004. Esta técnica permite uma deteção não destrutiva dos iões, tal como revisto por S. Schuchardt & A. Sickmann 2007.

5.1.3. Detetores

São o elemento final de um espectrómetro de massa. O detetor regista a carga ou a corrente produzida quando um ião ou passa ou atinge a sua superfície. À exceção de Orbitraps e FT-ICRs, o detetor de iões é normalmente destrutivo. Os iões são normalmente detetados por SEM (do inglês, *secondary electron multipliers*) ou por MCP (do inglês, *microchannel plate detectors*). Por norma, o detetor permite a formação de um sinal analógico através da produção de eletrões secundários, os quais são amplificados. O sinal analógico do detetor é convertido e

processado por um computador. Existem outros sistemas para a detecção de iões como os detetores foto-sensíveis (tal como revisto por Schuchardt & Sickmann 2007).

5.2 Preparação e análise da amostra

5.2.1 Digestão in gel das proteínas

Para minimizar as contaminações das amostras para identificação de proteínas por PMF, os passos que a seguir se descrevem foram realizados com luvas e bata.

As proteínas de plasma humano foram separadas em géis de SDS-PAGE 12%, com 1,0mm de espessura conforme descrito em secções anteriores. A banda correspondente ao monómero da TTR (na direcção do padrão de massa molecular de 15 kDa) foi removida com o auxílio de um bisturi. Para além das proteínas de plasma humano foram também separadas as proteínas interactuantes da TTR através da técnica de pulldown com conseqüente separação através de géis de SDS-PAGE 12% com 1,0mm de espessura e retiradas com auxílio de um bisturi.

As bandas são primeiro lavadas com água do tipo I, seguindo-se lavagens em acetonitrilo (ACN) a 50% (Merck) para se remover o excesso de Azul de Coomassie (até 3 lavagens). Por fim, a desidratação com ACN a 100%. Cada passo de lavagem teve 10 minutos de duração, a 37°C com agitação. As bandas e desidratadas foram guardadas a -20°C quando o processo de digestão não teve continuidade no mesmo dia.

Seguiram-se os passos de redução, alquilação e desidratação novamente. A redução foi feita com 50 µL de 10 mM DTT (Sigma) durante 45 minutos a 56°C com agitação, a alquilação com 50 µL de 55 mM de iodocetamida durante 30 minutos no escuro, para prevenir a formação de ligações persulfureto. Por fim, repetiu-se novo processo de desidratação com ACN a 100% durante 30 minutos com agitação.

5.2.2 Digestão com tripsina

As bandas foram re-hidratadas em Tampão de Digestão (50mM NH₄HCO₃ e 6.7 ng/µL tripsina) durante 45 minutos a 4°C. Removeu-se o tampão que não foi absorvido pelos pedaços de gel e adicionou-se NH₄HCO₃ para a digestão proceder O/N a 37°C. No final do procedimento, os digeridos e os fragmentos de gel foram separados e armazenados a -20°C.

O foi NH₄HCO₃ adquirido à Sigma e a tripsina à Promega.

5.2.3 Aplicação dos digeridos na placa de MALDI

A mistura de péptidos foi purificada através da remoção de sais e outros possíveis contaminantes e também concentrada com recurso à utilização de colunas de cromatografia de

fase reversa do tipo C8 (Poros reverse phase R2 – Applied Biosystems). O protocolo de preparação da coluna passou pela ativação da resina com 50% ACN e equilíbrio e conservação da mesma numa solução com ácido trifluoracético (TFA) (Sigma) a 0,1%.

Para a purificação e eluição dos péptidos, primeiro elui-se o TFA, seguido da aplicação e eluição da amostra digerida. Aplica-se a Solução de Matriz (10 µg/µL de CHCA (Sigma) em 50% ACN com 0,1% TFA) e os péptidos são eluídos diretamente para as placas de MALDI AnchorChip (Bruker Daltonics, Bremen) e Placa ABI 4800 MALDI TOFTOF.

5.2.4 Obtenção dos espectros de massa

Os digeridos de TTR e as amostras referentes ao pulldown foram analisados por MALDI-FT-ICR num espectrómetro de massa Bruker Apex Ultra Apollo II combi-source (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) com um magneto de 7 Tesla (MagneX Corporation, Oxford UK). As massas dos picos monoisotópicos dos péptidos foram determinadas pelo programa Data Analysis (versão 3.4), através do algoritmo SNAP 2 (Bruker Daltonics). Estas foram depois submetidas ao programa da identificação de proteínas Mascot¹ (Matrix Science, London, UK) e analisadas com o *software* Biotoools 3.1 (Bruker Daltonics).

5.2.5 Identificação das proteínas por PMF

Para a comparação das massas dos péptidos e identificação das proteínas correspondentes utilizaram-se base de dados a UniProtKB/SwissProt3 (base de dados de sequencias não redundantes de proteínas). Considerou-se um erro máximo de 5ppm.

5.2.6 Quantificação relativa das formas *wild-type* e mutante da TTR plasmática

Para proceder à quantificação relativa das variantes WT e V30M da TTR em circulação, a partir do programa Biotoools 3.1 (Bruker Daltonics), recolheram-se as intensidades monoisotópicas dos picos com m/z 1394,6178 e 1398,7279. Fez-se uma razão entre os valores destas intensidades e calculou-se a média para cada grupo em estudo. Tendo o grupo controlo como referência, calculou-se então a proporção de WT nos restantes indivíduos, dividindo a média da razão do grupo controlo pela média de cada grupo em estudo. A percentagem de TTR V30M é aferida a partir do valor de TTR WT determinado.

¹ <http://www.matrixscience.com>

III - RESULTADOS

1 – Determinação do tempo de desaparecimento da TTR V30M em doentes PAF transplantados com fígado cadáver

Nas doenças amilóides, a formação dos intermediários amiloidogénicos é um processo resultante da dissociação de proteínas em monómeros sem estrutura associada, tal como revisto por Knowles *et al.*, 2014. A PAF é uma das várias doenças que se insere nesta categoria, sendo a ocorrência de mutações na proteína TTR, segundo o modelo mais aceite, responsáveis pela formação destes depósitos.

O objetivo geral do trabalho é avaliar os interactuantes específicos da TTR V30M tirando partido de um modelo particular da PAF, que são os doentes transplantados com fígado cadavérico em que a variante V30M desaparece ao longo do tempo. Recorrendo a uma abordagem baseada na separação de proteínas por SDS-PAGE, marcação da TTR e através da espectrometria de massa de elevada resolução, determinou-se a razão entre as diferentes formas plasmáticas da TTR em indivíduos doentes e transplantados e o seu tempo de meia vida em três pacientes (BH4, BH5 e BH7) imediatamente a seguir ao transplante até 6 dias após o mesmo.

1.1 – Separação da TTR e identificação por Western Blot

Para a separação, identificação e quantificação da TTR foi usado um método simples, eficaz e de rápida execução, para além de que não exige quantidades elevadas de amostra. Este método é a eletroforese SDS-PAGE convencional, que permitiu detetar a proteína de interesse, a TTR, relativamente às restantes bandas (**figura III-15**). Para detectar a presença de TTR procedeu-se à marcação por Western Blot, como se evidencia na **figura III-15**.

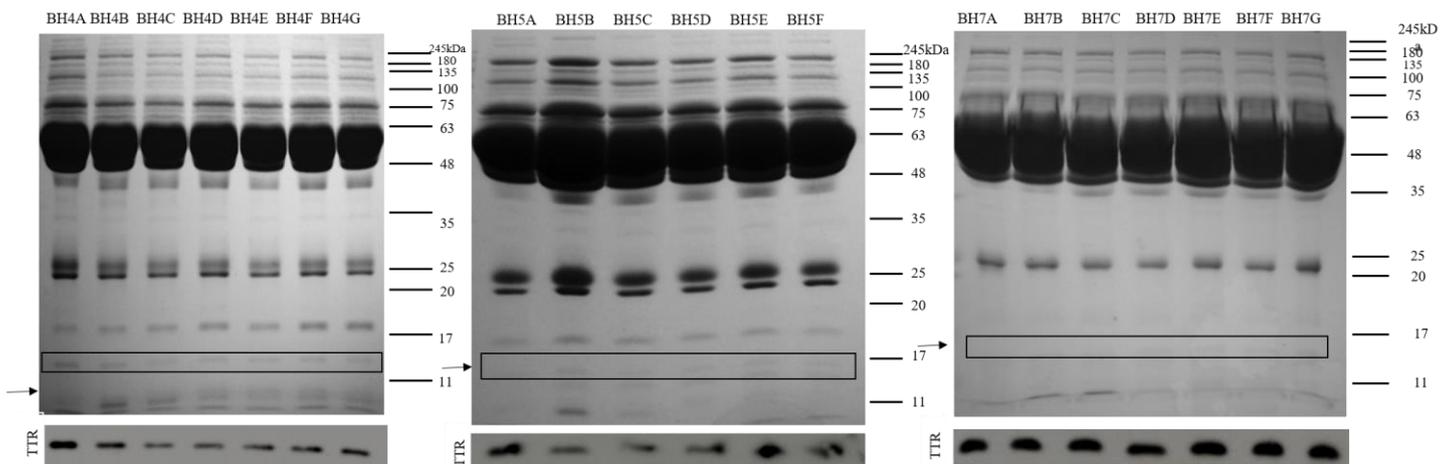


Figura III-15 - Análise das proteínas do plasma dos pacientes transplantados com fígados cadáver por SDS-PAGE, coloração com Azul de Coomassie (topo) estando a TTR (monómero) identificada pelo retângulo assinalado na figura, Western Blot do monómero da TTR (em baixo). À esquerda, paciente BH4, no meio paciente Bh5 e à direita paciente BH7.

Na **figura III-15** encontram-se os perfis eletroforéticos das amostras de plasma dos pacientes BH4, BH5 e BH7 (sendo a letra A= momento do transplante; B = 24 horas após o transplante; C = 48 horas após o transplante; D = 72 horas após o transplante; E = 96 horas após o transplante; F = 120 horas após o transplante e G = 144 horas após o transplante) indicados na figura. Como se pode verificar não existem variações no perfil eletroforético e também não aparenta ocorrer variações nos níveis totais de TTR entre indivíduos ao longo do tempo após o transplante.

1.2. Quantificação da TTR V30M e respetivo tempo de meia vida

Por forma a quantificar o decaimento da variante V30M presente nas amostras dos pacientes transplantados, foram retiradas as bandas correspondentes à TTR dos géis, a TTR foi digerida com tripsina e os espectros foram recolhidos recorrendo à fonte de MALDI do FTICR. Por forma a quantificar a variante V30M, fomos analisar a presença de dois péptidos, o péptido com o valor de m/z de 1394,6178 e o péptido com o valor de m/z de 1398,7279. O valor de m/z 1394,6178 corresponde a um péptido comum da forma TTR WT e da TTR V30M que está presente em todos os tipos de pacientes e o valor de m/z 1398,7279 corresponde ao péptido onde a Valina na posição 30 foi substituída pela Metionina e que está presente nos pacientes portadores da variante V30M. Para além destes valores de m/z, observamos também outros valores de m/z característicos da TTR WT e da TTR V30M, nomeadamente com *miscleavage* resultantes da digestão com tripsina ou com uma metionina oxidada exemplificados na **tabela III-4**:

Tabela III – 4 – Péptidos presentes nas amostras no momento do transplante, nomeadamente pacientes PAF transplantados com fígado cadáver (BH4, BH5 e BH7).

[M+H] ⁺ (observado)	[M+H] ⁺ (teórico)	ppm	Sequência	BH4A	BH5A	BH7A	
1366,7556	1366,7590	2	[22-34] GSPAINVAVHVFR	+	+	+	Péptido WT com mutação pontual
1394,6178	1394,6223	3	[36-48] AADDTWEPFASGK	+	+	+	Péptido comum
1398,7279	1398,7311	2	[22-34] GSPAINVAMHVFR	+	+	+	Péptido mutante
1414,7227	1414,7260	2	[22-34] GSPAINVAM ^o HVFR	+	+	+	Péptido mutante com uma oxidação na metionina
1494,8513	1494,8540	3	[22-35] GSPAINVAVHVFRK	+	+	+	Péptido WT com <i>miscleavage</i>
1526,9193	1526,8260	4	[22-35] GSPAINVAMHVFRK	+	+	+	Péptido mutante com <i>miscleavage</i>

III - RESULTADOS

A presença de péptidos característicos das duas variantes de TTR no momento do transplante demonstra que estamos na presença de 3 pacientes heterozigóticos para a mutação V30M.

A intensidade dos iões 1394,6178 m/z e 1398,7279 m/z foi determinada para todas as amostras pós transplante para os três pacientes. Na **figura III-16** podemos observar os vários iões para as amostras correspondentes ao paciente BH7. Como é possível observar a intensidade do ião 1394,6178 não é constante para todas as amostras, quer por diferenças na quantidade de amostra aplicada na placa, quer por diferenças na própria heterogeneidade da matriz uma vez que quando aplicada co cristaliza com a amostra de forma diferente em cada amostra. Dado a presença destas diferenças a intensidade do ião 1398,7279 m/z foi normalizada pela intensidade do ião 1394,6179 m/z.

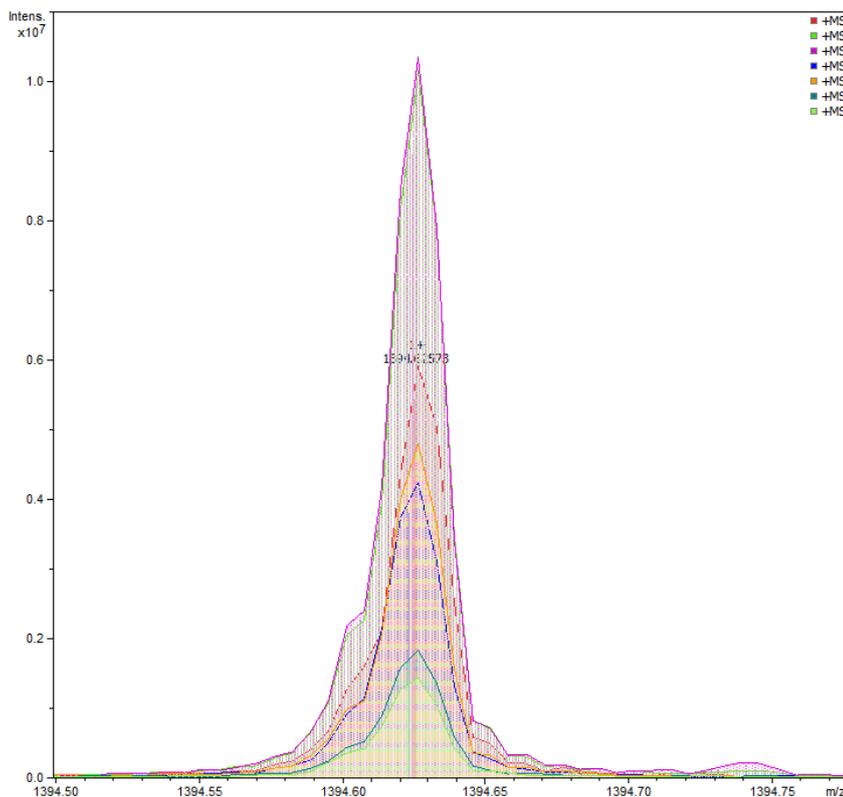


Figura III-16a- Ilustração da distribuição do pico 1394,6223 observado no paciente BH7 (picos com cores diferentes correspondem às diferentes amostras relativas aos tempos de recolha de sangue), pico relativo à TTR WT.

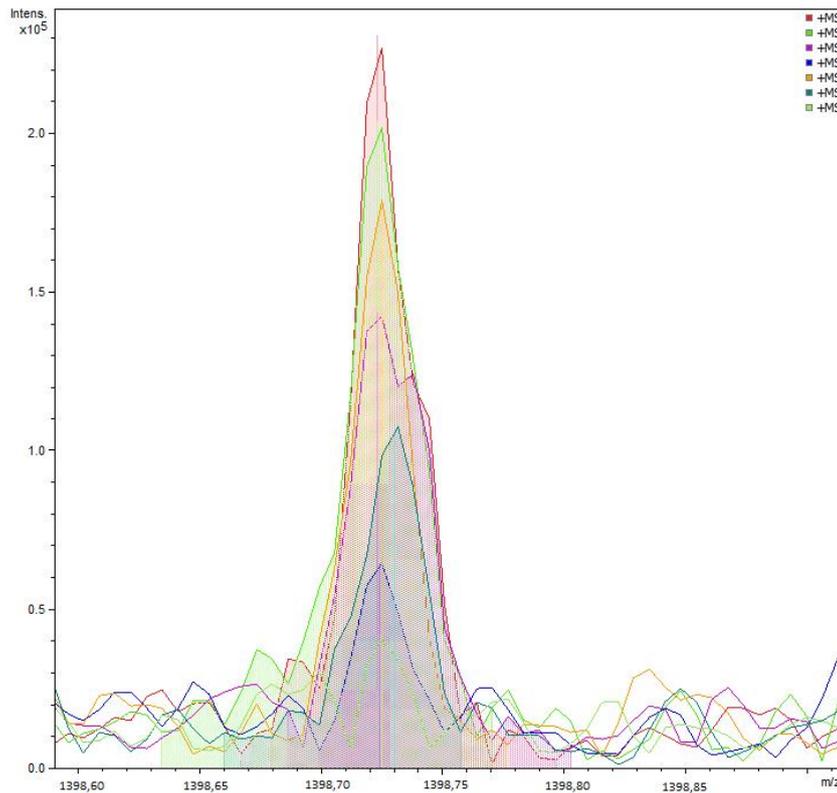


Figura III-16b- Ilustração da distribuição do pico 1398,7311 observado no paciente BH7 ((picos com cores diferentes correspondem às diferentes amostras relativas aos tempos de recolha de sangue), pico relativo à TTR V30M.

Os resultados obtidos após identificação dos iões e respetivas intensidades para os 3 pacientes (BH4, BH5 e BH7) estão discriminados na **tabela III-5** bem como a respetiva razão. Os resultados foram convertidos com gráfico de pontos e apresentam-se na **figura III-17**.

Tabela III-5 Resultados obtidos após análise por MALDI

	1394.6223 M/Z	1398.7311 M/Z	RAZÃO 1394/1398
BH4A	11029713	263680	0,023906334
BH4B	10134352	243745	0,024051365
BH4C	10345059	199602	0,019294428
BH4D	10555766	64718	0,006131057
BH4E	4800561	18629	0,003880588
BH4F	1836572	5012	0,002728997
BH4G	1441308	1	6,93814E-07
BH5A	12083731	263680	0,021821075
BH5B	10121342	223644	0,022096279
BH5C	8184973	109599	0,01339027
BH5D	6235594	65122	0,010443592
BH5E	4286215	17923	0,004181545
BH5F	2336836	112	4,79281E-05
BH5G	387457	1	2,58093E-06
BH7A	13137899	278654	0,021209936
BH7B	11488178	212644	0,018509811
BH7C	10104785	167634	0,016589566
BH7D	9088228	113624	0,012502327
BH7E	4971671	18614	0,003744013
BH7F	1961443	360	0,000183538
BH7G	144886	1	6,90198E-06

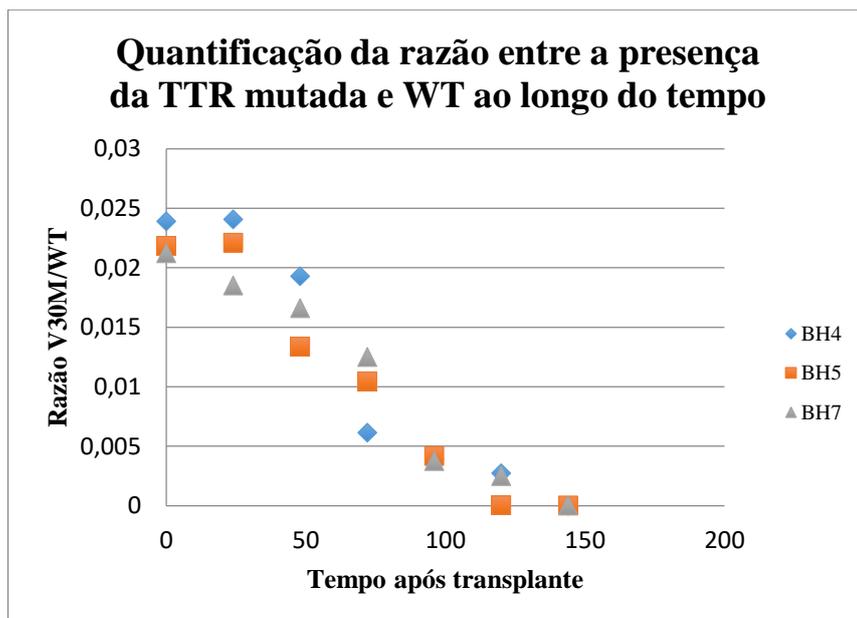


Figura III-17 Quantificação da razão entre a quantidade de TTR V30M e a quantidade de TTR WT presente nos pacientes transplantados com fígado cadáver a vários tempos de recolha de sangue

Como se pode verificar pelo gráfico, os três pacientes analisados apresentam um perfil de decaimento da TTR V30M similar. Para além disso, verifica-se que o desaparecimento total da TTR V30M se observa ao fim de 5 dias após o transplante. É interessante observar uma curva sigmóide decrescente, que corresponde a um decaimento rápido até ao terceiro dia após o transplante ocorrendo um decaimento lento do 5º ao 6º dia.

Com base nestes resultados foi-nos possível calcular o tempo de meia vida da TTR V30M. Este cálculo foi realizado com base na definição de tempo de meia vida $t_{1/2}$ que corresponde ao tempo para o qual ocorre a substituição de metade das moléculas desse compartimento (Kuhar 2010). Sendo assim, o $t_{1/2}$ foi extrapolado através do gráfico com base na equação 2:

$$t_{1/2} = \frac{\text{valor máximo da razão TTR WT/V30M}}{2} \quad \text{equação 2}$$

Os valores obtidos para o tempo de meia vida para os três pacientes para cada variante WT e V30M encontram-se na **tabela III-6**.

Tabela III-6 – Resultados do cálculo do tempo de meia vida

Paciente	Tempo de meia vida (horas)	Média do tempo de meia vida(horas)
BH4	60h	70h
BH5	70h	
BH7	80h	

III - RESULTADOS

Concluindo, o tempo de meia vida da TTR é de ± 3 dias, o que coincide com o tempo descrito na literatura (Makover *et al.*, 1988).

Esta análise do decaimento da TTR V30M e concomitante substituição pela TTR WT, dado que não se observa variação na quantidade total de TTR, permite-nos escolher as melhores amostras para prosseguir com a análise posterior.

2 –Determinação dos interactuantes

Estudos anteriores determinaram o fibrinogénio e o RBP como interactuantes da TTR (da Costa *et al.*, 2011 e Raghu & Sivakumar 2004, respetivamente) não especificando como interactuam com a TTR WT e/ou a TTR V30M em pacientes heterozigóticos. Neste trabalho, com base num modelo particular, que se baseia na presença de mutações pontuais que levam à perda de estrutura da TTR (tal como revisto por Hurshman *et al.*, 2004 e por Johnson *et al.*, 2012) e após a verificação do desaparecimento da variante V30M de circulação dos pacientes transplantados com fígado cadáver ao longo do tempo podemos especular que a interação observada se deve de facto à mutação V30M.

2.1. - *Pulldown* dos possíveis interactuantes e respetiva identificação

De forma a escrutinar os possíveis interactuantes da TTR recorreu-se à técnica de *pulldown*. Esta técnica serve não só para identificar possíveis interactuantes como também para purificar a proteína em estudo. Realizou-se o processo de *pulldown* incubando *over night* as esferas com amostra de plasma de pacientes controlo, pacientes sintomáticos não transplantados e os pacientes transplantados recentemente (BH4, BH5 e BH7). Dado que a TTR usada como “*bait*” está em fusão com a proteína GST, o que permite a sua purificação de forma muito fácil, foi usado a proteína GST sozinha como controlo negativo e também foi aplicado no gel o resultado da purificação das duas proteínas após a sua purificação e antes da incubação com as várias amostras de plasma (LB). Consideram-se possíveis interactuantes específicos da TTR neste ensaio, as bandas que só aparecem depois do *pulldown* da TTR e estão ausentes nas restantes “*lanes*”.

Inicialmente foram usadas amostras de indivíduos controlo (CONT) e indivíduos PAF sintomáticos antes de transplante (PAFNT) para determinarmos todos os interactuantes possíveis de absorver por esta tecnologia nas duas condições mais extremas. Além disso permite-nos observar se existem diferenças nestas duas condições. Desta forma apresentam-se em seguida os resultados para os pacientes controlo, PAFNT nas **figuras III-18**.

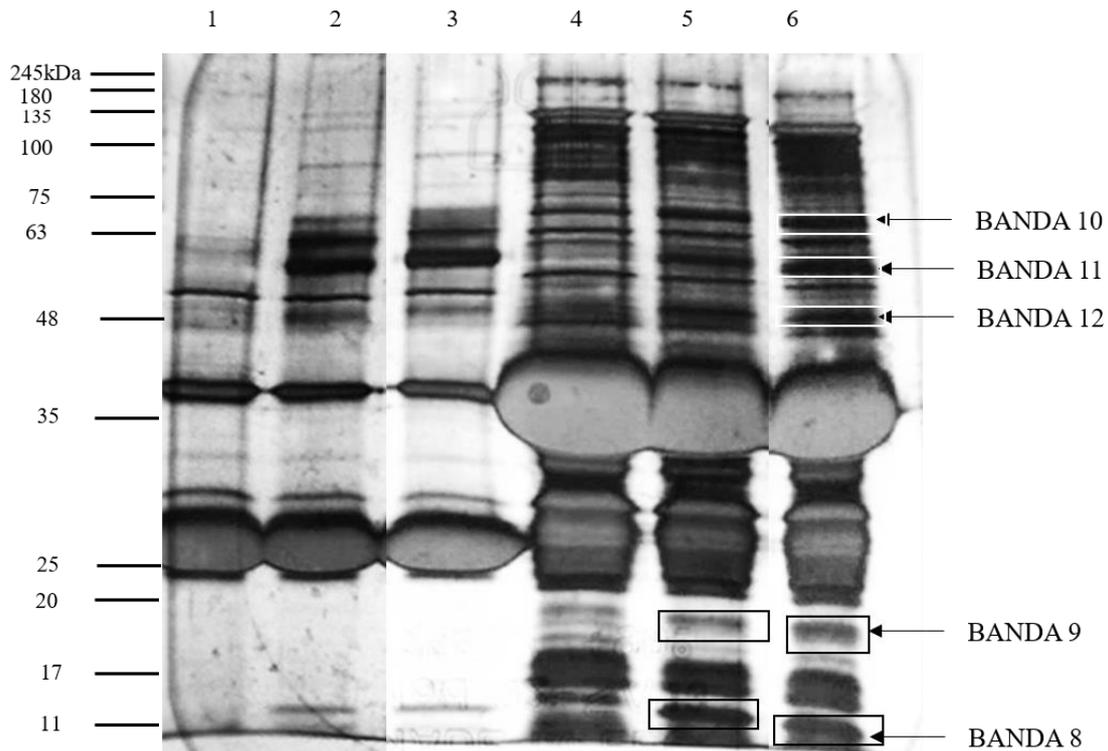


Figura III-18 - Purificação da TTR após ensaio de pulldown beads de GST com amostra de controlo (amostra C8) e de indivíduos sintomáticos não transplantados (PAFNT 4A). Lane 1 – beads GST incubadas com sobrenadante de BL21plus PGEX 4T2 com tampão de aplicação; Lane 2 – beads GST incubadas com sobrenadante de BL21plus PGEX 4T2 incubadas over night com plasma de paciente controlo com tampão de aplicação; Lane 3 – beads GST incubadas com sobrenadante de BL21plus PGEX 4T2 incubadas over night com plasma de paciente PAFNT com tampão de aplicação; Lane 4 – beads GST incubadas com sobrenadante de BL21plus PGEX 4T2-TTR com tampão de aplicação; Lane 5 – beads GST incubadas com sobrenadante de BL21plus PGEX 4T2-TTR incubadas over night com plasma de controlo com tampão de aplicação; Lane 6 – beads GST incubadas com sobrenadante de BL21plus PGEX 4T2-TTR incubadas over night com plasma de paciente PAFNT com tampão de aplicação

Após purificação com o GST-TTR, ambas as amostras dos pacientes controlo e PAFNT (*lane 5 e 6 da figura III-18*) possuem bandas que se destacam por não estarem presentes no controlo negativo (*lane 4*) nomeadamente a banda 8, 9, 10, 11 e 12. Estas bandas correspondem a interatuantes da TTR uma vez que não se encontram presentes no controlo negativo nem no controlo positivo que corresponde às *lanes 1,2 e 3*. O controlo positivo tem como objetivo verificar que o processo correu bem. Estas foram analisadas por MALDI e identificadas com recurso ao programa Mascot. As bandas identificadas após purificação por *pull-down* estão descritas na **tabela III-7**:

Tabela III-7 - Resultado da identificação das bandas retiradas dos géis da figura III, nomeadamente resultante do pulldown de indivíduos controlo e indivíduos PAFNT. Considera-se que uma identificação é significativa, nas condições utilizadas, quando o score é superior a 75.

BANDA RETIRADA	SCORE	IDENTIFICAÇÃO
8	123	Urocortino-3
9	98	Retinol binding protein (RBP)
10	115	Albumina
11	87	Região da cadeia C da IgG1

A banda 12 não foi possível identificar com “score” significativo.

O interactuante mais conhecido da TTR é o RBP (Raghu & Sivakumar 2004), o facto de o RBP ter sido identificado neste ensaio valida as condições experimentais estabelecidas. O complexo RBP-TTR é responsável pelo transporte da vitamina A, a qual tem um papel importante na visão bem como na morfogénese, diferenciação e manutenção de tecidos. A associação do RBP à TTR previne a eliminação do RBP (proteína com baixa massa molecular, cerca de 21 kDa) pela filtração glomerular (Adaptado de VIII).

Após a análise das bandas identificadas, avaliou-se a presença destas bandas no plasma dos pacientes BH, e se havia variação ao longo dos vários tempos de recolha. A escolha dos pacientes e dos respetivos tempos (A = dia do transplante; D = 72 horas após o transplante e E = 96 horas) relaciona-se com o decaimento da presença da TTR V30M, sendo que ao tempo E começa a aproximar-se do valor zero. Os resultados para o paciente BH7 encontram-se na **figura III-19**.

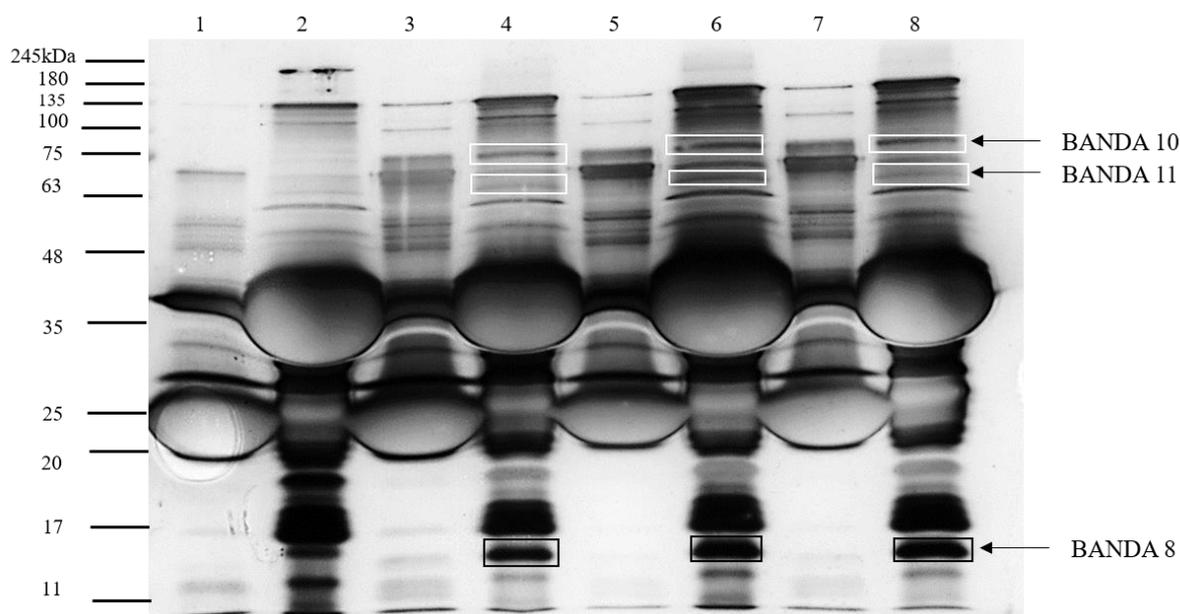


Figura III-19 - Purificação da TTR após ensaio de pulldown e incubação com amostras de indivíduo BH7 com vários tempos de colheita após transplante (tempo A, tempo D e tempo E). (Lane 1 - beads GST incubadas com sobrenadante de BL21plus PGEX 4T2 com tampão de aplicação; Lane 2 - beads GST incubadas com sobrenadante de BL21plus PGEX 4T2-TTR com tampão de aplicação; Lane 3 - beads GST incubadas com sobrenadante de BL21plus PGEX 4T2 incubadas com plasma de paciente BH7A com tampão de aplicação; Lane 4 - beads GST incubadas com sobrenadante de BL21plus

III - RESULTADOS

PGEX 4T2-TTR incubadas com plasma de paciente BH7A com tampão de aplicação; Lane 5 - beads GST incubadas com sobrenadante de BL2Iplus PGEX 4T2 incubadas com plasma de paciente BH7D com tampão de aplicação; Lane 6 - beads GST incubadas com sobrenadante de BL2Iplus PGEX 4T2-TTR incubadas com plasma de paciente BH7D com tampão de aplicação; Lane 7 - beads GST incubadas com sobrenadante de BL2Iplus PGEX 4T2 incubadas com plasma de paciente BH7E com tampão de aplicação; Lane 8 - beads GST incubadas com sobrenadante de BL2Iplus PGEX 4T2-TTR incubadas com plasma de paciente BH7E com tampão de aplicação.

Para além da verificação da presença das bandas identificadas nos pacientes Controlo e PAFNT, avaliou-se também a variação da interação ao longo do tempo.

Como se pode observar na **figura III-19** a presença das bandas 8, 10 e 11 também presentes nas amostras dos pacientes controlo e PAFNT.

A banda 8, correspondente à proteína Urocortino-3 sofre um aumento do tempo D (72h após o transplante) face ao tempo A (dia do transplante), sendo que este se mantém no tempo E (96 horas após o transplante), o que nos indica que a sua presença no *pulldown* em maior quantidade alguns dias a seguir ao transplante, o que pode significar uma interação maior com a TTR WT do que com a TTR V30M. Este resultado, tal como para todas as outras bandas, terá de ser confirmado por Imunoprecipitação, tal como temos que verificar que a quantidade total desta proteína não varia por si só ao longo do tempo.

A banda 10, correspondente à proteína Albumina não varia ao longo do tempo. A banda 11, correspondente à região da cadeia C da IgG1 sofre uma diminuição ao longo do tempo, o que quer dizer que esta possa ser uma interação específica da TTR V30M, uma vez que diminui com o aumento do tempo após o transplante.

3 - A glicação na PAF: análise dos níveis de glicação diferencial proteica no plasma e em Red blood cells

Estudos recentes identificaram níveis de glicação diferencial das proteínas do plasma em indivíduos PAF relativamente a indivíduos controlo, e que alguns dos interatuantes da TTR se apresentam diferencialmente glicados nestes pacientes (da Costa *et al.*, 2011). O objetivo deste trabalho é verificar se a TTR, nomeadamente a variante V30M interage de forma diferencial com proteínas glicadas. Deste modo, fomos verificar os níveis basais de glicação dos pacientes BH por forma a inferir se os interatuantes glicados que provêm de uma interação específica e não apenas porque os níveis das proteínas glicadas são no seu todo mais elevadas. A identificação dos níveis de glicação foram feitos extracelularmente no plasma, onde ocorre a interação da TTR WT e/ou TTR V30M com os possíveis produtos glicados. A identificação das proteínas glicadas foi feita com recurso a um anticorpo que deteta especificamente a Agrpirimidina (AGP), um AGE derivado do metilglioxal identificado por Shipanova *et al.*, 1997. Gomes *et al.*, 2005 verificou que as fibras amilóides removidas de pacientes PAF apresentavam proteínas glicadas, cujo produto de glicação associado era o AGP.

3.1. - Níveis de glicação diferenciais em indivíduos transplantados BH4, BH5 e BH7

Por forma a verificar os níveis de glicação diferenciais realizou-se um SDS-PAGE com amostras de plasma de pacientes BH, o qual não apresentou qualquer variação. Para confirmar se na realidade as amostras não apresentavam níveis de glicação procedeu-se à realização de Western blot com as mesmas amostras e marcou-se a membrana com o anticorpo contra a Argpirimidina, um produto de glicação. Os resultados referentes ao paciente BH7 apresentam-se na **figura III-20** e os resultados referentes aos pacientes BH4 e BH5 estão na figura VII-28 do anexo.

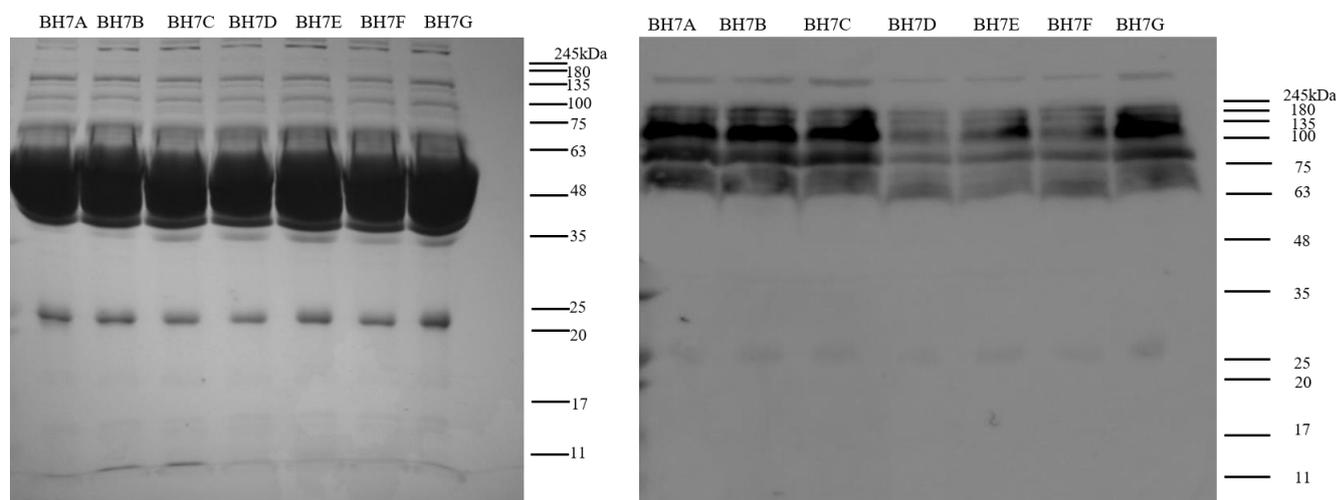


Figura III-20 - Análise por SDS-PAGE (à esquerda) e Western Blot (à direita) dos níveis de glicação derivada da Argpirimidina (AGP) em amostras de plasma de paciente BH7 transplantado com fígado cadáver.

Como se pode ver na **figura III-20** não existem alterações no gel SDS-PAGE e existe um decréscimo dos níveis diferenciais de glicação no plasma entre o 3º e o 5º dia após o transplante verificado pelo Western Blot com marcação por AGP. Foi observado este resultado para os três pacientes analisados. Para tentar perceber se esta variação dos níveis de glicação é específica do plasma ou ocorre

também nas *Red Blood Cells*, fomos medir os níveis de proteínas glicadas com AGP nestas células. Na **figura III-21** podemos analisar a marcação com AGP nas RBC do paciente BH7 e como controlo a marcação com β -actina.

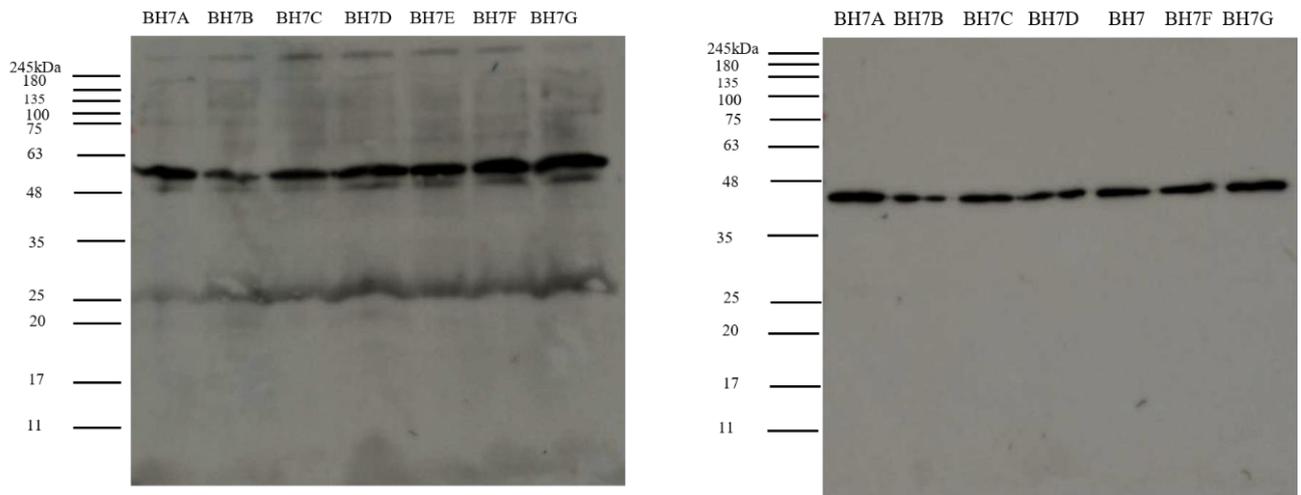


Figura III-21 - Análise por Western Blot dos níveis de glicação derivada da Argpirimidina (AGP) em amostras de RBC do paciente BH7. À esquerda, RBC marcada com AGP com os diferentes tempos de recolha do paciente BH7, sendo o tempo A correspondente ao dia do transplante e o tempo G à recolha após 144 horas ao transplante. À direita, RBC marcada com β -actina com os diferentes tempos de recolha do paciente BH7, sendo o tempo A correspondente ao dia do transplante e o tempo G à recolha após 144 horas ao transplante.

Como se pode verificar pela **figura III-21** os níveis de glicação por AGP nas RBC não variam com o mesmo padrão ao longo do tempo do que o observado para o plasma. O que se pode concluir que a ligeira variação observada é específica das proteínas do plasma e que deve ser aprofundado num trabalho futuro.

3.2. – Níveis de glicação diferenciais associados aos interactuantes da TTR

Para além do modelo de patogénese já descrito em capítulos anteriores, o qual assenta na perda de estabilidade do tetrâmero da TTR devido à presença de mutações (tal como revisto por Hurshman *et al.*, 2004 e por Johnson *et al.*, 2012). Apesar do conhecimento do modelo, é possível que interações da TTR com outras proteínas possam alterar o curso da doença. Para além disso, estes interactuantes podem ainda sofrer alterações pós-transdacionais, nomeadamente processos de glicação. Este processo poderá condicionar a ação dos interactuantes, uma vez que pode inibir ou potenciar a sua ação, o que deve ser avaliado.

Desta forma, repetiu-se o ensaio de “*pull-down*”, no qual se incubou a TTR acoplada à proteína GST com as amostras de plasma de pacientes controlo e PAFNT de forma a identificar possíveis interactuantes da TTR, os quais foram separadas por SDS-PAGE, seguindo-se a marcação por AGP por forma a verificar se os interactuantes estão ou não na sua forma glicada.

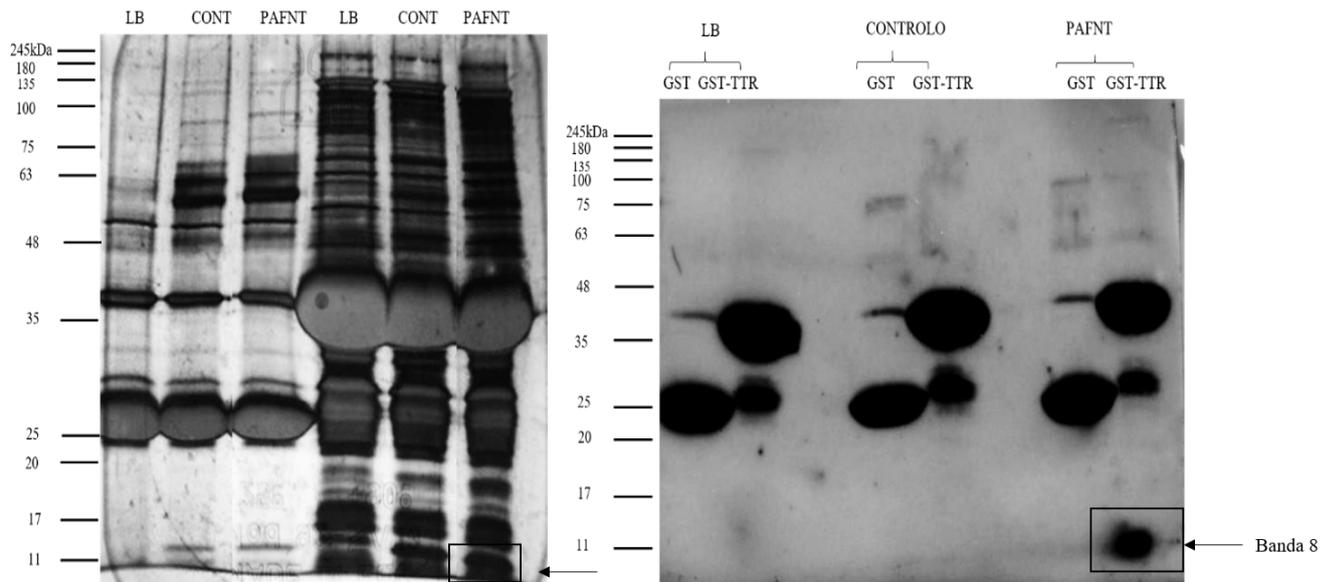


Figura III-22. Análise por SDS-PAGE (esquerda) e Western Blot (direita) de Pull-down de controlo e PAFNT.

Como se pode ver pela **figura III-22**, o paciente controlo apesar de ter identificado pelo menos duas proteínas como interagentes, a banda 8 que corresponde ao urocortino-3 e a banda 10 correspondente à albumina, nenhuma das bandas se encontra glicada. Já o paciente PAFNT apresenta a banda 8 com elevado padrão de glicação.

De forma a avaliar qual a variação dos interagentes glicados que ocorre após o transplante e se essa glicação é exclusiva da patologia repetiu-se o processo de *pull-down* mas com incubação com amostras de plasma de pacientes BH os quais sofreram um transplante com fígado cadáver, sendo que os tempos escolhidos estão relacionados com o decaimento da variante V30M verificado no início do trabalho. Segue-se os resultados do *pull-down* obtidos com as amostras do paciente BH7 na **figura III-23**:

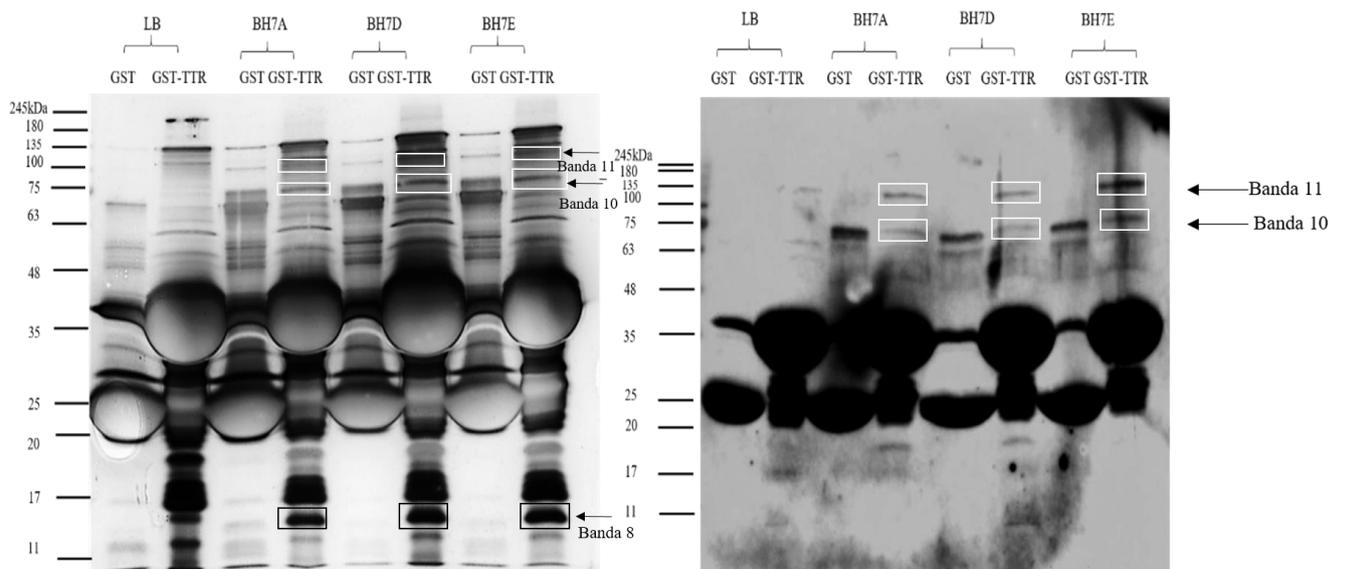


Figura III-23 Análise por SDS-PAGE (esquerda) e Western Blot (direita) de Pull-down de paciente BH7.

No caso do paciente BH7, podemos verificar que o padrão de glicação documentado na **figura III-22** do paciente PAFNT não está presente. Contudo, aparecem duas bandas com níveis diferenciais de glicação crescentes no paciente BH7, nomeadamente a banda 10 e a banda 11. Estes padrões de glicação apresentam um aumento ao longo do tempo após o transplante, o que significa a forma glicada desta proteínas parece interagir de forma mais intensa com a TTR WT do que com a TTR V30M.

IV – DISCUSSÃO

O modelo de patogênese da PAF, baseado em estudos *in vitro*, tem por base a perda de estabilidade do tetrâmero da TTR devido à ocorrência de mutações pontuais na cadeia polipeptídica (tal como revisto por Hurshman *et al.*, 2004 e por Johnson *et al.*, 2012). A mutação mais comum desta patologia é a substituição de uma valina na posição 30 por uma metionina (V30M) na cadeia polipeptídica da TTR, tal como revisto por Ando *et al.*, 2013 e por Parman *et al.*, 2016. Para além da importância da presença da mutação, é importante também perceber qual a proporção de variantes da TTR que cada tipo de paciente possui. Para tal, C. Ribeiro-Silva *et al.*, 2011 determinou que os pacientes PAFNT e DLT possuem uma razão 60%/40% de TTR WT/V30M em circulação. Para além da quantificação da proporção de variantes presentes em cada tipo de paciente, é importante quantificar o tempo de meia vida da TTR. O tempo de meia vida corresponde ao tempo para o qual ocorre a substituição de metade da quantidade total de TTR no plasma. Esta proteína é sintetizada e degradada no fígado, sendo que após o transplante de fígado de cadáver num paciente PAF é esperado que ocorra a substituição total da variante V30M em circulação pela variante WT. Até à data, nenhum estudo foi publicado por forma a quantificar o decaimento das variantes da TTR em humanos, nomeadamente utilizando espectrometria de massa. Só é possível realizar este estudo em humanos acompanhando os indivíduos PAF após o transplante. Sendo assim, o trabalho desenvolvido nesta tese de mestrado é pioneiro e de extrema relevância uma vez que foi possível quantificar o decaimento da variante TTR V30M após vários dias do transplante hepático recorrendo à Espectrometria de Massa, nomeadamente à espectrometria de massa de elevada resolução possível com MALDI FTICR. Foi-nos possível observar que a variante V30M desaparece na sua totalidade 5 dias após o transplante que está em linha com o descrito para a TTR WT na literatura por Makover *et al.*, 1988, o qual determinou o tempo de meia vida da TTR por marcação isotópica em ratinhos.

Como já referido anteriormente, o modelo de patogênese da PAF assenta na perda de estabilidade da TTR devido à presença de mutações nesta proteína. Contudo, a presença de interatuantes da TTR podem condicionar a progressão da doença. Desta forma torna-se importante identificar e caracterizar os interactuantes da TTR. A TTR tem como função o transporte de tiroxina (T4) e de retinol (que corresponde à vitamina A) através da formação de um complexo com o retinol binding protein (RBP) (Ueda & Ando 2014). O RBP é um dos principais interactuantes da TTR. É uma proteína de 21 kDa, cuja função é transportar o retinol no sangue e é sintetizado no fígado tal como a TTR (tal como revisto por Raghu & Sivakumar 2004). O facto de esta proteína estar presente no ensaio de pulldown em indivíduos Controlo e PAFNT valida a metodologia utilizada. Contudo, não foi possível a observação deste interactuante nas amostras dos pacientes transplantados analisados, o qual deverá ser confirmado em estudos futuros, nomeadamente em indivíduos com mais tempo de transplante e em pacientes transplantados com fígado sequencial, dado que esta proteína é importante para estabilizar o tetrâmero de TTR e uma interação mais reduzida com a TTR nestes indivíduos pode ser um dos fatores que induz a PAF adquirida em indivíduos que recebem um fígado sequencial.

Para além do RBP, outro interactuante da TTR já descrito na literatura é a albumina. Esta também pertence à classe de transportadores de tiroxinas tal como a TTR e a TBG (do inglês, *thyroxine-binding globulin*) (Friesema *et al.*, 2005). É sintetizada no fígado e tem como função de transporte de outras moléculas, nomeadamente bilirrubina, hormonas, metais, vitaminas e também drogas (Adaptado de VII). T. Kugimiya *et al.*, em 2011 determinou diversos pontos cruciais para a

compreensão do papel da albumina na progressão da PAF, nomeadamente: 1) os níveis plasmáticos da albumina diminuem com a progressão da PAF; 2) a albumina possui maior afinidade para as formas amilóides e desnaturadas da TTR do que com a TTR WT; 3) a albumina estabiliza as formas tetraméricas de ambas as variantes e 4) suprime a formação de fibras amilóides de ambas as variantes. Os resultados obtidos neste trabalho vêm confirmar o trabalho de T. Kugimiya, visto que foi também possível identificar a albumina como interactuante da TTR através da purificação por *pull-down*. Além disso nós verificámos que a interação da Albumina com a TTR não parece variar ao longo do tempo após o transplante o que nos sugere uma interacção com a TTR independente da Variante presente em circulação. Foram ainda identificados outros dois interactuantes da TTR, nomeadamente o urocortino-3 e a IgG1 os quais até ao momento não existe literatura descrita destas duas proteínas como interactuantes da TTR. A IgG1 é uma imunoglobulina cuja principal função é desencadear a resposta do sistema imunitário na presença de moléculas estranhas (tal como revisto por Vidarsson *et al.*, 2014) e o urocortino-3 é um ligando do CRF (do inglês, *corticotropin releasing factor*) (Li *et al.*, 2003), sendo o CRF um péptido que possui um papel importante na resposta ao stress (Perrin & Vale 1999). O urocortino-3 é também um neuropéptido expresso no sistema nervoso central (Lewis *et al.*, 2001), contudo Li *et al.*, em 2003 identificou que este péptido é também expresso nas células β do pâncreas, tendo sido considerado um modelador dos níveis de glucose, estimulando a produção de glucogénio e secreção de insulina. Estes dois interactuantes da TTR identificados neste trabalho podem estar relacionados com os níveis diferenciais de glicação que os pacientes PAF apresentam, já que o urocortino-3 é um modulador dos níveis de glucose (a glicação corresponde à adição de moléculas de glucose a proteínas) e a IgG1 poderá ser acionada através do desencadeamento de respostas inflamatórias uma vez que a ativação dos RAGEs (receptores dos AGES) leva à ativação do NF-kB e de respostas inflamatórias.

Considerada uma modificação pós-transducional, a glicação tem sido descrita como tendo um efeito significativo no *foldings*, estabilidade, *turnover* e função das proteínas (Luthra and Balasubramanian, 1993), o qual poderá estar associado à danificação de tecidos celulares que ocorre em patologias severas como a PAF (Thornalley, 2008). Para além disso, já foram feitas observações do envolvimento da glicação na PAF, nomeadamente através da deteção e quantificação por Argpirimidina em depósitos de pacientes PAF (Gomes *et al.*, 2005) e mais recentemente da Costa *et al.*, em 2011 descobriu no plasma de pacientes PAF proteínas com níveis diferenciais de glicação derivados do metilglioxal. Identificaram atmbém o aumento dos níveis diferenciais de glicação em proteínas ao longo do tempo em pacientes que foram sujeitos a um transplante em dominó (da Costa *et al.*, 2011). Neste trabalho, a avaliação dos níveis diferenciais de glicação no plasma de pacientes transplantados com fígado de cadáver após apenas 6 dias apresentam uma diminuição entre o terceiro e o quinto dia após o transplante. Não há literatura descrita até ao momento que justifiquem esta observação, sendo necessário uma avaliação mais profunda num trabalho futuro.

Relativamente à glicação é ainda importante compreender se esta modificação está presente nas proteínas interactuantes da TTR e de que forma é que compromete a progressão da patologia. Os interactuantes da TTR identificados neste trabalho foram a albumina, o urocortino-3, o RBP e a IgG1. Contudo, apenas a albumina e a IgG1 apresentam níveis diferenciais de glicação. A albumina é uma proteína com massa molecular de 66,7 kDa, constituída por 585 aminoácidos, alguns dos quais com elevada suscetibilidade de sofrer processos de glicação nomeadamente argininas e lisinas sendo o transporte uma das suas principais funções O resíduo de lisina na posição

525 é um dos mais conhecidos locais de glicação (tal como revisto por J. Anguizola *et al.*, 2013). A albumina possui um tempo de meia vida longo (cerca de 21 dias) e devido à sua elevada concentração no plasma torna-a uma proteína sensível à glicação (revisto por P. Rondeau & E. Bourdon 2011). Já a IgG1 é uma imunoglobulina, também uma das proteínas mais abundantes do plasma com uma massa molecular de 150 kDa e a sua função é ligar-se a moléculas estranhas e desencadear a resposta do sistema imunitário (tal como revisto por Vidarsson *et al.*, 2014). Esta proteína apresenta pelo menos dois locais passíveis de sofrer glicação, ambos na região constante da mesma (Kaschak *et al.*, 2011).

Em ambos os casos, foi possível verificar que interação com a proteína glicada em pacientes PAF transplantados com fígado cadáver com o aumento do tempo após transplante, e assim temos uma interação mais forte com a variante WT do que com a variante V30M. No seguimento deste trabalho será interessante perceber se este aumento se deve a uma reduzida capacidade da variante V30M interagir de forma geral com outras proteínas, ou se de facto as proteínas glicadas têm maior afinidade para a variante WT.

**V – CONSIDERAÇÕES
FINAIS E PERSPECTIVAS**

V – CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Atualmente a ideia de que o desenvolvimento da PAF não é apenas derivado de fatores genéticos começa a ter evidências fortes que a sustentam. Em causa estão a presença de interactuantes que possam estabilizar a variante V30M. Para além disso, é também importante verificar se os interactuantes apresentam níveis diferenciais de glicação e de que forma estes dois fatores não genéticos combinados influenciam a progressão da doença.

Para além de resultados de extrema importância para a compreensão de um modelo de patogénese multifatorial para a PAF, é ainda importante referir que alguns dos resultados, nomeadamente a determinação do tempo de meia vida da TTR em pacientes PAF e a identificação de dois dos 4 interactuantes da TTR (Urocortino-3 e a IgG1) identificados neste trabalho são resultados pioneiros no estudo desta patologia.

Como referido anteriormente a TTR apresenta uma curva de decaimento sigmóide decrescente, sendo que ao fim de 6 dias já não circula a variante mutada da TTR no plasma humano e, portanto, se antes e após o transplante for possível monitorizar os constituintes plasmáticos em circulação torna-se viável identificar os interactuantes específicos da variante V30M uma vez que estes deverão estar presentes antes do transplante e se verificar o seu decréscimo após o transplante. Contudo, até à data apenas foram identificados interactuantes da TTR WT, sendo urgente a confirmação dos resultados obtidos neste trabalho e a identificação de novos interactuantes da variante V30M através de técnicas como a imunoprecipitação.

Todos estes pontos devem ser tidos em conta em planos de estudos futuros, de forma a compreender inteiramente os mecanismos associados à formação e deposição de fibras amilóides.

VI - REFERÊNCIAS

- Alzheimer A. (1907) Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Z Psychiatrie Psychisch-Gerichtliche Med.* 64, 146–148.
- Ando, Y., Coelho, T., Berk, J. L., Cruz, M. W., Ericzon, B. G., Ikeda, S. I., ... & Said, G. (2013). Guideline of transthyretin-related hereditary amyloidosis for clinicians. *Orphanet journal of rare diseases*, 8(1), 1.
- Andrade, C. (1952). A peculiar form of peripheral neuropathy. *Brain*, 75(3), 408-427.
- Anguizola, J., Matsuda, R., Barnaby, O. S., Hoy, K. S., Wa, C., DeBolt, E., ... & Hage, D. S. (2013). Review: Glycation of human serum albumin. *Clinica Chimica Acta*, 425, 64-76.
- Barreiros, A. P., Otto, G., Kahlen, B., Teufel, A., & Galle, P. R. (2015). Familial amyloidosis: Great progress for an orphan disease. *Journal of hepatology*, 62(2), 483-485.
- Blake, C.C. et al., 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), pp.1-12.
- Buxbaum, J. N., & Reixach, N. (2009). Transthyretin: the servant of many masters. *Cellular and molecular life sciences*, 66(19), 3095-3101.
- Carvalho, A., Rocha, A., & Lobato, L. (2015). Liver transplantation in transthyretin amyloidosis: issues and challenges. *Liver Transplantation*, 21(3), 282-292.
- Claydon, A. J., & Beynon, R. (2012). Proteome dynamics: revisiting turnover with a global perspective. *Molecular & Cellular Proteomics*, 11(12), 1551-1565.
- Coelho, T., Choro, R., Sousa, A., Alves, I., Torres, M. F., & Saraiva, M. J. M. (1996). Compound heterozygotes of transthyretin Met30 and transthyretin Met119 are protected from the devastating effects of familial amyloid polyneuropathy. *Neuromuscular Disorders*, 6, S20.
- Cohen, A. S. (1986) General introduction and a brief history of the amyloid fibril, in Marrink, J., and Van Rijswijk, M H. (Eds.), *Amyloidosis*, pp. 3-19, Nijhoff Dordrecht
- Connors, L. H., Lim, A., Prokhaeva, T., Roskens, V. A., & Costello, C. E. (2003). Tabulation of human transthyretin (TTR) variants, 2003. *Amyloid*, 10(3), 160-184.
- da Costa, G., Gomes, R. A., Guerreiro, A., Mateus, É., Monteiro, E., Barroso, E., ... & Cordeiro, C. (2011). Beyond genetic factors in familial amyloidotic polyneuropathy: protein glycation and the loss of fibrinogen's chaperone activity. *PLoS One*, 6(10), e24850.
- Davie, C. A. (2008). A review of Parkinson's disease. *British medical bulletin*, 86(1), 109-127.
- Dikiy, I., & Eliezer, D. (2012). Folding and misfolding of alpha-synuclein on membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1818(4), 1013-1018.
- Domon, B., & Aebersold, R. (2006). Mass spectrometry and protein analysis. *science*, 312(5771), 212-217.
- Fändrich, M. (2012). Oligomeric intermediates in amyloid formation: structure determination and mechanisms of toxicity. *Journal of molecular biology*, 421(4), 427-440.

- Fonseca, D., Gilberto, S., Ribeiro-Silva, C., Ribeiro, R., Guinote, I. B., Saraiva, S., ... & Freire, A. P. (2016). The role of fibrinogen glycation in ATTR: evidence for chaperone activity loss in disease. *Biochemical Journal*, BCJ20160290.
- Friesema, E. C., Jansen, J., Milici, C., & Visser, T. J. (2005). Thyroid hormone transporters. *Vitamins & Hormones*, 70, 137-167.
- Furtado, A., Tome, L., Oliveira, F. J., Furtado, E., Viana, J., & Perdigoto, R. (1997, March). Sequential liver transplantation. In *Transplantation proceedings*(Vol. 29, No. 1, pp. 467-468). Elsevier.
- Gkogkolou, P., & Böhm, M. (2012). Advanced glycation end products: Key players in skin aging?. *Dermato-endocrinology*, 4(3), 259-270.
- Gomes, R., Silva, M. S., Quintas, A., Cordeiro, C., Freire, A., Pereira, P., ... & Freire, A. P. (2005). Argpyrimidine, a methylglyoxal-derived advanced glycation end-product in familial amyloidotic polyneuropathy. *Biochemical Journal*, 385(2), 339-345.
- Härd, T., & Lendel, C. (2012). Inhibition of amyloid formation. *Journal of molecular biology*, 421(4), 441-465.
- Holmgren, G., Steen, L., Ekstedt, J., Groth, C. G., Ericzon, B. G., Eriksson, S., ... & Hawkins, P. (1991). Biochemical effect of liver transplantation in two Swedish patients with familial amyloidotic polyneuropathy (FAP-met30). *Clinical genetics*, 40(3), 242-246.
- Hou, X., Aguilar, M. I., & Small, D. H. (2007). Transthyretin and familial amyloidotic polyneuropathy. *FEBS Journal*, 274(7), 1637-1650.
- Hurshman, A. R., White, J. T., Powers, E. T., & Kelly, J. W. (2004). Transthyretin aggregation under partially denaturing conditions is a downhill polymerization. *Biochemistry*, 43(23), 7365-7381.
- Johnson, S. M., Connelly, S., Fearn, C., Powers, E. T., & Kelly, J. W. (2012). The transthyretin amyloidoses: from delineating the molecular mechanism of aggregation linked to pathology to a regulatory-agency-approved drug. *Journal of molecular biology*, 421(2), 185-203.
- Kabat, E. A., Moore, D. H., & Landow, H. (1942). An electrophoretic study of the protein components in cerebrospinal fluid and their relationship to the serum proteins. *Journal of Clinical Investigation*, 21(5), 571.
- Kaschak, T., Boyd, D., & Yan, B. (2011). Characterization of glycation in an IgG1 by capillary electrophoresis sodium dodecyl sulfate and mass spectrometry. *Analytical biochemistry*, 417(2), 256-263.
- Kelly, J. W. (1997). Amyloid fibril formation and protein misassembly: a structural quest for insights into amyloid and prion diseases. *Structure*, 5(5), 595-600.
- Knowles, T. P., Vendruscolo, M., & Dobson, C. M. (2014). The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15(6), 384-396.

- Kugimiya, T., Jono, H., Saito, S., Maruyama, T., Kadowaki, D., Misumi, Y., ... & Obayashi, K. (2011). Loss of functional albumin triggers acceleration of transthyretin amyloid fibril formation in familial amyloidotic polyneuropathy. *Laboratory Investigation*, 91(8), 1219-1228.
- Kuhar, M. J. (2010). Measuring levels of proteins by various technologies: Can we learn more by measuring turnover?. *Biochemical pharmacology*, 79(5), 665-668.
- Landers, K. A., Mortimer, R. H., & Richard, K. (2013). Transthyretin and the human placenta. *Placenta*, 34(7), 513-517.
- Lewis, K., Li, C., Perrin, M. H., Blount, A., Kunitake, K., Donaldson, C., ... & Bilezikjian, L. (2001). Identification of urocortin III, an additional member of the corticotropin-releasing factor (CRF) family with high affinity for the CRF2 receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(13), 7570-7575.
- Li, C., Chen, P., Vaughan, J., Blount, A., Chen, A., Jamieson, P. M., ... & Vale, W. (2003). Urocortin III is expressed in pancreatic β -cells and stimulates insulin and glucagon secretion. *Endocrinology*, 144(7), 3216-3224.
- Luthra, M., & Balasubramanian, D. (1993). Nonenzymatic glycation alters protein structure and stability. A study of two eye lens crystallins. *Journal of Biological Chemistry*, 268(24), 18119-18127.
- Maillard, L. C. (1912). Réaction de Maillard. *Action des acides aminés sur les sucres: formation des mélanoidines par voie mé thodique. Compte-rendu de l'Académie des sciences*, 154, 66-68.
- Mahmood, T., & Yang, P. C. (2012). Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American journal of medical sciences*, 4(9), 429.
- Makover, A., Moriwaki, H., Ramakrishnan, R. A. J. A. S. E. K. H. A. R., Saraiva, M. J., Blaner, W. S., & Goodman, D. S. (1988). Plasma transthyretin. Tissue sites of degradation and turnover in the rat. *Journal of Biological Chemistry*, 263(18), 8598-8603.
- Maroteaux, L., Campanelli, J. T., & Scheller, R. H. (1988). Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *The Journal of Neuroscience*, 8(8), 2804-2815.
- Parman, Y., Adams, D., Obici, L., Galán, L., Guerguelcheva, V., Suhr, O. B., & Coelho, T. (2016). Sixty years of transthyretin familial amyloid polyneuropathy (TTR-FAP) in Europe: where are we now? A European network approach to defining the epidemiology and management patterns for TTR-FAP. *Current opinion in neurology*, 29(Suppl 1), S3.
- Perrin, M. H., & Vale, W. W. (1999). Corticotropin releasing factor receptors and their ligand family. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 885(1), 312-328.
- Planté-Bordeneuve, V., & Said, G. (2011). Familial amyloid polyneuropathy. *The Lancet Neurology*, 10(12), 1086-1097.
- Poortmans, J. R., Carpentier, A., Pereira-Lancha, L. O., & Lancha Jr, A. (2012). Protein turnover, amino acid requirements and recommendations for athletes and active populations. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 45(10), 875-890.

- Prapunpoj, P., & Leelawatwattana, L. (2009). Evolutionary changes to transthyretin: structure–function Relationships. *FEBS journal*, 276(19), 5330-5341.
- Purkey, H. E., Palaninathan, S. K., Kent, K. C., Smith, C., Safe, S. H., Sacchettini, J. C., & Kelly, J. W. (2004). Hydroxylated polychlorinated biphenyls selectively bind transthyretin in blood and inhibit amyloidogenesis: rationalizing rodent PCB toxicity. *Chemistry & biology*, 11(12), 1719-1728.
- Raghu, P., & Sivakumar, B. (2004). Interactions amongst plasma retinol-binding protein, transthyretin and their ligands: implications in vitamin A homeostasis and transthyretin amyloidosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1703(1), 1-9.
- Reitz, C. (2012). Alzheimer's disease and the amyloid cascade hypothesis: a critical review. *International journal of Alzheimer's disease*, 2012.
- Ribeiro-Silva, C., Gilberto, S., Gomes, R. A., Mateus, É., Monteiro, E., Barroso, E., ... & Cordeiro, C. (2011). The relative amounts of plasma transthyretin forms in familial transthyretin amyloidosis: a quantitative analysis by Fourier transform ion-cyclotron resonance mass spectrometry. *Amyloid*, 18(4), 191-199.
- Rondeau, P., & Bourdon, E. (2011). The glycation of albumin: structural and functional impacts. *Biochimie*, 93(4), 645-658.
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. *Recombinant protein expression in microbial systems*, 7.
- Rudolph, T., Kurz, M. W., & Farbu, E. (2008). Late-onset familial amyloid polyneuropathy (FAP) Val30Met without family history. *Clinical medicine & research*, 6(2), 80-82.
- Sakaki, Y. et al., 1989. Human transthyretin (prealbumin) gene and molecular genetics of familial amyloidotic polyneuropathy. *Molecular biology & medicine*, 6(2), pp.161-8.
- Schuchardt, S., & Sickmann, A. (2007). Protein identification using mass spectrometry: a method overview. In *Plant Systems Biology* (pp. 141-170). Birkhäuser Basel.
- Schwarzman, A. L., & Goldgaber, D. (2008). Interaction of transthyretin with amyloid b-protein: binding and inhibition of amyloid formation. *The Nature and Origin of Amyloid Fibrils*, 780, 146.
- Sekijima, Y. (2014). Recent progress in the understanding and treatment of transthyretin amyloidosis. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*, 39(3), 225-233.
- Serpell, L. C. (2000). Alzheimer's amyloid fibrils: structure and assembly. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1502(1), 16-30.
- Shipanova, I. N., Glomb, M. A., & Nagaraj, R. H. (1997). Protein modification by methylglyoxal: chemical nature and synthetic mechanism of a major fluorescent adduct. *Archives of biochemistry and biophysics*, 344(1), 29-36.
- Sikora, J. L., Logue, M. W., Chan, G. G., Spencer, B. H., Prokaeva, T. B., Baldwin, C. T., ... & Connors, L. H. (2015). Genetic variation of the transthyretin gene in wild-type transthyretin amyloidosis (ATTRwt). *Human genetics*, 134(1), 111-121.

- Singh, R., Barden, A., Mori, T., & Beilin, L. (2001). Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia*, 44(2), 129-146.
- Sousa, M. M., Du Yan, S., Stern, D., & Saraiva, M. J. (2000). Interaction of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) with transthyretin triggers nuclear transcription factor kB (NF-kB) activation. *Laboratory investigation*, 80(7), 1101-1110.
- Sparkes, R. S., Sasaki, H., Mohandas, T., Yoshioka, K., Klisak, I., Sakaki, Y., ... & Simon, M. I. (1987). Assignment of the prealbumin (PALB) gene (familial amyloidotic polyneuropathy) to human chromosome region 18q11. 2-q12. 1. *Human genetics*, 75(2), 151-154.
- Starzl, T. E., Marchioro, T. L., Von Kaulla, K. N., Hermann, G., Brittain, R. S., & Waddell, W. R. (1963). Homotransplantation of the liver in humans. *Surgery, gynecology & obstetrics*, 117, 659.
- Suhr, O. B., Herlenius, G., Friman, S., & Ericzon, B. G. (2000). Liver transplantation for hereditary transthyretin amyloidosis. *Liver Transplantation*, 6(3), 263-276.
- Tantau, A., Laszlo, M., & Laszlo, I. (2015). Transthyretin amyloidosis: an over review. *Cardiovascular Regenerative Medicine*, 2.
- Thornalley, P. J. (2008). Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems-role in ageing and disease. *Drug metabolism and drug interactions*, 23(1-2), 125-150.
- Tomba, P. (2012). Intrinsically disordered proteins: a 10-year recap. *Trends in biochemical sciences*, 37(12), 509-516.
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(9), 4350-4354.
- Ueda, M., & Ando, Y. (2014). Recent advances in transthyretin amyloidosis therapy. *Translational neurodegeneration*, 3(1), 1.
- Vidarsson, G., Dekkers, G., & Rispen, T. (2014). IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Frontiers in immunology*, 5, 520.
- Westermarck, P., Sletten, K., Johansson, B., & Cornwell, G. G. (1990). Fibril in senile systemic amyloidosis is derived from normal transthyretin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(7), 2843-2845.
- Wilczek, H. E., Larsson, M., Yamamoto, S., & Ericzon, B. G. (2008). Domino liver transplantation. *Journal of hepato-biliary-pancreatic surgery*, 15(2), 139-148.
- Yates, J. R. (2000). Mass spectrometry: from genomics to proteomics. *Trends in Genetics*, 16(1), 5-8.
- Yates III, J. R. (2004). Mass spectral analysis in proteomics. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 33, 297-316.

Livros:

1. Hames, B. (1998). *Gel Electrophoresis of Proteins A Practical Approach*. 3rd edition, Oxford University Press. New York
2. Lovric, J. (2011). *Introducing Proteomics From concepts do sample preparation, mass spectrometry and data analysis*. 1st edition, Wiley-Blackwell. UK

Páginas da internet:

- I. http://images.google.de/imgres?imgurl=http%3A%2F%2F3.bp.blogspot.com%2F-cjWmuMUPvK4%2FUjtIxKreJVI%2FAAAAAAAAAAays%2FpYBiW4zh3I0%2Fw1200-h630-p-nu%2Fdomino_new1.gif&imgrefurl=http%3A%2F%2Fdonatelife-organdonation.blogspot.com%2F2013%2F09%2Fdomino-transplant-saves-patient.html&h=294&w=560&tbnid=YWRkCsNPK5fstM%3A&docid=s_ZexljxtEcAhM&ei=LKPNV9PxOIONgAbM2rOYCA&tbn=isch&iact=rc&uact=3&dur=418&page=4&start=76&ndsp=22&ved=0ahUKEwjTt_G42PjOAhWDBsAKHUztDIMQMwh2KFEwUQ&bih=643&biw=1366
(9 Agosto 2016 12h)
- II. http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6040.pdf
(14 de Agosto 2016 19h)
- III. <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/1602761-Western-Blotting-Handbook.pdf>
(15 de Agosto 2016 14h)
- IV. [http://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/pgex_vectors_\(ge_healthcare\)/pGEX-4T-2/pGEX-4T-2_1x.png](http://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/pgex_vectors_(ge_healthcare)/pGEX-4T-2/pGEX-4T-2_1x.png)
(15 de Agosto 2016 18h)
- V. <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/1601945-Protein-Interactions-Handbook.pdf>
(16 de Agosto 2016 11h)
- VI. <http://www.uniprot.org/uniprot/P01857>
(12 de Setembro 19h)
- VII. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK204/pdf/Bookshelf_NBK204.pdf
(13 de Setembro 13h)
- VIII. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6223/>
(16 de Setembro 20h)

VII - ANEXOS

Nos anexos o leitor pode encontrar resultados que complementam o texto dos capítulos anteriores.

1 - Figuras

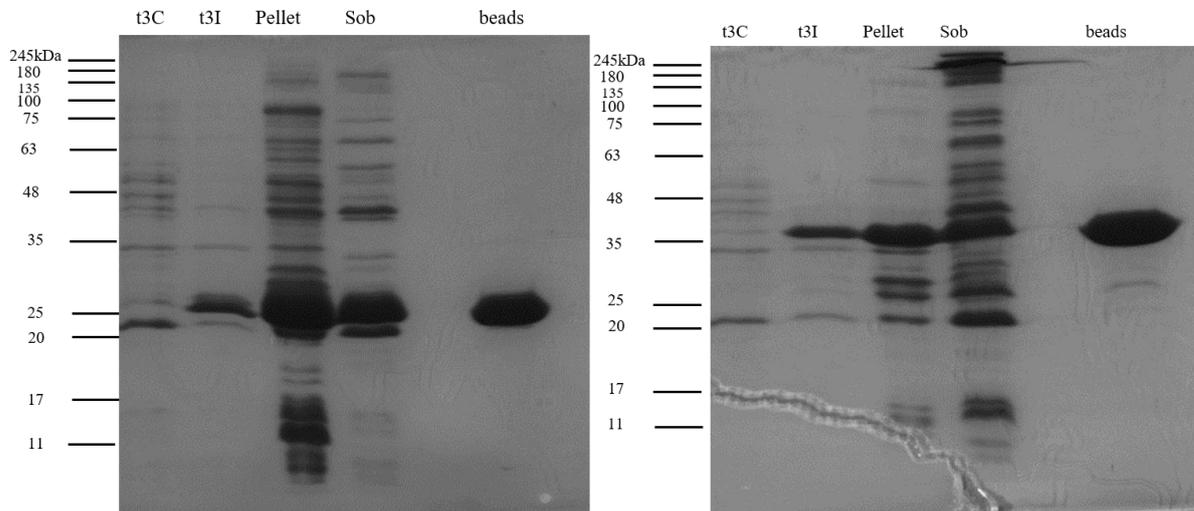


Figura VII-24 - Purificação da TTR após ensaio de pulldown. À esquerda encontra o pulldown de GST do sobrenadante de PGEX (sendo que as lanes correspondem t3C = 3 horas de incubação do tubo controle; t3I = 3 horas de incubação com 1mM de IPTG ; pellet = fração insolúvel do extrato; sob = sobrenadante, fração solúvel do extrato e beads = sobrenadante PGEX +beads de GST). À direita encontra o pulldown de GST do sobrenadante de PGC002 TTR-WT (sendo que as lanes correspondem t3C = 3 horas de incubação do tubo controle; t3I = 3 horas de incubação com 1mM de IPTG ; pellet = fração insolúvel do extrato; sob = sobrenadante, fração solúvel do extrato e beads = sobrenadante PGC002 TTR-WT +beads de GST).

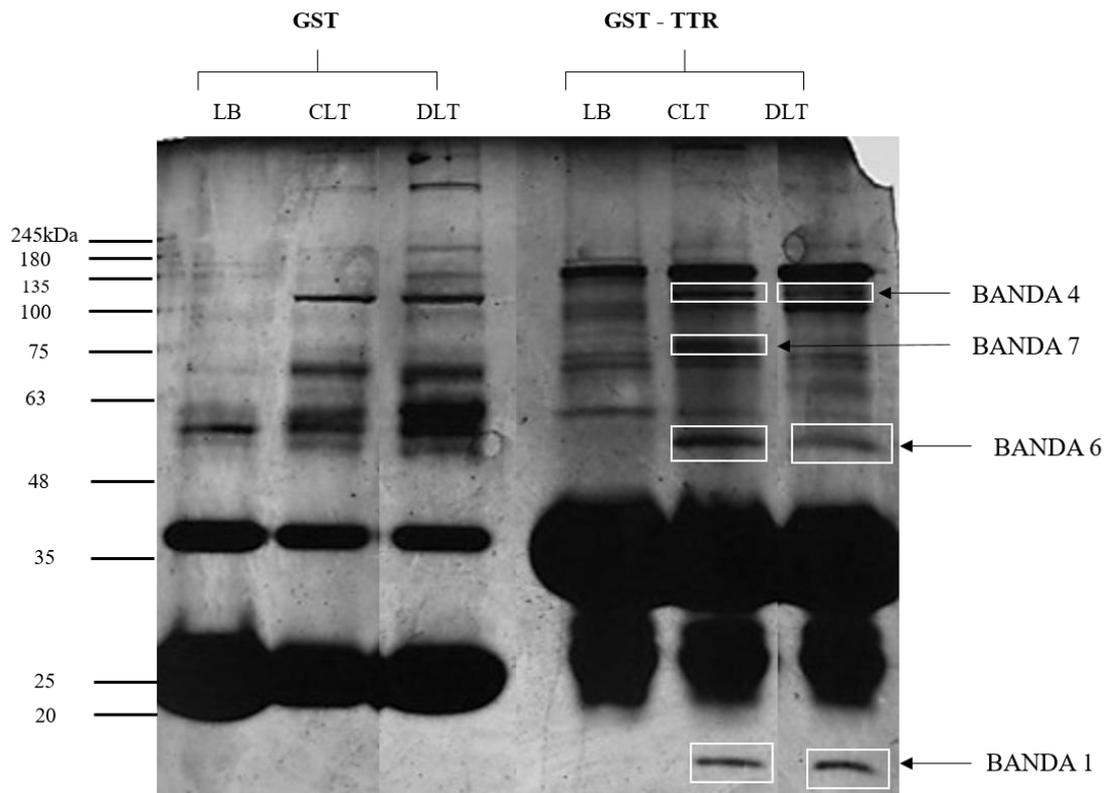


Figura VII-25 - Purificação da TTR após ensaio de pull-down beads de GST com amostras de indivíduos doente com PAF transplantados com fígado de cadáver (CLT 23 G) e doentes não PAF transplantados com fígado de doente PAF (DLT 18E).

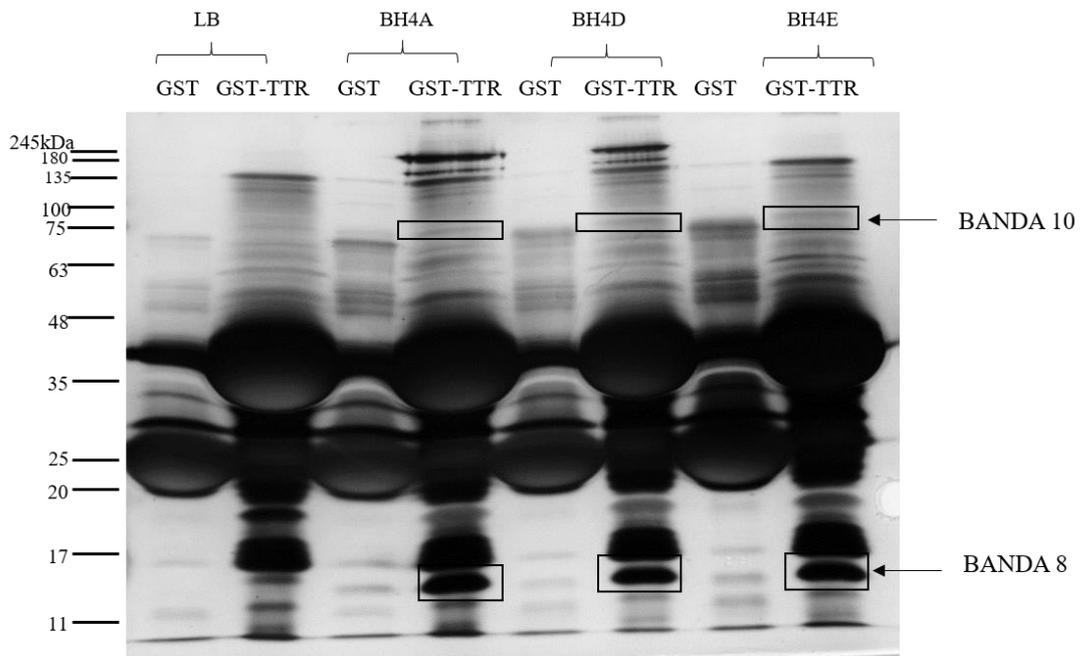


Figura VII-26 - Purificação da TTR após ensaio de pull-down e incubação com amostras de indivíduo BH4 com vários tempos de colheita após transplante (tempo A, tempo D e tempo E).

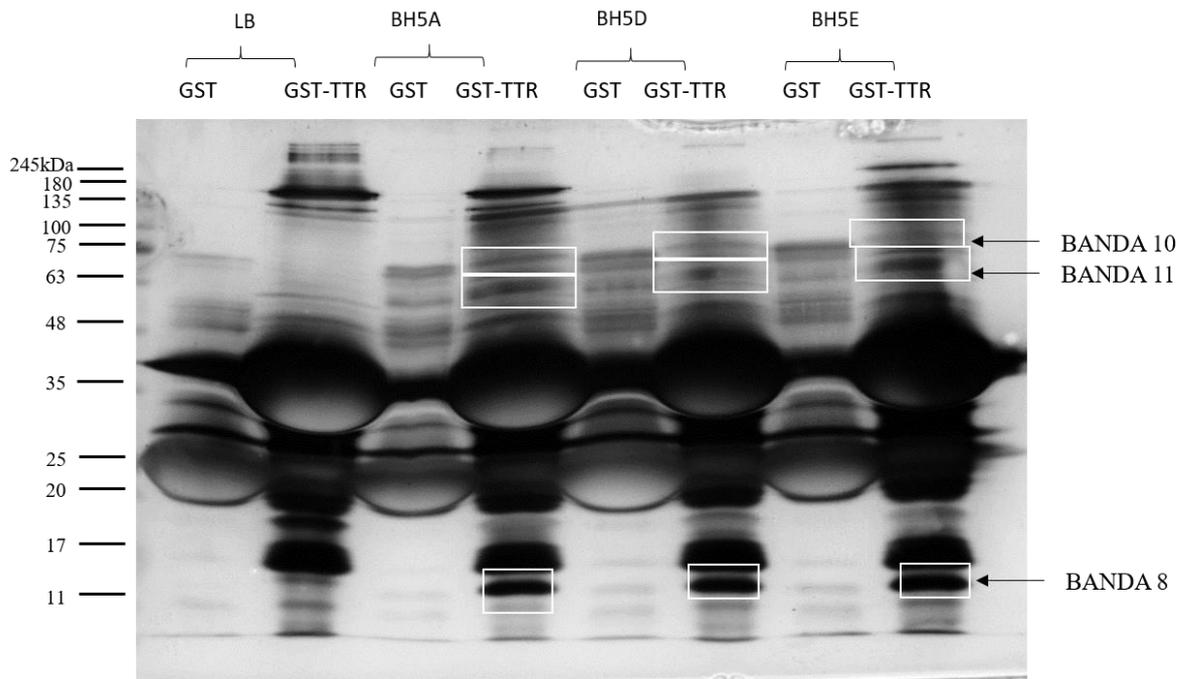


Figura VII-27 Purificação da TTR após ensaio de pulldown e incubação com amostras de indivíduo BH5 com vários tempos de colheita após transplante (tempo A, tempo D e tempo E).

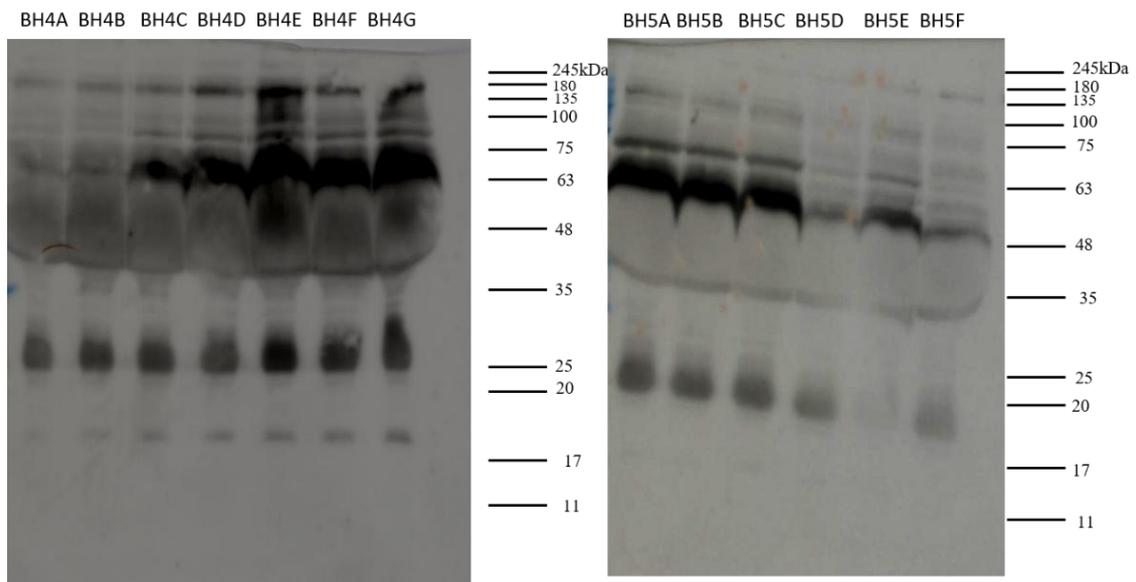


Figura VII-28 - Análise por Western Blot dos níveis de glicação derivada da Argpirimidina (AGP) em amostras de plasma. À esquerda relativo ao paciente Bh4 e à direita relativo ao paciente BH5.

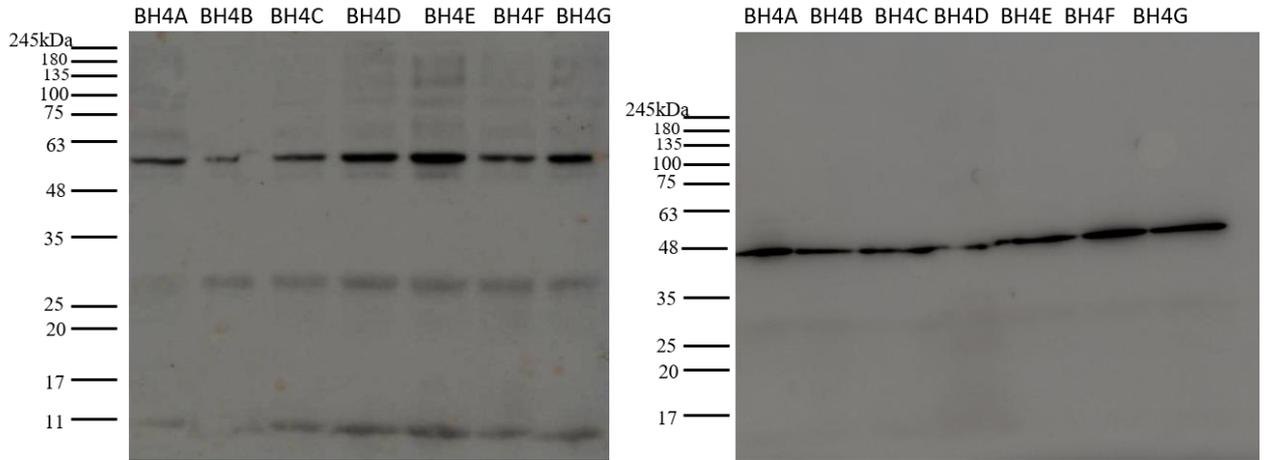


Figura VII-29 - Análise por Western Blot dos níveis de glicação derivada da Argpirimidina (AGP) em amostras de RBC do paciente BH4. À esquerda, RBC marcada com AGP com os diferentes tempos de biópsia do paciente BH4, sendo o tempo A correspondente ao dia do transplante e o tempo G à biópsia após 144 horas ao transplante. À direita, RBC marcada com β -actina com os diferentes tempos de biópsia do paciente BH4, sendo o tempo A correspondente ao dia do transplante e o tempo G à biópsia após 144 horas ao transplante.

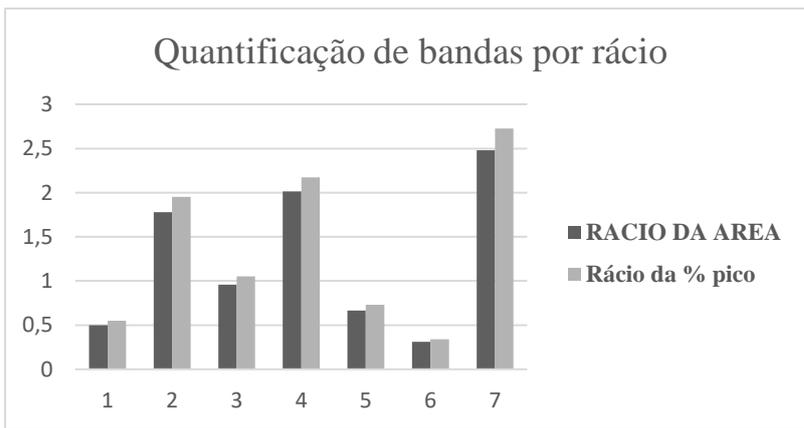


Figura VII-30 - Gráfico da quantificação da glicação associada às RBC do paciente BH4.

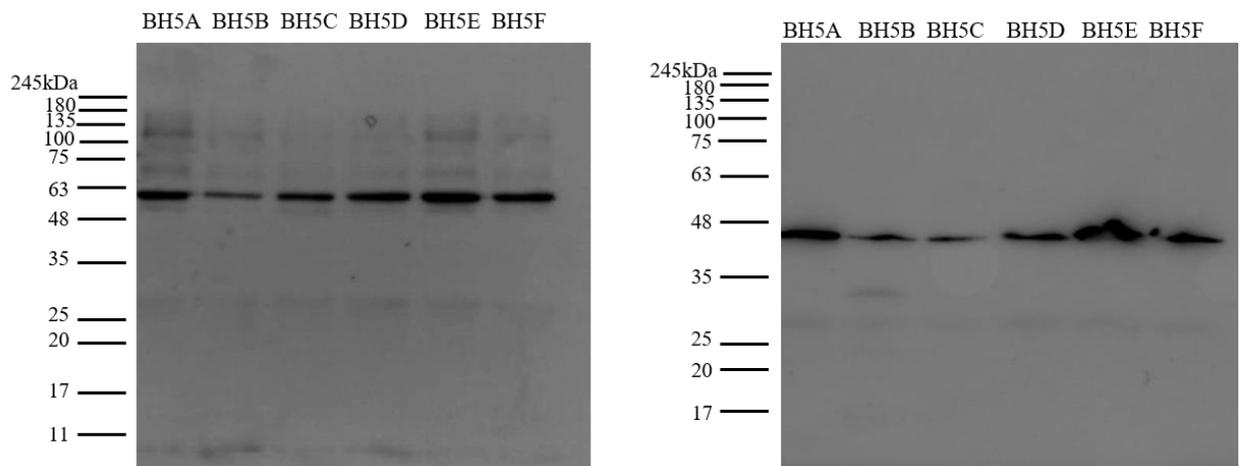


Figura VII-31 - Análise por Western Blot dos níveis de glicação derivada da Argpirimidina (AGP) em amostras de RBC do paciente BH5. À esquerda, RBC marcada com AGP com os diferentes tempos de biópsia do paciente BH5,

sendo o tempo A correspondente ao dia do transplante e o tempo G à biópsia após 144 horas ao transplante. À direita, RBC marcada com β -actina com os diferentes tempos de biópsia do paciente BH5, sendo o tempo A correspondente ao dia do transplante e o tempo G à biópsia após 144 horas ao transplante.

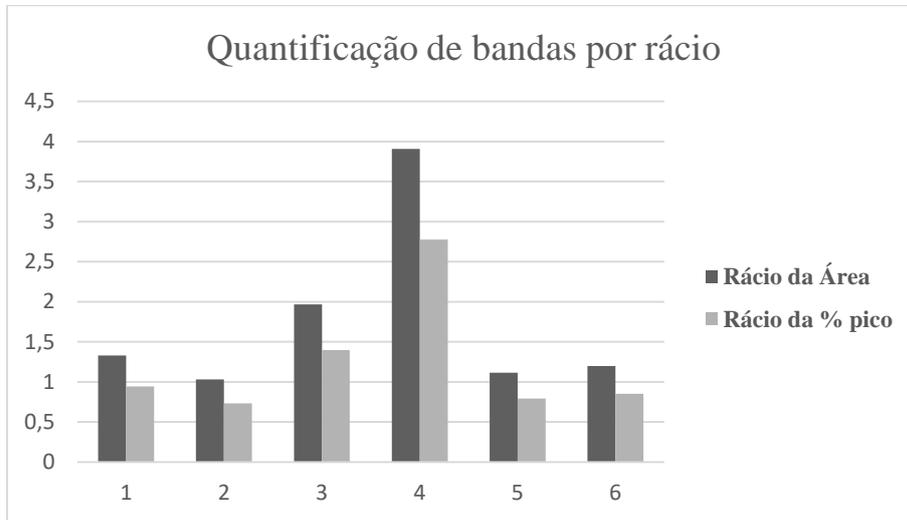


Figura VII-32 - Gráfico da quantificação da glicação associada às RBC do paciente BH5.

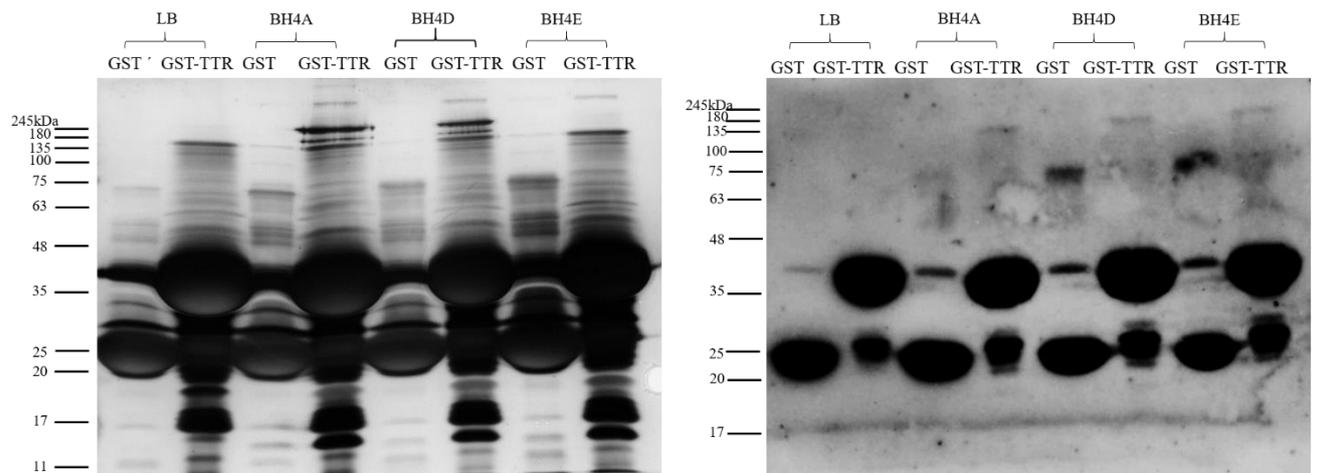


Figura VII-33 - Análise por SDS-PAGE (esquerda) e Western Blot (direita) de Pulldown de paciente BH4.

VII - ANEXOS

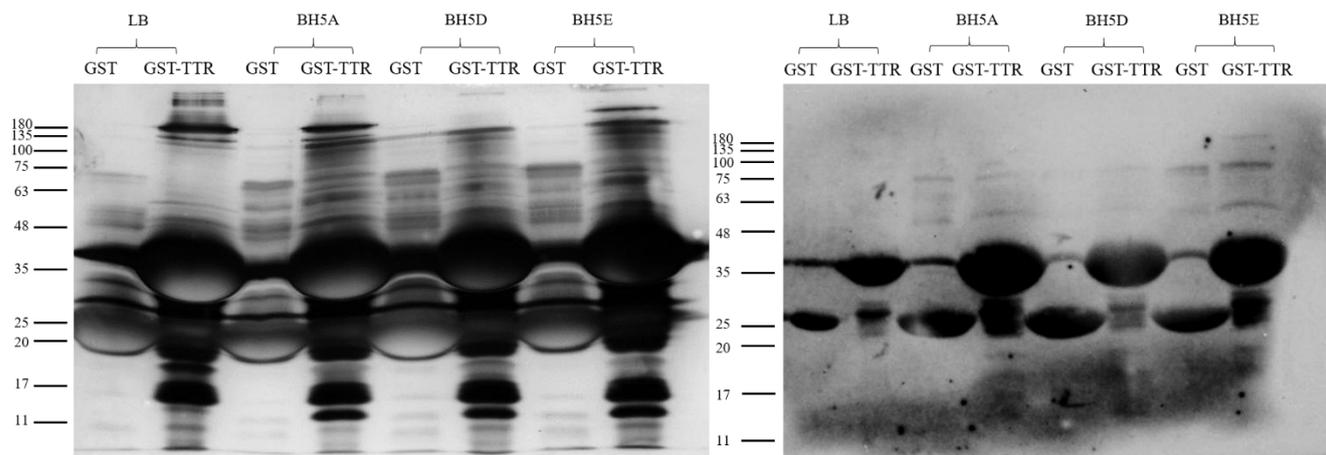


Figura VII-34 - Análise por SDS-PAGE (esquerda) e Western Blot (direita) de Pull-down de paciente BH5.

2 – Tabelas

Tabela VII-8 - Quantificação de cada banda marcada no western blot da figura VII-26 dos anexos, quer com AGP quer com β -actina do paciente BH4.

<u>RBC MARCADAS COM AGP</u>			<u>RBC MARCADAS COM B-ACTINA</u>		
AMOSTRA	Área da banda	% do pico obtido	AMOSTRA	Área da banda	% do pico obtido
BH4A	7684,69	9,478	BH4A	3096,962	3,478
BH4B	2951,225	3,64	BH4B	9510,054	10,679
BH4C	7168,276	8,841	BH4C	10760,47	12,083
BH4D	17386,47	21,444	BH4D	8625,518	9,86
BH4E	22245,47	27,436	BH4E	23194,18	26,046
BH4F	9323,347	11,499	BH4F	5240,619	5,885
BH4G	14320,74	17,662	BH4G	28623,44	32,143

Tabela VII-9 - Cálculos dos rácios entre as áreas ou a percentagem do pico de cada amostra da tabela VII-8, sendo o rácio calculado como (banda marcada com AGP)/(banda marcada com β -actina) do paciente BH4

AMOSTRA	RÁCIO DA ÁREA	RÁCIO DA % DO PICO
BH4A	2,4814	2,7251
BH4B	0,3103	0,3409
BH4C	0,6662	0,7317
BH4D	2,0157	2,1748
BH4E	0,9591	1,0534
BH4F	1,7791	1,9540
BH4G	0,5003	0,5495

Tabela VII-10 - Quantificação de cada banda marcada no western blot da figura VII-28 dos anexos, quer com AGP quer com β -actina do paciente BH5.

RBC MARCADAS COM AGP

RBC MARCADAS COM B-ACTINA

AMOSTRA	Área da banda	% do pico obtido	AMOSTRA	Área da banda	% do pico obtido
BH5A	20852,81	17,683	BH5A	17370,86	20,735
BH5B	8640,518	7,327	BH5B	7760,296	9,263
BH5C	16606,05	14,082	BH5C	4248,347	5,071
BH5D	23023,08	19,523	BH5D	11709,25	13,977
BH5E	27305,86	23,155	BH5E	26504,32	31,638
BH5F	21497,95	18,23	BH5F	16181,44	19,315

Tabela VII-11 - Cálculos dos rácios entre as áreas ou a percentagem do pico de cada amostra da tabela VII-10, sendo o rácio calculado como (banda marcada com AGP)/(banda marcada com β -actina) do paciente BH5.

AMOSTRA	RÁCIO DA ÁREA	RÁCIO DA % DO PICO
BH5A	1,2004	0,8528
BH5B	1,1134	0,7910
BH5C	3,9088	2,7770
BH5D	1,9662	1,3968
BH5E	1,0302	0,7319
BH5F	1,3286	0,9438