Paulo Manuel de Castro Pinho e Costa

Amiloidoses Transtirretínicas

Da Biopatologia à Terapêutica

Porto 1994

Paulo Manuel de Castro Pinho e Costa

Amiloidoses Transtirretínicas

Da Biopatologia à Terapêutica

Porto 1994

Dissertação de Candidatura ao grau de Doutor, apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas "Abel Salazar" da Universidade do Porto.

Para a João e para a Marta

com muito amor

Preâmbulo

O trabalho que se expõe nos capítulos seguintes tem um contorno talvez pouco habitual, não resultando de um projecto com um objectivo singular, bem definido, sendo antes um conjunto de averiguações e projectos que se desenvolveram em torno de uma tecnologia específica e de uma patologia particular, pelo que creio ser útil uma explicação das circunstâncias da minha vida profissional em que este se desenrolou:

Tendo terminado em 1984 o período obrigatório do Internato Geral, após a conclusão do curso de Medicina, momentaneamente livre de distrações académicas ou profissionais, gravitei naturalmente para a actividade que verdadeiramente me atraía, o trabalho científico, actividade para cuja aprendizagem me foram abertas as portas no Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, assim como no Centro de Estudos de Paramiloidose, que nessa altura coabitava um espaço reduzido com o Laboratório de Neuroquímica do Hospital Geral de Santo António, onde o meu pai, o Dr. Pedro Pinho e Costa, dirigia a investigação laboratorial.

Foi neste contexto que me foi dada a oportunidade, por intermédio da Prof. Maria de Sousa, então como sempre interessada no estudo da Hemocromatose Hereditária, de me deslocar por alguns mêses ao Laboratório de Imunopatologia do Prof. Peter Biberfeld, no Hospital Karolinska, em Estocolmo, para estudar, nessa patologia, a expressão dos receptores da transferrina nas células do sistema monocítico-macrofágico. Tirando partido desta oportunidade, foi combinado entre o Prof. Biberfeld, que se deslocara ao Porto por ocasião de um dos Encontros Nacionais de Imunologia, e o meu pai, interessado em dar continuidade aos estudos imunoquímicos que tão bons resultados tinham dado na Polineuropatia Amiloidótica Familiar, que a minha estadia no Hospital Karolinska seria aproveitada para uma tentativa de obtenção de um anticorpo monoclonal específico para a proteína amilóide, tecnologia cujo desenvolvimento exigia meios à época absolutamente fora das possibilidades do Centro de Estudos de Paramiloidose, e da qual não havia experiência no âmbito nacional.

Permaneci de Outubro de 1984 a Abril de 1985 em Estocolmo, dividindo o meu tempo entre o estudo da Hemocromatose Hereditária, realizada no Laboratório de Imunopatologia sob a orientação conjunta do Prof. Biberfeld e do Dr. Erik Björn-Rasmudsen, e a aprendizagem das técnicas de desenvolvimento de anticorpos monoclonais, essencialmente realizada no Instituto de Patologia Tumoral, situado no mesmo hospital, sob a orientação do Dr. V. P. Collins, que já na altura dispunha de uma bateria de anticorpos monoclonais para a transtirretina, desenvolvidos em colaboração com o Dr. Björn Jacobsson, com cujo auxílio também pude contar nas últimas fases deste projecto.

Ao contrário do estudo da Hemocromatose Hereditária, que infelizmente não chegou a resultados conclusivos, a minha iniciação às técnicas de produção de anticorpos monoclonais decorreu da melhor forma, tendo resultado dessa primeira experiência dois anticorpos ainda hoje de grande utilidade, como veremos adiante. A utilização de métodos imunoquímicos no estudo da paramiloidose revelava-se uma vez mais uma opção promissora, que pretendi desenvolver após o meu regresso a Portugal.

Procurando ligar-me a uma instituição académica, que entre nós é ainda quase exclusivamente o meio onde se pode desenvolver uma carreira centrada na investigação, fui encaminhado para o Prof. Fernando Oliveira Torres, regente da cadeira de Patologia Geral, que me recebeu com grande cordialidade, e que me convenceu a não abandonar a carreira médica, sugerindo-me antes que ingressasse na especialidade de Anatomia Patológica, onde poderia adquirir uma formação valiosa, como de facto pude verificar.

Esta tese resulta consequentemente de cerca de dez anos de investigação científica no campo da paramiloidose, que durante um largo período se teve de subordinar às exigências de um internato médico de especialidade, sendo a reduzida disponibilidade de tempo uma das principais razões para a lentidão do desenrolar destes trabalhos. Durante esses anos houve uma considerável evolução em todos os ramos da biologia e medicina, que determinaram algumas inflexões no foco da investigação e na metodologia empregue, que, julgo, transparecem na exposição subsequente.

A acomodação entre o trabalho de investigação e a assistência hospitalar tornou-se particularmente difícil a partir da altura em que se avançou com o projecto de terapêutica por imunodepuração, devido ao grau de dificuldade e responsabilidade inerentes a um projecto dessa natureza, facto a que foi sensível a Direcção do Hospital Geral de Santo António, com interesse em participar nesse projecto, pelo que me foi concedido o privilégio de me devotar exclusivamente ao trabalho de investigação. A disponibilidade daí resultante foi o catalizador que permitiu a elaboração desta tese.

Aproveito para agradecer a todos os que me ajudaram ao longo deste caminho. Em primeiro lugar, à Anabela Claro Teixeira, que me acompanhou quase desde o início, e sem a qual dificilmente poderia ter prosseguido este trabalho de investigação. Grande parte do trabalho laboratorial foi por ela realizado, devendo-se ao seu espírito inquieto e à sua notável capacidade de iniciativa algumas experiências de resultados importantes. Devo muito igualmente ao meu pai, que arcou com a responsabilidade destes projectos, que em grande parte definiu e orientou, tendo sempre em vista a necessidade de oferecer aos doentes paramiloidóticos a esperança de um futuro melhor, exemplo de dedicação a uma causa e a uma instituição que considero motivo apropriado de orgulho.

Agradeço ao Prof. Fernando Oliveira Torres ter aceite a incumbência de orientar esta tese, para o que teve certamente de usar de muita paciência para com este seu aluno pouco assíduo, mas que aprecia o seu agudo sentido crítico e a rasgada visão da biologia que lhe

soube transmitir. Tenho muito a agradecer também à Prof. Maria João Saraiva, por todas as valiosas sugestões e ajudas que prestou desinteressadamente ao longo destes anos, sendo a sua actividade de investigação no Centro de Estudos de Paramiloidose um dos principais factores que condicinaram o clima particularmente favorável a essa actividade que aí existe, e de que pude beneficiar. Para tal contribuíram também todos os outros que aí trabalham, com cuja amizade e simpatia sempre pude contar, e que espero me perdoem este agradecimento colectivo. Saliento apenas a Teresa Barandela, que nos últimos anos esteve encarregue de todo o sector de técnicas histológicas e de microscopia electrónica, e a quem devo a execução de todas as marcações imuno-histoquímicas e de imunomicroscopia electrónica representadas neste trabalho. Não quero deixar de agradecer igualmente ao Dr. António Guimarães o apoio a que recorri constantemente para execução e interpretação de todas as técnicas morfológicas, e em particular para a microscopia electrónica.

Agradeço ao Dr. Claude Rivat o empenhamento que demonstrou na colaboração estabelecida entre o Centro de Estudos de Paramiloidose do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge e a Unidade 284 do INSERM, no âmbito do projecto de imunodepuração, assim como a boa vontade com que me recebeu no seu laboratório, onde me desloquei por cerca de um mês, em Outubro de 1988, a fim de construir e ensaiar os primeiros imunoadsorventes, aí adquirindo os conhecimentos necessários para a concretização desse projecto.

O início dos ensaios de terapêutica da PAF por imunodepuração envolveu uma larga equipa multidisciplinar, de que saliento apenas os elementos que a eles mais directamente estão ou estiveram ligados: o Dr. Admar Estácio, a Drª Luísa Lobato, o Dr. Rui Castro, a Drª Irene Aragão, a Drª Teresa Coelho, o Prof. António Falcão de Freitas, o Prof. João Castro e Melo, a Enfª Rosa Azevedo e a Drª Margarida Ribeiro.

Um agradecimento muito especial devo à minha mulher, Maria João, cujo incitamento e ajuda foi essencial para a rápida conclusão desta tese.

Para o Nuno e para a Maria Helena, os meus agradecimentos pela ajuda prestada durante a montagem deste trabalho.

É meu dever também agradecer à Paracélsia, e em particular ao Prof. A. Albuquerque e à Drª Isabel Borges Salgado, a realização dos ensaios de apirogenicidade dos imunofiltros sem qualquer contrapartida, assim como a ajuda prestada na formulação, ensaio e fornecimento dos solutos de regeneração e conservação.

Por fim, tenho de agradecer ao Centro de Estudos de Paramiloidose do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge o acolhimento que me foi dado, sendo-me dada toda a liberdade que poderia desejar na utilização dos recursos aí disponíveis para a concretização destes estudos. Este agradecimento é extensivo a todas as instituições que apoiaram financeiramente o Centro de Estudos de Paramiloidose nestes projectos, começando pela

Fundação Calouste Gulbenkian, que financiou a criação de um laboratório de cultura celular logo no início dos trabalhos, os National Institutes of Health dos EUA, os clubes Lions, a Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica, a Agência de Inovação e o Ministério da Saúde, só para mencionar as mais significativas, sem as quais nada disto teria sido possível.

Para cumprimento do nº 2 do Artigo 8º do Decreto-Lei nº 388/70, esclarece-se que foram utilizados neste trabalho resultados já publicados, em colaboração, nas publicações que aqui se discriminam:

Costa PMP, Jacobsson B, Collins VP, Biberfeld P (1986). Unmasking antigenic determinants in amyloid. *J Histochem Cytochem* **24:** 1683-5

Costa PMP, Saraiva MJM, Costa PP (1988). Anticorpos monoclonais anti-TTR^{Met30}. *Bol Hosp (HGSA)* **3:** 127-31

Costa PMP, Saraiva MJM, Jacobsson B, Biberfeld P, Collins VP, Costa PP (1988). Epitope mapping of TTR (prealbumin) and TTR(Met^{30}) with monoclonal antibodies. *In:* Isobe T, Araki S, Uchino F, Kito S, Tsubura E, eds. *Amyloid and Amyloidosis*. New York: Plenum. pp 307

Costa PMP, Teixeira A, Regnault V, Rivat C, Saraiva MJM, Costa PP. A monoclonal antibody that recognizes several distinct amyloidogenic TTR variants (1990). *In:* Costa PP, Freitas AF, Saraiva MJM, eds. *Familial Amyloidotic Polyneuropathy and other Transthyretin Related Disorders*. Porto: Arquivos de Medicina **3 (Spec. Issue):** 247-9

Costa PMP, Regnault V, Teixeira A, Saraiva MJM, Rivat C, Stoltz J-F, Costa PP (1990). Removal of TTR from the plasma by immunoabsorption with monoclonal anti-TTR antibodies. *In:* Costa PP, Freitas AF, Saraiva MJM, eds. *Familial Amyloidotic Polyneuropathy and other Transthyretin Related Disorders*. Porto: Arquivos de Medicina **3 (Spec. Issue):** 379-80

Regnault V, Costa PMP, Teixeira A, Rivat C, Stoltz JF, Saraiva MJM, Costa PP (1992): Specific removal of transthyretin from plasma of patients with familial amyloidotic polyneuropathy: optimization of an immunoadsorption procedure. *Int J Artif Organs* **15:** 153-9

Saraiva MJM, Almeida MR, Sherman W, Gawinowicz MA, Costa P, Costa PP, Goodman DS (1992). A new transthyretin mutation associated with amyloid cardiomyopathy. *Am J Hum Gen* **50:** 1027-30

López Andreu FR, Munar-Qués M, Parrilla P, Escribano Soriano JB, Costa PP, Costa PMP, Almeida MR, Pons JA, Robles R, Sánchez-Bueno F, Ramírez P, Acosta F, Vicente Ibáñez J (1993). Trasplante hepático para el tratamiento de la polineuropatía amiloidótica familiar tipo I. *Med Clin (Barc)* **101:** 581-3

Costa PMP, Teixeira A, Saraiva MJM Costa PP (1993). Screening of transthyretin variants associated with amyloid neuropathy with FD6 monoclonal antibody (Abst.). *J Rheumathol* **20:** 185

Costa PMP, Teixeira A, Saraiva MJM, Costa PP (1993). Immunoassay for transthyretin variants associated with amyloid neuropathy. *Scand J Immunol* **38:** 177-82

É da minha responsabilidade a execução das experiências que estiveram na base dos resultados utilizados, assim como a sua interpretação, discussão e redacção.

Abreviaturas

ABTS	2,2'-azino-bis-3-etanotiazolino-sulfonato.
AEF	"Amyloid enhancing factor".
AMP	Adenosina monofosfato.
ANF	Factor natriurético atrial.
apoA1	Apolipoproteína A1.
bp	Pares de bases.
βPP	Polipéptido beta.
BSA	Albumina de bovino.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
DNA	Ácido desoxiribonucleico.
DTT	Ditiotreitol.
ELISA	"Enzyme-linked immunosorbent assay".
FCS	Soro fetal de bovino.
FITC	Fluoresceína isotiocianato.
FTIR	Espectroscopia no infravermelho com transformação de Fourrier.
GMP	Guanosina monofosfato.
HAT	Hipoxantina, aminopterina e timidina.
HGPRT	Hipoxantina guanosina fosforribosil transferase.
IAPP	"Islet amyloid polypeptide" (amilina).
IL-1	Interleucina 1.
IL-6	Interleucina 6.
KLH	"Keyhole limpet haemocyanin".
LCR	Líquido cefalorraquidiano.
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade.
Lp (a)	Lipoproteína (a).
MAP	Testes virais, de indução de anticorpos em murganhos.
MBS	Maleimido succinimida.
MCB	"Master Cell Bank"
mRNA	RNA mensageiro.
NMR	Ressonância nuclear magnética.
PAF	Polineuropatia Amiloidótica Familiar.
PCBs	Compostos policlorobifenílicos.
PrP^c	Proteína priónica celular.
RBP	Proteína transportadora do retinol.
RFLP	"Restriction fragments length polymorphism".
RNA	Ácido ribonucleico.
SAA	"Serum amyloid A protein".
SDS	Dodecilsulfato de sódio.
SDS-PAGE	"Sodium dodecil sulphate - polyacrylamide gel electrophoresis".
T_3	Tri-iodotironina.
T_4	Tiroxina.
TBG	Globulina transportadora da tiroxina.
TBS	Tampão TRIS salino.
TPCK	Tosil-fenilalanina-clorometano.
TSH	Hormona estimuladora da tireóide.
TTR	Transtirretina.
WCB	"Working Cell Bank".

Índice

Capítulo I

Amiloidose e TTR 1

As Amiloidoses - resenha histórica 1

Prólogo 1

Primórdios 1

Os primeiros estudos morfológicos 3

Diversidade clínica e anatómica 4

Bioquímica e genética molecular 6

Estudos biofísicos 9

Classificação actual das amiloidoses 11

Amiloidoses heredo-familiares 14

As amiloidoses ATTR 19

A Polineuropatia Amiloidótica Familiar de tipo Português 19

Outras amiloidoses relacionadas com a transtirretina 22

A Transtirretina 26

Amiloidogénese 32

Capítulo II

Os anticorpos monoclonais 36

Introdução 36

Linhas celulares de mieloma 37

Hibridação somática 39

Propriedades e usos dos anticorpos monoclonais 41

Breves considerações práticas 42

Perspectivas 44

Capítulo III

Desenvolvimento de anticorpos monoclonais anti-TTR 46

Introdução 46

Hibridomas 48

Imunização 48

Hibridação 49

Triagem 50

Reclonagem 51

Anticorpos monoclonais 51

Produção e purificação 51

Caracterização 52
Resultados **55**

Capítulo IV

Ensaio imunoenzimático com FD6 . . . . . **58**
Introdução **58**
Materiais e Métodos **59**
Resultados **62**
Conclusão **69**

Capítulo V

Imuno-histoquímica da proteína amilóide **71**
Objectivos **71**
Introdução **71**
A imuno-histoquímica nas amiloidoses **72**
A imuno-histoquímica no diagnóstico diferencial da PAF **73**
Utilização em imuno-histoquímica dos anticorpos monoclonais anti-TTR **74**

Capítulo VI

Terapêutica por imunodepuração **80**
Introdução **80**
Imunodepuração - Desenvolvimento Laboratorial **84**
Imunoadsorventes - Escolha da matriz 84
Imunoadsorventes - acoplamento do ligando 86
Imunoadsorventes - anticorpos monoclonais 90
Imunoadsorventes - utilização 91
Métodos analíticos 91
Resultados 91
Construção e ensaio de protótipos 97
Imunodepuração - Ensaio clínico piloto **99**
Considerações gerais 99
Fabrico dos imunofiltros 101
Realização do ensaio piloto 109
Resultados 111
Conclusão **118**

Capítulo VII

Conclusão **119**

Capítulo I

Amiloidose e TTR

As Amiloidoses - resenha histórica

Prólogo

Ao olhar para trás, para os acontecimentos destes últimos dois séculos, ao longo dos quais foram lançadas as modernas bases científicas da biologia e da medicina, alguns factores determinantes na progressão de todo o conhecimento científico nos chamaram desde muito cedo a atenção:

- A interdependência entre o progresso científico e o desenvolvimento tecnológico, que possibilitou a utilização de métodos analíticos cada vez mais sofisticados.
- A dependência desse progresso de condições sociais que numa abordagem superficial lhes poderiam parecer estranhas.
- O papel catalizador das teorias dominantes no debate científico, o seu reflexo na nomenclatura utilizada, e a sua influência no sentido das investigações.

Pareceu-nos pois de interesse para o enquadramento actual do campo de investigação das amiloidoses uma revisão destes acontecimentos históricos, ainda que no âmbito restrito do interesse pelas origens dos conceitos que enformam esta matéria, e que ainda hoje se encontram em permanente mutação.

A revisão desses acontecimentos mereceu a atenção de numerosos investigadores, sendo a exposição que se segue dos primórdios da investigação da amiloidose em grande parte baseada nas publicações de Puchtler e Sweet (1966), de Letterer (1968), de Schwartz (1970), de Gomes d'Oliveira (1971) e de Cohen (1986).

Primórdios

As ciências biológicas e médicas tal como as concebemos actualmente, têm origem no grande desenvolvimento científico que se verificou nos fins do século XVIII e princípios do século XIX, em plena Revolução Industrial, sob a influência das correntes filosóficas liberais e positivistas, e das consequentes transformações sociais, epitomizadas na Revolução Francesa. O termo *Biologia* é introduzido em 1802 por Lamarck e Treviranus para designar a ciência dos processos vitais, um ano após Bichat ter pela primeira vez decomposto os órgãos em tecidos na sua *Anatomia Geral aplicada à Medicina e à Fisiologia*. A química, que também progride rapidamente, é aplicada nas primeiras análises

de matérias orgânicas. Em 1811, Bertholet demonstra por análise elementar que as substâncias albuminóides (proteínas) diferem dos lípidos e hidratos de carbono pela presença de azoto (cerca de 15%), ausente naqueles. O iodo, descoberto em 1810, é empregue desde 1814 por Colin e Claubry para evidenciar o amido. Raspail funda a histoquímica em 1825, ao empregar esse mesmo teste em cortes histológicos. A citologia conhece importantes progressos, em particular na botânica, onde a morfologia celular é mais fácil de evidenciar. A constatação da existência do núcleo celular é feita por Brawn em 1831. Os desenvolvimentos técnicos da microscopia entre 1830 e 1840, com a introdução do microscópio composto munido de lentes acromáticas, estendem ao reino animal as observações dos botânicos, levando Schleiden e Schwann em 1838 e 1839 a postular a constituição de todos os seres vivos por elementos celulares, a chamada *teoria celular*. Relutantemente, a Medicina abandona a fundamentação da sua prática nos chamados *sistemas*, para se interessar pela auscultação e percussão dos doentes.

Em 21 de dezembro de 1850, em Würzburg, o jovem professor de patologia da universidade local, Rudolf Virchow, então com 29 anos, adepto fervoroso da teoria celular e feroz adversário do vitalismo, já famoso pelas suas descrições dos fenómenos tromboembólicos e das leucemias, e que lançará em 1858 as bases da patologia moderna ao publicar *Die Cellularpathologie*, assiste a uma sessão da Physikalisch-Medizinische Gesellschaft em que Schenk expõe o trabalho "Estrutura e desenvolvimento dos grãos de amido nas plantas", onde entre outros factos nota a magnífica cor azul que tomam os grãos de amido corados pelo iodo, quando expostos ao ácido sulfúrico concentrado. No fim da sessão, Virchow faz menção da presença de corpos semelhantes na patologia humana, os *corpora amylacea* cerebrais, as concreções prostáticas, os grãos sinoviais, os precipitados biliares, etc., designando-os por corpos *amilóides*. Esta é a provavelmente a primeira circunstância em que o termo *amilóide*, cunhado em 1938 por Schleiden para designar um constituinte amiláceo próprio das plantas, e posteriormente empregue por Harting para designar o produto da acção do ácido sulfúrico diluído sobre a celulose (Harting, 1847), foi empregue no contexto da patologia humana.

Não se sabe se Virchow, quando empregou a designação *amilóide* tinha apenas em mente as semelhanças morfológicas, ou se já consideraria a hipótese de uma real identidade química entre estes corpos e o amido, então considerado a marca distinctiva dos tecidos vegetais. É natural que uma tal hipótese o tenha seduzido, pois a descoberta de um constituinte vegetal nos tecidos humanos poderia considerar-se um argumento favorável à unidade fundamental de todos os seres vivos, e consequentemente à teoria celular. O que é certo, é que nos anos seguintes adoptou o teste do soluto iodado - ácido sulfúrico, que aplicou a cortes de encéfalo em que estavam presentes *corporae amilacea*, obtendo não a cor azul própria do amido, mas a cor violácea própria da celulose (Virchow, 1854abc). Entendendo esta observação como algo de fundamental, imediatamente a comunicou à Academia das Ciências de Paris, apresentando-a como a descoberta de celulose no corpo humano (Virchow, 1853a). Pouco depois descrevia a presença de "celulose" nos grãos de sago do

baço (Virchow, 1853b), apesar de a cor resultante do teste do soluto iodado - ácido sulfúrico ser amarelo-avermelhada e não violeta.

Embora a palavra *amilóide* tenha ficado para sempre associada ao nome de Virchow, que a vulgarizou, a exploração sistemática de todos os órgãos pelo iodo - ácido sulfúrico deve-se a Meckel, prossector em Berlin, que demonstrou a natureza sistémica da "degenerescência lardácea" de Rokitansky, caracterizada pela presença de depósitos esplénicos, hepáticos, renais e vasculares que tomavam uma tonalidade avermelhada ou violácea. Meckel não lhes reconheceu natureza celulósica, considerando-os antes constituídos por colesterina (Meckel, 1853). Virchow não só rebateu essa opinião (acertadamente), como recusou mesmo admitir a presença de amilóide na degenerescência lardácea, que considerou diferente da verdadeira degenerescência amilóide[1]. Não obstante a opinião de Virchow, que se viu ultrapassado pelas observações posteriores, ficou assim estabelecida a equivalência entre degenerescência lardácea e amiloidose.

A amiloidose é, portanto, desde a sua incepção, uma entidade nosológica cuja característica determinante é de natureza histoquímica. Era um achado necrópsico envolvendo diversos órgãos, particularmente o fígado, baço e rins, de indivíduos com evidência de uma doença prévia de evolução arrastada, notoriamente infecções crónicas como a osteomielite, a tuberculose e a sífilis, sendo a amiloidose considerada um acontecimento secundário de cariz degenerativo, provavelmente resultado de uma reacção celular inespecífica. Esta visão simplista, que resultou principalmente da uniformidade morfológica e aparente ausência de estrutura dos depósitos de amilóide, predominou até meados do século XX.

Os primeiros estudos morfológicos

Coube aos morfologistas os primeiros grandes progressos no estudo das amiloidoses, com a introdução de técnicas de visualização da substância amilóide com sensibilidade e especificidade crescentes: a descoberta em 1875, independentemente por Cornil, Heschl e Jurgens, da afinidade do violeta de metilo pelos depósitos de amilóide, método de coloração mais fiável que o iodo - ácido sulfúrico, que rápidamente substituiu (contra a resistência de Virchow), foi muito importante na altura. Só foi suplantado como método de coloração da substância amilóide com a introdução do vermelho do Congo (Benhold, 1922) especialmente após a descoberta de que as preparações resultantes apresentam uma birrefringência verde característica quando observadas sob luz polarizada (Divry e Florkin, 1927), método ainda hoje considerado o padrão de referência para a identificação histológica de amilóide. O uso de corantes fluorescentes, como a Tioflavina T (Vassar e Culling, 1959), teve alguma importância, dado a sua elevada sensibilidade, mas não podem ser utilizados isoladamente, pois não são específicos para a substância amilóide.

---

[1] no que foi ajudado pela inconstância do teste do iodo - ácido sulfúrico, que pode dar reacções diferentes em diversos órgãos afectados do mesmo indivíduo. Hoje sabe-se que na base desse teste está não o componente fundamental da substância amilóide mas de facto os glicosaminoglicanos que lhe estão associados (Cooper, 1974). Está assim de certo modo justificada a persistência de Virchow na crença da constituição da substância amilóide por hidratos de carbono.

Um contributo igualmente importante para um melhor reconhecimento destas doenças foi a introdução por Waldenström, em 1928, de uma nova agulha de biópsia hepática, que utilizou para seguir a evolução da amiloidose em doentes tuberculosos do sanatório que dirigia. Tendo tornado possível o diagnóstico em vida, catapultou as amiloidoses do lugar de curiosidade anátomo-patológica para o de uma afecção de interesse clínico.

Por fim, os primeiros estudos ultra-estruturais (Spiro, 1959; Cohen e Calkins, 1959), revelam a natureza fibrilar da substância amilóide, mostrando em todos os depósitos, qualquer que seja a sua origem, feixes mais ou menos desordenados de fibrilas não ramificadas, com 7 a 10 nm de diâmetro. Era a confirmação de que se estava em presença de uma entidade específica, com uma estrutura organizada, já entrevista nos estudos de microscopia de polarização, e não de uma simples degenerescência hialina.

Diversidade clínica e anatómica

Os primeiros indícios da heterogeneidade das amiloidoses foram fornecidos pelas observações clínicas. Estes surgem com a observação em 1856, por Wilks, e principalmente por Soyka (1876), e por Wild (1886), de casos de amiloidose sem doença subjacente determinada. Separou-se assim a amiloidose "primária" ("idiopática") da então mais comum amiloidose "secundária" ("adquirida"), denominações essas ainda hoje de uso corrente. Também por razões clínicas, mas principalmente pelo padrão "atípico" de distribuição anatómica, semelhante ao observado nas amiloidoses primárias, muito cedo se notou a tendência a separar as amiloidoses associadas ao mieloma múltiplo do grupo das amiloidoses "secundárias".

Para além destas formas de amiloidose sistémica, já no século passado foi notada por alguns patologistas a existência de depósitos isolados de amilóide em diversos órgãos, particularmente em indivíduos de idade avançada. Alguns patologistas, como Schwartz (1965, 1970) dedicaram à amiloidose senil muita da sua atenção. Hoje reconhece-se a existência de uma forma sistémica de amiloidose senil, predominantemente cardiovascular, a Amiloidose Senil Sistémica (Pitkänen *et al.*, 1984), na qual assume particular relevância clínica o envolvimento cardíaco (tendo sido durante muito tempo considerada uma amiloidose localizada cardíaca). De significado clínico incerto, mas de grande interesse para os "amiloidologistas", é a existência no mesmo contexto, de depósitos localizados de amilóide, nas ilhotas de Langerhans (Ehrlich e Ratner, 1961), particularmente em indivíduos com diabetes mellitus tipo II, e noutros órgãos endócrinos (paratireóides, hipófise, supra-renais), vesículas seminais, encéfalo (inclusões intracelulares no epitélio dos plexos coroideus e epêndima), aurículas cardíacas, e ainda na aorta e grandes vasos. Nestes últimos distingem-se três localizações distintas: na adventícia, integrantes de uma amiloidose senil sistémica, na média, de natureza desconhecida, e sub-íntimos, aparentemente relacionados com lesões ateroscleróticas (Muckle, 1986; Mucciano *et al.*, 1992).

Igualmente reconhecida há muito tempo é a presença de amilóide em tumores endócrinos, particularmente no carcinoma medular da tireóide e em alguns insulinomas (Porta *et al.*, 1962), nas placas e emaranhados neurofibrilares da doença de Alzheimer, em lesões liquenóides da pele, em alguns tumores pavimentosos, e ainda a existência de depósitos tumoriformes isolados de amilóide.

O último grande grupo de doenças amiloidóticas a ser individualizado é o das amiloidoses heredo-familiares. As primeiras descrições aprofundadas de amiloidoses hereditárias são as de Ostertag (1932, 1950), de Andrade (1951ab, 1952), de Rukavina *et al.* (1956), e de Frederiksen (1962), de que falaremos em detalhe mais adiante.

Um dos últimos tipos de amiloidose a ser descrito foi a amiloidose associada à hemodiálise, inicialmente reconhecida como uma causa importante de síndroma do tunel cárpico na hemodiálise de longa duração por Assenat *et al.* (1980), tendo sido durante anos considerada uma forma localizada osteoarticular. A proteína amilóide foi posteriormente identificada como sendo β_2-microglobulina (Gejyo *et al.*, 1985; Gorevic *et al.*, 1985), uma proteína sérica quase exclusivamente catabolizada no rim e que não é eficientemente filtrada pelas membranas de hemodiálise. Pouco depois era reconhecido o envolvimento sistémico nesta forma de amiloidose (Shirahama *et al.*, 1985; Hervé *et al.*, 1985), que infrequentemente pode ter consequências fatais (Arakawa *et al.*, 1989).

As primeiras classificações das amiloidoses foram estabelecidas com base em postulados propostos por Lubarsch em 1929, que permitiriam distinguir as amiloidoses primárias e secundárias com base em dados clínicos e anatómicos. Estas classificações sofreram numerosas metarmofoses, sendo um bom exemplo de uma versão recente a classificação referida por van Rijswijk *et al.* em 1979 no simpósio da Póvoa de Varzim (Van Rijswijk *et al.*, 1980), que reproduzimos, com ligeiras adaptações, na tabela I-I.

Outras tentativas de classificação com base histológica (Heller *et al.*, 1964; Missmahl, 1968), ou histoquímica (Koletsky e Stecher, 1939; Romhànyi, 1972; Wright *et al.*, 1976, 1977) foram propostas, mas não tiveram aceitação geral, provavelmente porque não contribuíram nada de novo para a compreensão do fenómeno subjacente, apoiando-se frequentemente em teorias controversas que não resistiram às investigações subsequentes.

A complexidade destas classificações, onde é difícil situar as doenças amiloidóticas recentemente descobertas, obscurece a relação com os mecanismos etiopatogénicos subjacentes, pelo que têm vindo a ser progressivamente abandonadas em favor de classificações mais modernas, estabelecidas numa base bioquímica, em que se encontra plenamente justificada, como veremos, a diversidade das doenças amiloidóticas.

Tabela I-I. Classificação clínica das amiloidoses (1979)

	Padrão de disfunção orgânica	
	Distribuição típica	**Distribuição atípica**
	Nefropatia sem cardiomiopatia, glossopatia, neuropatia ou artropatia amiloidótica	Cardiomiopatia e nefropatia particularmente quando associado a: glossopatia, neuropatia, artropatia amiloidótica
Adquirida	Amiloidose secundária	Amiloidose associada ao mieloma
Idiopática	Amiloidose primária com apresentação típica	Amiloidose primária com apresentação atípica
Hereditária	Febre Mediterrânica Familiar Amiloidose com urticária, surdez e nefropatia (Muckle e Wells, 1962)	Neuropática (Andrade, 1952) (Rukavina *et al.*, 1956) (Mahloudji *et al.*, 1969) Cardiopática (Frederiksen *et al.*, 1962) Distrofia reticular da córnea com neuropatia craneana (Meretoja, 1969)
Localizada	"tumores" amilóides amiloidose cutânea amilóide APUD amiloidose cerebral	

Bioquímica e genética molecular

A teoria de Virchow da constituição celulósica da substância amilóide teve uma existência breve. Logo em 1859, Friedreich e Kekulé falsificam-na, ao demonstrarem que uma massa de amilóide era de natureza albuminóide, ou seja, proteinácea, não encontrando quaisquer vestígios de carboidratos. Esta observação não é absolutamente correcta, pois sabe-se hoje que os depósitos de amilóide contêm grandes quantidades de mucopolissacáridos ácidos, muito provavelmente responsáveis pela afinidade tintorial pelo iodo. No entanto, é uma observação fundamentalmente válida. A caracterização físico-química da substância amilóide manteve-se neste ponto por mais um século.

A introdução de um método simples e eficaz de isolamento de fibras de amilóide (Pras *et al.*, 1968), aliado ao aperfeiçoamento das técnicas de purificação cromatográfica, são o passo catalizador dos estudos seguintes. Dois grupos de investigadores, o de Glenner e o de Benditt, dão os primeiros e mais importantes contributos para o estudo da composição bioquímica:

O primeiro, numa série de estudos da proteína amilóide de alguns casos de amiloidose primária (Glenner *et al.*, 1969, 1970ab, 1971a; Harada *et al.*, 1971; Kimura *et al.*, 1972), mostrou a estreita relação desta com as cadeias leves das imunoglobulinas, trabalho que culminou com a demonstração de que por tratamento proteolítico de proteínas de Bence-Jones se obtinham precipitados com todas as características da substância amilóide (Glenner *et al.*, 1971b). Um resultado importante destes estudos, que definiu o grupo das proteínas amilóides AL, é também o facto de em todos estes doentes se ter evidenciado a presença de uma proteína sérica com imunorreactividade cruzada com a proteína amilóide depositada. No entanto, este grupo não se apercebeu da existência de outra proteína amilóide nos casos de amiloidose secundária, não aparentada com as imunoglobulinas.

Essa descoberta deve-se ao grupo de Benditt, que estudando material necrópsico em que estavam representados 5 casos de amiloidose primária e outros tantos de amiloidose secundária, logo se apercebeu da existência de duas proteínas distintas, admitindo, como Glenner, que a proteína amilóide dos casos primários, que designam como proteína B, seja de facto aparentada às imunoglobulinas, mas encontrando nos casos de amiloidose secundária uma proteína, que designam por proteína A (de onde deriva a designação AA), cujas características químicas são completamente distintas da anterior, quer na mobilidade electroforética quer na composição em aminoácidos (Benditt e Eriksen, 1971). A sequenciação N-terminal dessa proteína não revela parentesco com qualquer proteína à data conhecida (Benditt *et al.*, 1971). Estes resultados são confirmados por outros laboratórios, que a isolam de casos de febre mediterrânica familiar, tuberculose e de doença de Hodgkin, e a sequenciam na totalidade (Levin *et al.*, 1972; Franklin *et al.*, 1972; Husby *et al.*, 1972; Sletten e Husby, 1974), incluíndo o laboratório de Glenner, onde encontram a mesma proteína num dos seus casos (Ein *et al.*, 1972). Também nestes casos se demonstrou a presença no plasma de uma proteína com imunorreactividade cruzada com a proteína amilóide (Levin *et al.*, 1973), a SAA, mais tarde identificada como uma apolipoproteína integrante das HDL (Benditt e Eriksen, 1977). A proteína SAA é codificada por uma família de genes, quatro dos quais foram identificados até hoje, todos no braço curto do cromossoma 11 (Sack, 1983; Woo *et al.*, 1987; Kluve-Beckerman *et al.*, 1991), e comporta-se como uma proteína da fase sérica aguda, elevando-se os seus níveis até mil vezes a concentração de base após um estímulo inflamatório agudo (Rosenthal e Franklin, 1975), sob a influência de diversas citoquinas, IL-1 e IL-6 em particular (Raynes *et al.*, 1991; Betts *et al.*, 1993). É actualmente um campo de investigação com grande vitalidade.

A descoberta da existência de duas substâncias amilóides absolutamente distintas, foi fatal para as teorias então correntes sobre a patogénese da amiloidose, geralmente considerada como um processo único, talvez uma disfunção imunológica, tendo pontificado a hipótese de Letterer (1926) de que a substância amilóide seria constituída por imunocomplexos. Ficou assim demonstrada a existência de duas amiloidoses distintas, a amiloidose "reactiva", com deposição de proteína AA, secundária a processos inflamatórios ou infecciosos crónicos, a certas neoplasias e a algumas doenças hereditárias com disfunção do

processo inflamatório (Febre Mediterrânica Familiar, síndroma de Muckle e Wells), e a amiloidose "imunocítica", associada ao mieloma e a outras discrasias imunocíticas, utilizando a nomenclatura introduzida por Glenner (1980).

Pouco depois era identificada a proteína constituinte dos depósitos de amilóide do carcinoma medular da tireoide, que talvez com menor surpresa se verificou ser constituída por fragmentos de procalcitonina (Sletten *et al.*, 1976), corroborando uma hipótese proposta por Pearse *et al.* (1972), segundo a qual os depósitos de amilóide observados em órgãos endócrinos seriam de natureza hormonal, cunhando até uma designação própria para estes (APUD-amilóide). Esta hipótese tem sido confirmada para outras localizações.

E nas outras formas, comparativamente raras, de amiloidose hereditária, de que já se conheciam na altura numerosas instâncias com quadros clínicos e patológicos distintos, qual era a natureza da proteína amilóide? Nenhum dos grupos responsáveis por esses estudos se debruçou na altura sobre estas doenças, talvez pela sua comparativa raridade. Coube aos investigadores portugueses demonstrar que pelo menos na polineuropatia amiloidótica familiar (PAF) descrita por Andrade, a proteína amilóide não pertencia a nenhum desses dois grupos, apresentando antes identidade imunológica com uma proteína sérica então conhecida por pré-albumina (*et al.*, 1978), e que actualmente se denomina por transtirretina (TTR).

Nos anos seguintes esta descoberta é confirmada por diversos investigadores em casos de polineuropatia amiloidótica familiar um pouco por todo o mundo. Benson (1981) e Skinner e Cohen (1981), comprovam-na em casos de PAF de origem sueca, recorrendo a métodos imunoquímicos e também por sequenciação parcial, que não revela nos segmentos sequenciados da proteína amilóide isolada diferenças significativas em relação à TTR normal, para lá de alguma heterogeneidade N-terminal. O estudo dos casos japoneses (Tawara *et al.*, 1981; Shoji *et al.*, 1981) dá resultados semelhantes. O estudo por Dalakas e Engel (1981) de casos de PAF tipo I de origem portuguesa e grega, de um caso de PAF tipo II de origem alemã e de duas irmãs de uma família de Maryland com uma forma muito agressiva e atípica de amiloidose, revela em todos eles a presença de TTR nos depósitos de amilóide. Pras *et al.* (1981) confirmam-no também na família por eles estudada, apesar da notória diferença no comportamento cromatográfico da proteína amilóide.

Por esta altura encontravam-se em pleno desenvolvimento as modernas técnicas de biologia molecular, e não tardou a que se identificasse por sequenciação de péptidos a proteína amilóide da forma portuguesa como uma variante de TTR com substituição da valina da posição 30 por metionina (Saraiva *et al.*, 1983b, 1984; Tawara *et al.*, 1983; Dwulet e Benson, 1984). Pouco depois Sasaki *et al.* (1984), tendo isolado e sequenciado o cDNA da TTR, prognosticaram que esta variante deveria resultar de uma mutação que criaria um novo local de corte para os enzimas de restrição Bal I e Nsi I, hipótese que puderam comprovar por RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism") em doentes japoneses. Este resultado foi confirmado para os doentes portugueses (Saraiva *et al.*, 1985).

Desde então, practicamente a totalidade das famílias conhecidas com neuropatias e cardiomiopatias amiloidóticas familiares tem sido investigadas por métodos de genética molecular, tendo-se verificado que todas, com duas excepções, têm como base uma mutação pontual do gene da TTR, depositando-se a variante correspondente como fibrilas de amilóide. As excepções são a neuropatia amiloidótica descrita por Van Allen, em que a proteína amilóide está relacionada com uma variante da lipoproteína apoAI (Nichols *et al.*, 1988), e a descrita por Meretoja, em que a proteína amilóide está relacionada com uma variante da gelsolina (Haltia *et al.*, 1990; Maury *et al.*, 1990).

Estudos biofísicos

A par dos primeiros estudos bioquímicos das fibras de amilóide, realizaram-se os primeiros estudos biofísicos de difracção de raios X (Eanes e Glenner, 1968), em que foram empregues fragmentos de tecido fresco e fibras purificadas de casos de amiloidose "primária" e "secundária", assim como de amiloidose experimental induzida em patos e murganhos. O padrão de difracção obtido foi sempre o mesmo, independentemente da amostra: Um anel a 4,7 Å, correspondendo ao espaçamento intercatenário previsto para uma folha pregueada β antiparalela, segundo o modelo de Pauling (Pauling e Corey, 1951), e um anel mais difuso a 9,8 Å, correspondendo à distância entre folhas adjacentes. Com preparações de fibras orientadas, formam-se arcos que mostram ser o eixo das cadeias polipeptídicas perpendicular ao eixo das fibras (figura I-1).

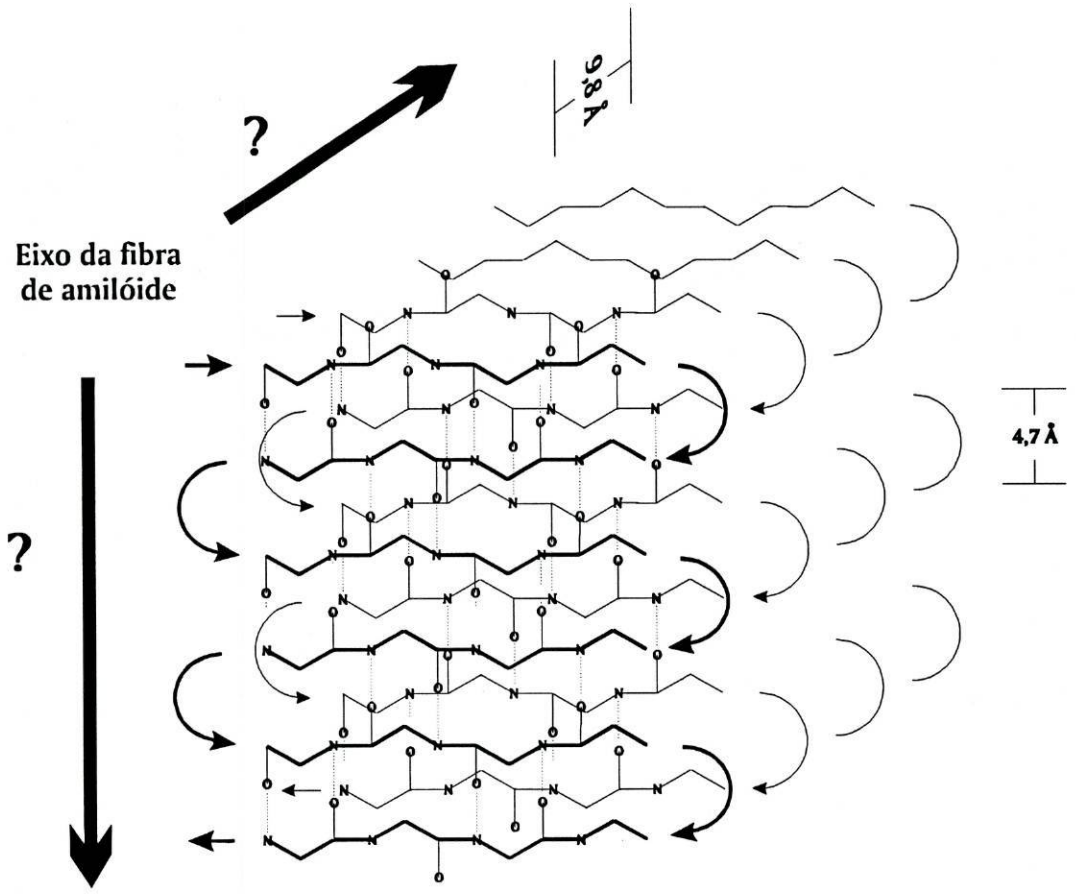


Figura I-1 Fibra de amilóide. Estrutura deduzida dos estudos de difracção de raios X.

Os estudos de fibras de amilóide por espectroscopia no infravermelho são condizentes com esta interpretação (Termine *et al.*, 1972). Esta é desde então considerada uma das propriedades fundamentais das fibras de amilóide, a par da birrefringência característica das preparações coradas pelo vermelho do Congo, tendo levado Glenner a propor a designação *β-fibriloses* para as amiloidoses (Glenner, 1980). Estudos mais recentes de difracção de raios X de fibras extraídas de casos de doença de Alzheimer (Kirschner *et al.*, 1986), e de PAF (Terry e Blake, 1991; Damas *et al.*, 1994), confirmam no essencial as observações anteriores.

Deve-se no entanto frizar que estudos biofísicos mais recentes, maioritariamente realizados com fibras sintéticas produzidas a partir de fragmentos da proteína β da doença de Alzheimer (Halverson *et al.*, 1991; Spencer *et al.*, 1991), apontam como sendo provavelmente uma simplificação excessiva a aplicação do modelo de Pauling às fibras de amilóide.

Classificação actual das amiloidoses

Como se pode depreender do atrás exposto, a classificação das amiloidoses por critérios clínicos tornou-se insustentável, pois em algumas categorias das classificações clínicas vieram a encontrar-se doenças absolutamente díspares na sua vertente etiopatogénica. Em 1974, no II simpósio internacional sobre amiloidose, em Helsínquia, foi estabelecida uma comissão sobre nomenclatura, que lançou as bases de uma classificação bioquímica, que foi consolidada no simpósio seguinte, em 1979, na Póvoa de Varzim, tendo-se proposto uma classificação que ainda se encontra em uso generalizado, com poucas alterações, e que reproduzimos na tabela I-II.

Tabela I-II. Classificação das Amiloidoses (1979)

Fibrila de amilóide (local, condições, natureza da proteína)	Designação preliminar	Designação Química
Cadeias leves	AL	$A\lambda_1$, $A\kappa_3$, etc.
Proteína A	AA	AA (protótipo) AA Trp 53 (variante)
Familiar		
Portuguesa	AF_P	A<nome da proteína>
Japonesa, etc.	AF_J , etc.	" "
Em tecidos endócrinos		
Tireóide, etc.	AE_t	" "
Amiloidose 'Senil'		
cardíaca	AS_{c1} , AS_{c2}	" "
cerebral	AS_{b1} , AS_{b2} , etc.	" "
Amiloidose cutânea (dérmica)	AD	" "

Esta classificação está no entanto muito desactualizada, tendo sido revista em 1990, no V simpósio internacional sobre amiloidose, em Oslo, sendo então proposta a classificação que reproduzimos na tabela I-III, com algumas adaptações: removemos os dois tipos de amilóide não encontrados no homem, adicionamos o tipo AKer, que não foi incluído na classificação proposta, cremos que por não ter sido considerada suficientemente esclarecida a natureza do precursor nas amiloidoses cutâneas, e os tipos ALys e AFibA, que correspondem a novas entidades. Substituímos o tipo AScr por APrP, adoptando a sugestão dos editores da revista *Amiloidose* (em Guidelines for Authors, vol 1(1), março de 1994). Também mantivemos a separação entre formas sistémicas e localizadas, desencorajada na nova classificação pelo facto de algumas formas de amiloidose que se julgavam localizadas se terem revelado mais tarde como amiloidoses sistémicas.

Algumas formas localizadas de amiloidose de tipo senil, que só muito recentemente começaram a ser caracterizadas, como a amiloidose das vesículas seminais, aparentemente derivada de uma proteína secretada (Cornwell *et al.*, 1992), ou a amilóide intracelular das glândulas suprarenais (Eriksson e Westermark, 1990a), e dos anéis de Biondi dos plexos coroideus (Eriksson e Westermark, 1990b), das quais se desconhece inteiramente a composição bioquímica, não foram igualmente incluídas.

Tabela I-III. Classificação das amiloidoses

Proteína amilóide	Precursor	Tipo ou variante	Clínica	Referências bibliográficas
Amiloidoses sistémicas				
AA	apoSAA		Amiloidose reactiva (secundária) Febre Mediterrânica Familiar Sindroma de Muckle-Wells	Husby *et al.*, 1972 Levin *et al.*, 1973 Linke *et al.*, 1983
AL	κ, λ, p.ex. λVI	Aκ, Aλ, p.ex. AλVI	Amiloidose imunocítica (primária)	Glenner *et al.*, 1970b, 1971a
AH	IgG1	Aγ1		Eulitz *et al.*, 1990
ATTR	Transtirretina		Amiloidose Senil Sistémica	Westermark *et al.*, 1990a
		Met 30	Polineuropatia Amiloidótica Familiar, tipo Português	Saraiva *et al.*, 1984 Tawara *et al.*, 1983
		Met 111	Cardiomiopatia Amiloidótica Familiar, tipo Dinamarquês	Nordlie *et al.*, 1988
		etc. (Tabela I-IV)		
AapoAI	apoAI	Arg 26	Polineuropatia Amiloidótica Familiar, Iowa	Nichols *et al.*, 1988
			Nefropatia Amiloidótica	Vigushin *et al.*, 1994
		Arg 60	Nefropatia Amiloidótica	Soutar *et al.*, 1992
ALys	Lisozima	Thr 56, His 67	Nefropatia Amiloidótica	Pepys *et al.*, 1993
AFibA	Fibrinogénio Aα	Val 526 Leu 554	Nefropatia Amiloidótica	Uemichi *et al.*, 1994b Benson *et al.*, 1993b
AGel	Gelsolina	Asn 187 (15)	Amiloidose Familiar, tipo Finlandês	Haltia *et al.*, 1990
ACys	Cistatina C	Gln 68	Hemorragia Cerebral Hereditária com Amiloidose, tipo Islandês	Ghiso *et al.*, 1986
Aβ_2M	β_2-microglobulina		Amiloidose associada à hemodiálise	Gejyo *et al.*, 1985

Tabela I-III (continuação)

Proteína amilóide	Precursor	Tipo ou variante	Clínica	Referências bibliográficas
Amiloidoses localizadas				
Aβ	βPP	βPP Gln 618 (22)	doença de Alzheimer, s. Down Hemorragia Cerebral Hereditária com Amiloidose, tipo Holandês	Glenner e Wong, 1984 Levy *et al.*, 1990
APrP	PrP^{C}	PrP^{Sc}, PrP^{CJD} P102L, A117V, etc.	Kuru, Creutzfeldt-Jakob, Scrapie Gerstmann-Straüssler-Scheinker	Prusiner *et al.*, 1984 Hsiao *et al.*, 1989
ACal	(Pro)calcitonina		Carcinoma medular da tireóide	Sletten *et al.*, 1976
AANF	Factor natriurético atrial		Amilóide atrial isolada	Johansson *et al.*, 1987
AIAPP	IAPP (amilina)		Ilhéus de Langerhans, esp. na Diabetes tipo II, insulinomas	Westermark *et al.*, 1986
AKer	Queratina		Amiloidose cutânea liquenóide e macular, carc. pavimentosos	Kobayashi e Hashimoto, 1983; Shinoda *et al.*, 1990

Amiloidoses heredo-familiares

O primeiro estudo pormenorizado de uma doença amiloidótica familiar deve-se a Ostertag, que descreveu uma família alemã em que a doença atinge, em 3 gerações, duas irmãs, os dois filhos e uma filha de uma delas, e ainda uma neta, fazendo supor uma transmissão autossómica dominante. Os indivíduos afectados apresentavam um quadro clínico de hipertensão e insuficiência renal rapidamente progressiva com início pela 3ª ou 4ª década, associado a amiloidose renal, hepática e esplénica. As descrições posteriores de casos semelhantes têm sido raras. Em duas famílias inglesas, descritas por Lanham *et al.* em 1982 e por Zalin *et al.* em 1991, foram identificadas na substância amilóide as variantes da lisozima Asp 67 → His e Ile 56 → Thr (Pepys *et al.*, 1993). Numa família americana de ascendência escandinava (Libbey e Talbert, 1987), foi identificada a variante Gly 26 → Arg da apolipoproteína AI (Jones *et al.*, 1991a), curiosamente também responsável pela polineuropatia amiloidótica familiar descrita por van Allen (ver adiante). Soutar *et al.* descreveram em 1992 uma outra família inglesa em que estabeleceram o defeito molecular como sendo uma nova variante da apolipoproteína AI (Leu 60 → Arg). Recentemente foram descritas duas outras famílias em que foram implicadas variantes do fibrinogénio Aα, Val 526 numa família americana (Uemichi *et al.*, 1994b) e Leu 554 numa família peruviana (Benson *et al.*, 1993). Além destas só temos conhecimento da descrição de mais 5 famílias (Weiss e Page, 1973; Moraghi *et al.*, 1982; Hawkins *et al.*, 1991), das quais não encontramos referência ao defeito molecular subjacente.

Andrade publicou em 1951 e 1952 o estudo de 64 casos de um síndroma neuropático "peculiar", 51 dos quais integravam 12 famílias, em que assume grande relevo a deposição sistémica de amilóide e em particular nos nervos periféricos. Esta doença, geralmente designada por polineuropatia amiloidótica familiar (PAF), paramiloidose de tipo português, ou doença de Andrade, é de transmissão autossómica dominante, e caracteriza-se por um quadro clínico de polineuropatia que se manifesta pela 3ª ou 4ª década nos indivíduos afectados, pela altura em que se detectam os depósitos de amilóide. O início é geralmente insidioso, por perturbações digestivas, consequentes à disfunção autonómica, ou por parestesias das extremidades inferiores, a que se segue hipoestesia termo-álgica de progressão centrípeta, logo seguida de perda da sensibilidade profunda e de paresia que se acompanha de atrofia muscular. Estas alterações vão-se agravando progressivamente, levando invariavelmente à morte em 10 a 15 anos de evolução. Pelo interesse central que tem para nós, sobre ela nos debruçaremos mais adiante. Mencionaremos apenas que a causa desta doença é uma mutação pontual do gene da transtirretina (TTR), de que resulta uma variante Val 30 → Met que se deposita sob a forma de amilóide (Saraiva *et al.*, 1983b, 1984).

Rukavina *et al.* publicam em 1956 um trabalho sobre amiloidoses primárias, que se revelou particularmente importante pela descrição de 66 casos de neuropatia amiloidótica em indivíduos de uma família residente no estado de Indiana, descendendo de um casal

originário da Suíça que imigrou para os Estados Unidos em 1883. A doença, também de transmissão autossómica dominante, é clinicamente muito diferente da forma portuguesa. As primeiras manifestações, pela 4ª ou 5ª década, são geralmente confinadas às mãos, com dor, parestesia e atrofia tenar, típicas de um síndroma do túnel cárpico. Igualmente precoces são as opacidades do vítreo por deposição de amilóide, com perda progressiva de visão. Posteriormente instala-se um quadro de polineuropatia com alterações difusas dos membros superiores e inferiores e alterações autonómicas, e por fim uma cardiomiopatia restritiva que leva à morte, pela 6ª década, dos indivíduos afectados. O exame necrópsico de um destes doentes revelou extensa infiltração amilóide dos vasos sanguíneos, miocárdio, língua, baço, fígado e rins. Apesar das marcadas diferenças na apresentação clínica em relação à PAF de tipo português, nesta doença também está envolvida uma variante da TTR, com substituição da isoleucina da posição 84 por serina (Dwulet e Benson, 1986).

Frederiksen *et al.* descreveram, em 1962, um quadro de cardiomiopatia amiloidótica atingindo 7 de 12 irmãos de uma família dinamarquesa. A doença manifesta-se pela 4ª ou 5ª década, por insuficiência cardíaca congestiva que se agrava inexoravelmente, levando à morte em 2 a 5 anos. O exame necrópsico de dois dos casos revelou extensa deposição de amilóide no miocárdio, língua, nervos, veias, septos alveolares e tecido adiposo subcutâneo. O fígado, baço e rins não tinham depósitos significativos. Merece destaque o envolvimento dos nervos periféricos, que tendo um padrão histológico semelhante ao observado na PAF de tipo português, surpreendentemente não se acompanhou nesses doentes de alterações neurológicas para além de parestesias de duvidosa interpretação. A transmissão autossómica dominante foi comprovada quando o filho de um destes irmãos desenvolveu a doença (Husby *et al.*, 1986). Nesta doença foi identificada a variante da TTR Leu 111 → Met (Nordlie *et al.*, 1988).

Uma família de Iowa, de origem britânica e irlandesa, com um quadro de neuropatia amiloidótica familiar sobreponível ao do arquétipo português, foi descrita por Van Allen *et al.* em 1969. Esta família apresenta, no entanto, para além da neuropatia, nefropatia com insuficiência renal, e uma elevada frequência de úlcera péptica duodenal. Foram realizadas autópsias de 5 dos 8 indivíduos afectados, tendo sido notado um marcado envolvimento do fígado e baço, órgãos poupados na forma portuguesa. Uma família com um quadro clínico semelhante, de origem irlandesa, foi descrita em Espanha for Gimeno *et al.* (1974). Apesar das semelhanças com as outras formas de polineuropatia amiloidótica familiar descritas, esta é a única em que a caracterização da proteína amilóide não revelou uma variante da TTR, tendo sido antes encontrada a variante da apolipoproteína AI Gly 26 → Arg (Nichols *et al.*, 1988, 1990).

Onze famílias de Maryland, uma das quais já havia sido descrita em 1962 por Schlesinger *et al.*, são descritas em 1969 por Mahloudji *et al.*, que descobre um ascendente comum, um casal emigrado da Alemanha em 1746. A doença, de transmissão autossómica dominante, atingiu provavelmente 146 indivíduos em 7 gerações, dos quais 53 poderam ser

examinados. O quadro clínico é muito semelhante ao da família descrita por Rukavina, com ligeiras diferenças. A generalização da neuropatia periférica tende a ser mais gravosa nestes doentes, ao contrário da cardiomiopatia. As opacidades do vítreo, muito comuns na família de Indiana, são nestes doentes raras. A proteína amilóide foi identificada como sendo uma variante distinta da TTR, Leu 58 → His (Nichols *et al.*, 1989).

Mahloudji *et al.*, na sua publicação de 1969, propõem uma classificação das neuropatias amiloidóticas em tipo I, com início nas extremidades inferiores, em que o arquétipo são os casos portugueses; tipo II, com predomínio nos membros superiores, englobando os casos descritos por Rukavina e os das famílias descritas nessa mesma publicação; e tipo III, com associação de úlcera péptica e nefropatia, correspondendo à família de Iowa descrita por Van Allen.

Ainda em 1969, foi descrito em famílias finlandesas, por Meretoja, um novo quadro de neuropatia amiloidótica familiar, com envolvimento quase exclusivo dos pares craneanos, em particular do facial, a que se associa uma distrofia reticular amiloidótica da córnea e alterações cutâneas. Alterações generalizadas do sistema nervoso periférico também se podem observar em casos avançados, mas são clinicamente pouco relevantes. A esse síndroma foi atribuído *a posteriori* o tipo IV na classificação de Mahloudji *et al.*. Tal como no tipo III, a proteína amilóide no tipo IV não é uma variante da TTR, mas um fragmento da gelsolina Asp 187 → Asn (Levy *et al.*, 1990), uma proteína moduladora da actina. O número de indivíduos afectados ultrapassa os 300 na Finlândia, tendo sido igualmente descritos casos na Dinamarca, Estados Unidos e Japão. Na Holanda e República Checa foram recentemente descritos casos relacionados com uma nova variante, a gelsolina Asp 187 → Tyr (De la Chapelle *et al.*, 1992).

A classificação de Mahloudji *et al.*, que alcançou grande voga, veio a demonstrar de forma crescente, com a proliferação dos síndromas descritos, alguma inadequação, sendo particularmente contestada a separação do tipo III do I, dado não diferirem significativamente entre si do ponto de vista neurológico. O seu uso é actualmente desaconselhado (Thomas *et al.*, 1990). No entanto, agruparemos as restantes descrições de polineuropatias amiloidóticas familiares, em tipo I, quando o quadro neuropático tem início nas extremidades inferiores e progressão centrípeta, e tipo II, com início por síndroma do túnel cárpico e/ou neuropatia difusa. Estas descrições, mais recentes e interessando de um modo geral um número restrito de doentes cuja história clínica é mal conhecida ou relatada muito resumidamente, dizem quase sempre respeito a novas variantes de TTR, implicadas na etiopatogenia de todos os casos que foi possível investigar a nível molecular.

Resumindo as restantes descrições mais importantes:

Uma família constituída por pai e duas filhas, também com um quadro de neuropatia de tipo I, que se acompanha por opacificação do vítreo, cardiomegalia e alterações endócrinas

com bócio, exoftalmia e amenorreia foi descrita por Kantarjian e DeJong em 1953. Não temos conhecimento de ter sido definido o defeito molecular subjacente.

Uma família de West Virginia, de origem holandesa e alemã, com um quadro clínico igualmente muito agressivo, caracterizado por polineuropatia de tipo I e envolvimento de múltiplos órgãos, de início na 2ª década ou princípio da 3ª, foi parcialmente estudada por diversos investigadores (Shulman e Bartter, 1956; Kaufman, 1958; Wong e McFarlin, 1967; Dalakas e Engel, 1981). Todos os elementos afectados faleceram antes dos 40 anos. A proteína amilóide foi identificada como sendo a variante da TTR Leu 55 → Pro (Jacobson *et al.*, 1992). Uma outra família com a mesma mutação foi recentemente descoberta em Taiwan (Yamamoto *et al.*, 1994).

Uma família (pai e filho) com um quadro neuropático também semelhante ao português mas com marcado envolvimento do vítreo, de judeus Ashkenazy oriundos da Polónia, foi descrita em 1981 por Pras *et al.*. O estudo da proteína amilóide revelou uma variante da TTR com substituição da fenilalanina 33 por isoleucina (Nakazato *et al.*, 1984c), e da glicina 6 por serina (Jacobson e Buxbaum, 1993). É uma das raras duplas mutações conhecidas, sendo de admitir que a doença se deve à mutação na posição 33, visto a variante TTR Ser 6 ser um polimorfismo não patogénico presente em 12% dos indivíduos caucasianos (Jacobson *et al.*, 1994a). O quadro clínico e patológico completo desta família foi publicado em 1985 por Gafni *et al.*.

Uma família residente no Texas, de origem anglo-germânica, com um quadro clínico de neuropatia amiloidótica de tipo I, afectando 4 de 12 irmãos, em que a idade dos primeiros sintomas se situa pela 7ª década, foi descrita por Libbey *et al.* em 1984. A análise por RFLP desses doentes revelou a presença de TTR Ser 77 → Tyr (Skinner *et al.*, 1990), uma variante já descrita numa família de origem germânica residente no estado de Illinois, com o mesmo quadro clínico mas idade de início mais precoce (Wallace *et al.*, 1988).

Em algumas famílias descritas, os componentes neuropático e cardiomiopático têm igual expressão. É o caso das famílias descritas na Irlanda (Staunton *et al.*, 1987, 1991) e na região dos Apalaches, nos Estados Unidos, em famílias de origem irlandesa (Benson *et al.*, 1987), com um quadro clínico de início na sexta ou sétima década de vida, em que a cardiomiopatia pode ser o quadro clínico de apresentação. Nestas famílias foi detectada a variante da TTR Thr 60 → Ala (Wallace *et al.*, 1986).

Mencionaremos ainda, nas formas familiares, a Febre Mediterrânica Familiar (Heller *et al.*, 1955; Sohar *et al.*, 1967), a única forma conhecida de amiloidose hereditária de transmissão autossómica recessiva, afectando largas centenas de Judeus Sefarditas, Turcos, Arménios e Árabes, e o síndroma de Muckle e Wells (amiloidose nefropática familiar com urticária febril e surdez; Muckle e Wells, 1962). Ambas são caracterizadas por distúrbios do processo inflamatório agudo, com crises recorrentes que se manifestam na maior parte

dos doentes desde idades jovens, sendo de facto amiloidoses de tipo "secundário", bioquimicamente e pelo mecanismo etiopatogénico subjacente.

Por fim, de descrição recente, a hemorragia cerebral hereditária com amiloidose (HCHWA) de tipo islandês (Gudmundsson *et al.*, 1972) e holandês (Wattendorf *et al.*, 1982), caracteriza-se por uma amiloidose cerebrovascular responsável por acidentes hemorrágicos catastróficos em idades jovens e na ausência de hipertensão. Apesar das semelhanças clínicas e morfológicas, a caracterização bioquímica da substância amilóide nestas duas doenças mostrou tratar-se de duas entidades absolutamente distintas. A forma islandesa deve-se à deposição sistémica de um fragmento de uma variante da cistatina C (Leu 58 → Gln), enquanto a forma holandesa se deve à variante Glu 618 → Gln da βPP_{695}, a proteína precursora da proteína β que constitui as fibras de amilóide da doença de Alzheimer, doença que em algumas familias foi igualmente relacionada com variantes desta proteína, por exemplo βPP_{770} Val 717 → Ile ou Phe (Murrel *et al.*, 1991; Liepnieks *et al.*, 1993).

As amiloidoses ATTR

A Polineuropatia Amiloidótica Familiar de tipo Português

A Polineuropatia Amiloidótica Familiar de tipo Português, ATTR Met 30, além de ser, tanto quanto se sabe, a forma familiar de amiloidose mais frequente, apresenta uma inusitada concentração geográfica no nosso país, em particular no litoral norte, estando registados no Centro de Estudos de Paramiloidose mais de 600 doentes. Em consequência disso, é aquela sobre a qual existem dados clínicos e anátomo-patológicos mais precisos.

Esta doença foi exaustivamente caracterizada do ponto de vista clínico por Andrade, que já nas suas primeiras publicações inclui o estudo de 64 casos, e pelos seus seguidores (ver por exemplo a revisão de Coutinho de 1980). Foi também alvo da atenção de cardiologistas, gastrenterologistas, nefrologistas e oftalmologistas portugueses, entre outros.

É uma doença de transmissão autossómica dominante, de penetrância quase completa, que se manifesta na grande maioria dos casos pela 3ª ou 4ª década (média de idade de início de cerca de 32 anos). O primeiro sintoma é geralmente uma disestesia, por vezes dolorosa, das extremidades dos membros inferiores, ou perturbações gastrointestinais, com obstipação e queixas dispépticas. Num número significativo de doentes o primeiro sinal é um acentuado emagrecimento.

Instala-se então um quadro de neuropatia periférica que se inicia pela perda de sensibilidade termo-álgica nas extremidades inferiores, de progressão ascendente, a que se segue o atingimento motor e dos membros superiores. Na fase terminal o doente está confinado ao leito ou a uma cadeira de rodas, e perdeu toda a sensibilidade excepto na cabeça e pescoço. Existe sempre uma marcada disautonomia, com perda dos reflexos vasculares e perturbações da motilidade gastrointestinal. Cursa também com alterações da condução cardíaca, e frequentemente, geralmente em casos avançados, com perda da função renal e opacidades do vítreo. Evolui inexoravelmente para a morte, por caquexia ou infecções intercorrentes, após 8 a 15 anos de doença.

O principal constituinte proteico das fibras de amilóide nesta doença é, como já referimos, uma variante da TTR com uma substituição de Valina por Metionina na posição 30 da sequência de aminoácidos (Saraiva *et al.*, 1983b, 1984), variante essa que circula no sangue dos portadores da doença conjuntamente com a TTR normal.

Casos semelhantes de PAF, que posteriormente se comprovou serem ATTR Met 30, foram mais tarde descritos no Brasil (Julião, 1963; Julião *et al.*, 1974; Mello, 1959; MacClure *et al.*, 1960), Holanda (Scholten, 1967), Japão (Araki *et al.*, 1968; Kito, 1973), Estados Unidos, em famílias de variadas origens étnicas (Grécia: Dyck e Lambert, 1969; Saraiva *et al.*, 1986; Suécia: Benson e Cohen, 1977; Inglaterra: Kincaid *et al.*, 1989; Vietname: Jones *et al.*, 1993; Portugal, Itália e Alemanha: Skinner *et al.*, 1993), Suécia (Andersson, 1970),

Argentina (Curcio *et al.*, 1970), Itália (Fariello *et al.*, 1971), França (Becq-Giraudon *et al.*, 1974), Grécia (Rubinow e Cohen, 1982), Espanha (Munar-Quès *et al.*, 1988), e Zaire (Léger *et al.*, 1994), espantosamente o único caso descrito em África, se considerarmos a extensão da permanência portuguesa aí existente. Apesar de todos estes focos da doença terem por base a mesma alteração molecular, existem diferenças notáveis no quadro clínico de região para região, e na mesma região entre famílias diferentes. Na Suécia, por exemplo, a idade de início é em média quase duas décadas superior à observada em Portugal. Um subgrupo importante das famílias afectadas nessa região tem tendência a apresentar como primeiro sinal da doença perturbações oculares (opacidades do vítreo ou querato-conjunctivites por envolvimento da glândula lacrimal). Nas famílias americanas de origem sueca (Benson e Cohen, 1977), a insuficiência renal terminal é comum. No Japão, quer a insuficiência renal terminal quer a cardiomiopatia amiloidótica são mais frequentes que em Portugal. Outra observação importante, notada em todos as regiões onde existem numerosas famílias atingidas, é a da tendência, em algumas, para o início mais tardio das manifestações clínicas, sendo frequente encontrar no seu seio portadores assintomáticos de idade avançada. Estas observações têm levado a que se considere como quase certa a existência de outros factores genéticos condicionantes da expressão da doença.

A ATTR Met 30 foi até há pouco considerada uma doença originária do norte de Portugal, que se teria disseminado por todo o globo ao sabor do comércio marítimo dos séculos XV e XVI e das vagas migratórias posteriores. Embora tal seja seguramente o caso em muitos dos focos descritos, estudos de haplotipos realizados com doentes japoneses (Yoshioka *et al.*, 1989), e com portugueses, gregos e italianos (Almeida *et al.*, 1990), demonstraram a existência de genes TTR Met 30 com origem independente. Uma hipótese avançada (Sakaki, 1990) é a de que a mutação Val 30 → Met ocorra com uma frequência elevada, pois a guanosina envolvida faz parte de uma sequência CpG, associada a uma taxa de mutações elevada nos mamíferos (Cooper e Youssoufian, 1988).

Do ponto de vista anátomo-patológico a doença foi igualmente bem estudada. Os primeiros estudos necrópsicos (Horta, 1956; Horta e Coelho, 1960; Horta e Trincão, 1963; Krücke, 1963; Horta *et al.*, 1964), foram complementados pelo estudo das autópsias, peças operatórias e biópsias efectuado no Laboratório de Neuropatologia e no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Geral de Santo António (Guedes, 1976; Guimarães *et al.*, 1980). Foram igualmente publicados estudos necrópsicos de casos japoneses (Shirabe *et al.*, 1973; Ikeda *et al.*, 1987; Takahashi *et al.*, 1991), brasileiros (Julião *et al.*, 1974) e suecos (Hofer e Anderson, 1975). De particular importância são os estudos aprofundados do envolvimento dos nervos periféricos (Dyck e Lambert, 1969; Coimbra e Andrade, 1971; Thomas e King, 1974; Said *et al.*, 1984; Yamada *et al.*, 1984; Hanyu *et al.*, 1989). Resumidamente, observam-se os seguintes padrões fundamentais de distribuição:

- Depósitos globóides endoneurais ao longo de todo o trajecto dos troncos e filetes nervosos, com exclusão do trajecto inicial das raízes raquidianas e dos pares craneanos,

até à sua emergência da dura mater. Estes depósitos têm uma distribuição irregularmente segmentar, com tendência para se agruparem na vizinhança de capilares cuja parede apresenta igualmente deposição de amilóide, e empurram as fibras nervosas, alterando o seu trajecto, normalmente rectilíneo. A sua aparição precede, por vezes de vários anos, o início do quadro clínico (Guimarães *et al.*, 1988; Coelho *et al.*, 1993a), acompanhando-se com o desaparecimento de neurónios ganglionares e por imagens de degenerescência de fibras, com progressiva rarefacção, primeiramente das fibras nervosas não mielinizadas e mielinizadas de pequeno calibre, e nos casos avançados também das fibras mielinizadas de grande diâmetro. Observam-se depósitos mais discretos no perineuro e epineuro. O sistema nervoso autonómico tem alterações morfológicas em tudo sobreponíveis.

- Extensos depósitos leptomeníngeos e na dura mater, por vezes extremamente abundantes, e no estroma dos plexos coroideus. Estes depósitos só muito discretamente envolvem zonas parenquimatosas imediatamente adjacentes, sendo em geral notável a ausência de envolvimento quer do encéfalo quer da espinal medula.

- Pequenos depósitos dispersos pelas membranas basais dos pequenos vasos, por vezes moldando toda a parede (arteríolas aferentes dos glomérulos renais, capilares dos plexos coroideus), membranas basais de algumas glândulas (glândulas sudoríparas, salivares, glândulas de Brunner e folículos tireoideus), dos tubos renais da zona medular e dos tubos seminíferos.

- Depósitos envolvendo os elementos celulares do músculo liso (paredes vasculares, tubo digestivo, *arrector pilii*) e, em menor grau, da panícula adiposa.

- Abundantes depósitos rodeando as fibras musculares cardíacas da rede de Purkinje, com atrofia ou desaparecimento desta.

- Marcados depósitos mesangiais nos glomérulos renais, que podem ir até à completa hialinização destes. De facto, é algo surpreendente que alterações graves da filtração glomerular só se observem em geral tão tardiamente na evolução da doença, se tomarmos como padrão de comparação outras formas de amiloidose com deposição glomerular semelhante.

- Pode-se observar por vezes extensa deposição de amilóide no vítreo, regra geral em casos avançados.

- Por fim, nos casos mais arrastados, observam-se pequenos depósitos dispersos onde quer que exista tecido conjunctivo, em particular na vizinhança de feixes de colagénio.

Outras amiloidoses relacionadas com a transtirretina

Conhecem-se actualmente mais de 40 variantes de TTR, todas devidas a mutações pontuais. A tabela I-IV lista as variantes conhecidas e as respectivas repercussões clínicas.

A grande maioria associam-se a quadros patológicos de amiloidose sistémica com envolvimento marcado do sistema nervoso periférico, e de modo variável do coração, rins e humor vítreo. Em algumas variantes o envolvimento destes últimos domina o quadro clínico, sendo escasso ou insignificante o envolvimento do nervo periférico. São raras as variantes conhecidas sem doença associada, ainda que não sem interesse clínico. Por exemplo, a existência no mesmo indivíduo de uma variante Met 30 e outra Met 119 poderá protegê-lo da acção deletéria da primeira (Coelho *et al.*, 1993b). Mesmo a TTR normal tem capacidade amiloidogénica, pois fragmentos seus são o principal constituinte dos depósitos na amiloidose senil sistémica (Westermark *et al.*, 1990a).

A expressão clínico-patológica das amiloidoses ATTR encaixa facilmente em alguns tipos base, aparentemente relacionados com o padrão anatómico de deposição da substância amilóide, deposição essa que sendo sistémica, é particularmente importante num número restrito de locais. A deposição dá-se preferencialmente junto a algumas estruturas mesenquimatosas, tendo sido descrita a sua associação com fibras de colagéneo e com as membranas basais de alguns tecidos. É particularmente notória a pouca importância dos depósitos de amilóide parenquimatosos, com excepção por vezes do rim, que mesmo assim, na grande maioria das mutações, raramente é responsável pelas primeiras manifestações da doença. Envolvimento significativo de outros órgãos, como o fígado e o baço, é ainda mais raro, observando-se apenas nas formas mais agressivas da doença, como a ATTR Pro 55. As principais manifestações da doença são as seguintes:

Neuropatia periférica: A neuropatia periférica é a principal manifestação na grande maioria das amiloidoses ATTR. O espectro de alterações observadas não difere significativamente do que se observa nas amiloidoses AL com envolvimento do sistema nervoso periférico (Ii *et al.*, 1992). Em conformidade com a classificação de Mahloudji, é usual a distinção de dois padrões fundamentais de neuropatia, o tipo I, em que as manisfestações progridem

Tabela I-IV. Notas explicativas.

Variante: A mutação indicada entre parêntesis corresponde a polimorfismo presente no mesmo alelo, que se presume não patogénico.

Neuropatia sensitivo-motora (SM): tipo I ou tipo II da classificação de Mahloudji.

Neuropatia dos pares craneanos (PC), autonómica (A), Cardiomiopatia (Card.), Opacidades do vítreo e Nefropatia (Nefr.):

?	duvidoso ou não referido.
-	ausente.
+	presente.
+++	alteração proeminente.

Tabela I-IV. Variantes da TTR

Variante	Expressão clínica						Fonte bibliográfica
	Neuropatia			Card.	Opac. Vítreo	Nefr.	
	SM	PC	A				
Ser 6	-	-	-	-	-	-	Fitch *et al.*, 1991; Jacobson *et al.*, 1994a
Arg 10	I	?	?	?	+++	?	Uemichi *et al.*, 1992
Ser 24	?	?	?	+++	?	?	Araki e Ikegawa, 1994
Ala 30	I	?	?	+	?	?	Jones *et al.*, 1992
Gly 30	-	?	?	+++	+++	?	Herbert *et al.*, 1994
Leu 30	I	?	+++	?	-	?	Nakazato *et al.*, 1992; Murakami *et al.*, 1992b
Met 30	I	+	+++	+	+	+	Saraiva *et al.*, 1983b; Tawara *et al.*, 1983
Ile 33 (Ser 6)	I	?	+++	-	+++	?	Nakazato *et al.*, 1984c; Jacobson e Buxbaum, 1994
Leu 33	I	?	+++	+	?	?	Ii *et al.*, 1991; Harding *et al.*, 1991
Pro 36	I	?	+++	+	+++	+	Jones *et al.*, 1991b; Jacobson *et al.*, 1992b
Gly 42	I	?	+++	+	?	-	Ueno *et al.*, 1990b
Gly 42 (Asn 90)	I	?	?	+	+++	?	Skare *et al.*, 1994
Asp 45 (Ser 6)	-	?	?	+++	?	?	Jacobson *et al.*, 1994b
Thr 45	-	?	+	+++	-	-	Saraiva *et al.*, 1992
Ala 47	I	?	?	+	?	+	Ferlini *et al.*, 1993
Arg 47	I	?	+++	?	-	?	Murakami *et al.*, 1992a
Val 47	II	?	+++	+++	-	-	Booth *et al.*, 1994
Ala 49	II	?	+++	+++	+++	?	Almeida *et al.*, 1992; Benson *et al.*, 1993a
Arg 50	II	+	+++	+++	?	-	Ueno *et al.*, 1990b; Takahashi *et al.*, 1992
Ile 50	I	?	+++	+++	?	?	Saeki *et al.*, 1992; Nishi *et al.*, 1992
Pro 52	I	?	+++	+++	?	+++	Booth *et al.*, 1994
Gly 54 (Ser 6)	I?	?	?	?	?	?	Booth *et al.*, 1994
Pro 55	I	+	+++	+++	+++	+++	Jacobson *et al.*, 1992a; Yamamoto *et al.*, 1994
Arg 58	II	?	+++	?	+++	?	Saeki *et al.*, 1991
His 58	II	?	+	+	+	?	Nichols *et al.*, 1989
Ala 60	I/II	?	+	+++	?	-	Wallace *et al.*, 1986
Lys 61	I	?	+++	?	?	?	Shiomi *et al.*, 1993; Nakazato *et al.*, 1994
Leu 64	II	?	+	+++	?	?	Ii *et al.*, 1991
Leu 68	?	?	?	+++	?	?	Almeida *et al.*, 1991b; Hesse *et al.*, 1993
His 69	II	?	-	-	+++	-	Zeldenrust *et al.*, 1994
Asn 70	II	+	-?	+++	+++	+++	Izumoto *et al.*, 1992
Ala 71	I	?	+++	?	+	?	Benson *et al.*, 1993b
Tyr 77	I	?	+++	?	?	+++	Wallace *et al.*, 1988; Satier *et al.*, 1990
Asn 84	II	?	-	+	+++	-	Skinner *et al.*, 1992
Ser 84	II	?	+	+++	+++	?	Dwulet e Benson, 1986
Gln 89	I	?	?	+++	?	?	Almeida *et al.*, 1992
Asn 90	-	-	-	-	-	-	Saraiva *et al.*, 1991
Gly 97	I	?	+	+	?	?	Yasuda *et al.*, 1994; Nakazato *et al.*, 1994
Arg 102	-	-	-	-	-	-	Almeida *et al.*, 1991a
Val 107	I/II	?	?	+	?	?	Uemichi *et al.*, 1994a; D. Adams, com. pessoal
Thr 109	-	-	-	-	-	-	Moses *et al.*, 1990
Val 109	-	-	-	-	-	-	Izumoto *et al.*, 1993
Met 111	-	-	-	+++	-	-	Nordlie *et al.*, 1988
Cys 114	I	-	+++	+++	+	-	Ueno *et al.*, 1990a
His 114	II	?	?	?	?	?	Murakami *et al.*, 1994
Val 116	-	-	-	-	-	-	Strahler *et al.*, 1987
Met 119	-	-	-	-	-	-	Harrison *et al.*, 1991
Ile 122	-	-	-	+++	-	-	Gorevic *et al.*, 1989; Saraiva *et al.*, 1990

centripetamente a partir das extremidades, em resultado de uma degenerescência axonal que tipicamente afecta primeiro as fibras não mielinizadas e mielinizadas de pequeno calibre, e o tipo II, com manifestações de feição compressiva, cuja primeira manifestação é tipicamente um síndroma do tunel cárpico, seguido de manifestações de neuropatia difusa que por vezes se mantêm largamente confinadas aos membros superiores. O envolvimento do sistema nervoso autónomo é em geral marcado e precoce, em particular nos quadros de neuropatia de tipo I. O mecanismo de lesão do nervo periférico é controverso. Estudos limitados a biópsias do nervo sural, em que se observam alterações degenerativas na ausência de depósitos de amilóide, levaram alguns investigadores a considerar que estas resultariam não da deposição de substância amilóide mas de uma acção tóxica directa da variante de TTR. No entanto esta conclusão é enfraquecida pelo facto de não se saber se o mesmo nervo não teria depósitos de amilóide em segmentos mais proximais, como tem sido observado em estudos de necrópsias. A deposição de amilóide dá-se em redor das pequenas células ganglionares, podendo-as lesar directamente, e em massas endoneurais, que podem ter um efeito compressivo directo sobre os axónios e células de Schwann circundantes. Estas apresentam frequentemente aspectos de desmielinização segmentar, não se sabendo se primária ou resultante da degenerescência axonal. Os segmentos nervosos proximais mais atingidos têm por vezes marcado edema e alterações dos capilares endoneurais, que é uma causa conhecida de neuropatia por isquémia. No entanto esta leva a uma perda preferencial das fibras mielinizadas de grande calibre, exactamente o contrário do observado.

Em algumas variantes de ATTR sem expressão clínica neuropática encontram-se, quando procurados, depósitos endoneurais de amilóide (por exemplo na ATTR Met 111, ver Frederiksen *et al.*, 1962).

Cardiomiopatia: As alterações resultantes da deposição de amilóide no miocárdio podem-se limitar ao sistema de condução, envolto em profusos depósitos de amilóide, com atrofia e desaparecimento das fibras musculares que lhe são próprias, em particular no nó sinusal e nos ramos ventriculares do feixe de His. As arritmias e bloqueios são frequentes nestes doentes. Nas cardiomiopatias mais agressivas há infiltração difusa do miocárdio, com um padrão electrocardiográfico de pseudo-enfarte e insuficiência cardíaca congestiva resultante de disfunção diastólica. Para além destas alterações existe geralmente, nas formas neuropáticas, um desnervamento total do coração resultante da destruição do sistema nervoso autónomo, que contribui para a existência de hipotensão postural.

Nefropatia: O grau de disfunção renal é extremamente variável, correlacionando-se com a extensão da deposição glomerular de amilóide. Esta pode ser quase inexistente, ou pelo contrário resultar na hialinização da maior parte dos glomérulos. Os depósitos medulares e perivasculares não são provavelmente causa de disfunção significativa. Estas alterações complicam-se frequentemente por um quadro de pielonefrite secundária às infecções repetidas do tracto urinário, resultantes da desnervação autonómica, nos quadros

neuropáticos. A existência de proteinúria significativa é comum, e a insuficiência renal crónica terminal não é rara, em particular nos casos avançados.

Alterações oculares: Para além das opacidades do vítreo que resultam directamente da deposição de amilóide, observam-se irregularidades da pupila e deficiência da secreção lacrimal, resultando por vezes em ulcerações da córnea. Em algumas variantes da ATTR, as alterações oculares são precoces e proeminentes, podendo dominar completamente o quadro clínico.

A Transtirretina

A transtirretina humana (TTR), também conhecida por pré-albumina, é uma proteína de 55 kDa, inicialmente identificada por técnicas electroforéticas no líquido cefalorraquidiano, (Kabat *et al.*, 1942), onde pode chegar a representar 25% das proteínas totais (Costa *et al.*, 1980; Weisner et Roethig, 1983). Foi posteriormente identificada no soro (Seibert e Nelson, 1942; Grabar *et al.*, 1955), onde representa cerca de 0,4% das proteínas totais (0,2 a 0,3 g/l). Adquiriu a designação de pré-albumina pela particularidade de migrar à frente da albumina por electroforese a pH alcalino. Foi pela primeira vez isolada em 1956, por Schultze *et al.*, a partir do plasma humano. O seu nome actual, homologado pelas comissões internacionais de nomenclatura relevantes (Goodman *et al.*, 1981), enfatiza as suas funções de transporte.

Ingbar demonstrou, em 1958, a ligação de tiroxina (T_4) à TTR. A constante de associação tem sido estimada entre $2{,}3 \cdot 10^8$ M^{-1} (Woeber e Ingbar, 1968) e $1{,}3 \cdot 10^8$ M^{-1} (Pages *et al.*, 1973), muito inferior à da ligação da T_4 à TBG, 10^{10} M^{-1} (Nilsson e Peterson, 1975). A TTR humana transporta 15% (Woeber e Ingbar, 1968) ou talvez mesmo 44% (Pettersson, 1989) da T_4 plasmática, sendo a restante na sua maior parte transportada pela TBG, e uma pequena percentagem pela albumina. No líquido cefalorraquidiano (LCR) a quase totalidade da T_4 encontra-se ligada à TTR (Hagen e Solberg, 1974), havendo dados experimentais que sugerem ser a TTR necessária ao transporte de T_4 atravéz dos plexos coroideus e à manutenção da sua relativamente elevada concentração no LCR (Dickson *et al.*, 1987; Schreiber *et al.*, 1990; Chanoine *et al.*, 1992; Mendel *et al.*, 1992; Southwell *et al.*, 1993). No rato adulto, que não possui TBG circulante, a TTR é a principal proteína sérica transportadora de T_4 (Davis *et al.*, 1970; Sutherland e Brandon, 1976).

Posteriormente Kanai *et al.* (1968) mostraram que à TTR circulante se liga uma outra proteína, designada em inglês por "retinol binding protein" (RBP), ou seja proteína transportadora do retinol (vitamina A). Esta é uma pequena proteína com cerca de 21 kDa, constituída por uma única cadeia de 182 aminoácidos (Rask *et al.*, 1987). Os complexos formados, na relação 1:1, e que constituem cerca de 40% da forma circulante de TTR, são estáveis entre pH 3,5 e 7,5 (Raz *et al.*, 1970), dissociando no entanto a baixa força iónica (Peterson, 1971a). A ligação da TTR ao RBP protege este da filtração glomerular, aumentando consideravelmente a sua semivida, de 4 para cerca de 12 horas (Vahlquist *et al.*, 1973), parecendo também estabilizar a ligação do retinol ao RBP (Rask *et al.*, 1972; Gotto *et al.*, 1972). A apoRBP tem uma reduzida afinidade pela TTR em relação à holoRBP (Fex *et al.*, 1979). A TTR do líquido cefalorraquidiano encontra-se livre, pois neste não existe RBP.

A presença de uma variante polimórfica da TTR no macaco Rhesus, com diferente mobilidade electroforética (Blumberg e Robbins, 1960), levou a que se evidenciasse a estrutura tetramérica desta proteína (Alper *et al.*, 1969). O tetrâmero de TTR é

extremamente estável, resistindo a grandes variações de pH, a 0,1% de SDS e a ureia 8M (Branch *et al.*, 1971, 1972), mas dissocia em soluções de guanidina 6M, revelando a natureza não covalente da ligação entre monómeros (Rask *et al.*, 1971). A TTR não é glicosilada (Peterson, 1971b). Ainda antes de se conhecer a estrutura detalhada da molécula, estudos de espectroscopia revelaram uma grande riqueza em folhas pregueadas β (Gotto *et al.*, 1972), constituindo cerca de 50% do total da proteína. A sequência primária do monómero da TTR humana, constituído por 127 aminoácidos (figura I-2), foi estabelecida por Kanda *et al.* (1974).

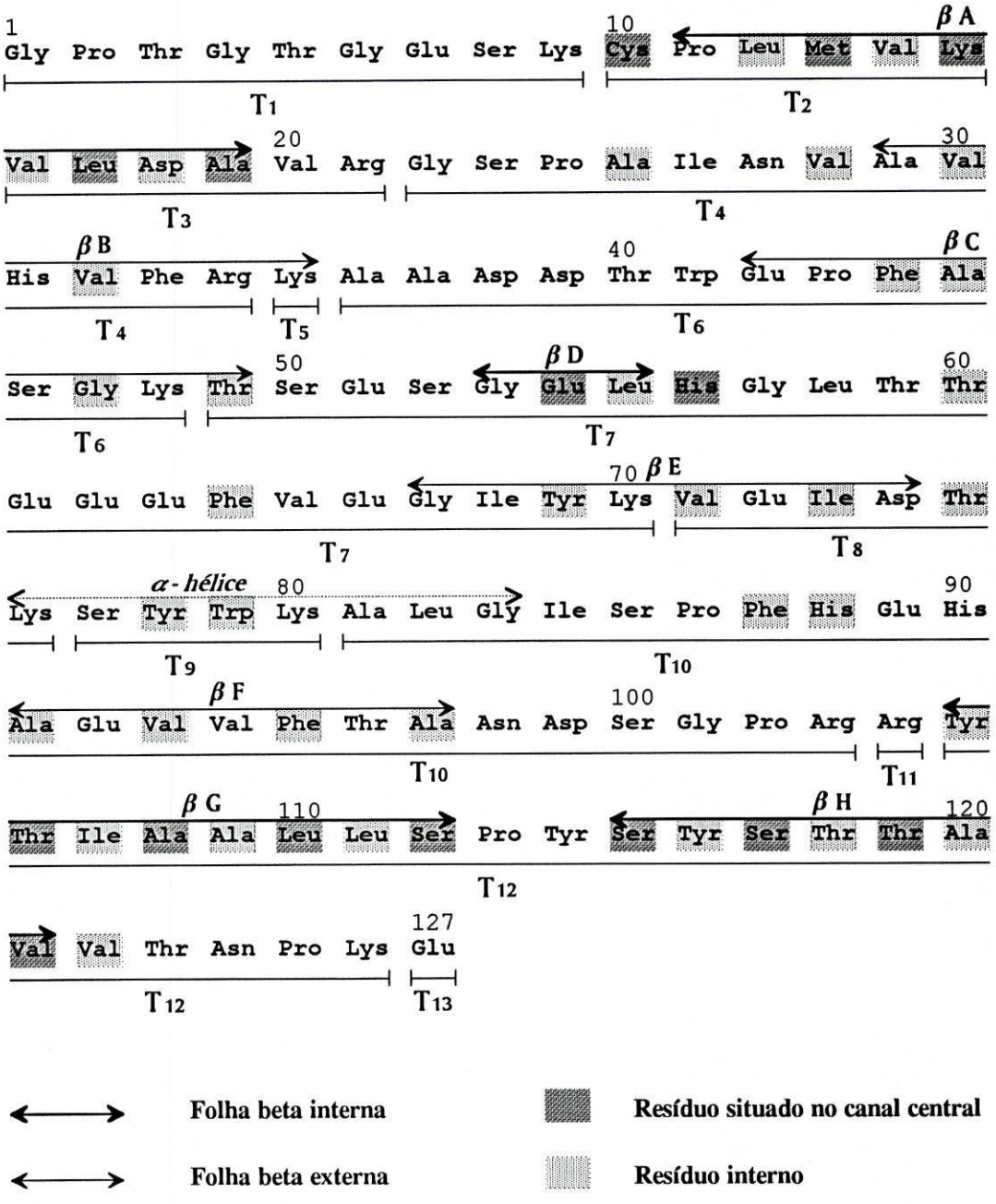


Figura I-2 Estrutura primária e secundária do monómero de TTR, com indicação dos fragmentos de digestão tríptica (T_1 a T_{13}) e da localização dos resíduos no tetrâmero.

A TTR foi a primeira proteína sérica cuja estrutura tridimensional foi elucidada por difracção de raios X (Blake *et al.*, 1974, 1978), estudo recentemente refinado por Hamilton *et al.* (1993). Cada monómero tem 2 folhas constituídas por 4 cadeias β antiparalelas. Estes formam dímeros por associação das cadeias β de ambos, formando duas folhas mais extensas, marcadamente côncavas, uma interna e outra externa (figura I-3). Os dímeros, que são a verdadeira subunidade morfológica da TTR, formada por dois monómeros com conformações ligeiramente dissimilares, associam-se por justaposição das faces internas, criando uma estrutura em barril achatado com 70 × 55 × 50 Å, atravessado por um canal central de 8 Å de diâmetro e 50 Å de comprimento, onde se dá a ligação da tiroxina (Blake, 1981). Neste canal existem dois locais de ligação simétricos, um em cada extremidade, apenas um dos quais se encontra normalmente ocupado, devido a fenómenos de cooperação negativa (Cheng *et al.*, 1977). O local de ligação do RBP ainda não foi elucidado, apesar da estrutura tridimensional deste também ter sido determinada por difracção de raios X (Newcomer *et al.*, 1984).

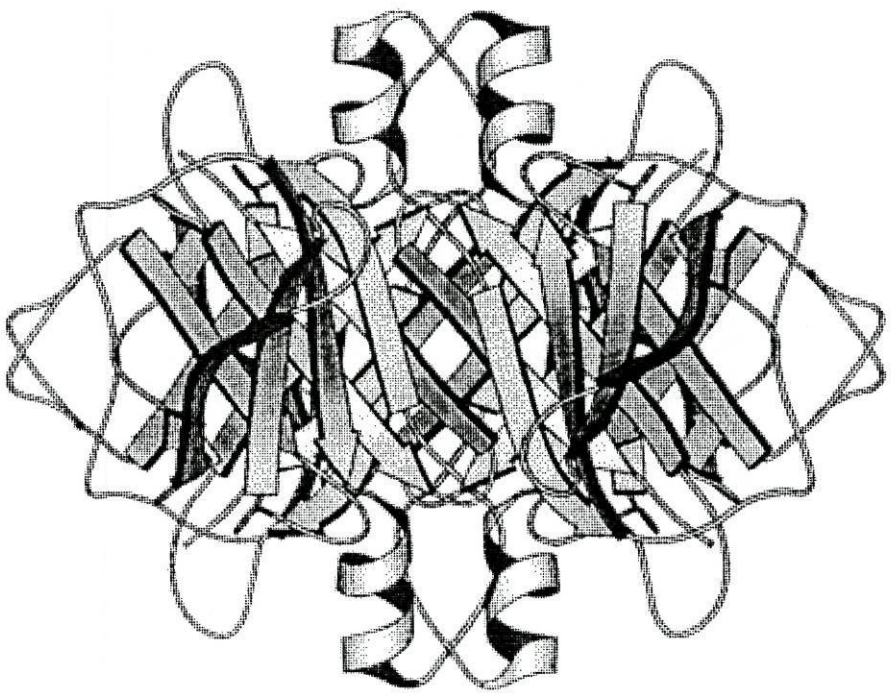


Figura I-3 Representação gráfica de um tetrâmero de TTR (adaptado de Jarvis *et al.*, 1994).

O RNA mensageiro (mRNA) da TTR foi clonado a partir de bancos genómicos de fígado humano (Mita *et al.*, 1984; Sasaki *et al.*, 1984; Whitehead *et al.*, 1984; Soprano *et al.*, 1985; Wallace *et al.*, 1985a), de rato (Dickson *et al.*, 1985a; Sundelin *et al.*, 1985), de murganho (Wakasugi *et al.*, 1985; Costa RH *et al.*, 1986; Duan *et al.*, 1989), de carneiro (Tu *et al.*, 1989), de galinha (Duan *et al.*, 1991) e de lagarto (Achen *et al.*, 1993). Tem cerca de 700 bp nas primeiras quatro espécies, compreendendo uma região codificadora de 441 bp intercalada entre um segmento a 5' de 26-27 bp e outro a 3' de 145-148 bp, a que

se segue a cauda poli(A). O polipéptido codificado tem 147 aminoácidos, correspondendo os 20 aminoácidos N-terminais que não integram o monómero de TTR ao "péptido sinal" que é clivado da pró-TTR durante o trânsito pelo retículo endoplásmico. O cDNA de galinha e lagarto possui 9 nucleotídeos extra que codificam os aminoácidos Val-Ser-His, inseridos após o 3º aminoácido da sequência, quando alinhada com as das outras espécies. A homologia entre as regiões codificadoras é considerável, de cerca de 80% entre as espécies de mamífero, e de cerca de 63% entre estas e a galinha ou lagarto.

Os cDNA foram empregues como sondas de hibridação para averiguação dos locais de síntese da TTR, por "Northern blots" realizados a partir de homogeneizados de tecidos ou por hibridação *in situ*. Para o homem e rato, foi demostrada a presença do respectivo mRNA no fígado, plexos coroideus, ilhotas de Langerhans e epitélio pigmentar da retina (Soprano *et al.*, 1985; Dickson *et al.*, 1985b; Dickson e Schreiber, 1986; Herbert *et al.*, 1986; Kato *et al.*, 1986; Stauder *et al.*, 1986; Thomas *et al.*, 1988; Jacobsson, 1989a; Cavallaro *et al.*, 1990; Ong *et al.*, 1994). Estudos alargados a um maior leque de espécies mostraram ser a síntese de TTR pelos plexos coroideus notavelmente conservada ao longo da evolução dos vertebrados, estando presente nos mamíferos placentares, marsupiais, monotremos, pássaros e répteis, mas não nos anfíbios (Harms *et al.*, 1991; Achen *et al.*, 1992, 1993). A síntese e secreção hepática de TTR é aparentemente um acontecimento filogeneticamente mais tardio (Schreiber *et al.*, 1993), estando ausente nos répteis, monotremos e marsupiais poliprotodontes (Richardson *et al.*, 1993).

A TTR é a principal proteína sintetizada nos plexos coroideus, sendo inteiramente secretada para o líquido cefalorraquidiano (Schreiber *et al.*, 1990). Esta é aparentemente a origem da quase totalidade da TTR aí existente (Hamberger *et al.*, 1990). Embora a concentração do mRNA da TTR no plexo coroideu, e consequentemente a taxa de secreção de TTR, seja 25 a 100 vezes superior à do fígado (Dickson *et al.*, 1986), este é responsável pela síntese da quase totalidade da TTR circulante (~300 mg/l), dada a grande diferença de tamanho dos dois órgãos.

A síntese e secreção de TTR surge numa fase precoce da ontogénese, tendo sido demonstrada para o homem no saco vitelino pela 4ª ou 5ª semana de gestação (Gitlin e Gitlin, 1975), e nos plexos coroideus e fígado desde a 8ª semana (Jacobsson, 1989b), e um pouco mais tarde, mas provavelmente antes da 12ª semana, no pâncreas endócrino (Gray *et al.*, 1985). A sua concentração sérica à nascença é de cerca de 50% do valor do adulto (Vahlquist *et al.*, 1975). Os estudos sobre a síntese e expressão de TTR ao longo do desenvolvimento fetal realizados em ratos (Kato *et al.*, 1986; Soprano *et al.*, 1986; Thomas e Schreiber, 1986; Makover *et al.*, 1989) e em murganhos (Murakami *et al.*, 1987) são congruentes com as observações realizadas em fetos humanos. Estes factos fazem pensar que a TTR teria um papel importante, talvez no transporte de T4 da mãe para o feto e no aporte desta ao encéfalo durante o desenvolvimento embrionário, pelo que se constatou com bastante surpresa que ratos "knock out" em que foi inactivado o gene da TTR, e nos quais

esta não é detectável, são, nas palavras dos autores, fenotipicamente normais, viáveis e férteis (Episkopou *et al.*, 1993).

O catabolismo da TTR foi investigado no homem com proteína marcada com radioisótopos, em indivíduos normais e com insuficiência renal (Oppenheimer *et al.*, 1965, Socolow *et al.*, 1965, Vahlquist *et al.*, 1973). As taxas de semivida encontradas foram 1,9, 2,5 e 2,6 dias, correspondendo a uma degradação diária de 9,74 mg/Kg ou de 282 mg/m^2 de área corporal, ou seja de 27 a 36% da TTR total, sendo portanto a TTR uma proteína com um catabolismo relativamente rápido. Estes estudos apontam também para a existência de um compartimento extravascular importante, onde se localiza cerca de 50% da TTR total. Os insuficientes renais tinham parâmetros muito semelhantes, donde se conclui não ser o rim um local preferencial de degradação da TTR. Estudos realizados no rato (Peterson *et al.*, 1974; Makover *et al.*, 1988; Saraiva *et al.*, 1988), indicaram um valor para a semivida da TTR total de 12 a 20 horas. Makover *et al.* estimaram em cerca de 70% do total a percentagem de TTR situada no compartimento extravascular. Este estudo permitiu outras conclusões importantes: A cinética de remoção da TTR do LCR foi estimada (semivida inferior a 2 horas) dando valores semelhantes aos do próprio LCR, donde se conclui ser a TTR arrastada passivamente para o plasma sem ser metabolizada localmente, e determinaram-se os locais de degradação, obtendo-se o valor de 40% para o fígado e de 25% para a pele e músculos, contribuindo os restantes tecidos com pequenos valores. O encéfalo não revelou sinais de actividade degradativa. A nossa interpretação destes dados aponta para um modelo do metabolismo da TTR no homem semelhante ao da figura I-4.

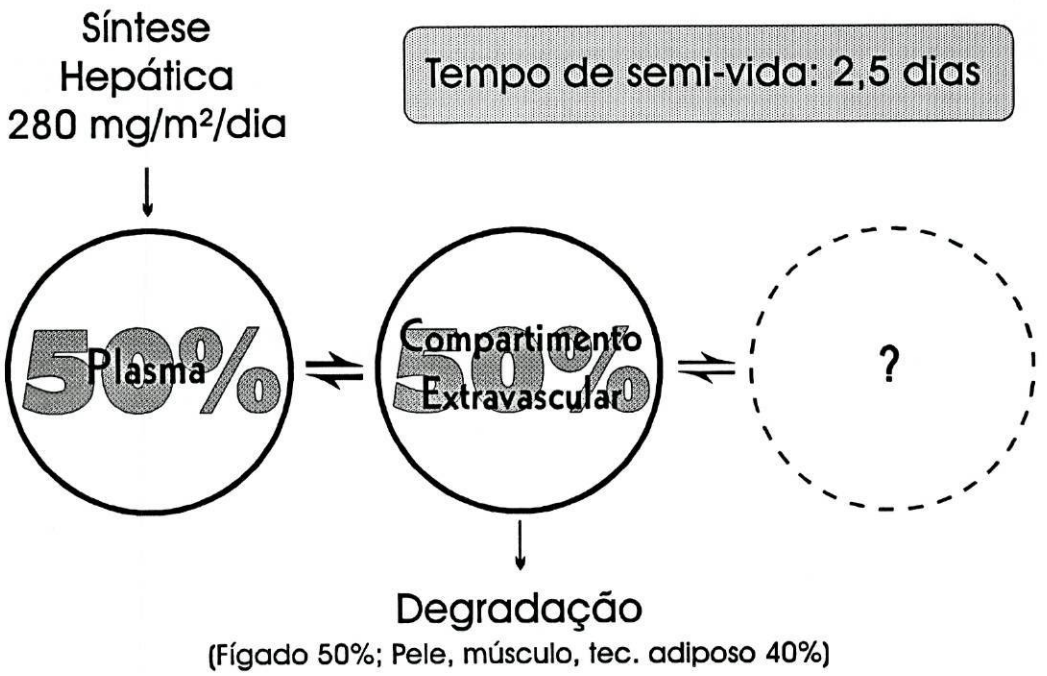


Figura I-4 Modelo proposto para o metabolismo da TTR humana.

A região do genoma humano contendo o gene da TTR foi clonada e sequenciada em vários laboratórios (Sasaki *et al.*, 1985; Tsusuki *et al.*, 1985; Sakaki *et al.*, 1989), o mesmo tendo sido feito para o murganho (Wakasugi *et al.*, 1986) e para o rato (Fung *et al.*, 1988; Motojima e Goto, 1990). É um gene de cópia única, que no homem se localiza no cromossoma 18 (Whitehead *et al.*, 1984; Wallace *et al.*, 1985b; Jinno *et al.*, 1986; Sparkes *et al.*, 1987). A região codificadora abrange cerca de 6,9 Kb, possuindo quatro exões e três intrões. O exão 1 codifica apenas os três primeiros aminoácidos da TTR, precedidos pela sequência de 20 aminoácidos do péptido sinal e por uma sequência de 26 bp não traduzida. O exão 4 possui uma região não traduzida de 139 bp, dando-se a adição da cauda poli(A) 123 bp a jusante deste. No 1º e 3º intrão foram detectadas duas "open reading frames" que poderão eventualmente codificar algum factor de regulação do gene da TTR. Na região 5' encontram-se ainda duas sequências homólogas a sequências conhecidas sensíveis aos glucocorticoides. Os mecanismos genéticos de regulação da expressão hepática foram detalhadamente estudados para o murganho (Costa RH *et al.*, 1986, 1988; Yan *et al.*, 1990; Costa e Grayson, 1991), tendo mostrado que uma região proximal promotora com cerca de 200 bp e uma região "enhancer" com cerca de 100 bp situada cerca de 2 kb a montante são necessários e suficientes para a expressão do gene em células de hepatoma ou no fígado de murganhos transgénicos. No "enhancer" conhecem-se locais de ligação para um factor largamente distribuido, AP1/cJun, e para os factores organoespecíficos C/EBP e HNF4. O promotor liga os factores HNF1, HNF3 e HNF4. Estas regiões não são no entanto suficientes para a expressão correcta do gene nos plexos coroideus, para o que são necessárias sequências situadas mais a jusante, mas a uma distância inferior a 3 kb (Yan *et al.*, 1990). A regulação da síntese de TTR no fígado e nos plexos coroideus é de resto independente, sofrendo um decréscimo acentuado no fígado durante a inflamação aguda, mas mantendo-se inalterada nos plexos (Dickson *et al.*, 1985a). As sequências reguladoras do gene humano têm uma grande homologia com as de murganho, em particular na região do promotor, existindo no entanto algumas diferenças (Sasaki *et al.*, 1990).

Sendo a TTR uma proteína cuja estrutura e regulação são conhecidas em grande detalhe, subsistem no entanto muitas dúvidas sobre alguns aspectos funcionais. Foram-lhe encontradas propriedades de tipo hormonal tímico (Burton *et al.*, 1978, 1985, 1987) e entrevista alguma homologia com pro-hormonas gastrointestinais da família da secretina (Jörnvall *et al.*, 1981), cujo significado continua por esclarecer. Foi-lhe também reconhecida capacidade para o transporte do factor tímico sérico (Dardenne *et al.*, 1980), da norepinefrina (De Vera *et al.*, 1986), e do ácido retinóico (Smith *et al.*, 1994). A grande afinidade da TTR para alguns compostos da família dos PCBs e das dioxinas (Lans *et al.*, 1993), poderá ter alguma importância no mecanismo de toxicidade desses poluentes. Ainda é também controversa a razão pela qual a TTR é activamente secretada para o LCR, e talvez preferencialmente reabsorvida ao longo do espaço subaracnóide (Costa *et al.*, 1980). É possível que a função mais importante da secreção de TTR para o LCR seja o aporte de T4 ao sistema nervoso central (Southwell *et al.*, 1993), ou pelo contrário que a circulação de TTR pelo LCR acelere a eliminação de T4 (Blay *et al.*, 1993).

Amiloidogénese

As circunstâncias que condicionam a amiloidogénese têm sido estudadas em muitos tipos de doenças amiloidóticas, sendo aparentemente diversas consoante a natureza do precursor envolvido. Apesar disso, o evento fundamental é sempre a polimerização linear de uma proteína precursora, com a adopção das propriedades próprias das fibras de amilóide, um fenómeno também designado *fibrilogénese*. As proteínas precursoras podem ser um constituinte normal dos tecidos ou uma proteína aberrante, resultante de uma proliferação plasmocitária monoclonal ou de uma alteração genética. Podem-se integrar nas fibras de amilóide intactas, ou após fragmentação proteolítica, não tendo sido ainda descortinadas as características que lhes conferem potencial fibrilogénico, sendo practicamente o único motivo comum a preponderância de estrutura β na proteína ou fragmento depositado.

Purificam-se conjuntamente com as fibras de amilóide uma série de componentes comuns a todos os tipos, como seja o componente P (Cathcart *et al.*, 1967; Pepys, 1988), cadeias livres de glicosaminoglicanos, em particular dermatan sulfato, e condroitina e heparan sulfato proteoglicano (Nelson *et al.*, 1991; Magnus *et al.*, 1991, 1992; Kisilevsky, 1992; Stenstad *et al.*, 1993; Husby *et al.*, 1994b), outros componentes das membranas basais (Scott *et al.*, 1983; Lyon *et al.*, 1991), fragmentos de apolipoproteína E (Wisniewski e Frangione, 1992), fragmentos de histonas (Prelli *et al.*, 1991), cálcio (Alizadeh-Khiavi *et al.*, 1992), etc. O consenso geral neste momento é de que estes componentes não são constituintes estruturais das fibras de amilóide, mas que terão um papel importante na nucleação ou estabilização das fibras nascentes, conferindo-lhes resistência à proteólise, ou induzindo mudanças conformacionais por interacção electrostática.

Um dos tipos de amiloidose em que o mecanismo é menos controverso é talvez a amiloidose AL. Neste tipo de amiloidose a tendência à polimerização das cadeias leves é muito variável de caso para caso, em alguns deles dando-se a polimerização quase imediata da proteína intacta ainda dentro do retículo endoplásmico, enquanto que nos casos mais típicos processamento proteolítico prévio é aparentemente necessário, eventualmente nos lisosomas do sistema retículo-endotelial, dando-se apenas a polimerização de um fragmento em que está geralmente representada toda a região variável (Glenner, 1980). Num caso particular recentemente descrito, em que a proteína de Bence Jones circulante se encontra intacta nos depósitos de amilóide, foi demonstrado que apenas era necessária a desnaturação por redução, em condições fisiológicas, para se dar a polimerização da proteína de Bence Jones, formando-se fibras com todas as características de amilóide (Klafki *et al.*, 1993).

O estudo da amiloidogénese tem sido ajudado pela existência de um excelente modelo animal, a amiloidose induzida no murganho e em outros animais de laboratório pela administração repetida de caseína, nitrato de prata, ou outros estímulos inflamatórios (Kuczynski e Goldmanns, 1922; Skinner *et al.*, 1977), que em estirpes apropriadas

desencadeia uma amiloidose de tipo AA em praticamente 100% dos animais. Este modelo, que teve um papel importante em algumas teorias precoces, como a teoria celular bifásica da segregação local de amilóide (Teilum, 1964), teoria baseada em observações perspicazes e com alguma actualidade, só verdadeiramente revelou o seu potencial a partir dos anos 60, altura a partir da qual foi possível investigar este modelo com as recentes aquisições nos métodos bioquímicos e de observação morfológica. Uma variante recente deste modelo com algumas particularidades interessantes é a amiloidose induzida pela hidatidose alveolar murina (Ali-Khan *et al.*, 1983).

Um modelo animal completamente diferente de amiloidose sistémica, é o do murganho com senescência acelerada (Takeda *et al.*, 1981; Higushi *et al.*, 1986), em que uma variante da lipoproteína apoAII Pro 5 → Gln se deposita espontaneamente a partir dos 6-8 meses. Este modelo tem tido uma utilização mais limitada.

Foi também criada, por microinjecção em oócitos de murganho de parte do gene humano da TTR Met 30, acoplado ao promotor da metalotionina, uma linha de animais transgénicos com níveis séricos elevados de TTR Met 30 humana (Yamamura *et al.*, 1987), que manifestam a partir dos 6 meses um quadro histológico de amiloidose sistémica, envolvendo particularmente a submucosa do tubo digestivo, e em idade mais avançada outros órgãos, particularmente o miocárdio e o rim, mas nunca o sistema nervoso periférico (Yi *et al.*, 1991). Esse quadro histológico não se acompanha pelo desenvolvimento de qualquer manifestação clínica evidente. O desenvolvimento deste modelo animal de amiloidose ATTR foi portanto apenas parcialmente coroado de êxito, sendo de prever que mesmo assim se venha a revelar de grande utilidade.

A amiloidose AA foi muito recentemente revista (Husby *et al.*, 1994a). A proteína SAA é codificada por uma família de genes complexa, que inclui pelo menos dois genes, SAA_1 e SAA_2, expressos predominantemente no fígado e com uma regulação complexa ligada à resposta inflamatória aguda, um gene SAA_3 que não é expresso, um gene SAA_4 com expressão constitutiva exclusivamente hepática, e pelo menos um pseudogene. Cada uma das proteínas expressas existe com ou sem uma arginina N-terminal (forma des-arg), pelo que se encontram pelo menos seis isoformas de SAA em circulação. Conhecem-se além disso alguns polimorfismos desses genes. A proteína AA isolada dos depósitos de amilóide corresponde ao segmento N-terminal da SAA, tendo no homem geralmente 76 aminoácidos, embora possa ter entre 43 e 94. A deposição de amilóide acompanha-se sempre pela elevação dos níveis de SAA circulante, tendo-se observado na amiloidose experimental o seu início pelo aparecimento de fibras de amilóide dentro de lisosomas. A digestão proteolítica incompleta da SAA, em que está aparentemente implicada a elastase neutrofílica lisosomal, é pois seguramente um aspecto importante na formação de amilóide de tipo AA, embora não esteja de modo nenhum demonstrado que ela se dê antes da polimerização, existindo alguma controvérsia sobre a importância da presença de SAA intacta nos depósitos de amilóide. Numerosos estudos ultra-estruturais mostraram uma

relação estreita entre os depósitos de amilóide AA e variados tipos celulares, quer epiteliais quer pertencentes ao sistema retículo-endotelial, observando-se frequentemente a presença de amilóide em invaginações profundas da membrana plasmática. É possível observar a deposição de amilóide in vitro, a partir de macrófagos peritoneais de murganhos em que foi induzida amiloidose, por incubação com soro rico em SAA (Shirahama *et al.*, 1990).

O estudo do modelo experimental clássico tem orbitado, nos últimos anos, em torno da definição da natureza e modo de acção do chamado "amyloid enhancing factor" (AEF). Esta designação aplica-se a um ou mais factores presentes em extratos de tecidos de animais amiloidóticos, em si mesmos não amiloidogénicos e não inflamatórios, hipoteticamente responsáveis pela aceleração da amiloidogénese que se observa quando estes são injectados, por via endovenosa, no início da estimulação inflamatória. Nestas experiências, o tempo de indução da deposição de amilóide é encurtado de semanas para 72 horas (Werdelin e Ranløv, 1966; Kisilevski *et al.*, 1977; Axelrad *et al.*, 1982).

A actividade AEF não respeita as diferenças entre espécies nem é específica da amiloidose AA (Shirahama *et al.*, 1969; Varga *et al.*, 1986; Ali-Khan *et al.*, 1988). A actividade AEF está em geral intimamente ligada às fibras de amilóide (Niewold *et al.*, 1987), embora possa ser demonstrada em preparações onde esta não é aparente, por exemplo de macrófagos peritoneais de murganhos amiloidóticos (Shirahama *et al.*, 1990). As tentativas de purificação da AEF têm dado resultados pouco conclusivos, permanecendo a sua natureza envolta em controvérsia, tendo sido encontrada actividade AEF em preparações ricas em ubiquitina (Alizadeh-Khiavi *et al.*, 1991, 1992), e ainda noutras substâncias, a que não será estranho a definição puramente funcional do AEF. Demonstrou-se no entanto que a indução de níveis elevados de SAA com administração concomitante de AEF não são suficientes para induzir a amiloidogénese, sendo necessários um ou mais factores adicionais ligados ao processo inflamatório (Niewold *et al.*, 1993).

Outra abordagem da amiloidogénese ultimamente muito estudada é a fibrilogénese *in vitro*, utilizando precursores de amilóide, ou fragmentos destes, naturais ou sintéticos. Estes estudos podem-se considerar como uma extensão natural das primeiras experiências realizadas com proteínas de Bence Jones (Glenner *et al.*, 1971b; Tan e Epstein, 1972; Linke *et al.*, 1973), pouco depois reproduzidas com péptidos hormonais, particularmente com insulina (Glenner *et al.*, 1974; Westermark, 1974, Kedar *et al.*, 1976), a partir da qual é possível produzir fibras com características tintoriais, morfológicas e biofísicas próprias da substância amilóide, por simples aquecimento de uma solução a pH ácido. Estes resultados foram reproduzidos recentemente com IAPP (Westermark *et al.*, 1990b) e ANF (Johansson e Westermark, 1990).

Na amiloidose AA também foram realizados estudos de fibrilogénese *in vitro*, utilizando péptidos sintéticos, ou resultantes de fragmentação proteolítica de proteínas AA e SAA, que revelaram serem particularmente importantes para a polimerização os primeiros 10 a 15 aminoácidos N-terminais (Westermark *et al.*, 1992). Os polimorfismos humanos da SAA

são idênticos nessa zona da molécula, o que talvez explique a inexistência de associação de qualquer deles com a doença no homem, ao contrário do que se observa na maior parte das espécies animais estudadas.

A maioria dos trabalhos publicados recentemente em que esta abordagem foi utilizada dizem respeito à amiloidose Aβ. A formação *in vitro* de fibras de amilóide foi demonstrada com diversos subfragmentos do βPP (Castaño *et al.*, 1986; Gorevic *et al.*, 1987; Kirschner *et al.*, 1987; Halverson *et al.*, 1990; Barrow *et al.*, 1992; Burdick *et al.*, 1992). As fibras resultantes do péptido β34-42 têm sido utilizadas para estudos de conformação molecular detalhada, por métodos sofisticados de marcação isotópica e FTIR (Halverson *et al.*, 1991) e de NMR (Spencer *et al.*, 1991), que revelaram a presença de uma inusitada conformação cis da ligação amida 37-38, eventualmente importante para a fibrilogénese da βPP. Este sistema tem-se prestado também a estudos cinéticos (Jarret e Lansbury, 1992; Jarret *et al.*, 1993), que revelaram ser a fibrilogénese um processo dependente de nucleação, analogamente ao que se pode observar para o PrP (Come *et al.*, 1993) e talvez para a TTR (Colon e Kelly, 1992). Com base nestes factos, foi proposta uma teoria geral da amiloidogénese, em que o evento fundamental seria a nucleação, cuja extrema dependência da concentração do precursor, e de outros factores exógenos, explicaria algumas particularidades deste processo: o longo tempo de latência, e o seu encurtamento pela junção de factores exógenos, como o PrP^{Sc} e o AEF, que não seriam mais do que núcleos fibrilares pré-formados, segundo esta teoria (Jarret e Lansbury, 1993).

Os estudos sobre a amiloidogénese na ATTR seguiram um percurso análogo. As investigações sobre a estrutura das fibras de amilóide centraram-se na importância ou não de pontes dissulfureto intermoleculares (Terry *et al.*, 1993; McCutchen et Kelly, 1993), e nos estudos de fibrilogénese *in vitro* realizados com TTR intacta ou péptidos homólogos de diversos segmentos, com os quais é possível realizar fibras por simples incubação a pH ácido (Colon e Kelly, 1992; McCutchen *et al.*, 1993; Gustavsson *et al.*, 1991). Com base neste modelo de fibrilogénese foram feitas tentativas de caracterização do intermediário directamente implicado na polimerização, tendo sido proposto tratar-se de um monómero parcialmente desnaturado, com destruição ou afastamento das cadeias β C e D (Kelly e Lansbury, 1994). A polimerização dar-se-ía por justaposição das cadeias A e H de subunidades adjacentes.

Um estudo recente, muito interessante (Ganowiak *et al.*, 1994), demonstra que estas fibras sintéticas têm actividade AEF no sistema murino clássico, reforçando a hipótese de o AEF poder ser constituído por fragmentos de fibras ou fibras nascentes, que promoveriam a nucleação segundo o modelo de Jarret e Lansbury atrás referido.

Estamos convictos que o estudo deste modelo de fibrilogénese, e a comparação das fibras obtidas com as verdadeiras fibras de amilóide, permitirá esclarecer finalmente o mecanismo molecular da amiloidogénese na ATTR, abrindo caminho à elucidação da fisiopatologia desta doença.

Capítulo II

Os anticorpos monoclonais

Introdução

O uso de anti-soros como sondas específicas da estrutura molecular vem já do século passado, dos primórdios da imunologia experimental, pouco após a descoberta das imunoglobulinas por von Behring e Kitazato. A produção de anti-soros de elevada especificidade manteve-se no entanto, e por muitos anos, uma arte difícil e de resultados incertos, exigindo uma imunização com antigénios de grande pureza, algo difícil de realizar na maior parte dos casos com os métodos bioquímicos então disponíveis. No tempo decorrido, foram sendo dados passos fundamentais no campo da imunologia, que do ângulo da imunoquímica tiveram um ponto alto com a demonstração experimental por Nossal e Lederberg (1958) da teoria da selecção clonal de Burnet (1957).

Nos anos 70, deu-se uma modificação revolucionária: baseando-se na técnica de fusão celular mediada pelo vírus Sendai (Okada, 1962) e em técnicas de selecção de híbridos somáticos (Littlefield, 1964), e encorajados pelo sucesso anterior da sua aplicação a linhas celulares de mieloma, sem perda da secreção de imunoglobulinas (Cotton e Milstein, 1973), Köhler e Milstein (1975) concretizaram uma ideia ousada: obter linhas celulares imortalizadas produtoras de imunoglobulinas com especificidade pré-determinada, abrindo novas perspectivas ao uso de técnicas imunoquímicas. Esta inovação revelou-se de tão grande importância que lhes mereceu a atribuição do prémio Nobel em 1984.

Esse primeiro trabalho de Köhler e Milstein explica-se em poucas palavras. Recorrendo ao vírus Sendai, hibridaram uma subestirpe do mieloma MOPC-21 deficiente em hipoxantina guanosina fosforribosil transferase ($HGPRT^-$) com células esplénicas de ratinhos imunizados com eritrócitos de carneiro, e os híbridos resultantes foram seleccionados em meio de cultura contendo aminopterina, hipoxantina e timidina (meio HAT). Os híbridos obtidos foram então cultivados em agar, com uma camada sobreposta contendo eritrócitos de carneiro e complemento, sendo as colónias celulares produtoras de imunoglobulinas com a especificidade desejada detectadas pelo halo de hemólise que as rodeava.

Iremos agora descrever dois desenvolvimentos que foram fundamentais para o sucesso desta estratégia: A disponibilidade de linhas celulares contínuas de mieloma adaptadas ao crescimento em meio de cultura, e a existência de técnicas eficazes de hibridação celular e de selecção dos híbridos resultantes.

Linhas celulares de mieloma

Porquê linhas celulares de mieloma? É um facto bem conhecido que a fusão entre células de linhagem diferente resulta quase sempre na supressão das funções que as diferenciam, e portanto seria altamente improvável que os híbridos resultantes mantivessem a produção de imunoglobulinas (Köhler *et al.*, 1977).

O mieloma, ou plasmocitoma, é uma neoplasia de células produtoras de imunoglobulinas rara na espécie animal, com uma excepção notável na estirpe LOU/C de rato (Bazin *et al.*, 1973), sendo relativamente comum no homem, e quase inexistente no coelho. No início dos anos 60 descobriu-se que irritantes peritoneais, particularmente certos óleos minerais, como o pristano, tinham a capacidade de induzir o aparecimento de mielomas na estirpe de murganhos BALB/c (Potter e Robertson, 1960; Potter e Boyce, 1962), geralmente associados a uma translocação de fragmento do cromossoma 15 onde se localiza o proto-oncogene *c-myc* para o locus do gene de uma das cadeias de imunoglobulina (Cory, 1983). A seguir a esta descoberta, um grande número de mielomas de ratinhos BALB/c foram produzidos e intensamente estudados (Potter, 1972, 1977), daí resultando grande parte do conhecimento actual da estrutura, genética e biossíntese das imunoglobulinas. De alguns desses mielomas foram derivadas linhas celulares contínuas adaptadas ao crescimento em meio de cultura (Horibata e Harris, 1970). A linha celular MOPC-21 é uma delas. Deve-se frizar aqui que todas estas linhas celulares produzem anticorpos, como seria de esperar pelo mecanismo atrás exposto de transformação neoplásica. No entanto, a frequência com que surgem nestas linhas celulares variantes genéticas em que se dá a perda da síntese de cadeias de imunoglobulinas, particularmente da cadeia pesada, é relativamente alta (Cotton *et al.*, 1973). Khöler e Milstein, no seu trabalho, utilizaram no entanto uma linha celular produtora de IgG1,κ, seguramente porque esta se encontrava disponível no seu laboratório, onde já tinha sido usada com sucesso em experiências de hibridação somática com outras linhas celulares de mieloma, sem perda da capacidade de produção de imunoglobulinas (Cotton e Milstein, 1973). O inconveniente que daí advém é que apenas uma pequena percentagem das imunoglobulinas secretadas pelos híbridos obtidos corresponde à molécula oriunda da célula linfóide do baço com a especificidade desejada, pois a maior parte contém um número variável de cadeias pertencentes à estirpe de mieloma, tendo apenas um ou mesmo nenhum local de ligação com essa especificidade. A utilização de linhas celulares de mieloma com um tal inconveniente não teve, compreensivelmente, grande seguimento. No entanto, todas as que se encontram actualmente em uso são derivadas do mieloma MOPC-21 empregue por Köhler e Milstein (figura II-1).

A primeira linha celular de uso corrente a ser estabelecida foi o clone P3-NS1-Ag4-1, ou simplesmente NS1 (Köhler *et al.*, 1976), produtora de cadeias κ que degrada internamente. No entanto, os híbridos realizados com esta linha celular incorporam-nas nas imunoglobulinas secretadas, de modo que 25% resultam completamente inactivas e 50%

possui apenas um local de ligação, o que constituiu de qualquer modo um progresso. As linhas celulares murinas de mieloma actualmente em uso geral são linhas não produtoras, sendo as mais populares as linhas X63-Ag8.653 (Kearney *et al.*, 1979) e Sp2/0-Ag-14 (Shulman *et al.*, 1978), geralmente designadas apenas como "653" e "Sp2/0". São linhas celulares pouco fastidiosas e de crescimento rápido, para além de hibridarem eficientemente.

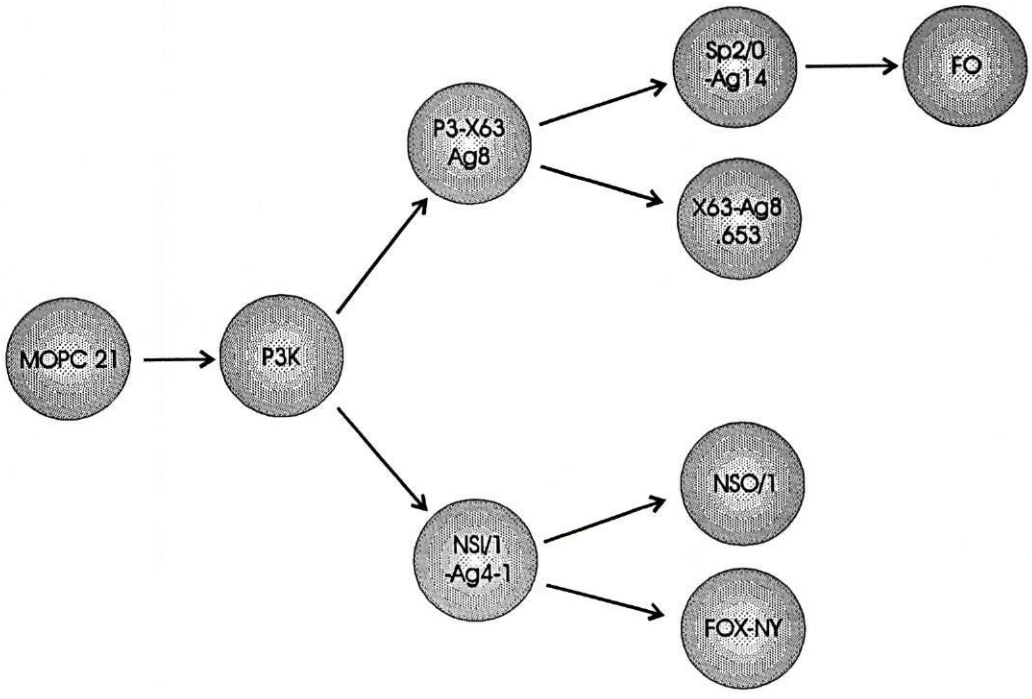


Figura II-1 Linhagem das linhas celulares murinas de uso corrente para a produção de hibridomas.

A existência de linhas celulares apropriadas condicionou a preferência pela produção de anticorpos monoclonais murinos, apesar de se ter conseguido algum sucesso na geração de hetero-híbridos rato-murganho e homem-murganho (Schlom *et al.*, 1980; Nowinski *et al.*, 1980; Lane *et al.*, 1982). O recurso pouco frequente à utilização de hetero-híbridos tem uma explicação simples: por um lado, pela maior instabilidade genética desses híbridos, que leva a uma mais frequente perda da síntese de imunoglobulinas pelos clones estabelecidos, e por outro lado, pelo facto de que não é possível fazê-los crescer como tumores ascíticos quer em murganhos BALB/c, quer na espécie do animal imunizado, por não haver histocompatibilidade possível. A indução de tumores ascíticos era há alguns anos, e ainda é em muitos laboratórios, o método de escolha para a obtenção rápida de anticorpos monoclonais à escala de alguns miligramas.

Existem também linhas celulares de mieloma de rato apropriadas para hibridação, que têm sido empregues para gerar anticorpos monoclonais. As mais conhecidas são estirpes derivadas da linha Y3-Ag 1.2.3 (Galfrè *et al.*, 1979), e a linha IR983F (Bazin, 1982). A

sua utilização é considerada mais difícil pela generalidade dos investigadores, e os híbridos obtidos mais difíceis de estabelecer e manter, pelo que a produção de anticorpos monoclonais de rato não teve tão larga difusão. Um dos maiores usos que encontrou foi a produção de anticorpos monoclonais contra antigénios de murganho.

Algumas publicações relatam o uso de linhas celulares humanas para a produção de anticorpos monoclonais humanos, tal como a SK-007 (Olsson e Kaplan, 1980), a ARH-77 (Edwards *et al.*, 1982), a GM1500 (Croce *et al.*, 1980), e outras (Kozbor *et al.*, 1984), sendo a única verdadeira estirpe de mieloma a primeira. As outras são aparentemente linhas linfoblastóides transformadas pelo vírus de Epstein-Barr, apesar de terem sido isoladas de doentes com mieloma, e têm consequentemente uma produção constitutiva de imunoglobulinas de muito baixo nível. De qualquer modo, e apesar do evidente interesse que anticorpos monoclonais humanos certamente têm, em particular para administração sistémica como potenciais agentes terapêuticos ou de diagnóstico, a sua geração por métodos clássicos parece-nos pouco prática, sendo provavelmente difícil obter voluntários dispostos a doar o baço para o efeito após regime de imunização apropriado! Os casos publicados recorreram geralmente a linfócitos circulantes de dadores com doenças autoimunes ou neoplásicas. Uma alternativa são as técnicas de imunização *in vitro*, mas estas raramente dão bons resultados, produzindo essencialmente anticorpos monoclonais de classe IgM e baixa afinidade. O melhor caminho a seguir se se pretende obter um anticorpo monoclonal "humano" é provavelmente o recurso a técnicas de genética molecular, que referiremos mais adiante.

Hibridação somática

O segundo desenvolvimento necessário à estratégia de Köhler e Milstein foi o de técnicas eficientes de hibridação somática. A fusão celular é um fenómeno que pode ocorrer espontaneamente (Barski *et al.*, 1960). Algumas estirpes víricas catalizam esse fenómeno, que provavelmente favorece a sua propagação dentro do hospedeiro sem se exporem a um meio extracelular desfavorável. Essa particularidade foi aproveitada para desenvolver métodos de hibridação celular mediada pelo virus Sendai (Okada, 1962). O virus Sendai foi suplantado posteriormente pelo polietilenoglicol em altas concentrações (Pontecorvo, 1975), e em alguns laboratórios bem equipados, por processos de electroporação (Lo *et al.*, 1984), método que dá excelentes resultados, sendo no entanto a fusão mediada pelo polietilenoglicol perfeitamente adequada na generalidade dos casos.

Quando se dá a fusão da membrana citoplasmática de duas ou mais células, formam-se elementos multinucleados designados heterocários. Na divisão celular seguinte, os núcleos fundem-se, repartindo-se os cromossomas mais ou menos equitativamente entre as duas células resultantes. Estas células híbridas são genéticamente instáveis, perdendo gradualmente cromossomas. Nos hetero-híbridos, há perda preferencialmente dos cromossomas de uma das espécies. Essa fenómeno tem sido aproveitado para a determinação da localização cromossómica de numerosos genes (Ruddle, 1981). As

técnicas de hibridação somática deram de facto um grande impulso ao campo da citogenética experimental.

Um método de fusão celular eficaz é no entanto apenas metade do caminho percorrido. Em seguida, é necessário isolar os híbridos obtidos de um mar de células não fusionadas, ou fusionadas com células da mesma estirpe. Para isso, foram desenvolvidos métodos de selecção bioquímica, que permitem também manter uma pressão selectiva que favorece a sobrevivência de híbridos estáveis. O método mais comum, de aplicação quase universal para a obtenção de híbridos produtores de anticorpos monoclonais, é o desenvolvido por Littlefield (1964). Este método baseia-se no facto de que quando o processo de biossíntese *de novo* das purinas é bloqueado por antagonistas do ácido fólico, como o metotrexato ou a aminopterina, as células dependem para a síntese dos nucleotídeos correspondentes, sem os quais não podem sobreviver, de uma via metabólica alternativa de recuperação de purinas derivadas do catabolismo, onde é essencial o enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferase (HGPRT). Este enzima converte a hipoxantina em inosina monofosfato (percursor de AMP e GMP) e a guanina em GMP. Linhas celulares em que a HGPRT esteja activa sobrevivem em meio de cultura com concentrações elevadas de aminopterina, desde que suplementado com hipoxantina e timidina (meio HAT). A timidina é necessária porque os inibidores do ácido fólico também bloqueiam a síntese *de novo* da dTMP, para a síntese da qual é necessária nestas condições a recuperação da timidina por intermédio da timidina cinase. Um meio selectivo alternativo ao meio HAT, bastante difundido, é o meio AH (Foung *et al.*, 1982). O meio AH contém azaserina, um análogo da glutamina que bloqueia a síntese das purinas num passo mais inicial que a aminopterina, e que ao contrário desta não inibe a síntese de dTMP. Sendo menos tóxico, tem sido usado com vantagem para a geração de hibridomas, em particular de linhagem tímica.

A obtenção de linhas celulares deficientes em HGPRT, incapazes de proliferar em meio HAT, é relativamente fácil, mediante o uso de análogos tóxicos da guanina como a 6-tioguanina ou a 8-azaguanina, que utilizam este enzima como via de entrada para a sua incorporação nos ácidos nucleicos. À medida que se submete a linha celular a concentrações crescentes destes análogos, vão surgindo clones em que a HGPRT foi inactivada, o que é relativamente fácil visto o gene correspondente se localizar no cromossoma X, só existindo uma cópia activa por célula.

Quando se hibridiza uma linha celular contínua $HGPRT^-$ com células normais, os híbridos resultantes adquirem da primeira a capacidade de divisão por tempo indefinido, e das segundas o gene da HGPRT que lhes permite sobreviver em meio HAT. Nestas condições, as células híbridas são as únicas que sobrevivem para lá das 2 ou 3 semanas de crescimento. Todas as linhas celulares de mieloma utilizadas para a produção de anticorpos monoclonais são $HGPRT^-$.

Os anticorpos produzidos por estas linhas celulares híbridas, às quais foi atribuída a designação de "hibridomas" devido à sua capacidade tumorigénica quando inoculadas em

murganhos de estirpe apropriada, designam-se por anticorpos monoclonais, porque as linhas celulares de hibridomas são reclonadas até à obtenção de um único clone celular estável.

Propriedades e usos dos anticorpos monoclonais

A identidade funcional existente entre as moléculas de imunoglobulina segregadas por um hibridoma, conferem aos "anti-soros" assim obtidos algumas particularidades:

- ► Possuem uma especificidade mais estrita do que é usual obter-se com anti-soros convencionais, em regra para um único epítopo do antigéneo alvo, sendo por vezes possível distinguir proteínas diferindo num único resíduo de aminoácido, em pequenas modificações pós-translacionais, ou apenas na conformação.

- ► A partir de uma pequena quantidade de antigénio inicial, que não necessita sequer de ser purificado, obtém-se uma linha celular que produz o anticorpo desejado em qualquer quantidade, sem variação significativa de lote para lote, e por tempo indeterminado.

- ► Possuem uma afinidade bem definida, e não há contaminação por imunoglobulinas com outras especifidades, propriedades particularmente úteis para as técnicas de imunoafinidade.

Talvez o melhor exemplo do impacto que os anticorpos monoclonais tiveram em toda a biologia seja a sua aplicação na definição de antigénios da superfície celular. Dentro desta categoria muito geral, encontram-se antigénios linfocitários que definem subgrupos funcionais, antigénios próprios de estádios de diferenciação, antigénios tumorais, receptores endócrinos, antigénios de histocompatibilidade, etc. Existem numerosos anticorpos monoclonais dirigidos para os antigénios de qualquer destas categorias, muitos deles de importância central no diagnóstico médico, por exemplo na definição da linhagem de neoplasias linfóides, em testes de gravidez, ou na determinação dos antigénios de histocompatibilidade. Antes da existência de anticorpos monoclonais, já se tinham utilizado anti-soros convencionais para definir subpopulações linfocitárias, utilizando como imunogénio, por exemplo, linfócitos circulantes (Koshiba *et al.*, 1977; Evans *et al.*, 1977) ou tecido encefálico (Huntley *et al.*, 1977). Estes anti-soros, no entanto, possuíam essencialmente especificidade para antigénios comuns a todas as células (HLA, grupos sanguíneos, etc.) pelo que tinham de ser submetidos a múltiplos e complicados processos de absorção antes de serem utilizados, ao fim dos quais o seu título se encontrava consideravelmente reduzido, e continham substâncias que interferiam nos estudos funcionais. Em comparação, por imunização com os mesmos antigénios obtêm-se facilmente, dependendo do processo de triagem inicial, anticorpos monoclonais absolutamente monoespecíficos, sem limitações de quantidade.

Por fim, o facto de se dispôr da linha celular produtora do anticorpo monoclonal permite a manipulação da molécula muito para além do que seria possível com anti-soros

convencionais. É possível, por exemplo, obter-se anticorpos biespecíficos, igualmente por recurso à hibridação somática (Milstein e Cuello, 1983, 1984), anticorpos catalíticos (Tramontano *et al.*, 1986; Pollack *et al.*, 1986; Napper *et al.*, 1987), e mais recentemente, mediante técnicas que refletem os avanços registados no campo da genética molecular, é possível manipular a molécula de um anticorpo de forma só limitada pela imaginação, tendo sido descritos anticorpos quiméricos (Morrison *et al.*, 1984; Boulianne *et al.*, 1984; Neuberger *et al.*, 1984, 1985), anticorpos humanizados (Jones *et al.*, 1986), anticorpos com funções efectoras inteiramente novas (Schnee *et al.*, 1987), etc. É igualmente possível transferir a produção de anticorpos para outras linhas celulares, por exemplo de levedura (Horwitz *et al.*, 1988), com possíveis vantagens económicas, e está até a ser encarada a produção de anticorpos monoclonais em plantas transgénicas (Hiatt *et al.*, 1989; Holzmann, 1994).

Breves considerações práticas

O percurso habitual do desenvolvimento de novos anticorpos monoclonais está esquematizado na figura II-2. É, como se nota, um processo complexo, ao ponto de se poder considerar a produção de anti-soros convencionais, com recurso unicamente a um antigénio, um coelho e uma seringa, um progresso tecnológico! (Goding, 1986, p. 281). Em consequência, a primeira questão que se põe logo de início, em cada projecto individual, é se compensará o investimento em esforço e material necessário para a obtenção de um anticorpo monoclonal.

Há situações em que a extrema monoespecificidade de um anticorpo monoclonal não só não é necessária, mas poderá mesmo ser prejudicial. É o que acontece frequentemente quando se pretende utilizar o anticorpo como sonda para um antigénio que poderá estar desnaturado ou alterado, por exemplo num sistema de tradução *in vitro*, em que a proteína expressa pode não estar glicosilada, reter o péptido sinal, ou simplesmente não apresentar a sua conformação normal, com o resultado de que o epítopo reconhecido por um determinado anticorpo monoclonal poderá não estar presente. Por razões semelhantes, um anticorpo monoclonal é provavelmente uma má escolha para selecção de genes clonados em vectores de expressão bacterianos, uma vez que a proteína correspondente é geralmente expressa como um péptido de fusão, incorrectamente conformado e não glicosilado.

Outra situação em que raramente se podem utilizar anticorpos monoclonais é para ensaios de imunoprecipitação, porque a ausência de múltiplos locais de ligação no antigénio impede a formação de agregados multiméricos insolúveis.

Dito isto, nas restantes situações, de que já se realçou a obtenção de sondas com elevada especificidade e a cromatografia de afinidade, pode ser uma vantagem ou mesmo uma necessidade o desenvolvimento de anticorpos monoclonais.

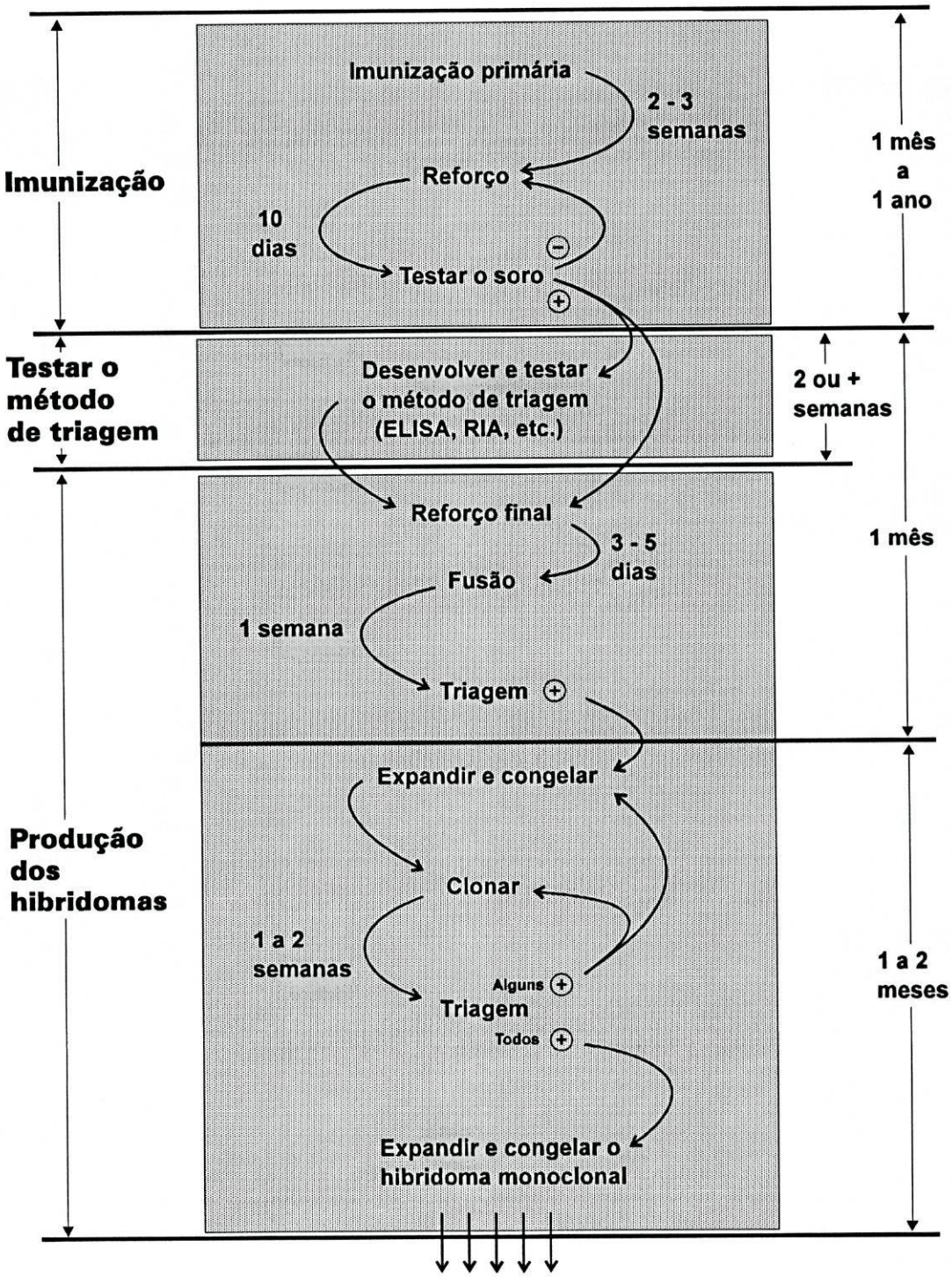


Figura II-2 Desenvolvimento de anticorpos monoclonais (adaptado de Harlow e Lane, 1988).

O resultado do processo de desenvolvimento de anticorpos monoclonais está dependente em grande parte das decisões que se tomarem em relação à escolha do imunogénio e ao método de triagem.

Em primeira aproximação, pode-se considerar que o painel de hibridomas obtidos de uma fusão são representativos do leque de resposta do sistema imune do animal utilizado ao

estímulo antigénico, pelo que essa resposta deve ser manipulada de modo a alcançar-se o objectivo proposto. Assim, pode ser necessário variar a estirpe do animal imunizado, caso não se consiga uma resposta adequada, pois a resposta imunológica a um determinado antigénio também pode depender de factores genéticos. No entanto, é geralmente mais importante a escolha do imunogénio.

O imunogénio, ou seja, a substância utilizada para a imunização, é nos casos mais simples a forma nativa do antigénio para o qual se pretende um anticorpo, mas há numerosas situações em que se terá de recorrer a compostos mais elaborados. Uma situação frequente é a necessidade de conjugação com uma proteína transportadora capaz de fornecer as sequências necessárias a uma resposta T, frequentemente inadequada, por exemplo quando o antigénio é uma pequena molécula (hapteno). Outro exemplo particular é o do desenvolvimento de anticorpos catalíticos, em que se recorre a compostos de síntese análogos dos estados de transição (instáveis) característicos da reacção que se pretende catalizar. De aplicação mais geral é a utilização de péptidos sintéticos. A imunização com péptidos sintéticos teve um grande impacto nas técnicas de desenvolvimento de anti-soros, policlonais ou monoclonais, desde que foi demonstrado que estes anti-soros eram frequentemente reactivos com proteínas nativas contendo sequências homólogas (Niman *et al.*, 1983). Os epítopos lineares assim definidos, não correspondem em geral aos obtidos por imunização directa com essas proteínas, visto estes serem quase sempre regiões da superfície da molécula que abrangem segmentos descontínuos da sequência de aminoácidos (Van Regenmortel, 1987). Talvez em consequência disso, os anti-soros obtidos por imunização com péptidos sintéticos raramente têm uma afinidade elevada para a proteína nativa. Por outro lado, apresentam algumas vantagens: O epítopo tem à partida uma localização bem definida, e podem-se obter anti-soros dirigidos para regiões de uma molécula que por imunização convencional se revelaram como não imunogénicas (Owen, 1983). O seu uso permitiu dissecar as sequências de um imunogénio nativo responsáveis pela estimulação dos linfócitos T, os chamados epítopos T. Estes podem ser incorporados em imunogénios sintéticos, dispensando o uso de proteínas transportadoras, uma abordagem que tem sido particularmente utilizada para o desenvolvimento de vacinas sintéticas. Uma variante interessante que também dispensa a utilização de uma proteína transportadora é o uso de péptidos poliméricos ramificados (Posnett *et al.*, 1988; Tam 1988), que geralmente se comportam como excelentes imunogénios.

Perspectivas

Presentemente, assiste-se a uma revitalização deste campo da imunoquímica pela aplicação de técnicas de DNA recombinante (ver por exemplo o elucidativo artigo de revisão de Winter e Milstein, 1991). Estas têm tirado vantagem da compartimentalização das moléculas de anticorpo em domínios morfo-funcionais distintos, sendo possível isolar e permutar entre anticorpos as funções de ligação e efectoras. É possível, por exemplo, a obtenção de anticorpos monoclonais ditos "quiméricos", introduzindo as regiões variáveis

de um anticorpo murino com a especificidade desejada no local correspondente dos genes de anticorpos humanos, com posterior transfecção desse "construct" numa linha de mieloma murina (Morrison *et al.*, 1984). Mais difícil, mas também exequível, é a obtenção de anticorpos monoclonais "humanizados", em que apenas as regiões hipervariáveis, determinantes da complementaridade antigénica, são introduzidas na molécula de imunoglobulina humana (Jones *et al.*, 1986). Esta operação implica em geral pequenas adaptações nas zonas de ligação, com substituição de aminoácidos, que têm de ser modeladas matematicamente e ensaiadas.

Uma variante destas novas técnicas, de garantida expansão no futuro imediato, são os chamados anticorpos fágicos, em que as regiões variáveis das imunoglobulinas são expressas à superfície de um fago filamentoso como proteínas de fusão (McCafferty *et al.*, 1990). Foi demonstrada a sua utilidade em muitas das aplicações correntes dos anticorpos monoclonais, por exemplo em "Western blots" e para a imuno-histoquímica. A facilidade com que se conseguem construir bancos de fagos em que estão representados repertórios completos de regiões variáveis, e com que estes se podem seleccionar para a especificidade pretendida (Nissim *et al.*, 1994), faz antever a possibilidade, inclusivamente, de se desenvolverem "anticorpos" sem sequer se recorrer ao processo de imunização natural.

Capítulo III

Desenvolvimento de anticorpos monoclonais anti-TTR

Para evitar repetições desnecessárias ao longo dos capítulos seguintes, exporemos aqui a estratégia e métodos utilizados para o desenvolvimento e caracterização dos anticorpos monoclonais anti-TTR empregues nos diferentes estudos. Para o desenvolvimento dos métodos recorreu-se fundamentalmente a dois artigos de revisão de Goding (1980) e de Fazekas de St. Groth e Scheidegger (1980), e mais tarde ao excelente tratado de Goding (1986) sobre a produção e uso de anticorpos monoclonais, assim como ao manual sobre anticorpos de Harlow e Lane (1988). Grande parte da fundamentação que se segue dos métodos utilizados, foi daí retirada.

Introdução

Possuíndo o murganho TTR, e sendo a imunização contra determinantes antigénicos próprios inibida pelos mecanismos de tolerância que defendem o organismo da auto-imunidade, parece-nos útil analisar as diferenças entre a TTR humana e de murganho, para se identificarem as zonas da molécula potencialmente imunogénicas. A TTR de murganho não foi objecto de análise cristalográfica, mas a estrutura primária, deduzida da sequência do cDNA respectivo, é suficientemente informativa para se estabeler uma comparação com a TTR humana (Wakasugi *et al.*, 1985). A figura III-1 mostra-nos as sequências das duas TTR , estando também indicadas as folhas β, a α-hélice, os resíduos localizados no interior da molécula e os que delimitam o canal central.

Existem 25 resíduos diferentes entre as duas espécies no monómero de TTR, mas apenas um deles, na posição 73, se situa no interior da molécula, encontrando-se os restante 24 expostos à superfície. Não há qualquer diferença nos resíduos que constituem o canal central ou nos que participam nas interações entre subunidades. Pode-se pois inferir que não existem diferenças substanciais de conformação da TTR entre as duas espécies.

A maior diferença constatada é na extremidade da cadeia B e no segmento BC, em que 6 dos 7 resíduos (34 - 40) se encontram substituídos. O segmento BC, que forma uma crista proeminente na face externa, é um excelente candidato a determinante antigénico, possuindo também dois resíduos polares (aspartatos). Entre os segmentos BC de cada dímero existe uma profunda depressão revestida por resíduos hidrofílicos, pertencentes às cadeias β B, E e F e ao segmento EF. Quatro desses resíduos encontram-se substituídos (31, 70, 90, 92) mas a concavidade dessa região não nos faz prever para eles, à partida, uma participação importante na imunogenicidade da TTR. As restantes diferenças

encontram-se agrupadas num dos rebordos do monómero, distribuídas pelos segmentos "desordenados" inicial (3, 5) e final (123, 126, 127), e pelos segmentos DE (61, 63) e FG (102, 104). É provável que esta zona seja imunogénica. A única outra zona a considerar é o segmento AB junto à cadeia B (26, 27). Embora as diferenças sejam pequenas, pode ter especial interesse para nós, pela proximidade da posição 30.

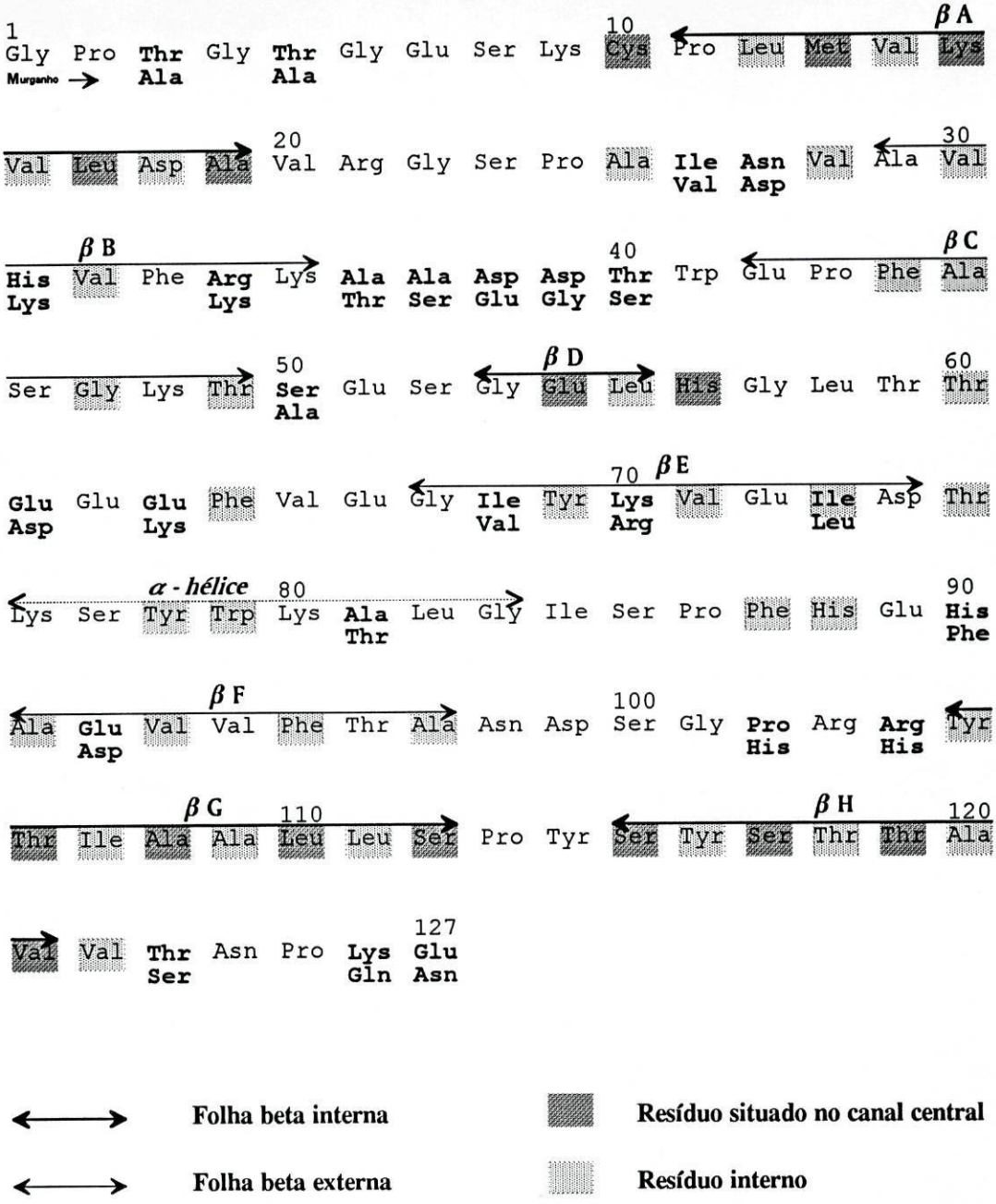


Figura III-1 Comparação da estrutura primária da TTR humana e de murganho.

As diferenças restantes correspondem a substituições de resíduos hidrofóbicos por outros do mesmo carácter, em zonas geralmente bem conservadas (50, 68, 73, 81) não sendo provável uma contribuição significativa para a imunogenicidade da molécula. Os anticorpos

monoclonais desenvolvidos por Collins *et al.* (1986) reconhecem aparentemente dois epítopos diferentes, ambos situados na região 35-103, resultado concordante com estas especulações.

Hibridomas

Imunização

Tendo sido o nosso objectivo inicial a obtenção de um anticorpo monoclonal específico para a TTR Met 30, ou seja, com maior afinidade para esta do que para a TTR nativa, procuramos desde o início utilizar para as hibridações baços de murganhos imunizados com material em que esta variante estivesse presente.

Quatro das sete hibridações efectuadas utilizaram murganhos imunizados com material obtido de doentes paramiloidóticos: em duas utilizou-se proteína amilóide extraída de material de autópsia, que sabemos conter não só monómeros intactos mas também fragmentos resultantes de clivagem na zona compreendida entre os resíduos 46 e 52. Noutras duas empregou-se TTR purificada a partir do soro de portadores heterozigotos (contendo cerca de 40% de TTR Met 30).

Não sendo de prever que a substituição Val 30 → Met desse lugar a modificações extensas da conformação da TTR em locais afastados da molécula, como de resto se veio a verificar mais tarde nos estudos cristalográficos por difracção de Raios X (Hamilton *et al.*, 1993; Terry *et al.*, 1993), e considerando-se improvável que a zona onde se situa o resíduo 30 da TTR fosse naturalmente imunogénica, complementou-se a imunização tradicional com o recurso à imunização com péptidos sintéticos, utilizando-se em duas hibridações murganhos imunizados com um heptapéptido e numa outra com um tripéptido.

Para a primeira hibridação (85.1), efectuada em Estocolmo no laboratório do Dr. V. Peter Collins, durante o nosso estágio de aprendizagem das técnicas de produção de anticorpos monoclonais, assim como para a hibridação 88.3, utilizamos como imunogénio proteína amilóide (ATTR), obtida por filtração em gel Sephadex G-100 de fibras extraídas de rins de doentes PAF, após dissolução em guanidina-HCl 6M, DTT 1%, Tris-HCl 0,1M, pH 10,2 (Costa *et al.*, 1978), sendo a fracção purificada dialisada contra água destilada e liofilizada. Para as inoculações foi feita uma suspensão de AF_P a 1 mg/ml em PBS, sonicada antes de cada utilização.

Para as hibridações 87.2 e 88.6 foi empregue TTR do soro de um doente paramiloidótico, purificada por cromatografia de troca aniónica e filtração em gel Sephadex, segundo métodos publicados (Saraiva *et al.*, 1985).

Para as hibridações 88.1, 88.2 e 88.5, recorreu-se ao uso de péptidos sintéticos. Foram utilizados dois péptidos sintéticos diferentes, fornecidos pela Cambridge Research

Biochemicals: Um heptapéptido com uma cisteína na primeira posição e as seis seguintes correspondendo à sequência de aminoácidos 28 - 33 da TTR Met 30 (Cys-Val-Ala--Met-His-Val-Phe), e um tripéptido correspondendo aos resíduos 29 - 31, precedidos por uma cisteína situada na extremidade de uma molécula espaçadora de ácido ε-aminocapróico (Cys-εACA-Ala-Met-His). A função destes resíduos de cisteína é fornecer um grupo reactivo -SH convenientemente localizado, de modo a permitir a conjugação destes péptidos com uma molécula transportadora, por ligação covalente mediada por um reagente heterobifuncional. Esta conjugação é indispensável pelo facto destes péptidos serem demasiado curtos para serem naturalmente imunogénicos, funcionando antes como haptenos. Ambos os péptidos foram conjugados com hemocianina (KLH), e o tripéptido com albumina bovina (BSA), por intermédio do ester n-maleimidobenzoil--N-hidroxi-succinimida (MBS) (Green *et al.*, 1982). Foi utilizado o protocolo incluído no "kit" de reagentes de conjugação (Cambridge Research Biochemicals). Os conjugados com KLH foram empregues como imunogénios, e o conjugado tripéptido-BSA para revestir as placas de microtitulação empregues na triagem por ELISA dos hibridomas obtidos.

Em todas as inoculações foram utilizados grupos de cinco murganhos fêmea com cerca de um mês de idade. A uma primeira inoculação, subcutânea, de 100 a 200 μl de uma emulsão em partes iguais da suspensão de antigénio com adjuvante de Freund completo, seguiram-se mais duas ou três feitas com cerca de 4 semanas de intervalo, intraperitonealmente, em adjuvante de Freund incompleto, após colheita de sangue do plexo venoso retrobulbar para avaliação do grau de imunização por ensaio imunoenzimático (ver adiante). O murganho com maior título foi sujeito a uma última inoculação intraperitoneal sem adjuvante, três ou quatro dias após a qual foi sacrificado e a hibridação executada.

Hibridação

A linha celular de mieloma empregue nas hibridações foi a SP2/0Ag14, excepto na 87.2, em que se empregou a linha X63Ag8.653. Uma ampola da reserva armazenada em azoto líquido foi descongelada 7 a 10 dias antes da data da fusão, e as células de mieloma expandidas em frascos de cultura até se obterem $>10^7$ células (2 ou 3 frascos de 150 cm^2). O meio de cultura utilizado foi o RPMI 1640, ou uma mistura IMEM/F12 (1:1), suplementado com 10% de soro de bovino fetal (FCS) e gentamicina.

No dia da fusão o murganho foi sacrificado, retirando-se-lhe a maior quantidade de sangue possível, e o baço recolhido assepticamente. Os esplenócitos foram suspensos em meio de cultura por esmagamento do baço.

O protocolo de fusão utilizado foi basicamente o de Galfrè e Milstein (1981), com modificações (Lane, 1985). As células de mieloma e os esplenócitos foram suspensas em meio sem soro num tubo de fundo cónico de 50 ml, e centrifugadas 5 minutos a 400g. O sobrenadante foi retirado e o sedimento descompactado com algumas pancadas secas. Com uma pipeta de 2 ml, 1 a 2 ml da solução de polietilenoglicol (PEG 4000, 30 a 40% em

meio de cultura sem soro, com 10% de DMSO) foram adicionados lentamente e misturados com as células. Com uma segunda pipeta adicionou-se lentamente (em cerca de 3 minutos) 10 ml de meio de cultura sem soro, pré-aquecido a 37 °C. Preencheu-se o tubo com o mesmo meio e centrifugou-se 5 minutos a 400g. Resuspenderam-se as células em meio de cultura contendo aminopterina, hipoxantina e timidina (meio HAT) e distribuíram-se por oito placas de cultura de 96 poços, 100 μl por poço. As placas permaneceram na incubadora (37 °C, 7% CO_2) durante cinco dias sem serem mexidas, ao fim dos quais se adicionaram mais 100 μl de meio HAT por poço. A partir do oitavo dia observaram-se os primeiros sinais de crescimento dos hibridomas, mudando-se então os sobrenadantes regularmente, de modo a manter o pH do meio (em geral de 2 em 2 dias).

Triagem

Quando os clones eram visíveis a olho nú, 8 a 12 dias após a fusão, iniciou-se o processo de selecção. A triagem dos clones produtores fez-se por ensaio imunoenzimático de tipo ELISA (Engvall e Perlmann, 1972), com sistema de detecção de avidina-biotina (Kendall *et al.*, 1983), utilizando-se como fase sólida placas de microtitulação de polistireno revestidas com o antigéneo, 0,1 mg/ml em carbonato de sódio 50 mM, 100 μl/poço, preparadas de véspera e armazenadas a 4°C. Exceptuou-se o heptapéptido, empregue não conjugado, que foi seco sobre as placas num liofilizador (1 μg/poço). Entre todos os passos seguintes as placas foram lavadas com tampão TBS-T (TRIS 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7.5, Tween 20 0.5%): As placas foram bloqueadas com BSA a 5% em TBS-T durante 30 minutos, seguindo-se a incubação com os sobrenadantes das culturas (100 μl/poço) de um dia para o outro a 4 °C. Seguiram-se as incubações de 60 minutos cada com anticorpo biotinilado anti-Ig de murganho (Amersham), 1/400 em TBS-T com 1% de BSA, e com complexos de avidina peroxidase biotinilada (Amersham) 1/600, no mesmo tampão. Por fim encheram-se os poços com 200 μl da solução cromogénica (tampão citrato/fosfato 50 mM, pH 4,7, H_2O_2 0,01%, 2,2'-azinobis[3-etilbenzo-tiazolino-6-sulfonato] (ABTS) 0,1%), e registou-se o resultado após 30 minutos, por inspecção visual ou por leitura a 405 nm.

Na última hibridação (88.6), substituiu-se o anticorpo biotinilado anti-Ig por anticorpo biotinilado anti-IgG, para se restringir os clones seleccionados a produtores de IgG, por se ter considerado que o número excessivo de clones IgM obtidos nas hibridações anteriores acarretavam uma sobrecarga de trabalho desproporcional à utilidade demonstrada, para além de as IgM serem difíceis de purificar e de não serem adequadas para algumas aplicações, em particular para a construção de imunoadsorventes.

As triagens utilizaram em geral como antigénio o imunogénio, excepto para a hibridação 88.5, em que se utilizou TTR_{FAP}, pois o número de clones positivos, mesmo para o heptapéptido, era superior a 200.

Reclonagem

Os clones positivos seleccionados foram seguidamente reclonados por diluição limite, também em placas de 96 poços, cujos sobrenadantes foram retestados por ELISA. Foram seleccionados subclones positivos, sendo o processo repetido até que a totalidade dos clones presentes fossem positivos, de modo a garantir uma elevada probabilidade de monoclonalidade. Os clones finais foram então expandidos para placas de 24 poços e finalmente para frascos de 25 cm^2, altura em que foram congelados em meio com 45 % de FCS e 10% de DMSO, e armazenados em azoto líquido.

Durante o processo de clonagem e expansão, a pressão selectiva foi abandonada, sendo às três semanas o meio HAT substituído por meio HT (sem aminopterina). Este foi por sua vez substituído, às seis semanas, ou eventualmente mais tarde, por meio não suplementado.

Anticorpos monoclonais

Produção e purificação

Para a produção de anticorpos monoclonais à escala laboratorial (~100 mg), os hibridomas correspondentes foram expandidos para frascos de cultura de dimensões sucessivamente maiores (25 → 75 → 150, e por vezes frascos de cultura Nunc "doubbletray"). Esta expansão fez-se em meio de cultura com 10% FCS, quando os sobrenadantes eram para utilização directa. Quando se pretendia purificar os anticorpos monoclonais, os hibridomas foram primeiro adaptados ao crescimento em meio definido, sem FCS, por diminuição gradual da percentagem deste, e posteriormente expandidos. Foram utilizadas duas versões de meio sem soro: RPMI 1640 suplementado com insulina (5 mg/l), transferrina (5 mg/l), etanolamina (20 μM) e selenito (20 nM) (meio ITES, Murakami *et al.*, 1982), ou IMEM/F12 suplementado com insulina e transferrina (Cleveland *et al.*, 1983).

A purificação dos anticorpos a partir dos sobrenadantes (de meio sem soro) fez-se por cromatografia de troca catiónica em "batch", com gel SP-Trisacryl M (IBF) equilibrado com tampão de citrato de sódio 0,17 M, após diluição do sobrenadante 1:2 com H_2O e ajuste a pH 4.0 com ácido cítrico (Carlsson *et al.*, 1985). A eluição fez-se com tampão Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 8,0. Adicionalmente, ou em alternativa, os anticorpos monoclonais de classe IgG foram purificados por afinidade em colunas de proteína G de 1 ml (HiTrap Protein G, Pharmacia): A captura realizou-se a 0,5 ml/minuto a partir de sobrenadante filtrado a 0,45 μm, ou outra solução de anticorpo monoclonal dializada contra TBS, sendo a coluna lavada com TBS e eluída com ácido acético 10 mM. Quando necessário, os anticorpos monoclonais de classe IgM foram purificados por cromatografia de filtração em gel de agarose (Bio-gel AcA 22, Bio-Rad).

A produção e purificação do anticorpo monoclonal 88.6.BA9 para a construção dos imunofiltros empregues no ensaio terapêutico por imunodepuração obedece a requisitos próprios, pelo que se encontram detalhadas no capítulo correspondente.

Caracterização

A subclasse de cada anticorpo monoclonal foi determinada por ELISA realizado do mesmo modo que para o processo de selecção, excepto que o anticorpo biotinilado foi substituido por outro com especificidade para a subclasse a testar.

A reactividade com TTR normal e Met 30 foi igualmente determinada por ELISA, utilizando para revestir a placa de microtitulação uma solução a 0,1 mg/ml em Na_2CO_3 50mM. Para a proteína amilóide empregou-se uma solução de ATTR a 0,2 mg/ml em guanidina 6M, de que se distribuíram 5 μl por poço, sendo então a ATTR precipitada por adição de 50 μl de H_2O.

Uma primeira abordagem para a determinação dos epítopos reconhecidos pelos anticorpos monoclonais foi realizada recorrendo ao padrão de reactividade com os fragmentos resultantes de digestão tríptica, determinação efectuada para as duas primeiras hibridações, e ao padrão de reacção com o produto de clivagem pelo brometo de cianogéneo, da TTR normal e Met 30. Foi igualmente pesquisada a reactividade com alguns péptidos sintéticos homólogos a segmentos da TTR normal e Met 30.

A tripsina é uma endopeptidase com uma especificidade para as ligações Lys-X e Arg-X, que por digestão completa da TTR dá origem a 13 fragmentos. A nomenclatura dos péptidos, T_1 a T_{13}, foi derivada da sequência de aminoácidos da TTR (figura I-2). Produtos de digestão incompleta, correspondendo a vários desses fragmentos concatenados, denotaram-se $T_{x+y+...}$.

Os fragmentos de digestão tríptica foram gentilmente cedidos pela Profª Maria João Saraiva, que para o efeito isolou TTR a partir de soro por um método para pequenas quantidades (Saraiva *et al.*, 1985), obtendo cerca de 1,5 mg. Após digestão por 90 minutos com 0,1 μg de tripsina tratada com TPCK, em tampão NH_4HCO_3 1M, pH 8,4, os fragmentos trípticos foram separados por cromatografia de fase reversa num sistema de alta pressão (RP-HPLC), em coluna C_{18} (Saraiva *et al.*, 1984). As fracções contendo os péptidos T_1, T_2, T_3, T_4 Met 30, T_{5+6}, T_6, T_7, T_{7+8}, T_{10} e $T_{11+12+13}$ foram liofilizadas em placas de microtitulação, e a reactividade dos anticorpos foi testada por ELISA pelo método atrás descrito para a triagem com heptapéptido.

Os péptidos sintéticos TTR(10 - 20), (24 - 35), (90 - 100), (105 - 115), (115 - 124), (119 - 127), e TTR Met 30 (24 - 35), gentilmente oferecidos pelo Prof. Per Westermark, foram suspensos em H_2O e testados pelo mesmo método que os péptidos de digestão tríptica.

O CNBr é um reagente que ataca os resíduos de metionina no enxofre, sofrendo o cianosulfónio resultante, em meio ácido, um rearranjo com eliminação de metiltiocianato e formação de lactona homosserina, reacção de que resulta a clivagem da ligação peptídica do lado do carboxilo (figura III-2). A acção do CNBr sobre a TTR normal dá origem a dois fragmentos, C_1 (resíduos 1-13) e C_2 (resíduos 14-127). A acção sobre a TTR Met 30 dá origem a novos fragmentos por clivagem de C_2, designados por C_a (resíduos 14-30) e C_b (resíduos 31-127). Por digestão incompleta forma-se o fragmento C_{1+a} (resíduos 1-30).

A reactividade com os fragmentos maiores de clivagem pelo CNBr, foi estudada num sistema de "immunoblotting" em escala semimicro, num processo em tudo semelhante ao usado no nosso laboratório para detectar os portadores da TTR Met 30. Sucintamente, TTR normal e Met 30 previamente purificadas, ou amostras de soro normal e de portadores parcialmente purificadas por cromatografia em colunas de Cibacrom Blue F3-GA imobilizado em gel de agarose (Sepharose azul), que removem a maior parte da albumina do soro, foram dialisadas contra água, liofilizadas, e seguidamente tratadas com CNBr em ácido fórmico a 70% por 18 horas. As amostras foram novamente dialisadas e liofilizadas, e submetidas a electroforese em gel de poliacrilamida segundo o sistema de tampão descontínuo de Laemmli (1970), após tratamento com mercaptoetanol e dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).

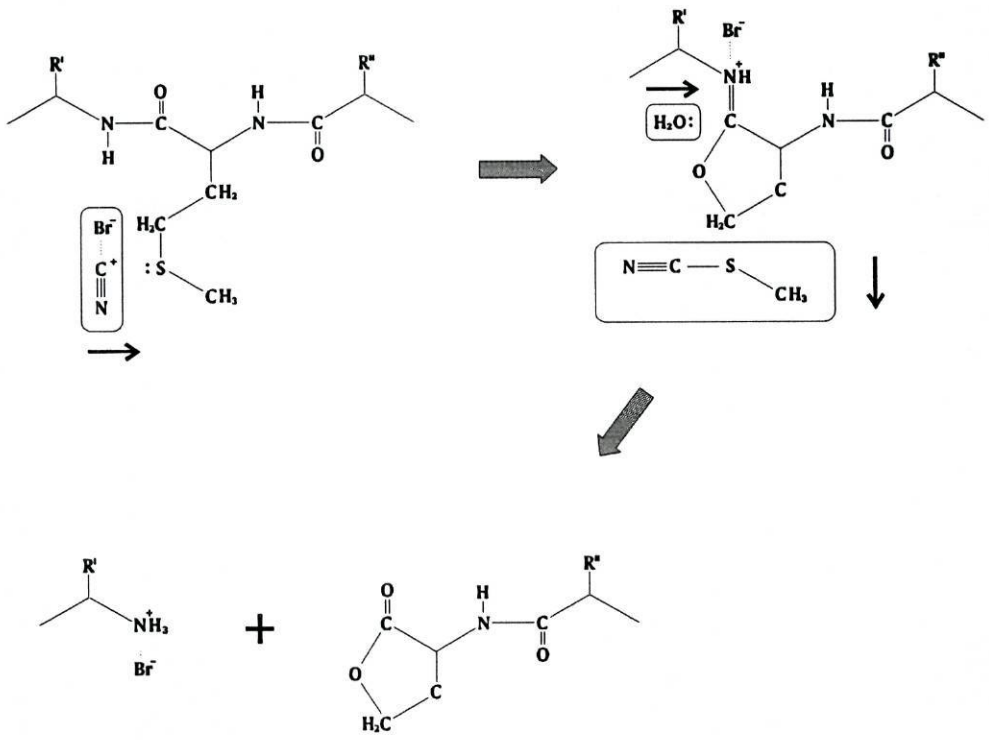


Figura III-2 Acção do CNBr sobre péptidos contendo resíduos de metionina.

Os péptidos separados foram então transferidas electroforeticamente para uma membrana de nitrocelulose com um poro de 0,45 μm (Towbin *et al.*, 1979). Esta foi "bloqueada" com TBS-T + 5% BSA, incubada com o anticorpo monoclonal a testar diluído 1:10 - 1:1000, e

seguidamente com os reagentes de detecção: anti-Ig de murganho biotinilada (Amersham) 1:400, por 30 minutos, complexos estreptavidina - peroxidase biotinilada (Amersham) 1:800, por 30 minutos, e o "blot" resultante revelado com uma solução cromogénica contendo diaminobenzidina e cobalto. Nestas condições podem-se discriminar o monómero intacto e os fragmentos C_2 e C_b, sendo os fragmentos restantes perdidos devido ao seu reduzido tamanho.

O padrão de reactividade imuno-histoquímica foi determinado em cortes de tecidos de doentes paramiloidóticos contendo depósitos de amilóide, e também em tecidos normais ricos em TTR (plexos coroideus ou pâncreas), fixados em formol ou Bouin, utilizando-se um sistema de detecção de avidina-biotina, cujo protocolo se encontra pormenorizado no capítulo V.

Resultados

Na tabela III-I encontram-se resumidas as sete hibridações até agora efectuadas, e alguns dados sobre os anticorpos monoclonais obtidos.

Ao examinar a tabela III-I, um dos factos que sobressai imediatamente é a grande preponderância de hibridomas produtores de IgM nas seis primeiras hibridações. Para este facto contribuem diversos factores. Quer a proteína amilóide, quer a TTR, são reconhecidamente maus imunogénios (Ram *et al.*, 1968; Costa *et al.*, 1978), sendo difícil a indução de uma imunização secundária vigorosa. A situação com os péptidos sintéticos é provavelmente semelhante. Os péptidos escolhidos, assaz curtos, correspondem a segmentos com uma sequência muito semelhante à homóloga murina, pelo que a resposta imune obtida foi seguramente dominada por epítopos próprios da proteína transportadora (KLH). Na hibridação 88.6, como se disse atrás, restringiu-se à partida a triagem a clones produtores de IgG, obtendo-se mesmo assim um número muito razoável de positivos. Um facto curioso, pela relativa raridade, é o de o anticorpo 85.1.BB6 pertencer à classe IgE, o que não impede que se utilizem com ele muitos anticorpos secundários com especificidade predominantemente anti-IgG, pois a reactividade cruzada, em parte devida às cadeias leves (de tipo κ), é suficientemente elevada.

A reactividade com fragmentos de digestão tríptica da TTR foi apenas ensaiada com os anticorpos das duas primeiras hibridações. O anticorpo monoclonal 85.1.CA12 é positivo com três fragmentos: T_1, T_{10} e $T_{11+12+13}$. Os únicos segmentos fisicamente próximos destes fragmentos, que além do mais apresentam diferenças significativas com as sequências correspondentes do murganho, são as caudas terminais e o segmento F-G. Em "immunoblot" este anticorpo reage com os fragmentos C_2 e C_b (figura III-5), sendo desde há vários anos o anticorpo empregue no protocolo de diagnóstico baseado neste método.

O anticorpo 85.1.BB6 foi negativo para todos os fragmentos de digestão tríptica. Este anticorpo é também negativo em "immunoblot" para o fragmento C_b, mas não para C_2, o que faz prever encontrar-se o epítopo correspondente na zona dos 30 primeiros resíduos do monómero de TTR. Este anticorpo tem também a particularidade de ser fracamente positivo, em ELISA, para a TTR nativa, sendo no entanto fortemente positivo para a proteína amilóide, o que talvez explique as excelentes colorações imuno-histoquímicas dos depósitos de amilóide que com ele se obtém, sob fundo muito limpo, a despeito da presença de TTR no fluído extracelular. A imuno-histoquímica é a sua grande aplicação.

Os anticorpos da hibridação 87.2 tem um padrão de reacção com fragmentos de digestão tríptica que se aproxima do observado para o 85.1.CA12, ainda que mais duvidosos pela intensidade da reacção de fundo, fundo este que, aliado ao fraco sinal obtido, tornou os resultados do estudo da reactividade com os fragmentos de clivagem pelo CNBr em "immunoblot" ininterpretáveis. Estes anticorpos não encontraram qualquer uso.

Tabela III-I. Hibridações efectuadas

Hibrid.	Antigénio	Nº de positivos[1]	MAB[2]	Subclasse	Reactividade[3] TTR	ATTR	Outros
85.1	ATTR	2	CA12	IgM	++	(+++)	C_2,C_b,T_1,T_{10},$T_{11+12+13}$
			BB6	IgE	+/-	(+++)	C_2
87.2	TTR_{FAP}	4	DF8	IgM	(+++)	+++	T_{10},$T_{11+12+13}$
			EC11	IgM	(+)	+	T_{10}
			BF11	IgM	(+)	+	T_{10}
88.1	7péptido	23	EC1	IgG1	-	-	
			FB9	IgG1	-	-	
			GE8	IgG1	+	+	
			FG12	IgG2a	+++	+++	
			BH2	IgM	+	+	
			GG6	IgM	+	+	
88.2	7péptido	20	FH2	IgG1	-	?	
			DG6	IgM	+++	?	
			EB1	IgM	+++	?	
			FD6	IgM	++	?	
88.3	ATTR	48	AA3	IgM	+++	(+++)	
			AB4	IgM	-	(+++)	
			BF6	IgM	+++	(+++)	
			DH10	IgM	+++	(+++)	
			EB5	IgM	+++	(+++)	
			EF11	IgM	+++	(+++)	
			FE12	IgM	+++	(+++)	
88.5	3péptido	46[4]	AD10	IgM	(+++)	?	(7péptido)
			AF12	IgM	(+++)	?	(7péptido)
			BE10	IgM	(+++)	?	(7péptido)
			BG11	IgM	(+++)	?	(7péptido)
			CE2	IgM	(+++)	?	(7péptido)
			DD8	IgM	(+++)	?	(7péptido)
			ED1	IgM	(+++)	?	(7péptido)
			EE6	IgM	(+++)	?	(7péptido)
			FD4	IgM	(+++)	?	(7péptido)
			FE9	IgM	(+++)	?	(7péptido)
88.6	TTR_{FAP}	12	AE4	IgG1	(+++)	+++	
			BA9	IgG1	(+++)	+++	C_2
			CD8	IgG1	(+++)	+++	
			DB2	IgG1	(+++)	+++	C_2
			EF12	IgG1	(+++)	+++	
			FD6	IgG1	(+++)	+++	C_2, C_b
			FE6	IgG1	(+++)	+++	

[1] Nº de clones positivos seleccionados na triagem inicial.

[2] Clones reclonados e caracterizados.

[3] Entre parêntesis quando se trata do antigénio empregue nas triagens.

[4] Seleccionados os clones positivos para TTR, de mais de 200 positivos para 7péptido.

Os anticorpos obtidos por imunização com péptidos sintéticos não foram ensaiados com vista à determinação do epítopo, pois este está definido à partida.

Os anticorpos da hibridação 88.3 foram abandonados logo após os primeiros ensaios contra soros normais e de portadores, e a determinação da classe de imunoglobulinas, não tendo demonstrado reactividade com a TTR em "immunoblot", nem com depósitos de amilóide em imuno-histoquímica.

Os anticorpos da hibridação 88.6 foram ensaiados em "immunoblot" com os fragmentos de clivagem da TTR pelo CNBr, sendo positivo para a cadeia intacta de TTR e para os fragmentos C_2 e C_1, o anticorpo FD6, e apenas para a TTR e para C_2 os anticorpos BA9 e FD6 (figura III-5). Este resultado tem de ser comentado, porque diverge, no que diz respeito ao anticorpo 88.6.FD6, daquele que foi por nós publicado (Costa *et al.*, 1993). Atribuímos esta discordância ao material empregue, que nas primeiras experiências foram amostras de soro parcialmente purificadas em colunas de Sepharose azul, só mais recentemente tendo esta experiência sido repetida com TTR purificada, com o resultado visível na figura III-5. É possível que a maior quantidade de TTR aplicada nestas condições tenha realçado uma positividade que não era aparente nas primeiras experiências.

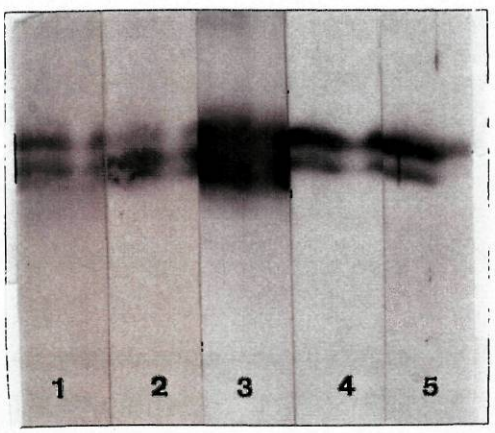


Figura III-5 "Immunoblot" de TTR isolada do soro de um doente paramiloidótico, após clivagem pelo CNBr, realizado com os anticorpos **1** - 85.1.BB6, **2** - 88.5.CA12, **3** - 88.6.FD6, **4** - 88.6.BA9 e **5** - 88.6.DB2.

Os ensaios em ELISA contra os péptidos sintéticos foram negativos com todos os anticorpos ensaiados, o que não é inesperado dado estes corresponderem a segmentos relativamente curtos, correspondentes a cadeias β.

Capítulo IV

Ensaio imunoenzimático com FD6

Introdução

O estudo dos fenómenos que se relacionam com a amiloidogénese tem sido prejudicado pela inexistência de uma sonda específica para a TTR-Met30, que permitisse a sua quantificação e localização tecidular, e eventualmente o seu isolamento. Devido à identidade de propriedades físico-químicas e funcionais desta variante e da TTR normal (Saraiva et al., 1983a) o reconhecimento da sua presença em qualquer tipo de amostra é difícil de efectuar sem recurso a métodos morosos e destrutivos, como o mapeamento de péptidos (Saraiva et al., 1984), "immunoblotting" após tratamento pelo brometo de cianogéneo (Saraiva et al., 1985) ou radioimunoensaio após digestão tríptica e tratamento pelo brometo de cianogéneo (Nakazato et al., 1984b), o único método quantitativo, mas que se revelou difícil de reproduzir fora do laboratório do seu autor. A separação cromatográfica da TTR normal e Met 30 só mais recentemente foi conseguida (Susuki et al., 1987), com alguma dificuldade. O uso de anti-soros convencionais, os quais haviam permitido a identificação da TTR como componente fundamental da substância amilóide (Costa et al., 1978), revelou-se ineficaz, pois nenhum dos que foram ensaiados até hoje distingue a TTR normal das suas variantes. Há no entanto uma comunicação do desenvolvimento de anticorpos monoclonais para a TTR de um doente paramiloidótico, judeu americano de origem polaca, provavelmente não Met 30 (Rosenthal *et al.*, 1986a), tendo um dos anticorpos monoclonais obtidos revelado, por radioimunoensaio, maior afinidade para a TTR deste doente.

Julgou-se por isso valer a pena tentar produzir anticorpos monoclonais que distinguissem a TTR normal da TTR Met30, apesar do facto do resíduo 30 da cadeia de aminoácidos da TTR se encontrar intercalado entre duas folhas pregueadas β. Este objectivo foi a causa motora de todo o programa de desenvolvimento de anticorpos monoclonais por nós empreendido.

Este projecto veio a revelar-se irrealizável. No entanto, um dos anticorpos monoclonais por nós obtidos, com a designação 88.6.FD6, que abreviaremos para FD6 (ver a tabela III-V no capítulo III), aproxima-se do objectivo inicialmente concebido, reconhecendo a TTR circulante dos portadores de numerosas variantes amiloidogénicas, em testes imunoenzimáticos com características particulares, por nós desenvolvidos, que descreveremos de seguida.

Materiais e Métodos

A produção de hibridomas foi detalhada no capítulo III, onde se encontram também as características gerais dos anticorpos monoclonais obtidos. Relembramos apenas que o FD6 é um anticorpo monoclonal de subclasse IgG1, obtido a partir de um murganho imunizado com TTR do soro de um portador heterozigoto para a variante Met 30.

Os soros utilizados para os ensaios comparativos iniciais, e para o refinamento posterior do ensaio imunoenzimático, foram escolhidos ao acaso de entre os existentes no arquivo do Centro de Estudos de Paramiloidose, já testados pelo método convencional ("immunoblotting" após clivagem pelo CNBr), escolhendo-se um número igual de soros positivos e negativos para a TTR Met 30. Foram quase sempre obtidos de colheitas de sangue efectuadas no próprio CEP, sem anticoagulante, e prontamente congelados a -20°C após separação.

O método imunoenzimático tal como se efectua neste momento deriva da triagem inicialmente realizada de todos os anticorpos monoclonais contra os soros atrás mencionados, em que se utilizou o mesmo protocolo de ELISA empregue nas reclonagens (ver capítulo III), com a simples substituição do antigénio aí empregue por um conjunto de soros positivos e negativos para a TTR Met 30. Esta triagem inicial revelou a capacidade do anticorpo monoclonal FD6 de distinguir os soros positivos e negativos, ainda que essa distinção não fosse sempre muito clara, sendo a densidade óptica de fundo muito elevada. Impunha-se pois tentar encontrar as condições que favorecessem uma melhor discriminação entre soros positivos e negativos. Diversas alterações foram testadas:

- Material da placa de ELISA empregue: testou-se a substituição das placas utilizadas, de polistireno (Nunc immunoplates, Maxisorp grade) por outras do mesmo fabricante com um tratamento de superfície diferente (Polysorp grade), e por placas de outro material (PETG, fabrico Costar). Ambas se revelaram inapropriadas, sendo o resultado completamente negativo.

- A variação do tempo (1 a 18 horas) e da temperatura (4 a 37°C) de incubação das placas com os soros não resultou em alterações significativas.

- O método de "bloqueio" dos locais de ligação das proteínas à placa, após o revestimento com os soros, mostrou ser um dos elementos mais críticos do método, tendo-se revelado o BSA utilizado na triagem inicial o principal factor responsável pelo elevado sinal de fundo. Tal pode ser devido a reactividade cruzada do FD6 com a albumina de bovino, ou com transtirretina contaminante da preparação de BSA utilizada (fracção V de Cohn). A substituição de BSA por gelatina de peixe dá uma densidade óptica de fundo muito menor, obtendo-se no entanto os melhores resultados quando o passo de bloqueio é eliminado. A presença de 0,05% Tween 20 no tampão de lavagem é suficiente para suprimir a adsorção inespecífica nos passos seguintes.

- Foram testadas diluições sucessivas do soro, de onde se retiraram alguns resultados interessantes, que se discutem mais adiante. A diluição em água ou TBS dá resultados muito semelhantes até cerca de 1:20. A diluição de 1:10 permite uma boa discriminação de soros positivos e negativos para a TTR Met 30.

- A utilização de TTR purificada, ou de amostras parcialmente purificadas por passagem em colunas de Sepharose azul, resulta na positividade de todas as amostras, normais ou Met 30.

- A diálise contra soro fisiológico atravéz de membranas com um limiar de exclusão de 10 kDa não altera o padrão de reactividade dos soros. A diálise contra H_2O, para além de provocar a precipitação de algumas proteínas séricas, torna positivas as amostras negativas. Estas, no entanto, tornam a negativar quando novamente dialisadas contra soro fisiológico.

- A utilização de placas revestidas por anticorpo policlonal anti-TTR, em lugar do revestimento directo pelos soros ("sandwich immunoassay"), resulta num sinal de fundo inaceitavelmente elevado, embora se mantenha uma diferença evidente entre os soros positivos e negativos.

- Por fim verificou-se que outros monoclonais da mesma hibridação empregues em substituição do FD6 davam variações de intensidade paralelas às obtidas com este, não se conseguindo no entanto o mesmo grau de discriminação.

O protocolo actual do ensaio imunoenzimático com FD6 resultou destas experiências. Utiliza placas de microtitulação de 96 poços, para ELISA, de tipo Maxisorp (Nunc). As amostras são sempre incluídas pelo menos em duplicado, assim como um controlo negativo (soro normal) e um positivo, constituído a partir do soro de um doente homozigótico, de que se estabeleceu uma reserva considerável em alíquotas congeladas, para permitir a padronização do ensaio. Todas as lavagens e diluições são efectuadas com TBS-T (tampão TRIS.HCl 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5, com 0,05% Tween 20). O protocolo é o seguinte:

1. Incubação das placas de microtitulação com os soros a testar diluídos 1:10 em soro fisiológico, 100 µl/poço, de um dia para o outro, a 4°C.

2. Três lavagens com TBS-T.

3. Incubação com FD6 (sobrenadante de cultura), 100 µl/poço, 60 minutos.

4. Três lavagens.

5. Incubação com anticorpo biotinilado anti-IgG de murganho (Amersham) 1:200, 100 µl/poço, 60 minutos.

6. Três lavagens.

7. Incubação com complexos estreptavidina - peroxidase biotinilada (Amersham) 1:400, 100 µl/poço, 30 minutos.

8. Cinco lavagens.

9. Incubação com solução de substrato cromogénico (tampão citrato/fosfato 100 mM, pH 4,7, mais 1% ABTS (2,2'-azinobis-3-etanotiazolino-sulfonato, SIGMA) e 0,01% H_2O_2), 200 µl/poço, 30 minutos.

10. Leitura das absorvâncias a 405 nm em leitor de placas de ELISA (Denley).

11. O valor final é calculado pela fórmula: $$\frac{1/n \sum^{n} Abs_{amostras} - 1/n \sum^{n} Abs_{contr\ominus s}}{1/n \sum^{n} Abs_{contr\oplus s}}$$

em que n é o número de réplicas de cada soro. Ou seja, após subtração do controlo negativo, os valores são normalizados em relação ao controlo positivo.

As particularidades do ensaio imunoenzimático levou-nos a realizar algumas experiências adicionais, para nos certificarmos de que o antigénio reconhecido estava de facto relacionado com a TTR:

Efectuou-se uma experiência de imunoprecipitação por difusão em gel de agarose a 1% em TBS (Ouchterlony, 1949), entre FD6 (sobrenadante de cultura) e um anti-soro policlonal anti-TTR (DAKO) 1:100, por um lado, e um soro normal e um soro Met 30 por outro, ambos diluídos 1:10 em TBS. Após incubação por 48 horas a 4°C, o gel foi lavado com TBS e H_2O, seco e corado pela prata (Kerenyi e Gallyas, 1972).

Amostras de soro negativas e positivas para o FD6 (300 µl) foram fraccionadas por filtração em coluna de 75×1,5 cm de gel Sephadex G-100, equilibrada com TBS, a uma velocidade de 2 cm/hora. Recolheram-se fracções de 1 ml, que foram testadas no ensaio imunoenzimático após mistura 1:1 com um soro normal diluído 1:4 com soro fisiológico, para reproduzir as mesmas condições de adsorção à placa do ensaio imunoenzimático realizado com soros. Para se identificar o pico de eluição da TTR, o mesmo ensaio imunoenzimático foi realizado com anticorpo policlonal anti-TTR (DAKO) 1:200, sendo as fracções adsorvidas directamente na placa de ELISA.

Pequenas colunas de imunoafinidade (2-5 ml) foram realizadas com FD6. Este foi imobilizado à concentração de 6 mg/(ml gel) em Sepharose CL-4B previamente activada pelo CNBr (Cuatrecasas et al., 1968; ver no capítulo VI), e de 2 mg/ml em Affi-Gel Hz (agarose derivatizada com hidrazida) após oxidação do anticorpo com $NaIO_4$, segundo os protocolos do fabricante (Bio-Rad). Amostras de soros normais e Met 30 foram passadas pelas colunas a cerca de 10-30 (ml/min)/(ml gel), e as proteínas adsorvidas eluídas com

NaSCN 3M pH 6,0 após lavagem com soro fisiológico. Após diálise do pico de eluição contra soro fisiológico para remover o NaSCN, as proteínas adsorvidas foram analisadas por electroforese em gel de acrilamida a 10 - 15%, em presença de SDS (SDS-PAGE), em sistema de tampão descontínuo (Laemmli, 1970), por visualização directa após coloração com azul de Comassie, ou após transferência electroforética para papel de nitrocelulose de 0,45 μm e "immunoblotting", com anticorpo policlonal anti-TTR ou FD6.

Resultados

O imunoensaio por FD6 foi testado numa primeira série de amostras onde estavam representados 94 soros normais, 89 soros TTR Met 30, e todas as amostras então disponíveis no CEP de soros de portadores de outras variantes, nomeadamente três soros Pro 36, um soro Gly 42, um soro Thr 45, um soro Arg 47, três soros Ala 47, seis soros Ala 49, três soros Leu 64, um dos quais de um homozigoto, um soro Leu 68, quatro soros Ala 71, um soro Tyr 77, um soro Gln 89, três soros Asn 90, um dos quais de um homozigoto, um soro Arg 102, um soro Val 107, um soro Met 111, dez soros Met 119 e dois soros Ile 122. Os resultados encontram-se na tabela IV-I.

Tabela IV-I. Variantes da TTR testadas em imuno-ensaio com FD6

Variante	Quadro clínico	Origem do soro	Imuno-ensaio
Met 30	Neuropatia t. I	P, E, I, S	0,77 ± 0,38 (S.D.)
Pro 36	Neuropatia t. I	I	0,36 0,21 0,30
Gly 42	Neuropatia t. I	I	0,13
Arg 47	Neuropatia t. I	J	0,15
Ala 47	Neuropatia t. I	I	0,04 0,09 1,22
Ala 49	Neuropatia t. I	I	0,20 0,26 0,27 0,28 0,59 0,73
Leu 64	Neuropatia t. II	I	0,39(?) 0,06 0,08
Ala 71	Neuropatia t. I	E	0,12 0,43 0,50 0,74
Tyr 77	Neuropatia t. I	USA	0,72
Gln 89	Neuropatia t. II	I	0,11
Val 107	Neuropatia t. II	F	0,40
Thr 45	Cardiomiopatia	USA (I)	0,09
Leu 68	Cardiomiopatia	D	0,01
Met 111	Cardiomiopatia	DK	0,02
Ile 122	Cardiomiopatia	USA	0,01 0,01
Asn 90	-	P	-
Arg 102	-	D	-
Met 119	-	P	-

(?) Homozigoto. Soro hemolisado.

Os resultados obtidos com soros de heterozigotos compostos Met 30/Asn 90 e Met 30/Met 119 são sobreponíveis aos dos soros Met 30. O soro de um heterozigoto composto Asn 90/Met 119 foi negativo. Também foram testados 6 soros de doentes com amiloidose senil sistémica, provenientes da clínica Mayo nos Estados Unidos, com resultados negativos.

A análise dos valores do ensaio mostrou uma excelente discriminação entre os soros normais e Met 30, tendo-se definido com base na sobreposição observada uma janela entre 0,05 e 0,15 em que o resultado do teste se considera indeterminado, sendo os valores superiores considerados positivos e os inferiores negativos. Nessa janela encontraram-se 2 soros normais e dois soros Met 30, o que corresponderia a uma sensibilidade do teste de cerca de 98% e a uma especificidade de 100%. Estes números têm-se confirmado nos imunoensaios posteriormente realizados (>400), não tendo até à data surgido discrepâncias entre os imunoensaios e o método de diagnóstico por "immunoblotting", com excepção de dois falsos positivos em amostras recolhidas fora do CEP, que posteriormente se averiguou terem sido armazenadas vários dias à temperatura ambiente. O resultado está representado graficamente na figura IV-1, pelos valores de todos os soros normais e Met 30, assim como os de todas as variantes com um valor positivo ou indeterminado.

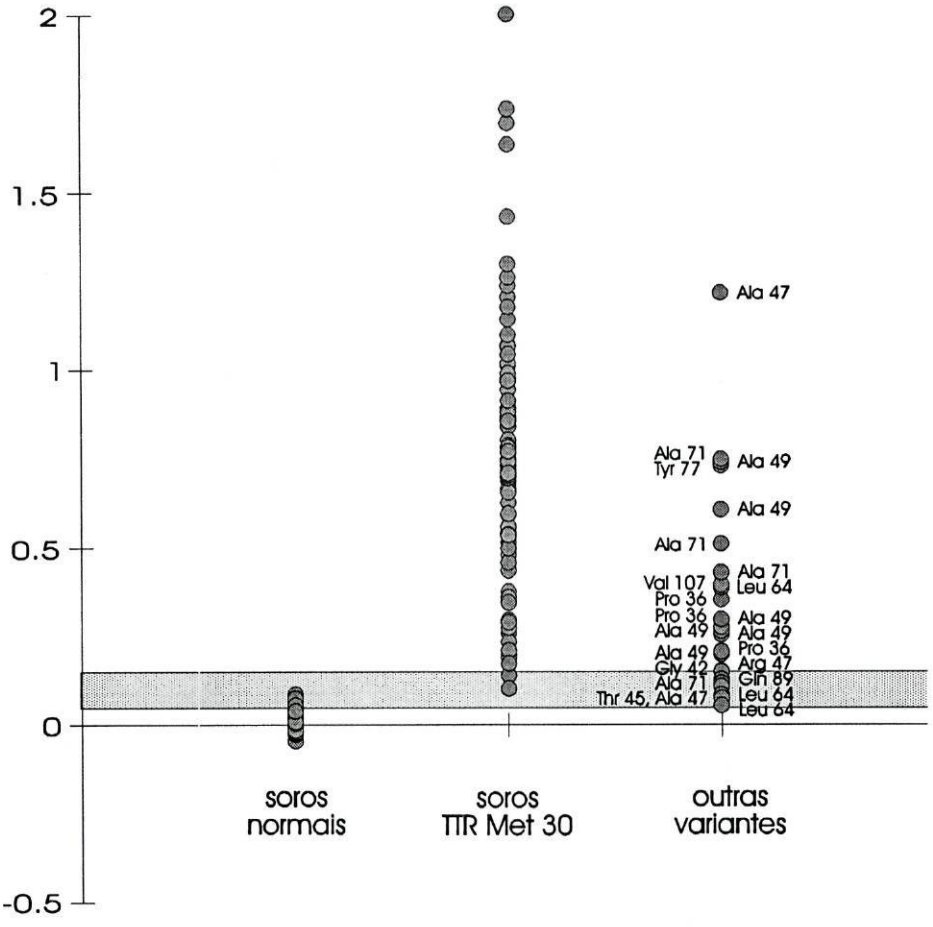


Figura IV-1 Representação gráfica dos resultados do imunoensaio com FD6 para 94 soros normais, 84 soros de portadores TTR Met 30, e de todos os soros não negativos de portadores de outras variantes. Barra sombreada: valores "borderline" (0,05 a 0,15).

O imunoensaio foi repetido com as mesmas amostras de soro TTR Met 30, mas com substituição do FD6 por anti-TTR policlonal (DAKO), com resultados completamente negativos.

Um dos aspectos deste imunoensaio que chama a atenção imediatamente é a grande dispersão dos valores positivos. Parece-nos razoável que haja uma correspondência entre estes e os valores de TTR Met 30 nas amostras, mas como não dispomos de um método quantitativo para a TTR Met 30 não nos foi possível avaliar essa hipótese. Um argumento a seu favor é a rápida negativação do teste logo após a realização de um transplante hepático, a única modalidade de tratamento que se oferece actualmente aos doentes paramiloidóticos, e que se fundamenta precisamente na remoção do órgão onde a quase totalidade da TTR Met 30 é produzida (figura IV-2).

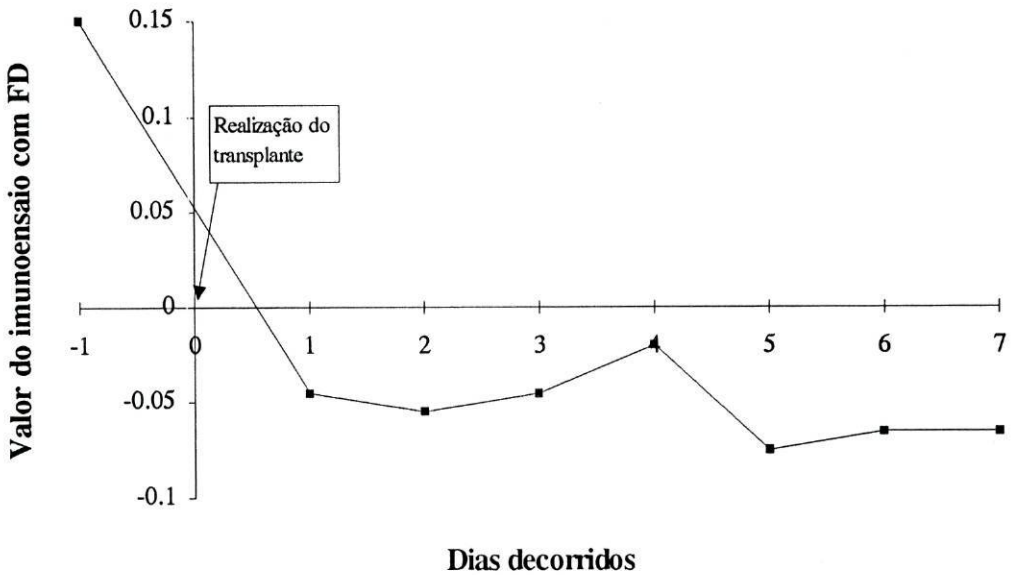


Figura IV-2 Evolução dos valores do imunoensaio com FD6 antes da intervenção e no pós-operatório em doente paramiloidótico ATTR Ala 71 submetido a transplantação hepática (adaptado de López Andreu *et al.*, 1993).

Não se demonstrou correlacão significativa dos valores deste imunoensaio nem com a idade nem com a fase de evolução da doença.

O efeito da diluição sobre o comportamento dos soros positivos e negativos merece consideração especial. Este foi estudado por diluição seriada dos soros quer em NaCl 0,9% (figura IV-3) quer em H_2O (figura IV-4).

Quando se diluem estes em soro fisiológico, observa-se uma diminuição gradual da positividade dos soros Met 30, enquanto os soros normais apresentam um ligeiro aumento de sinal quando diluídos a 1:512 - 1:1024. Essa positividade em diluição elevada também se observa com anticorpo policlonal anti-TTR, pelo que corresponde provavelmente a um aumento da adsorção de TTR na ausência de competição de outras proteínas plasmáticas.

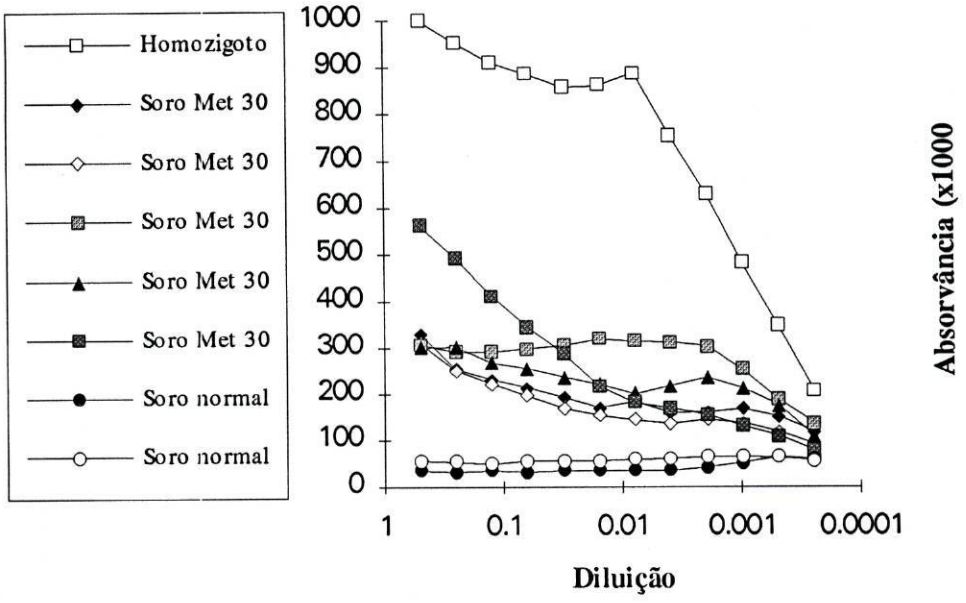


Figura IV-3 Efeito da diluição dos soros em NaCl 0,9% sobre o imunoensaio com FD6. Diluições seriadas a 1:2. Dois soros normais, cinco de heterozigotos TTR Met 30, e um de um homozigoto.

O mesmo efeito não é visível para os soros Met 30, seguramente mascarado pela positividade própria destes soros.

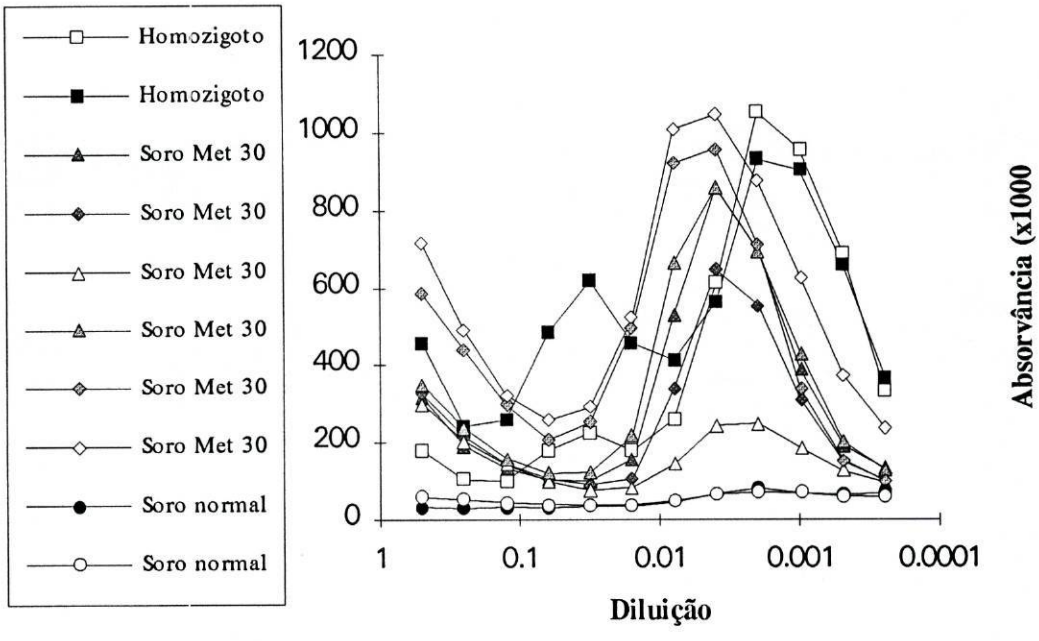


Figura IV-4 Efeito da diluição dos soros em H_2O sobre o imunoensaio com FD6. Diluições seriadas a 1:2. Dois soros normais, seis de heterozigotos TTR Met 30, e dois de duas colheitas do mesmo homozigoto.

A diluição seriada em H_2O apresenta resultados semelhantes para os soros normais, mas dramaticamente diferentes para os soros Met 30, comportando-se o soro do único

homozigoto de que temos amostras de maneira distinta dos soros de heterozigotos. Estes últimos, após uma descida inicial da positividade, têm um aumento abrupto desta, que resulta num pico cujo máximo se situa a uma diluição de 1:512. As duas colheitas de soro de um doente homozigoto que testamos têm um comportamento diferente, que se traduz na presença de dois picos distintos, a 1:64 e 1:1024.

A única explicação para estes resultados que nos parece plausível, é a de que o FD6 tenha uma particular afinidade por uma substância presente nos soros TTR Met 30, cujo comportamento durante a adsorção à superfície do polistireno Maxisorp seja diferente do da TTR normal. Essa substância tem aparentemente propriedades antigénicas diferentes da TTR normal, pois não é reconhecida pelos anticorpos policlonais anti-TTR por nós ensaiados. No entanto, alguns dados experimentais levam-nos a concluír uma relação próxima entre ela e a TTR:

- A imunoprecipitação por difusão em gel com FD6 (figura IV-5) mostra uma continuidade perfeita entre as linhas de precipitação com um soro e com TTR purificada, não se observando outras linhas de precipitação. A existência de imunoprecipitação revela também a existência de múltiplos locais de ligação do anticorpo para a TTR, consequência da sua natureza tetramérica.

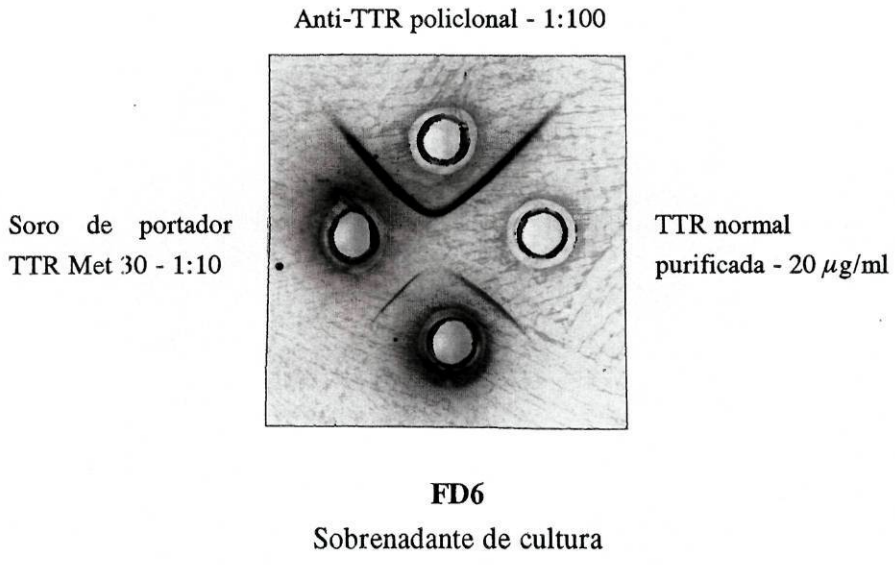


Figura IV-5 Imunoprecipitação por difusão em gel de agarose. Há uma continuidade perfeita entre as linhas de precipitação do soro e da TTR pelo anticorpo monoclonal FD6.

- Os picos de eluição obtidos com NaSCN 3M de colunas de afinidade realizadas com FD6, contendo 3 a 5 mg de proteína, foram analisados por SDS-PAGE corado com azul de Comassie, ou após "imunoblotting" com FD6, 85.1.CA12 e anti-TTR policlonal. Apesar de alguma dificuldade de interpretação devido à presença de múltiplas bandas que atribuímos a proteínas séricas adsorvidas inespecificamente, não é óbvia qualquer diferença entre os soros normais e Met 30.

► O teste em imunoensaio com FD6 de fracções de peso molecular diferente, obtidas por filtração em gel de um soro positivo (figura IV-6), revela positividade nas mesmas fracções onde se encontra a TTR. Esta experiência, em particular, exclui a hipótese de a substância em questão corresponder a polímeros ou pequenos fragmentos de TTR (monómeros, dímeros).

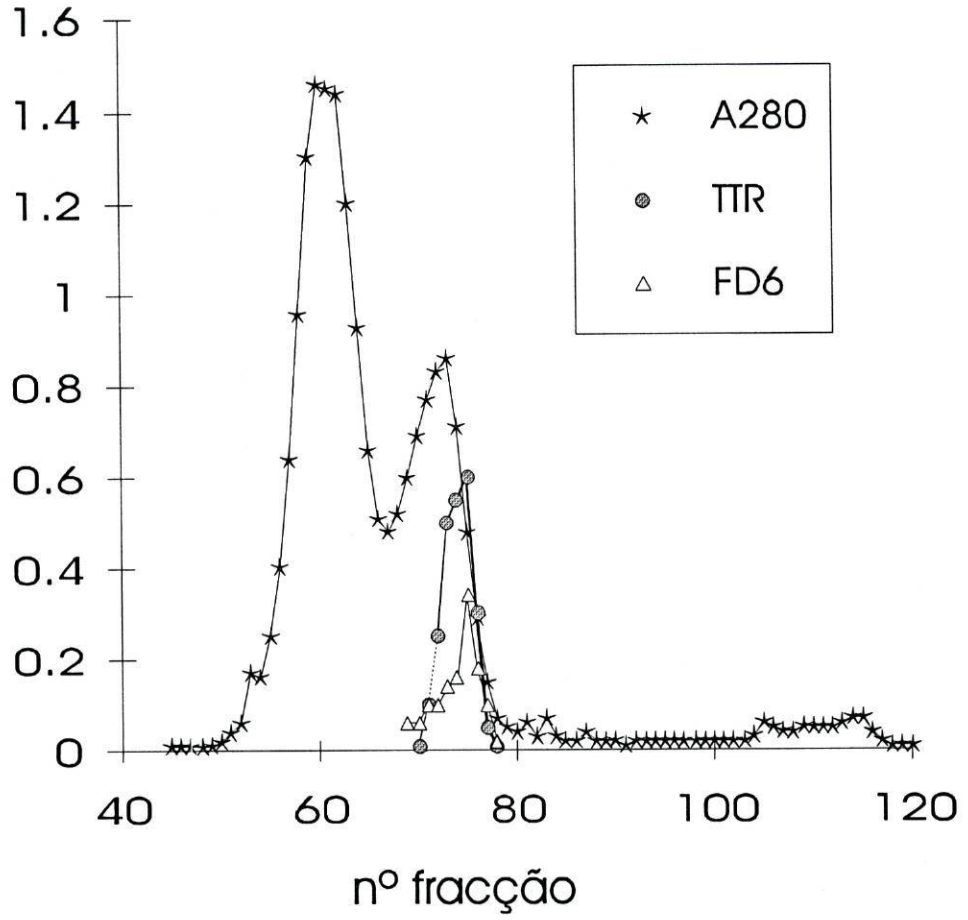


Figura IV-6 Imunoensaio com FD6 de um soro TTR Met 30 fraccionado por filtração em gel. Coluna Sephadex G-100 de 1,6 × 90 cm. Fluxo de 2 cm/hora. Amostra de 0,5 ml de soro. Colheram-se fracções de 1 ml, testadas por imunoensaio com FD6 após diluição em soro normal. **Legenda: A280** - Absorvância a 280 nm. **TTR** - Concentração total de TTR (unidades arbitrárias). **FD6** - Imunoensaio com FD6 (valores de absorvância a 280 nm não corrigidos).

► O facto de este teste ser positivo para diferentes mutações, de origem diversa, é contra a hipótese de se tratar de uma substância cuja presença dependa de um gene situado no mesmo alelo, que segrega-se juntamente com a TTR Met 30.

Resta-nos pois admitir que a substância positiva é a própria variante de TTR, no seu estado nativo ou eventualmente após alguma modificação ou mudança conformacional, talvez a mesma que é proposta por Kelly e Lansbury para o intermediário amiloidogénico (Kelly e Lansbury, 1994), que segundo estes investigadores surgiria por desestabilização do tetrâmero de TTR. Estes resultados poderão indicar que essa desestabilização se pode

realizar por redução da força iónica, e que a estabilidade do tetrâmero é diferente nos portadores heterozigotos e homozigotos. Alternativamente, é possível que a adsorção da TTR Met 30 ao polistireno seja afectada pela força iónica e pela concentração de outros componentes do soro.

A especificidade deste imunoensaio advém aparentemente de uma combinação de condições particulares de adsorção em que a TTR normal é impedida de se ligar ao suporte sólido por competição de outras proteínas do soro, em quantidade suficiente para dar um sinal positivo com o anticorpo monoclonal FD6, que tem uma baixa afinidade para a TTR, tendo no entanto afinidade elevada para uma forma particular da mesma molécula que se encontra no soro dos portadores de algumas variantes.

A importância da competição para a ligação ao suporte sólido entre a TTR e outras proteínas é no nosso entender corroborada pelos resultados que obtivémos quando submetemos a este imunoensaio alguns líquors provenientes do Serviço de Urgência de casos de suspeita de meningite não confirmada (figura IV-7).

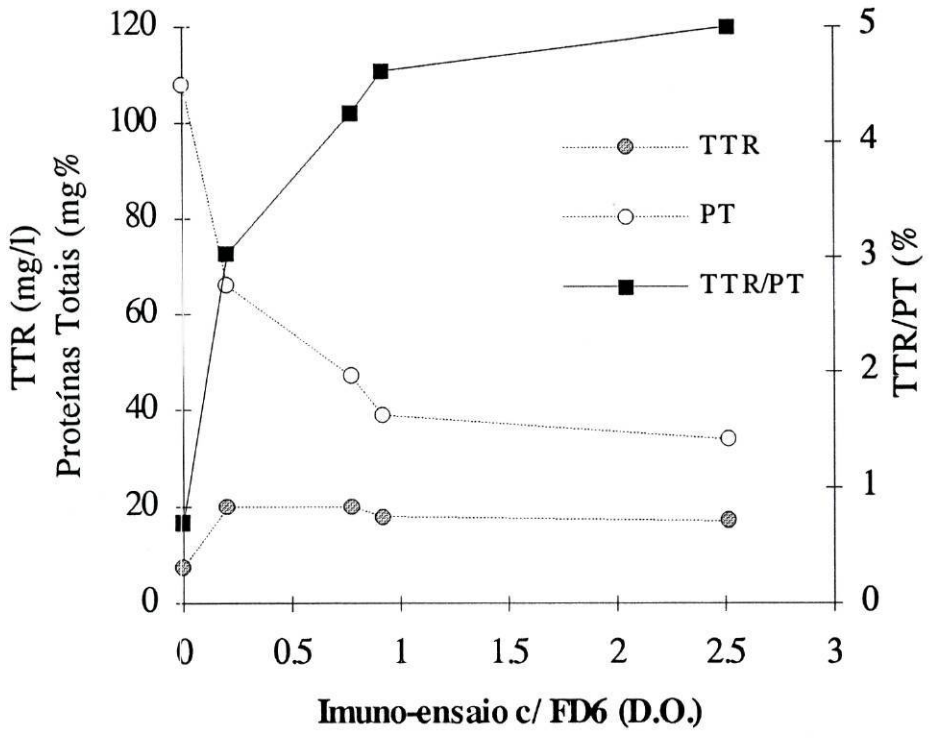


Figura IV-7 Imunoensaio com FD6 de líquido cefalorraquidiano. Correlação com os níveis de TTR e de proteínas totais (PT), e com a razão TTR/PT.

Os valores observados não têm relação óbvia com os níveis de TTR, tendo aparentemente maior relevância os níveis de proteínas totais ou a relação TTR/PT, como se poderia esperar pelo atrás exposto.

Conclusão

O anticorpo monoclonal 88.6.FD6 aparentemente revela, em condições particulares, a existência em circulação, nos portadores de certas variantes de TTR, de uma forma desta molécula com uma conformação especial, e possivelmente elevada afinidade para determinadas superfícies. Não é líquido que essa conformação exista no estado nativo, pois a adsorção de proteínas é capaz por si só de induzir importantes modificações conformacionais, com alteração das propriedades antigénicas que lhes são próprias (Friguet *et al.*, 1984), sendo no entanto essa hipótese a mais provável, a julgar pelo resultado dos ensaios por método de sanduíche, nos quais não se dá a adsorção ao plástico.

A hipótese de que as variantes de TTR amiloidogénicas são propensas a alterações conformacionais, que se acompanham pela modificação das suas propriedades antigénicas, particularmente após a deposição como fibras de amilóide, encontra apoio em resultados de outros laboratórios (Gustavsson *et al.*, 1994). Estes autores desenvolveram anti-soros contra péptidos correspondendo a múltiplas localizações da molécula de TTR, tendo demonstrado que o anti-soro para o péptido correspondendo aos resíduos 115-124, correspondendo essencialmente à cadeia β H, era positivo para ATTR e para fibras de TTR produzidas *in vitro*, sendo negativo para a TTR circulante. A elevada afinidade do FD6 para a ATTR, aparentemente superior à afinidade para a TTR circulante, tanto quanto se pode inferir do fraco sinal obtido por imuno-histoquímica nas células dos plexos coroideus em comparação com o que se observa nos depósitos de amilóide vizinhos, leva-nos a supor que o epítopo correspondente também se encontra exposto nas fibras de amilóide, tal como parece ser o caso para a cadeia β H. Uma determinação mais exacta do epítopo de FD6, que sabemos estar situado para lá da posição 30 (ver capítulo III), seria do maior interesse, sendo possível que se venha a demonstrar o envolvimento da mesma região da molécula.

Numa análise sumária dos resultados obtidos com as diferentes variantes de TTR testadas por imunoensaio, nota-se que em geral os resultados inequivocamente positivos são devidos a variantes associadas a quadros de neuropatia periférica de tipo I, ou seja, em que há depósitos de amilóide no endoneuro e nos gânglios nervosos. É pois possível que o epítopo exposto seja um dos factores responsáveis pela deposição selectiva da substância amilóide no sistema nervoso periférico, por exemplo por interacção com determinados componentes da matriz extracelular específicos desse território.

O valor do ensaio imunoenzimático com FD6 como instrumento de investigação clínica está já assegurado. É um dos pilares em que se baseia o diagnóstico de portadores de TTR Met 30 no Centro de Estudos de Paramiloidose, complementando a fragmentação pelo CNBr. Não é, por exemplo, afectado pela presença da variante Met 119, não patogénica, que pelo CNBr dá origem a um fragmento que se pode confundir com o da variante Met 30. Recebemos também frequentes solicitações de centros hospitalares de outros países para efectuar este ensaio em amostras de soro de indivíduos com quadros de neuropatia

amiloidótica, no sentido de se decidir se estará indicada a pesquisa imediata de uma possível variante amiloidogénica da TTR. A variante TTR Val 107 por nós testada, por exemplo, só posteriormente foi identificada como tal. Fazemos questão, no entanto, de notar que o fundamento deste método não está completamente esclarecido, sendo imprevisível o seu comportamento com variantes de TTR não testadas. É aconselhável nestes casos a confirmação, ou o recurso, a outros métodos de rastreio com uma base teórica mais segura, e com provas dadas nesta doença, como a focagem isoeléctrica híbrida, HIEF (Alves *et al.*, 1993), ou por análise de "single stranded conformational polymorphisms", SSCP (Torres *et al.*, 1994). Estes métodos complementam-se entre si, nenhum deles dando garantias de detecção de todas as variantes, conhecidas ou desconhecidas, só possível por sequenciação directa de todo o gene, abordagem muito trabalhosa, e difícil de justificar como método de rastreio.

Outro campo que tem sido explorado por recurso a este ensaio é o rastreio populacional, facilitado pela rapidez e baixo custo com que se podem realizar grandes séries de ensaios por este método. O maior até agora efectuado realizou-se no norte da Suécia, um dos locais de maior concentração de doentes paramiloidóticos com a variante TTR Met 30, em que foram testados cerca de 3000 soros de indivíduos pertencentes às regiões administrativas onde a doença tem maior prevalência (Holmgren *et al.*, 1994). Surpreendentemente, o número de portadores encontrados excede em muito o esperado pelo número de doentes conhecidos, apontando para uma baixa penetrância da doença na população sueca. É mais uma diferença da forma portuguesa, a juntar a outras já constatadas, que talvez explique a prontidão com que foi possível encontrar vários doentes homozigóticos no norte da Suécia, muito antes de se encontrar o único homozigoto conhecido na população portuguesa. Estudos de rastreio por imunoensaio com FD6 foram também efectuados no Japão, ainda sem resultados conhecidos.

Uma aplicação particular deste imunoensaio tem sido a confirmação do desaparecimento da variante de TTR da circulação em dontes tratados por transplantação hepática. Tem-nos sido pedido essa averiguação de diversos centros de transplantação nacionais e estrangeiros (Suécia, Espanha, França, Brasil), de que já apresentamos um exemplo, em que foram efectuadas múltiplas amostragens ao longo do tempo (figura IV.2).

Em conclusão, podemos afirmar que se não nos foi possível obter um anticorpo monoclonal específico para a TTR Met 30, nem por isso estes deixaram de se revelar de grande utilidade no estudo da Polineuropatia Amiloidótica Familiar.

Capítulo V

Imuno-histoquímica da proteína amilóide

Objectivos

Pretendeu-se, com a imuno-histoquímica, a sua confrontação com o método tradicional de coloração pelo vermelho do Congo, quer em sensibilidade quer em especificidade. Em particular, levantou-se a questão de saber se a imuno-histoquímica permitiria revelar a presença de depósitos de TTR não fibrilares, negativos para o vermelho do Congo.

Introdução

A utilização de anti-soros para a localização de um determinado antigénio em cortes histológicos, seguiu-se à demonstração de que era possível marcar anticorpos com sondas fluorescentes, sem perda das suas propriedades de ligação (Coons *et al.*, 1941, 1942; Coons, 1961). As técnicas de imunofluorescência tiveram uma enorme expansão a partir dos anos 60, após a introdução da marcação por isotiocianato de fluorosceína (FITC), um fluorocromo mais estável e de utilização simples (Riggs *et al.*, 1958), e posteriormente de marcadores enzimáticos (Nakane e Pierce, 1967ab), em particular da peroxidase de beterraba, que é ainda hoje o enzima mais utilizado nas técnicas imuno-histoquímicas. A marcação enzimática abriu imenso o campo de utilização destas técnicas, porque permite a sua utilização em microscopia óptica convencional, podendo ser empregue em qualquer laboratório de histologia ou histopatologia, de um modo análogo a qualquer outra técnica histoquímica. A utilização em microscopia óptica convencional contornou além do mais alguns dos problemas inerentes à imunofluorescência, como seja a grande dificuldade em identificar os elementos celulares marcados. Esta evolução técnica foi acompanhada por uma verdadeira explosão na disponibilidade de anti-soros para os mais variados antigénios, a que não foi estranha a introdução dos anticorpos monoclonais. A qualidade dos anti-soros existentes tambem tem melhorado substancialmente, sendo muitos deles aplicáveis em cortes histológicos fixados e processados de modo convencional. Um campo em que estas técnicas tiveram especial impacto foi a histopatologia, sendo difícil de conceber hoje em dia certos processos de diagnóstico histopatológico sem o apoio da imuno-histoquímica.

As técnicas originais de marcação directa foram em grande parte suplantadas por técnicas de marcação indirecta, de maior sensibilidade e conveniência, em que se utiliza o anti-soro sem qualquer modificação, detectando-se este em seguida com uma segunda sonda para ele dirigido. No caso mais simples esta sonda poderá ser um segundo anticorpo (anticorpo secundário), específico para as imunoglobulinas da espécie a que pertence o anticorpo primário, sendo o anticorpo secundário marcado por conjugação com um enzima. A

tendência actual é o recurso a uma das variações mais modernas, de maior sensibilidade, como seja a técnica PAP, que utiliza complexos de peroxidase com antiperoxidase (Sternberger *et al.*, 1970), ou então sistemas de detecção baseados na alta afinidade da avidina pela biotina, dos quais o mais usado utiliza um anticorpo secundário biotinilado, cuja presença é detectada com complexos pré-formados de avidina (ou estreptavidina) e peroxidase biotinilada (Hsu *et al.*, 1981). Ambos os sistemas dão bons resultados, existindo também em versões que utilizam a fosfatase alcalina, tendo talvez o segundo vantagem pela maior sensibilidade, que em imuno-histoquímica se traduz principalmente em maior economia de reagentes. Uma técnica menos usual em microscopia óptica, mas de grande utilização em microscopia electrónica, é a utilização de partículas de ouro coloidal como marcador (Faulk e Taylor, 1971; Romano *et al.*, 1974; Horisberger e Rosset, 1977). A sua utilização em microscopia óptica implica geralmente a utilização de métodos de intensificação pela prata (Holgate *et al.*, 1983), modificação que lhe confere uma das maiores sensibilidades conseguidas em técnicas de imuno-histoquímica.

A extensão destas técnicas à microscopia electrónica deparou com algumas dificuldades, devido à maior agressividade dos fixadores e materiais de inclusão empregues, que só em alguns casos permitem a manutenção da antigenicidade dos tecidos, e à dificuldade de penetração dos anticorpos no material incluído. Toda uma série de técnicas foi desenvolvida para contornar estes problemas, recorrendo a reagentes de solubilização do material de inclusão, a novos materiais de inclusão, e a técnicas de fixação especial, que mesmo assim não resolveram completamente o problema. Uma alternativa possível é a realização da imuno-histoquímica em fragmentos de tecido antes da inclusão, mas essa via não dá geralmente resultados consistentes, devido à irregularidade da penetração dos anticorpos nos fragmentos, para além de comprometer a manutenção dos detalhes ultra-estruturais. A imunomicroscopia electrónica necessitou também do desenvolvimento de marcadores electrodensos adequados. A peroxidase é moderadamente electrodensa, podendo ser empregue em microscopia electrónica, mas existem melhores alternativas. Outra proteína electrodensa que tem sido empregue como marcador é a ferritina (Singer, 1959; Marucci *et al.*, 1974). A alternativa a que no entanto se recorre hoje em dia, em geral, são as já mencionadas partículas de ouro coloidal, com diâmetros compreendidos entre 5 e 30 nm, empregues conjugadas com um anticorpo secundário, ou alternativamente com proteína A estafilocócica (Romano e Romano, 1977).

A imuno-histoquímica nas amiloidoses

A imuno-histoquímica tem sido empregue nas amiloidoses principalmente como instrumento de diagnóstico, aliás com bastante sucesso, tendo demonstrado grande superioridade em relação a métodos histoquímicos de aplicação limitada, como o teste do permanganato (Wright *et al.*, 1977). Métodos imunológicos foram empregues desde muito cedo na investigação das amiloidoses, complementando a caracterização bioquímica (Franklin e Pras, 1969; Husby e Natvig, 1972a), ou mesmo adiantando-se-lhe (Costa *et al.*,

1978). As proteínas amilóides envolvidas eram então desconhecidas, ou tinham apenas sido isoladas nos laboratórios onde se realizaram esses estudos, pelo que os anti-soros empregues foram produzidos pelos próprios investigadores, em geral a partir de preparações impuras obtidas de material de autópsia, que obrigavam a complicadas absorções com tecidos normais e com outros tipos de amilóide para se obter a especificidade desejada. As primeiras experiências de imunofluorescência realizadas com esses anti-soros, antes da individualização da amilóide AA, não tinham obviamente preocupações de diferenciação imuno-histoquímica (Cathcart *et al.*, 1971; Husby e Natvig, 1972b), mas propiciaram a sua aplicação posterior na diferenciação da amilóide AA e AL (Cornwell *et al.*, 1977), da amilóide senil cardíaca (ATTR), então de composição desconhecida (Cornwell *et al.*, 1978) e da ATTR na polineuropatia amiloidótica familiar (Benson, 1981; Dalakas e Engel, 1981). A imunofluorescência foi no entanto muito cedo abandonada em favor das técnicas imunoenzimáticas, pelas razões já apontadas, tendo-se realizado estudos com anti-soros anti-AA (Livni *et al.*, 1980; Shirahama *et al.*, 1981), anti-AA e anti-AL (Fujihara *et al.*, 1980; Linke e Nathrath, 1980), e anti-ATTR (Linke, 1982; Feurle *et al.*, 1984). Os anti-soros anti-AL revelaram-se os mais problemáticos, pela diversidade própria das cadeias leves das imunoglobulinas, não tendo sido possível a obtenção de um anti-soro que reconheça todos os tipos de proteína AL. Os melhores centros dispõem de uma bateria de anti-soros para os diversos subgrupos de cadeias leves, de modo a reduzir o número de falsos negativos. Os anti-soros comerciais anti-proteínas de Bence Jones raramente são positivos, porque reagem essencialmente com as regiões constantes C-terminais, ausente da maior parte das proteínas AL. Foram também desenvolvidos anticorpos monoclonais anti-AA (Linke, 1984; Yokota *et al.*, 1988) e anti-AF (Costa PMP *et al.*, 1988, presente trabalho), com bom desempenho em imuno-histoquímica. Existem actualmente anti-soros aplicáveis a todos os tipos de amilóide, quer dirigidos para o precursor, por exemplo anti-$\beta_2$microglobulina (Shirahama *et al.*, 1985), ou então obtidos por imunização com péptidos sintéticos, por exemplo anti-Aβ (Vinters *et al.*, 1988) ou anti-gelsolina 231-242 (Maury, 1991).

A imuno-histoquímica no diagnóstico diferencial da PAF

A PAF beneficiou pouco de técnicas de coloração especial desenvolvidas para o diagnóstico diferencial das amiloidoses, como o teste do permanganato, que permite distinguir as amiloidoses AA, sensíveis ao permanganato, das amiloidoses AL, quase sempre resistentes. Estas últimas são as que se poderiam eventualmente confundir com a PAF, clínica e histologicamente, mas infelizmente os depósitos de ATTR são igualmente resistentes ao permanganato. A imuno-histoquímica revelou-se em consequência de grande utilidade. A utilização de soros anti-TTR em revisões de séries de doentes amiloidóticos, levada a cabo na clínica Mayo, que concentra esse tipo de doentes, permitiu encontrar alguns doentes com polineuropatia ou cardiomiopatia amiloidótica familiar que se encontravam erradamente classificados como amiloidose de tipo AL (Cornwell *et al.*, 1988).

Utilização em imuno-histoquímica dos anticorpos monoclonais anti-TTR

No contexto atrás revisto, todos os anticorpos monoclonais obtidos por nós foram ensaiados em diferentes tecidos, contendo TTR ou com depósitos de amilóide, para avaliar a sua potencial utilidade em imuno-histoquímica, sendo os resultados comparados com os obtidos com soros policlonais anti-TTR. O painel de tecidos utilizados, constituído a partir de material existente no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Geral de Santo António, incluiu sempre plexos coroideus e fragmentos de pâncreas fixados em Bouin, com origem em necrópsias de indivíduos sem doença amiloidótica, e biópsias de nervo e fragmentos de rim fixados em formol, de doentes PAF. Estes tecidos foram processados de forma convencional, sendo realizados cortes histológicos de 6 μm após inclusão em parafina, que foram submetidos a coloração imuno-histoquímica com os anticorpos a testar, com um sistema de detecção de complexos de avidina-peroxidase biotinilada (Hsu *et al.*, 1981). O protocolo empregue, sinteticamente, foi o seguinte:

- tratam-se os cortes histológicos com H_2O_2/metanol ou ácido periódico para destruir as peroxidases endógenas.
- "bloqueio" do tecido com uma solução de 5% de BSA, 30 minutos.
- sobrenadante de cultura do anticorpo monoclonal a testar, 30 minutos.
- anticorpo secundário biotinilado anti-Ig de murganho (Amersham), 1:300, 30 minutos.
- complexos de estreptavidina-peroxidase biotinilada (Amersham), 1:400, 60 minutos.
- desenvolvimento de cor com diaminobenzidina (0,6 mg/ml) em TBS + H_2O_2 0,02%.

As incubações com anticorpos e com os complexos de estreptavidina-peroxidase biotinilada foram seguidas por lavagem em TBS, 2×5 minutos.

As preparações histológicas resultantes são contrastadas com hematoxilina (opcional), desidratadas, diafanizadas com xilol e montadas com lamela em Entellan (Merck).

O processo utilizado para a anti-TTR policlonal foi idêntico, excepto que o anticorpo primário utilizado foi anti-prealbumina (DAKO) 1:300, e o anticorpo secundário anti-Ig de coelho, biotinilado.

Poucos foram os anticorpos monoclonais que se revelaram úteis em imuno-histoquímica. Nenhum dos obtidos por imunização com péptidos sintéticos mostrou mais que uma fraca reacção com coloração de fundo intensa, o mesmo acontecendo com os anticorpos obtidos das hibridações 87.2 e 88.3 (ver tabela III-I). Os melhores resultados foram obtidos com os

anticorpos monoclonais 85.1.CA12 e BB6, particularmente este último, que cora muito satisfatoriamente os depósitos de amilóide ATTR (figura V-1).

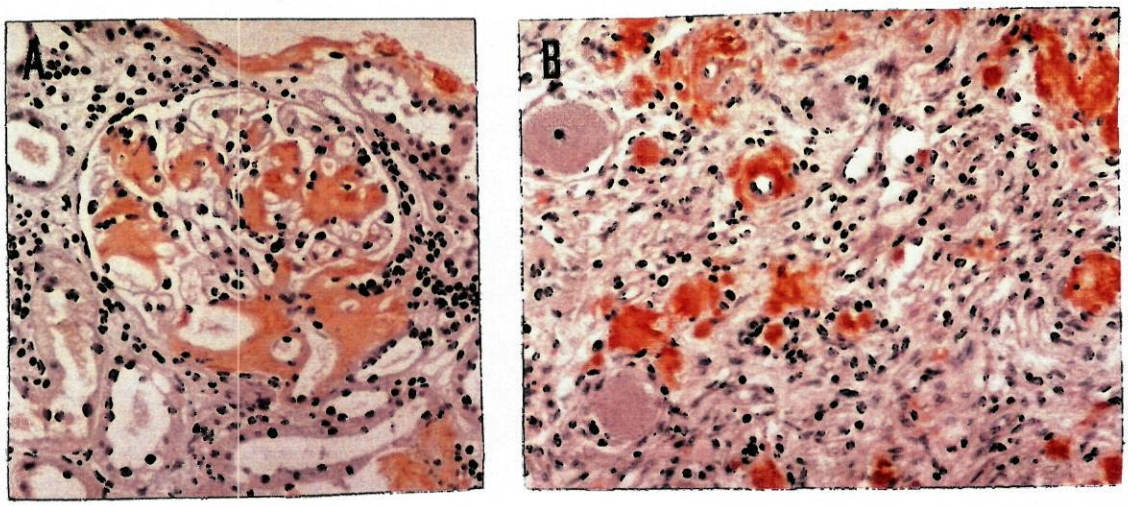


Figura V-1 Imuno-histoquímica dos depósitos de amilóide com o anticorpo monoclonal 85.1.BB6. **A** - Biópsia renal (200×): Envolvimento glomerular. **B** - Gânglio raquidiano (200×): Extensa deposição multifocal de amilóide.

Com este anticorpo, a coloração de fundo é quase inexistente, a que não será estranha a selectividade particular deste anticorpo para a proteína amilóide, que se traduz pela negatividade contra a TTR em ensaio imunoenzimático e pela fraca marcação em imuno-histoquímica de estruturas ricas em TTR, como as células epiteliais dos plexos coroideus e o conteúdo dos vasos. O 85.1.CA12, que não tem essa selectividade, também dá bons resultados, embora de qualidade inferior. A única outra hibridação que originou anticorpos monoclonais aplicáveis em imuno-histoquímica foi a 88.6, seis dos quais dão marcação positiva para depósitos de amilóide, dos quais os melhores são o BA9 e o FD6. Os resultados são no entanto de qualidade bastante inferior ao que se obtém com o anticorpo monoclonal 85.1.BB6, pelo que não têm sido empregues para esta utilização. Com a excepção já notada, a marcação dos depósitos de amilóide e da TTR dos plexos coroideus dá resultados absolutamente paralelos. Todos os restantes estudos imuno-histoquímicos foram realizados com o anticorpo monoclonal 85.1.BB6. Este foi posteriormente testado em tecidos com depósitos de amilóide de tipo AL e AA, com resultados negativos, confirmando a sua especificidade.

Uma das primeiras questões que se colocaram foi a da comparação da imuno-histoquímica com o método tradicional de coloração pelo vermelho do Congo, quer em sensibilidade quer em especificidade. Em particular, levantou-se a questão de saber se a imuno-histoquímica permitiria revelar a presença de depósitos de TTR não fibrilares, negativos para o vermelho do Congo. Para responder a estas questões, foram testadas em paralelo, com a coloração tradicional pelo vermelho do Congo, e com coloração

imuno-histoquímica com anti-TTR policlonal (DAKO) e com 85.1.BB6, numerosas biópsias de pele e nervo de doentes paramiloidóticos. A oportunidade da realização de um exame necrópsico num destes doentes permitiu alargar este estudo a um extenso painel de tecidos representativos de quase todos os órgãos, a maior parte dos quais apresentava depósitos de amilóide consideráveis. Nunca se evidenciaram depósitos TTR positivos sem as características próprias da substância amilóide, para além da positividade esperada das células de revestimento dos plexos coroideus e das células ß dos ilhéus de Langerhans (Jacobsson *et al.*, 1979), reforçando a opinião geral de que a deposição de TTR se faz directamente sob a forma de fibras. Nos estudos realizados em biópsias de nervo e pele obteve-se uma evidente marcação dos depósitos de substância amilóide, mas para a detecção dos pequenos e esparsos depósitos dos casos em início revelou-se mais fidedigno o método do Vermelho do Congo anteriormente utilizado. No entanto é um método com evidente aplicação no diagnóstico diferencial com outros tipos de amiloidoses, principalmente em casos de manifestação esporádica, sem história familiar, e principalmente em casos de consulta vindos de outras regiões geográficas, muitos dos quais estão associados a outras variantes da TTR que não a Met 30, sendo em consequência o diagnóstico bioquímico por fragmentação da TTR pelo CNBr inaplicável.

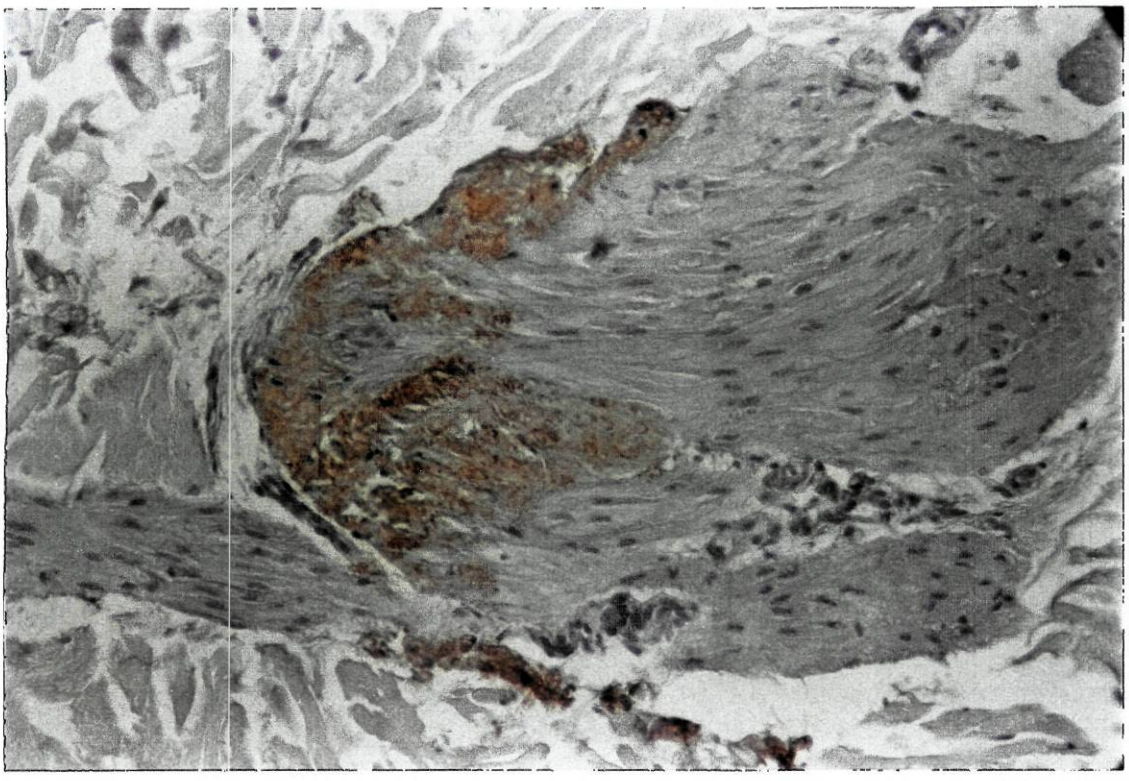
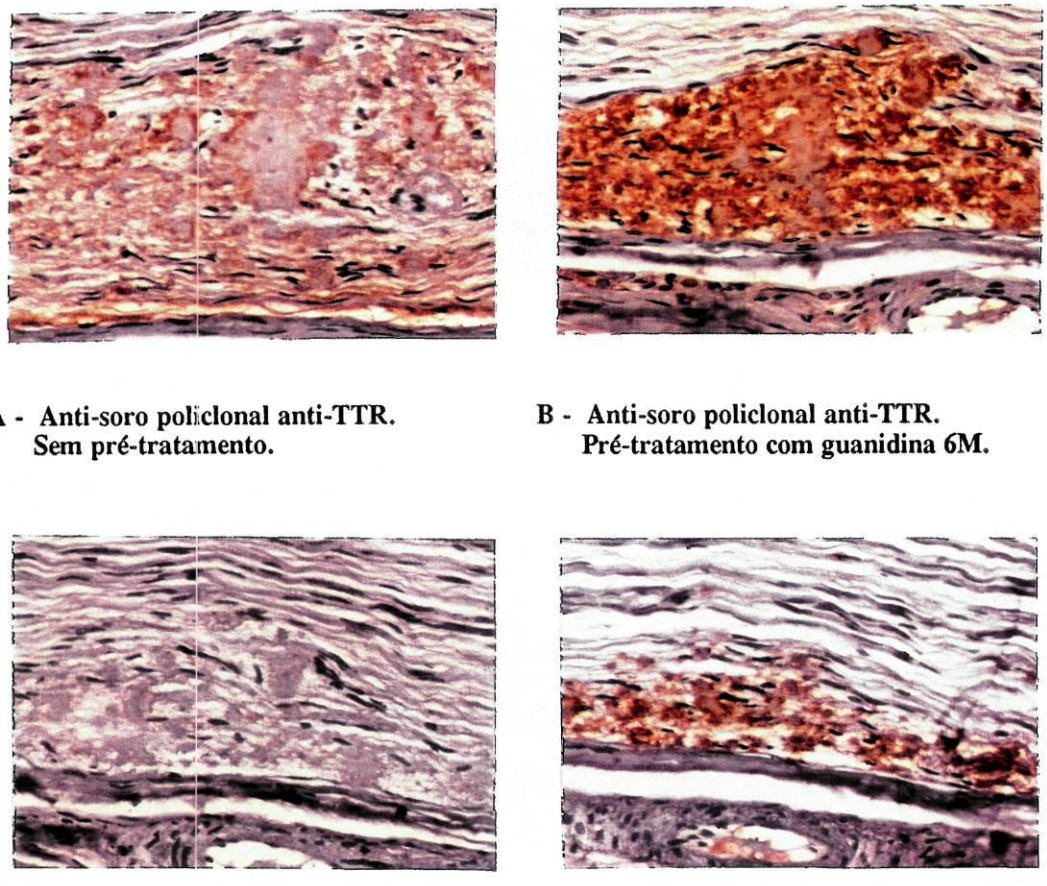


Figura V-2 Biópsia cutânea de doente ATTR Thr 45, marcada com 85.1.BB6 (300×). Observam-se depósitos manifestamente positivos envolvendo os *arrector pilii.*

É o caso de um doente americano com uma cardiomiopatia amiloidótica familiar, do qual nos foi enviada uma biópsia cutânea em que eram visíveis depósitos de amilóide, que classificamos como ATTR por marcação com anticorpo monoclonal (figura V-2), tendo as

investigações que se seguiram demonstrado a presença de uma nova variante da TTR, com substituição da alanina da posição 45 por treonina (Saraiva *et al.*, 1992).

Tivemos a oportunidade de verificar, há já alguns anos, que por vezes o material histológico de arquivo com depósitos indubitáveis de amilóide ATTR é negativo pela marcação imuno-histoquímica, encontrando-se os epítopos correspondentes aparentemente mascarados, tendo sido por nós desenvolvido um método de tratamento prévio dos cortes histológicos, com uma solução caotrópica de guanidina 6M, que regenera a imunorreactividade original (Costa PMP *et al.*, 1986). Esse pré-tratamento, que utilizamos no estudo das biópsias de arquivo, revelou-se por vezes necessário mesmo para o anticorpo monoclonal 85.1.BB6, contrariamente ao observado nos estudos iniciais realizados com outro anticorpo. Sem este pré-tratamento, o resultado pode ser completamente negativo (figura V-3).



A - Anti-soro policlonal anti-TTR. Sem pré-tratamento.

B - Anti-soro policlonal anti-TTR. Pré-tratamento com guanidina 6M.

C - Anticorpo monoclonal 85.1.BB6. Sem pré-tratamento.

D - Anticorpo monoclonal 85.1.BB6. Pré-tratamento com guanidina 6M.

Figura V-3 PAF: biópsia de nervo (200×). Comparação da marcação imuno-histoquímica com anti-soro policlonal e com o anticorpo monoclonal 85.1.BB6, com e sem pré-tratamento pela guanidina. Sem pré-tratamento, a marcação com 85.1.BB6 é completamente negativa.

Fizeram-se tentativas de aplicação dos anticorpos monoclonais em imunomicroscopia electrónica, para o que se testou primeiro esta técnica com anti-soro policlonal anti-TTR. Utilizaram-se fragmentos com cerca de 1 mm^3 de biopsias de nervo e de pele, e fragmentos de intestino grosso obtidos aquando da execução de colostomias, todos de doentes paramiloidóticos, fixados numa solução tamponada de 0,5% de gluteraldeído e 2,5% de paraformaldeído, e incluídos em resina Epon sem pós-fixação com tetróxido de ósmio. A presença de antigénio foi testada em cortes semifinos pela técnica imuno-histoquímica convencional, após tratamento destes por 5 minutos com uma solução alcoólica de etóxido de sódio, sendo então realizados cortes ultrafinos das áreas de interesse, que se recolheram em grelhas de níquel.

A marcação para imunomicroscopia electrónica foi realizada em grelhas tratadas com solução alcoólica de etóxido de sódio, e sequencialmente incubadas com BSA a 5% por 30 minutos, anti-TTR (Dako) 1:100 por 60 minutos, lavadas três vezes com TBS, incubadas com partículas de ouro coloidal de 10nm revestidas com anti-IgG de coelho (Amersham) 1:30 por 60 minutos, e lavadas três vezes com TBS, passadas por H_2O e contrastadas com acetato de uranilo. As incubações e as lavagens entre elas foram efectuadas nos poços de uma placa Terasaki colocada sobre um agitador magnético, à temperatura ambiente.

Estes ensaios permitiram verificar que as partículas de ouro se fixavam sobre as fibras de amilóide dos depósitos (figura V-3), mas nunca sobre os citoplasmas das células de Schwann, dos axónios ou das células endoteliais dos nervos periféricos ou, no caso dos fragmentos de intestino grosso, dos neurónios e células satélites dos gânglios autonómicos ou mesmo das fibras musculares lisas vizinhas dos depósitos.

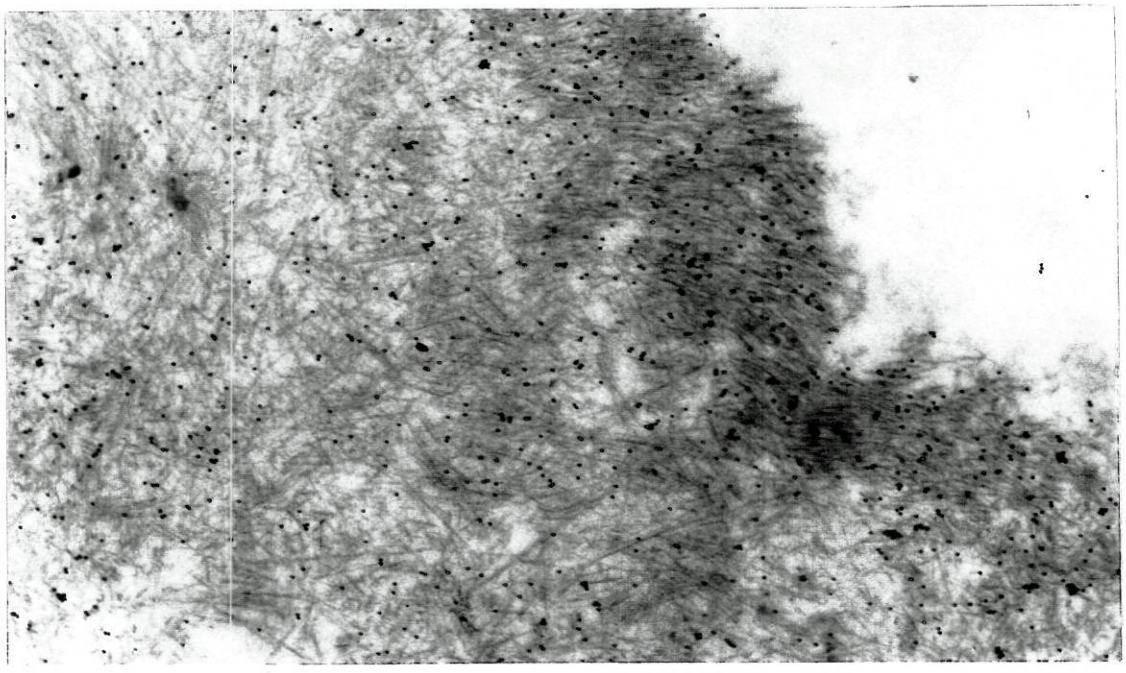


Figura V-3 Imunomicroscopia electrónica de nervo de um paramiloidótico (20.000×). Marcação de um depósito de amilóide com anti-TTR policlonal. Partículas de ouro de 10 nm. Estas localizam-se preferencialmente sobre as fibras de amilóide.

Efectuamos tentativas de repetir estas experiências com os anticorpos monoclonais positivos em imuno-histoquímica, utilizando este material e fragmentos incluídos em resina LR White, que surpreendentemente se revelou inferior para esta aplicação. O único anticorpo monoclonal que demonstrou positividade, ainda que fraca, em cortes semifinos (85.1.CA12), revelou-se totalmente inadequado quando se tentou a observação ultra-estrutural, não se discernindo localização preferencial das partículas de ouro com as fibras de amilóide, ou qualquer outra estrutura.

Confirmamos assim a dificuldade de obtenção de um bom anticorpo monoclonal para utilização em imunomicroscopia electrónica, para desenvolvimento do qual seria provavelmente necessário realizar um projecto específico com recurso a metodologia própria.

Capítulo VI

Terapêutica por imunodepuração

Introdução

Apesar da longa história de investigação das amiloidoses, os progressos no tratamento destas doenças, de evolução quase sempre fatal, têm sido practicamente nulos. A única excepção digna de nota é talvez a Febre Mediterrânica Familiar, em que a administração prolongada de colchicina, segundo uma sugestão de Goldfinger (1972), se revelou como um método eficaz de prevenção da deposição de amilóide nestes doentes (Zemer *et al.*, 1986). No entanto, mesmo neste caso, a terapêutica não beneficia a nefropatia amiloidótica já instalada. Ganhos modestos no prolongamento da sobrevida de doentes com amiloidose AL têm igualmente sido conseguidos por quimioterapia da proliferação monoclonal subjacente (Gertz *et al.*, 1991; Kyle *et al.*, 1994).

O desenvolvimento de novas terapêuticas é dificultado pela quase total ignorância dos detalhes da amiloidogénese, ou seja, do processo que leva um precursor proteico a depositar-se sob a forma de amilóide. Mesmo assim, muitas ideias de possíveis terapêuticas foram avançadas ao longo do tempo, que classificaremos consoante a fase do processo em que pretendem actuar (tabela VI-I).

Tabela VI-I. Terapêuticas potenciais da amiloidose

Remoção dos depósitos já existentes	Solventes orgânicos Proteólise enzimática
Inibição da formação de fibras	Inibidores enzimáticos ? Inibidores da polimerização ?
Eliminação do precursor proteico	
Inibição da síntese	Quimioterapia (AL) Anti-inflamatórios (AA) Transplante hepático (ATTR) Fármacos "anti-sense" ?
Remoção do precursor circulante	Plasmaferese Aferese selectiva (p. ex. imunoadsorção)

Remoção dos depósitos já existentes:

Esta é uma das ideias mais antigas para a terapêutica das amiloidoses. Diversos métodos foram propostos, desde a solubilização química destes com solventes orgânicos, até à digestão enzimática (Skogen e Amundsen, 1982; Adachi, 1989). O primeiro chegou mesmo a ser ensaiado no homem, após se ter verificado que o dimetilsulfóxido (DMSO) tinha um efeito solubilizador sobre proteínas de Bence-Jones precipitadas (Isobe e Osserman, 1976), tendo este sido administrado a doentes amiloidóticos (Osserman *et al.*, 1980; van Rijswijk e Ruinen, 1980; Ravid e Kedar, 1980; ver também Adachi, 1989), com parcos resultados clínicos, sobressaíndo apenas um efeito secundário, um hálito avassalador que levou muitos doentes (ou seus familiares) a considerar o tratamento pior que a doença.

Inibição da formação de fibras:

É uma hipótese especulativa, que talvez venha a ter relevância quando os mecanismos da fibrilogénese forem esclarecidos. Em amiloidoses em que se sabe estar implicada a degradação proteolítica do precursor, como é possivelmente o caso da amiloidose AA e grande parte das amiloidoses AL, tem sido proposto o desenvolvimento de inibidores específicos para esses enzimas, que ainda falta de qualquer modo identificar. Há no entanto indicações provindas de estudos em modelos de Scrapie, ou de fibrilogénese *in vitro*, de que talvez seja possível inibir a polimerização com ligandos como o vermelho do Congo (Caughey e Race, 1992) ou a rifampicina (Tomiyama *et al.*, 1994), ou com péptidos sintéticos (Hilbich, 1994).

Remoção do precursor proteico - por inibição da síntese:

O único processo actual de realizar este objectivo é por destruição ou remoção das células ou tecidos onde é sintetizado o precursor. É o caso da quimioterapia nas amiloidoses AL, já mencionada. Outra abordagem possível, nas doenças heredofamiliares em que está implicado um precursor anómalo, é a transplantação do órgão onde se dá essa síntese. Na PAF tem sido ensaiada a transplantação hepática, a primeira das quais ocorreu há cerca de quatro anos, na Suécia, com resultados encorajadores (Holmgren *et al.*, 1991, 1993). Desde então difundiu-se a outros centros, existindo no nosso país pelo menos 27 doentes transplantados. O acompanhamento destes doentes mostra, para além do rápido desaparecimento do precursor da circulação, uma estabilização do quadro clínico. Não se observam no entanto sinais convincentes de regressão das lesões já estabelecidas do sistema nervoso periférico. De qualquer modo, e apesar da elevada mortalidade nos meses que se seguem à intervenção (20 a 30%), e da incerteza quanto às complicações a longo termo da transplantação e da imunossupressão, este é desde já considerado pela maior parte dos investigadores o único método terapêutico de comprovada eficácia nestes doentes, e uma indicação clínica formal para aqueles que têm condições operatórias.

Outro processo de se obter a diminuição da síntese do precursor, que se prevê venha a constituír o método de eleição num futuro talvez já não muito distante, é o da interferência nos mecanismos genéticos, por meio de fármacos que inibam a sua expressão, por interacção com as sequências reguladoras, ou com o RNA mensageiro (terapia genética somática). Uma abordagem possível é a utilização de compostos "anti-sense" (Milligan *et al.*, 1993). Menos provável neste momento, até pelas questões éticas que levanta, é a alteração directa do genoma, com correcção ou destruição do gene deletério.

Remoção do precursor proteico - por remoção da circulação:

A remoção de proteínas da circulação é hoje realizada rotineiramente em numerosas situações, em circuito extracorporal, apoiando-se em técnicas de aferese plasmática de que existe uma longa experiência, tendo sido concretizada em animais de laboratório há já mais de 80 anos (Abel *et al.*, 1913). No entanto a sua utilização só se vulgarizou com a introdução de equipamentos automatizados que vieram substituír os métodos manuais (Tullis *et al.*, 1956). A remoção das proteínas plasmáticas pode ser não selectiva, isto é, com substituição do plasma total por plasma exógeno, ou simplesmente por uma solução de albumina, ou selectiva, em que o plasma extraído ao doente é tratado para remover o componente indesejado e reinfundido de novo.

A plasmaferese total, não selectiva, foi ensaiada em doentes PAF nos Estados Unidos (Rosenthal *et al.*, 1986b), Japão (Ikegawa *et al.*, 1990), Holanda (Hazenberg *et al.*, 1990), França (A. Bussel *et al.*, não publicado) e também em Portugal, onde se realizaram os ensaios mais longos (máximo de 6 anos, à data das publicações) e em maior número de doentes (Coutinho *et al.*, 1988; Sales-Luís *et al.*, 1990). Os volumes de plasma permutados por sessão foram em geral de cerca de dois litros, e o intervalo entre sessões de 2 a 5 semanas. Apesar das insuficiências óbvias destes ensaios, em particular pelo longo intervalo entre sessões, muito superior ao tempo de semivida de cerca de 2,5 dias da TTR (Vahlquist *et al.*, 1973), a impressão geral que se transmitiu é a de que os doentes tratados tiveram uma evolução clínica mais lenta que o esperado, durante o tempo em que o ensaio decorreu. Embora esses resultados se possam considerar encorajadores, a hipótese de realização de programas de tratamento por plasmaferese total mais intensiva, com maior frequência e em maior número de doentes, depara com dificuldades práticas difíceis de ultrapassar, em parte de ordem logística, pelas elevadas quantidades de plasma necessárias, e também pela multiplicação dos riscos inerentes à administração de plasma exógeno, ou à depleção de outras proteínas plasmáticas quando se recorre à albumina como soluto de substituição.

Uma alternativa possível para contornar esses inconvenientes seria o recurso à plasmaferese selectiva, com remoção exclusivamente da TTR, e preferencialmente apenas da TTR Met 30. Existe no campo das doeças genéticas um caso em que estas técnicas de aferese selectiva foram alvo de um desenvolvimento considerável, e que nos pode servir de modelo: a Hipercolesterolemia Familiar, em que uma deficiência dos receptores hepáticos

leva a uma remoção ineficaz das LDL circulantes pelo fígado, podendo estas atingir em indivíduos homozigóticos níveis plasmáticos várias vezes acima do normal, difíceis de controlar farmacologicamente. Foram desenvolvidos diversos métodos de tratamento do plasma para remoção das LDL: Adsorventes à base de heparina (Lupien *et al.*, 1976), e de sulfato de dextrano (Yokoyama *et al.*, 1984, 1985; Mabuchi *et al.*, 1987), precipitação pela heparina a baixo pH (Wieland e Seidel 1983; Eisenhauer *et al.*, 1987), e imunoadsorventes, realizados com anticorpos policlonais de cabra anti-apoB, e mais raramente com anticorpos monoclonais (Stoffel e Demant, 1981; Stoffel *et al.*, 1981; Saal *et al.*, 1986; Kukharchuk *et al.*, 1988; Borberg *et al.*, 1988). Todos estes processos vieram a revelar uma eficácia semelhante, e embora teoricamente a imunoadsorção seja mais selectiva que os outros processos, na prática não se observam grandes diferenças (Riesen, 1990). Com excepção do primeiro, todos se encontram disponíveis comercialmente. Uma abordagem idêntica foi seguida para um problema semelhante, a hiperlipidémia de Lp(a), em que foram desenvolvidos e testados imunoadsorventes com anticorpos policlonais de cabra anti-Lp(a) (Pokrovsky *et al.*, 1991, 1994).

Na Polineuropatia Amiloidótica Familiar, o uso de um processo selectivo de remoção da TTR do plasma foi já considerado por investigadores japoneses, que ensaiaram laboratorialmente diversos materiais, tendo notado a afinidade para a TTR de um adsorvente à base de grupos amino-alquilo (Ikegawa *et al.*, 1988). Não há nenhuma comunicação posterior de desenvolvimentos deste primeiro estudo.

Dispondo nós de anticorpos monoclonais anti-TTR que poderiam ser utilizados para a construção de imunoadsorventes de grande selectividade, avançamos com um projecto para o seu desenvolvimento que já ultrapassou os primeiros ensaios laboratoriais e se encontra na fase de ensaio piloto, e que iremos expor a seguir.

Imunodepuração - Desenvolvimento Laboratorial

A imunoadsorção é um processo de separação por afinidade, ou seja, em que se dá a partição da substância a extraír (TTR) entre duas fases, numa das quais se encontra um ligando específico (anticorpo). Neste caso pretende-se uma separação cromatográfica, em que uma fase líquida (plasma) perfunde uma fase sólida à superfície da qual se encontra imobilizado o ligando. Tendo-se optado desde o início por um anticorpo monoclonal como ligando, foi necessário escolher em segundo lugar a fase sólida, ou seja a matriz do imunofiltro, e o método de imobilização do anticorpo nesta.

Imunoadsorventes - Escolha da matriz

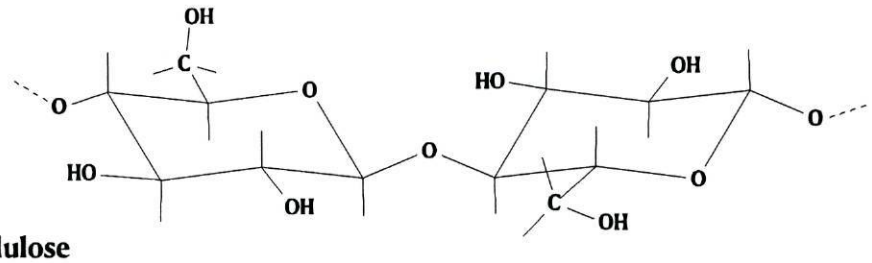
Pela natureza da aplicação em vista, restringiu-se a escolha da matriz do imunoadsorvente a materiais com provas dadas de biocompatibilidade, de preferência em aplicações análogas à pretendida. A primeira constatação que fizemos é a de que todos os filtros de adsorção de uso médico, já comercializados ou em fase de ensaio, são, tanto quanto sabemos, se exceptuarmos os filtros de carvão activado, baseados em matrizes cromatográficas de gel de agarose, de derivados da celulose, ou de metacrilato.

Os geis de agarose, geralmente Sepharose CL-4B ou CL-6B da firma Pharmacia, têm sido utilizados quando o ligando é uma proteína: proteína A estafilocócica (Nilsson *et al.*, 1981), anticorpos policlonais ou monoclonais anti-apoB100 (Stoffel e Demant, 1981; Saal *et al.*, 1986; Kukharchuk *et al.*, 1988), anticorpos anti-Lp(a) (Pokrovsky *et al.*, 1991), anticorpos anti-IgE (Lebedin *et al.*, 1991), ou o factor IX da coagulação (Nilsson *et al.*, 1994). A Sepharose é uma matriz de elevado custo, mas de qualquer modo bastante inferior, nestes casos, ao custo dos ligandos. Este tipo de filtros são obrigatoriamente regenerados e reutilizados, geralmente dezenas de vezes, sempre no mesmo doente, caso contrário o seu uso seria economicamente inviável.

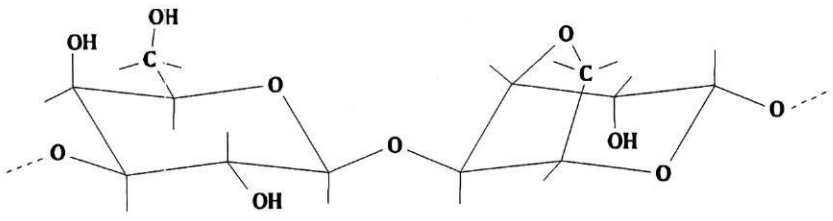
As restantes matrizes são utilizadas para ligandos mais simples, em processos de adsorção por troca iónica ou por interacção hidrofóbica: heparina (Lupien *et al.*, 1976) ou sulfato de dextrano (Yokoyama *et al.*, 1984) para remoção de LDL, grupos alquilo (Furuyoshi *et al.*, 1988; Gejyo *et al.*, 1994) para a β_2-microglobulina, e amino-alquilo (Ikegawa *et al.*, 1988) para a TTR. São frequentemente filtros de uso único, embora possam ser regenerados, e podem por vezes ser utilizados com hemoperfusão directa. Uma outra fonte de materiais a considerar é a dos filtros de hemodiálise, que são materiais bem experimentados. De facto, foram desenvolvidos imunofiltros anti-apoB100 por modificação directa destes (Larue *et al.*, 1985). Estes filtros são geralmente realizados com derivados da celulose (cuprofan, acetato ou nitrato de celulose, etc.), mas também com poliacrilonitrilo, polisulfona, polimetilmetacrilato, e outros. Têm a desvantagem de terem uma área disponível para modificação muito inferior à dos suportes cromatográficos, pelo que só têm utilidade quando a quantidade de ligando a imobilizar é relativamente pequena.

Pela necessidade de se garantir uma retenção quase absoluta do anticorpo pela matriz do imunofiltro, de modo a não se dar a perda deste para a circulação, a sua ligação à matriz é sempre uma ligação de tipo covalente, efectuada por activação ou modificação química da matriz e/ou do anticorpo. As matrizes em que estes processos de activação química estão melhor estudados são a celulose e a agarose, dois polissacarídeos naturais, de biocompatibilidade comprovada, com uma estrutura química bastante semelhante, pelo que os processos de modificação química aplicáveis são basicamente idênticos, partindo sempre dos grupos -OH que constituem as espécies mais reactivas presentes nestes materiais. O resultado obtido diverge pelas diferenças nas suas características físicas, e pela presença de diois vicinais na celulose, quase totalmente ausentes da agarose. Tomaremos em consideração apenas estes dois tipos de suporte.

A celulose é provavelmente o material orgânico mais abundante na natureza. Tem uma enorme importância industrial, sendo inúmeros os produtos manufacturados dela derivados, pelo que as suas propriedades físicas e químicas são bem conhecidas. É um polímero linear formado por blocos de β-D-glucose encadeados (figura VI-1). A sua estrutura física caracteriza-se pela existência de áreas amorfas alternando com áreas microcristalinas, que lhe conferem uma elevada resistência mecânica, apesar da ausência de ligações covalentes entre cadeias.



Celulose



Agarose

Figura VI-1 Estrutura química da celulose e agarose. Unidade básica destes polissacarídeos.

Podem-se preparar partículas esféricas de celulose para suportes cromatográficos, com excelentes características mecânicas e elevada porosidade, mas que não têm de qualquer modo uma estrutura tão aberta como os geis de agarose. Têm talvez mais interesse para a imobilização de macromoléculas suportes em folha de derivados de celulose, como os utilizados na manufactura de filtros de fibras ocas para diálise e ultrafiltração. Estes teriam

para nós a considerável vantagem de permitir a perfusão com sangue total, difícil de realizar com suportes particulados. A experiência prévia dos nossos colaboradores do INSERM com este tipo de suporte revelou no entanto algumas dificuldades na sua regeneração e reutilização, assim como na ligação de quantidade suficiente de anticorpo na superfície disponível (inferior a 2 m^2), pelo que demos preferência aos geis de agarose, de que falaremos de seguida.

A agarose é um polímero linear extraído de algas marinhas, constituído por unidades encadeadas de agarobiose, um dissacarídeo formado por β-D-galactose e 1,3-anidro-α-L-galactose (figura VI-1). Em meio aquoso, as cadeias de agarose tendem a enrolar-se em dupla hélice estabilizada por pontes de hidrogénio, formando um gel com uma estrutura reticular aberta facilmente acessível a compostos macromoleculares, mas ao mesmo tempo bastante rígida, razão pela qual encontrou numerosas aplicações em técnicas cromatográficas e electroforéticas. A estabilidade física destes geis é no entanto muito insastisfatória em algumas aplicações, pelo facto de depender inteiramente de pontes de hidrogénio fáceis de romper por acção do calor ou de determinados solventes, pelo que as partículas dos suportes cromatográficos são actualmente estabilizadas por pontes covalentes realizadas com epicloridrina ou 2,3-dibromopropanol. Estes geis modificados têm uma combinação quase ideal de resistência mecânica e porosidade, pelo que têm sido o suporte mais utilizado para imobilização de macromoléculas. São suficientemente estáveis para serem esterilizados por autoclavagem.

O suporte cromatográfico por nós seleccionado para a matriz dos imunoadsorventes foi um gel de agarose a 4% (Sepharose CL-4B da firma Pharmacia), a concentração que realiza o melhor compromisso entre rigidez e porosidade (limite de exclusão ~10^7 Da) para o fim em vista. O fabricante recomenda para fins cromatográficos como pressão máxima de utilização 90 mmHg, e um fluxo máximo de 0,43 $ml.min^{-1}.cm^{-2}$, mas utilizamos correntemente valores até 6 vezes maiores sem qualquer dificuldade.

Imunoadsorventes - acoplamento do ligando

A ligação de uma proteína a um polissacarídeo implica geralmente a modificação química deste último, porque este não possui grupos funcionais capazes de reagir com uma proteína em condições compatíveis com a manutenção da funcionalidade desta. A introdução de grupos reactivos consegue-se por modificação dos grupos -OH, os mais abundantes nestes carboidratos. Os grupos mais frequentemente introduzidos e algumas das características dos suportes activados resultantes estão resumidos na tabela VI-II.

Tabela VI-II. Processos de activação da agarose

Reagente de activação	Grupo introduzido	Estabilidade do produto	Ligandos	Estabilidade da ligação	Comentários
CNBr, p-nitrofenil-cianato, 1-ciano-4-dimetilaminopiridinio tetrafluoroborato (CDAP)	Éster de cianato (-OCN), Imidocarbonato (-OC(NH)O-)	Má	$-NH_2$	Mediocre	Método clássico, elevada capacidade, mas pouco reprodutível.
Bis-oxiranos	Epóxido	Moderada	-SH, $-NH_2$	Excelente	A ligação a grupos amino exige incubações prolongadas a pH e temperatura elevados. Baixa capacidade.
Cloreto de tresilo, outros cloretos de sulfonilo	Éster de sulfonilo ($-OSO_2R$)	Boa	$-NH_2$, -SH	Excelente	A activação realiza-se em meio anidro.
Tricloro-s-triazina	Dicloro-s-triazina	Boa	$-NH_2$, -SH, -OH	Boa	Introduz anéis de triazina na ligação química.
2-fluoro-1-metil-piridínio tosilato (FMP)	1-metilpiridinol	?	$-NH_2$, -SH	Excelente	Método patenteado, não publicado
p-nitrofenil-cloroformato, N-hidroxi-succinimida--cloroformato	Éster de carbonato	Moderada	$-NH_2$	Boa	A activação realiza-se em meio anidro.
Ácido periódico	Aldeído (-CHO)	Boa	$-NH_2$	Excelente, após redução	Maus resultados devido à escassez de dióis vicinais na agarose.
Hidrólise ácida	Aldeído (-CHO)	Boa	$-NH_2$	Excelente, após redução	Baixa capacidade
1,1'-carbonil-di-imidazol (CDI)	imidazolil-carbamato	Moderada	$-NH_2$	Boa	A activação realiza-se em meio anidro.
Processo complexo	N-hidroxi-succinimida	Boa	$-NH_2$	Variável	Capacidade e estabilidade dependentes do processo de activação empregue.
Processo complexo	Hidrazida	Boa	$-NH_2$	Variável	Também empregue para imobilização de ligandos contendo carbo-hidratos após activação destes com IO_4^-.

Desde o início optou-se por um dos métodos mais antigos e seguramente o mais largamente usado e experimentado, a activação pelo brometo de cianogénio, método que proporciona um dos suportes activados de capacidade mais elevada, tendo sido de facto o método utilizado para a construção de todos os imunofiltros de uso médico que já referimos. Pesou também nessa decisão o facto de os nossos colaboradores do INSERM terem uma larga experiência com este método, por eles utilizado para o desenvolvimento de imunofiltros anti-apoB100. É no entanto pertinente analizar essa decisão no âmbito de uma comparação dos méritos e desvantagens das alternativas disponíveis.

O método de activação pelo brometo de cianogénio (Axén *et al.*, 1967; Cuatrecasas *et al.*, 1968; March *et al.*, 1974; Kohn e Wilchek, 1984) introduz no gel de agarose grupos reactivos de éster de cianato e imidocarbonatos, que reagem com os grupos amina presentes no ligando, formando ligações predominantemente do tipo isoureia (figura VI-2).

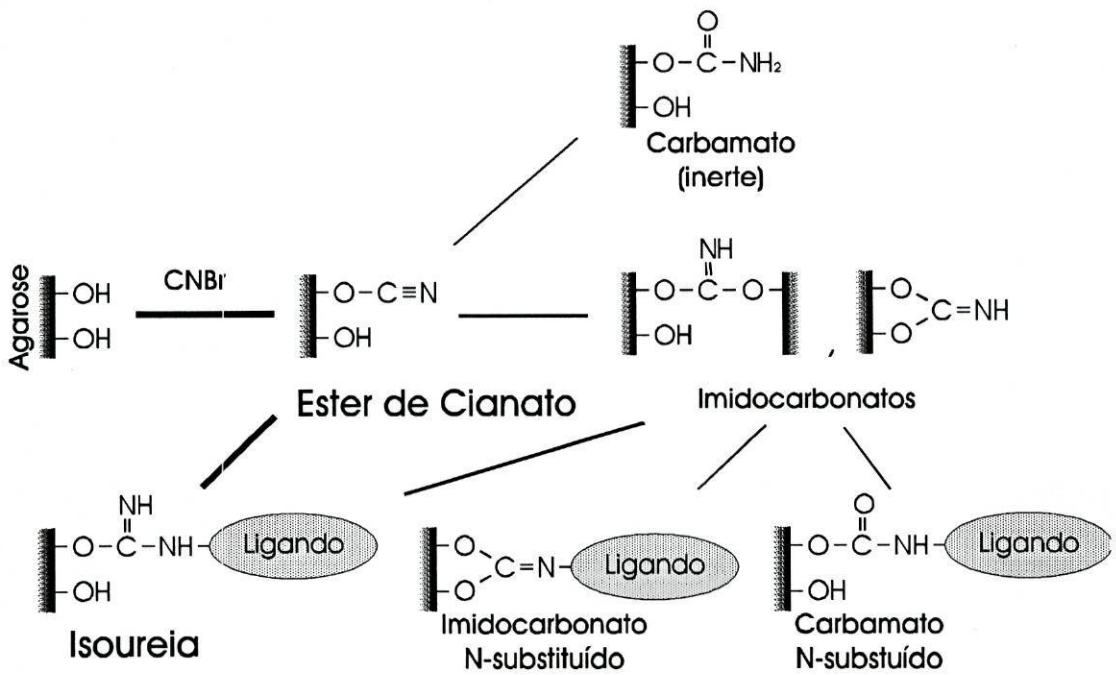


Figura VI-2 Activação da agarose pelo CNBr.

Tem a seu favor uma densidade de derivatização elevada, a rapidez e relativa simplicidade de execução, a realização em meio aquoso, a não introdução no gel de grupos químicos difíceis de remover, e o facto de o gel activado ligar as proteínas rapidamente, a baixa temperatura e a pH moderado (8,5 a 9). Tem contra si a toxicidade e volatilidade do próprio brometo de cianogénio, que no entanto não é difícil de inactivar (com hipoclorito de sódio ou sulfato ferroso), a instabilidade do gel activado, que tem de ser imediatamente utilizado, e acima de tudo o facto de a ligação introduzida entre o gel e o ligando, uma isoureia, ser susceptível de ataque nucleófilo, o que a torna instável, particularmente a pH alcalino (Schnapp e Shalitin, 1976; Lasch e Koelsh, 1978). Este problema não é tão grave

com macromoléculas como para pequenos ligandos, porque as primeiras geralmente ligam-se à matriz por múltiplos pontos, mas mesmo assim dá-se uma hidrólise gradual, que na aplicação que nos concerne resulta na libertação lenta de anticorpo monoclonal para o plasma do doente, com o risco de reacções devidas à sensibilização deste para o anticorpo murino. No entanto, a ausência que constatamos de referências a reacções atribuídas a esse fenómeno em doentes hipercolesterolémicos tratados por imunodepuração (Borberg *et al.*, 1988), com excepção de um caso (Parker e Studbaker, 1988), e que confirmamos por contacto pessoal com investigadores clínicos que a ela se dedicam, fez-nos secundarizar essa eventualidade, a que no entanto nos mantivemos atentos.

Dos outros métodos, podemos excluír desde já os que resultam em matrizes activadas de baixa capacidade, visto ser necessário imobilizar o anticorpo monoclonal sobre o suporte com elevada densidade (6 a 9 mg/ml), como veremos adiante. É o caso da activação com bis-oxiranos (Sundberg e Porath, 1974), que infelizmente é um dos poucos métodos que se realizam em meio aquoso, com reagentes relativamente pouco tóxicos, e que dá origem a uma ligação química resistente à hidrólise. Também tem contra si a necessidade de incubar o ligando com a matriz activada por períodos longos, a pH > 9, e a temperaturas relativamente elevadas. Experiências preliminares por nós realizadas não conseguiram imobilizar mais de 2 mg/ml de anticorpo em Sepharose CL-4B activada por este processo.

Outros métodos que sofrem pela baixa capacidade de fixação obtida são os que introduzem grupos aldeído, quer por activação com ácido periódico (Sanderson e Wilson, 1971), quer por hidrólise ácida controlada (Stults *et al.*, 1983). São métodos que dão excelentes resultados com derivados celulósicos, mas que não resultam para a agarose, pelo facto de esta ser muito pobre em dióis vicinais, necessários nestes processos de activação. Aparentemente, uma excepção são os geis de agarose polimerizados com epicloridrina, que introduz como reacção lateral numerosos grupos glicólicos, mas esta foi substituída pelo dibromopropanol no processo de fabrico da Sepharose CL-4B, pelo que não nos foi possível confirmar este facto.

Todos os restantes métodos, adiante referidos, têm de se efectuar em solvente anidro, para evitar a hidrólise dos reagentes empregues, o que dificulta a sua execução e levanta problemas de eliminação dos efluentes quando se encara a sua aplicação em grande escala.

Os métodos de activação com os cloretos de sulfonilo (Nilsson e Mosbach, 1980, 1981, 1984, 1987), dando bons resultados, levantam outro problema: é um método que só produz grupos reactivos por modificação dos OH primários, sendo o produto de modificação dos OH secundários (a maior parte) uma reacção indesejada que introduz grupos químicos difíceis de remover, levantando eventuais problemas de toxicidade e biocompatibilidade.

O método de activação pela tricloro-s-triazina (Kay e Crook, 1967) sofre do mesmo problema que o método anterior, com a agravante de o grupo triazina integrar a estrutura de ligação do gel ao ligando.

De entre os outros métodos, poderiam ser boas alternativas os processos de activação pelos cloroformatos (Miron e Wilchek, 1987), particularmente o p-nitrofenil-cloroformato, disponível comercialmente, ou o cloroformato de N-hidroxi-succinimida, que sendo o que dá melhores resultados, tem a desvatagem de ter de se sintetizar no laboratório com reagentes extremamente tóxicos. O carbonil-di-imidazol (Bethel *et al.*, 1979; Hearn *et al.*, 1987) é outra boa alternativa, encontrando-se de resto o gel de agarose activado por este processo disponível comercialmente (Reacti-gel da Pierce). O fluoro-metil-piridínio tosilato é outro reagente de activação com características interessantes (Scouten WH, 1987), com a desvantagem de o processo de activação correspondente ter sido patenteado e não ser conhecido em todos os seus detalhes. Como se referiu atrás, todos estes processos de activação têm de ser realizados em solvente anidro, o que pesou contra a sua utilização.

Para além destes métodos de activação directa podem-se introduzir na agarose outros grupos reactivos, de que os exemplos mais popupares são a N-hidroxi-succinimida e a hidrazida, recorrendo a manipulações químicas mais complexas com ponto de partida num dos suportes activados atrás descritos. Não nos pareceu que qualquer pressuposta vantagem destes suportes activados compensasse a complexidade adicional, pelo menos numa primeira aproximação a este projecto.

O método utilizado por nós para activação da agarose pelo CNBr foi no essencial o de Cuatrecasas *et al.* (1968). Em resumo, ao volume desejado de Sepharose CL-4B, lavada com H_2O e mantida a 4°C, adiciona-se volume igual de uma solução a 10% de CNBr em H_2O, após o que se mantém o pH entre 10,5 e 11 por adição de NaOH 10 M. Ao fim de 5 a 10 minutos o pH estabiliza, assinalando o fim da reacção. Lava-se o gel rapidamente com H_2O, e equilibra-se com tampão carbonato/bicarbonato 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 8,5. Escorre-se o gel activado e adiciona-se-lhe o anticorpo monoclonal no mesmo tampão, ficando a mistura a agitar lentamente 4 a 16 horas a 4°C. Escorre-se o imunoadsorvente e lava-se 4 vezes com tampão carbonato/bicarbonato, guardando-se estas lavagens para determinação da quantidade de anticorpo não ligada. Neutralizam-se grupos reactivos residuais por incubação com etanolamina.HCl 1 M, pH 8, por duas horas. Lava-se com NaSCN 3M para eliminar anticorpo adsorvido e não ligado. Finalmente lavam-se e guardam-se os imunoadsorventes em fosfato de sódio 10 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,4 (PBS) contendo 0,01% NaN_3, ou em etanol a 25%.

Imunoadsorventes - anticorpos monoclonais

O anticorpo monoclonal a utilizar nos imunofiltros necessita de ser produzido em grandes quantidades, o que à partida nos fez restringir a escolha a um anticorpo de classe IgG, visto estes serem secretados em quantidade 10 a 100 vezes maior que os de classe IgM. Para estas experiências foram produzidas quantidades suficientes de três anticorpos monoclonais de duas hibridações diferentes (88.1.FG12, 88.1.GE8 e 88.6.BA9) após adaptação dos hibridomas correspondentes a meio sem soro (ver capítulo III).

Imunoadsorventes - utilização

Os imunoadsorventes obtidos, após enpacotamento em colunas de cromatografia de tamanho adequado (colunas com 1 cm ∅ para imunoadsorventes até 10 ml), foram testados com plasma estabilizado com citrato, obtido de dadores de sangue e de doentes com PAF. Foi empregue em geral um fluxo de perfusão correspondendo a um tempo de residência do plasma no imunoadsorvente de 10 minutos. O tempo de residência definiu-se como:

$$tempo_{residencia} = \frac{volume_{adsorvente}\ (\text{ml})}{fluxo_{plasma}\ (\text{ml.min}^{-1})}\ .$$

O primeiro volume de líquido a saír da coluna, correspondendo ao PBS em que se encontra armazenado o imunoadsorvente, foi rejeitado, sendo recolhido o plasma das fracções seguintes, incluindo o primeiro volume da lavagem final. Neste plasma doseou-se a TTR total, para estimar a quantidade de TTR adsorvida. No fim lavaram-se o imunoadsorventes com PBS até se obter uma absorvância a 280 nm inferior a 0,01.

A simulação da imunoadsorção *in vivo* foi aproximada partindo do pressuposto da utilização de uma coluna única de 300 ml num doente com 2,5 l de volume plasmático, e um tempo de residência de 10 minutos. Fez-se para o efeito a circulação, em circuito fechado, de um volume de plasma igual a 8,3 vezes o volume do imunoadsorvente a ensaiar, com um fluxo de 6×(volume do imunoadsorvente) ml/hora, retirando-se alíquotas de plasma com um intervalo de 10 minutos para doseamento da TTR.

A regeneração dos imunoadsorventes foi realizada com uma solução de um sal caotrópico (NaSCN 3M em tampão de acetato de sódio 0,1 M, pH 6), e comparada, para os imunoadsorventes realizados com o anticorpo monoclonal 88.6.BA9, com a regeneração efectuada com um tampão alcalino (trietanolamina.HCl 0,1 M, NaCl 1 M, pH 10,5) e um tampão ácido (glicina.HCl 0,3 M, pH 2,8).

Métodos analíticos

As concentrações de anticorpo monoclonal purificado foram medidas com ácido bicinchonínico (Smith *et al.*, 1985), pelo método recomendado pelo fornecedor do reagente (Pierce), ou então estimadas por medição da absorvância a 280 nm, utilizando um coeficiente de extinção $\varepsilon_{280}^{1\%} = 14,3$.

A concentração de TTR no plasma e nos picos de eluição foi medida por electroimunodifusão ("rocket immunoelectrophoresis") pelo método de Laurell (1966), utilizando como padrão soro de referência da Behring.

Resultados

Nas primeiras experiências, prepararam-se imunoadsorventes de 3 ml para cada um dos anticorpos monoclonais da hibridação 88.1, utilizando respectivamente 3, 9 e 15 mg de

88.1.GE8 e 3, 6 e 12 mg de 88.1.FG12. O rendimento de fixação foi mau para o 1º anticorpo, variando entre 23 e 43 %, e bom para o 2º, situando-se à volta dos 85%.

Passaram-se 100 ml de plasma normal por cada coluna, com um tempo de residência de 20 minutos, sendo a eluição feita com NaSCN 3 M. Não se observou retenção significativa de TTR por medição desta no plasma após passagem pelas colunas, e os picos de eluição, contendo cerca de 2 mg de proteína em todos os casos, não revelaram presença de TTR, contendo provavelmente apenas proteínas adsorvidas inespecificamente.

Como controlo foi preparada uma pequena coluna (1 ml) com cerca de 5 mg de anticorpo policlonal (DAKO), cujo pico de eluição, contendo 0,3 mg de proteína, era constituido por TTR.

Este resultado negativo não é de todo inesperado, se tivermos em vista que ambos estes anticorpos monoclonais, da mesma hibridação, são dirigidos contra um péptido situado numa cadeia β de duvidosa acessibilidade na conformação nativa da TTR, ainda que tenham mostrado reactividade com a TTR em imunoensaio de fase sólida. A adsorção à superfície do plástico na base deste tipo de imunoensaios ocasiona no entanto mudanças conformacionais que podem modificar a antigenicidade da proteína adsorvida, não se podendo em consequência extrapolar do resultado destes para o comportamento do antigénio em solução. Tornou-se pois necessário desenvolver novos anticorpos monoclonais para a construção de imunoadsorventes, sendo esta a principal motivação para a hibridação 88.6, e uma das razões porque nesta se optou por apenas seleccionar anticorpos monoclonais de classe IgG. Desta hibridação, de que resultaram 12 clones positivos (ver o capítulo III), seleccionou-se um dos primeiros a ser reclonado, o clone BA9, com um crescimento vigoroso, para adaptação a meio sem soro e produção de quantidade suficiente para os primeiros ensaios de novos imunoadsorventes.

Nesta fase foram construídos também 3 imunoadsorventes com concentrações crescentes de anticorpo, cujas características estão resumidas na tabela VI-III.

Tabela VI-III. Imunoadsorventes com BA9 1ª fase

	Volume	[ ] anticorpo	Rendimento da fixação	Capacidade de ligação de TTR
	ml	mg/ml	%	mg/ml
BA9 (2)	3	2,2	92	0,70
BA9 (4)	5	3,7	91	1,15
BA9 (6)	2	5,5	92	1,48

Como se pode ver, este anticorpo monoclonal permitiu a construção de imunoadsorventes com excelente rendimento. Quando se testaram estes com plasma, nos mesmos moldes que

nas experiências anteriores, obtiveram-se picos de eluição constituídos quase exclusivamente por TTR (0,27 a 0,31 mg de TTR por cada mg de anticorpo), a julgar pela análise destes em SDS-PAGE, onde para além da banda correspondendo ao monómero de TTR só são aparentes uma banda mais fraca na zona de migração do RBP (22 kDa), e bandas muito fracas de albumina e de outras proteínas de peso molecular mais elevado, provavelmente resultantes da lavagem incompleta dos imunoadsorventes.

A influência do tempo de residência na capacidade de adsorção foi investigada com a coluna BA9 (4), pela qual se passaram três fracções idênticas de plasma com fluxos de 30, 15 e 10 ml/hora (tempo de residência de 10 a 30 minutos), não se registando diferenças significativas entre as três experiências.

Com esta mesma coluna estudou-se o efeito da quantidade total de TTR perfundida sobre a capacidade de adsorção. Para isso volumes de plasma com quantidades crescentes de TTR foram passados pela coluna, e a quantidade de TTR eluída comparada com a quantidade aplicada (figura VI-3). Como esperado, a adsorção dá-se quantitativamente até cerca de 80% da capacidade total, após o que aumenta lentamente com o incremento da quantidade de plasma perfundido.

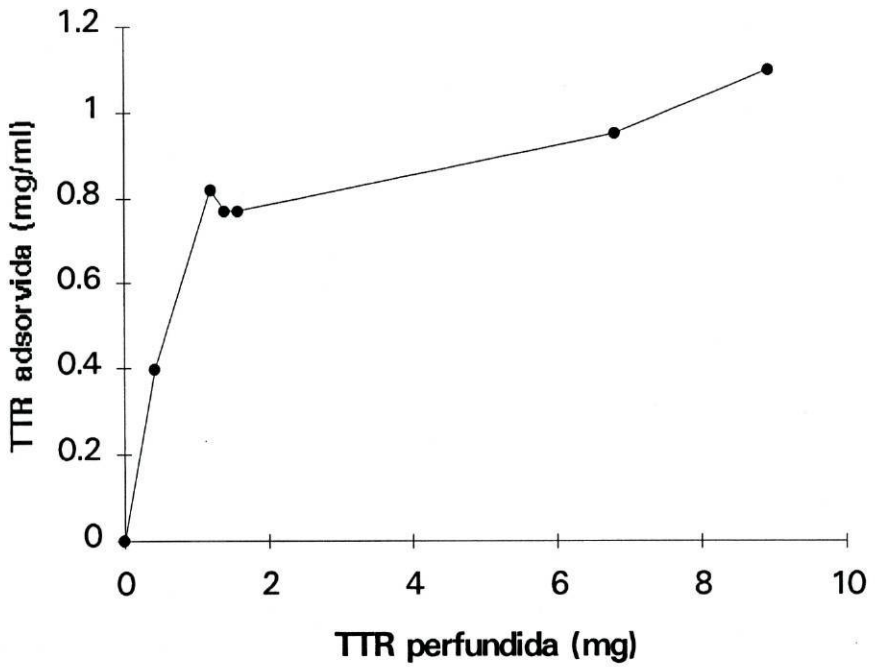


Figura VI-3 TTR adsorvida em função da TTR total perfundida. Imunoadsorvente BA9(4). Tempo de residência de 10 minutos. A adsorção é quantitativa até cerca de 80% da capacidade total.

Experiências de imunoadsorção em circuito fechado foram realizadas com os imunoadsorventes BA9 (4) e BA9 (6) (figura VI-4). Com o primeiro, observou-se uma rápida descida da concentração de TTR no plasma para cerca de metade do valor inicial, onde estabilizou ao fim de cerca de 20 minutos, enquanto que com o segundo se obteve

uma descida para cerca de um quarto do valor inicial, mas que se processou mais lentamente. Este efeito atribui-se a um fenómeno de inibição estérica resultante da alta concentração de ligando, e consequente aumento do tempo de ligação do antigénio. Este aumento reflete-se negativamente na capacidade dinâmica do imunoadsorvente.

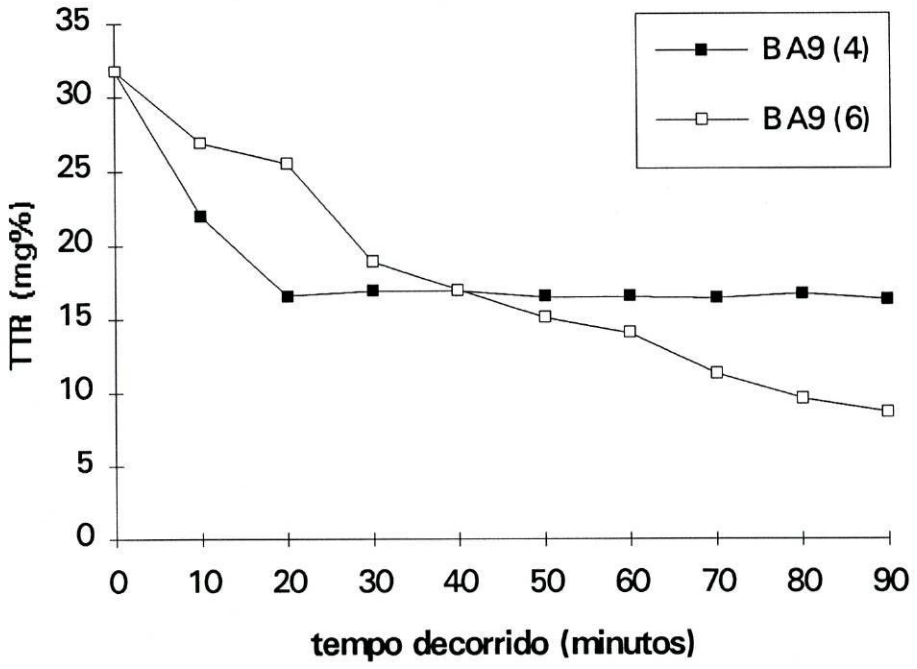


Figura VI-4 Imunoadsorção em circuito fechado com os imunoadsorventes BA9 (4) e BA9 (6). Volume de plasma de 8,33 ml/(ml de gel) e fluxo de 6 ml/hora/(ml de gel). O imunoadsorvente de maior capacidade permite atingir valores mais baixos de TTR, mas a descida processa-se lentamente.

Diante destes resultados encorajadores, procedeu-se à construção de imunoadsorventes de maiores dimensões e com maior densidade de anticorpo monoclonal, com o fim de se proceder a estudos mais extensivos e a ensaios laboratoriais em condições próximas das da utilização *in vivo*. Foram realizados mais quatro imunoadsorventes, cujas características se encontram resumidas na tabela VI-IV.

Tabela VI-IV. Imunoadsorventes com BA9 2ª fase

	Volume	[ ] anticorpo	Rendimento da fixação	Capacidade de ligação de TTR
	ml	mg/ml	%	mg/ml
BA9 (4')	10	3,9	93	1,28
BA9 (6')	10	6,1	92	1,77
BA9 (8)	350	8,14	93	2,37
BA9 (10)	300	9,65	80	2,51

Os imunoadsorventes BA9(4'), BA9(6') e 10 ml do BA9(8) e BA9(10) foram empacotados em colunas cromatográficas com 1 cm ∅, e utilizados para reavaliar a capacidade de adsorção de TTR, em função da concentração de anticorpo monoclonal fixado e com diferentes plasmas. Seis frações de plasma com 480 ml cada e com concentrações de TTR compreendidas entre 45 e 72 mg/ml foram divididas em 2 porções de 240 ml, que foram passadas por 2 colunas a 1 ml/minuto, de modo que cada coluna foi testada com 3 frações de plasma diferente. O gráfico da TTR eluída em função da concentração de anticorpo monoclonal imobilizado (figura VI-5), mostra um aumento de capacidade proporcional à concentração de anticorpo monoclonal, no intervalo de concentrações testado, se tivermos em conta as variações da capacidade total devidas a diferentes concentrações de TTR nas fracções de plasma utilizadas.

A capacidade que se obteve para estes imunoadsorventes situa-se entre os 0,2 e os 0,25 mg de TTR por cada mg de anticorpo imobilizado, ligeiramente inferior à observada nas primeiras experiências. Deve-se no entanto levar em conta que as quantidades de plasma aqui empregues não permitem garantir a saturação total dos imunoadsorventes, reflectindo melhor a sua capacidade dinâmica do que a sua capacidade total.

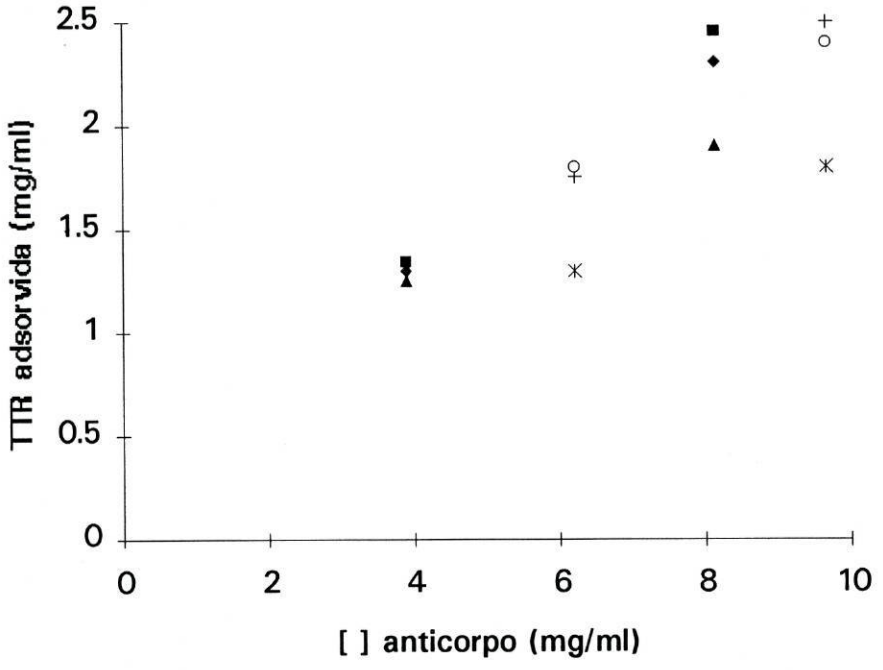


Figura VI-5 Capacidade de adsorção de TTR por diferentes imunoadsorventes, em função da concentração de anticorpo imobilizado. Imunoadsorventes BA9 (4'), (6'), (8) e (10). Tempo de contacto de 10 minutos. Foram empregues alíquotas de plasma com concentrações variáveis de TTR, cada uma das quais foi dividida em duas porções, utilizadas em imunoadsorventes diferentes (representadas com o mesmo símbolo). A capacidade é aproximadamente proporcional à quantidade de anticorpo monoclonal imobilizado, variando entre 0,2 e 0,25 mg de TTR por cada mg de 88.6.BA9 imobilizado.

Com o imunoadsorvente BA9(8) foram igualmente realizadas 3 colunas de 1 x 13 cm com as quais se compararam os processos de regeneração com solução caotrópica (NaSCN), tampão ácido (pH 2,8) e tampão alcalino (pH 10,5), e se avaliou o seu efeito sobre a actividade dos imunoadsorventes ao longo de utilizações repetidas. Efectuaram-se 15 imunoadsorções para cada imunoadsorvente, num período de duas semanas, utilizando em cada dia fracções do mesmo plasma para as três colunas. Os plasmas das séries 1, 2 e 7, e das séries 8 e 15, têm concentrações idênticas, o que facilita a avaliação do efeito ao longo do tempo dos diferentes métodos de regeneração. Como se pode ver na figura VI-6, o tiocianato teve um efeito deletério sobre a capacidade de adsorção, levando a uma perda de cerca de 50% da capacidade total do imunoadsorvente ao fim das 15 séries. Os outros dois métodos têm um comportamento ao longo da série muito semelhante, notando-se uma pequena quebra de capacidade (8 - 10%) entre a 1ª e 2ª série, não havendo diferença entre a 2ª e a 7ª, e uma quebra de 5 - 10% entre a 8ª e a 15ª.

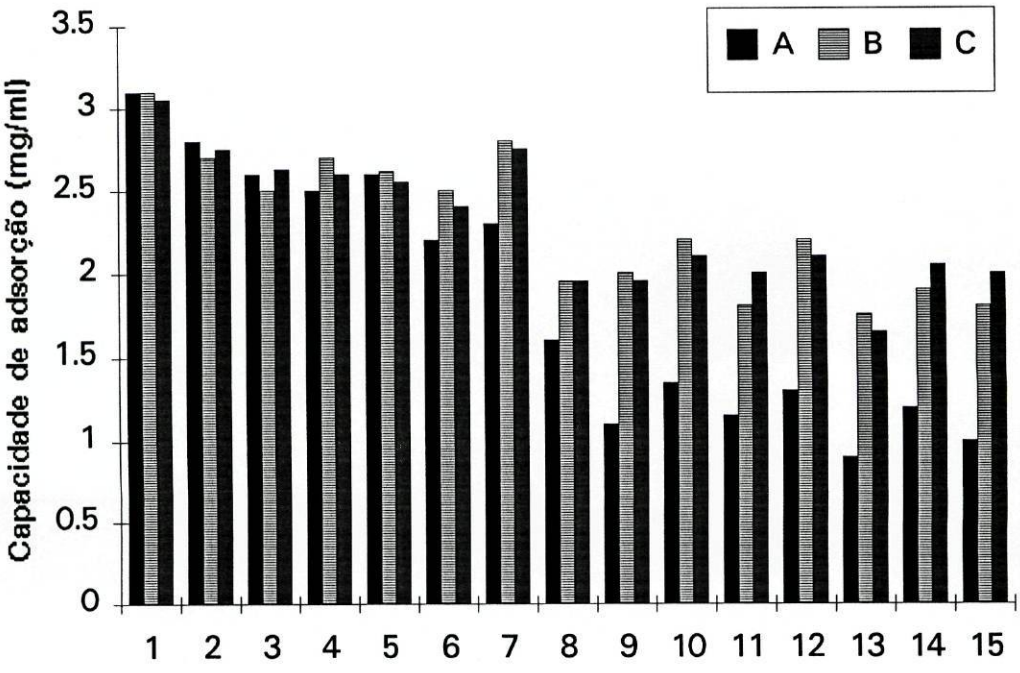


Figura VI-6. Efeito do método de regeneração sobre a capacidade de adsorção de TTR, com o uso repetido dos imunoadsorventes. A - NaSCN; B - tampão ácido; C - tampão alcalino. Imunoadsorvente BA9 (8).

O tiocianato tem um efeito deletério sobre a capacidade, resultando numa perda de 50% ao fim de 15 utilizações, em relação aos outros métodos de regeneração.

No produto de dessorção obtido pelos três métodos quantificou-se a TTR total, tendo estes sido também analisados por SDS-PAGE. Para a eluição com NaSCN e com tampão alcalino, a quantidade de TTR recuperada correspondeu à quantidade retida, observando-se no gel de SDS-PAGE uma banda principal correspondente à TTR e alguns contaminantes menores. A eluição com tampão ácido resultou num produto em que era evidente a

presença de um precipitado, sendo a recuperação de TTR no filtrado muito inferior à quantidade adsorvida. A análise deste por SDS-PAGE mostrou uma multiplicidade de bandas para além da banda de TTR. Este fenómeno não se pode considerar estranho, se se tiver em conta que a acidificação é o método geralmente empregue para induzir a polimerização de TTR (Gustavsson *et al.*, 1991; Colon e Kelly, 1992). Estes polímeros apresentam todas as características de fibras de amilóide, pelo que nos parece contraproducente a utilização da acidificação como método de regeneração, pelo risco de introdução nos doentes de uma forma de TTR que poderia contribuir para o agravamento da sua doença. Optou-se portanto pela regeneração a pH alcalino, a despeito do risco de aumento da relargagem de anticorpo dos imunoadsorventes, por hidrólise das ligações isoureia.

Outras duas colunas de 10 ml de BA9(8) foram utilizadas para avaliar a possibilidade de se armazenarem os imunoadsorventes em etanol a 25%. Efectuaram-se três imunoadsorções com 180 ml de plasma, em três dias seguidos, e após 8 dias outras duas, em paralelo nas duas colunas. Durante este período, uma delas foi armazenada em PBS, e a outra em etanol a 25%. As eluições foram todas realizadas com tampão de etanolamina pH 10,5. Não houve diferença significativa entre as duas colunas na quantidade de TTR adsorvida, em qualquer das imunoadsorções realizadas. O etanol a 25% é, consequentemente, uma solução antisséptica adequada para o armazenamento destes imunoadsorventes.

Construção e ensaio de protótipos

Com o gel restante dos imunoadsorventes BA9(8) e BA9(10) construíram-se dois protótipos de imunofiltros de 300 ml cada um, um volume compatível com a capacidade de expansão do volume de circulação extracorporal. Pelos resultados anteriores estes imunofiltros deveriam ter uma capacidade de adsorção de TTR de 700 a 750 mg, o suficiente para remover toda a TTR de um volume de plasma aproximadamente igual ao de um indivíduo de envergadura média (2,5 l).

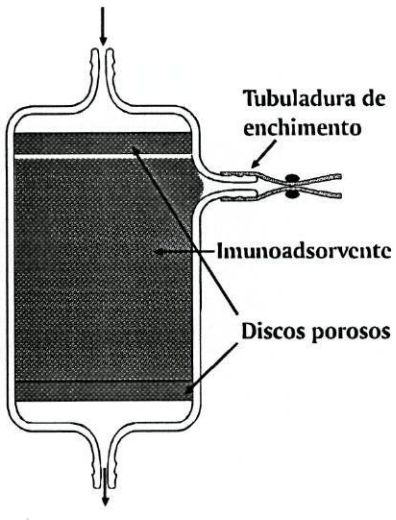


Figura VI-8 Construção de um imunofiltro.

Para o efeito utilizaram-se envólucros em vidro de borossilicato, que nos foram fornecidos pelos nossos colaboradores franceses, constituídos por um corpo cilíndrico com 7 cm de diâmetro e 8 cm de altura, fechado em ambos os topos por um disco poroso de vidro sinterizado, de malha G3, a que se seguem as tubuladuras de entrada e saída do plasma (figura VI-8). Junto ao topo superior existe uma tubuladura lateral por onde se faz o enchimento com a matriz do imunoadsorvente, após o que é selada. Às

tubuladuras dos topos foram adaptados segmentos de tubo de silicone, munidos de fechos de pressão.

Procedeu-se com estes protótipos a experiências de recirculação semelhantes às efectuadas em pequena escala, com as adaptações necessárias (volume de plasma de 2500 ml, fluxo de 30 ml/minuto). Realizaram-se duas "sessões de imunodepuração" de 3 horas com cada um dos protótipos, e uma terceira de 2 horas com mudança do BA9 (8) para o BA9 (10) a meio da sessão, para averiguar se a depleção de TTR no plasma estaria a ser limitada pela saturação dos imunofiltros, e logo se o uso de dois imunofiltros permitiria alcançar o mesmo grau de depuração num tempo mais curto. Como se pode ver no gráfico da figura VI-9, tal não é o caso, obtendo-se curvas de concentração da TTR quase sobreponíveis nas três experiências, sendo a redução da concentração de TTR no plasma satisfatória (85 a 90%) ao fim das 3 horas.

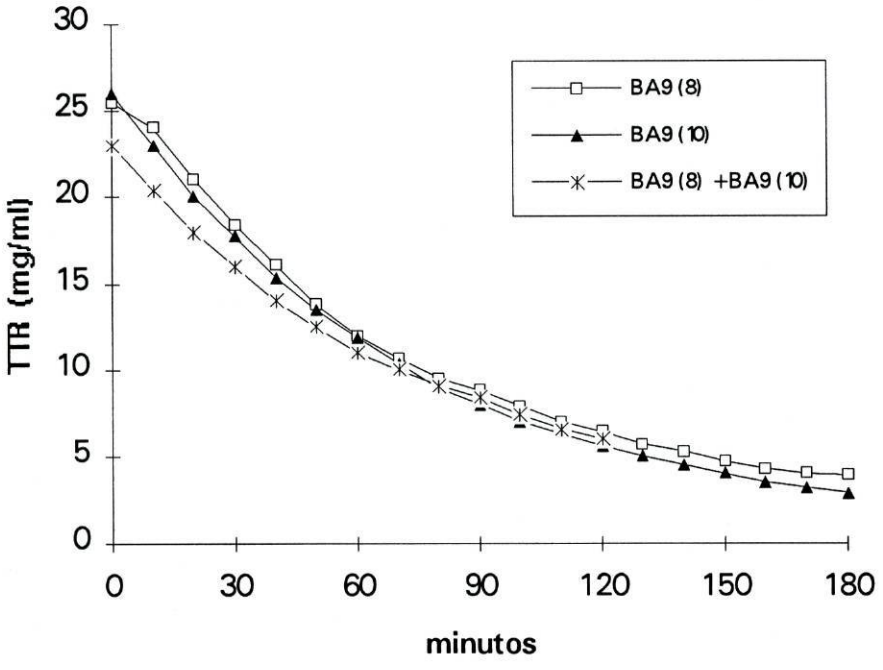


Figura VI-9 Simulação de uma sessão de imunodepuração com os protótipos BA9 (8) e BA9 (10) isoladamente, e com a utilização consecutiva dos dois por permutação aos 90 minutos da experiência. Recirculação de 2,5 litros de plasma com um fluxo de 30 ml/minunto. As diferenças observadas são pouco significativas.

Nestas experiências a quantidade total de TTR removida foi de 500 a 550 mg, ou seja, cerca de 80% da capacidade total calculada. Estes valores pareceram-nos satisfatórios, tendo sido a fase de desenvolvimento laboratorial dada como concluída, e os protótipos considerados como modelos adequados para os imunofiltros a submeter a ensaio clínico.

Imunodepuração - Ensaio clínico piloto

Considerações gerais

Ultrapassada a fase de desenvolvimento laboratorial dos imunofiltros anti-TTR, iniciaram-se diligências para a realização de ensaios clínicos, com a conjugação de esforços do Centro de Estudos de Paramiloidose e do Hospital Geral de Santo António.

Citando o Decreto-Lei Nº 97/94 ("ensaios clínicos"), Art 1ºnº2, "... entende-se por ensaio clínico todo o estudo sistemático com medicamentos a realizar em seres humanos, saudáveis ou doentes, com o objectivo de investigar ou verificar os efeitos e ou identificar qualquer efeito secundário dos medicamentos e ou estudar a sua absorção, distribuição, metabolismo e excreção, a fim de determinar a sua eficácia e segurança". Não sendo de todo claro que um imunofiltro se deva considerar um medicamento, sendo em alguns países considerado como tal e noutros como um dispositivo médico, sujeito a legislação menos estrita, é nossa convicção que as normas a eles relativas, criadas para proteger os indivíduos envolvidos e o público em geral, não se devem interpretar de forma muito restritiva, sendo de aplicar sempre que tal se assevere razoável.

A realização de um ensaio clínico desta natureza é um projecto ambicioso, que como de resto vem explícito no Decreto-Lei citado deve ser conduzido sobre estrito controlo de médicos devidamente qualificados, em instituição hospitalar. Foi pois necessário ao Centro de Estudos de Paramiloidose obter a colaboração de diversos Serviços do Hospital Geral de Santo António, de modo a garantir um acompanhamento clínico multidisciplinar e o apoio de pessoal médico e de enfermagem durante as sessões de tratamento. Nesse âmbito, e com o apoio directo do Ministério da Saúde, foi constituída no HGSA uma Unidade de Imunodepuração, dotada de instalações próprias, construídas para o efeito, dispondo de duas salas de tratamento onde decorrem as sessões, e de um laboratório onde se processa o fabrico e controlo laboratorial dos imunofiltros. Cada sala de tratamento foi equipada com um monitor de plasmaferese, mas o espaço disponível permite a realização de duas sessões por sala com a aquisição de mais equipamento, o que equivale a uma capacidade máxima previsível de 20 sessões semanais, ou seja, 10 doentes em regime de duas sessões por semana.

As condições gerais de ordem administrativa que o DL 97/94 impõe são a autorização para a realização do ensaio dada pelo órgão de administração da instituição onde este se realiza, mediante parecer favorável da comissão de ética, e a comunicação do início do ensaio ao Instituto Nacional de Farmácia e do Medicamento. A primeira foi obtida, para o que foi submetido à comissão de ética um protocolo promenorizado do ensaio clínico, que foi aprovado, não se tendo efectuado a comunicação atrás referida por o início do ensaio ter sido anterior a este Decreto-Lei.

No ensaio de uma nova terapêutica distinguem-se habitualmente fases, que nem sempre são estanques entre si, mas que permitem uma sistematização útil. Assim ao desenvolvimento e estudo laboratorial segue-se o ensaio piloto, em que os primeiros ensinamentos retirados da experimentação humana são utilizados para se avaliar a exequibilidade da terapêutica, e se realizam os primeiros estudos de natureza farmacológica. Esta fase de adaptação leva frequentemente a alterações aos planos originais, podendo ser necessário repensar a terapêutica e regressar aos ensaios laboratoriais. É esta a fase em que se encontra o ensaio de imunodepuração.

Ultrapassado o ensaio piloto, iniciam-se os ensaios clínicos propriamente ditos. Distinguem-se nestes três ou quatro fases:

Fase I - Realizada em poucos doentes, não tem por objectivo avaliar a eficácia do método, sendo basicamente estudos de segurança, em que os efeitos gerais da terapêutica, incluindo os efeitos secundários, são rigorosamente avaliados.

Fase II - Nesta fase, realizada em maior número de doentes, para além dos estudos de segurança avalia-se a eficácia do método.

Fase III - Ensaios alargados ao maior número de doentes possíveis, em que para além da confirmação da eficácia comprovada na fase II se procura avaliar os efeitos colaterais menos frequentes e os riscos que lhes estão associados.

É durante ou no fim desta fase que normalmente é pedida uma licença de comercialização, quando se trata de um produto que se pretende lançar no mercado farmacêutico.

Há quem distinga uma fase IV de ensaio clínico, correspondendo a ensaios realizados em produtos já comercializados, em que se pretende alargar as indicações de uso ou continuar os estudos do efeito a longo prazo, mas a sua separação da fase III é controversa.

O ensaio piloto é precedido normalmente por estudos farmacológicos e toxicológicos em animais, que no nosso caso se consideraram inexequíveis, pelo facto de o anticorpo a utilizar ser específico para a TTR humana, pelo que a informação recolhida de eventuais experiências seria de reduzidíssimo valor. Os estudos necessários à avaliação da segurança dos processos de imunoaferese em geral foram de resto já efectuados aquando do desenvolvimento de outras terapêuticas por imunodepuração, tendo aqui a sua justificação a opção durante o desenvolvimento laboratorial por técnicas e materiais largamente experimentados.

Tomada a decisão de se proceder a ensaios em seres humanos, optou-se por iniciá-los em doentes paramiloidóticos. Embora seja hábito realizarem-se os primeiros estudos de um novo medicamento em voluntários sãos, tal só se justifica quando os riscos inerentes à terapêutica se consideram mínimos. As técnicas de aferese que estão na base desta terapêutica envolvem riscos não desprezíveis, pois implicam a realização de cateterizações

profundas ou de fístulas arteriovenosas, e sujeitam o indivíduo a hipocoagulação. Foi igualmente tomado em consideração que os doentes escolhidos poderiam mais tarde transitar para os ensaios clínicos propriamente ditos, com ganho de tempo na avaliação da terapêutica e eventual benefício próprio, o que não é de desprezar numa doença cujo único tratamento comprovadamente eficaz é o transplante hepático, ao qual muitos doentes não chegarão infelizmente a ter acesso, mesmo que o desejem.

Seleccionaram-se para o início do ensaio piloto dois doentes, de entre um grupo de voluntários que preenchiam os critérios de inclusão iniciais, constantes do protocolo submetido à comissão de ética, e que se mantêm confidenciais, por razões deontológicas e humanitárias.

Fabrico dos imunofiltros

O fabrico de produtos terapêuticos contendo substâncias activas ("produtos medicinais") está estritamente regulamentado, tendo sido objecto de várias directivas Comunitárias[2] e de recomendações da Organização Mundial de Saúde[3], na sua quase totalidade já transportas para a legislação nacional. Toda esta actividade normativa, dirigida essencialmente para as condições a que deve obedecer um pedido de comercialização, encontra-se resumida em publicação da Comissão das Comunidades Europeias[4], parcialmente adaptada à legislação nacional pela antiga Direcção Geral dos Assuntos Farmacêuticos[5]. Ao examinar essa legislação, verifica-se ter esta sido em larga medida expressamente declarada como não aplicável a produtos de investigação, supomos que para não inviabilizar grande parte dos estudos de desenvolvimento pré-clínico de novos medicamentos. No entanto, as condições de aceitabilidade de um ensaio clínico como fundamento de um pedido de licença de comercialização quase que obrigam a que o produto a ensaiar seja fabricado em condições idênticas às do produto final, pelo que na prática, quando se alcança a fase I dos ensaios clínicos, a produção é já efectuada nos moldes definitivos. Isto é particularmente verdadeiro para os produtos biotecnológicos, logo para os anticorpos monoclonais, que pela sua natureza tornam extremamente difícil garantir que qualquer alteração ao processo de fabrico não leva a uma modificação do produto final.

Não estando ao nosso alcance, infelizmente, por manifesta falta de meios materiais e humanos, a produção de imunofiltros para o ensaio piloto em condições de controlo rigoroso semelhantes às exigidas de uma empresa farmacêutica, tentou-se tanto quanto

---

[2] Directiva 91/356/CEE de 13 de Junho de 1991, que estabelece os princípios e directrizes das boas práticas de fabrico de medicamentos para uso humano.

[3] Revised Requirements for biological Substances No. 1; WHO, TRS 323: Requirements for Manufactoring Establishments and Control Laboratories.

[4] CEC: Regras que regem os produtos farmacêuticos na Comunidade Europeia. Volumes I a IV.

[5] DGAF, Ministério da Saúde: Guia para o bom fabrico de medicamentos. Colecção "Legislação e documentação técnica - medicamentos e cosméticos" nº1. INCM.

possível cumprir um certo número de regras, de modo a garantir satisfatoriamente a segurança dos doentes.

Sendo o imunofiltro um dispositivo de uso parentérico, que tem de ser preparado assepticamente, não existindo método satisfatório para a sua esterilização final, um dos requisitos básicos a considerar é a de que todas as operações para a sua preparação, incluindo as que envolvem os produtos intermediários, devem ser realizadas em espaços protegidos de atmosfera classe A (menos de 1 microrganismo viável por m^3), situados numa sala limpa de classe B (menos de 5). Para esse efeito existe no laboratório da Unidade de Imunodepuração uma sala limpa dotada de uma câmara de fluxo laminar horizontal, onde se processam a maior parte das operações finais. As operações não realizadas dentro desta câmara são efectuadas tanto quanto possível em sistema fechado.

Outro requisito básico é o da realização de ensaios de esterilidade e apirogenicidade do produto final, que foram introduzidos no controlo de qualidade.

Nas secções seguintes consideraremos as particularidades de cada uma das operações que integram o fabrico dos imunofiltros.

Produção do anticorpo monoclonal

A produção do anticorpo monoclonal é o passo mais dispendioso e delicado em todo o processo de fabrico, assim como aquele que está sujeito a uma regulamentação mais estrita, que incide especialmente nas garantias de esterilidade e ausência de contaminação viral[6]. A fim de se satisfazerem minimamente essas garantias, foi constituído um "Master Cell Bank" (MCB) de 50 ampolas criopreservadas da linha celular de hibridoma 88.1.BA9, em parte guardado no CEP, em parte numa agência de salvaguada de linhas celulares, que foi submetido a uma bateria de exames que se discriminam na tabela VI-V.

Todos os testes foram negativos, com excepção do doseamento da transcriptase reversa, cujo resultado foi ininterpretável, e o exame em microscopia electrónica, que revelou a presença de algumas partículas intracelulares características de retrovírus de tipo C. Este resultado era esperado, pois todas as linhas celulares murinas possuem retrovírus endógenos, o que não impede a sua utilização. Tem apenas como consequência mandatar a realização de estudos que demonstrem a inactivação de estirpes víricas modelo durante a purificação do anticorpo monoclonal.

O primeiro passo na produção do anticorpo monoclonal foi a criação a partir do MCB de um "Working Cell Bank" (WCB) de 100 ampolas criopreservadas, após adaptação a meio de cultura quimicamente definido. É a partir do WCB que se inicia cada ciclo de produção.

---

[6] CEC: Validation of virus removal and inactivation procedures: Notes for guidance. Ad hoc Working Party on Biotechnology/Pharmacy (1987)

Tabela VI-V. Validação do MCB de 88.1.BA9

Teste de esterilidade para bactérias e fungos	Testes MAP (produção de anticorpos em murganhos) para os seguintes virus:
Pesquisa de micoplasmas	*Sendai*
	Pneumonia murina
Pesquisa de vírus MuLV ecotrópicos (placas XC)	*Hepatite murina*
	Parvovirus
Pesquisa estendida de vírus MuLV xenotrópicos (focos S^+L^-)	*Encefalomielite murina*
	Reovirus tipo 3
	Diarreia epizoótica do murganho
Pesquisa de virus bovinos	*Pneumonite murina*
	Ectromelia
Procura de efeito citopático em 3 linhas celulares	*Polioma*
	Adenovirus murino
Pesquisa de transcriptase reversa	*Coriomeningite linfocítica*
	Citomegalovirus murino
Perfil de 100 células em microscopia electrónica	*Virus tímico do murganho*
	Virus de Hantaan

A produção de BA9 teve de ser consideravelmente aumentada, para satisfazer as necessidades previsíveis. Admitindo-se um número máximo de 10 doentes em tratamento, e que cada um poderá necessitar, no pior dos casos, de três colunas por ano, sendo no fabrico de cada coluna utilizados cerca de 3 g de anticorpo monoclonal, e estimando-se o rendimento do processo de purificação em 75%, seriam necessários 120 g de anticorpo monoclonal por ano. Com um rendimento de 80 mg de anticorpo monoclonal por litro de meio de cultura (ligeiramente inferior aos valores por nós medidos em frascos cultivados até à exaustão), era preciso processar 1.500 litros de meio de cultura, o equivalente a 30.000 frascos de cultura de 150 cm^2. Foi pois necessário encontrar uma tecnologia alternativa. Assumindo 5 ciclos de produção por ano, de dois meses cada, em cada um dos quais se verificam 30 dias de produção à capacidade máxima, ou seja 150 dias por ano, está indicado um biorreactor capaz de processar 10 l de meio de cultura por dia. Consideraram-se três alternativas: biorreactores de cultura celular em suspensão por agitação de tipo clássico, de suspensão por bolhas de ar ("airlift"), e com imobilização das células em fibras ocas (figura VI-10).

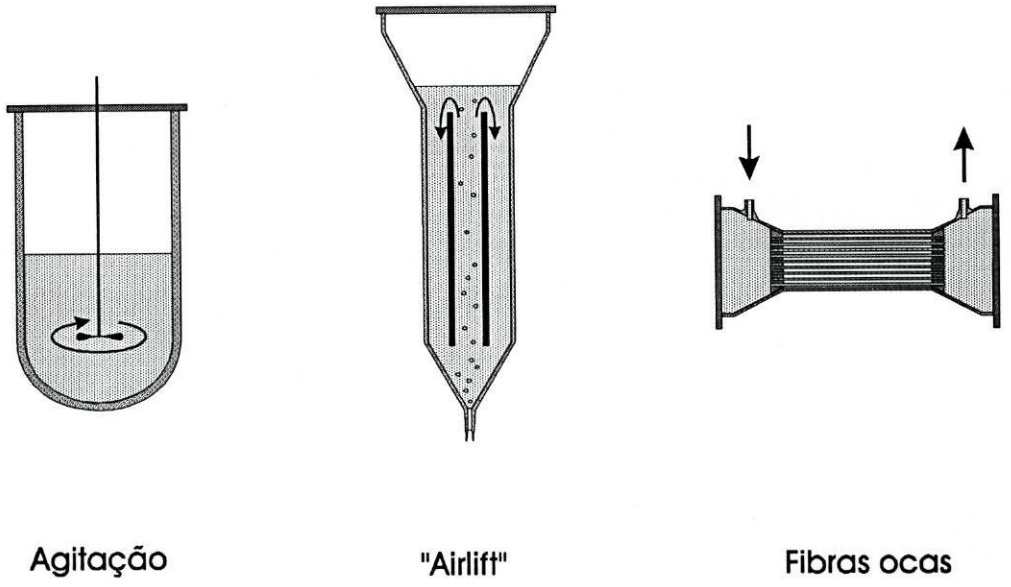


Figura VI-10. Tipos de biorreactores para cultura de células animais.

Um biorreactor para cultura de células em suspensão tem uma taxa de perfusão diária que ronda tipicamente os 0,5, o que significa que necessitaríamos de um equipamento com um volume útil de 20 litros. O biorreactor de agitação permite no entanto a utilização de sistemas de retenção celular, dos quais o mais utilizado é o "spin filter", com alguma vantagem sobre os sistemas de perfusão sem retenção celular, pelo menor volume necessário (4 a 5 vezes menor) e pela maior densidade celular atingida, pois existem dados que indicam ser uma densidade celular elevada favorável a uma mais correcta glicosidação do anticorpo monoclonal produzido (Maiorella et al., 1993). No entanto, os biorreactores que permitem as maiores concentrações celulares são sem dúvida os de fibras ocas, em que as células crescem formando mangas compactas em redor das fibras. Estes biorreactores têm uma outra característica, que nos levou a optar por eles. Retêm no espaço extracapilar não só as células como também o anticorpo secretado, pois as fibras ocas utilizadas têm um limite de exclusão molecular de 10 a 30 kDa. O efluente recolhido desse compartimento tem um pequeno volume e uma elevada concentração de anticorpo, o que simplifica extraordinariamente a purificação posterior. Acresce ainda o facto de estarem disponíveis comercialmente unidades compactas e muito automatizadas, que exigem pouco tempo de atenção do operador. Optamos no nosso caso por uma unidade Acusyst-Jr da firma Endotronics, que satisfazia aparentemente os critérios mínimos de produtividade necessários. Este tipo de biorreactor adapta-se bem à produção à escala piloto, mas não é adequado para escalas de produção maiores, pois não é escalável geometricamente, sendo a expansão feita por multiplicação do número de unidades de fibras ocas, o que torna rapidamente o seu custo proibitivo.

Cada ciclo de produção (figura VI-11) inicia-se com a descongelação do hibridoma e da sua expansão em frascos de cultura até se obter um inóculo de cerca de 10^8 células. Este inóculo é utilizado para o arranque do biorreactor.

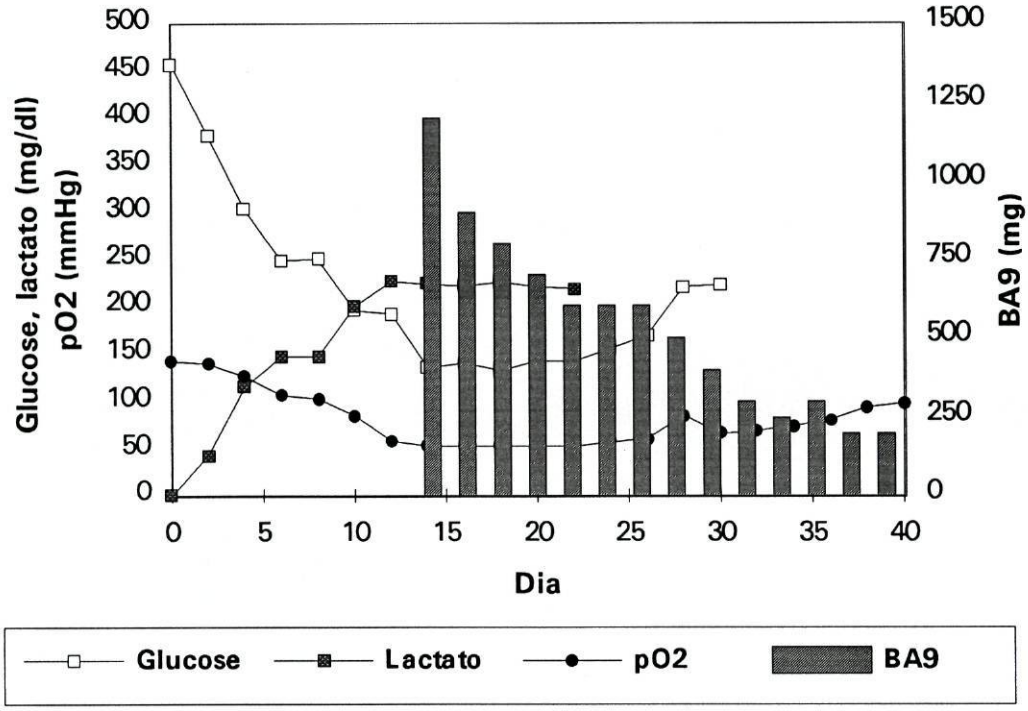


Figura VI-11 Ciclo de produção típico do biorreactor de fibras ocas. A produção decai marcadamente para lá dos 30 dias, provavelmente pela acumulação de detritos celulares.

Dez a catorze dias após o arranque inicia-se a colheita do meio de cultura contendo o anticorpo monoclonal, que se recolhe em fracções correspondendo a 2-3 dias de produção (400 a 800 ml). A quantidade de anticorpo produzido decai progressivamente ao longo do tempo, devido à acumulação de células mortas entre as fibras ocas, de tal modo que ao fim de 3 a 4 semanas desce a níveis inaceitáveis e o ciclo é terminado. Este é, na nossa experiência, o maior inconveniente deste tipo de biorreactor, e uma das principais razões que determinou a obtenção de quantidades de anticorpo monoclonal aquém do esperado.

As fracções obtidas do processo de fermentação, após clarificação por centrifugação, foram submetidas a um processo de purificação cromatográfica em dois passos. O primeiro, o passo de captura, é uma cromatografia de troca catiónica realizada numa coluna de SP-Sepharose FF (Pharmacia) com 5 cm de diâmetro e 7,5 cm de altura, equilibrada com tampão citrato/fosfato 50 mM pH 3,5. O produto clarificado é diluído 1:3 com H_2O, e o pH ajustado a 3,5 com ácido cítrico, após o que é passado pela coluna a 50 cm/hora. Após lavagem desta com citrato/fosfato, o anticorpo é eluído com tampão de fosfato de sódio 100 mM, NaCl 500 mM, pH 9, também a 50 cm/hora. O pico de eluição contendo o anticorpo, com um volume de 150 a 200 ml, é directamente carregado no 2º passo cromatográfico,

uma filtração em gel de exclusão molecular para polimento final, realizada com uma coluna de Sephacryl S-300 HR (Pharmacia) com 10 cm de diâmetro e 67 cm de altura. A coluna é equilibrada e eluída com tampão carbonato/bicarbonato 100 mM, NaCl 500 mM, pH 8,5, a 20 cm/hora. O rendimento conjunto destes dois passos é superior a 85%.

Os lotes intermediários de anticorpo monoclonal assim obtidos, após ensaios de controlo de qualidade (figura VI-12), são reunidos em lote final, que após concentração por ultrafiltração e testes adicionais pode ser utilizado directamente para a preparação dos imunofiltros.

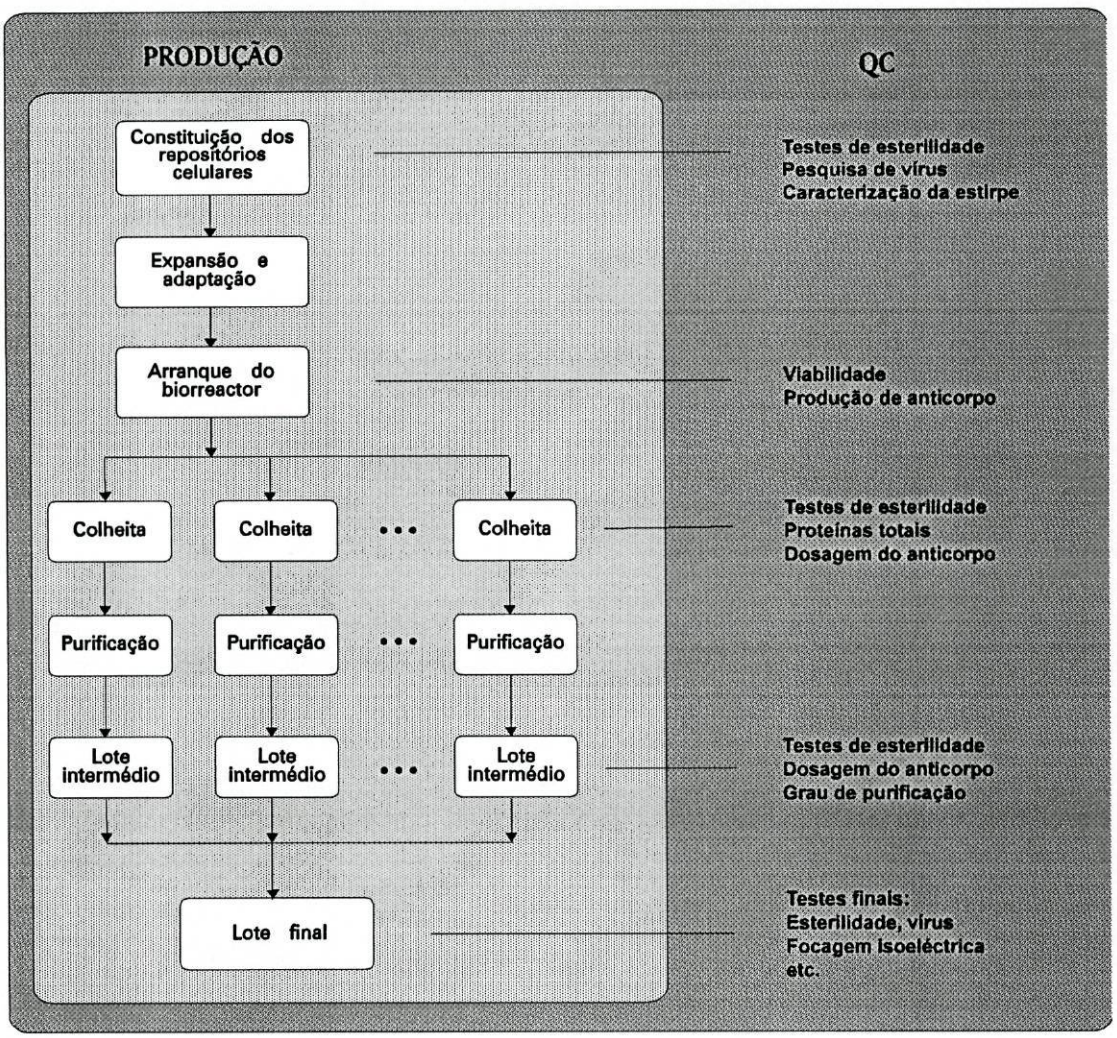


Figura VI-12 Produção de anticorpo monoclonal: controlo de qualidade.

As especificações para os lotes finais do anticorpo monoclonal BA9 são as seguintes:

1. Concentração de 8 a 12 mg/ml em tampão carbonato/bicarbonato 0,1M, NaCl 0,5M, pH 8,5.

2. Padrão de bandas em SDS/PAGE e em IEF conformes com o produto de referência.

3. Esterilidade e apirogenicidade (endotoxinas [LAL] < 10 EU/ml).

Preparação dos imunoadsorventes e enchimento dos imunofiltros

O protocolo de activação da Sepharose CL-4B pelo CNBr e acoplamento do anticorpo monoclonal foi essencialmente o mesmo utilizado para as experiências em pequena escala. A modificação mais importante, condicionada pela necessidade de manipulação asséptica e pelos volumes bastante maiores de reagentes utilizados, foi a realização de todo o processo em reactor de vidro fechado, esterilizável por autoclavagem, especialmente concebido para o efeito (figura VI-13). Este é composto por um corpo com um volume útil de 2 litros, limitado em baixo por uma placa de vidro sinterizado de malha G3, a que se segue uma curta câmara de escoamento fechada por uma válvula manual. A peça que fecha o topo do reactor possui diversas tubuladuras cónicas de acesso, uma central utilizada pela vareta de agitação, sendo as outras utilizadas para entrada dos reagentes, por um tubo de drenagem e pelo elétrodo de pH.

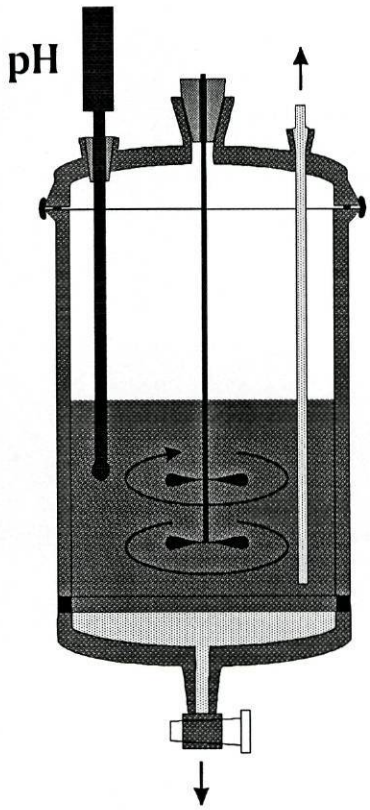


Figura VI-13 Reactor de activação pelo CNBr.

Todas as peças que constituem o reactor de activação, os frascos para as diferentes soluções e os tubos de conexão, assim como a Sepharose, são autoclavados antes da montagem do reactor, sendo as soluções esterilizadas por filtração. O aporte das soluções faz-se por gravidade a partir de ampolas adaptadas às rodagens cónicas no topo do reactor, ou com uma bomba peristáltica. O escoamento de líquidos pela válvula inferior é também feito por sucção com uma bomba peristáltica. A transferência do imunoadsorvente para o envólucro do imunofiltro é feita por aspiração pelo tubo de drenagem atravéz de um tubo de conexão estéril, garantindo a assépsia de todo o processo, incluindo o enchimento final.

O envólucro utilizado para os imunofiltros é o mesmo que foi empregue para os protótipos. A ele foi adaptado um sistema de ligação constituído por tubos de silicone com ligações e terminações de tipo Luer em polipropileno. O envólucro é despirogenizado por aquecimento a 250°C por 16 horas, e todo o conjunto é esterilizado por autoclavagem antes do enchimento.

Os únicos materiais com que o plasma do doente entra em contacto, para além da matriz do filtro, são o vidro de borossilicato, silicone e polipropileno.

Testes finais

Após o enchimento, os imunofiltros são lavados com soro fisiológico, sendo o produto da lavagem utilizado para os testes de esterilidade e apirogenicidade.

Os testes de esterilidade foram realizados por inoculação do lavado em placas de meio gelose sangue e Sabouraud, incubadas a 37 °C por 48 horas.

Os testes de apirogenicidade foram realizados em coelhos, segundo a farmacopeia americana, por especial favor da firma Paracélsia.

Parte do imunoadsorvente (cerca de 30 ml) foi empacotado numa coluna de cromatografia de 26 mm ∅, para se determinar a capacidade de adsorção de TTR, por processo idêntico ao descrito para os estudos laboratoriais.

Resultados

A produção de imunofiltros para o ensaio piloto sofreu inúmeras vissicitudes, em parte resultantes da nossa falta de experiência numa área que se encontra fora do âmbito clínico e laboratorial, a que se somaram infortúnios diversos, desde avarias do biorreactor a cortes prolongados de corrente eléctrica, que condicionaram uma produção de anticorpo monoclonal muito aquém do esperado. O processo de activação em maior escala também se revelou pouco reproductível, sendo as maiores dificuldades encontradas a manutenção da temperatura em valores aceitáveis, e a instabilidade do sensor de pH. Apesar disso, realizaram-se alguns imunofiltros, que permitiram o início do ensaio piloto, cujas características se encontram na tabela VI-VI.

Tabela VI-VI. Imunofiltros realizados

Lote	Rendimento de ligação	Concentração de anticorpo (mg/ ml)	Capacidade total (mg de TTR)	Imunofiltro	Destinatário
C01	93,1%	5,74	430	/1	EP1
				/2	EP2
C02	36,7%	3,05	230	/1	Rejeitada
				/2	Rejeitada
C03	84,4%	8,19	615	/1	EP1
C04	82,1%	6,38	480	/1	EP3
				/2	EP4

Ficou-nos todavia a certeza que a produção de imunofiltros em maior escala é incomportável nas condições de um laboratório de investigação como o nosso, sendo absolutamente necessária a sua transferência para o sector industrial se se pretender dar continuidade à imunodepuração.

Realização do ensaio piloto

Os ensaios foram inicialmente realizados em dois doentes, que denominaremos EP1 e EP2, seleccionados de um grupo de voluntários que satisfazia os critérios de inclusão, após a obtenção de consentimento informado. Reproduzimos alguns dados clínicos e biológicos destes doentes na tabela VI-VI.

Tabela VI-VI. Doentes submetidos a ensaio.

	EP1	EP2
Sexo	M	F
Idade	31	31
Tempo de evolução da doença	5	5
Perda de sensibilidade	+	+
Perda motora	+	-
Disautonomia	+	++
Peso	47 Kg	53 Kg
Altura	160 cm	160 cm
Volume plasmático estimado	2,2 l	2,2 l

Após o período de desenvolvimento das fístulas arteriovenosas, realizadas no antebraço em ambos os doentes, iniciaram-se as sessões de imunodepuração em monitores de plasmaferese PEM 10 (Excorim) munidos de plasmafiltros PF2000 (Gambro), sendo o imunofiltro ligado à saída da bomba da linha de plasma, e o plasma tratado reconduzido à linha venosa após aquecimento (figura VI-14). A hipocoagulação foi assegurada por um *bolus* inicial de 1500 a 2000 UI de heparina, seguida de 1000 a 2000 UI por hora em infusão contínua, até ao final da sessão. A inibição da activação do complemento foi realizada por adição ao plasma de 4 ou 6% de uma solução isotónica de citrato de sódio (3,8%), imediatamente antes da entrada no imunofiltro.

Após um periodo inicial de experimentação, as sessões foram efectuadas em EP1 com um fluxo de plasma de 30 ml/min para um volume de plasma tratado de 4,7 litros, ao fim dos quais o imunofiltro se encontrava saturado, e em EP2 com um fluxo de plasma de 20 ml/min para um volume de plasma tratado de 4,4 litros. O fluxo de plasma em EP2 não pôde ser aumentado acima deste valor devido ao aparecimento de sintomas de hipocalcémia (induzida pelo citrato).

EP1 realizou um total de 35 sessões, entre Abril e Dezembro, as primeiras 22 numa base semanal, e as restantes bissemanais, com pequenas interrupções. Por falha logística, não dispomos de dados bioquímicos das sessões 34 e 35.

EP2 realizou 20 sessões, em regime semanal, também com algumas interrupções.

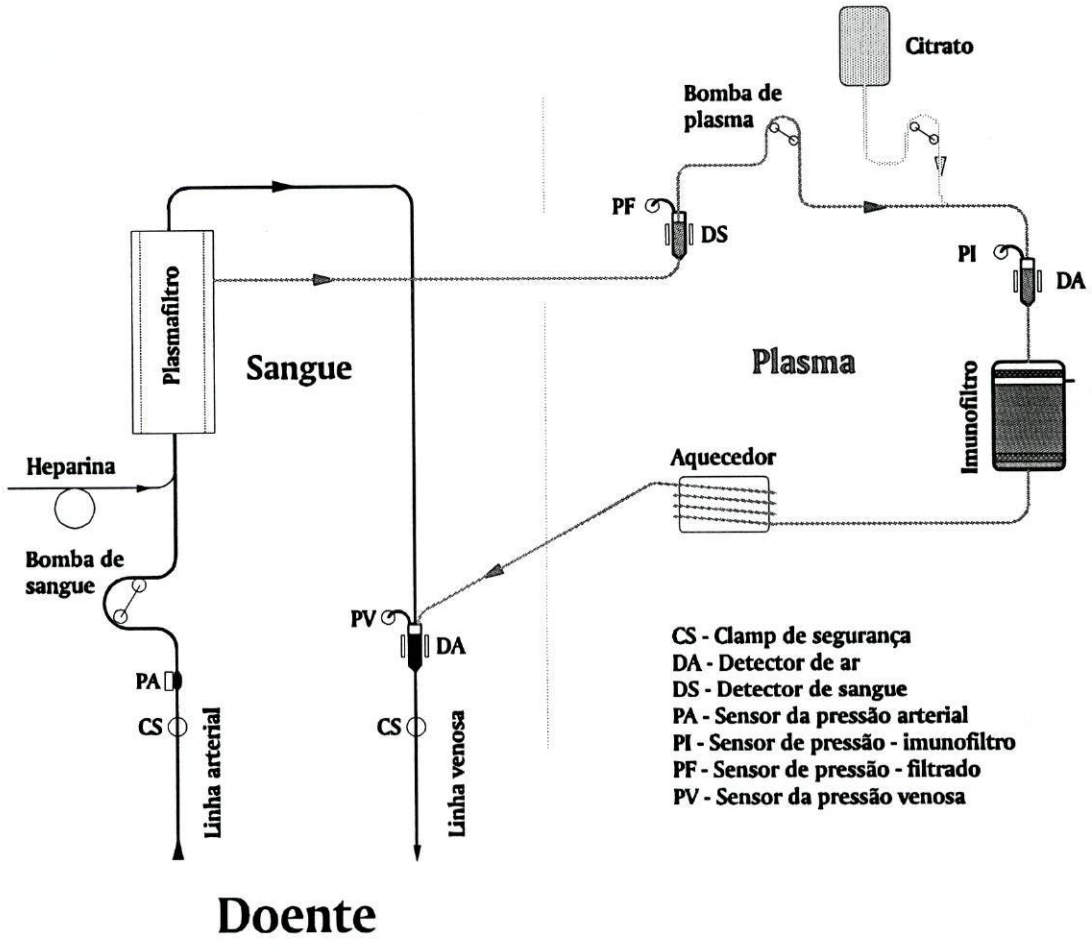


Figura VI-14 Esquema da circulação extracorporal durante uma sessão de imunoaferese.

Controlo laboratorial

Para além de análises de controlo hematológico antes e no fim das sessões, e de controlo bioquímico regular, foram retiradas três amostras de sangue (antes, no meio e no fim) para avaliação do sistema do complemento, durante as primeiras sessões. Pontualmente, efectuaram-se medições do cálcio ionizado e avaliou-se o equilíbrio ácido-base. Para avaliação da eficácia bioquímica da imunodepuração retiraram-se amostras de sangue da linha arterial a intervalos regulares, que foram de 10 minutos nas primeiras sessões, sendo posteriormente aumentados para 20 minutos.

Resultados

Eficácia bioquímica

Os gráficos seguintes da variação da concentração de TTR ao longo das sessões documentam a eficácia bioquímica da imunodepuração nestes dois doentes. O primeiro gráfico mostra a descida da concentração plasmática de TTR durante as primeiras sessões. A descida teve uma cinética exponencial, com um tempo de redução a metade da concentração de cerca de 30 minutos para EP1 e de 20 minutos para EP2.

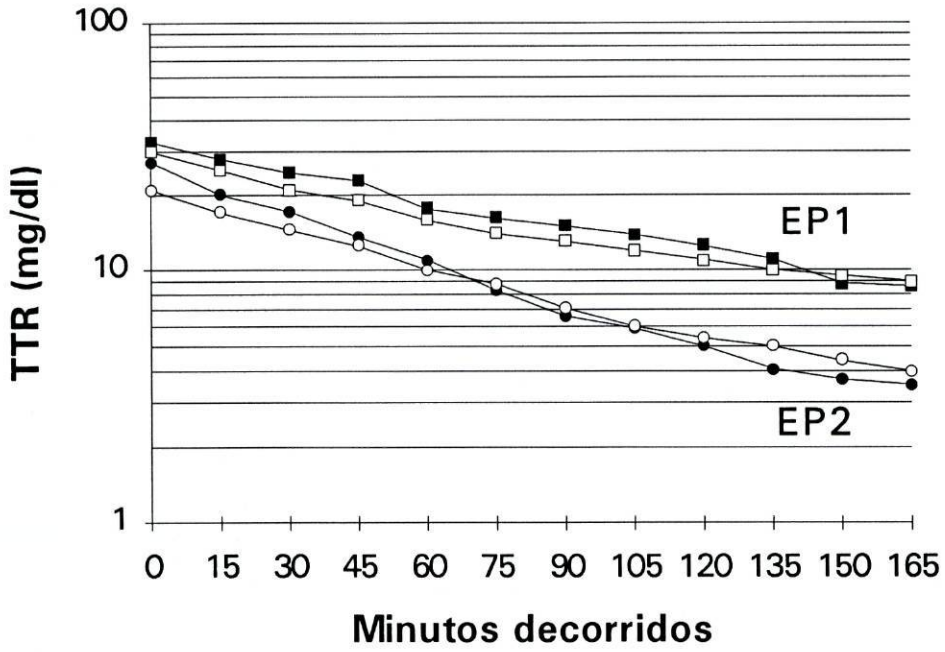


Figura VI-15 EP1 e EP2: perfil logarítmico da descida da concentração plasmática de TTR durante duas das primeiras sessões.

Ao examinarem-se as variações analíticas ao longo da semana, verificou-se uma rápida subida dos valores da concentração de TTR nas primeiras 24 horas, provavelmente devida a refluxo da TTR do compartimento extravascular, a que se seguiu uma subida mais lenta até aos valores anteriores à sessão ao fim de 3 a 4 dias (figuras VI-16 e VI-17). Os valores de albumina, em comparação, mantiveram-se inalterados. O imunoensaio por FD6 sofre variações erráticas durante a sessão de tratamento, aumentando em geral no início, mas ao longo dos dias seguintes mantêm valores inferiores aos anteriores ao tratamento.

Em EP2 foram efectuadas medições da concentração de RBP. A descida é à primeira vista paralela à da TTR, mas se se observar a evolução da razão RBP/TTR (figura VI-18), verifica-se que há uma depleção preferencial de TTR durante a sessão. Como essencialmente todo o RBP circulante se encontra ligado à TTR, este facto poderá denotar uma melhor afinidade do 88.6.BA9 pela TTR livre do que pela TTR complexada com RBP.

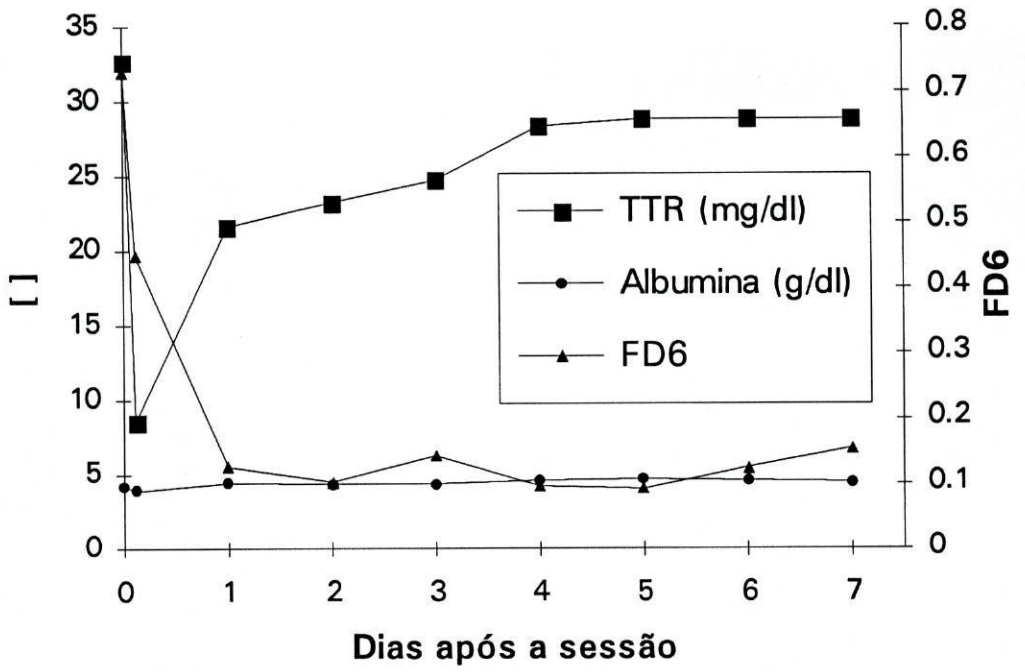


Figura VI-16 EP1: Evolução da concentração de TTR e albumina, e do imunoensaio com FD6, durante e no intervalo entre sessões.

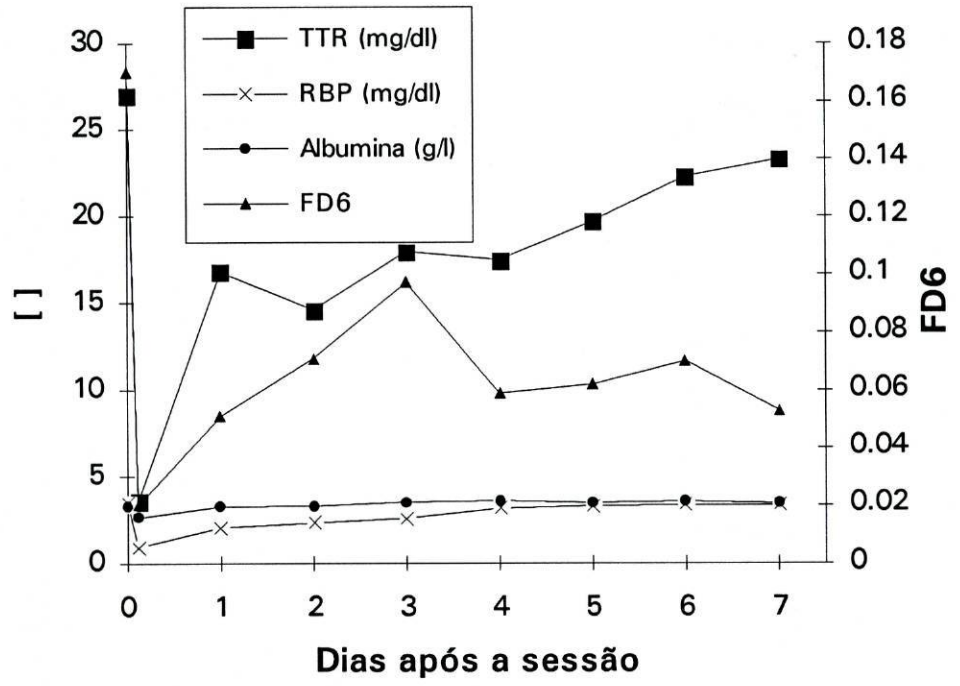


Figura VI-17 EP2: Evolução da concentração de TTR, RBP e albumina, e do imunoensaio com FD6, durante e no intervalo entre sessões.

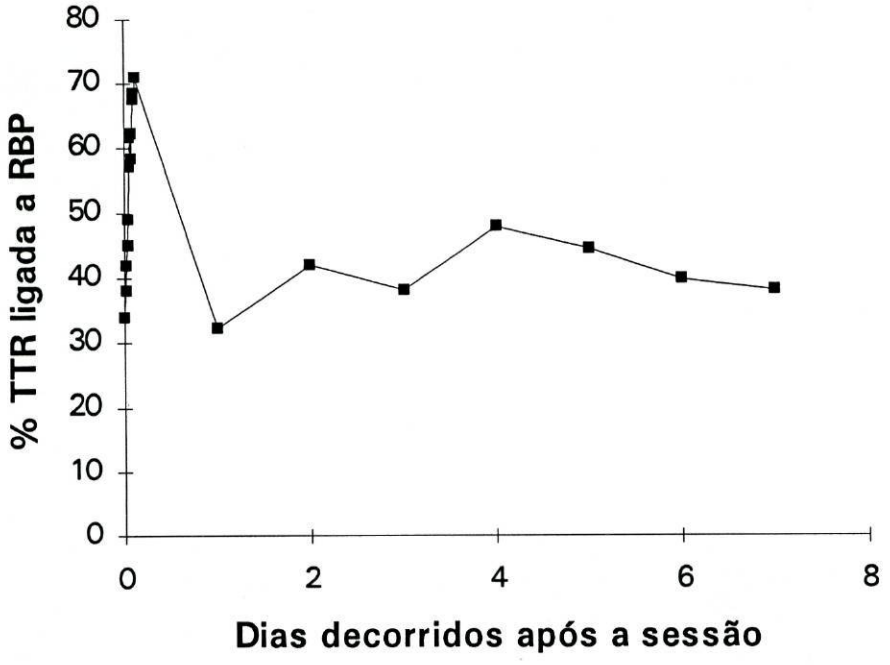


Figura VI-18. EP2: Razão molar complexos (TTR•RBP) / (TTR total) durante e após as sessões de tratamento.

A evolução dos valores de TTR nestes doentes durante as primeiras 20 sessões encontra-se representada graficamente nas figuras VI-19 e VI-20.

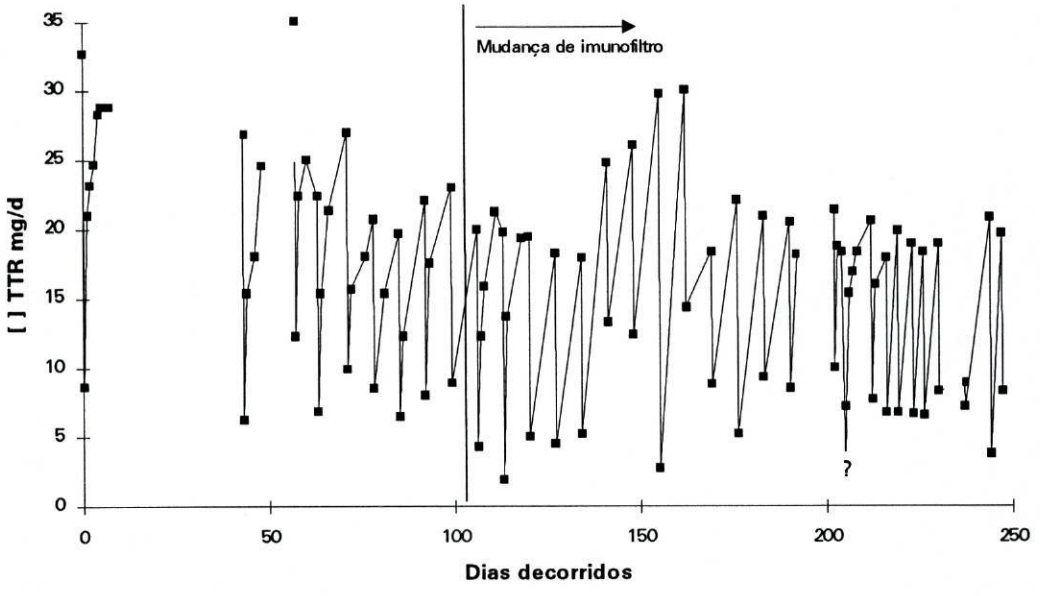


Figura VI-19 EP1: Evolução da concentração plasmática de TTR durante o ensaio. A linha separadora vertical indica a mudança de imunofiltro realizada. Não há dados das sessões 34 e 35.

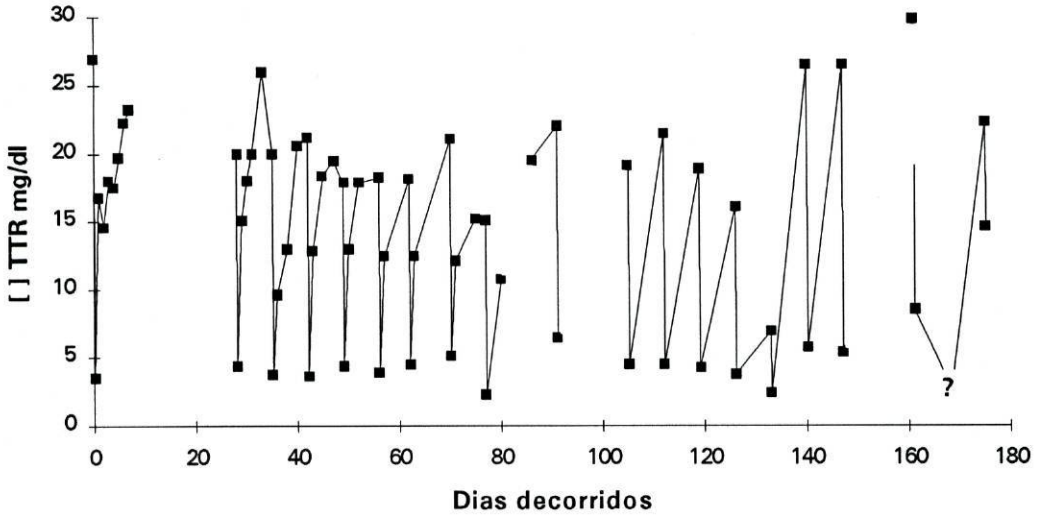


Figura VI-20 EP2: Evolução da concentração plasmática de TTR durante o ensaio.

A descida da concentração plasmática de TTR foi considerada insatisfatória nas primeiras sessões do doente EP1, pelo que se substituiu o imunofiltro original por um de maior capacidade à décima sessão. Este doente abandonou o ensaio por queixas de mal-estar incontrolável, por vezes acompanhadas de perturbações hemodinâmicas, cuja causa não se conseguiu elucidar.

O decorrer do ensaio no doente EP2 foi marcado pela impossibilidade em manter a fístula arteriovenosa funcionante, obrigando a diversas pausas e intervenções cirúrgicas, tendo mesmo algumas sessões sido realizadas por cateterização central, sendo o ensaio terminado em consequência da nossa incapacidade em manter o acesso venoso em condições de segurança aceitáveis.

A eficácia bioquímica deste método de depuração da TTR foi um pouco inferior ao esperado, e algo errática (figuras VI-21 e 22). O efeito das sessões em EP2 foi relativamente consistente, com uma descida média da concentração plasmática de TTR de 16,2 mg/dl, a que correspondeu a eluição do imunofiltro, em média, de 334 mg de TTR.

O comportamento com EP1 foi algo errático. A descida média da concentração plasmática de TTR foi, para o primeiro imunofiltro, de 17,0 mg/dl, a que correspondeu a eluição, em média, de 238 mg de TTR. Como estes valores foram considerados insuficientes, substituiu-se o imunofiltro na 10ª sessão. O segundo imunofiltro teve um comportamento distinto na 1ª fase, da 10ª à 18ª sessão, e nas sessões restantes. Na 1ª fase deu razão à suspeita de capacidade insuficiente do 1º imunofiltro, realizando uma descida média da concentração plasmática de TTR de 15,8 mg/dl, a que correspondeu a eluição, em média, de 312 mg de TTR. Na segunda fase, infelizmente, e por razões que não conseguimos apurar, deu-se uma degradação abrupta da capacidade do imunofiltro, sendo a descida

média da concentração plasmática de TTR de 11,7 mg/dl, e a quantidade de TTR eluída, em média, de 180 mg.

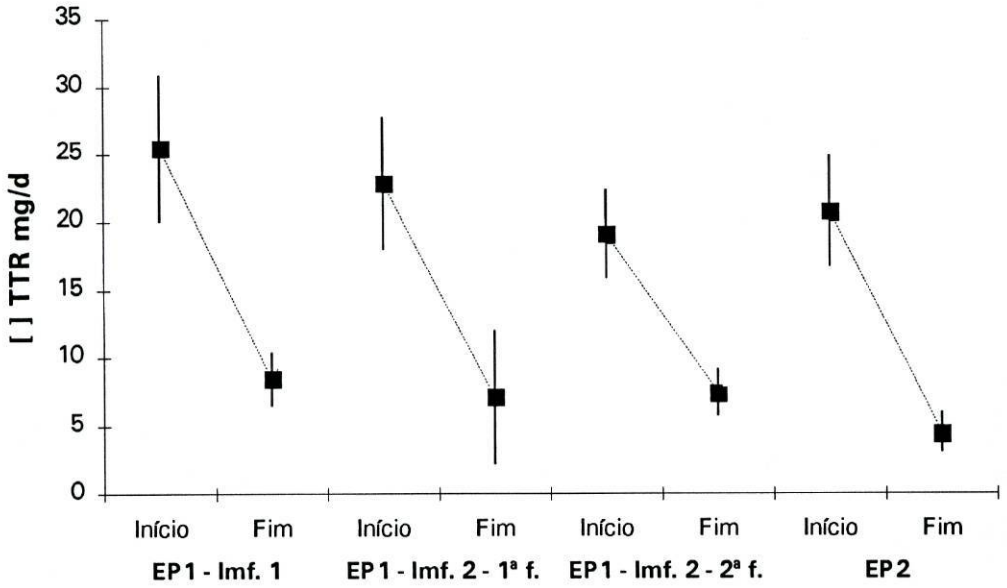


Figura VI-21 Valores da concentração plasmática de TTR no início e fim das sessões (médias e desvios padrões).

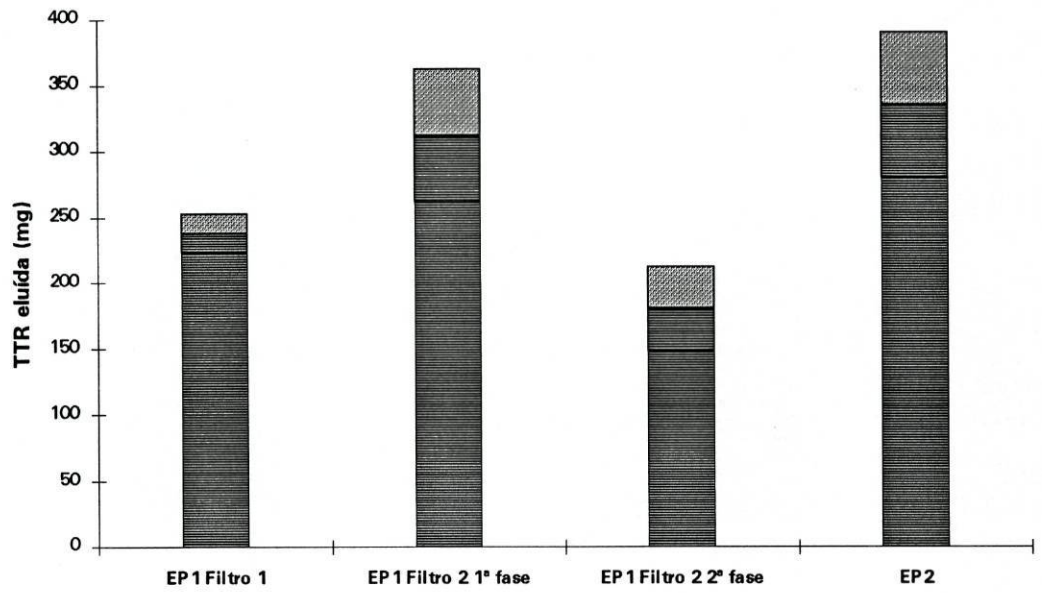


Figura VI-22 TTR eluída dos imunofiltros (médias e desvios padrões).

Estes valores são bastante inferiores à capacidade teórica dos imunofiltros, e menos do que a produção diária de TTR.

Observação clínica

Não se observaram reacções graves associadas ao tratamento. As complicações mais frequentes foram:

- Náusea e parestesias transitórias aparentemente devidas a hipocalcémia (resultante da administração de citrato), particularmente frequentes em EP2, que se conseguiu prevenir em grande parte com a administração de cálcio por via oral ou parentérica.

- Rubor facial, que em EP2 se acompanhou por vezes por sensação de aperto glótico, e raramente por ligeira baixa da tensão arterial. Estas reacções, que se pensa estarem relacionadas com a activação do sistema do complemento (ver adiante), coincidiram no tempo com o início da reentrada do plasma tratado na circulação, 15 a 20 minutos após o início da sessão. Tiveram um carácter transitório, resolvendo-se espontaneamente, necessitando apenas, por vezes, de uma diminuição temporária do fluxo de plasma, até ao seu desaparecimento.

O maior problema que enfrentamos foi o da manutenção do acesso venoso no doente EP2. Esta doente tem uma disautonomia significativa, com hipotensão postural sintomática, que provavelmente contribuiu para o colapso repetido da fístula arteriovenosa, obrigando a intervenções cirúrgicas repetidas e a cateterizações profundas, cujo risco se considerou inaceitável para um estudo desta natureza, obrigando à interrupção definitiva deste. É provavel que este venha a ser um dos grandes problemas para alguns destes doentes, uma vez que a hipotensão postural é comum nesta doença. A utilização de equipamento de plasmaferese por centrifugação, cuja eficiência permite a utilização de fluxos sanguíneos menores, talvez evite a necessidade da realização de fístulas arteriovenosas em alguns doentes, ultrapassando este problema.

Em EP1 surgiram, nas últimas sessões, geralmente para o fim destas, queixas de mal estar geral, acompanhadas de dores ou caimbras nos membros inferiores, que se foram tornando cada vêz mais insistentes, levando em algumas delas à sua terminação prematura. Na sessão 34 verificou-se um episódio de hipotensão, e na sessão 35 náuseas intensas que motivaram o fim prematuro desta, pelo que se impôs uma pausa para repouso e avaliação que se estendeu por 3 meses. Após esta, tentou-se o recomeço das sessões, mas a instalação quase imediata de mal estar e dores tibiais, que desta vêz se acompanharam de vómitos e taquicardia paroxística, levaram a que se abortasse a sessão com apenas 1,5 litros de plasma tratados, e ao abandono definitivo do ensaio.

Não se observou alteração do quadro neurológico destes doentes durante o período do ensaio, para além de uma ligeira progressão da incapacidade motora em EP1. Essa avaliação não era, de resto, o objectivo do ensaio piloto, nem o tempo decorrido seria suficiente para isso face à lenta evolução da doença.

Uma observação curiosa foi uma diminuição substancial das queixas do foro digestivo em ambos os doentes, em particular das diarreias e da intolerância alimentar, que em EP1 foi substituída na 1ª fase do ensaio por um quadro de bulimia que tomou proporções quase alarmantes. Estas modificações, que já foram notadas nos doentes transplantados, são no entanto difíceis de objectivar, sendo particularmente influenciadas pelo estado anímico dos doentes, pelo que não lhes atribuímos grande valor.

Outra observação de significado incerto, foi a perda de cabelo que se notou em ambos os doentes após alguns meses de ensaio.

Entre a primeira e a última sessão EP1 aumentou de 47 para 49 Kg, e EP2 diminuiu de 53 para 50 Kg.

Parâmetros laboratoriais

Não se observaram alterações significativas nos parâmetros bioquímicos e hematológicos vigiados durante e após as sessões de imunoadsorção, com raras excepções. O achado mais significativo foi um dramático aumento de C3d durante as sessões, denotando a activação do sistema do complemento, não se acompanhando todavia de consumo aparente de C3 ou C4 (figura VI-23). Este fenómeno observa-se em maior ou menor grau em todos os processos de aferese, não estando descritas complicações significativas que lhe tenham sido atribuídas. Não o consideramos motivo de preocupação.

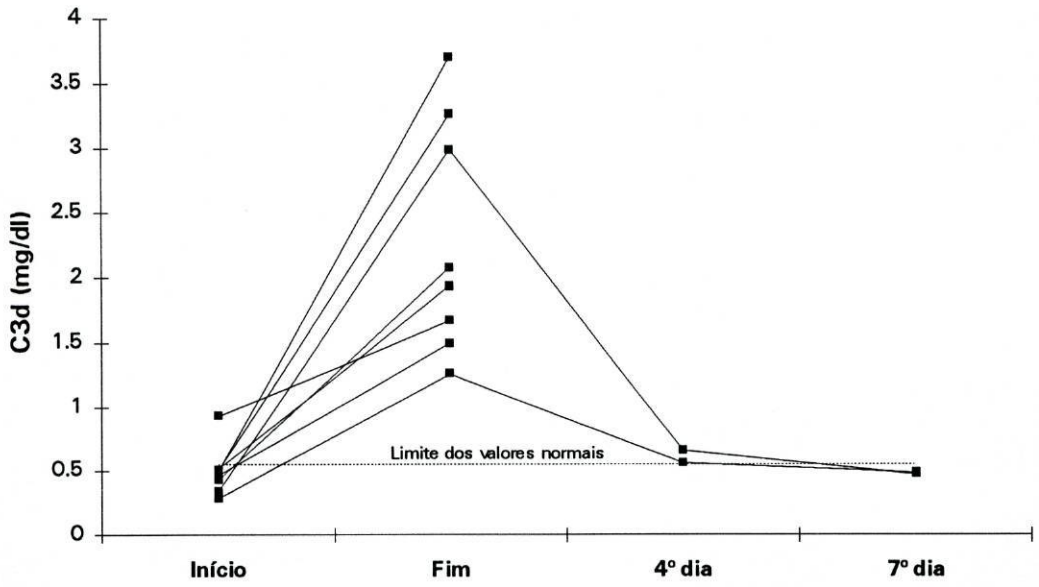


Figura VI-23 Variação de C3d durante e após as sessões de imunodepuração. Valores corrigidos para a hemodiluição.

Outra observação constante foi uma hemodiluição de 25 a 30% entre o início e o fim das sessões, que se traduziu pela redução correspondente em todos os valores hematológicos e bioquímicos.

Outras alterações dignas de nota foram a baixa transitória do cálcio ionizado, e uma moderada alcalose metabólica no final das sessões, que se atribuíram à infusão de citrato.

Em EP2 observou-se ainda uma baixa progressiva do hematócrito e da hemoglobina, que atingiram 25% e 8,4 g/dl, respectivamente, tendo-lhe sido detectada uma anemia ferripriva e instituído tratamento, recuperando o hematócrito para 33% e a hemoglobina para 10,9% no final do ensaio. Um problema adicional nesta doente foi a presença de proteinúria significativa, já detectada nos exames realizados que precederam o início do ensaio, e que no decurso deste oscilou erraticamente entre 0,8 e 4,6 g/24h, nas análises efectuadas. Esta proteinúria não se acompanhou de evidência laboratorial de consumo de complemento entre as sessões, ou pela presença de complexos imunes circulantes, pelo que se atribuíu ao envolvimento renal pela amiloidose subjacente.

No controlo final de T_3, T_4 e TSH não se encontraram alterações.

Testes preliminares de pesquisa de anticorpos anti-Ig de murganho, realizados pelo Dr. C. Rivat, por protocolo de ELISA, em amostras de soro de ambos os doentes, obtidas antes e após o início do ensaio, ainda que sem valor quantitativo, demonstraram claramente a imunização destes para o anticorpo monoclonal do imunofiltro. Este resultado poderá, eventualmente, explicar algumas das reacções tardias observadas em EP1.

Conclusão

A imunodepuração revelou-se moderadamente eficaz na remoção da TTR, impondo-se no entanto a realização de estudos adicionais no sentido de se melhorar essa eficácia, por aumento da capacidade dos imunoadsorventes, ou talvez encarando a hipótese do recurso a um sistema de duas colunas. Dada a rápida recuperação dos níveis séricos de TTR nos 3 dias seguintes à realização das sessões, serão provavelmente necessárias pelo menos duas sessões semanais para assegurar a diminuição efectiva da concentração média de TTR ao longo do tempo.

Não se observaram reacções adversas graves, que impossibilitassem o tratamento, sendo no entanto preocupante a imunização dos doentes para o anticorpo monoclonal do imunofiltro, que no nosso entender aconselha a realização de estudos no sentido de diminuir a libertação de anticorpo para a circulação dos doentes.

A avaliação da eficácia clínica deste terá de aguardar a realização de ensaios mais prolongados de fase I e II. Caso tal se venha a comprovar, será uma alternativa promissora à transplantação hepática para os doentes que não queiram ou não possam a ela recorrer, até ao dia já não muito distante em que a terapia genética, estamos convictos, providenciará um tratamento mais eficaz e menos penoso para esta doença.

Capítulo VII

Conclusão

Os trabalhos estudados nos capítulos anteriores provavelmente encerram, com a sua conclusão, o ciclo da abordagem imunoquímica da Polineuropatia Amiloidótica Familiar. Não porque esta tenha esgotado a sua utilidade, como certamente se comprovará repetidamente ao longo dos próximos anos, mas porque terá de ceder a primazia a novas tecnologias, com melhores perspectivas de ultrapassar os desafios que a investigação desta doença nos coloca neste momento.

Na nossa opinião, a elucidação da patogénese desta doença encontra-se próxima, vindo a resultar, provavelmente, dos progressos realizados em três frentes distintas:

- Estudos sobre os mecanismos da fibrilogénese, essencialmente realizados *in vitro*, talvez o campo em que se têm observado os progressos mais promissores (Kelly e Lansbury, 1994). Eventualmente, a imunoquímica poderá aqui dar ainda um contributo, fornecendo sondas específicas para os intermediários conformacionais postulados por alguns investigadores a partir dos estudos de fibrilogénese *in vitro*, sondas que poderão demonstrar a presença dessas espécies moleculares *in vivo*. O nosso anticorpo 88.6.FD6 encontra-se aparentemente próximo desse objectivo.

- Estudos de estrutura por novos métodos biofísicos, em particular novos desenvolvimentos na espectroscopia no infravermelho (Halverson *et al.*, 1991) e na aplicação da ressonância magnética nuclear ao estado sólido (Griffiths e Griffin, 1993), ambos, infelizmente, exigindo a marcação isotópica da substância em estudo, pelo que dificilmente se poderão utilizar fora dos modelos de amiloidogénese *in vitro*.

- Estudos da formação de amilóide *in vivo*, de que há uma longa tradição, mas que tem sofrido pela extrema complexidade das interacções moleculares envolvidas, a que já se fez referência no capítulo introdutório. Estes estudos dependem essencialmente da existência de modelos animais, pelo que tiveram maior desenvolvimento na amiloidose AA. Estes estudos sugerem uma grande importância para a fibrilogénese nessa doença da interacção das fibrilas de amilóide com outros componentes que a elas se encontram invariavelmente associados *in vivo*, como por exemplo os glicosaminoglicanos (Snow e Kisilewski, 1985; Snow *et al.*, 1991). A imunoquímica continuará a ter aqui, na nossa opinião, um papel relevante, fornecendo sondas para estudos de colocalização de macromoléculas em preparações histológicas, eventualmente também utilizáveis em estudos de inibição competitiva. A realização deste tipo de estudos na PAF depende obviamente da disponibilidade de modelos animais, cujo desenvolvimento, por recurso a manipulações transgénicas, teve um sucesso parcial, como já foi referido. Este modelo

animal poderia de qualquer modo constituir um ponto de partida para a realização deste tipo de estudos, caso os seus autores o disponibilizassem à comunidade científica.

As perspectivas de intervenção terapêutica também sofrerão, estamos convictos, uma transformação radical nos próximos anos. As técnicas de aferese aqui ensaiadas, por melhores que venham a ser os resultados clínicos, são, além de muito dispendiosas, um contributo negativo para a qualidade de vida destes doentes, à semelhança do que se observa nos insuficientes renais crónicos em hemodiálise. Entendemos esta terapêutica como uma medida intercalar de suporte destes doentes, complementar da transplantação hepática, enquanto se aguarda o desenvolvimento de métodos alternativos menos perturbadores da vida diária destes doentes, e quase seguramente mais económicos. Um dos campos actualmente mais promissores é o da terapêutica genética somática. Ensaia-se já a sua utilização na modulação da expressão de factores deficitários em numerosas doenças, como a imunodeficiência combinada severa por deficiência de adenosina deaminase, ou a hipercolesterolemia familiar (Wilson *et al.*, 1992). O desenvolvimento de uma estratégia bem sucedida para a aplicação da terapêutica genética somática a doenças em que, tal como na PAF, se dá a expressão de uma proteína com propriedades deletérias é, seguramente, apenas uma questão de tempo.

Bibliografia

Abel JJ, Rowntree LG, Turner BB (1913). Plasma removal with return of curpuscles (plasmapheresis). *J Pharmacol Exp Ther* **5:** 625-41

Achen MG, Harms PJ, Thomas T, Richardson SJ, Wettenhall REH, Schreiber G (1992). Protein synthesis at the blood-brain barrier. The major protein secreted by amphibian choroid plexus is a lipocalin. *J Biol Chem* **267:** 23170-4

Achen MG, Duan W, Pettersson TM, Harms PJ, Richardson SJ, Lawrence MC, Wettenhall REH, Aldred AR, Schreiber G (1993). Transthyretin gene expression in choroid plexus first evolved in reptiles. *Am J Physiol* **265:** R982-9

Adachi N (1989). Current and proposed treatment of familial amyloidotic polyneuropathy. *Clin Neuropharm* **12:** 506-13

Ali-Khan Z, Jothy S, Al-Karmi T (1983). Murine alveolar hydatidosis: a potencial experimental model for the study of AA-amyloidosis. *Br J Exp Pathol* **64:** 599-611

Ali-Khan Z, Quirion R, Robitaille Y, Alizadeh-Khiavi K, Du T (1988). 1. Evidence for increased amyloid enhancing factor activity in Alzheimer brain extract. *Acta Neuropathol* **77:** 82-90

Alizadeh-Khiavi K, Normand J, Chronopoulos S, Ali-Khan Z (1991). Alzheimer's disease brain-derived ubiquitin has amyloid-enhancing factor activity: behavior of ubiquitin during accelerated amyloidogenesis. *Acta Neuropathol* **81:** 280-6

Alizadeh-Khiavi K, Normand J, Chronopoulos S, Ali A, Ali-Khan Z (1992). Amyloid enhancing factor activity is associated with ubiquitin. *Virchows Arch A* **420:** 139-48

Almeida MR, Sasaki H, Sakaki Y, Salvi F, Ferlini A, Costa PP, Saraiva MJ (1990). Haplotype analysis of different FAP individuals with methionine 30 mutation in Europe. *In:* Costa PP, Freitas AF, Saraiva MJM, eds. *Familial Amyloidotic Polyneuropathy and other Transthyretin Related Disorders*. Porto: Arquivos de Medicina **3 (Spec. Issue):** 189-92

Almeida MR, Altland K, Rauh S, Gawinowicz MA, Moreira P, Costa PP, Saraiva MJM (1991a). Characterization of a basic transthyretin variant - TTR Arg 102 - in the German population. *Biochim Biophys Acta* **1097:** 224-6

Almeida MR, Hesse A, Steinmetz A, Maisch B, Altland K, Linke RP, Gawinowicz MA, Saraiva MJM (1991b). Transthyretin Leu 68 in a form of cardiac amyloidosis. *Bas Res Cardiol* **86:** 567-71

Almeida MR, Ferlini A, Forabosco A, Gawinowicz MA, Costa PP, Salvi F, Plasmati R, Tassinari C, Altland K, Saraiva MJM (1992). Transthyretin variants (TTR Ala 49 and TTR Gln 89) in two Sicilian kindreds with hereditary amyloidosis. *Hum Mutation* **1**: 211-5

Alper CA, Robin NI, Refetoff S (1969). Genetic polymorphism of Rhesus thyroxine-binding prealbumin: Evidence for tetrameric structure in primates. *Proc Natl Acad Sci USA* **63:** 775-81

Andersson R (1970). Hereditary amyloidosis with polyneuropathy. *Acta Med Scand* **188:** 85-94

Andrade C (1951a). A peculiar form of peripheral neuropathy. *Acta Psichiatr Neurol Scand* **26:** 251-7

Andrade C (1951b). Note prèliminaire sur une forme particulière de neuropathie périphérique. *Rev Neurol* **85:** 302-6

Andrade C (1952). A peculiar form of peripheral neuropathy - Familial atypical generalized amyloidosis with special involvement of the peripheral nerves. *Brain* **75:** 408-27

Arakawa M, Gejyo F, Oohara K, Homma N (1989). Systemic deposition of beta-2 microglobulin amyloid. *In:* Gejyo F, Brancaccio D, Bardin T, eds. *Dialysis Amyloidosis.* Milano: Wichtig Editore. 111-8

Araki S, Mawatari S, Ohta M, Nakajima A, Kuroiwa Y (1968). Polyneuritic amyloidosis in a Japanese family. *Arch Neurol* **18:** 593-602

Araki S, Ikegawa S (1994). Transthyretin and Apo A-I amyloidosis. *In:* Kisilevsky R, Benson MD, Frangione B, Gauldie J, Muckle TJ, Young ID, eds. *Amyloid and Amyloidosis 1993. The Proceedings of the VIIth International Symposium on amyloidosis, July 11-15 1993, Kingston, Ontario, Canada.* New York: Parthenon Publishing. 422-7

Assenat H, Calemard E, Charra B, Laurent G, Terrat JC, Vanel T (1980). Hémodialyse, syndrome du canal carpien et substance amyloïde (Letter). *Nouv Presse Méd* **9:** 1715

Axelrad MA, Kisilevsky R, Willmar J, Chen SJ, Skinner M (1982). Further characterization of amyloid-enhancing factor. *Lab Invest* **47:** 139-46

Axén R, Porath J, Ernback S (1967). Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides. *Nature* **214:** 1302-4

Barrow CJ, Yasuda A, Kenny PTM, Zagorski MG (1992). Solution conformations and aggregational properties of synthetic amyloid β-peptides of Alzheimer's disease. Analysis of circular dichroism spectra. *J Mol Biol* **225:** 1075-93

Barski G, Sorieul S, Cornefert F (1960). Production dans des cultures *in vitro* de deux souches cellulaires en association, de cellules de caractère "hybride". *C R Acad Sci Paris* **251:** 1825-7

Bazin H, Beckers A, Deckers C, Moriamé M (1973). Transplantable immunoglobulin-secreting tumors in rats. V. Monoclonal immunoglobulins secreted by 250 ileocecal immunocytomas in LOU/WsI rats. *J Natl Cancer Inst* **51:** 1359-61

Bazin H (1982). Production of rat monoclonal antibodies with the LOU rat non-secreting IR983F myeloma cell line. *In:* Peeters H, ed. *Protides of the Biological Fluids.* 29th Colloquium. Oxford and New York: Pergamon Press. 615-8

Becq-Giraudon B, Giacomini P, Babin P, Gil R, Sudre Y (1974). L'amyloïdose familiale primitive portugaise. *Nouv Presse Méd* **3:** 260

Benditt EP, Eriksen N (1971). Chemical classes of amyloid substance. *Am J Pathol* **65:** 231-51

Benditt EP, Eriksen N, Hermodson MA, Ericsson LH (1971). The major proteins of human and monkey amyloid substance: common properties including unusual N-terminal amino acid sequences. *FEBS Lett* **19:** 169-73

Benditt EP, Eriksen N (1977). Amyloid protein SAA is associated with high density lipoprotein from human serum. *Proc Natl Acad Sci USA* **74:** 4025-8

Benhold H (1922). Eine Spezifische Amiloidfärbung mit Kongorot. *Münch Med Wschr* **69:** 1537-8

Benson MD, Cohen AS (1977). Generalized amyloid in a family of Swedish origin. A study of 426 family members within seven generations of a new kinship with neuropathy, nephropathy and central nervous involvement. *Ann Internal Med* **86:** 419-24

Benson MD (1981). Partial amino acid sequence homology between an heredofamilial amyloid protein and human plasma prealbumin. *J Clin Invest* **67:** 1035-41

Benson MD, Wallace MR, Tejada E, Baumann H, Page B (1987). Hereditary amyloidosis: description of a new American kindred with late onset cardiomyopathy. Appalachian amyloid. *Arthr Rheum* **30:** 195-200

Benson MD, Liepnieks J, Uemichi T, Wheeler G, Correa R (1993). Hereditary renal amyloidosis associated with a mutant fibrinogen alpha-chain. *Nat Genet* **3:** 252-5

Benson MD, 2nd, Julien J, Liepnieks J, Zeldenrust S, Benson MD (1993a). A transthyretin variant (alanine 49) associated with familial amyloidotic polyneuropathy in a French family. *J Med Genet* **30:** 117-9

Benson MD, 2nd, Turpin JC, Lucotte G, Zeldenrust S, LeChevalier B, Benson MD (1993b). A transthyretin variant (alanine 71) associated with familial amyloidotic polyneuropathy in a French family. *J Med Genet* **30:** 120-2

Bethell GS, Ayers JS, Hancock WS, Hearn MTW (1979). A novel method of activation of cross-linked agaroses with 1,1'-carbonyldiimidazole which gives a matrix for affinity chromatography devoid of additional charged groups. *J Biol Chem* **254:** 2572-4

Betts JC, Akira S, Kishimoto T, Woo P (1993). The role of NF-κB and NF-IL6 transactivating factors in the synergistic activation of human serum amyloid A gene expression by interleukin-1 and interleuki- 6. *J Biol Chem* **268:** 25624-31

Blake CCF, Geisow MJ, Swan IDA, Rérat C, Rérat B (1974). Structure of human plasma prealbumin at 2.5 Å resolution. A preliminary report of the polypeptide chain conformation, quaternary structure and thyroxine binding. *J Mol Biol* **88:** 1-12

Blake CCF, Geisow JJ, Oatley SJ, Rérat B, Rérat C (1978). Structure of prealbumin. Secondary, tertiary and quaternary interactions determined by Fourier refinement at 1.8 Å. *J Mol Biol* **121:** 339-56

Blake CCF (1981). Prealbumin and the thyroid hormone nuclear receptor. *Proc R Soc Lond B* **211:** 413-31

Blay P, Nilsson C, Owman C, Aldred A, Schreiber G (1993). Transthyretin expression in the rat brain: effect of thyroid functional state and role in thyroxine transport. *Brain Res* **632:** 114-20

Blumberg BS, Robbins J (1960). Thyroxine-serum protein complexes: single dimensional gel and paper electrophoresis studies. *Endocrinology* **67:** 368-78

Booth DR, Soutar AK, Hawkins PN, Reilly M, Harding A, Pepys MB (1994). Three new amyloidogenic transthyretin gene mutations: advantages of direct sequencing. *In:* Kisilevsky R, Benson MD, Frangione B, Gauldie J, Muckle TJ, Young ID, eds. *Amyloid and Amyloidosis 1993. The Proceedings of the VIIth International Symposium on amyloidosis, July 11-15 1993, Kingston, Ontario, Canada.* New York: Parthenon Publishing. 456-8

Borberg H, Gakzkowski A, Hombach V, Oette K, Stoffel W (1988). Treatment of familial hypercholesterolemia by means of specific immunoadsorption. *J Clin Apheresis* **4:** 59-65

Boulianne GL, Hozumi N, Shulman MJ (1984). Production of functional chimaeric mouse/human antibody. *Nature* **312:** 643-6

Branch WT, Robbins J, Edelhoch H (1971). Thyroxine-binding prealbumin. Conformation in aqueous solutions. *J Biol Chem* **246:** 6011-8

Branch WT, Robbins J, Edelhoch H (1972). Thyroxine binding prealbumin. Conformation in urea and guanidine. *Arch Biochem Biophys* **152:** 144-51

Burdick D, Soreghan B, Kwon M, Kosmoski J, Knauer M, Henschen A, Yates J, Cotman C, Glabe C (1992). Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/β amyloid peptide analogs. *J Biol Chem* **267:** 546-54

Burnet FM (1957). A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *Austral J Sci* **20:** 67-9

Burton P, Iden S, Mitchell K, White A (1978). Thymic hormone-like restoration by human prealbumin of azathioprine sensivity of spleen cells from thymectomized mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **75:** 823-7

Burton PM, Hung P, Lin T, Lovelace C, White A (1985). The effects of homogeneous human prealbumin on *in vitro* and *in vivo* immune responses in the mouse. *Int J Immunopharmacol* **7:** 473-81

Burton PM, Horner BL, Jones GH, Lin T, Nestor JJ, Jr, Newman SR, Parks TL, Smith AJ, White A (1987). Immuno-enhancing activity of the amino-terminal domain of human prealbumin: isolation, characterization and synthesis. *Int J Immunopharmacol* **9:** 297-305

Carlsson M, Hedin A, Inganas M, Harfast B, Blomberg F (1985). Purification of *in vitro* produced mouse monoclonal antibodies. A two-step procedure utilizing cation exchange chromatography and gel filtration. *J Immunol Methods* **79:** 89-98

Castaño EM, Ghiso J, Prelli F, Gorevic PD, Migheli A, Frangione B (1986). *In vitro* formation of amyloid fibrils from two synthetic peptides of different lengths homologous to Alzheimer's disease β-protein. *Biochem Biophys Res Commun* **141:** 782-5

Cathcart ES, Wollheim FA, Cohen AS (1967). Plasma protein constituents of amyloid fibrils. *J Immunol* **99:** 376-85

Cathcart ES, Skinner M, Cohen AS (1971). Immunogenicity of amyloid. *Immunology* **20:** 945-54

Caughey B, Race RE (1992). Potent inhibition of scrapie-associated PrP accumulation by Congo Red. *J Neurochem* **59:** 768-71

Cavallaro T, Martone RL, Dwork AJ, Schon EA, Herbert J (1990). The retinal pigment epithelium is the unique site of transthyretin synthesis in the rat eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **31:** 497-501

Chanoine J-P, Alex S, Fang SL, Stone S, Leonard JL, Köhrle J, Braverman LE (1992). Role of transthyretin in the transport of thyroxine from the blood to the choroid plexus, the cerebrospinal fluid, and the brain. *Endocrinology* **130:** 933-8

Cheng SY, Pages RA, Saroff HA, Edelhoch H, Robbins J (1977). Analysis of thyroid hormone binding to human serum prealbumin by 8-anilinonaphtalene-1-sulfonate fluorescence. *Biochemistry* **16:** 3707-13

Cleveland WL, Wood I, Erlanger BF (1983). Routine large-scale production of monoclonal antibodies in a protein-free culture medium. *J Immunol Methods* **56:** 221-34

Coelho T, Leite I, Silva MR, Coutinho P, Pinheiro AV, Guimarães A (1993a). Study of skin and sural nerve biopsies in FAP Met 30 asymptomatic carriers. (Abstr.). *J Rheumatol* **20:**

Coelho T, Carvalho M, Saraiva MJM, Alves I, Almeida MR, Costa PP (1993b). A strikingly benign evolution of FAP in an individual found to be a compound heterozygote for two TTR mutations: TTR MET 30 and TTR MET 119. (Abstr.). *J Rheumatol* **20:** 179

Cohen AS, Calkins E (1959). Electron microscopic observation on a fibrous component in amyloid of diverse origins. *Nature* **183:** 1201-3

Cohen AS (1986). General introduction and a brief history of amyloidosis. *In:*Marrink J, van Rijswijk MH, eds. *Amyloidosis.* Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers. 3-19

Coimbra A, Andrade C (1971). Familial amyloid polyneuropathy: an electron microscope study of the peripheral nerve in five cases. *Brain* **94:** 199-212.

Collins VP, Jacobsson B, Pettersson T, Carlström A (1986). Monoclonal antibodies to transthyretin. *Scand J Clin Lab Invest* **46:** 761-9

Colon W, Kelly J (1992). Partial denaturation of transthyretin is sufficient for amyloid fibril formation. *Biochemistry* **31:** 8654-60

Come JH, Fraser PE, Lansbury PT, Jr (1993). A kinetic model for amyloid formation in the prion diseases: Importance of seeding. *Proc Natl Acad Sci USA* **90:** 5959-63

Coons AH, Creech HJ, Jones RN (1941). Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc Soc Exp Biol Med (NY)* **47:** 200-5

Coons AH, Creech HJ, Jones RN, Berliner E (1942). The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody. *J Immunol* **45:** 159-70

Coons AH (1961). The beginnings of immunofluorescence. *J Immunol* **87:** 499-503

Cooper DN, Youssoufian H (1988). The CpG dinucleotide and human genetic disease. *Hum Genet* **78:** 151-5

Cooper JH (1974). Selective amyloid staining as a function of amyloid composition and structure. Histochemical analysis of the alkaline Congo red, standardized toluidine blue, and iodine methods. *Lab Invest* **31:** 232-8

Cornil AV (1875). Sur le developpement de l'epitheliome du corps thyroide. *Arch Physiol Norm Pathol, s. 5* **2:** 659-89

Cornwell GG, 3rd, Husby G, Westermark P, Natvig JB, Michaelsen TE, Skogen B (1977). Identification and characterization of different amyloid fibril proteins in tissue sections. *Scand J Immunol* **6:** 1071-80

Cornwell GG, 3rd, Natvig JB, Westermark P, Husby G (1978). Senile cardiac amyloid: demonstration of a unique fibril protein in tissue sections. *J Immunol* **120:** 1385-8

Cornwell GG, 3rd, Thomas B, Kyle RA, Sletten K, Westermark P (1988). Immunohistochemical typing of tissues from 100 patients with systemic amyloidosis. *In:* Isobe T, Araki S, Uchino F, Kito S, Tsubura E, eds. *Amyloid and Amyloidosis - Proceedings of the Fifth International Symposium on Amyloidosis, held October 25-28, 1987, in Hakone, Japan.* New York: Plenum Press. 179-84

Cornwell GG, 3rd, Westermark GT, Pitkanen P, Westermark P (1992). Seminal vesicle amyloid: the first example of exocrine cell origin of an amyloid fibril precursor. *J Pathol* **167:** 297-303

Cory S (1983). Oncogenes and B lymphocyte neoplasia. *Immunol Today* **4:** 205-7

Costa PMP, Jacobsson B, Collins VP, Biberfeld P (1986). Unmasking antigenic determinants in amyloid. *J Histochem Cytochem* **24:** 1683-5.

Costa PMP, Saraiva MJM, Costa PP (1988). Anticorpos monoclonais anti-TTR^{Met30}. *Bol Hosp (HGSA)* **3:** 127-31

Costa PMP, Teixeira A, Saraiva MJM, Costa PP (1993). Immunoassay for transthyretin variants associated with amyloid neuropathy. *Scand J Immunol* **38:** 177-82

Costa PP, Figueira A, Bravo F (1978). Amyloid fibril protein related to prealbumin in familial amyloidotic polyneuropathy. *Proc Natl Acad Sci USA* **75:** 4499-503

Costa PP, Figueira AS, Bravo FR, Guimarães A (1980). Prealbumin and amyloid in the Portuguese type of familial amyloidotic polyneuropathy. *In:* Glenner GG, Costa PP, Freitas AF, eds. *Amyloid and Amyloidosis - Proceedings of the Third International Symposium on Amyloidosis, Póvoa de Varzim, Portugal, 23-28 September 1979.* Amsterdam: Excerpta Medica. 147-52

Costa RH, Lai E, Darnell JE, Jr (1986). Transcriptional control of the mouse prealbumin (transthyretin) gene: both promoter sequences and a distinct enhancer are cell specific. *Mol Cell Biol* **6:** 4697-708

Costa RH, Grayson DR, Xanthopoulos KG, Darnell JE, Jr (1988). A liver-specific DNA-binding protein recognizes multiple nucleotide sites in regulatory regions of transthyretin, α1-antitrypsin, albumin, and simian virus 40 genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **85:** 3840-4

Costa RH, Van Dyke, Yan C, Kuo F, Darnell JE, Jr (1990). Similarities in transthyretin gene expression and differences in transcription factors: liver and yolk sac compared to choroid plexus. *Proc Natl Acad Sci USA* **87:** 6589-93

Costa RH, Grayson DR (1991). Site-directed mutagenesis of hepatocyte nuclear factor (HNF) binding sites in the mouse transthyretin (TTR) promoter reveal synergistic interactions with its enhancer region. *Nucleic Acids Res* **19:** 4139-45

Cotton RGH, Milstein C (1973). Fusion of two immunoglobulin-producing myeloma cells. *Nature* **244:** 42-3

Cotton RGH, Secher DS, Milstein C (1973). Somatic mutation and origin of antibody diversity. Clonal variability of the immunoglobulin produced by MOPC-21 cells in culture. *Eur J Immunol* **3:** 135-40

Coutinho P, Silva AM, Lima JL, Barbosa AR (1980). Forty years of experience with type I amyloid neuropathy. Review of 483 cases. *In:* Glenner GG, Costa PP, Freitas AF, eds. *Amyloid and Amyloidosis - Proceedings of the Third International Symposium on Amyloidosis, Póvoa de Varzim, Portugal, 23-28 September 1979.* Amsterdam: Excerpta Medica. 88-98

Coutinho P, Macedo E, Estácio A, Saraiva A, Costa PP, Saraiva MJM (1988). Periodic plasma exchanges in the treatment of familial amyloid polyneuropathy: preliminary results. *In:* Isobe T, Araki S, Uchino F, Kito S, Tsubura E, eds. *Amyloid and Amyloidosis - Proceedings of the Fifth International Symposium on Amyloidosis, held October 25-28, 1987, in Hakone, Japan.* New York: Plenum Press. 845-9

Croce CM, Linnenbach A, Hall W, Steplewski Z, Koprowski H (1980). Production of human hybridomas secreting antibodies to measles virus. *Nature* **288:** 488-9

Cuatrecasas P, Wichek M, Anfinsen CB (1968). Selective enzyme purification by affinity chromatography. *Proc Natl Acad Sci USA* **61:** 636-43

Curcio FI, Scanik JS, Ale JS, Curcio HF (1970). Enfermedad de Corino Andrade. *Prensa Med Argent* **57:** 1611-5

Dalakas MC, Engel WK (1981). Amyloid in hereditary amyloid polyneuropathy is related to prealbumin. *Arch Neurol* **38:** 420-2

Damas AM, Sebastião MP, Costa PP, Saraiva MJ (1994). A fiber diffraction study of FAP fibrils. *In:* Kisilevsky R, Benson MD, Frangione B, Gauldie J, Muckle TJ, Young ID, eds. *Amyloid and Amyloidosis 1993. The Proceedings of the VIIth International Symposium on amyloidosis, July 11-15 1993, Kingston, Ontario, Canada.* New York: Parthenon Publishing. 492-4

Dardenne M, Pléau J-M, Bach J-F (1980). Evidence of the presence in normal serum of a carrier of the serum thymic factor (FTS). *Eur J Immunol* **10:** 83-6

Davis PJ, Spaulding SW, Gregerman RI (1970). The three thyroxine-binding proteins in rat serum: binding capacities and effects of binding inhibitors. *Endocrinology* **87:** 978-86

De la Chapelle A, Tolvanen R, Boysen G, Santavy J, Bleeker-Wagemakers L, Maury CPJ, Kere J (1992). Gelsolin-derived familial amyloidosis caused by asparagine or tyrosine substitution for aspartic acid at residue 197. *Nature Genet* **2:** 157-60

De Vera N, Cristófol RM, Farré ER (1986). Protein binding and stability of norepinephrine in human blood plasma. Involvement of prealbumin, α_1-acid glycoprotein and albumin. *Life Sciences* **43:** 1277-86

Dickson PW, Howlett GJ, Schreiber G (1985a). Rat transthyretin (prealbumin). Molecular cloning, nucleotide sequence, and gene expression in liver and brain. *J Biol Chem* **260:** 8214-9

Dickson PW, Aldred AR, Marley PD, Guo-Fen T, Howlett GI, Schreiber G (1985b). High prealbumin and transferrin mRNA levels in the choroid plexus of rat brain. *Biochem Biophys Res Commum* **127:** 890-5

Dickson PW, Schreiber G (1986). High levels of messenger RNA for TTR (prealbumin) in human choroid plexus. *Neurosci Lett* **66:** 311-5

Dickson PW, Aldred AR, Marley PD, Bannister D, Schreiber G (1986). Rat choroid plexus specializes in the synthesis and the secretion of transthyretin (prealbumin). *J Biol Chem* **261:** 3475-8

Dickson PW, Aldred AR, Menting JGT, Marley PD, Sawyer WD, Schreiber G (1987). Thyroxine transport in choroid plexus. *J Biol Chem* **262:** 13907-15

Divry P (1927). Étude histochimique des plaques séniles. *J Belge Neurol Psichiatr* **27:** 643-57

Divry P, Florkin M (1927). Sur les proprietés optiques de l'amyloide. *C R Soc Biol Paris* **97:** 1808-10

Duan W, Cole T, Schreiber G (1989). Cloning and nucleotide sequencing of transthyretin (prealbumin) cDNA from rat choroid plexus and liver. *Nucleic Acids Res* **17:** 3979

Duan W, Achen MG, Richardson SJ, Lawrence MC, Wettenhall REH, Jaworowski A, Schreiber G (1991). Isolation, characterization, cDNA cloning and gene expression of an avian transthyretin. Implications for the evolution of structure and function of transthyretin in vertebrates. *Eur J Biochem* **200:** 679-87

Dwulet FE, Benson MD (1984). Primary structure of an amyloid prealbumin and its plasma precursor in a heredofamilial polyneuropathy of swedish origin. *Proc Natl Acad Sci USA* **81:** 694-8

Dwulet FE, Benson MD (1986). Characterization of a transthyretin (prealbumin) variant associated with familial amyloidotic polyneuropathy type II (Indiana/Swiss). *J Clin Invest* **78:** 880-6

Dyck PJ, Lambert EH (1969). Dissociated sensation in amyloidosis. Compound action potential, quantitative histologic and teased fiber, and electron microscopic studies of sural nerve biopsies. *Arch Neurol* **20:** 490-507

Eanes ED, Glenner GG (1968). X-ray diffraction studies on amyloid filaments. *J Histochem Cytochem* **16:** 673-7

Edwards PAW, Smith CM, Neville AM, O'Hare MJ (1982). A human-human hybrid mieloma (hybridoma) system based on a fast-growing mutant of the ARH-77 myeloma line. *Eur J Immunol* **12:** 641-8

Ehrlich JC, Ratner IM (1961). Amyloidosis of the islets of Langerhans. A restudy of islet hyalin in diabetic and nondiabetic individuals. *Am J Pathol* **38:** 49-59

Ein D, Kimura S, Terry WD, Magnotta J, Glenner GG (1972). Amino acid sequence of an amyloid fibril protein of unknown origin. *J Biol Chem* **247:** 5653-5

Eisenhauer T, Armstrong VW, Wieland H, Fuchs C, Scheler F, Seidel D (1987). Selective removal of low density lipoprotein (LDL) by precipitation at low pH: First clinical application of the HELP system. *Klin Wochenschr* **65:** 161-8

Engvall E, Perlmann P (1972). Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J Immunol* **109:** 129-35

Episkopou V, Maeda S, Nishiguchi S, Shimada K, Gaitanaris GA, Gottesman ME, Robertson EJ (1993). Disruption of the transthyretin gene results in mice with depressed levels of plasma retinol and thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* **90:** 2375-9

Eriksson L, Westermark P (1990a). Characterization of intracellular amyloid fibrils in the human choroid plexus epithelial cells. *Acta Neuropathol (Berl)* **80:** 597-603

Eriksson L, Westermark P (1990b). Age-related accumulation of amyloid inclusions in adrenal cortical cells. *Am J Pathol* **136:** 461-6

Eulitz M, Weiss DT, Solomon A (1990). Immunoglobulin heavy-chain-associated amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **87:** 6542-6

Evans RL, Beard JM, Lazarus H, Schlossman SF, Chess L (1977). Detection, isolation, and functional characterization of two human T-cell subclasses bearing unique differentiation antigens. *J Exp Med* **145:** 221-33

Fariello R, Curtoni ES, Delsedime M (1971). Considerazioni genetiche su di una casistica di neuropatia periferica di tipo paramiloidosico ereditario. *Arch Sci Med* **128:** 181-5

Faulk WP, Taylor GM (1971). An immunocolloid method for the electron microscope. *Immunochemistry* **8:** 1081-3

Fazekas de St. Groth S, Scheidegger D (1980). Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. *J Immunol Methods* **35:** 1-21

Ferlini A, Salvi F, Patrosso C, Fini S, Vezzoni P, Forabosco A (1993). Gly47Ala: A new transthyretin gene mutation in hereditary amyloidosis TTR-related. (Abstr.) *J Rheumatol* **20:** 187

Feurle GE, Linke RP, Kuhn E, Wagner A (1984). Clinical value of immunohistochemistry with AF-antibody in the diagnosis of familial amyloid neuropathy. *J Neurol* **231:** 237-43

Fex G, Ålbertsson P-A, Hansson B (1979). Interaction between prealbumin and retinol-binding protein studies by affinity chromatography, gel filtration and two-phase partition. *Eur J Biochem* **99:** 353-60

Fitch NJS, Akbari MT, Ramsden DB (1991). An inherited non-amyloidogenic transthyretin variant, [Ser6]-TTR, with increased thyroxine-binding affinity, characterized by DNA sequencing. *J Endocrinol* **129:** 309-13

Foung SKH, Sasaki DT, Grumet FC, Engleman EG (1982). Production of functional human T-T hybridomas in selection medium lacking aminopterin and thymidine. *Proc Natl Acad Sci USA* **79:** 7484-8

Franklin EC, Pras M, Levin M, Frangione B (1972). The partial amino acid sequence of the major low molecular weight component of two human amyloid fibrils. *FEBS Lett* **22:** 121-3

Frederiksen TH, Gøtzshe M, Harboe N, Kiær W, Mellemgaard K (1962). Familial primary amyloidosis with severe amyloid heart disease. *Am J Med* **33:** 328-48

Friedreich N, Kekulé R (1858). Zur Amyloidfrage. *Virchows Arch Path Anat* **16:** 60-5

Friguet B, Djavadi-Ohaniance L, Goldberg ME (1984). Some monoclonal antibodies raised with a native protein bind preferentially to the denatured antigen. *Mol Immunol* **21:** 673-7

Fujihara S, Balow JE, Costa JC, Glenner GG (1980). Identification and classification of amyloid in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections by the unlabeled immunoperoxidase method. *Lab Invest* **43:** 358-65

Fung W, Thomas T, Dickson PW, Aldred AR, Milland J, Dziadek M, Power B, Hudson P, Schreiber G (1988). Structure and expression of the rat transthyretin (prealbumin) gene. *J Biol Chem* **263:** 480-8

Furuyoshi S, Tani N, Nakazawa R (1988). New adsorbents for extracorporeal removal of β_2-microglobulin. *In:* Isobe T, Araki S, Uchino F, Kito S, Tsubura E, eds. *Amyloid and Amyloidosis - Proceedings of the Fifth International Symposium on Amyloidosis, held October 25-28, 1987, in Hakone, Japan.* New York: Plenum Press. 629-34

Gafni J, Fischel B, Reif R, (1985). Amyloidotic polyneuropathy in a Jewish family: evidence for the genetic heterogeneity of the lower limb familial amyloidotic neuropathies. *Q J Med* **55:** 33-43

Galfrè G, Milstein C, Wright B (1979). Rat × rat hybrid myelomas and a monoclonal anti-Fd portion of mouse IgG. *Nature* **277:** 131-3

Galfrè G, Milstein C (1981). Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. *Methods Enzymol* **73:** 1-46

Ganowiak K, Hultman P, Engstrom U, Gustavsson A, Westermark P (1994). Fibrils from synthetic amyloid-related peptides enhance development of experimental AA-amyloidosis in mice. *Biochem Biophys Res Commun* **199:** 306-12

Gejyo F, Yamada T, Odani S, Nakagawa Y, Arakawa M, Kunitomo T, Kataoka H, Suzuki M, Hirasawa Y, Shirahama T, Cohen AS, Schmid K (1985). A new form of amyloid protein associated with chronic hemodialysis was identified as β2-microglobulin. *Biochem Biophys Res Commun* **129:** 701-6

Gejyo F, Homma N, Hasegawa S, Teramura T, Arakawa M, Furuyoshi S, Takata S, Tsunomori M, Yasuda A, Tani N (1994). Clinical trial of a newly developed adsorbent column for intensive removal of β2-microglobulin in dialisis patients. *In:* Kisilevsky R, Benson MD, Frangione B, Gauldie J, Muckle TJ, Young ID, eds. *Amyloid and Amyloidosis 1993. The Proceedings of the VIIth International Symposium on amyloidosis, July 11-15 1993, Kingston, Ontario, Canada.* New York: Parthenon Publishing. 572-4

Gertz MA, Kyle RA, Greipp PR (1991). Response rates and survival in primary systemic amyloidosis. *In:* Natvig JB, Førre Ø, Husby G, Husebekk A, Skogen B,Sletten K, Westermark P, eds. *Amyloid and amyloidosys 1990. VIth International Symposium on Amyloidosis, August 5-8, 1990, Oslo, Norway.* Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 235-8

Ghiso J, Jensson O, Frangione B (1986). Amyloid fibrils in hereditary cerebral hemmorrhage with amyloidosis of Icelandic type is a variant of Gamma-trace basic protein (cystatin C). *Proc Natl Acad Sci USA* **83:** 2974-8

Gimeno A, Alix CG, Arana JMS, Mateos M, Sotelo MT (1974). Amyloidotic polyneuritis of type III "(Iowa, van Allen)". *Eur Neurol* **11:** 46-57

Gitlin D, Gitlin JD (1975). Fetal and neonatal development of human plasma proteins. *In:* Putnam FW, ed. *The Plasma Proteins.* Vol II. 2nd ed. New York: Academic Press. 264-317

Glenner GG, Cuatrecasas P, Isersky C, Bladen HA, Eanes ED (1969). Physical and chemical properties of amyloid fibers. II. Isolation of a unique protein constituting the major component from human splenic amyloid fibril concentrates. *J Histochem Cytochem* **17:** 769-80

Glenner GG, Harada M, Isersky C, Cuatrecasas P, Page D, Keiser H (1970a). Human amyloid protein: diversity and uniformity. *Biochem Biophys Res Commun* **41:** 1013-9

Glenner GG, Harbaugh J, Ohms JI, Harada M, Cuatrecasas P (1970b). An amyloid protein: the amino-terminal variable fragment of an immunoglobulin light chain. *Biochem Biophys Res Commun* **41:** 1287-9

Glenner GG, Terry W, Harada M, Isersky C, Page D (1971a). Amyloid fibril proteins: proof of homology with immunoglobulin light chains by sequence analysis. *Science* **172:** 1150-1

Glenner GG, Ein D, Eanes ED, Bladen HA, Terry W, Page D (1971b). Creation of "amyloid" fibrils from Bence Jones proteins *in vitro. Science* **174:** 712-4

Glenner GG, Eanes ED, Bladen HA, Linke RP, Termine JD (1974). β-pleated sheet fibrils. A comparison of native amyloid with synthetic protein fibrils. *J Histochem Cytochem* **22:** 1141-58

Glenner GG (1980). Amyloid deposits and amyloidosis. The β-fibrillosis. *N Engl J Med* **302:** 1283-92, 1338-43

Glenner GG, Wong CW (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* **120:** 885-90

Goding JW (1980). Antibody production by hybridomas. *J Immunol Methods* **39:** 285-308

Goding JW (1986). *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice.* 2nd ed. London: Academic Press.

Goldfinger SE (1972). Colchicine for Familial Mediterranean Fever. *N Engl J Med* **287:** 1302

Gomes d'Oliveira JJ (1971). A distribuição da substância amilóide. Estudo em microscopia óptica de casos generalizados de autópsia. *J Soc Ciênc Méd Lisboa* **135(4):** 289-349

Goodman DS, Peters T, Robbins J, Schwick HG (1981). Prealbumin becomes transthyretin. Nomenclature committee - IUB and JCBN newsletter. *J Biol Chem* **256:** 12-14

Gorevic PD, Casey TT, Stone WJ, DiRaimondo R, Prelli FC, Frangione B (1985). Beta-2 microglobulin is an amyloidogenic protein in man. *J Clin Invest* **76:** 2425-9

Gorevic P, Castaño EM, Sarma R, Frangione B (1987). Ten to fourteen residue peptides of Alzheimer's disease protein are sufficient for amyloid fibril formation and its characteristic X ray diffraction pattern. *Biochem Biophys Res Commun* **147:** 854-62

Gorevic PD, Prelli FC, Wright J, Pras M, Frangione B (1989). Systemic Senile Amyloidosis. Identification of a new Prealbumin (Transthyretin) variant in cardiac tissue: immunologic and biochemical similarity to one form of familial amyloidotic polyneuropathy. *J Clin Invest* **83:** 836-43

Gotto AM, Lux SE, Goodman DS (1972). Circular dichroic studies of human plasma retinol-binding protein and prealbumin. *Biochem Biophys Acta* **271:** 429-35

Grabar P, Gavrilesco K, Courcon J, Hillion P, Uriel J, Lewin J (1955). A study of normal human cerebrospinal fluid by the immuno-electrophoretic method. *Nature* **176:** 976

Gray HDA, Gray ES, Horne CHW (1985). Sites of prealbumin production in the human fetus using the indirect immunoperoxidade technique. *Virchows Arch A* **406:** 463-73

Green N, Alexander H, Olson A, Alexander S, Shinnick TM, Sutcliffe JG, Lerner RA (1982). Immunogenic structure of the influenza virus hemagglutinin. *Cell* **28:** 477-87

Griffiths JM, Griffin RG (1993). Nuclear magnetic resonance methods for measuring dipolar couplings in rotating solids. *Anal Chim Acta* **283:** 1081-101

Gudmundsson G, Hallgrimsson J, Jonasson TA, Bjarnason O (1972). Hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis. *Brain* **95:** 387-404

Guedes JP (1976). Anatomia patológica da polineuropatia amiloidótica familiar (tipo português). *Bol Hosp (HGSA)* **1:** 51-9

Guimarães A, Monteiro L, Coutinho P (1980). Pathology of the autonomic nervous system in Andrade type of Familial Amyloidotic Polyneuropathy (study of 11 postmorten cases). *In:* Glenner GG, Costa PP, Freitas AF, eds. *Amyloid and Amyloidosis - Proceedings of the Third International Symposium on Amyloidosis, Póvoa de Varzim, Portugal, 23-28 September 1979.* Amsterdam: Excerpta Medica. 139-52

Guimarães A, Pinheiro AV, Leite I (1988). Sural nerve biopsy in Familial Amyloidotic Polyneuropathy: a morphological and morphometric study. *In:* Isobe T, Araki S, Uchino F, Kito S, Tsubura E, eds. *Amyloid and Amyloidosis - Proceedings of the Fifth International Symposium on Amyloidosis, held October 25-28, 1987, in Hakone, Japan.* New York: Plenum Press. 493-8

Gustavsson Å, Engström U, Westermark P (1991). Normal transthyretin and synthetic transthyretin fragments form amyloid-like fibrils in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **175:** 1159-64

Hagen GA, Solberg LA, Jr (1974). Brain and cerebrospinal fluid permeability to intravenous thyroid hormones. *Endocrinology* **95:** 1398-410

Haltia M, Prelli F, Ghiso J, Kiuru S, Somer H, Palo J, Frangione B (1990). Amyloid protein in familial amyloidosis (Finish type) is homologous to gelsolin, an actin-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* **167:** 927-32

Halverson K, Frazer PE, Kirschner DA, Lansbury PT, Jr (1990). Molecular determinants of amyloid deposition in Alzheimer's disease: Conformational studies of synthetic β-protein fragments. *Biochemistry* **29:** 2639-44

Halverson KH, Sucholeiki I, Ashburn TT, Lansbury PT, Jr (1991). Location of β-sheet-forming sequences in amyloid proteins by FTIR. *J Am Chem Soc* **113:** 6701-3

Hamberger A, Nyström B, Silvenius H, Wikkelsø C (1990). The contribution from the choroid plexus and the periventricular CNS to amino acids and proteins in the human CSF. *Neurochem Res* **15:** 307-12

Hamilton JA, Steinrauf LK, Braden BC, Liepnieks J, Benson MD, Holmgren G, Sandgren O, Steen L (1993). The X-ray crystal structure refinements of normal human transthyretin and the amyloidogenic Val-30 → Met variant to 1.7-Å resolution. *J Biol Chem* **268:** 2416-24

Hanyu N, Ikeda S, Nakadai A, Yanagisawa N, Powell HC (1989). Peripheral nerve pathological findings in familial amyloid polyneuropathy: a correlative study of proximal sciatic nerve and sural nerve lesions. *Ann Neurol* **25:** 340-50

Harada M, Isersky C, Cuatrecasas P, Page D, Bladen HA, Eanes ED, Keiser HR, Glenner GG (1971). Human amyloid protein: chemical variability and homogeneity. *J Histochem Cytochem* **19:** 1-15

Harding J, Skare J, Skinner M (1991). A second transthyretin mutation at position 33 leu/phe associated with familial amyloidotic polyneuropathy. *Biochem Biophys Acta* **1097:** 183-6

Harlow E, Lane D (1988). *Antibodies. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Harms PJ, Tu G-F, Richardson SJ, Aldred AR, Jaworowski A, Schreiber G (1991). Transthyretin (prealbumin) gene expression in choroid plexus is strongly conserved during evolution of vertebrates. *Comp Biochem Physiol* **99B:** 239-49

Harrison HH, Gordon ED, Nichols WC, Benson MD. Biochemical and clinical characterization of Prealbumin^{CHICAGO}: An apparently benign variant of serum prealbumin (transthyretin) discovered with high-resolution two-dimensional electrophoresis (1991). *Am J Med Genet* **39:** 442-52

Harting P (1847) Brief an H. von Mohl, zur Beantwortung seines Aufsatzes: Ueber das Wachsthum der Zellmembran. *Bot Ztg* **5:** 337-348

Hawkins PN, Feest TG, Pepys MB (1991). Imaging hereditary amyloidosis of Ostertag. *In:* Natvig JB, Førre Ø, Husby G, Husebekk A, Skogen B,Sletten K, Westermark P, eds. *Amyloid and amyloidosys 1990. VIth International Symposium on Amyloidosis, August 5-8, 1990, Oslo, Norway.* Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 789-92

Hazenberg BPC, Marrink J, Nakazato M, Limburg PC, Sibinga CTS, Bijzet J, van Rijswijk MH (1990). The effect of plasma exchange on serum levels of TTR Met 30 in a patient with FAP type I. Influence of the acute-phase response. *In:* Costa PP, Freitas AF, Saraiva MJM, eds. *Familial Amyloidotic Polyneuropathy and other Transthyretin Related Disorders.* Porto: Arquivos de Medicina **3 (Spec. Issue):** 371-4

Hearn MTW (1987). 1,1'-carbonyldiimidazole-mediated immobilization of enzymes and affinity ligands. *Methods Enzymol* **135:** 102-17

Heller H, Kariv J, Sherf L, Sohar E (1955). Familial Mediterranean Fever. *Harefuah* **48:** 91-4

Heller H, Missmahl H-P, Sohar E, Gafni J (1964). Amyloidosis: Its differentiation into peri-reticulin and peri-collagen types. *J Path Bact* **88:** 15

Herbert J, Wilcox JN, Pham KC, Fremeau RT, Zeviani M, Dwork A, Soprano DR, Makover A, Goodman DS, Zimmerman EA, Roberts JL, Schon EA (1986). Transthyretin: a choroid plexus-specific transport protein in human brain. *Neurology* **36:** 900-11

Herbert J, Younger D, Latov N, Martone RL (1994). Clinical spectrum of familial amyloidotic polyneuropathy. *In:* Kisilevsky R, Benson MD, Frangione B, Gauldie J, Muckle TJ, Young ID, eds. *Amyloid and Amyloidosis 1993. The Proceedings of the VIIth International Symposium on amyloidosis, July 11-15 1993, Kingston, Ontario, Canada.* New York: Parthenon Publishing. 486-8

Hervé JP, Cledes J, Bourbigot B, Guillodo MP, Legrand O, Pennec Y, Youinou P, Leroy JP (1985). Systemic amyloidosis in the course of maintenance hemodialysis. *Nephron* **40:** 494

Heschl R (1875). Eine hübsche à vista-Reaktion auf amyloid degenerirte Gewebe. *Wien Med Wschr* **25:** 713-5

Hesse A, Altland K, Linke RP, Almeida MR, Saraiva MJM, Steinmetz A, Maisch B (1993). Cardiac amyloidosis: a review and report of a new transthyretin (prealbumin) variant. *Br Heart J* **70:** 111-5

Hiatt A, Cafferkey R, Bowdish K (1989). Production of antibodies in transgenic plants. *Nature* **342:** 76-8

Higushi K, Yonezu T, Kogishi K, Matsumura A, Takeshita S, Higushi K, Kohno A, Matsushita M, Hosokawa M, Takeda T (1986). Purification and characterization of a senile amyloid-related antigenic substance (apo SAS_{SAM}) from mouse serum: Apo SAS_{SAM} is an apo A-II apolipoprotein of mouse high density lipoproteins. *J Biol Chem* **261:** 12834-40

Hilbich C (1994). Amyloid of Alzheimer's disease: filament formation and its inhibition. *In:* Kisilevsky R, Benson MD, Frangione B, Gauldie J, Muckle TJ, Young ID, eds. *Amyloid and Amyloidosis 1993. The Proceedings of the VIIth International Symposium on amyloidosis, July 11-15 1993, Kingston, Ontario, Canada.* New York: Parthenon Publishing. 507-9

Hofer P-Å, Andersson R (1975). Postmortem findings in primary familial amyloidosis with polyneuropathy: A study based in six cases from Northern Sweden. *Acta Pathol Microbiol Scand A* **83:** 309-22

Holgate CS, Jackson P, Cownen PN, Bird CC (1983). Immunogold-silver staining: new method of immunostaining with enhanced sensitivity. *J Histochem Cytochem* **31:** 938-44

Holmgren G, Steen L, Ekstedt J, Groth C-G, Ericzon B-G, Eriksson S, Andersen O, Karlberg I, Norden G, Nakazato M, Hawkins P, Richardson S, Pepys M (1991). Biochemical effect of liver transplantation in two Swedish patients with familial amyloidotic polyneuropathy (FAP-met^{30}). *Clin Genet* **40:** 242-6

Holmgren G, Ericzon B-G, Groth C-G, Steen L, Suhr O, Andersen O, Wallin BG, Seymour A, Richardson S, Hawkins PN, Pepys MB (1993). Clinical improvement and amyloid regression after liver transplantation in hereditary transthyretin amyloidosis. *Lancet* **341:** 1113-6

Holmgren G, Costa PM, Andersson C, Asplund K, Steen L, Beckman L, Nylander PO, Teixeira A, Saraiva MJ, Costa PP (1994). Geographical distribution of TTR met30 carriers in northern Sweden: discrepancy between carrier frequency and prevalence rate. *J Med Genet* **31:** 351-4

Holzmann D (1994). Agracetus grows monoclonals in soybeans and corn plants. *Genetic Engineering News* **14(16):** 1

Horibata K, Harris AW (1970). Mouse myelomas and lymphomas in culture. *Exp Cell Res* **60:** 61-77

Horisberger M, Rosset J (1977). Colloidal gold, a useful marker for transmission and scanning electron microscopy. *J Histochem Cytochem* **25:** 295-305

Horta JS (1956). Pathologische Anatomie der portugiesischen Paramyloidosenfälle mit besondere Bevorzugung des peripheren Nervensystems. *Gaz Méd Port* **9:** 678-99

Horta JS, Coelho MRD (1960). Localisations de substance paramyloïde dans le système nerveux central. *Arch 'De Vecchi' Anat Pat* **31:** 163-78

Horta JS, Trincão R (1963). Anatomie pathologique de la paramiloïdose du type portugais. *Acta Neuropathol (Berl)* **Suppl II:** 54-65

Horta JS, Filipe I, Duarte S (1964). Portuguese polyneuritic familial type of amyloidosis. *Path Microbiol* **27:** 809-25

Horwitz AH, Chang CP, Better M, Hellström KE, Robinson RR (1988). Secretion of functional antibody and Fab fragment from yeast cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **85:** 8678-82

Hsiao K, Baker HF, Crow TJ, Poulter M, Owen F, Terwilliger JD, Westaway D, Ott J, Prusiner SB (1989). Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Straussler syndrome. *Nature* **338:** 342-5

Hsu S-M, Raine L, Fanger H (1981). Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* **29:** 577-80

Huntley AC, Fletcher MP, Ikeda RM, Gershwin ME (1977). Shared antigenic determinants between rabbit antihuman brain and rabbit antihuman thymocyte sera: relationship to the lymphocytotoxic antibodies of systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol Immunopathol* **7:** 269-80

Husby G, Sletten K, Michaelsen TE, Natvig JB (1972). Alternative non-immunoglobulin origin of amyloid fibrils. *Nature* **238:** 187

Husby G, Natvig JB (1972a). Individual antigenic specificity and cross-reactions among amyloid preparations from different individuals. *Clin Exp Immunol* **10:** 635-47

Husby G, Natvig JB (1972b). Immunological characterization of amyloid fibrils in tissue sections. *Clin Exp Immunol* **11:** 357-66

Husby G, Ranløv PJ, Sletten K, Marhaug G (1986). Prealbumin nature of the amyloid in familial amyloid cardiomyopathy of Danish origin. *In:* Glenner GG, Osserman EF, Benditt EP, Calkins E, Cohen AS, Zucker-Franklin D, eds. *Amyloidosis.* New York: Plenum Press. 391-9

Husby G, Marhaug G, Dowton B, Sletten K, Sipe JD (1994a). Serum amyloid A (SAA): biochemistry, genetics and the pathogenesis of AA amyloidosis. *Amyloid: Int J Exp Clin Invest* **1:** 119-37

Husby G, Stenstad T, Magnus JH, Sletten K, Nordvag BY, Marhaug G (1994b). Interaction between circulating amyloid fibril protein precursors and extracellular tissue matrix components in the pathogenesis of systemic amyloidosis. *Clin Immunol Immunopathol* **70:** 2-9

Ii K, Kyle RA, Dyck PJ (1992). Immunohistochemical characterization of amyloid proteins in sural nerves and clinical associations in amyloid neuropathy. *Am J Pathol* **141:** 217-26

Ii S, Minnerath S, Ii K, Dyck PJ, Sommer SS (1991). Two-tiered DNA-based diagnosis of transthyretin amyloidosis reveals two novel point mutations. *Neurology* **41:** 893-8

Ikeda SI, Hanyu N, Hongo M, Yoshioka J, Oguchi H, Yanagisawa N, Kobayashi T, Tsukagoshi H, Ito N, Yokota T (1987). Hereditary generalized amyloidosis with polyneuropathy. Clinicopatyhological study of 65 Japanese patients. *Brain* **110:** 315-37

Ikegawa S, Tanase S, Morino Y, Yi S, Ando Y, Miyazaki A, Araki S (1988). Evaluation of serum variant prealbumin levels, and its behavior after plasma exchange for familial amyloidotic polyneuropathy (type I). *In:* Isobe T, Araki S, Uchino F, Kito S, Tsubura E, eds. *Amyloid and Amyloidosis - Proceedings of the Fifth International Symposium on Amyloidosis, held October 25-28, 1987, in Hakone, Japan.* New York: Plenum Press. 839-44

Ikegawa S, Tanaka Y, Yi S, Fukushima T, Ikeda T, Ando Y, Miyazaki A, Araki S (1990). Therapeutic effect of periodic plasma exchange for familial amyloidotic polyneuropathy (type I). The long term preliminary study. *In:* Costa PP, Freitas AF, Saraiva MJM, eds. *Familial Amyloidotic Polyneuropathy and other Transthyretin Related Disorders.* Porto: Arquivos de Medicina **3 (Spec. Issue):** 357-60

Ingbar SH (1958). Prealbumin: A thyroxine-binding protein of human plasma. *Endocrinology* **63:** 256-9

Isobe T, Osserman E (1976). Effects of dimethyl sulfoxide (DMSO) on Bence Jones proteins, amyloid fibrils and casein-induced amyloidosis. *In:* Wegelius O, Pasternack A, eds. *Amyloidosis. Proceedings of the Fifth Sigrid Jusélius Foundation Symposium.* London: Academic Press. 247-57

Izumoto S, Younger D, Hays AP, Martone RL, Smith RT, Herbert J (1992). Familial amyloidotic polyneuropathy presenting with carpal tunnel syndrome and a new transthyretin mutation, asparagine 70. *Neurology* **42:** 2094-102

Izumoto S, Kornberg J, Herbert J (1993). Two transthyretin mutations associated with euthyroid hyperthyroxinemia. (Abstr.). *J Rheumatol* **20:** 186

Jacobson DR, McFarlin DA, Kane I, Buxbaum JN (1992a). Transthyretin Pro 55, a variant associated with early-onset, aggressive, diffuse amyloidosis with cardiac and neurologic involvement. *Hum Genet* **89:** 353-6

Jacobson DR, Rosenthal CJ, Buxbaum JN (1992b). Transthyretin Pro 36 associated familial amyloidotic polyneuropathy in an Ashkenazic jewish kindred. *Hum Genet* **90:** 158-60

Jacobson DR, Buxbaum JN (1994). A double-variant transthyretin allele (Ser 6, Ile 33) in the Israeli patient "SKO" with familial amyloidotic polyneuropathy. *Hum Mutat* **3:** 254-60

Jacobson DR, Alves I, Saraiva MJ, Buxbaum JN (1994a). Transthyretin Ser 6 gene frequency in individuals without amyloidosis. *In:* Kisilevsky R, Benson MD, Frangione B, Gauldie J, Muckle TJ, Young ID, eds. *Amyloid and Amyloidosis 1993. The Proceedings of the VIIth International Symposium on amyloidosis, July 11-15 1993, Kingston, Ontario, Canada.* New York: Parthenon Publishing. 428-30

Jacobson DR, Gertz MA, Kane I, Buxbaum JN (1994b). Genetic analysis of 9 unrelated patients with transthyretin (TTR)-cardiac amyloidosis: correlation of clinical and genetic findings and description of 2 new TTR variants. *In:* Kisilevsky R, Benson MD, Frangione B, Gauldie J, Muckle TJ, Young ID, eds. *Amyloid and Amyloidosis 1993. The Proceedings of the VIIth International Symposium on amyloidosis, July 11-15 1993, Kingston, Ontario, Canada.* New York: Parthenon Publishing. 474-6

Jacobsson B, Pettersson T, Sandstedt B, Carlström A (1979). Prealbumin in the islets of Langerhans. *IRCS Med Sci* **7:** 590

Jacobsson B (1989a). *In situ* localization of transthyretin mRNA in the adult human liver, choroid plexus and pancreatic islets and in endocrine tumours of the pancreas and gut. *Histochemistry* **91:** 299-309

Jacobsson B (1989b). Localization of transthyretin-mRNA and of immunoreactive transthyretin in the human fetus. *Virchows Arch A* **415:** 259-63

Jarret JT, Lansbury PT, Jr (1992). Amyloid fibril formation requires a chemically discriminating nucleation event: studies of an amyloidogenic sequence from the bacterial protein OsmB. *Biochemistry* **31:** 12345-52

Jarret JT, Lansbury PT, Jr (1993). Seeding "One-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and Scrapie? *Cell* **73:** 1055-8

Jarret JT, Berger EP, Lansbury PT, Jr (1993). The carboxy terminus of the β-amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* **32:** 4693-7

Jarvis JA, Munro SLA, Craik DJ (1994). Structural analysis of peptide fragment 71-93 of transthyretin by NMR spectroscopy and electron microscopy: insight into amyloid fibril formation. *Biochemistry* **33:** 33-41

Jinno Y, Matsumoto T, Kamei T, Kondoh T, Maeda S, Araki S, Shimada K, Niikawa N (1986). Localization of the human prealbumin gene to 18p11.-q12.3 by gene dose effect study of southern blot hybridization. *Jpn J Hum Genet* **31:** 243-8

Johansson B, Wernstedt C, Westermark P (1987). Atrial natriuretic peptide deposited as atrial amyloid fibrils. *Biochem Biophys Res Commun* **148:** 1087-92

Johansson B, Westermark P (1990). The relation of atrial natriuretic factor to isolated atrial amyloid. *Exp Mol Pathol* **52:** 266-78

Jones LA, Harding JA, Cohen AS, Skinner M (1991a). New USA family has apolipoprotein AI (Arg26) variant. *In:* Natvig JB, Førre Ø, Husby G, Husebekk A, Skogen B,Sletten K, Westermark P, eds. *Amyloid and amyloidosys 1990. VIth International Symposium on Amyloidosis, August 5-8, 1990, Oslo, Norway*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 385-8

Jones LA, Skare JC, Harding JA, Cohen AS, Milunsky A, Skinner M (1991b). Proline at position 36: a new transthyretin mutation associated with familial amyloidotic polyneuropathy. *Am J Hum Genet* **48:** 979-82

Jones LA, Skare JC, Cohen AS, Harding JA, Milunsky A, Skinner M (1992). Familial amyloid polyneuropathy: a new transthyretin position 30 mutation (alanine for valine) in a family of German descent. *Clin Genet* **41:** 70-3

Jones LA, Keller U, Skare J, Heim S, Skinner M (1993). Familial amyloidotic polyneuropathy (FAP) in a family of Southeast Asian descent. *In:* Kisilevsky R, Benson MD, Frangione B, Gauldie J, Muckle TJ, Young ID, eds. *Amyloid and Amyloidosis 1993. The Proceedings of the VIIth International Symposium on amyloidosis, July 11-15 1993, Kingston, Ontario, Canada.* New York: Parthenon Publishing. 450-2

Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G (1986). Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* **321:** 522-5

Jörnvall H, Carlström A, Pettersson T, Jacobsson B, Persson M, Mutt V (1981). Structural homologies between prealbumin, gastrointestinal prohormones and other proteins. *Nature* **291:** 261-3

Julião OF (1963). Aspectos clínicos da neuropatia amiloide. Considerações a propósito de 14 casos. *Rev Paul Med* **63:** 349-52

Julião OF, Queiroz LS, Faria JL (1974). Portuguese type of familial amyloid polyneuropathy. Anatomo-clinical study of a Brazilian family. *Europ Neurol* **11:** 180-95

Jürgens R (1875). Eine neue Reaction auf Amyloidkörper. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol* **65:** 189-96

Kabat EA, Moore DM, Landow H (1942). An electrophoretic study of the protein components in the cerebrospinal fluid and their relationship to the serum proteins. *J Clin Invest* **21:** 571-7

Kanai M, Raz A, Goodman DS (1968). Retinol-binding protein: the transport protein for vitamin A in human plasma. *J Clin Invest* **47:** 2025-44

Kanda Y, Goodman DS, Canfield RE, Morgan FJ (1974). The aminoacid sequence of human plasma prealbumin. *J Biol Chem* **249:** 6796-805

Kantarjian AD, DeJong RN (1953). Familial primary amyloidosis with nervous system involvment. *Neurology (Minneap)* **3:** 399-409

Kato M, Soprano DR, Makover A, Kato K, Herbert J, Goodman DS (1986). Localization of immunoreactive transthyretin (prealbumin) and of transthyretin mRNA in fetal and adult rat brain. *Differentiation* **31:** 228-35

Kaufman HE (1958). Primary familial amyloidosis. *Arch Ophthalmol* **60:** 1036-43

Kay G, Crook EM (1967). Coupling of enzymes to cellulose using chloro-s-triazines. *Nature* **216:** 514-5

Kearney JF, Radbruch A, Liesegang B, Rajewsky K (1979). A new mouse myeloma cell line which has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody in secreting hybrid cell lines. *J Immunol* **123:** 1548-50

Kedar I, Ravid M, Sohar E (1976). *In vitro* synthesis of "amyloid" fibrils from insulin, calcitonin and parathormone. *Israel J Med Sci* **12:** 1137-40

Kelly JW, Lansbury PT, Jr (1994). A chemical approach to elucidate the mechanism of transthyretin and β-protein amyloid fibril formation. *Amyloid: Int J Exp Clin Invest* **1:** 186-205

Kendall C, Ionescu-Matiu I, Dressman GR (1983). Utilization of the biotin/avidin system to amplify the sensitivity of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J Immunol Methods* **56:** 329-39

Kerenyi L, Gallyas F (1972). A highly sensitive method for demonstrating proteins in electrophoretic, immunoelectrophoretic and immunodiffusion preparations. *Clin Chim Acta* **38:** 465-7

Kimura S, Guyer R, Terry WD, Glenner GG (1972). Chemical evidence for λ-type amyloid fibril proteins. *J Immunol* **109:** 891-2

Kincaid JC, Wallace MR, Benson MD (1989). Late-onset familial amyloid polyneuropathy in an american family of english origin. *Neurology* **39:** 861-3

Kirschner DA, Abraham C, Selkoe DJ (1986). X-ray diffraction from intra neuronal paired helical filaments and extraneuronal amyloid fibers in Alzheimer disease indicates cross-Beta conformation. *Proc Natl Acad Sci USA* **83:** 503-7

Kirschner DA, Inouye H, Duffy LK, Sinclair A, Lind M, Selkoe DJ (1987). Synthetic peptide homologous to β-amyloid protein from Alzheimer disease forms amyloid-like fibrils *in vitro. Proc Natl Acad Sci USA* **84:** 6953-7

Kisilevsky R, Axelrad M, Corbett W, Brunet S, Scott S (1977). The role of inflammatory cells in the pathogenesis of amyloidosis. *Lab Invest* **37:** 544-53

Kisilevsky R (1992). Proteoglycans, glycosaminoglycans, amyloid-enhancing factor, and amyloid deposition. *J Internal Med* **232:** 515-6

Kito S (1973). A new focus of familial amyloidotic polyneuropathy. Epidemiological and clinico-pathological studies. *Nippon Rinsho* **31:** 170-82

Klafki H, Pick AI, Pardowitz I, Cole T, Awni LA, Barnikol H, Mayer F, Kratzin HD, Hilschmann N (1993). Reduction of disulfide bonds in an amyloidogenic Bence Jones protein leads to formation of "amyloid-like" fibrils *in vitro. Biol Chem Hoppe-Seyler* **374:** 1117-22

Kluve-Beckerman B, Brinckerhoff C, Benson MD (1991). Sequence analysis of a third human SAA gene. *In:* Natvig JB, Førre Ø, Husby G, Husebekk A, Skogen B,Sletten K, Westermark P, eds. *Amyloid and amyloidosys 1990. VIth International Symposium on Amyloidosis, August 5-8, 1990, Oslo, Norway*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 24-28

Kobayashi H, Hashimoto K (1983). Amyloidogenesis in organ-limited cutaneous amyloidosis: an antigenic identity between epidermal keratin and skin amyloid. *J Invest Dermatol* **80:** 66-72

Kohn J, Wilchek M (1984). The use of cyanogen bromide and other novel cyanylating agents for the activation of polysaccharide resins. *Appl Biochem Biotechnol* **9:** 285-304

Koletsky S, Stecher RM (1939). Primary systemic amyloidosis. Involvement of cardiac valves, joints and bones, with pathologic fracture of the femur. *Arch Pathol* **27:** 266-88

Koshiba H, Ishii Y, Yamanaka N, Kikuchi K (1977). Identification of human peripheral T cell antigens. *J Immunol* **118:** 625-9

Kozbor D, Triputti P, Roder JC, Croce CM (1984). A human hybrid myeloma for production of human monoclonal antibodies. *J Immunol* **133:** 3001-5

Köhler G, Milstein C (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256:** 495-7

Köhler G, Howe SC, Milstein C (1976). Fusion between immunoglobulin-secreting and non-secreting myeloma cell lines. *Eur J Immunol* **6:** 292-5

Köhler G, Pearson T, Milstein C (1977). Fusion of T and B cells. *Somat Cell Genet* **3:** 303-12

Krücke W (1963). Zur pathologischen Anatomie der Paramyloidose. *Acta Neuropathol* **Suppl. II:** 74-93

Kuczynski MH, Goldmanns E (1922). Untersuschungen uber zelluläre Vorgange in Gefolge des Verdauungsprozesses auf Grund nachgelassener Präparate dargestellt und durch neue Versuche ergänzt. *Virch Arch* **239:** 185-302

Kukharchuk VV, Konovalov GA, Vedernikov AV, et al. (1988). Long-term application of three types of sorbent for LDL-apheresis. *Plasma Ther Transfus Technol* **9:** 45-7

Kyle RA, Gertz MA, Garton JP, Greipp PR, Witzig TE, Lust JA (1994). Primary systemic amyloidosis (AL): randomized trial of colchicine vs. melphalan and prednisone vs. melphalan, prednisone, and colchicine. *In:* Kisilevsky R, Benson MD, Frangione B, Gauldie J, Muckle TJ, Young ID, eds. *Amyloid and Amyloidosis 1993. The Proceedings of the VIIth International Symposium on amyloidosis, July 11-15 1993, Kingston, Ontario, Canada.* New York: Parthenon Publishing. 648-50

Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227:** 680-5

Lane HC, Shelhamer JH, Mostowski HS, Fauci AS (1982). Human monoclonal anti-keyhole limpet hemocyanin antibody-secreting hybridoma produced from peripheral blood B lymphocytes of a keyhole limpet hemocyanin-immune individual. *J Exp Med* **155:** 333-8

Lane RD (1985). A short-duration polyethylene glycol fusion technique for increasing production of monoclonal antibody-secreting hybridomas. *J Immunol Methods* **81:** 223-8

Lanham JG, Meltzer ML, de Beer FC, Hughes GRV, Pepys MB (1982). Familial amyloidosis of Ostertag. *Q J Med* **51:** 25-32

Lans MC, Klasson-Wehler E, Willemsen M, Meussen E, Safe S, Brouwer A (1993). Structure-dependent, competitive interaction of hydroxy-polychlorobiphenyls, -dibenzo- *p*-dioxins and -dibenzofurans with human transthyretin. *Chem Biol Interactions* **88:** 7-21

Larue C, Gueraud V, Rivat C (1985). Suitable hollow fibre immunobioreactors for specific *ex vivo* removal of antibodies and antigens from plasma. *Clin Exp Immunol* **62:** 217-24

Lasch J, Koelsch R (1978). Enzyme leakage and multipoint attachment of agarose-bound enzyme preparations. *Eur J Biochem* **82:** 181-6

Laurell C-B (1966). Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Anal Biochem* **15:** 46-52

Laurell C-B (1972). Electrophoretic and electroimmunochemical analysis of proteins. *Scand J Clin Invest* **29 (Suppl 124):** 21-37

Lebedin YS, Gorchakov VD, Petrova EN, Kobylyansky AG, Raudla LA, Tatarsky AR, Bobkov EV, Adamova IY, Vasilov RG, Nasanov EL, Pokrovsky SN, Chuchalin AG (1991). *Ex vivo* removal of IgE in atopic asthma by extracorporeal plasmoimmunoadsorption (EPIA): development of a clinical adsorbent. *Int J Artif Organs* **14:** 508-14

Léger JM, Grateau G, Gugenheim M, Hauw JJ, Bouche P, Brunet P (1994). Genetic expression of a transthyretin mutation in a case of amyloidotic polyneuropathy occurring in an African. *Neurology* **44:** 181

Letterer E (1926). Studien über Art und Entstehung des Amyloids. *Zbl allg Path path Anat* **75:** 486-7

Letterer E (1968). History and development of amyloid research. *In:* Mandema E, Ruinen L, Scholten JH, Cohen AS, eds. *Amyloidosis. Proceedings of the symposium on amyloidosis, University of Groningen, The Netherlands, september 24-28, 1967.* Amsterdam: Excerpta Medica. 3-9

Levin M, Franklin EC, Frangione B, Pras M (1972). The amino acid sequence of a major non-immunoglobulin component of some amyloid fibrils. *J Clin Invest* **51:** 2773-6

Levin M, Pras M, Franklin EC (1973). Immunologic studies of the major nonimmunoglobulin protein of amyloid. I - Identification and partial characterization of a related serum component. *J Exp Med* **138:** 373-80

Levine F, Friedmann T (1993). Gene Therapy. *Am J Dis Child* **147:** 1167-74

Levy E, Carman MD, Fernandez-Madrid IJ, Power MD, Lieberburg I, van Duinen SG, Bots GTAM, Luyendijk W, Frangione B (1990). Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. *Science* **248:** 1124-6

Libbey CA, Rubinow A, Shirahama T, (1984). Familial amyloid polyneuropathy: demonstration of prealbumin in a kinship of German/English ancestry with onset in the seventh decade. *Am J Med* **76:** 18-24

Libbey CA, Talbert ML (1987). Case records of the Massachusetts General Hospital. Case 50 - 1987. *N Engl J Med* **317:** 1520-31

Liepnieks JJ, Ghetti B, Farlow M, Roses AD, Benson MD (1993). Characterization of amyloid fibril beta-peptide in familial Alzheimer's disease with APP717 mutations. *Biochem Biophys Res Commun* **197:** 386-92

Linke RP, Zucker-Franklin D, Franklin EC (1973). Morphologic, chemical and immunologic studies of amyloid-like fibrils formed from Bence Jones proteins by proteolysis. *J Immunol* **111:** 10-23

Linke RP, Nathrath WBJ (1980). Klassifizierung von Amyloid-Krankheiten an der Biopsie. Anwendung der Immunperoxidase-Technik. *Münch Med Wschr* **122:** 1772-7

Linke RP (1982). Immunohistochemical identification and cross reactions of amyloid fibril proteins in senile heart and amyloid in familial polyneuropathy. Lack of reactivity with cerebral amyloid in Alzheimer's disease. *Clin Neuropathol* **1:** 172-82

Linke RP, Heilmann KL, Nathrath WBJ, Eulitz M (1983). Identification of amyloid A protein in a sporadic Muckle-Wells syndrome. N-terminal amino acid sequence after isolation from formalin-fixed tissue. *Lab Invest* **48:** 698-704

Linke RP (1984). Monoclonal antibodies against amyloid fibril protein AA. Production, specificity and use for immunohistochemical localization and classification of AA-type amyloidosis. *J Histochem Cytochem* **32:** 322-8

Littlefield JW (1964). Selection of hybrids from matings of fibroblasts *in vitro* and their presumed recombinants. *Science* **145:** 709-10

Livni N, Laufer A, Levo Y (1980). Demonstration of amyloid in murine and human secondary amyloidosis by the immunoperoxidase technique. *J Pathol* **132:** 343-8

Lo MS, Tsong TY, Contad MK, Strittmatter SM, Hester LD, Snyder SH (1984). Monoclonal antibody production by receptor-mediated electrically induced cell fusion. *Nature* **310:** 792-4

López Andreu FR, Munar-Qués M, Parrilla P, Escribano Soriano JB, Costa PP, Costa PMP, Almeida MR, Pons JA, Robles R, Sánchez-Bueno F, Ramírez P, Acosta F, Vicente Ibáñez J (1993). Trasplante hepático para el tratamiento de la polineuropatía amiloidótica familiar tipo I. *Med Clin (Barc)* **101:** 581-3

Lupien PJ, Moorjani S, Awad JA (1976). A new approach to the management of familial hypercholesterolaemia: Removal of plasma cholesterol based on the principle of affinity chromatography. *Lancet* **i:** 1261-5

Lyon AW, Narindrasorasak S, Young ID, Anastassiades T, Couchman JR, McCarthy KJ, Kisilewsky R (1991). Co-deposition of basement membrane components during the induction of murine splenic AA amyloid. *Lab Invest* **64:** 785-90

Mabuchi H, Michishita J, Mitsuaki T, Fujita H, Koizumi J, Takeda R, Takada R, Oonishi M (1987). A new low density lipoprotein apheresis system using two dextran sulfate cellulose columns in an automated column regenerating unit (LDL continuous apheresis). *Atherosclerosis* **68:** 19-25

MacClure E, Raick A, Lemos C, Ferreira S (1960). Polineuropatia amiloidótica familiar. *Hospital (Rio de Janeiro)* **58:** 269-91

Magnus JH, Stenstad T, Kolset SO, Husby G (1991). Glycosaminoglycans in extracts of cardiac amyloid fibrils from familial amyloid cardiomyopathy of Danish origin related to variant transthyretin Met 111. *Scand J Immunol* **34:** 63-9

Magnus JH, Stenstad T, Husby G, Kolset SO (1992). Isolation and partial characterization of heparan sulphate proteoglycans from human hepatic amyloid. *Biochem J* **288:** 225-31

Mahloudji M, Teasdall RD, Adamkiewicz JJ, Hartmann WH, Lambird PA, McKusick VA (1969). The genetic amyloidoses, with particular reference to hereditary neuropathic amyloidosis, type II (Indiana or Rukavina type). *Medicine (Balt)* **48:** 1-37

Maiorella BL, Winkelhake J, Young J, Moyer B, Bauer R, Hora M, Andya J, Thomson J, Patel T, Parekh R (1993). Effect of culture conditions on IgM antibody structure, pharmacokinetics and activity. *Bio/Technology* **11:** 387-92

Makover A, Moriwaki H, Ramakrishnan R, Saraiva MJM, Blaner WS, Goodman DS (1988). Plasma transthyretin. Tissue sites of degradation and turnover in the rat. *J Biol Chem* **263:** 8598-603

Makover A, Soprano DR, Wyatt ML, Goodman DS (1989). An *in situ*-hybridization study of the localization of retinol-binding protein and transthyretin messenger RNAs during fetal development in the rat. *Differentiation* **40:** 17-25

March SC, Parkh I, Cuatrecasas P (1974). A simplified method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography. *Anal Biochem* **60:** 149-52

Marucci AA, DiStefano HS, Dougherty RM (1974). Preparation and use of soluble ferritin-antiferritin complexes as a specific marker for immunoelectron microscopy. *J Histochem Cytochem* **22:** 35-9

Maury CPJ, Alli K, Baumann M (1990). Finish hereditary amyloidosis. Amino acid sequence homology between the amyloid fibril protein and human plasma gelsolin. *FEBS Lett* **260:** 85-7

Maury CPJ (1991). Gelsolin-related amyloidosis. Immunohistochemical studies in Finnish hereditary amyloidosis with antibodies to a synthetic dodecapeptide of the amyloidogenic region of gelsolin. *In:* Natvig JB, Førre Ø, Husby G, Husebekk A, Skogen B,Sletten K, Westermark P, eds. *Amyloid and amyloidosys 1990. VIth International Symposium on Amyloidosis, August 5-8, 1990, Oslo, Norway.* Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 414-7

McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ (1990). Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* **348:** 552-4

McCutchen SL, Kelly JW (1993). Intermolecular disulfide linkages are not required for transthyretin amyloid formation in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **197:** 415-21

McCutchen SL, Colon W, Kelly JW (1993). Transthyretin mutation Leu-55-Pro significantly alters tetramer stability and increases amyloidogenicity. *Biochemistry* **32:** 12119-27

Meckel H (1853). Die Speck- oder Cholestrinkrankheit. *Ann Charité-Krankenhauses* **4:** 264-320

Mello AR (1959). Polineuropatia amiloidótica familiar. *J Bras Med* **1:** 161-218

Mendel CM, Cavalieri RR, Köhrle J (1992). Thyroxine (T_4) transport and distribution in rats treated with EMD 21388, a synthetic flavonoid that displaces T_4 from transthyretin. *Endocrinology* **130:** 1525-32

Meretoja J (1969). Familial systemic paramyloidosis with lattice distrophy of the cornea, progressive cranial neuropathy, skin changes and various internal symptoms: a previously unrecognized heritable syndrome. *Ann Clin Res* **1:** 314-24

Milligan JF, Matteucci MD, Martin JC (1993). Current concepts in antisense drug design. *J Med Chem* **36:** 1923-37

Milstein C, Cuello AC (1983). Hybrid hybridomas and their use in immunocytochemistry. *Nature* **305:** 537-40

Milstein C, Cuello AC (1984). Hybrid hybridomas and the production of bi-specific monoclonal antibodies. *Immunol Today* **5:** 299-304

Miron T, Wilchek M (1987). Immobilization of proteins and ligands using chlorocarbonates. *Methods Enzymol* **135:** 84-90

Missmahl H-P (1968). Reticulin and collagen as important factors for the localization of amyloid. The use of polarization microscopy as a tool in the detection of the composition of amyloid. *In:* Mandema E, Ruinen L, Scholten JH, Cohen AS, eds. *Amyloidosis. Proceedings of the symposium on amyloidosis, University of Groningen, The Netherlands, september 24-28, 1967.* Amsterdam: Excerpta Medica. 22-33

Mita S, Maeda S, Shimoda K, Araki S (1984). Cloning and sequence analysis of cDNA for human prealbumin. *Biochem Biophys Res Commun* **124:** 558-64

Moraghi R, Rubenstein P, Franklin EC (1982). Familial renal amyloidosis; case reports and genetic studies. *Am J Med* **73:** 609-14

Morrison SL, Johnson MJ, Herzenberg LA, Oi VT (1984). Chimeric human antibody molecules: Mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc Natl Acad Sci USA* **81:** 6851-5

Moses AC, Rosen HN, Moller DE, Tsuzaki S, Haddow J, Lawlor J, Liepnieks IJ, Nichols WC, Benson MD (1990). A point mutation in transthyretin increases affinity for thyroxine and produces euthyroid hyperthyroxinemia. *J Clin Invest* **86:** 2025-33

Motojima K, Goto S (1990). Dual promoters and tissue-specific expression of rat transthyretin gene. *Biochem Biophys Res Commun* **173:** 323-30

Mucchiano G, Cornwell GG, Westermark P (1992). Senile aortic amyloid. Evidence for two distinct forms of localized deposits. *Am J Pathol* **140:** 871-7

Muckle TJ, Wells M (1962). Urticaria, deafness and amyloidosis: a new heredo-familial syndrome. *Q J Med* **31:** 235-48

Muckle TJ (1986). Peripheral angiopathy. *In:* Marrink J, van Rijswijk MH, eds. *Amyloidosis.* Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers. 271-82

Munar-Quès M, Costa PP, Saraiva MJM (1988). Familial amyloidotic polyneuropathy type I Portuguese form in the isle of Mallorca (Spain). Study of five families. *Bol Hosp (HGSA)* **3:** 17-27

Murakami H, Masui H, Sato GH, Sueoka N, Chow TP, Kano-Sueoka T (1982). Growth of hybridoma cells in serum-free medium: ethanolamine is an essential component. *Proc Natl Acad Sci USA* **79:** 1158-62

Murakami T, Yasuda Y, Mita S, Maeda S, Shimada K, Fujimoto T, Araki S (1987). Prealbumin gene expression during mouse development studied by *in situ* hybridization. *Cell Differentiation* **22:** 1-10

Murakami T, Maeda S, Yi S, Ikegawa S, Kawashima E, Onodera S, Shimada K, Araki S (1992a). A novel transthyretin mutation associated with familial amyloidotic polyneuropathy. *Biochem Biophys Res Commun* **182:** 520-6

Murakami T, Atsumi T, Maeda S, Tanase S, Ishikawa K, Mita S, Kumamoto T, Araki S, Ando M (1992b). A novel transthyretin mutation at position 30 (Leu for Val) associated with familial amyloidotic polyneuropathy. *Biochem Biophys Res Commun* **187:** 397-402

Murakami T, Tachibana S, Endo Y, Kawai R, Hara M, Tanase S, Ando M (1994). Familial carpal tunnel syndrome due to amyloidogenic transthyretin His 114 variant. *Neurology* **44:** 315-8

Murrell J, Farlow M, Ghetti B, Benson MD (1991). A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease. *Science* **254:** 97-9

Nakane PK, Pierce GB, Jr (1967a). Enzyme-labeled antibodies for the light and electron microscopic localization of tissue antigens. *J Cell Biol* **33:** 307-18

Nakane PK, Pierce GB, Jr (1967b). Enzyme-labeled antibodies: preparations and applications for the localization of antigens. *J Histochem Cytochem* **14:** 929-30

Nakazato M, Kangawa K, Minamino N, Tawara S, Matsuo H, Araki S (1984a). Identification of a prealbumin variant in the serum of a Japanese patient with familial amyloidotic polyneuropathy. *Biochem Biophys Res Commun* **122:** 712-8

Nakazato M, Kangawa K, Minamino N, Tawara S, Matsuo H, Araki S (1984b). Radioimmunoassay for detecting abnormal prealbumin in the serum for diagnosis of familial amyloidotic polyneuropathy (Japanese type). *Biochem Biophys Res Commun* **122:** 719-25

Nakazato M, Kangawa K, Minamino N, Tawara S, Matsuo H, Araki S (1984c). Revised analysis of aminoacid replacement in a prealbumin variant (SKO-III) associated with familial amyloidotic polyneuropathy of Jewish origin. *Biochem Biophys Res Commun* **123:** 921-8

Nakazato M, Ikeda S, Shiomi K, Matsukura S, Yoshida K, Shimizu H, Atsumi T, Kangawa K, Matsuo H (1992). Identification of a novel transthyretin variant (Val30Leu) associated with familial amyloidotic polyneuropathy. *FEBS Lett* **306:** 206-8

Nakazato M, Shiomi K, Matsukura S (1994). Three transthyretin variants (Val^{30}→Leu, Glu^{61}→Lys, Ala^{97}→Gly) cause familial amyloidotic polyneuropathy. *In:* Kisilevsky R, Benson MD, Frangione B, Gauldie J, Muckle TJ, Young ID, eds. *Amyloid and Amyloidosis 1993. The Proceedings of the VIIth International Symposium on amyloidosis, July 11-15 1993, Kingston, Ontario, Canada.* New York: Parthenon Publishing. 468-70

Napper A, Benkovic SJ, Tramontano A, Lerner RA (1987). A stereospecific cyclization catalyzed by an antibody. *Science* **237:** 1041-3

Nelson SR, Lyon M, Gallagher JT, Johnson EA, Pepys MB (1991). Isolation and characterization of the integral glycosaminoglycan constituents of human amyloid A and monoclonal light-chain amyloid fibrils. *Biochem J* **275:** 67-73

Neuberger MJ, Williams GT, Fox RO (1984). Recombinant antibodies possessing novel effector functions. *Nature* **312:** 604-8

Neuberger MJ, Williams GT, Mitchell EB, Jouhal SS, Flanagan JG, Rabbitts TH (1985). A hapten-specific chimaeric IgE antibody with human physiological effector function. *Nature* **314:** 268-70

Newcomer M, Jones TA, Åqvist J, Sundelin J, Eriksson U, Rask L, Peterson PA (1984). The three-dimensional structure of retinol-binding protein. *EMBO J* **3:** 1451-4

Nichols WC, Dwulet FE, Liepnicks J, Benson MD (1988). Variant apolipoprotein A-I as a major constituent of a human hereditary amyloid. *Biochem Biophys Res Commun* **156:** 762-8

Nichols WC, Liepnicks JJ, McKusik VA, Benson MD (1989). Direct sequencing of the gene for Maryland/German familial amyloidotic polyneuropathy type II and genotyping by allele-specific enzymatic amplification. *Genomics* **5:** 535-40

Nichols WC, Gregg RE, Brewer HB, Jr., Benson MD (1990). A mutation in apolipoprotein A-I in the Iowa type of familial amyloidotic polyneuropathy. *Genomics* **8:** 318-23

Niewold TA, Hol PR, van Andel ACJ, Lutz ETG, Gruys E (1987). Enhancement of amyloid induction by amyloid fibril fragments in hamster. *Lab Invest* **56:** 544-9

Niewold TA, Gruys E, Arakawa T, Shirahama T, Kisilevsky R (1993). Recombinant human tumour necrosis factor-alpha (rhTNF-alpha) and rhTNF-alpha analogue enhance amyloid deposition in the Syrian hamster. *Scand J Immunol* **37:** 29-32

Nilsson IM, Jonsson S, Sundqvist SB, Ahlberg A, Bergentz SE (1981). A procedure for removing high titer antibodies by extracorporeal protein-A-sepharose adsorption in hemophilia: substitution therapy and surgery in a patient with hemophilia B and antibodies. *Blood* **58:** 38-44

Nilsson IM, Freiburghaus C, Sundqvist S-B, Sandberg H (1984). Removal of specific antibodies from whole blood in a continuous extracorporeal system. *Plasma Ther Transfus Technol* **5:** 127-34

Nilsson K, Mosbach K (1980). p-Toluenesulfonyl chloride as an activating agent of agarose for the preparation of immobilized affinity ligands and proteins. *Eur J Biochem* **112:** 397-402

Nilsson K, Mosbach K (1981). Immobilization of enzymes and affinity ligands to various hydroxyl group carrying supports using highly reactive sulfonyl chlorides. *Biochem Biophys Res Commun* **102:** 449-57

Nilsson K, Mosbach K (1984). Immobilization of ligands with organic sulfonyl chlorides. *Methods Enzymol* **104:** 56-69

Nilsson K, Mosbach K (1987). Tresyl chloride-activated supports for enzyme immobilization. *Methods Enzymol* **135:** 65-78

Nilsson SF, Peterson PA (1975). Studies on thyroid hormone-binding proteins. The subunit structure of human thyroxine-binding globulin and its interaction with ligands. *J Biol Chem* **250:** 8543-53

Niman HL, Houghten RA, Walker LE, Reisfield RA, Wilson IA, Hogle JM, Lerner RA (1983). Generation of protein-reactive antibodies by short peptides is an event of high frequency: Implications for the structural basis of immune recognition. *Proc Natl Acad Sci USA* **80:** 4949-53

Nishi H, Kimura A, Harada H, Hayasha Y, Nakamura M, Sasazuki T (1992). Novel variant transthyretin gene (Ser50 to Ile) in familial cardiac amyloidosis. *Biochem Biophys Res Commun* **187:** 460-6

Nissim A, Hoogenboom HR, Tomlinson IM, Flynn G, Midgley C, Lane D, Winter G (1994). Antibody fragments from a 'single pot' phage display library as immunochemical reagents. *EMBO J* **13:** 692-8

Nordlie M, Sletten K, Husby G, Ranløv PJ (1988). A new prealbumin variant in familial amyloid cardiomyopathy of Danish origin. *Scand J Immunol* **27:** 119-22

Nossal GJV, Lederberg J (1958). Antibody production by single cells. *Nature* **181:** 1419-20

Novotny J, Handschumacher M, Bruccoleri RE (1987). Protein antigenicity: a static surface property. *Immunol Today* **8:** 26-31

Nowinski RC, Boglund J, Lane M, Lostrum M, Bernstein I, Young W, Hakomori S, Hill L, Cooney M (1980). Human monoclonal antibody against Forsmann's antigens. *Science* **210:** 537-9

Okada Y (1962). Analysys of giant polynuclear cell formation caused by HVJ virus from Ehrlich's ascites tumor cells. I. Microscopic observation of giant polynuclear cell formation. *Exp Cell Res* **26:** 98-107

Olofsson OB, Nilsson TK (1990). Reduced levels of tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor in plasma of patients with familial amyloidotic polyneuropathy. *Haemostasis* **20:** 31-6

Olsson L, Kaplan HS (1980). Human-human hybridomas producing monoclonal antibodies of predefined antigenic specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* **77:** 5429-31

Ong DE, Davis JT, O'Day WT, Bok D (1994). Synthesis and secretion of retinol binding protein and transthyretin by cultured retinal pigment epithelium. *Biochemistry* **33:** 1835-42

Oppenheimer JH, Surks MI, Bernstein G, Smith JC (1965). Metabolism of Iodine-131-labeled thyroxine-binding prealbumin in man. *Science* **149:** 748-50

Osserman EF, Sherman WH, Kyle RA (1980). Further studies of therapy of amyloidosis with dimethylsulfoxide (DMSO). *In:* Glenner GG, Costa PP, Freitas AF, eds. *Amyloid and Amyloidosis - Proceedings of the Third International Symposium on Amyloidosis, Póvoa de Varzim, Portugal, 23-28 September 1979.* Amsterdam: Excerpta Medica. 563-9

Ostertag B (1932). Demonstration einer eigenartigen familiaren "Paraamyloidose". *Zentralb Allg Pathol* **56:** 253-4

Ostertag B (1950). Familiäre Amyloid - Erkrankung. *Z Menschl Vererbungs Konstit lehre* **30:** 105-15

Ouchterlony, Ö (1949). Antigen-antibody reactions in gels. *Ark Kemi Mineral Geol* **26:** 1

Owen MJ (1983). Synthetic peptides and their impact on immunology. *Immunol Today* **4:** 190-1

Pages RA, Robbins J, Edelhoch H (1973). Binding of thyroxine and thyroxine analogs to human serum prealbumin. *Biochemistry* **12:** 2773-9

Parker TS, Studebaker JF (1988). Low density lipoprotein-pheresis: selective immunoadsorption of plasma lipoproteins from patients with premature atherosclerosis. *Methods Enzymol* **137:** 466-78

Pauling L, Corey RB (1951). Configurations of polypeptide chains with favoured orientations round single bonds: two new pleated sheets. *Proc Natl Acad Sci USA* **37:** 729-40

Pearse AGE, Ewen SWB, Polak JM (1972). The genesis of apudamyloid in endocrine polypeptide tumors: Histochemical distinction from immunoamyloid. *Virchows Arch B* **10:** 93-107

Pepys MB, Hawkins PN, Booth DR, Vigushin DM, Tennent GA, Soutar AK, Totty N, Nguyen O, Blake CCF, Terry CJ, Feest TG, Zalin AM, Hsuan JJ (1993). Human lysozyme gene mutations cause hereditary systemic amyloidosis. *Nature* **362:** 553-7

Peterson PA (1971a). Studies on the interaction between prealbumin, retinol-binding protein and vitamin A. *J Biol Chem* **246:** 44-9

Peterson PA (1971b). Characteristics of a vitamin A transporting protein complex occuring in human serum. *J Biol Chem* **246:** 34-43

Peterson PA, Nilsson SF, Östberg L, Rask L, Vahlquist A (1974). Aspects of the metabolism of retinol-binding protein and retinol. *Vitam Horm* **32:** 181-214

Pettersson T (1989). *Studies of thyroxine binding globulin and transthyretin (prealbumin) with special reference to their significance for free thyroxin concentration.* (Tese). Estocolmo: Karolinska Institutet

Pitkänen P, Westermark P, Cornwell III GG (1984). Senile Systemic Amyloidosis. *Am J Pathol* **117:** 391-9

Pokrovsky SN, Adamova IY, Afanasieva OY, Benevolenskaya GF (1991). Immunosorbent for selective removal of Lipoprotein (a) from human plasma: in vitro study. *Artif Organs* **15:** 136-40

Pokrovsky SN, Sussekov AV, Afanasieva OI, Adamova IY, Lyakishev AA, Kukharchuk VV (1994). Extracorporeal immunoadsorption for the specific removal of lipoprotein (a) (Lp(a) apheresis): preliminary clinical data. *Chem Phys Lipids* **67/68:** 323-30

Pollack SJ, Jacobs JW, Schultz PG (1986). Selective chemical catalysis by an antibody. *Science* **234:** 1570-3

Pontecorvo G (1975). Production of mammalian somatic cell hybrids by means of polyethylene glycol treatment. *Somatic Cell Genet* **1:** 397-400

Porta EA, Yerry R, Scott RF (1962). Amyloidosis of functioning islet cell adenomas of the pancreas. *Am J Pathol* **41:** 623

Posnett DN, McGrath H, Tam JP (1988). A novel method for producing anti-peptide antibodies. Production of site-specific antibodies to the T cell antigen receptor beta-chain. *J Biol Chem* **263:** 1719-25

Potter M, Robertson CL (1960). Development of plasma-cell neoplasms in BALB/C mice after intraperitoneal injection of paraffin-oil adjuvant, heat-killed staphylococcus mixtures. *J Natl Cancer Inst* **25:** 847

Potter M, Boyce CR (1962). Induction of plasma cell neoplasms in strain BALB/C mice with mineral oil adjuvants. *Nature* **193:** 1086-7

Potter M (1972). Immunoglobulin-producing tumors and myeloma proteins of mice. *Physiol Rev* **52:** 631-719

Potter M (1977). Antigen-binding myeloma proteins of mice. *Adv Immunol* **25:** 141-211

Pras M, Schubert M, Zucker-Franklin D, Rimon A, Franklin EC (1968). The characterization of soluble amyloid prepared in water. *J Clin Invest* **47:** 924-33

Pras M, Franklin EC, Prelli F, Frangione B (1981). A variant of prealbumin from amyloid fibril in familial polyneuropathy of Jewish origin. *J Exp Med* **154:** 989-93

Prelli F, Pras M, Shtrasburg S, Frangione B (1991). Characterization of high molecular weight amyloid A proteins. *Scand J Immunol* **33:** 783-6

Prusiner SB, Groth DF, Bolton DC, Kent SB, Hood LE (1984). Purification and structural studies of a major scrapie prion protein. *Cell* **38:** 127-34

Puchtler H, Sweet F, Levine M (1962). On the binding of Congo red by amyloid. *J Histochem Cytochem* **10:** 355-64

Puchtler H, Sweet FJ (1966). A review of early concepts of amyloid in context with contemporary chemical literature from 1839 to 1859. *J Histochem Cytochem* **14:** 123-134

Ram JS, DeLellis RA, Glenner GG (1968). Amyloid. IV. Is human amyloid immunogenic? *Int Arch Allergy* **34:** 269-82

Rask L, Peterson PA, Nilsson SF (1971). The subunit structure of human thyroxine-binding prealbumin. *J Biol Chem* **246:** 6087-97

Rask L, Peterson PA, Bjork I (1972). Conformational studies of the human vitamin A-transporting protein complex. *Biochemistry* **11:** 264-8

Rask L, Anundi H, Fohlman J, Peterson PA (1987). The complete amino acid sequence of human serum retinol-binding protein. *Upsala J Med Sci* **92:** 115-46

Ravid M, Kedar I (1980). Prolonged dimethylsulfoxide treatment of systemic amyloidosis in man. *In:* Glenner GG, Costa PP, Freitas AF, eds. *Amyloid and Amyloidosis - Proceedings of the Third International Symposium on Amyloidosis, Póvoa de Varzim, Portugal, 23-28 September 1979.* Amsterdam: Excerpta Medica. 578-9

Raynes JG, Eagling S, McAdam KPWJ (1991). Acute phase protein synthesis in hepatoma cells: Differential regulation of SAA and haptoglobin by IL-1 and IL-6. *Clin Exp Immunol* **84:** 488-92

Raz A, Shiratori T, Goodman DS (1970). Studies on the protein-protein and protein-ligand interactions involved in retinol transport in plasma. *J Biol Chem* **245:** 1903-12

Richardson SJ, Bradley AJ, Duan W, Southwell BR, Selwood L, Schreiber G (1993). The expression of the transthyretin gene in liver evolved during the radiation of diprotodont marsupials in Australia. *Gen Comp Endocrinol* **90:** 177-82

Riesen WF (1990). Experience with low-density lipoprotein apheresis by polyclonal and monoclonal anti-apolipoprotein B antibodies and by dextran sulfate cellulose. *In:* Nydegger UE, ed. *Therapeutic Hemapheresis in the 1990s. Curr Stud Hematol Blood Transf, vol 57.* Basel: Karger. 208-19

Riggs JL, Seiwald RJ, Burckhalter JH, Downes CM, Metcalf TG (1958). Isothiocyanate compounds as fluorescent labeling agents for immune serum. *Am J Pathol* **34:** 1081-98

Romano RL, Stolinski C, Hughes-Jones NC (1974). An antiglobulin reagent labeled with colloidal gold for use in electron microscopy. *Immunochemistry* **11:** 521-2

Romano EL, Romano M (1977). Staphylococcal protein A bound to colloidal gold: an useful reagent to label antigen-antibody sites in electron microscopy. *Immunochemistry* **14:** 711-5

Romhànyi G (1972). Differences in ultrastructural organization of amyloid as revealed by sensitivity or resistence to induced proteolysis. *Virchows Arch A* **357:** 29-52

Rosenthal CJ, Franklin EC (1975). Variation with age and disease of an amyloid A protein- related serum component. *J Clin Invest* **55:** 746-53

Rosenthal CJ, Martin ME, Huq A (1986a). Monoclonal antibodies to serum prealbumin of a patient with familial amyloidotic polyneuropathy. *In* Glenner GG, Osserman EF, Benditt EP, Calkins E, Cohen AS, Zucker-Franklin D, eds. *Amyloidosis.* New York: Plenum Press. 323-30

Rosenthal CJ, Kula RW, Solomon N, Devita R (1986b). Plasma exchange in the treatment of patients with systemic amyloidosis. *In* Glenner GG, Osserman EF, Benditt EP, Calkins E, Cohen AS, Zucker-Franklin D, eds. *Amyloidosis.* New York: Plenum Press. 629-37

Rubinow A, Cohen AS (1982). Familial amyloid polyneuropathy: description of two new kinships of Greek ancestry. *Arthr Rheum* **25:** S141

Ruddle FH (1981). A new era in mammalian gene mapping: somatic cell genetics and recombinant DNA methodologies. *Nature* **294:** 115-20

Rukavina JG, Block WD, Jackson CE, Falls HF, Carey JH, Curtis AC (1956). Primary systemic amyloidosis: a review and an experimental, genetic and clinical study of 29 cases with particular emphasis on familial form. *Medicine (Balt)* **35:** 239-334

Saal SD, Parker TS, Gordon BR, et al. (1986). Removal of low-density lipoproteins in patients by extracorporeal immunoadsorption. *Am J Med* **80:** 583-8

Sack GH, Jr (1983). Molecular cloning of human genes for serum amyloid A. *Gene* **21:** 19-24

Saeki Y, Ueno S, Yorifuji S, Yu S, Yoshihiko I, Matsuzawa Y (1991). New mutant gene (transthyretin Arg 58) in cases with hereditary polyneuropathy detected by non-isotope method of single-strand conformation polymorphism analysis. *Biochem Biophys Res Commun* **180:** 380-5

Saeki Y, Ueno S, Takahashi N, Soga S, Yanagihara T (1992). A novel mutant (Transthyretin Ile 50) related to amyloid polyneuropathy - single-strand conformation polymorphism as a new genetic marker. *FEBS Lett* **308:** 35-7

Said G, Ropert A, Faux N (1984). Length-dependent degeneration of fibers in Portuguese amyloid polyneuropathy: a clinicopathologic study. *Neurology* **34:** 1025-32

Sakaki Y, Yoshioka K, Tanahashi H, Furuya H, Sasaki H (1989). Human transthyretin (prealbumin) gene and molecular genetics of familial amyloidotic polyneuropathy. *Mol Biol Med* **6:** 161-8

Sakaki Y (1990). Further evidence for the mutation hot spot hypothesis of the Val-Met mutation most common to familial amyloidotic polyneuropathy type I. *In:* Costa PP, Freitas AF, Saraiva MJM, eds. *Familial Amyloidotic Polyneuropathy and other Transthyretin Related Disorders.* Porto: Arquivos de Medicina **3 (Spec. Issue):** 185-8

Sales-Luís ML, Galvão M, Carvalho M, Sousa G, Alves MM, Serrão R (1990). Plasma exchange (PE) on the treatment of familial amyloidotic polyneuropathy (FAP). *In:* Costa PP, Freitas AF, Saraiva MJM, eds. *Familial Amyloidotic Polyneuropathy and other Transthyretin Related Disorders.* Porto: Arquivos de Medicina **3 (Spec. Issue):** 361-9

Sanderson CJ, Wilson DV (1971). A simple method for coupling proteins to insoluble polysaccharides. *Immunology* **20:** 1061-5

Saraiva MJM, Costa PP, Goodman DS (1983a). Studies on plasma transthyretin (prealbumin) in familial amyloidotic polyneuropathy, portuguese type. *J Lab Clin Med* **102:** 590-603

Saraiva MJM, Costa PP, Birken S, Goodman DS (1983b). Presence of an abnormal transthyretin (prealbumin) in Portuguese patients with familial amyloidotic polyneuropathy. *Trans Ass Amer Phys* **96:** 261-70

Saraiva MJM, Birken S, Costa PP, Goodman DS (1984). Amyloid fibril protein in familial amyloidotic polyneuropathy, Portuguese type. Definition of molecular abnormality in transthyretin (prealbumin). *J Clin Invest* **74:** 104-19

Saraiva MJM, Costa PP, Goodman DS (1985). Biochemical marker in familial amyloidotic polyneuropathy, Portuguese type. Family studies on the transthyretin (prealbumin) methionine-30 variant. *J Clin Invest* **76:** 2171-7

Saraiva MJM, Sherman W, Goodman DS (1986). Presence of a plasma transthyretin (prealbumin) variant in familial amyloidotic polyneuropathy in a kindred of Greek origin. *J Lab Clin Med* **108:** 17-22

Saraiva MJM, Makover A, Moriwaki H, Blaner W, Costa PP, Goodman DS (1988). Studies of transthyretin methabolism in the nervous system. *In:* Isobe T, Araki S, Uchino F, Kito S, Tsubura E, eds. *Amyloid and Amyloidosis - Proceedings of the Fifth International Symposium on Amyloidosis, held October 25-28, 1987, in Hakone, Japan*. New York: Plenum Press. 343-8

Saraiva MJM, Sherman W, Marboe C, Figueira A, Costa PP, Freitas AF, Gawinowicz MA (1990). Cardiac amyloidosis: report of a patient heterozygous for the transthyretin isoleucine 122 variant. *Scand J Immunol* **32:** 341-6

Saraiva MJM, Almeida MR, Alves IL, Moreira P, Gawinowicz MA, Costa PP, Rauh S, Banhzoff A, Altland K (1991). Molecular analyses of an acidic transthyretin Asn 90 variant. *Am J Hum Genet* **48:** 1004-8

Saraiva MJM, Almeida MR, Sherman W, Gawinowicz MA, Costa P, Costa PP, Goodman DS (1992). A new transthyretin mutation associated with amyloid cardiomyopathy. *Am J Hum Genet* **50:** 1027-30

Sasaki H, Sakaki Y, Matsuo H, Goto I, Kuroiwa Y, Sahashi I, Takahashi A, Shinoda T, Isobe T, Takagi Y (1984). Diagnosis of familial amyloidotic polyneuropathy by recombinant DNA techniques. *Biochem Biophys Res Commun* **125:** 636-42

Sasaki H, Yoshioka N, Takagi Y, Sakaki Y (1985). Structure of the chromosomal gene for human serum prealbumin. *Gene* **37:** 191-7

Sasaki H, Tanahashi H, Yoshioka K, Furuya H, Sakaki Y (1990). Structural and functional analysis of the upstream region of the human transthyretin gene. *In:* Costa PP, Freitas AF, Saraiva MJM, eds. *Familial Amyloidotic Polyneuropathy and other Transthyretin Related Disorders*. Porto: Arquivos de Medicina **3 (Spec. Issue):** 171-6

Satier F, Nichols WC, Benson MD (1990). Diagnosis of familial amyloidotic polyneuropathy in France. *Clin Genet* **38:** 469-73

Schlesinger AS, Duggins VA, Masucci EF (1962). Peripheral neuropathy in familial primary amyloidosis. *Brain* **85:** 353-70

Schlom J, Wonderlich D, Teramoto YA (1980). Generation of human monoclonal antibodies reactive with human mammary carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **77:** 6841-6

Schnapp J, Shalitin Y (1976). Immobilization of enzymes by covalent binding to amine supports via cyanogen bromide activation. *Biochem Biophys Res Commun* **70:** 8-14

Schnee JM, Runge MS, Matsueda GR, Hudson NW, Seidman JG, Haber E, Quertermous T (1987). Construction and expression of a recombinant antibody-targeted plasminogen activator. *Proc Natl Acad Sci USA* **84:** 6904-8

Scholten JH (1967). Familiaire hereditaire amyloidose. *Fol Med Neerl* **10:** 10-6

Schreiber G, Aldred AR, Jaworowski A, Nilsson C, Achen MG, Segal MB (1990). Thyroxine transport from blood to brain via transthyretin synthesis in choroid plexus. *Am J Physiol* **258:** R338-45

Schreiber G, Pettersson T, Southwell BR, Aldred AR, Harms PJ, Richardson SJ, Wettenhall REH, Duan W, Nicol SC (1993). Transthyretin expression evolved more recently in liver than in brain. *Comp Biochem Physiol* **105B:** 317-25

Schwartz P (1965). Senile cerebral, pancreatic insular and cardiac amyloidosis. *Trans NY Acad Sci* **27:** 393-413

Schwartz P (1970). *Amyloidosis. Cause and manifestation of senile deterioration.* Springfield IL: Charles C. Thomas.

Scott DL, Marhaug G, Husby (1983). Comparative studies of the high molecular weight amyloid fibril proteins and similar components from normal tissue. *Clin Exp Immunol* **52:** 693-701

Scouten WH (1987). A survey of enzyme coupling techniques. *Methods Enzymol* **135:** 30-65

Seibert FB, Nelson JW (1942). Electrophoretic study of the blood protein response in tuberculosis. *J Biol Chem* **143:** 29-38

Shinoda T, Takenawa T, Kametani Y (1990). Biochemical analysis of amyloid. *Clin Dermatol* **8:** 87-101

Shiomi K, Nakazato M, Matsukura S, Ohnishi A, Hatanaka H, Tsuji S, Murai Y, Kojima M, Kangawa K, Matsuo H (1993). A basic transthyretin variant ($Glu^{61} \rightarrow Lys$) causes familial amyloidotic polyneuropathy: protein and DNA sequencing and PCR-induced mutation restriction analysis. *Biochem Biophys Res Commun* **194:** 1090-6

Shirabe T, Hashimoto M, Araki S, Mawatari S, Kuroiwa Y (1973). *In:* Zimmerman HM, ed. *Progress in Neuropathology.* New York: Grune & Stratton. Vol II, Chapter 12

Shirahama T, Lawless OJ, Cohen AS (1969). Heterologous transfer of amyloid-human to mouse. *Proc Soc Exp Biol Med* **130:** 516-9

Shirahama T, Skinner M, Cohen AS (1981). Immunocytochemical identification of amyloid in formalin-fixed paraffin sections. *Histochemistry* **72:** 161-71

Shirahama T, Skinner M, Cohen AS, Gejyo F, Arakawa M, Susuki M, Hirasawa Y (1985). Histochemichal and immunohistochemical characterization of amyloid associated with chronic hemodialysis as β2-microglobulin. *Lab Invest* **53:** 705-9

Shirahama T, Miura K, Ju ST, Kisilevsky R, Gruys E, Cohen AS (1990). Amyloid enhancing factor-loaded macrophages in amyloid fibril formation. *Lab Invest* **62:** 61-8

Shoji S, Kameko M, Tsukada N, Kato M (1981). Immunologic and immunohistochemical study of familial amyloid polyneuropathy. *Neurology (NY)* **31:** 1493-6

Shulman LE, Bartter FC (1956). Familial primary amyloidosis. *John Hopkins Med Soc Bull* **98:** 238-9

Shulman M, Wilde CD, Köhler G (1978). A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies. *Nature* **276:** 269-70

Singer SJ (1959). Preparation of an electron-dense antibody conjugate. *Nature* **183:** 1523

Skare JC, Milunsky JM, Milunsky A, Skare IB, Cohen AS, Skinner M (1990). A new transthyretin variant from a patient with familial amyloidotic polyneuropathy has asparagine substituted for histidine at position 90. *Clin Genet* **38:** 1-7

Skare JC, Myles N, Jones LA, Kane K, Milunsky A, Cohen AS, Skinner M (1994). The Asn90 italian FAP kindred also has Gly42. *In:* Kisilevsky R, Benson MD, Frangione B, Gauldie J, Muckle TJ, Young ID, eds. *Amyloid and Amyloidosis 1993. The Proceedings of the VIIth International Symposium on amyloidosis, July 11-15 1993, Kingston, Ontario, Canada.* New York: Parthenon Publishing. 431-3

Skinner M, Shirahama T, Benson MD, Cohen AS (1977). Murine amyloid protein AA in casein-induced experimental amyloidosis. *Lab Invest* **36:** 420-7

Skinner M, Cohen AS (1981). The prealbumin nature of the amyloid protein in familial amyloid polyneuropathy (FAP) - Swedish variety. *Biochem Biophys Res Commun* **99:** 1326-32

Skinner M, Libbey CA, Benson MD, Skare JC, Milunsky A, Cohen AS (1990). Variant transthyretin (tyrosine 77) in a United States family of German/English ancestry with familial amyloid polyneuropathy. *In:* Costa PP, Freitas AF, Saraiva MJM, eds. *Familial Amyloidotic Polyneuropathy and other Transthyretin Related Disorders*. Porto: Arquivos de Medicina **3 (Spec. Issue):** 103-6

Skinner M, Harding J, Skare I, Jones LA, Cohen AS, Milunsky A, Skare J (1992). A new transthyretin mutation associated with amyloidotic vitreous opacities - Asparagine for isoleucine at position 84. *Ophthalmology* **99:** 503-8

Skinner M, Skare J, Simms JW, Libbey CA, Cohen AS (1993). Familial amyloidosis at the Boston University Amyloid Research Center. (Abstr.) *J Rheumatol* **20:** 177

Skogen B, Amundsen E (1982). Degradation of amyloid proteins with protease I from *Aspergillus oryzae. In vivo* increase in SAA clearance rate after enzyme infusion. *Scand J Immunol* **16:** 509-14

Sletten K, Husby G (1974). The complete amino acid sequence of non-immunoglobulin amyloid fibril protein AS in rheumatoid arthritis. *Eur J Biochem* **41:** 117-25

Sletten K, Westermark P, Natvig JB (1976). Characterization of amyloid fibril proteins from medullary carcinoma of the thyroid. *J Exp Med* **143:** 993-8

Sletten K, Westermark P, Natvig JB (1980). Senile cardiac amyloid is related to prealbumin. *Scand J Immunol* **12:** 503-6

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150:** 76-85 [*erratum:* Anal Biochem; 1987; 163: 279]

Smith TJ, Davis FB, Deziel MR, Davis PJ, Ramsden DB, Schoenl M (1994). Retinoic acid inhibition of thyroxine binding to transthyretin. *Biochim Biophys Acta* **1199:** 76-80

Snow AD, Kisilewski R (1985). Temporal relationship between glycosaminoglycan accumulation and amyloid deposition during experimental amyloidosis: a histochemical study. *Lab Invest* **53:** 37-44

Snow AD, Bramson R, Mar H, Wight TN, Kisilewsky R (1991). A temporal and ultrastructural relationship between heparan sulfate proteoglycans and AA amyloid in experimental amyloidosis. *J Histochem Cytochem* **39:** 1321-30

Socolow EL, Woeber KA, Purdy RH, Holloway MT, Ingbar SH (1965). Preparation of ^{131}I-labeled human serum prealbumin and its metabolism in normal and sick patients. *J Clin Invest* **44:** 1600-9

Sohar E, Gafni J, Pras M, Heller H (1967). Familial Mediterranean Fever. A survey of 470 cases and review of the literature. *Am J Med* **43:** 227-53

Soprano DR, Herbert J, Soprano KJ, Schon EA, Goodman DS (1985). Demonstration of transthyretin mRNA in the brain and other extrahepatic tissues in the rat. *J Biol Chem* **260:** 11793-8

Soprano DR, Soprano KJ, Goodman DS (1986). Retinol-binding protein and transthyretin mRNA levels in visceral yolk sac and liver during fetal development in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* **83:** 7330-4

Soutar AK, Hawkins PN, Vigushin DM, Tennent GA, Booth SE, Hutton T, Nguyen O, Totty NF, Feest TG, Hsuan JJ, Pepys MB (1992). Apolipoprotein AI mutation Arg-60 causes autosomal dominant amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **89:** 7389-93

Southwell BR, Duan W, Alcorn D, Brack C, Richardson SJ, Köhrle J, Schreiber G (1993). Thyroxine transport to the brain: role of protein synthesis by the choroid plexus. *Endocrinology* **133:** 2116-26

Soyka J (1876). Ueber amyloide degeneration. *Prag Med Wschr* **1:** 165-171

Sparkes RS, Sasaki H, Mohandas T, Yoshioka K, Klisak I, Sakaki Y, Heinzmann C, Simon MI (1987). Assignement of the prealbumin (PALB) gene (familial amyloidotic polyneuropathy) to human chromossome region 18q11.2-q12.1. *Hum Genet* **75:** 151-4

Spencer RGS, Halverson KJ, Auger M, McDermott AE, Griffin RG, Lansbury PT, Jr (1991). An unusual peptide conformation may precipitate amyloid formation in Alzheimer's disease: Application of solid-state NMR to the determination of protein secondary structure. *Biochemistry* **30:** 10382-7

Spiro D (1959). The structural basis of proteinuria in man. Electron microscopic studies of renal biopsy specimens from patients with lipid nephrosis, amyloidosis and subacute and chronic glomerulonephritis. *Am J Pathol* **36:** 47-73

Stauder AJ, Dickson PW, Aldred AR, Schreiber G, Mendelsohn FAO, Hudson P (1986). Synthesis of transthyretin (prealbumin) mRNA in choroid plexus epithelial cells, localized by in situ hybridization in rat brain. *J Histochem Cytochem* **34:** 949-52

Staunton H, Dervan P, Kale R, Linke RP, Kelly P (1987). Hereditary amyloid polyneuropathy in North West Ireland. *Brain* **110:** 1231-45

Staunton H, Davis MB, Guiloff RJ, Nakazato M, Miyazato N, Harding AE (1991). Irish (Donegal) amyloidosis associated with the transthyretin ALA 60 (Appalachian) variant. *Brain* **114:** 2675-9

Stenstad T, Magnus JH, Husby G, Kolset SO (1993). Purification of amyloid-associated heparan sulphate proteoglycans and galactosaminoglycan free chains from human tissues. *Scand J Immunol* **37:** 227-35

Sternberger LA, Hardy PH, Jr, Cuculis JJ, Meyer HG (1970). The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem* **18:** 315-33

Stoffel W, Demant T (1981). Selective removal of apolipoprotein B-containing serum lipoproteins from blood plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* **78:** 611-5

Stoffel W, Borberg H, Greve V (1981). Application of specific extracorporeal removal of low density lipoprotein in familial hypercholesterolemia. *Lancet* **ii:** 1005-7

Strahler JR, Rosenblum BB, Hanash SM (1987). Identification and characterization of a human transthyretin variant. *Biochem Biophys Res Commun* **148:** 471-7

Stults NL, Lin P, Hardy M, Lee YC, Uchida Y, Tsukada Y, Sugimori T (1983). Immobilization of proteins on partially hydrolyzed agarose beads. *Anal Biochem* **135:** 392-400

Sundberg L, Porath J (1974). Preparation of adsorbents for biospecific affinity chromatography. Attachment of group-containing ligands to insoluble polymers by means of bifuctional oxiranes. *J Chromatogr* **90:** 87-98

Sundelin J, Melhus H, Das S, Eriksson U, Lind P, Trägårdh L, Peterson PA, Rask L (1985). The primary structure of rabbit and rat prealbumin and a comparison with the tertiary structure of human prealbumin. *J Biol Chem* **260:** 6481-7

Susuki T, Azuma T, Tsujino S, Mizuno R, Kishimoto S, Wada Y, Hayashi A, Ikeda S, Yanagisawa N (1987). Diagnosis of familial amyloidotic polyneuropathy: Isolation of variant prealbumin. *Neurology* **37:** 708-11

Sutherland RL, Brandon MR (1976). The thyroxine-binding properties of rat and rabbit serum proteins. *Endocrinology* **98:** 91-8

Takahashi K, Yi S, Kimura Y, Araki S (1991). Familial amyloidotic polyneuropathy type 1 in Kumamoto, Japan: A clinicopathologic, histochemical, immunohistochemical, and ultrastructural study. *Hum Pathol* **22:** 519-27

Takahashi N, Ueno S, Uemichi T, Fujimura H, Yorifuji S, Tarui S (1992). Amyloid polyneuropathy with transthyretin Arg50 in a japanese case from Osaka. *J Neurol Sci* **112:** 58-64

Takeda T, Hosokawa H, Takeshita S, Irino M, Higushi K, Matsushita T, Tomita Y, Yasuhira K, Hamamoto H, Shimizu K, Ishii M, Yamamuro T (1981). A new murine model of accelerated senescence. *Mech Ageing Dev* **17:** 183-94

Tam JP (1988). Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. *Proc Natl Acad Sci USA* **85:** 5409-13

Tan M, Epstein W (1972). Polymer formation during degradation of human light chain and Bence-Jones proteins by an extract of the lysosomal fraction of normal human kidney. *Imunochemistry* **9:** 9-16

Tawara S, Araki S, Toshimori K, Nakagawa H, Ohtaki S (1981). Amyloid fibril protein in type I familial amyloidotic polyneuropathy in Japanese. *J Lab Clin Med* **98:** 811-22

Tawara S, Nakazato M, Kanzawa K, Matsuo H, Araki S (1983). Identification of amyloid prealbumin variant in familial amyloidotic polyneuropathy (japanese type). *Biochem Biophys Res Commun* **116:** 880-8

Teilum G (1964). Pathogenesis of amyloidosis. The two-phase cellular theory of local secretion. *Acta Path Microbiol Scand* **61:** 21-45

Termine JD, Eanes ED, Ein D, Glenner GG (1972). Infrared spectroscopy of human amyloid fibrils and immunoglobulin proteins. *Biopolymers* **2:** 1103-13

Terry CJ, Blake CCF (1991). Studies on the molecular arrangement in transthyretin-related familial amyloidotic polyneuropathy. *In:* Natvig JB, Førre Ø, Husby G, Husebekk A, Skogen B,Sletten K, Westermark P, eds. *Amyloid and amyloidosys 1990. VIth International Symposium on Amyloidosis, August 5-8, 1990, Oslo, Norway*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 575-8

Terry CJ, Damas AM, Oliveira P, Saraiva MJM, Alves IL, Costa PP, Matias PM, Sakaki Y, Blake CCF (1993). Structure of Met 30 variant of transthyretin and its amyloidogenic implications. *EMBO J* **12:** 735-41

Thomas PK, King RHM (1974). Peripheral nerve changes in amyloid neuropathy. *Brain* **97:** 395-406

Thomas PK, Araki S, Coutinho P, Harding AE, Herbet J, Luís MLS, Novis S, Staunton H (1990). The clinical classification of hereditary amyloid polyneuropathies. *In:* Costa PP, Freitas AF, Saraiva MJM, eds. *Familial amyloidotic polyneuropathy and other transthyretin related disorders.* Porto: Arquivos de Medicina. 261-2

Thomas T, Power B, Hudson P, Schreiber G, Dziadek M (1988). The expression of transthyretin mRNA in the developing rat brain. *Dev Biol* **128:** 415-27

Tomiyama T, Asano S, Suwa Y, Morita T, Kataoka K-I, Mori H, Endo N (1994). Rifampicin prevents the aggregation and neurotoxicity of amyloid β protein *in vitro. Biochem Biophys Res Commun* **204:** 76-83

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **76:** 4350-4

Tramontano A, Janda KD, Lerner RA (1986). Catalytic antibodies. *Science* **234:** 1566-70

Tsuzuki T, Mita S, Maeda S, Araki S, Shimada K (1985). Structure of the human prealbumin gene. *J Biol Chem* **260:** 12224-7

Tu G, Duan W, Schreiber G (1989). The nucleotide sequence of transthyretin cDNA isolated from a sheep choroid plexus cDNA library. *Nucleic Acids Res* **17:** 6384

Tullis JL, Surgenor DM, Tinch RJ, *et al.* (1956). New principle of closed system centrifugation. *Science* **124:** 792-7

Uemichi T, Murrell JR, Zeldenrust S, Benson MD (1992). A new mutant transthyretin (Arg 10) associated with familial amyloid polyneuropathy. *J Med Genet* **29:** 888-91

Uemichi T, Gertz MA, Benson MD (1994a). Amyloid polyneuropathy in two German-American families: a new transthyretin variant (Val 107). *J Med Genet* **31:** 416-7

Uemichi T, Liepnieks JJ, Benson MD (1994b). Hereditary renal amyloidosis with a novel variant fibrinogen. *J Clin Invest* **93:** 731-6

Ueno S, Uemichi T, Yorifuji S, Tarui S (1990a). A novel variant of transthyretin (Tyr 114 to Cys) deduced from the nucleotide sequences of gene fragments from familial amyloidotic polyneuropathy in Japanese sibling cases. *Biochem Biophys Res Commun* **169:** 143-7

Ueno S, Uemichi T, Takahashi N, Soga F, Yorifuji S, Tarui S (1990b). Two novel variants of transthyretin identified in Japanese cases with familial amyloidotic polyneuropathy: Transthyretin (Glu 42 to Gly) and Transthyretin (Ser 50 to Arg). *Biochem Biophys Res Commun* **169:** 1117-21

Vahlquist A, Peterson PA, Wibell L (1973). Metabolism of the vitamin A transporting protein complex. I - Turnover studies in normal persons and in patients with chronic renal failure. *Eur J Clin Invest* **3:** 352-62

Vahlquist A, Rask L, Peterson PA, Berg T (1975). The concentration of retinol-binding protein, prealbumin and transferrin in the sera of newly delivered mothers and children of various ages. *Scand J Clin Lab Invest* **35:** 569-75

Van Allen MW, Fröhlich JA, Davis JR (1969). Inherited predisposition to generalized amyloidosis. Clinical and pathological study of a family with neuropathy, nephropathy and peptic ulcer. *Neurology (Minneap)* **19:** 10-25

Van Regenmortel MHV (1987). Antigenic cross-reactivity between proteins and peptides: new insights and applications. *Trends Biochem Sci* **12:** 237-40

Van Rijswijk MH, Van Heusden CWGJ, Ruinen L (1980). Histochemical and serological differentiation of human amyloidosis. *In:* Glenner GG, Costa PP, Freitas AF, eds. *Amyloid and Amyloidosis - Proceedings of the Third International Symposium on Amyloidosis, Póvoa de Varzim, Portugal, 23-28 September 1979.* Amsterdam: Excerpta Medica. 25-34

Van Rijswijk MH, Ruinen L (1980). Successful treatment with dimethylsulfoxide of human amyloidosis secondary to rheumatoid arthritis. *In:* Glenner GG, Costa PP, Freitas AF, eds. *Amyloid and Amyloidosis - Proceedings of the Third International Symposium on Amyloidosis, Póvoa de Varzim, Portugal, 23-28 September 1979.* Amsterdam: Excerpta Medica. 570-7

Varga J, Flinn MSM, Shirahama T, Rodgers OG, Cohen AS (1986). The induction of accelerated murine amyloid with human splenic extract. *Virchows Arch B* **51:** 177-85

Vassar PS, Culling CFA (1959). Fluorescent stains, with special reference to amyloid and connective tissue. *Arch Pathol* **68:** 487-98

Vigushin DM, Gough J, Allan D, Alguacil A, Penner B, Pettigrew NM, Quinonez G, Bernstein K, Booth SE, Booth DR, *et al.* (1994). Familial nephropathic systemic amyloidosis caused by apolipoprotein AI variant Arg26. *Q J Med* **87:** 149-54

Vinters HV, Pardridge WM, Yang J (1988). Immunohistochemical study of cerebral amyloid angiopathy: use of an antiserum to a synthetic 28-amino-acid peptide fragment of the Alzheimer's disease amyloid angiopathy. *Hum Pathol* **19:** 214-22

Virchow R (1853a). Découverte d'une substance qui donne lieu aux mêmes réactions chimiques que la cellulose végétale, dans le corps humain. *C R Hbd Scéances Acad Sci* **37:** 492-3

Virchow R (1853b). Nouvelles observations sur une substance animale analogue à la cellulose végétale. Academie de Médicine, Séance du 5 Déc., 1853. *Gaz Hebd Méd Chir* **1:** 161

Virchow R (1854a). Ueber eine im Gehirn und Rüchenmark des Menschen aufgfundene Substanz mit der chemischen Reaction der Cellulose. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol* **6:** 135-8

Virchow R (1854b). Weitere Mittheilung über das Vorkommen der pflanzlichen Cellulose beim Menschen. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol* **6:** 268-71

Virchow R (1854c). Zur Cellulose-Frage. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol* **6:** 416-26

Virchow R (1858). *Die Cellularpathologie.* Berlin: A. Hirschwald

Wakasugi S, Maeda S, Shimada K, Nakashima H, Migita S (1985). Structural comparisons between mouse and human prealbumin. *J Biochem* **98:** 1707-14

Wakasugi S, Maeda S, Shimada K (1986). Structure and expression of the mouse prealbumin gene. *J Biochem* **100:** 49-58

Waldenström H (1928). Formation and disappearence of amyloid in man. *Acta Chir Scand* **63:** 479-530

Wallace MR, Kluve-Beckerman B, Long GL, Conneally PM, Benson MD (1985a). Cloning and sequencing of human prealbumin cDNA: application to diagnosis of hereditary amyloidosis. *Clin Res* **33:** 592A

Wallace MR, Naylor SL, Kluwe-Beckerman B, Long GL, McDonald L, Shows TB, Benson MD (1985b). Localization of the human prealbumin gene to chromossome 18. *Biochem Biophys Res Commun* **129:** 753-8

Wallace MR, Dwulet FE, Conneally PM, Benson MD (1986). Biochemical and molecular genetic characterization of a new variant prealbumin associated with hereditary amyloidosis. *J Clin Invest* **78:** 6-12

Wallace MR, Dwulet FE, Williams EC, Conneally PM, Benson MD (1988). Identification of a new hereditary amyloidosis prealbumin variant, Tyr-77, and detection of the gene by DNA analysis. *J Clin Invest* **81:** 189-93

Wattendorf AR, Bots GTAM, Went LN, Endtz LJ (1982). Familial cerebral amyloid angiopathy presenting as recurrent cerebral haemorrhage. *J Neurol Sci* **55:** 121-35

Weisner B, Roethig H-J (1983). The concentration of prealbumin on cerebrospinal fluid (CSF), indicator of CSF circulation disorders. *Eur Neurol* **22:** 96-105

Weiss SW, Page DL (1973). Amyloid nephropathy of Ostertag with special reference to renal glomerular giant cells. *Am J Pathol* **72:** 447-60

Werdelin O, Ranløv P (1966). Amyloidosis in mice produced by transplantation of spleen cells from casein-treated mice. *Acta Path Microbiol Scand* **68:** 1-18

Westermark P (1974). On the nature of the amyloid in human islets of Langerhans. *Histochemistry* **38:** 27-33

Westermark P, Wernstedt C, Wilander E, Sletten K (1986). A novel peptide in in the calcitonin gene related peptide family as an amyloid fibril protein in the endocrine pancreas. *Biochem Biophys Res Commun* **140:** 827-31

Westermark P, Sletten K, Johansson B, Cornwell GG, 3rd (1990a). Fibril in senile systemic amyloidosis is derived from normal transthyretin. *Proc Natl Acad Sci USA* **87:** 2843-5

Westermark P, Engström U, Johnson KH, Westermark GT, Betsholtz C (1990b). Islet amyloid polypeptide: pinpointing amino acid residues linked to amyloid fibril formation. *Proc Natl Acad Sci USA* **87:** 5036-40

Westermark GT, Engström U, Westermark P (1992). The N-terminal segment of protein AA determines its fibrillogenic property. *Biochem Biophys Res Commun* **182:** 27-33

Whitehead AS, Skinner M, Bruns GAP, Costello W, Edge MD, Cohen AS, Sipe JD (1984). Cloning of human prealbumin complementary DNA. Localization of the gene to chromossome 18 and detection of a variant prealbumin allele in a family with familal amyloid polyneuropathy. *Mol Biol Med* **2:** 411-23

Wieland H, Seidel D (1983). A simple specific method for precipitation of low-density lipoproteins. *J Lipid Res* **24:** 904-9

Wild C (1886). Beitrag zur Kenntnis der amyloiden und der hyalinen Degeneration des Bindegewebes. *Beitr Pathol Anat* **1:** 177-99

Wilks S (1856). Cases of lardaceous disease and some allied affections. With remarks. *Guy Hosp Rep* **17:** 103-32

Winter G, Milstein C (1991). Man-made antibodies. *Nature* **349:** 293-9

Wisniewski T, Frangione B (1992). Apolipoprotein E: a pathological chaperone protein in patients with cerebral and systemic amyloid. *Neurosci Lett* **135:** 235-8

Woeber KA, Ingbar SH (1968). The contribution of thyroxine-binding prealbumin to the binding of thyroxine in human serum, as assessed by immunoadsorption. *J Clin Invest* **47:** 1710-21

Wong VG, McFarlin DE (1967). Primary familial amyloidosis. *Arch Ophthalmol* **78:** 208-13

Woo P, Sipe JD, Dinarello CA, Colten HR (1987). Structure of a human serum amyloid A gene and modulation of its expression in transfected L cells. *J Biol Chem* **262:** 15790-5

Wright JR, Humphrey RL, Calkins E (1976). Different molecular forms of amyloid histologically distinguished by susceptibility or resistence to trypsin digestion. *In:* Wegelius O, Pasternack A, eds. *Amyloidosis. Proceedings of the Fifth Sigrid Jusélius Foundation Symposium.* London: Academic Press. 51-59

Wright JR, Calkins E, Humphrey RL (1977). Potassium permanganate reaction in amyloidosis. A histologic method to assist in differentiating forms of this disease. *Lab Invest* **36:** 274-81

Yamada M, Habakeyama S, Tsukagoshi H (1984). Peripheral and autonomic nerve lesions in systemic amyloidosis. Three pathological types of amyloid polyneuropathy. *Acta Pathol Jpn* **34:** 1251-66

Yamamoto K, Hsu SP, Yoshida K, Ikeda S, Nakazato M, Shiomi K, Cheng SY, Furihata K, Ueno I, Yanagisawa N (1994). Familial amyloid polyneuropathy in Taiwan: identification of transthyretin variant (Leu55 → Pro). *Muscle Nerve* **17:** 637-41

Yamamura K, Wakasugi S, Maeda S, Inomoto T, Iwanaga T, Uehira M, Araki K, Miyazaki J-I, Shimada K (1987). Tissue specific and developmental expression of human transthyretin gene in transgenic mice. *Develop Genet* **8:** 195-205

Yan C, Costa RH, Darnell JE, Jr, Chen J, Van Dyke (1990). Distinct positive and negative elements control the limited hepatocyte and choroid plexus expression of transthyretin in transgenic mice. *EMBO J* **9:** 869-78

Yasuda T, Sobue G, Doyu M, Nakazato M, Shiomi K, Yanagi T, Mitsuma T (1994). Familial amyloidotic polyneuropathy with late-onset and well-preserved autonomic function: a Japanese kindred with novel mutant transthyretin (Ala97 to Gly). *J Neurol Sci* **121:** 97-102

Yi S, Takahashi K, Wakasugi S, Maeda S, Shimada K, Yamamura K, Araki S (1991). Systemic amyloidosis in transgenic mice carrying the human mutant transthyretin (Met30) gene. *Am J Pathol* **138:** 403-12

Yokota T, Ishihara T, Takahashi M, Yamashita Y, Kawano H, Kawamura S, Fujinaga Y, Uchino F, Hanai N, Yoshida H, Honda S, Sato M (1988). Monoclonal antibody against synthesized short peptides corresponding to human amyloid A protein. *In:* Isobe T, Araki S, Uchino F, Kito S, Tsubura E, eds. *Amyloid and Amyloidosis - Proceedings of the Fifth International Symposium on Amyloidosis, held October 25-28, 1987, in Hakone, Japan.* New York: Plenum Press. 241-6

Yokoyama S, Hayashi R, Kikkawa T, Tani N, Takada S, Hatanaka K, Yamamoto A (1984). Specific sorbent of apolipoprotein B-containing lipoproteins for plasmapheresis: Characterization and experimental use in hypercholesterolemic rabbits. *Arteriosclerosis* **4:** 276-82

Yokoyama S, Hayashi R, Satani M, Yamamoto A (1985). Selective removal of low density lipoprotein by plasmapheresis in familial hypercholesterolaemia. *Arteriosclerosis* **5:** 613-22

Yoshioka K, Furuya H, Sasaki H, Saraiva MJM, Costa PP, Sakaki Y (1989). Haplotype analysis of familial amyloidotic polyneuropathy. Evidence for multiple origins of the Val Met mutation most common to the disease. *Hum Genet* **82:** 9-13

Zalin AM, Jones S, Fitch NJS, Ramsden DB (1991). Familial nephropathic non-neuropathic amyloidosis: clinical features, immunohistochemistry and chemistry. *Q J Med* **81:** 945-56

Zeldenrust SR, Skinner M, Skare J, Benson MD (1994). A new transthyretin variant (His 69) associated with vitreous amyloid in an FAP family. *Amyloid: Int J Exp Clin Invest* **1:** 17-22

Zemer D, Pras M, Sohar E, Modan M, Cabili S, Gafni J (1986). Colchicine in the prevention and treatment of the amyloidosis of familial Mediterranean fever. *N Engl J Med* **314:** 1001-5