

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Unidade de Ciências e Tecnologias dos Recursos Aquáticos

Estudo da distribuição do transportador da hormona
tiroxina - transretina - em dourada, *Sparus aurata*
(Linnaeus, 1758)

Adelaide da Conceição Dimas Henrique Charrão

Faro

1998

UNIVERSIDADE DO ALGARVE
SERVIÇO DE DOCUMENTAÇÃO

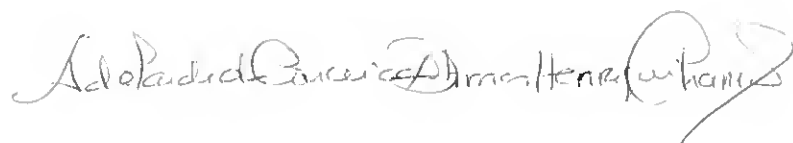
21/05/99 26514

39.31.5
CHA. E. F.

1

Dissertação apresentada para obtenção do grau de
mestre em Aquacultura pela Universidade do Algarve

O conteúdo deste relatório é da
exclusiva responsabilidade da autora.

A handwritten signature in black ink, written in a cursive style. The signature reads "Adelaide da Conceição Dimas Henrique Charrão".

(Adelaide da Conceição Dimas Henrique Charrão)

AGRADECIMENTOS

À Prof. Doutora Deborah Power, pelo empenho na orientação deste trabalho por todo o apoio, confiança, paciência e optimismo, pelo ensinamento das técnicas laboratoriais de Biologia Molecular, bem como pela revisão e correcção da parte escrita.

À Dr^a Cecília Santos pela disponibilização de um clone da transretina de dourada, pela sua paciência no esclarecimento de muitas dúvidas na aprendizagem das técnicas utilizadas e pela sua franca amizade.

À Dr^a Silvia Socorro pelo seu auxílio nos meandros da Biologia Molecular, bem como pela sua amizade.

Ao IPIMAR, pela disponibilização das suas instalações para a realização da experiência a que se refere este trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Endocrinologia Comparada da Universidade do Algarve, Eng^a. Elsa Couto, Eng^a Regina Ervideira, Dr^a Teresa Modesto, Dr. Pedro Guerreiro, Dr. Paulo Vília, Dr. Manuel Faustino e Dr. João Condeça pelo excelente ambiente proporcionado e pela disponibilidade que sempre demonstraram.

Ao Prof. Doutor Adelino Canário, pela disponibilização de alguns meios informáticos.

À JNICT, Programa Praxis XXI, por ter financiado este projecto através da bolsa de mestrado BM / 7079 / 95.

Aos meus pais, a quem dedico este trabalho, pelo seu apoio constante, pela sua preocupação em me facultarem sempre o melhor e pelo seu carinho. sem os quais a conclusão deste trabalho não teria sido possível.

RESUMO

A transretina (TTR) é uma das três proteínas que transporta a tiroxina no plasma sanguíneo de animais superiores. Vários estudos demonstraram a sua síntese e secreção no choroid plexus de mamíferos placentários, aves, répteis. Nos anfíbios tal não se verifica. Recentemente foi clonado o gene para a transretina a partir de um banco de cDNA de fígado de dourada (Santos & Power, 1998). O objectivo deste estudo foi determinar a distribuição da transretina em alguns tecidos da dourada e estudar a influência das hormonas produzidas pela tiróide na regulação da transretina. Juvenis de dourada foram injectados intraperitonealmente com T₃ e T₄ (0,1 mg/gr. peso corporal) ou com solução salina. Seis horas, doze horas e vinte e quatro horas após a injeção, peixes tratados (com T₃ e T₄) e controlos foram mortos e os tecidos removidos. A expressão da transretina foi determinada por RT-PCR, usando primers homólogos, e por Southern blot. A identidade dos produtos de PCR foi confirmada por sequenciação. Verificou-se, neste estudo que a transretina é expressa no fígado, cérebro, coração, brânquias e intestino e indetectável no rim e músculo. O tratamento com T₃ e T₄ muda os níveis de expressão da transretina nos tecidos. Durante os intervalos de tempo estudados verificou-se que a expressão da transretina é regulada de forma diferente no fígado e no cérebro, por acção da T₃ e T₄.

ABSTRACT

Transthyretin (TTR) is one of three thyroxine binding proteins found in the serum of higher animals. It has been shown to be synthesised and secreted in the choroid plexus of placental mammals, birds and reptiles but not in amphibians. Recently has cloned transthyretin from a sea bream liver cDNA library (Santos & Power, 1998). The objective of the present study was to determine the distribution of TTR in sea bream and study its regulation thyroid hormone. T₃ and T₄ (0,1 mg/g body weight) or saline was administered to sea bream by a single intraperitoneal injection. At 6h, 12h and 24h after injection treated and controls fish were killed and tissue removed. Expression of TTR was determined by RT-PCR, using homologous primers coupled with Southern blotting. The identity of PCR products was also confirmed by partial sequencing. TTR was expressed in liver, brain, heart, gill and gut and undetectable in kidney and muscle. Treatment with T₃ e T₄ changed the level of expression of TTR in tissue. During the timescale studied there was a different up-regulation of TTR expression by T₄ and T₃ in liver and brain.

ÍNDICE

Abreviaturas

1. INTRODUÇÃO

1.1. Hormonas tiroxina e tri-iodotironina	1
1.1.1. Estrutura	2
1.1.2. Função	3
1.1.3. Metabolismo	4
1.2. Transretina	
1.2.1. Estrutura/Função	5
1.2.2. Regulação	7
1.2.3. Evolução	8
1.3. Caracterização da espécie	
1.3.1. Posição sistemática	10
1.3.2. Biologia e ecologia	10
1.4. Objectivos do estudo	13

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Experiência	14
2.2. Análise da transretina por RT-PCR	
2.2.1. Extracção de RNA total	14
2.2.2. Desenho e optimização dos <i>primers</i>	15
2.2.3. Síntese de cDNA	16
2.2.4. Polymerase Chain Reaction (PCR)	17
2.2.5. Electroforese e purificação de ácidos nucleicos em gel de agarose	19
2.2.6. Clonagem, excisão do plasmídeo e digestão com enzimas de restrição	20
2.2.7. Sequenciação	22
2.3. Análise da transretina por Southern blot	
2.3.1. Transferência de DNA para membrana de nitrocelulose	23
2.3.2. Marcação de sondas, hibridação e autorradiografia	25

3. RESULTADOS

3.1. Análise da transretina por RT-PCR

3.1.1 Extração de RNA	26
3.1.2 Expressão da transretina em tecidos de <i>Sparus aurata</i>	
i) Controlo	27
ii) Estimulados com T ₃ e T ₄	28
3.2. Confirmação da identidade do produto de PCR para a transretina	32
3.3. Análise da transretina por Southern blot	33
	35
4. DISCUSSÃO	40
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	

Anexo

Abreviaturas

bp	Pares de bases
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Etilenodiaminotetra-acetato
IPTG	Isopropil tiogalactósido
Kb	Kilobases
mRNA	RNA mensageiro
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Dodecil-sulfato de sódio
SSC	Citrato de sódio standard
TAE	TRIS acetato EDTA
TBE	TRIS borato EDTA
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
TTR	Transretina
X-Gal	5-cloro-4-bromo-3-indoli-b-D-galactosidase

1. INTRODUÇÃO

À medida que a vida evolui e que começam a aparecer seres pluricelulares mais complexos, surgem sistemas de controlo que permitem regular o metabolismo de forma a que todas as células actuem em conjunto na efectivação das diversas funções, que permitem a sobrevivência individual e a reprodução da espécie (Manso *et al.*, 1986). A comunicação intercelular pode ser feita segundo três processos: usando mediadores locais, neurotransmissores ou hormonas (Hardie, 1991).

O termo hormona (do grego ormao: eu excito) foi criado por Starling, em 1905, para designar um grupo de mensageiros químicos autógenos, lançados na corrente circulatória, coordenando algumas sequências fisiológicas, independentemente do sistema nervoso (Manso *et al.*, 1986; Hardie, 1991). Actualmente define-se hormona como a substância directamente secretada na corrente sanguínea, por células especializadas (que podem estar agrupadas em glândulas endócrinas) em resposta a um estímulo específico e cuja quantidade depende da intensidade desse estímulo.

As hormonas estão presentes em quantidades mínimas no sangue, e quando são levadas às suas células-alvo exercem efeitos específicos, estando quase sempre envolvidas na regulação de reacções celulares pré-existentes (Hardie, 1991).

1.1. Hormonas tiroxina e tri-iodotironina

O controlo do eixo hipotálamo-pituitária-tiróide é bem conhecido em mamífero e parece ser relativamente conservado entre os vertebrados podendo-se por isso, considerar que nos peixes o processo é semelhante.

O hipotálamo produz a hormona libertadora de tirotropina (TRH) que é lançada na corrente sanguínea e levada até à adenohipófise onde estimula primeiro a libertação e depois a síntese de uma glicoproteína, tirotropina (TSH). Esta hormona vai estimular a síntese e a libertação das hormonas produzidas na tiróide (THs) (Leatherland, 1987; Hardie, 1991).

A tireóide é uma glândula endócrina presente em todos os vertebrados mas cuja morfologia varia (Bentley, 1982). Nos teleosteos a tireóide não apresenta uma forma de glândula, antes se verifica a existência de foliculos dispersos no tecido conectivo da mandíbula inferior. Estes foliculos, formados por uma camada de células epiteliais são responsáveis pela captação do iodo, síntese da glicoproteína tiroglobulina e pela subsequente libertação das hormonas tiroxina (T_4) e tri-iodotironina (T_3) (Bentley, 1982; Manso *et al*, 1986; Duke, 1990; Power, 1997).

1.1.1 Estrutura

As hormonas produzidas pela tireóide, tiroxina (T_4) e a tri-iodotironina (T_3), apresentam a seguinte estrutura molecular:

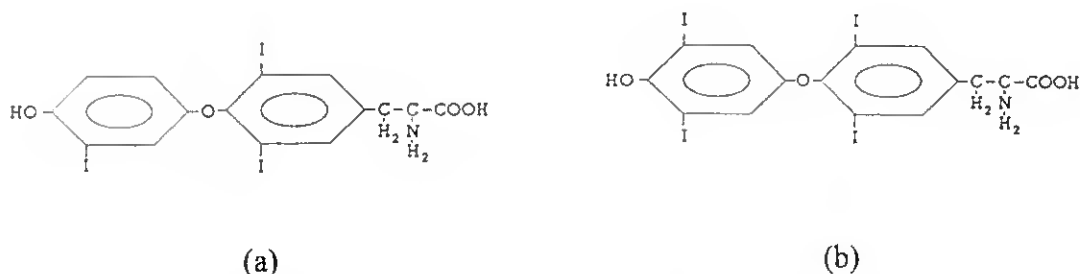


Figura 1 – Estrutura molecular das hormonas produzidas pela tireóide (a) tri-iodotironina (T_3) e tiroxina (T_4) (Adaptado de Leatherland, 1994)

Em termos de estrutura molecular as hormonas tiroxina (T_4) e a tri-iodotironina (T_3) são muito semelhantes. Ambas são formadas por um anel fenólico e por uma anel tirosil centrando-se as diferenças no número de átomos de iodo ligados aos carbonos dos aneis. Assim, a tiroxina (T_4) tem quatro átomos de iodo ligados dois deles ao anel fenólico (carbonos 3 e 5) e dois ligados aos carbonos 3 e 5 do anel tirosil. A hormona tri-iodotironina (T_3) possui também dois átomos de iodo nos carbonos 3 e 5 do anel fenólico mas só apresenta um átomo de iodo no anel tirosil (carbono 3).

1.1.2 Função

Das hormonas produzidas pelos foliculos da tiróide, a tri-iodotironina (T_3) é considerada a forma biologicamente activa enquanto que a tiroxina (T_4) é considerada precursora ou prohormona (Leatherlande, 1994). Estas hormonas regulam a expressão de genes e aumentam a taxa de metabolismo de uma grande variedade de células-alvo (Hardie, 1991).

Vários estudos têm sido desenvolvidos com o objectivo de se conhecer o papel desempenhado pelas hormonas tri-iodotironina (T_3) e tiroxina (T_4) em vertebrados. Provavelmente o papel desempenhado na iniciação e controlo dos vários estádios da metamorfose que os anfíbios sofrem, seja a área mais estudada. Nos peixes, que em termos evolutivos se consideram muito próximos dos anfíbios, este papel não foi ainda consistentemente identificado (Leatherlande, 1987; 1994).

Aubrey Gorbman's (1969 *in* Leatherlande, 1994) compilou os conhecimentos existentes até então, sobre algumas acções das hormonas produzidas pela tiróide em peixes (Agnatha, Chondrichthyes e Osteichthyes), sendo estas enquadradas em cinco áreas da fisiologia. Mais estudos foram feitos e actualmente os dados existentes sugerem vários tipos de acção: mudanças sazonais na actividade da tiróide (incluindo resposta a mudanças da temperatura ambiente), migração, ontogenia e desenvolvimento, reprodução, crescimento, metabolismo intermediário, regulação osmótica e iónica, desenvolvimento e funcionamento do sistema nervoso e pigmentação. Estas propostas de acção das hormonas da tiróide são contudo controversas, uma vez que os resultados dos vários estudos realizados com diferentes espécies nem sempre apontam no mesmo sentido (Leatherlande, 1994).

Em alguns estudos com vertebrados, nomeadamente carneiros e galinhas, verificou-se que as hormonas produzidas pela tiróide são muito importantes no desenvolvimento fetal (Aldred *et al.*, 1995).

1.1.3 Metabolismo

O conhecimento actual da síntese e libertação das hormonas produzidas pela tiróide tem por base o modelo de funcionamento da tiróide em mamíferos. Uma vez que se considera que a génese das hormonas é similar em todos os vertebrados, o caso específico dos peixes não deverá ser muito diferente.

Nos peixes as células dos foliculos da tiróide (tirocitos) captam o iodo existente na água, através das brânquias e intestino. Este é transportado no sangue como iodo livre e/ou ligado a proteínas plasmáticas. Segundo o modelo conhecido, o iodo penetra no lúmen dos foliculos sendo depois oxidado e reagindo com radicais de tirosina da glicoproteína, tiroglobulina (processo catalizado pelas peroxidases) formando mono-iodotirosina (MIT) e di-iodotirosina (DIT). No lúmen dos foliculos pode ocorrer a ligação de uma unidades MIT com uma unidade DIT formando tri-iodotironina (T_3) ou a ligação de duas unidades DIT produzindo-se tetra-iodotironina (tiroxina T_4). Nesta fase as duas hormonas continuam a fazer parte da molécula de tiroglobulina. Quando se torna necessário disponibilizar estas hormonas, a molécula de tiroglobulina, por proteólise, liberta a tri-iodotironina e a tiroxina que são lançadas corrente sanguínea (Manso *et al.*, 1986; Leatherland, 1994).

Comparativamente, a quantidade de T_3 que é libertada pela glândula tiróide nos mamíferos ou pelos foliculos nos peixes é menor que a de T_4 . Tal facto leva a supor que a maior parte de T_3 circulante seja produzido noutros tecidos que não os da tiróide como por exemplo o figado, rins e brânquias. Esta produção resulta da remoção enzimática de um átomo de iodo do anel tirosil da hormona T_4 (Leatherland, 1994).

O processo de regulação dos níveis destas duas hormonas não é ainda conhecido com profundidade. Segundo se supõe a manutenção do nível de T_4 não depende dos níveis de T_3 . Por outro lado a produção de T_3 pode ser ajustada às necessidades metabólicas dos organismos sem que seja necessário controlar os níveis sanguíneos de T_4 (Leatherland, 1994).

1.2 Transretina

As hormonas tiroxina (T_4) e tri-iodotironina (T_3) podem-se encontrar sob várias formas: livres na corrente sanguínea, na fase lipídica dos tecidos ou ligadas a proteínas existentes no plasma (Southwell *et al.*, 1992). Estas proteínas são sobretudo a transtiretina (TTR), globulina que se liga à tiroxina (TBG) e albumina (Palha *et al.*, 1994).

As proteínas plasmáticas podem ser isoladas em quantidades relativamente grandes a partir do plasma sanguíneo e actuam principalmente nos espaços intersticiais e nos compartimentos intravasculares, contribuindo assim para a homeostasia. O principal local de síntese das proteínas plasmáticas é o fígado. Tipicamente as proteínas plasmáticas são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso como precursoras de proteínas com pré-segmentos ricos em aminoácidos hidrofóbicos e posteriormente são modificadas no aparelho de Golgi e secretadas via vesículas (Aldred *et al.*, 1995).

A transretina, uma das proteínas plasmáticas envolvidas no transporte das hormonas da tiróide foi descoberta em 1942 no fluido e no plasma de humanos. Esta proteína, quando sujeita a electroforese a pH 8,6, migra mais rapidamente que a albumina, tendo por isso sido inicialmente conhecida como prealbumina (Aldred *et al.* 1997; Schreiber & Richardson, 1997). A sequência de aminoácidos da transretina é conhecida para várias espécies de vertebrados, nomeadamente mamíferos, aves, anfíbios (Duan *et al.*, 1995a,b) e recentemente numa espécie piscícola, o teleóstéo *Sparus aurata* (Santos & Power, em publicação).

1.2.1 Estrutura / Função

A transretina é composta por quatro subunidades idênticas, de 127 aminoácidos, dispostas segundo uma simetria tetraédica formando-se um canal central. As hormonas tiroxina (T_4) e tri-iodotironina (T_3) ligam-se a esta proteína em locais simétricos localizados profundamente no canal central. Na transtiretina humana só um destes locais é utilizado. Na transretina existem locais de ligação para outras proteínas, como por exemplo a proteína que se liga ao retinol (RBP), que é o transportador específico da vitamina A (Wakasugi *et al.*, 1985; Blake & Oatley, 1977; Aldred *et al.*, 1997; Schreiber

& Richardson, 1997).

A análise, por raios-X, da transretina permitiu caracterizar quimicamente o canal central. Assim, a partir do centro encontra-se (a) uma zona hidrofílica formada pelos aminoácidos Ser 117 e Thr 119; (b) uma zona hidrofóbica formada pelos grupos metil de Leu 17, Thr 106, Ala 108, Leu 110, Thr 119 e Val 121; e (c) um grupo formado por Lys 15, Glu 54 e His 56. As hormonas T_4 e T_3 ligam-se à transretina na zona de constricção perto dos pares Ser 117-Thr 119 e Lys 15-Glu 54, e os seus eixos ficam mais ou menos paralelos ao eixo do canal (Blake & Oatley, 1977).

As proteínas que se ligam a componentes, que são insolúveis ou parcialmente solúveis na fase aquosa, tais como ferro e ácidos gordos podem servir como transportadores de hormonas. Outras proteínas podem evitar que componentes, mais solúveis nas membranas lipídicas que no plasma desapareçam na fase lipídica das membranas celulares por ligação desses componentes a sítios específicos na proteína. Um exemplo do anteriormente exposto é a transretina que se liga às hormonas produzidas pela tiróide, com grande afinidade (Aldred *et al.*, 1995).

Sendo as hormonas tiroxina e tri-iodotironina lipofílicas (Robbins & Lakshmanan, 1992), isto é, muito mais solúveis na fase lipídica das membranas do que na fase aquosa (Schreiber & Richardson, 1997), rapidamente atravessariam as membranas celulares levando ao abaixamento dos níveis destas hormonas no plasma sanguíneo. Para que tal não aconteça as hormonas ligam-se, no meio extracelular, à transretina (Southwell *et al.*, 1993). Esta ligação é importante uma vez que permite a distribuição da hormona T_4 , existente no sangue para o sistema nervoso central (Schreiber *et al.* 1995; Cavaliere, 1997)

A principal função das proteínas plasmáticas é promover um ambiente apropriado no espaço extracelular para as células do corpo (homeostasia) (Aldred *et al.*, 1995), no entanto esta função pode não ser essencial. Este facto foi verificado em ratos onde foi evidenciado que a homeostasia das hormonas da tiróide, não depende da proteína transretina (Palha *et al.* 1994).

A proteína transretina, tal como as outras proteínas plasmáticas, são normalmente consideradas transportadoras das hormonas da tiróide. No entanto segundo Schreiber & Richardson (1997) esta designação não é correcta pois considera que as hormonas da tiróide são um substracto que é produzido num local e que é metabolizado noutro. Na realidade isto não acontece pois estas hormonas funcionam como “componentes de sinal”, cujos níveis precisos têm que ser mantidos. Assim a transretina deve antes ser chamada de proteína distribuidora das hormonas da tiróide em vez de transportadora.

1.2.2. Regulação

A maior parte dos dados disponíveis sugerem que a tiroxina (T₄) existente nas células é fornecida por “reservatórios” de tiroxina livre existentes em torno das células, isto é, no espaço sinusoidal no fígado. O tamanho destes “reservatórios” é determinado pelo balanço entre a entrada/saída da T₄ nas/das células e ligação/libertação à transretina (proteína plasmática). Esta proteína plasmática é sintetizada no fígado, distribuída através da corrente sanguínea em minutos e equilibrada nos compartimentos extravascular, intersticial e intravascular em poucos dias (Schreiber *et al.*, 1995; Aldred *et al.*, 1995; Schreiber & Richardson, 1997).

Segundo Dickson *et al.* (1982 *in* Schreiber *et al.*, 1995) e com base em estudos de determinação da quantidade total de transretina nos tecidos, sua taxa de viragem e incorporação de leucina e determinação da quantidade da proteína no plasma, o fígado é o maior local de síntese da transretina. Contudo foram descobertos outros locais onde o gene da transretina se expressava como por exemplo epitélio, saco vitelino, epitélio pigmentar da retina (Ong *et al.*, 1994), sendo contudo mais proeminente o choroid plexus (Dickson *et al.*, 1985).

Das proteínas sintetizadas pelo choroid plexus a transretina é de longe a mais abundante: cerca de 50% do total de proteínas secretadas e cerca de 12% do total de proteínas sintetizadas. Foi calculado que o choroid plexus tem a capacidade de sintetizar a maior parte, se não toda a transretina existente no fluido cerebroespinal (Schreiber *et al.*, 1995).

A concentração da transretina no plasma sanguíneo e os níveis de RNA mensageiro no fígado decrescem durante a fase aguda de resposta a um trauma ou inflamação (Dickson *et al.*, 1985). Contudo os níveis de RNA mensageiro da transretina no choroid plexus não se alteram durante essa fase (Aldred *et al.*, 1995).

Consistente com a importância das hormonas produzidas pela tiróide, no desenvolvimento do cérebro no embrião, a expressão do gene da transretina ocorre muito cedo durante o desenvolvimento fetal (Aldred *et al.*, 1995).

1.2.3 Evolução

Os vários estudos efectuados em vertebrados levaram a que se considerasse que a expressão do gene da transretina ocorre primeiro no choroid plexus e só mais tarde no fígado (Richardson *et al.* 1994; Aldred *et al.*, 1995). Desde que a expressão do gene da transretina foi demonstrado pela primeira vez no choroid plexus de ratos (Dickson *et al.*, 1985), tem sido identificado no choroid plexus de várias espécies de mamíferos (Duan *et al.*, 1995a).

A forte conservação da estrutura e a expressão do gene da transretina em mamíferos e galinhas sugere que a transretina já era sintetizada por um ancestral comum às aves e aos mamíferos, isto é, os répteis com cauda que viveram à cerca de 350 milhões de anos (Duan *et al.*, 1991; Southwell *et al.*, 1992). Estas considerações suportam a ideia de a função mais importante da transretina é o transporte das hormonas produzidas pela tiróide até ao cérebro (Richardson *et al.* 1994).

No entanto a identificação e a caracterização da transretina em peixes (*Sparus aurata*) feita por Santos e Power (1998, em publicação) veio demonstrar que tal pressuposto não é totalmente correcto. Por um lado o gene da transretina já devia ser expresso muito antes da existência dos répteis com cauda por outro lado, como os peixes têm um choroid plexus muito pequeno a expressão desta proteína, provávelmente não terá ocorrido primeiro no cérebro, mas antes noutro tecido como por exemplo o fígado.

A estrutura primária da transretina, em particular o âmago das subunidades e o

canal central, onde se encontram os locais de ligação das hormonas, é altamente conservado entre as espécies (Wakasugi *et al.*, 1985; Duan *et al.*, 1991; Richardson *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1994; Duan *et al.*, 1995a; Schreiber *et al.*, 1995; Aldred *et al.*, 1997). As grandes diferenças encontradas na sequência de aminoácidos, das várias espécies estudadas, envolvem os dez primeiros aminoácidos do N-terminus de cada subunidade (Sundelin *et al.*, 1985; Wakasugi *et al.*, 1985; Duan *et al.*, 1991, 1995a,b.; Richardson *et al.*, 1994; 1996).

1.3. Caracterização da espécie

1.3.1. Posição sistemática

A espécie utilizada neste estudo foi a dourada, *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758). Segundo Bauchot (1987) a dourada tem a seguinte classificação taxonómica:

Filo: Chordata

Subfilo: Vertebrata

Super-classe: Piscis

Classe: Osteichthyes

Super-ordem: Teleostei

Ordem: Perciformes

Super-família Percoidea

Família Sparidae

Género: *Sparus*

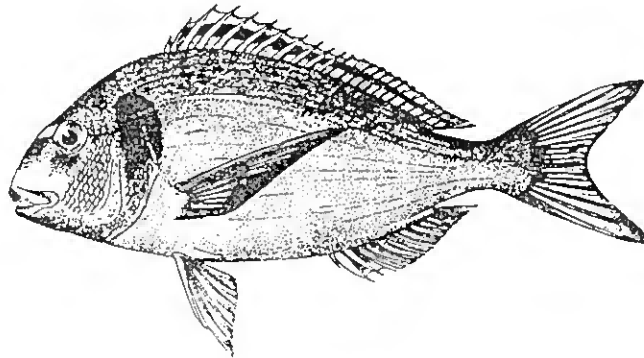


Figura 2 – Dourada, *Sparus aurata*, (Bauchot, 1987)

1.3.2. Biologia e ecologia

A dourada é um teleósteo marinho bentónico, cujos alevins e juvenis vivem próximos da costa, penetrando frequentemente nas desembocaduras dos rios e lagunas litorais (salobras ou não), sobretudo na primavera e verão. No inverno os indivíduos maduros migram para o mar alto com fins reprodutivos (Orvay, 1993; Barnabé, 1989; Bauchot, 1987). Segundo Muzavor *et al.* (1993) a Ria Formosa é local de permanência dos juvenis.

Segundo Barnabé (1989) e Orvay (1993) este teleósteo apresenta elevada tolerância a parâmetros ambientais, estabelecendo este autor limites de temperatura entre 5 e 35°C, de salinidade entre 5 e 50 ‰ e um mínimo de oxigênio dissolvido em torno de 2-3 mg/l.

É uma espécie preferencialmente carnívora, alimentando-se em especial de moluscos bivalves, crustáceos e pequenos peixes (Orvay, 1993)

Sparus aurata uma espécie que apresenta inversão sexual (hermafrodita protândrico), atingindo a maturidade como machos entre o segundo e o terceiro ano de vida (20-30 cm de comprimento e 250/400gr. de peso). Posteriormente, mudam de sexo e convertem-se definitivamente em fêmeas (80-90%) e podem atingir cerca de 70 cm de comprimento (Orvay, 1993; Bauchot, 1987).

A reprodução ocorre durante o inverno e a postura tem lugar entre Outubro e Dezembro, dependendo fundamentalmente da temperatura da água e do fotoperíodo (Bauchot, 1987). Nas águas do mediterrâneo a maturação inicia-se a partir dos 19°C e a postura em condições naturais ocorre a temperaturas inferiores a 14-15° (Orvay, 1993).

A fecundação é externa sendo os ovos e as larvas, pelágicos (Bauchot, 1987). Em meio natural, os ovos têm um diâmetro entre 0,8-1 mm e encerram uma gota lipídica ou ocasionalmente duas a três gotas mais pequenas. As larvas recém-eclodidas medem pouco mais de 1mm (Zaki, 1984; Orvay, 1993).

Segundo Barnabé (1989) após a eclosão podem-se considerar duas fases: pré-larva e larva. A primeira é caracterizada pela presença do saco vitelino, ovalado e que ocupa cerca de um terço do totalidade do corpo e pela presença da gota lipídica do ovo. A designação de larva só é aplicada a partir do momento de abertura da boca e da transição para a alimentação exógena. O intestino torna-se funcional e o saco vitelino, que está reduzido à gota lipídica desaparece por volta do sétimo dia (após a eclosão).

A taxa de crescimento indivíduos desta espécie em meio natural é alta. Assim um indivíduo que ao fim de dois anos pesa cerca de 300gr., pode pesar 600gr. no terceiro ano

(Orvay, 1993). Esta taxa pode ser manipulada permitindo obter indivíduos mais pesados em menor espaço de tempo. Por outro lado, por manipulação da temperatura e do fotoperíodo é possível manter diferentes grupos de reprodutores a realizarem posturas em diferentes momentos e ao longo do ano (Calderer & Cardona, 1993). Estas características aliadas ao elevado valor comercial, tornam esta espécie interessante do ponto de vista da piscicultura.

Aos longo dos anos, alguns estudos têm sido realizados em peixes no sentido de entender o papel das hormonas nos processos de reprodução. No entanto, a evidência do envolvimento das hormonas produzidas pela tiróide no funcionamento das gonadas é fragmentário e especulativo. Eventualmente estas hormonas actuarão em conjunto com as gonadotropinas e estarão implicadas na vitelogenese e/ou na incorporação da vitelogenina nos oócitos (Leatherland, 1987).

1.4 Objectivos do estudo

Em vertebrados as hormonas produzidas pela tiróide são transportadas, desde o seu local de síntese até ao de actuação, por proteínas plasmáticas. Em estudos recentes (Santos & Power, 1998) verificou-se que a transretina é a proteína plasmática de transporte por excelência destas hormonas, pelo menos no teleósteo *Sparus aurata*.

Este trabalho teve como objectivo o estudo da distribuição da transretina nos tecidos de *Sparus aurata*, seis, doze e vinte e quatro horas após a injeccção com as hormonas tiroxina (T₄) e tri-iodotironina (T₃). Para tal, utilizou-se uma gama de métodos de biologia moléculas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2. 1. Experiência

Para estudar a influência das hormonas T₃ (tri-iodotironina) e T₄ (tiroxina) na expressão da transretina (TTR), deliniou-se uma experiência onde foram usados trinta e seis juvenis de *Sparus aurata* (peso médio 73g ± 17). Esta experiência teve lugar em Maio quando a temperatura média da água era de 18°C e a salinidade 35‰, os juvenis foram colocados em três tanque (doze em cada) durante dois dias (para diminuir o stress resultante da manipulação). Foram sujeitos ao fotoperíodo normal para a época do ano e alimentados com ração (duas vezes por dia). O primeiro grupo de doze juvenis (tanque 1) foram injectados intra-peritonealmente com T₃ (triiodotironina), dissolvido em solução salina, na concentração de 0,1 mg/g de peso corporal, o segundo grupo (tanque 2) com T₄ (tiroxina, 0,1mg/g peso corporal) também dissolvido em solução salina e o terceiro grupo (tanque 3) foi injectado com a solução salina (testemunho).

Seis horas, doze horas e vinte e quatro horas após a injeção, quatro juvenis de cada grupo foram mortos por decapitação, os tecidos removidos (fígado, cérebro, brânquias, rim, intestino, coração e músculo), congelados em azoto líquido e armazenados a -80°C (Ultra Low Freezer U57085, New Brunswick Scientific) até à extração de RNA.

2.2. Análise da transretina por RT-PCR

2.2.1. Extração de RNA total

De acordo com a bibliografia existente (Brown, 1991) o estudo de um gene deve começar pelo RNA e não pelo DNA. Tal deve-se ao facto de as moléculas de mRNA presentes num tecido, representarem os genes que estão a ser expressos naquele momento. Por este motivo optou-se por fazer a extração do RNA total com o objectivo de incluir o mRNA.

O RNA total foi extraído segundo o método de Chomezynski e Sacchi (1987), a partir dos tecidos congelados. Este método permite a extracção de RNA total de pequenas quantidades de tecido sendo reduzidas as manipulações o que previne as possíveis contaminações.

O RNA total extraído foi guardado, em aliquotas, em tubos *ependorfs* a -80°C até à sua utilização na síntese de cDNA.

2.2.2. Desenho e optimização dos *primers*

A escolha das sequências de bases dos *primers* foi feita segundo os critérios propostos por Holland (1993)

Os *primers* 1 (directo) e 2 (reverso) foram desenhados a partir da sequência de bases do gene conhecida para a dourada (Santos & Power em publicação). Estes *primers* permitiam a ampliação de um fragmento com cerca de 335 bp e foram mandados construir a uma empresa especializada (Pharmacia Biotech). Foram determinadas as condições ideais para o PCR (concentração de sal, temperatura de annealing, número de ciclos) (ver 2.2.4.) e determinada a fiabilidade através de clonagem (ver 2.2.6.) e sequenciação (ver 2.2.7.) dos produtos de RT-PCR assim obtidos.

Durante o tratamento das amostras surgiram problemas relacionados com o produtos de RT-PCR (amostras onde tinham sido detectadas bandas, deixaram de as apresentar em RT-PCR subsequentes). Apesar dos inúmeros testes realizados (reagentes, *primers* e sínteses de cDNA) não foi possível identificar a razão do problema. Afim de avançar com o trabalho foi determinado desenhar novos primers utilizando a mesma sequência mas agora utilizando um programa informático Primer Premier. Deste modo foram desenhados os *primers* 3 (directo) e 4 (reverso). Estes *primers* permitem a ampliação de um fragmento com cerca de 270 bp que foram mandados construir à empresa MWG-Biotech GmbH. Foram determinadas as novas condições óptimas para PCR.

2.2.3. Síntese de cDNA

O cDNA ou DNA complementar foi produzido por cópia de uma molécula de mRNA, processo no qual intervém uma enzima especial, a transcriptase inversa, que é característica dos retrovírus (Peters, 1993). A síntese da cadeia complementar é feita no sentido 3' - 5' sendo iniciada por um *primer* (iniciador) composto por uma sequência de Timinas (Oligo dT) que se liga à extremidade 3' da molécula de mRNA. Na extremidade 3' dos mRNA existe uma cauda de Adeninas (poliA) que são adicionadas no final do processo de transcrição, pelo que o *primer* tem que ser complementar (sequência de Timinas) para permitir a sua ligação. Esta técnica permite a preparação de um único cDNA para a análise de vários mRNAs (Dallman & Porter 1993; Koopman, 1993). Para que a síntese tenha lugar são também fornecidos nucleótidos (dNTPs).

Para a síntese de cDNA foram utilizadas 5µg de RNA total de cada um dos extractos. Para cada reacção adicionou-se, ao RNA total, um volume de água estéril suficiente para fazer 12,6µl e 1µl de Oligo (dT)₁₂₋₁₈ (1µg/µl), Pharmacia. Esta solução foi aquecida a 68°C durante 3 minutos e colocada imediatamente sobre o gelo, adicionando-se de seguida:

4µl de 5x Reaction Buffer, Pharmacia

2µl de DTT (0.1M) (Pharmacia Biotech)

1µl de dNTPs (10mM) (Pharmacia Biotech)

0.2µl de RNA guard (3,2U; Pharmacia Biotech)

0.2µl de M-MLV Reverse Transcriptase (20U; GibcoBRL)

Esta mistura foi incubada durante 2 horas a 37°C a que se seguiu um período de 5 minutos a 68°C (objectivo: parar a reacção).

Por cada síntese foi também preparado um tubo testemunho. Foi sujeito ao mesmo tratamento tendo-se substituído o volume de RNA total por água depc.

Os tubos *ependorfs* com o cDNA sintetizado foram guardados a -20°C.

2.2.4. Polymerase Chain Reaction (PCR)

O método de PCR inventado por Kary Mullis e seus colegas da Cetus Corporation (Weaver & Hedrick, 1992) permite obter uma amplificação selectiva das moléculas de cDNA produzidas anteriormente.

Neste método é utilizada a enzima DNA polimerase que copia uma determinada região da molécula de DNA (neste caso de cDNA) delimitada por *primers* que hibridizam em locais individualizados das cadeias de DNA. Esta técnica permite obter inúmeras cópias em pouco tempo (Eidne, 1991) e é muito útil quando a existências de mRNA nos tecidos é muito pequena ou quando se dispõem de pequena quantidade dos tecidos a analisar (Dallman & Porter, 1993).

Tal como o nome indica o RT-PCR é um processo cíclico que promove reacção em cadeia. Para que o processo de ampliação tenha lugar é necessário criar as condições apropriadas. Assim o processo inicia-se com a desnaturação da dupla cadeia de DNA, por aquecimento. Uma vez as cadeias separadas os *primers*, que delimitam a região a ampliar, ligam-se por complementariedade na região 3' de cada uma das cadeias, permitindo a actuação da DNA polimerase que pode proceder assim à cópia. Uma vez esta terminada, o processo reinicia-se dando-se nova desnaturação, separando-se as novas cadeias formadas que serviram de molde para nova cópia. Terminado o número de ciclo determinados suficientes para se obter a quantidade desejada, procede-se a um período de alongamento (um minuto), para garantir que todas as cópias foram feitas na integra (Weaver & Hedrick, 1992).

Para aplicação deste método foi utilizado um termociclador (Robocycle Gradient 40, Stratagene) e foram determinadas as condições ideais de funcionamento. Estas condições passam pela escolha dos *primers* adequados, pela determinação da concentração de um sal, MgCl₂, que condiciona o desempenho dos *primers* e influencia o desempenho da enzima e ainda pela utilização de uma solução-tampão da reacção (*buffer*) que cria as condições óptimas para o funcionamento da enzima (foi utilizada a enzima Taq (Promega) e o respectivo *buffer*).

Para o primeiro par de *primers* (1 e 2), a 5ml de cDNA foram adicionados:

- 35,25ml de água estéril
- 1,5ml de MgCl₂ (1,5mM) (Promega)
- 1ml de dNTPs (10mM)
- 5ml de 10xPCR *buffer* (Promega)
- 0.25ml de Taq (1,25U; Promega)
- 1ml do Primer 1 (50pmol/ml) (Pharmacia Biotech)
- 1ml de Primer 2 (50pmol/ml) (Pharmacia Biotech)

Para o par 3 e 4, a 5µl de cDNA foram adicionados:

- 33,5ml de água estéril
- 3ml de MgCl₂ (1,5mM) (Promega)
- 1ml de dNTPs (10mM)
- 5ml de 10xPCR *buffer* (Promega)
- 0.5ml de Taq (1,25U; Promega)
- 1ml do Primer 3 (50pmol/ml) (MWG-Biotech GmbH)
- 1ml de Primer 4 (50pmol/ml) (MWG-Biotech GmbH)

Para cada PCR foi efectuado um controlo, no qual o volume de cDNA era substituído por igual volume de água estéril.

As condições de temperatura, número de ciclos e tempos de cada etapa foram previamente determinados antes de se proceder ao tratamento das amostras. Para estes PCR foram determinadas as seguintes condições:

- para o primeiro par de *primers* (1 e 2):

Desnaturação inicial	94°C	1m30sec	1x
Desnaturação	94°C	1m	
Annealing	60°C	2m	20x
Extensão	72°C	3m	

Extensão final	72°C	1m	1x
----------------	------	----	----

- para o segundo par de *primers* (3 e 4)

Desnaturação inicial	94°C	1m30sec	1x
----------------------	------	---------	----

Desnaturação	94°C	1m	
--------------	------	----	--

Annealing	72°C	2m	25x
-----------	------	----	-----

Extensão	72°C	1m	
----------	------	----	--

Extensão final	72°C	1m	1x
----------------	------	----	----

Os resultados destes RT-PCRs foram observados e avaliados através de electroforeses em gel de agarose.

2.2.5 Electroforese e purificação de ácidos nucleicos em gel de agarose

A separação de ácidos nucleicos de diferentes tamanhos é usualmente obtida através da aplicação da técnica de electroforese (Brown, 1991). A electroforese baseia-se na migração diferencial das moléculas através de uma matriz. Esta migração é induzida por uma corrente eléctrica positiva que actua sobre os ácidos nucleicos que se encontram carregados negativamente. As moléculas mais pequenas têm mais facilidade em atravessar os poros da matriz, pelo que migram mais que as moléculas maiores. Quando a corrente cessa, a migração cessa o que permite verificar os diferentes tamanhos dos fragmentos (aparecem na forma de bandas) e, se for o caso, permitir a purificação de produtos individualizados (Purves *et al*, 1995).

A matriz de um gel de agarose é uma complexa rede de poros que se encontram distribuídos de forma regular (Peters, 1993). O seu tamanho depende da solução-tampão e do tipo de agarose utilizada.

Os geis usados neste trabalho foram de 1-2% variando a solução-tampão consoante se pretendiam geis para RNA (TBE) ou para DNA (TAE). Para tornar as bandas fluorescentes, quando sujeitas a luz ultra-violeta foi adicionado 3µl/5ml de brometo de etídio (500µg/ml) na preparação de cada gel. O brometo de etídio é um agente fluorescente que se intercala entre as bases de DNA (Ahern, 1991). Para aumentar a

densidade das amostras e mantê-las no fundo dos poços do gel, foi adicionado, a cada amostra, um reagente colorido feito à base de sucrose ou glicerol e azul de bromofenol (Andrews, 1991). Foi ainda usado um conjunto de fragmentos de tamanhos conhecidos, marcador de peso molecular (1Kb DNA Ladder GibcoBRL e 50 Base-Pair Ladder Pharmacia Biotech), que permite a determinação, por interpolação, do tamanho dos fragmentos nas amostras. As amostras foram corridas num gel sob um campo eléctrico de 70-80 V.

Os produtos de RT-PCR e os fragmentos digeridos de plasmídeos que se pretendiam purificar foram corridos em gel de agarose e processados segundo os protocolos propostos, respectivamente, pelos métodos Wizard PCR Prep. DNA Purification System (Promega) e QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)

2.2.6 Clonagem, excisão do plasmídeo e digestão com enzimas de restrição

Nas bactérias e leveduras existem moléculas de DNA circulares a que se dá o nome de plasmídios ou vectores. Estes apesar de não pertencerem ao património genético das bactérias ou leveduras, replicam-se quando estas sofrem o processo de divisão celular. Aproveitando esta característica, é possível criar vectores onde se introduz o fragmento de DNA que se quer multiplicar e introduzir este vector modificado em células hospedeiras (bactérias ou leveduras). A esta técnica dá-se o nome de clonagem (Peters, 1993).

Actualmente, são usados plasmídeos produzidos artificialmente a partir de plasmídeos naturais. Estes novos plasmídeos apresentam genes que lhe conferem características próprias: resistências a determinados antibióticos, um só local de corte para as endonucleases de restrição (Purves *et al.*, 1995).

Na figura 3 encontra-se esquematizado, de forma simplificada o processo de clonagem.

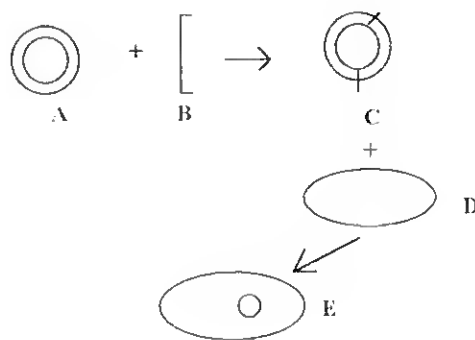


Figura 3 - Esquemática, simplificada do processo de clonagem. A- Plasmídeo fechado; B- Fragmento de DNA a inserir com pontas compatíveis; C- Plasmídeo com o fragmento inserido; D- Bactéria hospedeira; E- Plasmídeo com o fragmento introduzido na bactéria hospedeira. (Adaptado de Brown, 1991)

O produtos de RT-PCR, de cDNA sintetizado a partir de RNA de fígado foram purificados e clonados em células hospedeiras, *Escherichia coli* (estirpe XL1B) segundo as instruções do fabricante do sistema pGEM-T easy Vector (Promega) (figura 4). Este vector encontra-se linearizado e as suas extremidades são compatíveis com os produtos de RT-PCR.

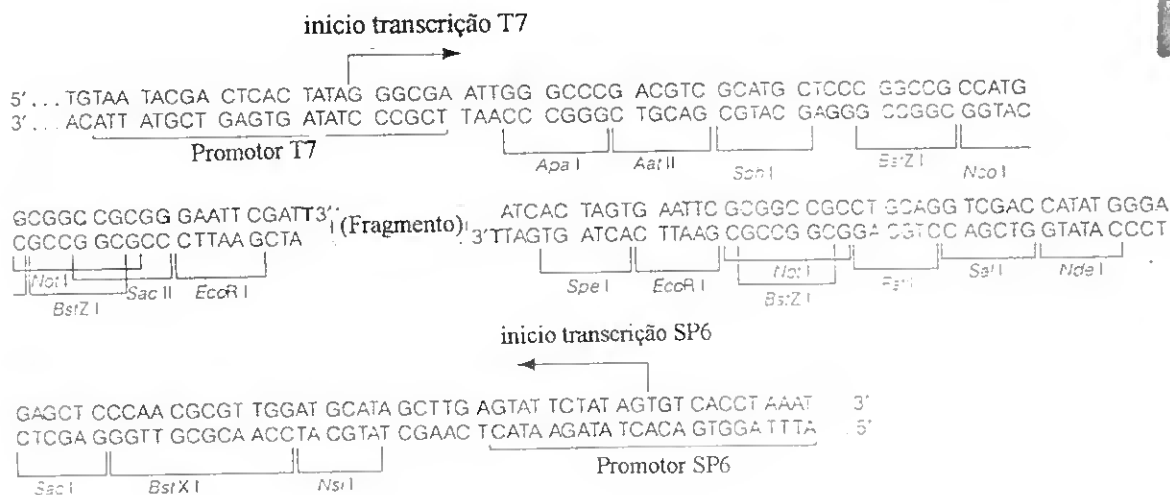


Figura 4 - Local de clonagem, promotores e enzimas de restrição do plasmídeo PGEM-T Easy Vector (Promega). A cadeia superior corresponde ao RNA sintetizado pela RNA polimerase T7 e a cadeia de baixo pela RNA polimerase SP6.

O processo de ligação do fragmento de DNA, anteriormente purificado, com o plasmídeo foi efectuado segundo as instruções do fabricante. As células hospedeiras

foram sujeitas a um tratamento que as tornou competentes, isto é, permeáveis à introdução do plasmídeo modificado. Para que tal fosse possível foi utilizado CaCl_2 0.1M. Após a transformação, as células foram plaqueadas em meio de cultivo LB Agar (Sigma) com ampicilina (antibiótico), IPTG e XGal e deixadas crescer a 37°C durante pelo menos 16 horas. Na placa surgiram colónias azuis e colónias brancas sendo estas as escolhidas, uma vez que a inserção do fragmento interrompe a sequência do gene que codifica a β -galactosidase, a qual confere um tom azul às colónias.

As colónias brancas foram repicadas para meio LB Broth (Sigma) com ampicilina e incubadas algumas horas a 37°C. Para se proceder à excisão do plasmídeo, libertando-o assim da célula hospedeira, foi utilizado o sistema Wizard Plus SV Minipreps (Promega). O sucesso da clonagem foi determinado pela digestão do plasmídeo com uma enzima de restrição (enzimas que reconhecem e cortam apenas em locais específicos da sequência de bases. Estes locais situam-se de cada um dos lados do ponto de inserção, e deste modo permitem a libertação do fragmento clonado).

A digestão foi efectuada durante pelo menos uma hora a 37°C, com a enzima EcoR I (1 μ l) à qual se juntou 4 μ l de One-Phor-All (Pharmacia Biotech) (*buffer*), 10 μ l de água estéril e 5 μ l de plasmídeo. Para se confirmar o sucesso da digestão, isto é, a libertação dos fragmentos clonados foi feita uma electroforese em gel de agarose.

2.2.7 Sequenciação

O produto de PCR colonado foi mandado sequenciar para se assegurar a sua identidade.

O processo de sequenciação baseia-se nos princípios propostos por Sanger em 1977 (Weaver & Hendrick, 1992; Peters, 1993), segundo os quais durante a formação de uma cadeia de DNA é necessário que um nucleótido tenha determinadas características químicas que permitam a incorporação do seguinte. Se o nucleótido estiver alterado não é possível a ligação de outro nucleótido, o processo de síntese é interrompido gerando-se fragmentos de DNA e não uma molécula inteira. Ao nucleótido alterado (ddNTP) dá-se o

nome de terminador da cadeia.

O DNA a ser sequenciado é desnaturado e adicionado um *primer* que hibrida na região adjacente ao local de inserção e uma DNA polimerase. Cópias do complexo *primer*-DNA são divididas em quatro tubos tendo cada uma delas os quatro nucleótidos normais (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) em grandes quantidades. A cada tubo é fornecido dATP marcado radioativamente com ³⁵S e um único tipo de nucleótido alterado (ddNTP). Ao longo de cada uma das reacções, a síntese da cadeia é interrompida o que leva à formação de fragmentos radioactivos de diferentes tamanhos mas que terminam sempre num nucleótido cuja base é conhecida. A leitura da sequência pode ser feita recorrendo a electroforese em gel de poliacrilamida, ou usado um sequenciador automático.

A identidade do DNA sequenciado foi confirmada por comparação da homologia com a sequência determinada por Santos e Power (em publicação) para este gene nesta espécie.

2.3. Análise da transretina por Southern blot

2.3.1 Transferência de DNA para membrana de nitrocelulose (Southern blot)

O método de transferência de DNA foi descrito pela primeira vez por Southern em 1975 (Sambrook *et al.*, 1989) e consiste basicamente na passagem, por difusão, dos fragmentos de DNA que se encontram num gel de agarose para uma membrana de nitrocelulose. Este método é normalmente utilizado, como um dos passos no processo de hibridação de fragmentos com uma sonda marcada com radioisótopos.

Os produtos de PCR separados em gel de agarose foram transferidos segundo um protocolo adaptado de Sambrook *et al.* (1989). Segundo este protocolo depois da electroforese o gel é colocado numa solução desnaturante que quebra as ligações de hidrogénio existentes na molécula de DNA, permitindo assim a sua ligação à membrana. A passagem do DNA para a membrana de nitrocelulose faz-se por capilaridade, usando-se uma solução que arrasta os fragmentos. Uma vez a transferência ocorrida, o DNA é fixado à membrana através de calor seco a 80°C (Weaver & Hendrick, 1992; Purves *et al.*,

1995).

A figura 5 esquematiza a montagem para Southern blot.

Os produtos de PCR foram sujeitos a electroforese em gel de agarose 1-2%, até à separação efectiva das bandas.

O gel foi colocado numa solução desnaturante (0.5N NaOH*1.5M NaCl) durante 15 minutos, com agitação suave. Foi lavado em água estéril e colocado em contacto com solução neutralizante (1.5M NaCl*0.5M TRIS (pH 8)) durante 30 minutos.

Entretanto colocou-se a solução de transferência (20xSSC) numa tina e embebeu-se nela uma tira de papel de filtro (3MM Whatman). Sobre esta tira colocou-se o gel e sobre este uma folha de membrana de nitrocelulose (Hybond-C, Amersham). Esta membrana foi previamente molhada em água desionizada e imergida em 20xSSC durante 5 minutos. Sobre a membrana foram colocadas 2-3 folhas de papel de filtro 3MM Whatman embebidas em 20xSSC e sobre estas uma pilha de papel absorvente. Para garantir o permanente contacto do gel com a membrana de nitrocelulose, foi colocado no topo da pilha um peso de 500g.

A transferência ocorreu durante 16-24 horas.

Após a transferência a membrana foi imersa em 2xSSC durante alguns segundos. A membrana, entre folhas de 3MM Whatman foi colocada no forno a 80°C durante duas horas.

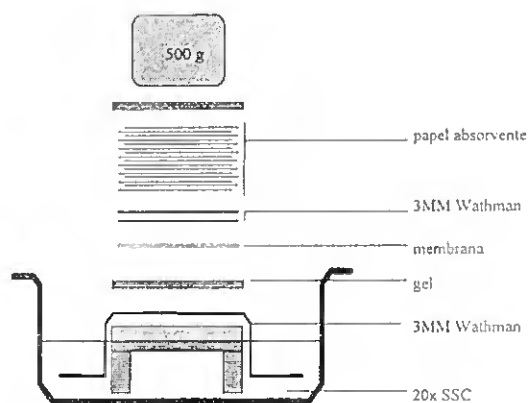


Figura 5 - Montagem para Southern blot. A transferência dos fragmentos de DNA do gel para a membrana de nitrocelulose ocorre por capilaridade e o papel absorvente facilita o processo de difusão (Adaptado de Guerreiro, 1996).

2.3.2 Marcação de sondas, hibridação e autorradiografia

Detectar um determinado fragmento de DNA numa membrana, só é possível se existir uma sonda (cadeia de DNA ou RNA complementar do fragmento fixado na membrana) que com ele hibride. Para além desta característica é necessária que essa hibridação se torne visível, pelo que se procede à incorporação de nucleótidos radioactivos. A sonda foi produzida a partir de fragmento clonados de TTR, marcada segundo o protocolo do produto comercial Ready-To-Go DNA Labelling Kit (-dCTP) (Pharmacia Biotech) com o radionucleótido [α - 32 P]dCTP (Amersham) e purificada por cromatografia utilizando NACS PREPAC (Gibco BRL). A actividade da sonda foi quantificada num contador de cintilação (Beckman LS6000IC).

O sucesso da hibridação da sonda com os ácidos nucleicos fixados na membrana depende, da temperatura a que tem lugar e da concentração da solução de hibridação. Estas características constituem a estringência (Old & Primrose, 1994).

Uma vez que a sonda utilizada era complementar do DNA nas membranas, foram usadas condições de elevada estringência (pouca concentração de sais e elevada temperatura).

As membranas foram hidratadas com 6xSSC e imersas em solução de pré-hibridação (15ml 20xSSC, 5ml 50xDenhart Solution, 500 μ l 10% SDS, 200 μ l tRNA (50mg/7ml), 29,3ml água estéril) durante 3 horas a 60°C. A esta solução foi depois adicionada a sonda, que previamente foi desnaturada, para linearizar a cadeia. A incubação foi feita no interior de garrafas herméticas (a sua composição impede a saída da radioactividade) que se encontravam num eixo rotativo de uma estufa de hibridação (Shel Lab 1004). A hibridação decorreu durante aproximadamente 20 horas, findas as quais a solução de hibridação foi eliminada e as membranas lavadas com 0.1xSSC*0.1%SDS (repetida por 3 vezes, 30 minutos cada).

Posteriormente, as membranas foram envoltas em película aderente e colocadas no interior de uma cassete impenetrável à luz e à radioactividade sobre um filme fotográfico (Kodak Biomax MS). As cassetes foram mantidas a -80°C durante o tempo de exposição.

3. RESULTADOS

3.1. Análise da transretina por RT-PCR

3.1.1 Extração de RNA

Na tabela I encontram-se os resultados da extração de RNA de tecidos de peixes que não foram sujeitos a tratamento, isto é, que foram injectados com a solução salina..

Dos vários extractos de RNA efectuados, foram escolhidos os que apresentavam um rácio maior (fornecido pelo espectrofotómetro GeneQuant, Pharmacia Biotech), por se considerar serem os de melhor qualidade. Segundo Wilkinson (1991) um rácio entre 1,8 e 2,0 corresponde a um extracto com pouca contaminação principalmente por DNA. Valores abaixo de 1,6 são indicadores de contaminação por proteínas.

Tabela I - Leitura das absorvâncias, rácio, r, (abs260/abs280) de alguns extractos de RNA de vários tecidos de dourada (fígado, cérebro, rim, brânquia, intestino, coração e músculo) que não foram sujeitas a tratamento. A absorvâncias refere-se a uma diluição 1:50 à excepção dos extractos de cérebro, rim e coração cuja diluição usada foi 1:25.

Amostras	Absorvância 260nm	Absorvância 280nm	Rácio r
Fígado 1 (F1)	2,46	1,68	1,6
Fígado 2 (F2)	2,86	1,87	1,5
Cérebro 1 (CP1)	0,34	0,18	1,8
Cérebro 2 (CP2)	0,29	0,17	1,8
Rim 1 (R1)	1,58	0,88	1,8
Rim 2 (R2)	0,63	0,35	1,7
Brânquia 1 (B1)	0,72	0,39	1,8
Brânquia 2 (B2)	1,13	0,62	1,8
Intestino 1 (I1)	2,15	1,17	1,8
Intestino 2 (I2)	1,71	0,92	1,8
Coração 1 (C1)	0,72	0,43	1,7
Coração 2 (C2)	0,90	0,59	1,7
Músculo 1 (M1)	0,09	0,03	1,9
Músculo 2 (M2)	0,06	0,03	1,8

A qualidade dos extratos também foi verificada através de corrida em gel de

agarose.

3.1.2 Expressão da transretina em tecidos de *Sparus aurata*

i) Controlo

Os resultados obtidos por RT-PCR para a transretina foram avaliados através de electroforese em gel de agarose. O PCR 1 corresponde à utilização de cDNA sintetizado a partir de extractos de RNA de fígado (pistas 2 e 3), cérebro (pistas 4 e 5), rim (pistas 6 e 7), brânquias (pistas 8 e 9), intestino (pistas 10 e 11), coração (pistas 12 e 13) e músculo (pistas 14 e 15). Estes extractos dizem respeito aos peixes que foram injectados unicamente com a solução salina (testemunho)

Como resultado do RT-PCR 1 (figura 6), correspondente à utilização dos *primers* 3 e 4, homólogos à sequência da TTR, foi visível uma banda de tamanho esperado (270 bp) nas pistas correspondentes ao cérebro, brânquia e intestino, e uma banda maior (cerca de 300 bp) nas pistas correspondentes ao fígado e coração.

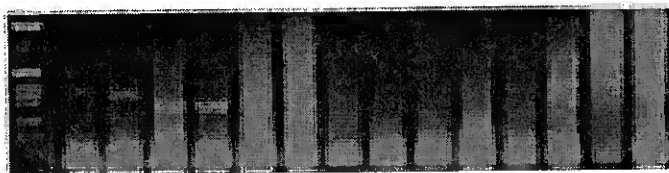


Figura 6 - Fotografia dos resultados do RT-PCR 1 avaliados por electroforese. Pistas: 1 marcador de peso molecular (1Kb GibcoBRL); 2-3 fígado; 4-5 cérebro; 6-7 rim; 8-9 brânquias; 10-11 intestino; 12-13 coração; 14-15 músculo.

Bandas do tamanho esperado surgiram nas pistas 4, 5, 8 e 10 e surgiram bandas um pouco maiores nas pistas 1, 2 e 12.

As bandas mais intensas de baixo tamanho são artefactos dos primers.

Uma vez que a expressão da TTR parece mais abundante (bandas mais intensas) no fígado e no cérebro, optou-se por observar a evolução da expressão ao fim de seis horas, doze horas e vinte e quatro horas.

ii) Estimulados com T₃ e T₄

Nas figuras 7 (a), (b) e (c) encontram-se os resultados do RT-PCR 2 realizados com cDNA sintetizado a partir de RNA de fígado de peixes tratados com T₃ e T₄, e que foram sacrificados, respectivamente, seis, doze e vinte e quatro horas após a injeção. Para este RT-PCR foram utilizados os *primers* 3 e 4, homólogos à sequência da TTR e verificou-se a existência de bandas com o tamanho esperado (≈ 270 bp) e também surgiram bandas com cerca de 350 bp.

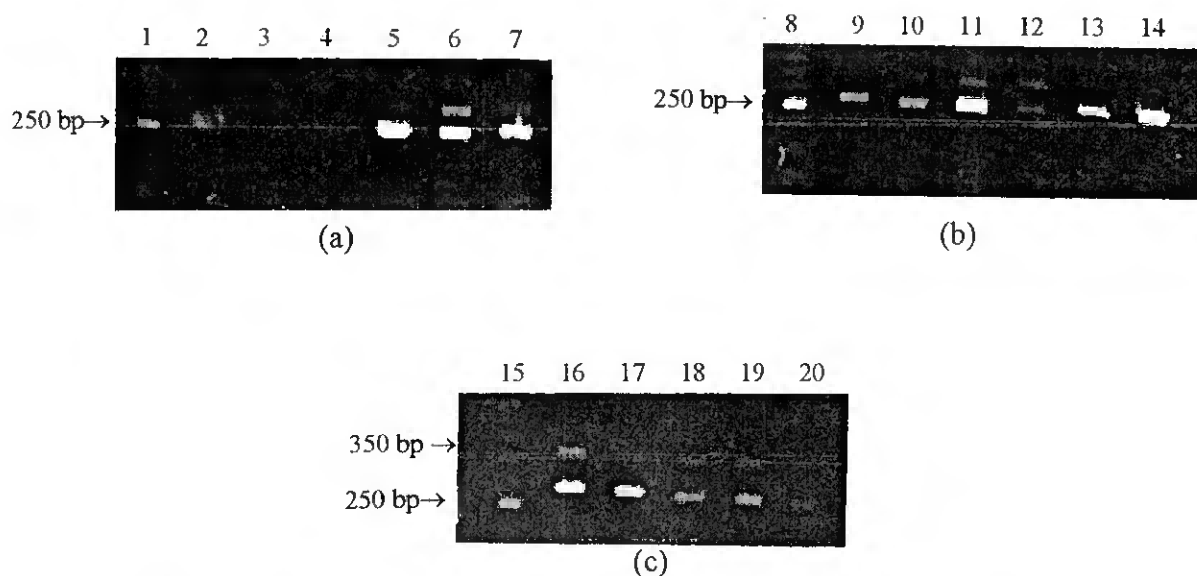


Figura 7 - Resultados do RT-PCR 2, onde foram usados cDNA de fígado.

(a) Expressão de TTR, 6 horas após injeção com T₃ (pistas 2-3), com T₄ (pistas 4-5) e solução salina (pistas 6-7).

(b) Expressão de TTR, 12 horas após injeção com T₃ (pistas 9-10), com T₄ (pistas 11-12) e solução salina (pistas 13-14).

(c) Expressão de TTR, 24 horas após injeção com T₃ (pistas 16-17), com T₄ (pistas 18-19) e solução salina (pista 20).

Nas pistas 1, 8 e 15 encontra-se o marcador de peso molecular 50 Base-Pair Ladder (Pharmacia Biotech). Foram observadas bandas com o tamanho esperado (≈ 270 bp) e bandas com cerca de 350bp.

Nas pistas correspondentes aos peixes injectados com T₃ (pistas 2-3, 9-10 e 16-17) verifica-se um aumento da intensidade das bandas à medida que o tempo decorre (mais

intensa após 24 horas). No que concerne ao tratamento com T_4 , verifica-se uma expressão inversa, isto é, diminui a intensidade das bandas à medida que aumenta a diferença entre o momento da injeção e o momento de recolha do fígado (24 horas).

Nas figuras 8 (a), (b) e (c) encontram-se os resultados do RT-PCR 3, onde foram utilizados os cDNA resultantes dos extractos de RNA de peixes injectados com T_3 e T_4 e cujos cérebro foram recolhidos seis, doze e vinte e quatro horas após a injeção. Foram usados os *primers* 3 e 4 e obtiveram-se bandas com o tamanho esperado (≈ 270 bp). Como resultado do tratamento com T_3 verifica-se que as bandas são muito ténues nas seis horas (pistas 2-3) e vinte e quatro horas (pistas 16-17) após a injeção. No entanto são muito intensas 12 horas após a injeção (pistas 9-10). Nos peixes tratados com T_4 , o padrão de aparecimento das bandas foi o mesmo, isto é, muito ténuas seis e vinte e quatro horas após a injeção (pistas 4-5 e 18-19, respectivamente) e bem visíveis 12 horas após o tratamento (pistas 11-12). É de referir ainda que, doze horas após o tratamento, a injeção com T_3 faz surgir bandas mais intensas que a injeção com T_4 . Apesar de não ter sido possível quantificar o cDNA, pode-se considerar que bandas mais intensas corresponderão a maior quantidade de matéria.

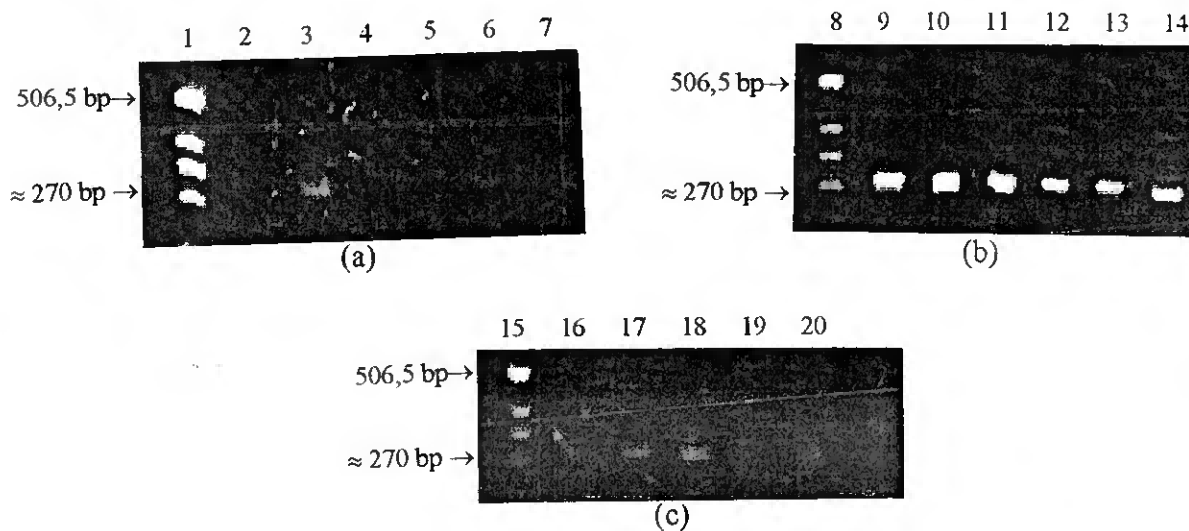


Figura 8 - Resultados do RT-PCR 3 onde foram usados cDNA de cérebro.

(a) Expressão de TTR, 6 horas após injeção com T_3 (pistas 2-3), com T_4 (pistas 4-5) e solução salina (pistas 6-7).

(b) Expressão de TTR, 12 horas após injeção com T_3 (pistas 9-10), com T_4 (pistas 11-12) e solução salina (pistas 13-14).

(c) Expressão de TTR, 24 horas após injeção com T_3 (pistas 16-17), com T_4 (pistas 18-19) e solução salina (pista 20).

Nas pistas 1, 8 e 15 encontra-se o marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder (GibcoBRL). Foram observadas bandas com o tamanho esperado (≈ 270 bp).

Na figura 9 comparam-se as bandas obtidas por RT-PCR onde foram utilizados cDNAs sintetizados a partir de RNA de fígado e cérebro de peixes tratados com T₃ e T₄. Em (a) podem-se visualizar as bandas nos tecidos removidos seis horas após o tratamento, em (b) doze horas e em (c) vinte e quatro horas.

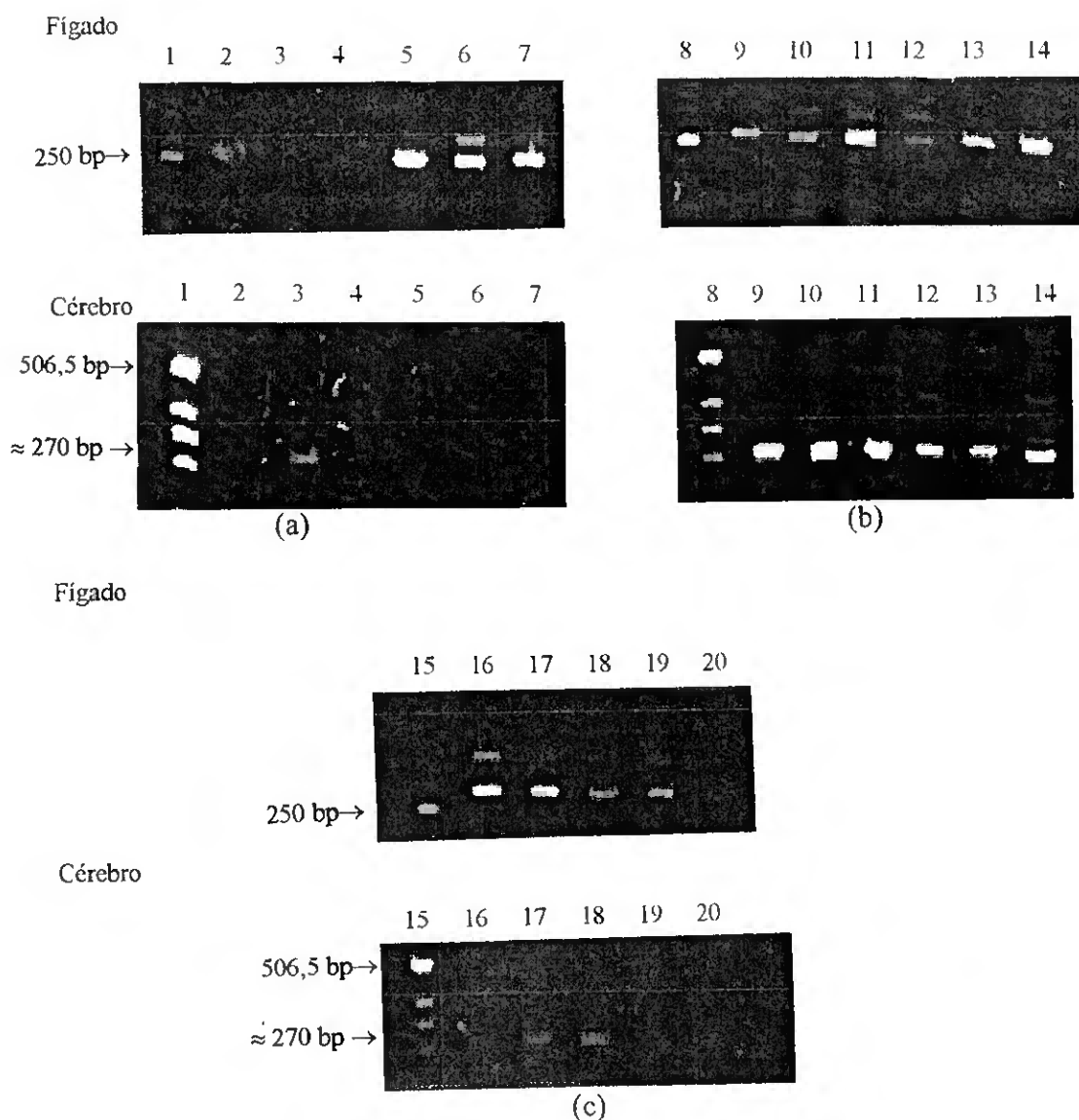


Figura 9 - Comparação da expressão de TTR em fígados e cérebro de peixes sujeitos a tratamento com T₃ e T₄.

(a) Expressão de TTR, 6 horas após injeção com T₃ (pistas 2-3), com T₄ (pistas 4-5) e solução salina (pistas 6-7).

(b) Expressão de TTR, 12 horas após injeção com T₃ (pistas 9-10), com T₄ (pistas 11-12) e solução salina (pistas 18-19).

(c) expressão de TTR, 24 horas após injeção com T₃ (pistas 16-17), com T₄ (pistas 18-19) e solução salina (pista 20).

Foram usados os marcadores de peso molecular 50 Base-Pair Ladder (Pharmacia Biotech) para os produtos de RT-PCR de sínteses efectuadas a partir de RNA de fígado e de 1Kb DNA Ladder (GibcoBRL) para cérebro.

Foram observadas bandas com o tamanho esperado (≈ 270 bp) e bandas com cerca de 350bp.

Da análise da figura 9a) podemos constatar que nos dois tecidos surgem bandas (pistas 2-3), seis horas após a injeção com T₃. Em relação aos tecidos removidos a peixes tratados T₄ (pistas 4-5), surgem diferenças verificando-se o aparecimento de bandas no fígado enquanto que no cérebro não é possível detectá-las.

Nos tecidos removidos doze horas após o tratamento (9b) surgem diferenças na intensidade das bandas quer após a injeção com T₃ quer com T₄ (pistas 9-10 e 11-12 respectivamente). Em ambas as situações, as bandas são mais intensas no cérebro que no fígado.

Vinte e quatro horas após o tratamento com T₃ e T₄ (9c) (pistas 16-17 e 18-19) surgem bandas com diferentes intensidades. A intensidade das bandas no fígado de peixes tratados com T₃ é maior do que no cérebro, com igual tratamento (pistas 16-17). O mesmo se verificando para os tecidos de peixes tratados com T₄ (pistas 18-19)

3.2 Confirmação da identidade dos produtos de PCR para transretina

A clonagem do produto de RT-PCR (fígado de peixe não tratado) foi bem sucedida e a sequenciação automática (Pharmacia Biotech) permitiu a identificação do produto do RT-PCR como fragmento do gene da TTR, após comparação com a sequência conhecida para este gene na dourada (Santos & Power, em publicação) (figura 10).

```
1  GTC TAC CCA TCA GCC AGC CAT GCT TCA ACC ACT GCA CTG CTG CTI  
   GTC TAC CCA TCA GCC AGC CAT GCT TCA ACC ACT GCA CTG TCT GCT  
  
46  CTA GCC TCC GCC GTG CTG CTC TGC AAC ACC GCC CCC ACC CCC ACG  
   CTA GCC TCC GCC GTG CTG      TGC AAC ACC GCC CCC ACC CCC ACG  
  
91  GAC AAA CAT GGA GGC TCA GAC ACC AGG TGT TCC TCT GAT GGT AAA  
   GAC AAA CAT GGA GGC TCA GAC ACC AGG TGT CCT CTG ATG GTA AAA  
  
136 AAT CCT GGA CGC AGT GAA AGG GAC TCC AGC CGG ATC IGT GGC ACT  
   AT CCT GGA CGC AGT GAA AGG GAC TCC AGC CGG ATC AGT GGC ACT  
  
181 CAA AGT GTC TCA GAA GAC CGC TGA TGG AGC GTG GAC ACA GAT TGC  
   CAA AGT GTC TCA GAA GAC CGC TGA TGG AGG GTG GAC ACA GAT TGC  
  
226 GAC CGG AGT GAC AGA TGC CAC TGG GGA GAT CCA CAA TCT GAT CAC  
   GAC CGG AGT GAC AGA TGC CAC TGG GGA GAT CCA CAA TCT GAT CAC  
  
271 AGA GGG CGT CAA ACA CCA CCA CCT CAC ACA TGG CTG GCT GAT GGG  
   AGA  
  
316 TAG ACA ATC ACT AGT
```

Figura 10 - Sequência do produto de PCR do gene da transretina em dourada. Na segunda linha encontra-se a zona correspondente deste gene, anteriormente clonado e sequenciado por Santos & Power (em publicação). As zonas sublinhadas correspondem a bases não coincidentes. A negrito estão assinalados os *primers* utilizados (*primers 1 e 2*).

3.3 Análise da transretina por Southern blot

Os produtos de RT-PCR foram transferidos de géis de agarose para membranas através do método de Southern blot. Estas membranas foram hibridizadas com sonda marcada com fósforo radioactivo (α - ^{32}P) e os resultados dessas hibridações foram analisadas através da exposição a filmes fotográficos durante 15 minutos.

Os dados obtidos por este processo são mais fiáveis uma vez que pequenas quantidades de DNA podem não ser detectáveis nos geis, mas a sua hibridização com sonda radioactiva de elevado grau de radioactividade, basta para confirmar a sua presença.

A figura 11 corresponde à hibridação da sonda de TTR com os produtos RT-PCR de cDNA sintetizado com RNA de cérebro, transferidos para a membrana de nitrocelulose.

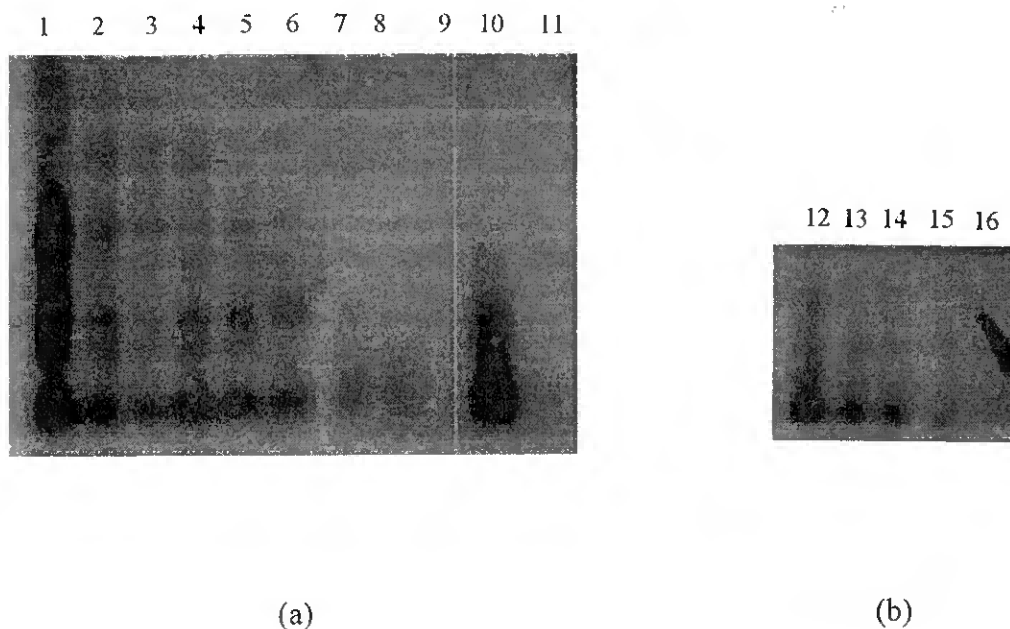


Figura 11 - Filme resultante da exposição da hibridação da membrana, com os produtos RT-PCR de cDNA sintetizado com RNA de cérebro, com a sonda para TTR. Verifica-se uma hibridação de intensidade variável com a banda esperada e com fragmentos maiores.

(a) Cérebros extraídos 6 horas (pistas 1-6) e 12 horas após o tratamento (7-11). As pistas 1-2 e 7-8 referem-se os injectados com T_3 ; as pistas 3-4 e 9-10 aos injectados com T_4 e as pistas 5-6 e 11 aos injectados com solução salina.

(b) Cérebros extraídos 24 horas após o tratamento (pistas 12-13 injectados com T_3 pistas 14-15 injectados com T_4 e pista 16 injectados com solução salina)

Apesar de nos géis dos produtos de RT-PCR as bandas só serem bem visíveis nos cérebros extraídos 12 horas após o tratamento, da leitura deste filme é possível referir que o DNA está presente em todos os momentos (seis, doze e vinte e quatro horas, injectados com T₃ e T₄). Verifica-se também a hibridação com fragmentos maiores.

Na figura 12 encontra-se o resultado da hibridação da sonda de TTR com os produtos de RT-PCR resultante da síntese de cDNA de RNA de fígado. Observa-se que houve hibridação com intensidade variável em todas as pistas.

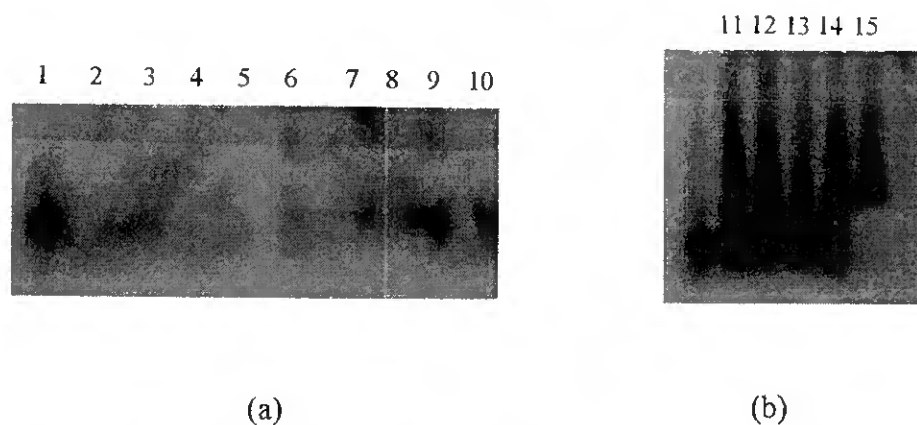


Figura 12 - Filme resultante da exposição da hibridação da membrana, com os produtos RT-PCR de cDNA sintetizado com RNA de fígado, com a sonda para TTR. Verifica-se uma hibridação de intensidade variável com a banda esperada.

(a) Fígados extraídos 6 horas e doze horas após o tratamento. As pistas 1-2 e 6-7 referem-se aos peixes injectados com T₃; as pistas 3-4 e 8-9 aos injectados com T₄, as pistas 5 e 10 aos injectados com solução salina.

(b) Fígados extraídos 24 horas após o tratamento (pistas 11-12 injectados com T₃, pistas 13-14 injectados com T₄ e pista 15 injectado com solução salina).

4. DISCUSSÃO

Com a realização deste trabalho verificou-se que a proteína transretina, contrariamente ao que se pensava (Dickson *et al.*, 1985; Duan *et al.*, 1991, 1995a; Schreiber & Richardson, 1997), existe em peixes. Richardson *et al.* (1994) realizou estudos semelhantes com *Salmo trutta*, *Oncorhynchus mykiss*, *Oncorhynchus tshawytscha* e *Cyprinus carpio*, mas não conseguiu detectar esta proteína. Por outro lado, Larsson *et al.* (1985) ao realizar estudos com *Salmo salar* detectou uma proteína com características semelhantes à transretina.

Identificada em vários vertebrados como por exemplo: mamíferos, aves, répteis, anfíbios, a proteína transretina tem sido sempre considerada como distribuidora das hormonas produzidas pela tiróide. Esta distribuição pode ser feita ao nível do sistema nervoso central, para a transretina sintetizada no choroid plexus, ou ao nível das restantes células no caso da transretina que se encontra na corrente sanguínea e que foi sintetizada no fígado ou em outros órgãos extra-hepáticos (Dickson *et al.*, 1985; Hollywell *et al.*, 1992; Schreiber *et al.*, 1995).

A razão pela qual a transretina, que se encontra na corrente sanguínea se liga à hormona tiroxina tem sido alvo de várias hipóteses. Segundo alguns autores (por exemplo Southwell *et al.*, 1992) esta ligação ocorre porque a tiroxina é uma hormona lipofílica e como tal tem forte tendência para fazer parte da fase lipídica da membrana das células, saindo assim da circulação e não podendo realizar a sua função primordial, fornecer iodo às células-alvo. Para Palha *et al.* (1994) a transretina circulante funcionará como um reservatório de tiroxina e como substância tampão, libertando tiroxina consoante as necessidades e evitando que um excesso de tiroxina invada os tecidos.

Existem estudos que evidenciam que a transretina não se liga exclusivamente às hormonas da tiróide mas também se liga à proteína que se liga ao retinol (RBP) que é o transportador específico da vitamina A (Blake & Oatley, 1997; Noy *et al.*, 1992; Schreiber & Richardson, 1997).

A proteína transretina, em *Sparus aurata*, é expressa em vários órgãos: fígado,

cérebro, brânquias, intestino e coração sendo a expressão mais intensa nos dois primeiros.

Das bandas detectadas por RT-PCR, as que apresentavam maior intensidade correspondiam à expressão no cérebro e no fígado. Se nos atermos ao facto de que se tratam de tecidos de peixe, os resultados obtidos parecem estar de acordo os vários estudos já efectuados (Dickson *et al.*, 1985; Harms *et al.*, 1991; Duan *et al.*, 1991; Southwell *et al.*, 1993; Richardson *et al.*, 1994; Duan *et al.*, 1995b; Schreiber *et al.*, 1995; Richardson *et al.*, 1996; Aldred *et al.*, 1997). Segundo estes estudos, o cérebro e o fígado são apontados como os locais onde esta proteína se expressa em maior quantidade.

Uma vez que os resultados preliminares apontavam o cérebro e o fígado como os órgãos de expressão, por excelência, da transretina, procedeu-se à montagem de uma experiência. Com esta experiência pretendeu-se analisar a influência das hormonas T₃ (tri-iodotironina) e T₄ (tiroxina) na expressão da transretina, ao longo do tempo.

Segundo a bibliografia (por exemplo Schreiber *et al.*, 1995; Richardson *et al.*, 1996) a hormona T₄ tem maior afinidade de ligação com a transretina (TTR) do que a T₃. No entanto esta liga-se mais facilmente aos receptores nucleares que a hormona T₄ o que torna a hormona T₄ mais abundante na corrente sanguínea que a T₃. Por outro lado, é referida a existência de hormonas tri-iodotironina (T₃) e tiroxina (T₄) na forma livre e ligadas a proteínas plasmáticas, nomeadamente a transretina (Southwell *et al.*, 1992; Leatherland, 1994). Provavelmente estes factos explicam as diferenças encontradas na intensidade de expressão da transretina nos tecidos dos peixes tratados com T₃ e com T₄.

No fígado, dos peixes injectados com T₃ (tri-iodotironina) a intensidade da expressão da transretina aumentava ao longo do tempo, o que sugere um estímulo gradual das células deste órgão. Quando se procedeu à injeção de T₃ na corrente sanguínea aumentou-se a concentração de hormona T₃ “livre” (não ligada a proteínas plasmáticas). Provavelmente o valor óptimo foi atingido sendo necessário proceder a um controlo, que se consegue aumentando a produção de uma proteína plasmática, a transretina com a qual é estabelecida uma ligação reversível com a hormona T₃. Deste modo a expressão da transretina aumentou.

Nos peixes injectados com T₄ (tiroxina) as células do fígado foram estimuladas de forma diferente, a intensidade de expressão da transretina diminuiu ao longo da experiência. Tendo a hormona T₄ maior afinidade de ligação à transretina que a T₃, o aumento dos níveis de T₄ no sangue, através da injeção da forma “livre”, permitiu que esta se ligasse a transretina existente na corrente sanguínea. No entanto os níveis do complexo T₄-TTR (transretina) podem ter atingido valores perto do limite, o que levou a que a restante T₄ fosse desiodada (Eales *et al.*, 1993; Manso *et al.*, 1986) transformando-se em T₃ “livre”. Desta forma, a expressão de transretina diminuiria ao longo do tempo.

A expressão da transretina no cérebro é independente do tipo de estímulo, isto é, a injeção com T₃ ou com T₄ produz o mesmo efeito. A intensidade de expressão da transretina é maior doze horas após o estímulo registando-se depois uma quebra o que sugere uma resposta mais rápida ao estímulo. Esta resposta poderá significar uma necessidade de transportar estas hormonas, o mais rapidamente possível ao cérebro sendo por isso aumentada a produção da transretina. Este aumento poderá também ser explicado por um lado, pela necessidade de impedir a entrada excessiva de tiroxina nos tecidos, com a sua subsequente degradação, isto é, transformação na forma biologicamente activa, a tri-iodotironina. Por outro lado estará relacionada com a difusão da tiroxina na corrente sanguínea, uma vez que esta hormona na forma livre tem grande afinidade com a fase lipídica das membranas celulares.

Subsequente, a rápida diminuição da expressão da TTR pode estar ligada ao retrocontrolo de transporte da hormona, isto é, atingido-se a concentração limite de transretina no sangue a sua produção deixa de ser estimulada, apesar do nível de hormona que transporta (neste caso a forma activa T₃) poder continuar alto.

O produto de RT-PCR, obtido a partir de cDNA de fígado de juvenil de *Sparus aurata* não tratado foi clonado e sequenciado com sucesso. Verificou-se, por comparação com a sequência conhecida para este gene na dourada (Santos & Power, em publicação), que correspondia a um fragmento do gene da transretina de dourada.

A sequência foi sujeita a alinhamentos múltiplos com todas as sequências da transretina, conhecidas para outras espécies. Como resultado destes alinhamentos,

verificou-se que a transretina de *Sparus aurata* apresenta baixa homologia com as outras espécies. Assim, a sequência da transretina de dourada é 47% homóloga com as sequências já determinadas para humanos (Mita *et al.*, 1984) e para ratinhos (Duan *et al.*, 1989). Em relação à sequência conhecida para galinhas a homologia é de 54% (Duan *et al.*, 1991) e de 49% para lagarto (Achen *et al.*, 1993).

Apesar da baixa homologia, resultante de provavelmente de mutações sobretudo à superfície da molécula (Schreiber & Richardson, 1997), as zonas correspondentes ao domínio funcional da proteína são altamente conservadas. A expressão, domínio funcional conservado, significa neste caso que a organização dos aminoácidos envolvidos na formação do canal central da transretina aos quais se ligam as hormonas T₃ e T₄, é uma constante entre as várias espécies estudadas (Blake & Oatley, 1977; Southwell *et al.*, 1992; Schreiber & Richardson, 1997).

Segundo Blake e Oatley (1977) o canal central da transretina é caracterizado, quimicamente, por três tipos de elementos: (1) hidrofílicos formados por hidroxilos, (2) hidrofóbicos formados por grupos metil e (3) grupo de resíduos.

Na transretina de *Sparus aurata* sequênciada encontram-se os elementos hidrofóbicos característicos Leu 17, Thr 106, Ala 108, Leu 110, Thr 119 e Val 121 e o grupo de resíduos onde se inclui Lys15, Glu 54 e His 56. Verifica-se, no entanto que o aminoácido Ser 117 está substituído por treonina.

Os aminoácidos envolvidos na ligação da transretina à proteína transportadora de retinol (RBP) (os aminoácidos 20, 21, 83-85, 99, 100 e 114) (Monaco *et al.*, 1995), também se encontram conservados na transretina de *Sparus aurata*.

A conservação dos locais de ligação da T₃, T₄ e RBP parece sugerir que a transretina nos peixes desempenha a mesma ou uma função semelhante à desempenhada nos vertebrados superiores, nomeadamente o transporte das hormonas produzidas pela tiróide e de forma indirecta, o transporte de retinol para os tecidos alvo.

Uma vez que a evolução dos vertebrados não pode ser investigada directamente, a

interpretação dos mecanismos de evolução da transretina só pode ser hipotética e especulativa (Schreiber & Richardson, 1997).

Segundo Duan *et al.* (1991) a forte conservação da estrutura e expressão do gene da transretina entre mamíferos e aves sugere a síntese desta proteína num ancestral comum, que viveu à mais de 300 milhões de anos – um réptil. Em termos evolutivos isto significará que a expressão da transretina ocorreu mais cedo no choroid plexus que no fígado (Aldred *et al.*, 1995; Duan *et al.* 1995a; Richardson *et al.*, 1994; 1996).

A constatação da existência de transretina, transportadora das hormonas produzidas pela tiróide, numa espécie piscícola *Sparus aurata* (Santos & Power, 1998) não está isenta de discussão uma vez que vem colocar em questão alguns conceitos anteriormente estabelecidos. Se por um lado se pode sugerir que a síntese da transretina já era efectuada no ancestral dos répteis, por outro pode-se considerar que a sua expressão ocorreu mais cedo no fígado que no cérebro (os peixes apresentam um choroid plexus muito pequeno).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A proteína transretina é expressa no fígado, cérebro, brânquias, intestino e coração do teleosteo *Sparus aurata*. No entanto a expressão é mais intensa nos dois primeiros, o que parece estar de acordo com estudos realizados em vários vertebrados.

Quando se estimula a expressão da transretina, através de injeção com as hormonas produzida pela tiróide (tri-iodotironina - T_3 e tiroxina - T_4) observa-se uma resposta diferenciada. No fígado, a injeção com T_3 leva a um aumento da expressão da transretina enquanto que com T_4 a expressão diminui. No cérebro, a expressão aumenta 12 horas após o estímulo, sendo menor 24 horas depois. Este comportamento verifica-se quer quando é estimulado com T_3 quer com T_4 , no entanto a expressão é mais intensa com T_3 . No entanto, quando se aplica a técnica do Southern blot aos produtos de PCR, verifica-se que existe expressão da transretina, com alguma intensidade, 6, 12 e 24 horas após os estímulos com T_3 e T_4 .

Comparando, ao longo do tempo a expressão da transretina nos dois órgãos estudados verifica-se que esta é mais intensa no cérebro 12 horas após o estímulo com T_3 e mais intensa no fígado 24 horas após o estímulo quer com T_3 quer com T_4 .

Estes resultados sugerem um controlo de expressão da transretina consoante o órgão em questão. Sendo o fígado um órgão bem desenvolvido nos peixes, este será provavelmente o local de expressão por excelência da transretina. Apesar da hormona T_3 ter uma baixa afinidade de ligação com a transretina, um aumento do nível desta hormona “livre” no plasma sanguíneo estimula a sua expressão, o que evita que a hormona se difunda na fase lípida das membranas celulares. Em presença de um aumento do nível da hormona T_4 , verifica-se que a expressão da transretina diminui 12 e 24 horas após o estímulo. Tendo a hormona T_4 maior afinidade de ligação com a transretina esta diminuição de expressão poderá ter resultado, por um lado de ligação com toda a transretina livre e com a transretina que estava ligada à T_3 mas que em presença da T_4 quebre essa ligação para se ligar a esta última hormona, por outro tendo-se atingido o ponto de saturação, a hormona T_4 em excesso foi transformada em T_3 .

Com os resultados deste trabalho, mais questões se levantaram. Seria interessante montar uma experiência semelhante, mas onde os órgãos fossem recolhidos com intervalos mais curtos. Este procedimento permitiria conhecer mais profundamente as variações diárias da expressão da transretina ao nível de todos os órgãos e não só do fígado e cérebro. Nos tecidos onde a expressão fosse significativa, deveriam ser feitos estudos usando a técnica da hibridação *in situ* afim de localizar as células envolvidas na produção da transretina. Seria também de se considerar um estudo que permitisse determinar o momento a partir do qual, é expressa a transretina em *Sparus aurata*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achen, M. G.; Duan, W.; Pettersson, T. M.; Harms, P. J.; Richardson, S.; Lawrence, M. C.; Wettenhall, R. E. H.; Aldred, A. R.; Schreiber, G.** (1993) Transthyretin gene expression in choroid plexus first evolved in reptiles. *Am. J. Physiol.* **265**: R982-R989
- Ahern, H.** (1991) Gene Cloning I: Making a Recombinant Plasmid *In: Introduction to Experimental Molecular Biology*, Kane, K. (ed.), Wm. C. Brown Publishers, NY, 27-39pp
- Aldred, A.R.; Brack, C.M.; Schreiber, G.** (1995) The Cerebral Expression of Plasma Protein Genes in Different Species, *Comparative Biochemistry & Physiology* **111B**(1): 1-15
- Aldred, A.R.; Prapunpoj, P; Schreiber, G.** (1997) Evolution of shorter and more hydrophilic transthyretin N-termini by stepwise conversion of exon 2 into intron 1 sequences (shifting the 3' splice site of intron 1), *Eur. J. Biochem* **246**: 401-409
- Andrews, A.** (1991) Electrophoresis of nucleic acids *In: Essential Molecular Biology I, A Practical Approach*, Brown, T. (ed), Oxford University Press, NY, 89-126pp
- Barnabé, G.** (1989) L'élevage du loup e de la daurade *In: Aquaculture* vol. II, Barnabé, G. (ed), 2ème Édition, Technique et Documentation Lavoisier, Paris, 675-720pp
- Bauchot, M.-L.** (1987) Poissons osseux *In: Fiches FAO d'identification des espèces pour les besoins de la pêche, (Revision I). Méditerranée et mer Noire. Zone de pêche 37.* Vol. II - Vertébrés, Fischer, W.; Bauchot, M.-L., Schneider, M. (eds), FAO, Rome, 1374-1375pp
- Bentley, P. J.** (1982) Comparative vertebrate endocrinology, 2^a Ed., Cambridge University Press, USA, 1-83pp
- Brown, T.** (1991) The essential techniques in molecular biology *In: Essential Molecular Biology I, A Practical Approach*, Brown, T. (ed), Oxford University Press, NY, 1-12pp
- Blake, C. C. F.; Oatley, S. J.** (1977) Protein-DNA and Protein-Hormone Interactions in Prealbumin: a Model of the Thyroid Hormone Nuclear Receptor?, *Nature*, **268**:115-120pp
- Calderer, A.; Cardona, L.** (1993) Cría Intensiva de la Dorada (*Sparus aurata*) y la Lubina (*Dicentrarchus Labrax*) *In: Acuicultura Marina: Fundamentos Biológicos Y Tecnología de La Producción*, Universitat de Barcelona (ed), Publicacions Universitat de Barcelona, Barcelona, 398-401pp

- Cavalieri, R. R.** (1997) Iodine Metabolism and Thyroid Physiology: Current Concepts, *Thyroid* 7(2): 177-181
- Chomczynski, P.; Sacchi, N.** (1987) Single-step method of RNA isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction, *Analytical Biochemistry*, **162**: 156-159
- Dallman, M.; Porter, A.** (1993) Semi-quantitative PCR for the analysis of gene expression *In: PCR, A Practical Approach*, McPherson, M.; Quirke, P.; Taylor, G. (eds), Oxford University Press, NY, 215-224pp
- Dickson, P.W.; Howlett, G.J.; Schreiber, G.** (1985) Rat Transthyretin (Prealbumin) Molecular Cloning, Nucleotide Sequence and Gene Expression in Liver and Brain, *The Journal of Biological Chemistry* **260**(13): 8214-8219
- Duan, W.; Cole, T.; Schreiber, G.** (1989) Cloning and nucleotid sequencing of transthy (prealbumin) cDNA from rat choroid plexus and liver. *Nucleic Acids Res.* **17**: 3979
- Duan, W.; Achen, M.G.; Richardson, S.J.; Lawrence, M.C.; Wettenhall, R.E.H.; 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**: 679-687
- Duan, W.; Richardson, S.J.; Babon, J.J.; Heyes, R.J.; Southwell, B.R.; Harms, P.J.; Wettenhall, R.E.H.; Dziegielewska, K.M.; Selwood, L.; Bradley, A.J.; Brack, C.M.; Schreiber, G.** (1995a) Evolution os Transthyretin in Marsupials, *Eur. J. Biochem.* **227**: 407-415
- Duan, W.; Richardson, S.J.; Köhrle, J.; Chang, L.; Southwell, B.R.; Harms, P.J.; Brack, C.M.; Pettersson T.M.; ; Schreiber, G.** (1995b) Binding of Thyroxine to Pig Transthyretin, its cDNA Structure, and other Properties, *Eur. J. Biochem.* **230**: 977-986
- Duke, J. B.** (1990) Hormonal Control *In: Animal Physiology: Adaptation and Environment*, Knut Schmidt-Nielsen (ed), 4^a Ed., Cambridge University Press, USA, 486-519pp
- Eales, J. G., MacLatchy, D. L.; Sweeting, R. M.** (1993) Thyroid Hormone Deiodinase Systems in Salmonids, and their Involvement in the Regulation of Thyroidal Status, *Fish Physiology and Biochemistry* **11**(1-6): 313-321
- Eidne, K.** (1991) The Polymerase Chain Reaction and its uses in endocrinology, *TEM*, **5**(2). 169-174.

Guerreiro, P. (1996) Ontogenia da expressão dos genes da hormona de crescimento e da prolactina em estados iniciais do desenvolvimento da dourada, *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758), relatório de estágio do curso de Licenciatura em Biologia Marinha e Pescas, Faro, 47p

Hardie, D. G. (1991) The First Messengers – Hormones, Neurotransmitters and Local Mediators *In: Biochemical messengers hormones, neurotransmitters and growth factors*, Chapman and Hall (eds), 21-43pp

Harms, P. J.; Tu, G.-F.; Richardson, S. J.; Aldred, A. R.; Schreiber, G. (1991) Transthyretin (prealbumin) Gene Expression in Choroid Plexus is Strongly Conserved During Evolution of Vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* **B 99**, 239-249

Holland, W. (1993) Cloning genes using the polymerase chain reaction *In: Essential Developmental Biology, A Practical Approach*, Stern, C. & Holland, P. (eds), Oxford University Press, NY, 243-255pp

Hollywell, C. A.; Jaworowski, A.; Thumwood, C.; Alcorn, D.; Ryan, G. B. (1992) Immunohistochemical Localization of Transthyretin in Glomerular Peripolar Cells of Newborn Sheep. *Cell Tissue Res.* **267**: 193-197

Koopman, P. (1993) Analysis of gene expression by reverse transcriptase -polymerase chain reaction *In: Essential Developmental Biology, A Practical Approach*, Stern, C. & Holland, P. (eds), Oxford University Press, NY, 233-242pp

Larsson, M.; Pettersson T.; Carlström, A (1985) Thyroid hormone binding in serum of 15 vertebrate species: isolation of thyroxine-binding-globulin and prealbumin analogs. *Gen. Comp. Endocrinol.* **58**:360-375

Leatherland, J. F. (1987) Thyroid Hormones and Reproduction *In: Hormones and Reproduction in Fishes, Amphibians, and Reptiles*, Norris, D. O. & Jones, R. E. (eds), Plenum Press, NY, 411-431pp.

Leatherland, J. F. (1994) Reflections on the thyroidology of fishes: from molecules to humankind, *In: Guelph Ichthyology Reviews*, **2**:11-21

Manso, C.; Freire, A.; Azevedo, M. (1986) Hormonas e Neurotransmissores *In: Introdução à Bioquímica Humana*, 3ª edição, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 433-518pp

Mita, S.; Maeda, S.; Shimada, K. Araki, S. (1984) Cloning and sequence analysis of cDNA for human prealbumin *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **124**: 558-594

- Monaco, H. L.; Rizzi, M.; Coda, A.** (1995) Structure of a Complex of Two Plasma Proteins: Transthyretin and Retinol-Binding Protein *Science* **268**: 1039-1041
- Muzavor, S.; Arruda, L. M., Andrade, J. P.** (1993) Roteiro Ecológico da Ria Formosa, vol II-Peixes, Algarve Em Foco Editora, Faro, 167p
- Noy, N.; Slosberg, E.; Scarlata, S.** (1992) Interactions of Retinol with Binding Proteins: Studies with Retinol-Binding Protein and with Transthyretin, *Biochemistry* **31**(45): 11118-11124
- Old, R; Primrose, S.** (1994) Principles of Gene Manipulation, an introduction to genetic engineering, 5th edition, Blacwell Science Ltd, UK, 407p
- Ong, D. E.; Davis, J. T.; O'Day, W. T.; Bok, D.** (1994) Synthesis and Secretion of Retinol-Binding Protein and Transthyretin by Cultured Retinal Pigment Epithelium, *Biochemistry* **33**: 1835-1842
- Orvay, F. C.** (1993) Biología de Los Teleosteos Más Interesantes en Piscicultura Marina *In: Acuicultura Marina: Fundamentos Biológicos Y Tecnología de La Producción*, Universitat de Barcelona (ed), Publicacions Universitat de Barcelona, Barcelona, 61-67pp
- Palha, J.A.; Episkopou, V.; Maeda, S.; Shimada, K.; Gottesman, M.E.; Saraiva, J.M.** (1994) Thyroid Hormone Metabolism in a Transthyretin-null Mouse Strain *The Journal of Biological Chemistry* **269**(52): 33135-33139
- Peters, P** (1993) Biotechnology, a guide to genetic engineering, Wm. C. Brown Communications, Inc, EUA, 253p
- Power, D. M.** (1997) Ontogeny of the Thyroid Gland in Sea Bream (*Sparus aurata*) Larvae *In: Third International Symposium on: Research for Aquaculture: Fundamental and Applied Aspects*, European Society for Comparative Physiology and Biochemistry 18th Annual Conference, University of Barcelona, Spain, 94p
- Purves, W.; Orians, G.; Heller, H.** (1995) Life, the science of biology, 4th edition, Sinauer Associates, Inc., EUA, 1195p
- Richardson, S.J.; Bradley, A.J.; Duan, W.; Wettenhall, R.E.H., Harms, P.J.; Babon, J.J.; Southwell, B.R.; Nicol, S.; Donnellan, S.C.; Schreiber, G.** (1994) Evolution of Marsupial and Other Vertebrate Thyroxine-Binding Plasma Proteins, *Am. J. Physiol.* **266** (Regulatory Integrative Comp. Physiol. **35**): R1359-R1370

- Richardson, S.J.; Wettenhall, R.E.H.; Schreiber, G.** (1996) Evolution of Transthyretin Gene Expression in the Liver of *Didelphis virginiana* and Other American Marsupials, *Endocrinology* **137**:3507-3512
- Robbins, J.; Lakshmanan** (1992) The Movement of Thyroid Hormones in the Central Nervous System, *AMA Jg. 19, Sonderheft* **1**:21-25
- Sambrook, J.; Fritsch, E.; Maniatis, T.** (1989) Molecular Cloning, a laboratory manual, 2nd edition, 3 vols, Cold Spring Harbor Laboratory Press, EUA.
- Santos, C. R. A.; Power, D.** (1998) Piscine (*Sparus aurata*) Transthyretin cDNA Cloning and Characterization *Annals of the New York Academy of Sciences* **839**: 607-609
- Schreiber, G.; Southwell, B.R.; Richardson, S.J.** (1995) Hormone delivery systems to the brain-transthyretin (mini-review) *Exp. Clin. Endocrinol* **103**:75-80
- Schreiber, G.; Richardson, S.J.** (1997) The Evolution of Gene Expression, Structure and Function of Transthyretin *Comp. Biochem. Physiol* **116B**(2): 137-160
- Smith, T. J.; Davis, F. B.; Deziel, M. R.; Davis, P. J.; Ramsden, D. B.; Schoenl, M.** (1994) Retinoic Acid Inhibition of Thyroxine Binding to Human Transthyretin, *Biochimica et Biophysica Acta* **1199**: 77-80
- Southwell B.R.; Tu, G. F.; Duan W.; Achen M.; Harms, P. J.; Aldred, A. R.; Richardson S. J.; Thomas, T.; Pettersson, T. M.; Schreiber G.** (1992) Cerebral Expression of Transthyretin: evolution, ontogeny and function *AMA Jg. 19 Sonderheft* **1**: 28-31
- Southwell B.R.; Duan W.; Alcorn D., Brack C. Richardson S. J.; Korle J.; Schreiber G.** (1993) Thyroxine transport to the brain: role of protein synthesis by the choroid plexus. *Endocrinology* **133**: 2116-2126
- Sundelin, J.; Melhus, H.; Das, S.; Eriksson, U.; Lind, P.; Trägårdh, L.; Peterson, P.A.; Rask, L.** (1985) The Primary Structure of Rabbit and Rat Prealbumin and a Comparison with the Tertiary Structure of Human Prealbumin, *The Journal of Biological Chemistry* **260**(10): 6481-6487
- Wakasugi, S.; Maeda, S.; Shimada, K.; Nakashima, H.; Migita, S.** (1985) Structural Comparisons Between Mouse and Human Prealbumin, *J. Biochem.* **98**: 1707-1714
- Weaver, R. F.; Hedrick, P. W.** (1992) Genetics, 2nd edition, Kane, K. (ed), Wm. C. Brown Publishers, EUA, 437-487pp

Wilkinson, M. (1991) Purification of RNA *In: Essential Molecular Biology 1, A Practical Approach*, Brown, T (ed), Oxford University Press, NY, 69-88pp

Zaki, M. (1984) Artificial Culture and Early Ontogeny of Gilthead, *Sparus aurata*, of the Mediterranean Sea, *J. Ichthyol.*, **24** (3): 56-63

ANEXO

ANEXO

Sequência do fragmento sequenciado do cDNA do gene da TTR em dourada (Santos & Power, em publicação). A sublinhado, os pares de *primers* 1-2 e 3-4 utilizados. A zona entre *primers* é de 335 bases e 350 bases, respectivamente.

Primers directos:

Primer 1 - 5' GTCTACCCATCAGCCAGCCAT 3'

Primer 3 - 5' CTCCAGCCGGATCAGTGGCA 3'

Primers reversos:

Primer 2 - 5' GGGCGTCAAACACCACCTCAG 3'

Primer 4 - 5' GCGGTGGTGGTGTAGGAGAACG 3'

1 GTCTACCCAT CAGCCAGCCA TGCTTCAACC ACTGCACTGT CTGCTTCTAG
Primer 1

51 CCTCCGCCGT GCTGTGCAAC ACCGCCCCCA CCCCACGGA CAAACATGGA

101 GGCTCAGACA CCAGGTGTCC TCTGATGGTA AAAATCCTGG ACGTGAAAGG

151 GACTCCAGCC GGATCAGTGG CACTCAAAGT GTCTCAGAAG ACCGCTGATG
Primer 3

201 GAGGGTGGAC ACAGATTGCG ACCGGAGTGA CAGATGCCAC TGGGGAGATC

251 CACAATCTGA TCACAGAGCA GCAGTTCCCA GCAGGAGTGT ATCGTGTTGA

301 GTTTGACACC AAAGCTTACT GGACGAATCA GGGCAGCACG CCGTTCCATG

351 AAGTAGCTGA GGTGGTGT GACGCCCATC CTGAAGGCCA TGGTCACTAC
Primer 2

401 ACCTTGGCTC TGCTGCTCAG TCCGTTCTCC TACACCACCA CCGC
Primer 4

