

**Universidade de Lisboa**

Faculdade de Ciências

Departamento de Química e Bioquímica



**ESTUDO DO PAPEL NEUROPROTECTOR DA  
INSULINA A AGRESSÕES CELULARES:  
AMILÓIDES, OXIDATIVAS E DE MEMBRANA**

Ana Margarida Santos do Nascimento

Mestrado em Bioquímica geral

2009

**Universidade de Lisboa**

Faculdade de Ciências

Departamento de Química e Bioquímica



**ESTUDO DO PAPEL NEUROPROTECTOR DA  
INSULINA A AGRESSÕES CELULARES:  
AMILÓIDES, OXIDATIVAS E DE MEMBRANA**

Ana Margarida Santos do Nascimento

Dissertação orientada por:

Doutor Pedro A. Lima

Mestrado em Bioquímica geral

2009

## **Agradecimentos**

Primeiramente gostaria de agradecer ao Doutor Pedro Afonso Lima, pela oportunidade de fazer este projecto.

Um obrigado ao Gonçalo Costa e ao Prof. Doutor Carlos Cordeiro por terem fornecido os amilóide TTR's.

Agradeço também aos meus colegas de laboratório pelos disparates, cooperação e smoke breaks.

Às minhas colegas e amigas Catarina e Joana um obrigado especial, sem elas isto teria sido bem menos divertido.

Agradeço à Professora Doutora Margarida Meireles, que acompanhou os meus passos nesta faculdade e que sempre me apoiou.

Não posso deixar de expressar a minha gratidão aos meus colegas e amigos Pedro Rafael, Carlinha e Pedro Neves, sem vocês muita coisa teria sido diferente e confusa neste mestrado! Com toda a certeza teria demorado mais tempo a chegar até aqui!

Um obrigado especial a todos os meus amigos que sem querer tropeçaram na minha vida e a tornaram formidável. Em especial à Inês Barbosa, Viseu e Frank que são as minhas pessoas preferidas no mundo inteiro.

E por fim, para além de agradecer quero dedicar este trabalho aos meus pais e madrinha, que me amam incondicionalmente e a quem devo tudo!

# Índice

Agradecimentos.....	III
Resumo.....	VII
Abstract.....	IX
Nomenclatura: símbolos e abreviaturas.....	XI
I. INTRODUÇÃO TEÓRICA.....	1
1.1 Doença de Alzheimer.....	1
1.2. Insulina.....	3
1.2.1 Activação do receptor da insulina - transdução do sinal .....	5
1.2.2 Insulina como neuroprotector.....	6
1.2.3 Insulina no sistema nervoso.....	6
1.2.4 Insulina como modeladora da neuroexcitabilidade .....	8
1.3 Agressores .....	9
1.3.1 Agressores celulares não amilóides.....	9
1.3.1.1 Peróxido de hidrogénio.....	9
1.3.1.2 DMSO .....	11
1.3.2 Agressores celulares amilóides.....	12
1.3.2.1 Beta amilóide .....	12
1.3.2.2 Trantirretina.....	17
1.4. Cultura de células .....	19
1.4.1 Células de neuroblastoma N1E-115.....	20
Objectivos .....	21

II. MATERIAIS E MÉTODOS .....	22
2.1 Cultura de células .....	22
2.1.1 Meios e procedimentos gerais de cultura de células.....	22
2.1.2 Crio-preservação de células.....	24
2.2 Determinação da citotoxicidade.....	25
2.3 Efeito da insulina <i>per si</i> nas taxas de sobrevivência controlo vs período de incubação ao longo do tempo .....	26
2.4 Efeito neuroprotector da insulina e Way-123,398-A-5 (WAY) perante exposições a agressores (não amilóides e amilóides) .....	27
2.5 Relação da insulina com o cálcio citoplasmático .....	28
2.6 Relação dos agressores (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e TTRs) com o cálcio citoplasmático .....	29
2.7 Análise de dados .....	30
III. RESULTADOS .....	31
3.1 Efeito da insulina <i>per si</i> nas taxas de sobrevivência controlo vs período de incubação ao longo do tempo .....	31
3.2 Relação da insulina com o cálcio citoplasmático.....	34
3.3 Efeito neuroprotector da insulina e Way-123,398-A-5 (WAY) perante exposições a agressores .....	35
3.3.1 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	35
3.3.1.1 Tratamento com insulina.....	35
3.3.1.2 Tratamento com WAY .....	38
3.3.1.3 Relação de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> com o cálcio citoplasmático .....	39
3.3.2 DMSO.....	41

3.3.2.1 Tratamento com insulina.....	41
3.3.2.2 Tratamento com WAY.....	42
3.3.3 $\beta$ -amilóide.....	43
3.3.3.1 Tratamento com insulina .....	43
3.3.3.2 Tratamento com WAY.....	44
3.3.4 TTRs .....	46
3.3.4.1 Tratamento com insulina .....	46
3.3.4.2 Tratamento com WAY.....	48
3.3.4.3 Relação de TTRs com o cálcio citoplasmático.....	49
 IV. DISCUSSÃO DE RESULTADOS .....	 51
4.1 Efeito da insulina <i>per si</i> nas taxas de sobrevivência controlo vs período de incubação ao longo do tempo .....	51
4.2 Efeito neuroprotector da insulina em neuroblastomas na presença de agressores ...	52
4.3 Mecanismo da neuroprotecção da insulina .....	54
 V. CONCLUSÕES .....	 56
 VI. PERSPECTIVAS FUTURAS .....	 57
 VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	 58

## Resumo

Existem evidências recentes, mas em número crescente, que apontam para uma relação entre a doença de Alzheimer e a diabetes. A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa em que as conhecidas perdas nas faculdades cognitivas são, em grande parte, devidas a uma considerável taxa de morte neuronal. O peptídeo beta-amilóide ( $\beta$ A) é apontado como um agente importante no contexto da neurotoxicidade associada com DA. Outros agentes considerados relevantes nesta doença são o peróxido de hidrogénio, que promove stress oxidativo em neurónios e a transtirretina (TTR), uma vez que é conhecido o seu papel como transportadora de  $\beta$ A e, se mutada, pode provocar morte neuronal. Já a insulina é apontada como potencial agente neuroprotector constituindo uma oportunidade terapêutica para a DA. Apesar de haver ainda pouca informação sobre a função da insulina no cérebro, sabe-se que modula a actividade neuronal e consequentemente as funções cognitivas. Nomeadamente, eventos de plasticidade sináptica como LTP (*Long Term Potentiation*), o paradigma experimental da memória, podem ser modulados pela insulina. Contudo o processo facilitador da insulina no LTP e na memória não é entendido, assim como muitos dos mecanismos consequentes à activação dos receptores de insulina expressos em regiões específicas do cérebro como o hipocampo. No entanto, foi revelado por este laboratório um papel inibitório da insulina em correntes neuronais de potássio que, aumentando a neuroexcitabilidade, pode facilitar a indução de LTP.

Este trabalho procurou aprofundar o conhecimento sobre as faculdades neuroprotectoras da insulina, estudando o plausível papel neuroprotector desta em relação a agressores associados à DA. Em células de neuroblastoma N1E-115, averiguou-se se a neuroprotecção pela insulina se processa através da mesma via recrutada na modulação nos canais de potássio ou se recruta uma via independente. Para tal elaboraram-se ensaios de viabilidade celular (MTT) com insulina e com Way-123,398-A-5 (WAY), bloqueador específico dos canais tipo ERG, responsáveis pela corrente de  $K^+$  sensível à insulina nas células N1E-115 (Lima et al., 2008). Assim, na presença de insulina ou WAY, adicionaram-se os agressores em estudo. Efectuaram-se também ensaios de fluorescência, marcando as células com o indicador sensível ao cálcio ( $Ca^{2+}$ ) Fluo-3AM, afim de se estudar a dinâmica do  $Ca^{2+}$  face à insulina e também, face à exposição com  $H_2O_2$  e TTRs.

Os decréscimos na viabilidade celular induzidos por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Aβ<sub>1-42</sub>, e TTR 55' foram claramente atenuados pela insulina mas inalterados com o WAY. Tais resultados demonstram que a neuroprotecção inferida pela insulina não recruta a mesma via que é mobilizada na modulação dos canais ERG.

O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e TTR55' evocaram um aumento persistente no Ca<sup>2+</sup> citosólico, consistente com o efeito neurotóxico, ao passo que a insulina evocou um aumento transitório, coerente com o seu efeito neuroprotector. A insulina não contrariou a mortalidade induzida pelo DMSO e os resultados com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mostraram que existe um efeito neuroprotector por parte da insulina e que esse efeito é tanto maior quanto mais intensa for a agressão. Tais resultados sugerem que a neuroprotecção da insulina é eficaz em situações de stress oxidativo mas não em casos em que a integridade da membrana é comprometida.

A TTR *wt* aumentou a sobrevivência celular ao passo que a TTR 55' a reduz; consistente com tais factos, a TTR *wt* induz um aumento breve, e pequeno no Ca<sup>2+</sup> citoplasmático contrastando com uma elevação considerável, lenta e persistente nos níveis de Ca<sup>2+</sup> causada pela TTR 55'.

O presente trabalho mostra que a activação do receptor da insulina leva a uma neuroprotecção não recorrendo à via de modulação da neuroexcitabilidade, segundo um fenómeno associado a alterações na dinâmica de Ca<sup>2+</sup> mas discute o envolvimento de outra via independente do Ca<sup>2+</sup>.

### **Palavras-chave:**

Insulina, neuroprotecção, cálcio, amilóides, canais de potássio

## **Abstract**

Recent research has revealed a relationship between Alzheimer's disease (AD) and diabetes. AD is a neurodegenerative disease characterised by cognition losses, mainly due to neuronal death. The  $\beta$ -amyloid peptide ( $A\beta$ ) is a major protagonist in the neurotoxicity associated with AD. Other relevant 'players' in the AD context are the hydrogen peroxide, which promotes oxidative stress and transthyretin (TTR), which is able to act as an  $A\beta$  carrier and, when mutated, to promote cell death. On the other hand, insulin is described as a neuroprotective agent. Although information about brain insulin is still scarce, it is known that insulin modulates neuronal activity. In particular, events of synaptic plasticity such as LTP (long-term- potentiation), the experimental paradigm for memory and learning, can be facilitated by insulin. Such facilitation is not yet understood. In our laboratory, an inhibitory role of insulin on neuronal potassium currents was revealed (Lima et al., 2008). It was postulated that the consequent increase in neuroexcitability may facilitate the induction of LTP.

The present study aims to deepen the knowledge about the insulin neuroprotection to AD related insults. In differentiated neuroblastoma cells N1E-115, addressed the question whether the neuroprotection by insulin occurs through the same cell-pathway as the one recruited for the modulation of potassium channels. To do so, cell viability tests (MTT) were used, using insulin and Way-123,398-A-5 (WAY), a specific blocker of ERG-type channels which underlies the insulin sensitive  $K^+$  current in N1E-115 cells (Lima et al., 2008). In the presence of insulin or WAY, the AD related insults were applied and the results compared. Fluorescence recordings from cells loaded with the  $Ca^{2+}$  sensitive indicator Fluo-3 AM were conducted to study if  $Ca^{2+}$  dynamics is altered by insulin as well as by  $H_2O_2$  or TTRs.

The disclosed decreases in cell viability induced by  $H_2O_2$ ,  $A\beta_{1-42}$  and TTR 55' were attenuated by insulin treatment but unchanged by WAY. These results demonstrate that the neuroprotection induced by insulin does not recruit the same pathway as the one utilised by the modulation of ERG channels.

Application of  $H_2O_2$  and TTR 55' evoked a persistent increase in  $Ca^{2+}$ , consistent with the neurotoxic effect, while insulin evoked a transient  $Ca^{2+}$  increase, consistent with its neuroprotective effect. Insulin did not reverse the cell-death induced by DMSO, but instead showed an neuroprotective effect against  $H_2O_2$ . This suggested that the

neuroprotection by insulin is effective in situations of oxidative stress but not in cases where membrane integrity is compromised.

TTR-*wt* increased cell survival while TTR 55' reduce it. These observations are concordant with the recordings showing that TTR *wt* evokes a small and transient increase in  $Ca^{2+}$ , whereas, a larger and sustained  $Ca^{2+}$  elevation is induced by TTR 55'. The present work shows that activation of the insulin receptor leading to neuroprotection does not recruit the same cell-pathway as the one leading to the modulation of neuroexcitability. It is a phenomenon associated with changes in  $Ca^{2+}$  dynamics but the involvement of another pathway independent of  $Ca^{2+}$  is discussed.

**Key words:**

Insulin, neuroprotection, calcium, amyloids, potassium channels

## Nomenclatura: símbolos e abreviaturas

%	percentagem
abeta	beta amilóide
Ca <sup>2+</sup>	iões cálcio
CaCl <sub>2</sub>	cloreto de cálcio
Céls.	Células
cm <sup>2</sup>	centímetros quadrados
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono
DA	doença de Alzheimer
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Médium</i>
DMSO	dimetilsulfóxido
EGTA	<i>Ethylene Glycol-bis (<math>\beta</math>-aminoethyl ether) N,N,N,N'- Tetraacetic Acid</i>
ERG	Canal de potássio <i>ether-a-gogo-related</i>
FBS	soro fetal de bovino ( <i>Fetal Bovine Serum</i> )
Fluo-3AM	Fluo-3-acetoximetil Ester
GST	Glutathione S-transferase
h	horas
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrogénio
HEPES	<i>N-[2-HydroxyEthyl]Piperazine-N'-[2-EthaneSulfonic acid]</i>
ins	insulina
InsR	receptor de insulina
IRS	subtrato do receptor de insulina
K <sup>+</sup>	iões de potássio
K <sub>ATP</sub>	canais de potássio sensíveis a ATP
KCl	cloreto de potássio
LTD	<i>long term depression</i>
LTP	<i>long term potentiation</i>
MAPK	<i>phosphoinositide 3-kinase</i>
mg	miligrama
MgCl <sub>2</sub>	cloreto de magnésio
mL	mililitros
mM	milimolar

MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)- 2,5 difenilbrometo de tetrazolina
n	número de amostras
Na <sup>+</sup>	íons de sódio
NaCl	cloreto de sódio
NADH	enzima quinona oxidurreductase
NADPH	<i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase</i>
NaOH	hidróxido de sódio
nm	nanómetro (10 <sup>-9</sup> metros)
n°	número
°C	graus Célsius
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
pH	simétrico do logaritmo decimal da concentração hidrogeniônica molar
PI 3-kinase	<i>phosphoinositide 3-kinase</i>
PI3K	<i>phosphoinositide 3-kinase</i>
PKB-akt	<i>protein kinase B</i>
S.E.M.	erro padrão à média ( <i>standard error to the mean</i> )
TK	tirosina cinase
TTR	transtirretina
WAY	Way-123,398-A-5
x	vezes
βA	beta amilóide
Aβ <sub>1-42</sub>	beta amilóide (sequência com 42 aminoácidos)
μL	microlitros (10 <sup>-6</sup> litros)
μM	micromolar

## I. INTRODUÇÃO TEÓRICA

A insulina possui um papel relevante em diversas funções cerebrais, incluindo a memória. A síndrome de resistência à insulina, caracterizada por valores crónicos elevados de insulina e redução do nível de insulina no cérebro, é normalmente associada à doença de Alzheimer (DA) (Zhao *et al.*, 1999; Craft e Watson, 2004; Holscher e Li, 2008). Por exemplo, pacientes com DA apresentam alterações na fisiologia da insulina cerebral, e, uma desregulação da homeostase da insulina, está directamente envolvida com o início de DA (Craft e Watson, 2004; Gasparini e Xu, 2003). Com o progresso da DA, agentes agressores começam a provocar danos e conseqüentemente morte neuronal, como por exemplo agregações de  $\beta$ -amilóide (Reichman, 2003) e formas mutadas de transtirretina (Hou *et al.*, 2007). No entanto, acredita-se que a insulina tem propriedades neuroprotectoras (Venter *et al.*, 2001; Holscher e Li, 2008) que poderão vir a ser úteis no desenvolvimento de estratégias combativas na DA.

### 1.1 Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) é uma desordem neurodegenerativa progressiva, clinicamente caracterizada pela perda de memória e por deficiências progressivas noutros domínios da cognição, e que provoca alterações comportamentais (apatia, agitação, psicose) e restrições nas actividades quotidianas (Reichman, 2003). Esta doença, que apresenta uma maior taxa de incidência com o envelhecimento, constitui a forma mais comum de demência, estimando-se que existam actualmente cerca de 26.6 milhões de pessoas no mundo com DA, segundo a Organização Mundial de Saúde (Brookmeyer *et al.*, 1998). Com o aumento da esperança média de vida e caso não surjam novas terapias preventivas ou neuroprotectoras, calcula-se que o número de pessoas com DA deverá duplicar até 2025.

Embora a causa primária da DA seja ainda especulativa, existem três marcos neuropatológicos consistentes desta doença verificados em cérebros *postmortem*: placas extracelulares ricas em  $\beta$ -amilóide (A $\beta$ ) (Reichman, 2003), tranças neurofibrilares intracelulares formadas maioritariamente por formas hiperfosforiladas da proteína tau (Goedert *et al.*, 1991), e degeneração neuronal. A perda de memória a curto prazo,

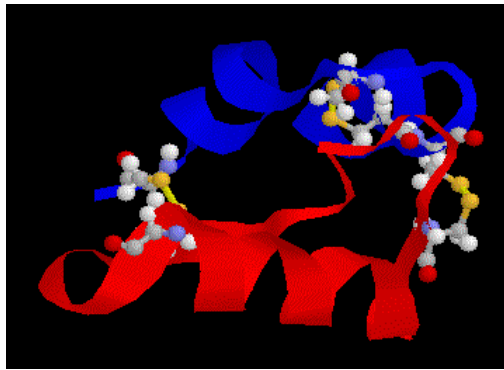
geralmente o primeiro sintoma da doença, reflecte uma ruptura da comunicação entre o hipocampo e o córtex *entorhinal*, regiões adjacentes do cérebro que se pensa serem necessárias para a formação inicial da memória (Probst *et al.*, 1991). Com a progressão da DA, a comunicação neuronal, nas áreas neocorticais necessárias para a função cognitiva e armazenamento da memória a longo prazo, é também afectada (Reichman, 2003). Num estado terminal de Alzheimer, o doente acaba por perder toda a sua capacidade de mobilidade e comunicação, assim como a sua massa muscular, pois a degeneração é de tal ordem que são totalmente dependentes de outro alguém para sobreviver (Probst *et al.*, 1991), perdendo a sua dignidade enquanto seres humanos. Por fim, os pacientes morrem, normalmente não por causa da doença, mas por factores externo (por exemplo pneumonia) devido à debilidade do seu organismo.

Por tudo isto, é imperativo o desenvolvimento de estratégias de combate a esta doença.

Acredita-se que a insulina possa ser a chave no combate a esta doença, uma vez que a insulina cerebral assume funções fisiológicas, entre elas sabe-se que modula a actividade neuronal e conseqüentemente as funções cognitivas afectadas na DA. Sabe-se ainda que eventos de plasticidade sináptica, como por exemplo LTP (*long term potentiation*), o paradigma experimental da memória, podem ser modulados pela insulina (Zhao *et al.*, 1999; Craft *et al.*, 2004). Para além disso e como anteriormente referido, estados de agregação de  $\beta$ -amilóide, observadas sob forma de placas senis são características na DA. Dados recentes indicam que a via neuronal da insulina é um possível alvo destes estados de agregação (Gasparini *et al.*, 2003), uma vez que a insulina afecta o metabolismo de  $\beta$ -amilóide (Selkoe, 1991). De facto, o enzima degradador de insulina, que é controlado pela insulina, tem sido reportado como o agente desagregador maioritário de  $\beta$ -amilóide extracelular (Gasparini *et al.*, 2003). Também as formas solúveis de  $\beta$ -amilóide, que como tem vindo a ser mostrado, são as formas mais tóxicas aos neurónios, induzem uma deficiência nos receptores de insulina no cérebro (Zhao *et al.*, 2008). Todos estes factos reportados podem explicar o facto de os pacientes de DA apresentarem uma perturbação na homeostase de insulina cerebral.

## **1.2. Insulina**

A insulina é uma pequena hormona polipeptídica constituída por duas cadeias: a cadeia A composta por 21 resíduos de aminoácidos e a cadeia B composta por 30 resíduos de aminoácidos, unidas entre si por duas pontes dissulfureto que permitem a conexão dos aminoácidos A7 e B7, A20 e B19. Existe ainda uma terceira ponte de dissulfureto na cadeia A que liga os resíduos A6 e A11 (Bell *et al.*, 1980). A conformação estrutural desta hormona é dominada por secções de hélices  $\alpha$  (Figura 1). Ao todo a molécula activa de insulina tem 51 resíduos de aminoácidos, o que se traduz num peso molecular de 5808 Da e uma grande estabilidade estrutural (Chang *et al.*, 1997).



**Figura 1.** Estrutura secundária da insulina com representação atómica das pontes dissulfureto

As moléculas de insulina têm tendência para formar monómeros, mas em solução a formação de dímeros é privilegiada devido a ligações por pontes de hidrogénio. No entanto, quando em presença de iões de zinco os dímeros associam-se em hexâmeros devido a interações entre as superfícies hidrófobas (Dunn, 2005). Sabe-se que os hexâmeros são a forma preferencial no armazenamento da insulina nas células beta e na sua secreção para a corrente sanguínea (Huang e Arvant, 1994). Contudo a forma activa é aparentemente a unidade única (monómeros). Este fenómeno pode ser explicado devido ao facto de os monómeros e os dímeros se difundirem no sangue muito rapidamente, enquanto os hexâmeros se difundem muito lentamente, dando à insulina um efeito progressivo e prolongado (Dunn, 2005). Tais conhecimentos estimularam o desenvolvimento de vários análogos recombinantes de insulinas comerciais, sendo a forma mais comum encontrada no mercado a forma de hexâmeros combinados com iões de zinco.



1986) (processo de quebra de proteínas dos músculos). A acrescentar às demais funções já descritas, há participação da insulina na activação de cascatas celulares e na facilitação sináptica (Craft e Watson, 2004).

### 1.2.1 Activação do receptor da insulina – transdução do sinal

A insulina circula rapidamente, de modo a alcançar os seus órgãos alvo (fígado, músculos, tecido adiposo e cérebro), onde interage com o seu receptor, de forma a desempenhar as funções anteriormente referidas. O InsR (receptor de insulina) pertence à família de receptores de superfície celular. O InsR é composto por duas subunidades  $\alpha$  extracelulares e duas subunidades  $\beta$  transmembranares com ligações dissulfureto. Quando uma molécula de insulina interage com o seu receptor, liga-se primeiramente à subunidade  $\alpha$  e promove autofosforilação nas subunidades  $\beta$  (Marchant-Brustel *et al.*, 2003). Cada subunidade  $\alpha$  do monómero  $\alpha\beta$  tem uma massa molecular de 135kDa e apresenta-se como inteiramente extracelular, contendo o sítio de ligação da insulina. Por sua vez, cada subunidade  $\beta$ , tem 95kDa e é uma proteína transmembranar, contendo, portanto, uma porção extracelular, um domínio transmembranar e uma parte citosólica, que inclui o domínio tirosina cinase (TK), envolvido na sinalização intracelular (White & Kahn 1994).

A ligação da insulina leva à rápida autofosforilação do receptor, seguida pela fosforilação da tirosina do substrato receptor de insulina (IRS), que induz a activação *downstream* de vias celulares (Marchant-Brustel *et al.*, 2003).

Os eventos de sinalização intracelular do receptor de insulina são, em primeira instância, mediados pela família dos substratos do receptor de insulina (IRS, substrato do receptor de insulina), tal como a proteína IRS-1 com 20-22 potenciais locais de fosforilação de tirosina que se ligam, *downstream*, aos domínios SH2 de várias proteínas efectoras (White e Kahn 1994) como, por exemplo, PI3K (fosfatidinositol 3 cinase), PKB (proteína cinase B) e MAPK (proteínas cinase activada por mitogénios) (Marchant-Brustel *et al.*, 2003)..

A interacção de IRS-1 com PI 3-Kinase (PI3K) conduz, directamente, a uma via de sinalização de insulina envolvida no aumento de transporte celular de glucose, através da translocação de proteínas GLUT 4 de um *pool* intracelular para a membrana

plasmática (Kahn & White 1988; Cheatham *et al.* 1994; Saltiel e Kahn, 2001) e, indirectamente, via sinalização IP3K-PKB, a um aumento da actividade enzimática do glicogénio sintase (Dent *et al.* 1990), entre outros efeitos metabólicos, tais como lipogénese, lipólise e síntese proteica.

Os efeitos da insulina dependentes da via de sinalização MAPK (*phosphoinositide 3-kinase*), incluem síntese de DNA, divisão e diferenciação celulares estando portanto ligado à função de promoção de crescimento (Saltiel e Kahn, 2001).

A via PKB-akt (*protein kinase B*) está envolvida no controlo da tradução e mais recentemente pensa-se estar envolvida na neuroprotecção (Bayascas, 2008).

### 1.2.2 Insulina como neuroprotector

A insulina tem propriedades neuroprotectoras bem documentadas (Venters *et al.*, 2001). Fomenta a neurogénese (Åberg, 2000), a formação de sinapses e potencia a utilização eficaz de glucose pelo cérebro (Trejo *et al.*, 2001). Para além disso, sabe-se que a insulina, protege neurónios dos agregados de  $\beta$ -amilóide característicos na DA (Klein *et al.*, 2008; L Alkon *et al.*, 2008) e do stress oxidativo por eles causado (Moreira *et al.*, 2004; Duarte *et al.*, 2008). Contudo, o mecanismo pelo qual a insulina efectua essa protecção não está bem esclarecido. No entanto, pensa-se que a via PKB-akt desencadeada pela insulina é a via de neuroprotecção que esta segue (Bayascas, 2008). Embora haja vários estudos acerca do assunto ainda não existe um consenso.

### 1.2.3 Insulina no sistema nervoso

Nos últimos anos, a insulina tem sido um objecto de estudo de grande interesse científico, em razão da descoberta de outros efeitos biológicos além do transporte de açúcar. Evidências que prosperaram na última década apontam para um importante território da actuação da insulina: o cérebro.

Vários estudos já identificaram receptores de insulina distribuídos por regiões específicas do cérebro, como o bolbo olfactivo, o hipotálamo e o hipocampo (Unger *et al.*, 1998; Schulingkamp *et al.*, 2000), onde a insulina participa numa variedade de funções através de mecanismos que diferem do da sua regulação directa da glucose nos órgãos periféricos. Mais tarde, Woods *et al.* (2003) e Banks *et al.* (2004) mostraram que

uma pequena porção da insulina presente no cérebro era produzida localmente. O papel da insulina no cérebro é ainda pouco conhecido. Contudo alguns trabalhos sugerem que a insulina controla vários mecanismos no sistema nervoso central, como a regulação da ingestão de comida pelo hipotálamo (Spanswick *et al.*, 2000) e o controlo do olfacto no bolbo olfactivo (Fadool *et al.*, 2004; Das *et al.*, 2005). Resultados recentes indicam a insulina como um potenciador da memória e da aprendizagem. Como por exemplo o trabalho de Fehm *et al.* (2000) que mostra que a injeção intracerebroventricular de insulina aumenta a memória em ratos em tarefas de aprendizagem. Por outro lado, Craft *et al.* (1999) mostra que a injeção intravenosa de insulina em concentrações precisas aumenta *story recall*, em humanos. De um modo geral, os estudos sugerem que a insulina tem um papel nas funções de aprendizagem e memorização, provavelmente através da modulação de eventos relacionados com a plasticidade sináptica (Zhao e Alkon, 2001). Entre estes eventos destacam-se a LTP (*long term potentiation*) (3, 13, 14 lima) e a LTD (*long term depression*) (14, 15 lima). Acredita-se ainda que a actuação da insulina nesta modelação segue uma via de regulação de moléculas NMDA e receptores AMPA (Lars *et al.*, 2006). Uma outra hipótese para a explicação da possível modelação da plasticidade sináptica por parte da insulina, é o facto desta alterar a neuroexcitabilidade, uma vez que se sabe que várias correntes de potássio podem regular LTP (5, 6 lima). A acrescentar a estes estudos, Lima *et al.* (2008) obteve resultados que indicam que existem correntes de potássio em neurónios CA1 sensíveis a baixas concentrações de insulina (0,3  $\mu\text{M}$ ). E que no modelo neuronal N1E-115, estas correntes são mediadas por canais tipo ERG (canais de potássio dependentes de voltagem), o que indica um papel modulatório por parte da insulina em correntes de potássio em neurónios.

Consistente com este papel da insulina no sistema cognitivo encontram-se os resultados que evidenciam que a insulina e a resistência à insulina estão associados à doença de Alzheimer (Gasparini *et al.* 2002; Craft e Watson, 2004).

Estas novas descobertas certamente ampliarão os conhecimentos a respeito do controle da memória, e possibilitarão novas abordagens para prevenir, tratar ou ao menos retardar a progressão de doenças com comprometimento da memória, como é o caso da DA.

### **1.2.4 Insulina como modeladora da neuroexcitabilidade**

A acção da insulina e dos receptores de insulina, como tem sido sugerido, poder-se-á dever a alterações na neuroexcitabilidade, uma vez que já foi demonstrado que a insulina ao actuar nas condutâncias de  $K^+$ , por mecanismos neuronais específicos, é capaz de alterar a excitabilidade (Fadool *et al.*, 2004; Lima *et al.*, 2008). Contudo, no hipocampo surge informação contraditória quanto ao efeito da insulina, uma vez que além de aumentar também são capazes de reduzir condutâncias de  $K^+$  específicas. Nos neurónios do bulbo olfactivo – região cerebral com níveis mais elevados de insulina (Baskin *et al.*, 1983) e de receptores de insulina (Schuligkamp *et al.*, 2000) – a insulina aumenta a excitabilidade ao inibir canais de potássio do tipo Kv 1.3 (canais dependentes de voltagem), responsáveis pela maioria da corrente de potássio nestes neurónios. Em neurónios hipotalâmicos, a insulina activa os canais  $K_{ATP}$  (canais de potássio sensíveis a ATP), originando uma diminuição na excitabilidade.

Estes dados aparentemente contraditórios relativos aos efeitos da insulina na neuroexcitabilidade, conjuntamente com o conhecimento incompleto sobre os mecanismos de modulação das correntes de potássio pela insulina, desencadearam novos estudos. Em 2008, Lima et al, obteve resultados que evidenciaram a existência de uma modelação da neuroexcitabilidade por parte da insulina através dos canais específicos de potássio - ERG, resultando numa correlação directa entre o aumento da excitabilidade o aumento da concentração de insulina.

Assim teceu-se a hipótese de que o mecanismo de neuroprotecção da insulina poderia recorrer aos mesmos canais de potássio usados na modelação da neuroexcitabilidade. Para o verificar, utilizou-se Way-123,398-A-5 (WAY) – um bloqueador específico de canais de potássio tipo ERG nos ensaios.

## **1.3 Agressores**

### **1.3.1 Agressores celulares não amilóides**

#### **1.3.1.1 Peróxido de hidrogénio**

Os peróxidos são continuamente gerados durante o metabolismo aeróbio nos neurónios de mamíferos. Um produto intermediário da degradação desses peróxidos é o peróxido de hidrogénio, que é uma espécie reactiva de oxigénio (ROS). Níveis fisiológicos de peróxido de hidrogénio são necessários não só, para a sinalização celular como também, para a defesa contra microorganismos invasores (Rhee *et al.*, 2005; Wolfgang *et al.*, 2008). Contudo, a sobrecarga celular de peróxido de hidrogénio induz stress oxidativo, que se traduz num desequilíbrio persistente entre a produção de radicais derivados de peróxido e a sua remoção, resultando em danos neuronais e consequente morte (Dringen *et al.*, 2005). Clinicamente, o stress oxidativo tem sido relacionado com doenças neurológicas, como é o exemplo da doença de Alzheimer e de acidentes vasculares cerebrais, entre outras (Barnham *et al.*, 2004). O mecanismo de toxicidade do peróxido de hidrogénio em células neuronais ainda não é completamente compreendido, mas sabe-se que este afecta a função de várias proteínas, incluindo membranas de canais (Kourier, 1998). Outro evento intracelular importante é o distúrbio na homeostase do cálcio, que aumenta a sua concentração no citosol e há uma consequente captação para o interior da mitocôndria, o que promove a peroxidação lipídica, a oxidação de amino ácidos (a.a.) e danifica o DNA (Mattson e Liu, 2002; Teepker *et al.*, 2007).

As correntes de potássio dependentes de voltagem têm um papel crucial na modificação celular neuronal, mais concretamente no funcionamento da excitabilidade e actividade em rede (Müller e Misgeld 1990, 1991). Estas correntes controlam a duração do potencial de acção, a libertação de neurotransmissores e hormonas, a plasticidade sináptica dependente de cálcio e a actividade epileptiforme de disparos (Müller e Connor 1991; Müller *et al.*, 1988; Pongs, 1999). Vários estudos mostram que muitos tipos de canais de potássio clonados são modelados por ROS, onde a oxidação resulta num decréscimo da actividade de disparo (Duprat *et al.*, 1995; Vega-Saenz de Miera e

Rudy, 1992), enquanto que os canais de potássio dependentes de voltagem tipo ERG são reforçados pela oxidação (Taglialatela *et al.*, 1997).

O aumento da excitabilidade via submodelação de canais de potássio, ou mudança de propriedades biofísicas, assim como a dependência de voltagem, pode resultar no reforço de resposta de cálcio e conseqüentemente no aumento da sua actividade de disparo (Pongs, 1999). Este cálcio intracelular adicional é captado, por sua vez, pela mitocôndria e pode estimular a fosforilação oxidativa assim como produzir ROS. Este processo forma um ciclo vicioso uma vez que este ROS actua nos canais de potássio. Por outro lado, o decréscimo da excitabilidade pode proteger os neurónios, tal pode ser conseguido através da exposição do peróxido de hidrogénio, que reduz o disparo do potencial de acção e a sua frequência (Pellmar, 1987), evocando assim aumentos do cálcio intracelular. Müller e Bittner em 2002 verificaram que o peróxido de hidrogénio em grandes concentrações (> 500  $\mu\text{M}$ ) reduz correntes de potássio em canais do tipo ERG em neurónios de hipocampo de rato.

Estudos recentes mostram que ROS desempenha um papel casual na resistência à insulina no músculo esquelético e no tecido adiposo (Bloch-Damti e Bashan, 2005). Sabe-se também, que essa resistência ocorre em condições neurodegenerativas, sendo evidenciada por um decréscimo da expressão ou sobreexpressão funcional de receptores de insulina. (Ostlund *et al.*, 2001; Peretz *et al.*, 2001). Em 2007, Zhong e Lee, obtiveram resultados que sugeriam que a resistência/ insensibilidade neuronal à insulina pode ser induzida por uma sobrecarga de peróxido de hidrogénio, resultando na morte neuronal.

Neste trabalho o peróxido de hidrogénio usaram-se concentrações adequadas para promover stress oxidativo nos neuroblastomas, de modo a poder verificar-se se a insulina consegue contrariar de alguma forma os danos por ele causado.

### **1.3.1.2 DMSO**

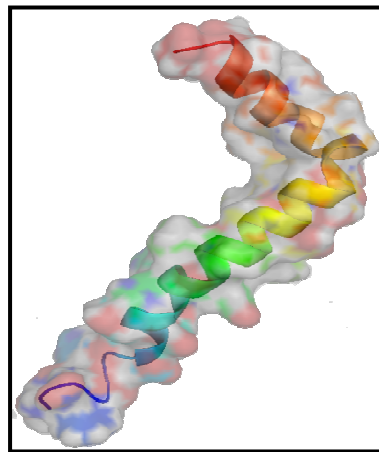
O dimetil sulfóxido (DMSO) é um composto químico cuja fórmula é  $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ . É conhecido por ser um importante solvente orgânico, que dissolve tanto compostos polares como apolares. Como referido na secção 1.1, na presença de 1% deste solvente as células N1E-115 sofrem uma diferenciação relativamente sincronizada. No entanto quando essa percentagem é superior a 5% este solvente torna-se prejudicial às células em processo de diferenciação ou já diferenciadas (Kimhi *et al.*, 1976), uma vez que perturba o processo de formação de neurites e dissolve a membrana celular, assim como os seus constituintes.

Curiosamente o DMSO é também usado como crioprotector, pois quando adicionado a meio de crescimento previne a morte celular durante o congelamento, que é um processo lento. Neste processo o DMSO pode ser usado numa percentagem de 10% sem danificar as células, no entanto aquando o descongelamento celular retirar o DMSO rapidamente é imperativo, na medida em que nessa altura pode lesionar a membrana das células como anteriormente dito.

## 1.3.2 Agressores celulares amilóides

### 1.3.2.1 Beta amilóide

A beta amilóide ( $\beta$ A) é um péptido constituído por 38-43 resíduos de aminoácidos, apresentando por isso várias isoformas, cuja conformação estrutural é dominada por *loops* e caracterizada por alguma estrutura helicoidal no C-terminal da cauda hidrófoba (Figura 3). Este péptido resulta da clivagem de uma proteína transmembranar composta por 700 aminoácidos, que é expressa amplamente por neurónios em cérebros normais – proteína precursora amilóide (APP).



**Figura 3.** Superfície e estrutura secundária de beta amilóide

A APP pode seguir duas vias de clivagem, as quais diferem na acção de diferentes proteases (Figura 4). Numa primeira via, a APP é clivada por  $\alpha$ -secretase onde se forma um fragmento neuroprotectivo sAPP $\alpha$ . Numa segunda via, a APP sofre a acção de  $\beta$ -secretase e posteriormente de  $\gamma$ -secretase, onde o produto maioritário é a  $\beta$ A (Pearson *et al.*, 2006). Deste processo podem resultar várias isoformas de  $\beta$ A, consoante o comprimento da cadeia de aminoácidos, como já referido anteriormente. As isoformas com cadeias mais curtas são tipicamente produzidas no retículo endoplasmático, enquanto que as de cadeias mais longas são formadas na rede do trans-Golgi (Hartmann *et al.*, 1997). Fisiologicamente as isoformas mais comuns são a  $\beta$ A 1-40 e a  $\beta$ A 1-42, estando numa proporção de 90% para 10% respectivamente e encontrando-se a baixas concentrações no fluído cerebrospinal humano (1-10 nM) (Pearson *et al.*, 2003). Contudo, a isoforma  $\beta$ A 1-42 é a mais fibrilogénica das duas, sendo por isso associada a

estados de doença, alterando as proporções para 50%-50% no caso de doença de Alzheimer (DA) (Mehta *et al.*, 2001). É também o principal constituinte das placas senis observadas em cérebros *postmortem* de vítimas desta doença (Reichman, 2003).

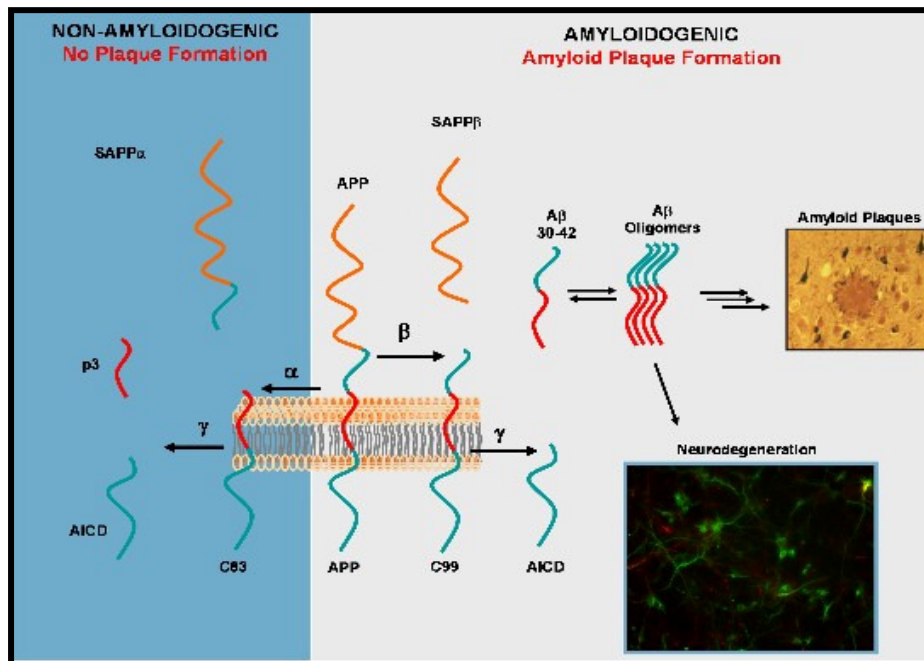
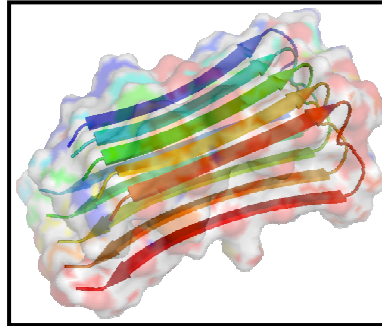


Figura 4. Esquema de formação da  $\beta$ A por ação de várias enzimas

O facto de  $\beta$ A existir a níveis fisiológicos em cérebros normais suscitou a curiosidade dos investigadores para possíveis papéis fisiológicos deste péptido. Kamenetz *et al.* (2003) verificou que  $\beta$ A funcionaria por feedback negativo na neuroexcitabilidade, controlando desta forma a actividade sináptica. Assim como muitos outros autores constataram que este péptido desempenhava papéis fulcrais na sobrevivência neuronal (Plant *et al.*, 2003), na regulação de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  (Robakis *et al.*, 1998; Ramsden *et al.*, 2002) e na regulação da expressão de canais de  $\text{K}^+$  dependentes da voltagem (Ramsden *et al.*, 2001; Yu, 2003; Plant *et al.*, 2005). Ainda este ano (2009), Giuffrida e os seus colegas mostraram que os monómeros de  $\beta$ -amilóide têm propriedades neuroprotectoras.

No entanto, estes monómeros de  $\beta$ A podem agregar ao longo do tempo e formarem estruturas prejudiciais aos neurónios. Tudo indica, que a demência que se faz notar na DA se deve à morte neuronal causada por fibrilhas amilóides (German *et al.*, 2004). Estas fibrilhas amilóides são grandes polímeros insolúveis constituídos por 42

aminoácidos, com a capacidade de se auto agregarem e cuja estrutura secundária é abundante em folhas  $\beta$  paralelas entre si (Figura 5) (Selkoe *et al.*, 2003).



**Figura 5.** Superfície e estrutura secundária de agregados de  $\beta$ A

Durante anos pensou-se que estas fibrilhas amilóides eram a principal causa da demência, como consequência da morte neuronal verificada em pacientes de DA.

Contudo, em 2001 Klein *et al.* afirma que recentes evidências indicam que as fibrilhas amilóides não são as únicas formas tóxicas de  $\beta$ A, e nem mesmo as mais relevantes. Sugerindo agora possíveis papéis patológicos de outros oligómeros solúveis com origem em  $\beta$ A, conhecidos por ADDL's e protofibrilhas (PF's), uma vez que existe uma correlação entre a perda neuronal e estes péptidos solúveis (Klein, 2002).

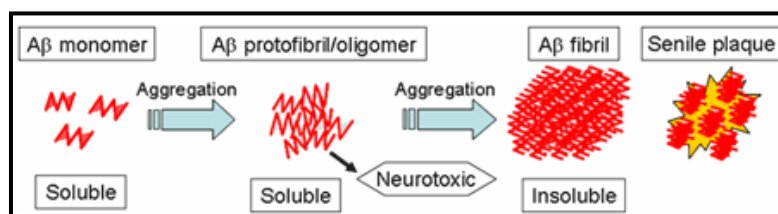
As ADDL's podem ser definidas como pequenas neurotoxinas solúveis não fibrilares, que compreendem oligómeros globulares de  $\beta$ A 1-42 apenas, pois Younkin (1998) verificou que não é possível formar estas estruturas neurotóxicas a partir de  $\beta$ A 1-40. Estas pequenas neurotoxinas são o fruto da primeira fase de agregação de  $\beta$ A (Klein, 2002).

Numa segunda etapa de agregação formam-se as PF's, que são grandes neurotoxinas sub-fibrilares solúveis. Estas PF's são mais estreitas que as fibrilhas clássicas e raramente excedem os 150 nm de comprimento (Harper *et al.*, 1997; Walsh *et al.*, 1997). As PF's são consideradas intermediários metaestáveis das fibrilhas amilóides, pois têm actividade biológica semelhante às fibrilhas maduras (Hartley *et al.*, 1999).

Teoricamente as ADDL's são precursores de PF's, pois são as primeiras a aparecer (Chang *et al.*, 2001), no entanto a ideia de que poderá haver um equilíbrio

dinâmico entre estas neurotoxinas assombra Klein (2002) e ainda não foi comprovado até aos dias de hoje.

Há portanto um processo de agregação de monómeros de  $\beta A$ , que passa pela formação de várias formas tóxicas (ADDL's e PF's e fibrilhas amilóides) até ao estado de agregação final que se traduz na formação das placas senis observadas na DA (Figura 6).



**Figura 6.** Esquema do processo de agregação de monómeros de  $\beta A$ , que passa pela formação de ADDL's (oligómeros), PF's, fibrilhas amilóides até ao estado de agregação final que se traduz em placas senis (Eisai Co., Ltd., (2007))

Estas várias formas tóxicas de  $\beta A$  (ADDL's e PF's) têm consequências devastadoras para os neurónios levando à sua disfunção e morte (Figura 7), principalmente para neurónios hipocámpais, que são particularmente susceptíveis ADDL's (Klein, 2002).

O ambiente de hipoxia é um ambiente favorável para a formação de ADDL's e PF's, pois aumenta a produção de  $\beta A$  e em consequência disso dá-se um aumento de espécies reactivas de oxigénio (ROS) derivadas especificamente da mitocôndria, que danifica as estruturas celulares e leva mesmo a mecanismos de apoptose celular (Pearson *et al.*, 2006). As formas tóxicas de  $\beta A$ , enumeradas anteriormente, também estimulam a fosforilação tau que leva à formação de tranças neurofibrilares intracelulares, que assim como as placas senis são um marco na DA (Reichman, 2003). Caughey *et al.* (2003) chega a afirmar que uma subpopulação de PF's pode desempenhar um papel patogénico como poros para  $\beta A$ . Para além disso,  $\beta A$  promove uma disfunção nas correntes de  $Ca^{2+}$ , uma vez que aumenta a sua concentração intracelular (Stutzmann, 2005) e inibe canais de  $K^+$ , bloqueando assim as suas correntes, (Murphy *et al.*, 1996), destabilizando desta forma a actividade sináptica.

Tudo isto acaba por traduzir-se na morte neuronal e como consequência disso mesmo à demência tão característica de DA.

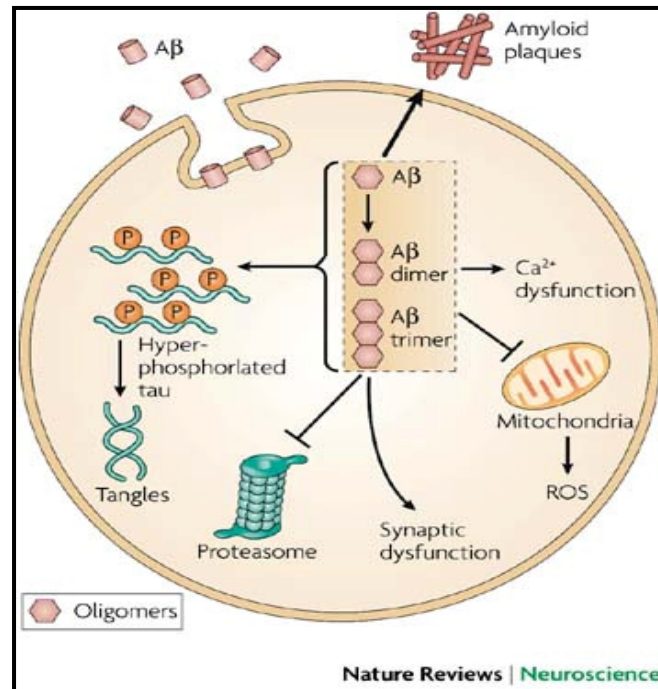


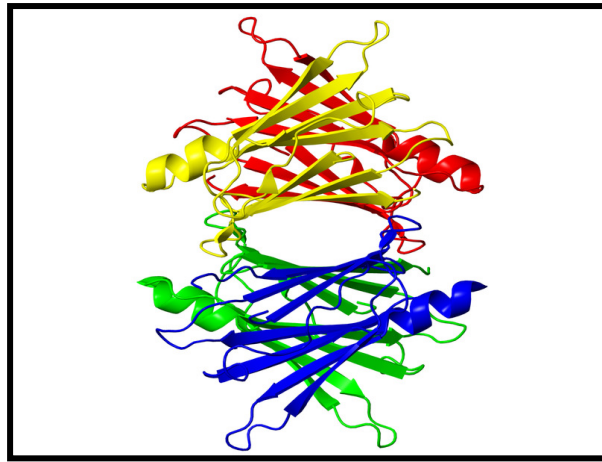
Figura 7. Esquema dos vários efeitos de agregados de  $\beta A$  nos neurônios (LaFerla, 2007)

No entanto, Gasparini *et al.* (2001) e Selkoe (2001) mostraram que a insulina inibia os efeitos tóxicos da  $\beta A$ . Anteriormente também Hong *et al.* (1997) e Lesort *et al.* (2000) evidenciaram que a insulina reduzia a fosforilação tau, uma das principais causas pela qual  $\beta A$  é nociva em culturas neuronais. E Lee em 2001, observou que um decréscimo da insulina elevava a toxicidade de  $\beta A$  no cérebro. Mais tarde Moreira *et al.* (2004) mostrou ainda que na presença de  $\beta A$ , a insulina reverte o efeito nocivo do stress oxidativo mitocondrial.

Até hoje os cientistas debruçam-se sobre o assunto, com a esperança de desenvolver uma estratégia de combate à DA e por consequência aos efeitos nocivos provocados pela  $\beta A$ .

### 1.3.2.2 Trantirretina

A transtirretina (TTR) é uma proteína homotetramérica de 55 kDa, que consiste em quatro subunidades de 127 resíduos de aminoácidos com uma estrutura rica em folhas  $\beta$  (Blake *et al.*, 1978). A associação de dois monómeros assume uma conformação de sanduíche  $\beta$ , e por sua vez a associação idêntica dos outros dois monómeros produz a estrutura homotetramérica (Figura 8).



**Figura 8.** Estrutura secundária da transtirretina

Esta proteína está presente em mamíferos, aves e répteis (Richardson *et al.*, 1994), sendo sintetizada maioritariamente no fígado e no plexo coróide no cérebro, que por sua vez é secretada no plasma e no fluído cerebrospinal (CSF) respectivamente (Soprano *et al.*, 1985), onde normalmente circula como uma proteína solúvel e inócua. Fisiologicamente sabe-se que a TTR é responsável pelo transporte da tiroxina, uma hormona da tiróide (T4) e pelo transporte do retinol, através da proteína ligante de retinol (RBP) (Woeber *et al.*, 1968).

Enquanto a literatura ainda reflecte acerca do papel da TTR, uma recente atenção acerca do envolvimento desta proteína na DA tem surgido no seio científico, uma vez que alguns estudos sugerem que a TTR pode ter um papel no transporte de  $\beta$ A (Carro *et al.*, 2002; Stein *et al.*, 2002; Stein *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2007). Schwarzman e os seu colegas em 1994 incubaram CSF com  $\beta$ A sintética com o intuito de identificarem proteínas que interagem com a  $\beta$ A. Concluíram que a TTR era a proteína que se ligava a  $\beta$ A, resultando desta interacção curiosa um descréscimo no estado de agregação e toxicidade da  $\beta$ A, que sabemos ser uma das principais causas da DA como

anteriormente dito (Schwarzman *et al.*, 1994. Schwarzman *et al.*, 1996). Estudos posteriores mostraram que a TTR *wt* interage similarmente com todas as formas  $\beta$ A descritas no capítulo anterior desta introdução (nomeadamente a sua forma solúvel, ADDL's e protofibrilhas), inibindo a agregação e perturbando a *performance* destas formas nocivas. Desta forma o estudo provou que a TTR *wt* se comporta como uma molécula neuroprotectora em cultura celular através da inibição da apoptose (Costa *et al.*, 2008). No entanto, dois outros estudos (Riisøen, 1988; Serot *et al.*, 1997), mostraram que níveis da TTR *wt* no CSF assumem valores baixos em pacientes terminais com AD, o que sugere que pode ocorrer uma alteração na expressão de TTR ou mutações nesta proteína relevantes no desenvolvimento desta doença. Formas mutantes de TTR assumem um grande potencial amiloidogénico pois têm uma estrutura menos estável e ligam-se mais fracamente à  $\beta$ A, agregam-se em espécies de baixa massa molecular, depositando-se no tecidos e formando fibrilhas (Hou *et al.*, 2007), não obstante disso são prejudiciais às células uma vez que interferem na homeostase de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático e promovem stress oxidativo (Costa *et al.*, 2008). Uma das formas mutadas de TTR mais tóxica às células é composta predominantemente pela TTR variante L55P (substituição de prolina por uma leucina na posição 55) (Jacobson *et al.*, 1992). A literatura acerca da influência da TTR em correntes de  $\text{K}^+$  é inexistente, para tal neste trabalho usou-se o WAY (um bloqueador de canais de potássio), não só para a TTR mas como para todos os agressores usados, de forma a averiguar-se se o seu mecanismo nas células depende de algum modo destas correntes.

### **1.4. Cultura de células**

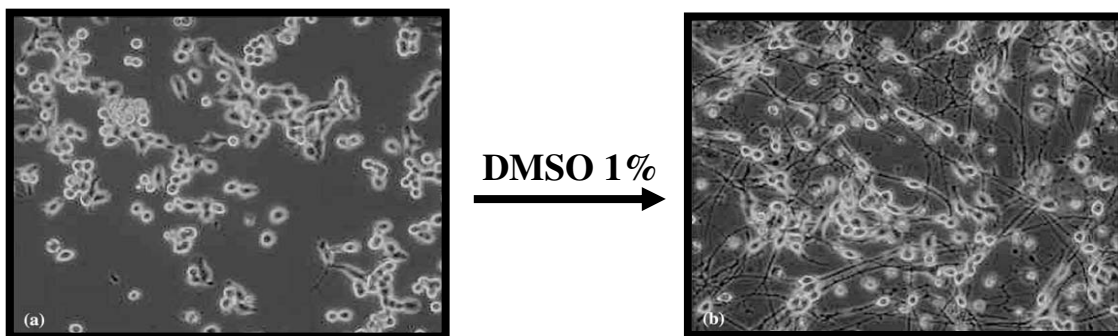
O termo cultura de células refere-se a culturas derivadas de células dispersas, que podem ser provenientes, ou do tecido original, a partir de uma cultura primária; ou de uma linhagem celular, por degradação enzimática, mecânica ou química.

A técnica de cultura de células é utilizada em variados estudos, entre os quais estudos da actividade celular, síntese proteica, metabolismo, interações das células no ambiente específico em que se encontram (nutrição) e genética, apresentando vantagens e desvantagens. Entre as vantagens, é importante destacar a capacidade de expansão do número de células disponível, por subcultivo; o controlo do ambiente físico-químico; a caracterização e homogeneidade da amostra; e a redução do uso de animais. Por sua vez, as desvantagens incluem a necessidade de realização desta técnica sob condições assépticas rigorosas, de modo a evitar contaminações; e a diferenciação assincronizada, um processo devido, principalmente, ao sobrecrecimento de células não diferenciadas (Freshney, 1994).

Muitas das diferenças observadas no comportamento celular, entre células de cultura e os seus correspondentes *in vivo*, derivam da dissociação das células a partir de uma geometria tridimensional e da sua propagação, num posterior substrato a duas dimensões, que conduz à perda das características de interacção específicas da célula. Além disso, o ambiente de cultura também possui vários componentes sistémicos envolvidos na regulação homeostática *in vivo*. Deste modo, o metabolismo celular *in vitro* poderá ser mais constante que *in vivo*, não sendo verdadeiramente representativo do tecido a partir do qual as células derivam. Não obstante, embora as diferenças entre as condições de uma célula *in vitro* e *in vivo* não possam ser ignoradas, é necessário enfatizar que muitas funções especializadas estão expressas em cultura e, desde que se tenha consciência das limitações do modelo, a técnica de cultura de células é uma ferramenta muito valiosa (Freshney, 1994).

### **1.4.1 Células de neuroblastoma N1E-115**

As células N1E-115 pertencem a uma linhagem celular imortalizada, isolada a partir do clone adrenérgico derivado do neuroblastoma C-1300, um tumor de murganho de origem simpática (Amano *et al.*, 1972). Estas células constituem um bom modelo neuronal para estudos de células neuronais diferenciadas, dado que, na presença de 1% dimetilsulfóxido (DMSO) sofrem uma diferenciação relativamente sincronizada (Kimhi *et al.*, 1976) (Figura 9). Esta diferenciação é acompanhada pela extensão de neurites e pela produção de enzimas que metabolizam neurotransmissores, tais como a tirosina hidroxilase e acetilcolinesterase (Ji-eun Oh *et al.*, 2005).



**Figura 9.** Efeito na morfologia celular de N1E-115 por acção de 1% DMSO. (a) células indiferenciadas antes da adicção de DMSO. (b) células diferenciadas (Ji-eun Oh *et al.*, 2005)

Encontram-se ainda descritas diversas correntes iónicas nestas células, entre elas, uma corrente de  $\text{Na}^+$  (Moolenaar e Spector, 1978) e correntes de  $\text{K}^+$  (Quandt, 1988; Leidners e Vijverberg, 1992), as quais são reversivelmente bloqueadas por aplicação externa de Way-123,398-A-5 (WAY) (Faravelli *et al.*, 1996).

Estas células constituem portanto um bom modelo neuronal, na medida em que para além de assimilarem o comportamento de neurónios, as suas correntes fisiológicas estão bem documentadas.

**Objectivos**

O presente trabalho de investigação teve como objectivo aprofundar o conhecimento sobre as faculdades neuroprotectoras da insulina, estudando o plausível papel desta em relação a agressores que se julgam serem relevantes na doença de Alzheimer.

Considerando o efeito inibitório da insulina em correntes de  $K^+$  que, em células de neuroblastoma N1E-115, são mediadas pelos canais do tipo ERG, pretendeu-se averiguar se a neuroprotecção pela insulina se processa via a sua modulação nos canais de potássio ou se recruta uma via independente.

Devido ao conhecimento crescente sobre os factores fisio-patológicos que sobrepõem a doença de Alzheimer e a diabetes tipo II, objectivou-se estudar os efeitos neurotóxicos de agressores como o  $H_2O_2$  e a  $\beta$ -amilóide, assim como a eventual neuroprotecção da insulina. De igual modo, inclui-se neste estudo amilóides trantirretina, que recentes estudos relacionam com a doença de Alzheimer e a agressão da  $\beta$ -amilóide.

Finalmente, e uma vez que fenómenos de neurotoxicidade e neuroprotecção estão intimamente ligadas com  $Ca^{2+}$  objectivou-se estudar o efeito das protagonistas já mencionadas na dinâmica de  $Ca^{2+}$  citoplasmático.

## **II. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Cultura de células**

O uso de técnicas estéreis em cultura de células é hoje essencial para inúmeras linhas de investigação e depende largamente das condições de esterilidade. Foi, por isso, utilizada uma câmara de fluxo laminar (Esco SC2) e todos os materiais utilizados, esterilizados. Alguns materiais foram adquiridos já esterilizados e, relativamente a outros procedeu-se em laboratório à sua esterilização por vapor utilizando uma autoclave. Todos os frascos contendo meio, bem como outros reagentes e materiais foram limpos com álcool a 70% e somente abertos dentro da câmara de fluxo laminar. O uso de antibióticos no meio é, a par da esterilidade, outro factor relevante, pois inibe o crescimento de microorganismos prejudiciais às células, uma vez que estas não possuem um sistema imunitário defensivo. As células são sensíveis a diversos factores, tais como o pH, a temperatura, a composição do meio, pelo que é de extremo interesse manter todos estes factores em concordância de modo a que o fenótipo celular se mantenha estável. Tendo isto em conta, para evitar choques térmicos nefastos às células, todos os reagentes usados na manutenção das células foram previamente aquecidos num banho-maria (Memmert) a 37°C. As células foram mantidas em condições de divisão permanente numa incubadora de CO<sub>2</sub> (Shel Lab) a 37°C, com uma atmosfera húmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **2.1.1 Meios e procedimentos gerais de cultura de células**

Ao longo deste trabalho utilizaram-se células de neuroblastoma de murganho N1E-115, uma vez que são bons modelos neuronais. Estas células foram cultivadas em meio de crescimento, constituído por 90% de DMEM (Gibco), suplementado com 10% de FBS (Gibco) e 0,1% de antibiótico – penicilina 10 000 U/mL e estreptomicina 10 000 µg/mL (Gibco), em frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup> (Falcon). O meio de crescimento foi substituído de 2 em 2 dias, realizando lavagens com solução salina de PBS (Gibco).

Para induzir diferenciação celular, as células foram semeadas em placas de 96 poços (Falcon) contendo meio de diferenciação. Este era constituído por 96% de

DMEM, 2.5% de FBS, 1.5% de DMSO (Sigma) e 0.1% de antibiótico – penicilina 10 000 U/mL e estreptomicina 10 000 µg/mL, em placas de cultura de 96 poços cm<sup>2</sup> (Falcon). A redução da percentagem de soro no meio de cultura e a presença de DMSO foram usadas para induzir a diferenciação celular (Kimhi *et al.*, 1976).

As células desenvolvem-se nos frascos de cultura por adesão através da secreção de proteínas responsáveis por essa função. O seu desenvolvimento é limitado pelo contacto entre si, assim sendo quando estas atingem um estado de grande confluência (70-80%), tem de se proceder a passagens. Passagens estas que podem definir-se como sendo o processo através do qual se fazem subculturas. Para tal é necessário recorrer-se ao uso de tripsina (Gibco), um enzima que quebra a ligação das proteínas que facultam a adesão. Para efectuar essas subculturas o meio dos frascos da cultura inicial é retirado e a monocamada celular lavada três vezes com PBS (2 mL cada lavagem) (Gibco). A lavagem com PBS é essencial para remover os vestígios de meio com soro (que inibe a acção da tripsina). Posteriormente procedeu-se a uma trispinização, onde se incubam as células com tripsina e agita-se ligeiramente o frasco de cultura de forma a descolar a monocamada. Esta trispinização dura no máximo 30 segundos e a maior parte da tripsina é rejeitada ficando apenas no frasco a quantidade suficiente para cobrir as células até se observar o seu descolamento. A actividade deste enzima é então inibido pela adição de soro, contido no meio de cultura, que possui na sua composição inibidores de proteases e catiões divalentes, que inibem a actividade proteolítica (Wang *et al.*, 2008).

As células utilizadas para as experiências de agressores foram mantidas em meio de diferenciação durante 4-6 dias. Assim como as células utilizadas para as experiências sem agressores, foram mantidas também em meio de diferenciação durante os 10 dias desta.

Foi utilizado um microscópio óptico (Motic AE21) para a observação das células.

### **2.1.2 Crio-preservação de células**

A crio-preservação de células é essencial para a manutenção de stocks celulares. O princípio básico de uma crio-preservação bem sucedida é um congelamento lento e um descongelamento rápido. No que respeita ao congelamento celular este foi efectuado quando os frascos de cultura estavam com cerca de 90% de confluência. As células eram ressuspendidas num pequeno volume (1 ml para um frasco de cultura de 25 ml) de meio de congelação. Este é constituído por D-MEM, 10% de DMSO e 90% de soro (FBS). Depois de ressuspendidas, as células eram imediatamente colocadas em criotubos (VWR) e colocados no 'Mr. Freeze' (Nalgeme), onde o decréscimo da temperatura é lento e controlado (cerca de  $-1^{\circ}\text{C}$  por minuto, quando colocado  $-80^{\circ}\text{C}$ ). Depois de algumas horas, os criotubos contendo as células foram colocados em azoto líquido.

Relativamente ao descongelamento das células, os criotubos eram colocadas num banho a  $37^{\circ}\text{C}$  e logo depois de descongeladas, as células eram semeadas num frasco com meio de crescimento previamente aquecido.

## 2.2 Determinação da citotoxicidade

O estudo da citotoxicidade tanto da insulina *per si* como dos agressores, foi efectuado nos neuroblastomas utilizando um ensaio de MTT, 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenilbrometo de tetrazolina (Aldrich), para medir a viabilidade celular. Este ensaio baseia-se na capacidade de desidrogenases associadas ao NADPH e ao NADH, em células vivas, converterem o substrato amarelo solúvel em água (MTT) num produto de cor púrpura, cristais de formazano, no interior das células. Estes cristais podem ser observados ao microscópio e extraídos com solventes orgânicos, como por exemplo o DMSO, permitindo a sua quantificação através da espectrofotometria. Quanto mais púrpura se observar, mais células estão viáveis. Foi utilizada uma concentração de MTT de 0,5 mg/mL, o tempo de incubação é dependente da confluência de células e da linha celular. Este método foi sugerido pela primeira vez por Mossman em 1983 e desde então tem sido bastante utilizado. Este ensaio associado a placas de 96 poços permite testar várias amostras simultaneamente de forma rápida e fácil (Freshney, 1987).

Os ensaios de MTT foram feitos quando as células se apresentaram diferenciadas e numa confluência de 70%. Estes ensaios basearam-se então na adição de 10µL MTT/poço na concentração acima referida. A placa foi, de seguida, incubada durante 1h – 1h30 a 37°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após este tempo o meio foi cuidadosamente retirado e foram adicionados 100 µL de DMSO a cada poço, para a solubilização dos cristais de formazano. Os valores de absorvância foram determinados num leitor de microplacas (Tecan) no intervalo de 570 nm a 630 nm. A percentagem de sobrevivência foi calculada usando a fórmula:

$$\% \text{ sobrevivência} = \frac{n^{\circ} \text{ céls.vivas}(\text{teste})}{n^{\circ} \text{ céls.vivas}(\text{controlo})} \times 100$$

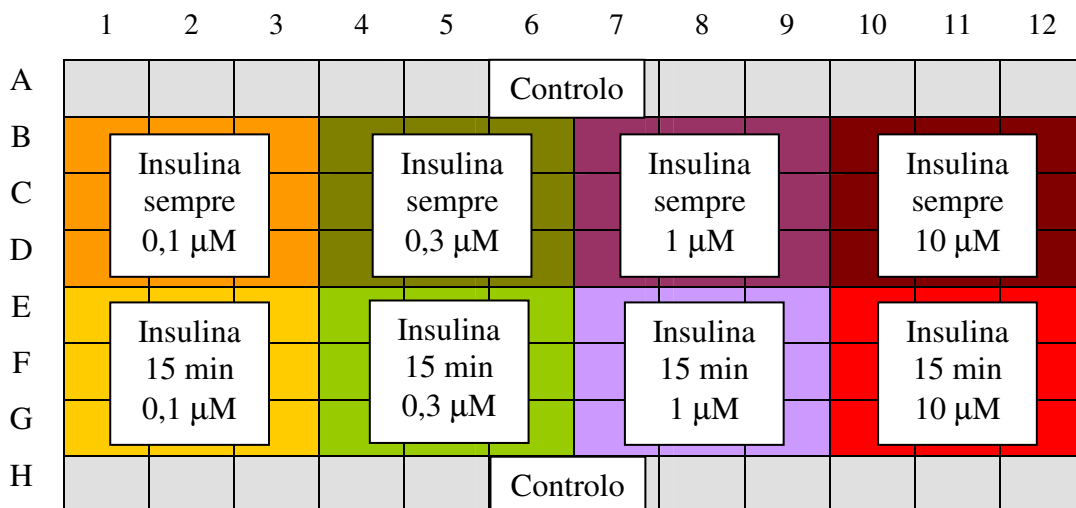
Desta forma 100% de sobrevivência celular corresponde sempre à sobrevivência das células em condições de controlo.

Com este ensaio, efectuaram-se dois grupos de experiências. Um primeiro, onde se pretendeu estabelecer os padrões de sobrevivência celular nas condições usadas ao

longo de tempo de incubação, e, inferir sobre o eventual efeito promotor de sobrevivência por parte da insulina (2.2.1). Posteriormente, efectuaram-se ensaios em que se estudou o papel da insulina, bem como o do **Way-123,398-A-5** (WAY), no efeito neurotóxico de agressores vários.

**2.3 Efeito da insulina *per si* nas taxas de sobrevivência controlo vs período de incubação ao longo do tempo**

Medir a viabilidade celular perante incubações de insulina permite verificar o possível efeito neuroprotector desta *per si* em neuroblastomas. Foram por isso efectuados ensaios de MTT ao longo do tempo. Para tal semearam-se células diferenciadas em 12 caixas de 96 poços e com uma confluência de ~ 70%. Em 5 das quais mudou-se o meio de 2 em 2 dias. Trataram-se todas as caixas com várias concentrações de insulina (0,1µM; 0,3 µM; 1 µM e 10 µM), onde em alguns poços a insulina esteve sempre presente e em outros as células estiveram expostas à insulina apenas durante 15 minutos. Seguidamente é apresentado o esquema geral do desenho experimental utilizado.



**Esquema 1.** Esquema geral do desenho experimental em ensaio típico de MTT onde se testou o efeito da insulina nas taxas de sobrevivência celular, em condições de controlo. O esquema representa uma caixa de 96 poços e as várias cores representam as várias concentrações de insulina aplicada.

Procederam-se a ensaios de MTT durante 10 dias, onde em cada dia se elaboravam 2 ensaios: um para uma caixa com mudança de meio e outro para caixa em que não se mudou o meio.

### **2.4 Efeito neuroprotector da insulina e Way-123,398-A-5 (WAY) perante exposições a agressores (não amilóides e amilóides)**

Como anteriormente referido o estudo da viabilidade celular, durante exposições a vários agressores, assim como o efeito da insulina/WAY perante estas exposições, foi elaborado por meio de ensaios de MTT. Para tal trataram-se caixas de 96 poços com duas concentrações de insulina (0,3  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$ ) ou WAY (1 $\mu\text{M}$  e 10 $\mu\text{M}$ ) ao 4º dia de diferenciação e com uma confluência celular de 70%. O tratamento com insulina e WAY foi persistente (3 horas). De seguida expuseram-se as células tratadas com insulina ou WAY a vários agressores, com as células sempre em meio de diferenciação:

- $\text{H}_2\text{O}_2$  (100 $\mu\text{M}$ ; 300 $\mu\text{M}$  e 600 $\mu\text{M}$ ) durante 3 horas na incubadora.
- DMSO 10% durante 3 horas na incubadora.
- $\beta$ -amilóide (1  $\mu\text{M}$ ) durante 3 e 24 horas na incubadora.
- TTR (wt, com mutação em 55' e com uma molécula de Glutathione S-transferase associada à TTR (GST)) durante 3 e 12 horas na incubadora.

Após este procedimento elaboraram-se ensaios de MTT.

Para o DMSO 10% e para as várias concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , procedeu-se ainda da mesma forma, mas utilizando solução externa contendo cálcio e na sua ausência, de modo a averiguar a dependência do efeito neuroprotector da insulina ao  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular.

#### **Solução externa com cálcio**

Para um volume final de 500 mL de solução em água destilada, adicionaram-se os seguintes reagentes (em mM): 135 NaCl (Merck); 5,4 KCl (Merck); 10  $\text{Na}_{1/2}$ -Hepes (Sigma); 2  $\text{CaCl}_2$  (Merck); 1,5  $\text{MgCl}_2$  (Merck) e 25 Glucose (Merck)

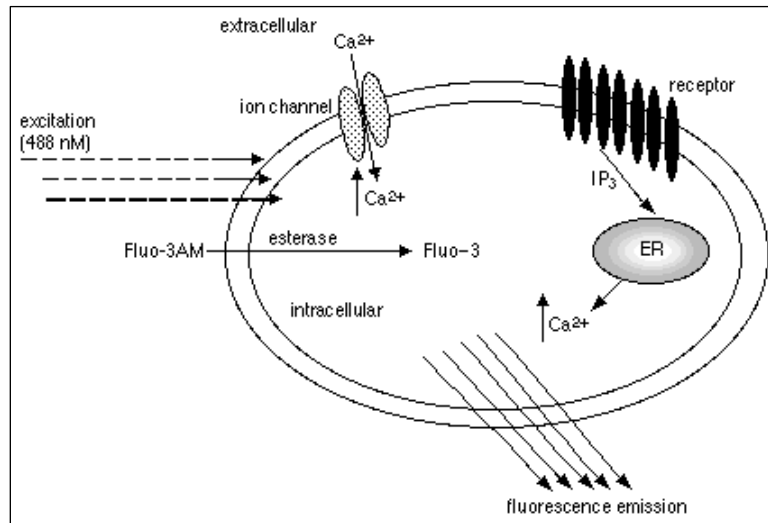
**Solução externa sem cálcio**

A constituição é essencialmente a mesma, com a diferença que em vez de se colocar 2  $\mu\text{M}$  de  $\text{CaCl}_2$ , colocou-se EGTA (10 mM) (Merck).

Ambas as soluções (solução externa com e sem cálcio) foram tituladas com NaOH (Merck) para o pH ideal aos neuroblastomas, ou seja, para um pH de 7,40.

**2.5 Relação da insulina com o cálcio citoplasmático**

A monitorização de cálcio nos neuroblastomas perante a actuação de insulina, foi conseguido a partir de medições de fluorescência. Este método implica o carregamento das células com sondas fluorescentes como descrito em Benech *et al.*, (2000) e Dajas-Bailador *et al.*, (2000). Para tal retirou-se o meio de diferenciação em cujas células se encontravam e lavou-se com solução externa (cerca de 100  $\mu\text{L}$ /poço). Procedeu-se desta forma duas vezes, de modo a garantir uma boa lavagem celular. De seguida, incubaram-se as células com solução de carregamento, durante 1 hora a 37°C na estufa. Esta solução de carregamento é constituída por solução externa (1M) contendo 3  $\mu\text{M}$  de fluo-3 AM (marcador de fluorescência). Esta incubação de 1h é necessária, dadas as propriedades do marcador (Figura 10). Após a incubação lavaram-se novamente as células com solução externa e após uma lavagem deixaram-se as células neste meio (cerca de 150  $\mu\text{L}$ /poço). Por fim procedeu-se à medição propriamente dita, usando o leitor de fluorescência (Gemini). Excitaram-se as células a 488nm e 525nm, uma vez que estes comprimentos de onda são os ideais para a observação da resposta com Fluo-3AM. Mediu-se primeiro as células em solução externa, que é considerado o zero e posteriormente aplicou-se insulina (3  $\mu\text{M}$ ).



**Figura 10.** Esquema da actuação de Fluo-3AM nas células em ensaios de fluorescência, onde se monitoriza o fluxo de cálcio. As células são inicialmente incubadas com Fluo-3-acetoximetil Ester (Fluo-3-AM), que é permeável à membrana. A forma AM do Fluo-3 é hidrolizada por esterases intracelulares e é então “encurrada” nas células sob a forma fluorescente de ácido livre (Fluo-3). Elevações nos níveis de cálcio intracelular, desencadeadas por receptores ou canais iónicos, aumentam as emissões de fluorescência de Fluo-3, uma vez que se dá a ligação entre o cálcio celular e o Fluo-3. Esta ligação é detectada e registada. (Whiteaker *et al.*, 2000).

## 2.6 Relação dos agressores ( $H_2O_2$ e TTRs) com o cálcio citoplasmático

Procedeu-se à semelhança do ponto anterior (2.5 Relação da insulina com o cálcio citoplasmático), com a diferença de que em vez de se aplicar insulina ( $3 \mu M$ ), aplicou-se  $H_2O_2$  ( $100 \mu M$ ,  $300 \mu M$  e  $600 \mu M$ ) e TTR *wt* ( $1 \mu M$ ), TTR 55' ( $1 \mu M$ ) e o veículo GST ( $1 \mu M$ ).

## 2.7 Análise de dados

A análise estatística foi realizada utilizando o programa SigmaStat (versão 3.5). Para comparação de duas amostras emparelhadas foi utilizado o teste de Wilcoxon para amostras  $n < 10$ , ou o teste t emparelhado para amostras com  $n \geq 10$ , com uma distribuição gaussiana. Para análises de variância recorreu-se à *One Way Analysis of Variance*, ANOVA, de medições repetidas e ao teste de comparação múltipla de Tukey.

A análise de variância foi utilizada na comparação da significância dos efeitos resultantes dos diversos tratamentos aplicados às células nas experiências que tinham como objectivo testar o efeito da insulina ou WAY e dos agressores na sobrevivência celular. Dado o tamanho das amostra em algumas destas experiências ( $n < 10$ ), o teste estatístico indicado para determinar se os diferentes tratamentos seriam idênticos estatisticamente, seria um teste não paramétrico emparelhado, especificamente o teste de Friedman, seguido de um teste de comparação múltipla de Dunn. O teste de Friedman posiciona separadamente os valores de cada experiência, do menor para o maior, somando, posteriormente, as posições dos valores de cada coluna. Se as somas forem muito diferentes, o valor de p será pequeno. Uma vez que nas experiências realizadas, as adições tanto da insulina/WAY como dos agressores conduziram a valores consecutivamente mais pequenos, as posições dos valores de cada experiência seriam sempre os mesmos, não reflectindo assim a grandeza do efeito de cada tratamento.

Deste modo, em vez do teste de Friedman, decidiu-se aplicar o teste paramétrico correspondente, ANOVA de medições repetidas, seguido de um teste de Tukey.

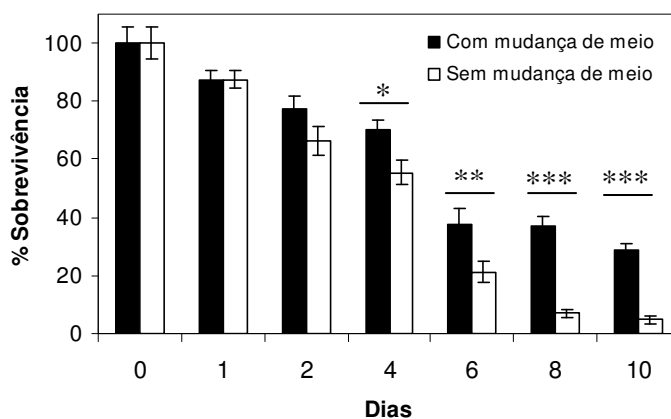
Quanto ao nível de significância assumiu-se que:  $p > 0.05$  – diferença não significativa;  $0.01 < p < 0.05$  – diferença significativa (\*);  $0.001 < p < 0.01$  – diferença muito significativa (\*\*);  $p < 0.001$  – diferença altamente significativa (\*\*\*)

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão à média (*standard error to the mean*, S.E.M.) e n representa a dimensão da amostra.

### III. RESULTADOS

#### 3.1 Efeito da insulina *per si* nas taxas de sobrevivência controlo vs período de incubação ao longo do tempo

Antes de se estudar o efeito neuroprotector da insulina face a agressores celulares, pretendeu-se inferir sobre o efeito da insulina na sobrevivência celular em condições controlo de cultura. Assim, e ao longo de uma escala temporal utilizada no cultivo destas células, pretendeu-se estabelecer: a) o padrão da sobrevivência destas células ao longo de 10 dias; b) o eventual efeito da insulina em condições onde as células tinham o meio de diferenciação renovado de 2 em 2 dias e em condições em que as células permaneciam com o mesmo meio de diferenciação ao longo do mesmo período de tempo. Para tal, procederam-se a ensaios de viabilidade celular (MTT), durante 10 dias, e em condições distintas: mantendo sempre o mesmo meio de diferenciação (sem mudança de meio) e renovando o meio de diferenciação de 2 em 2 dias (com mudança de meio).



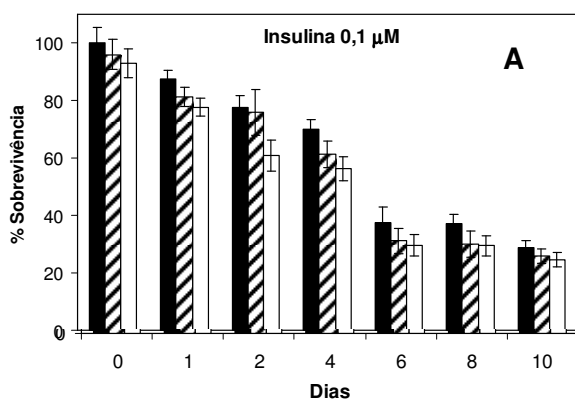
**Figura 11. Viabilidade celular por ensaio de MTT em culturas de neuroblastoma N1E-115 mantidas durante um período de 10 dias – efeito da mudança/permanência do meio de cultura.** Os valores expressos em % de sobrevivência decaem ao longo dos dias a uma taxa mais acelerada quando o meio de cultura não era renovado de 2 em 2 dias (barras vazias) em comparação com as células em que tal mudança era processada (barras a preto). Significância estatística:  $p > 0.05$  – diferença não significativa;  $0.01 < p < 0.05$  – diferença significativa (\*);  $0.001 < p < 0.01$  – diferença muito significativa (\*\*);  $p < 0.001$  – diferença altamente significativa (\*\*\*) ;  $n=16$ ; barra de erro S.E.M.

As células cujo meio era mudado apresentaram uma maior taxa de sobrevivência, tendência que se mostrou óbvia a partir do quarto dia ( $n=16$ ;  $0,001 < p < 0,01$ ). Quando, supostamente, a disponibilidade de nutrientes se tornava mais premente. Por outro lado, no caso em que o meio era renovado, os produtos excretados pelas células não acumulavam tanto como na situação em que não havia mudança de meio. Esta discrepância nos valores de sobrevivência entre as condições de permanência e as de renovação de meio, tornaram-se mais significativas nos períodos mais longos de incubação (8 e 10 dias;  $n=16$ ;  $p < 0,001$ ).

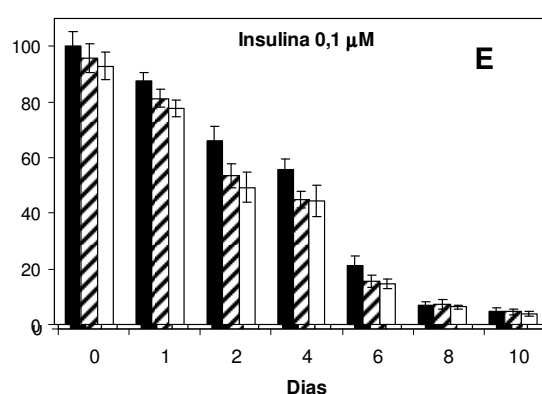
Para verificar o efeito da insulina nestas condições de cultura, usaram-se várias concentrações de insulina (0,1; 0,3; 1 e 10  $\mu\text{M}$ ). Para cada uma das condições, houve uma exposição permanente e uma exposição de apenas 15 minutos, de modo a se verificar se o tempo de exposição teria alguma influência nos efeitos da insulina (Duarte *et al.*, 2008) (Figura 12). De um modo geral, a insulina não induziu uma mudança marcada nas taxas de sobrevivência.

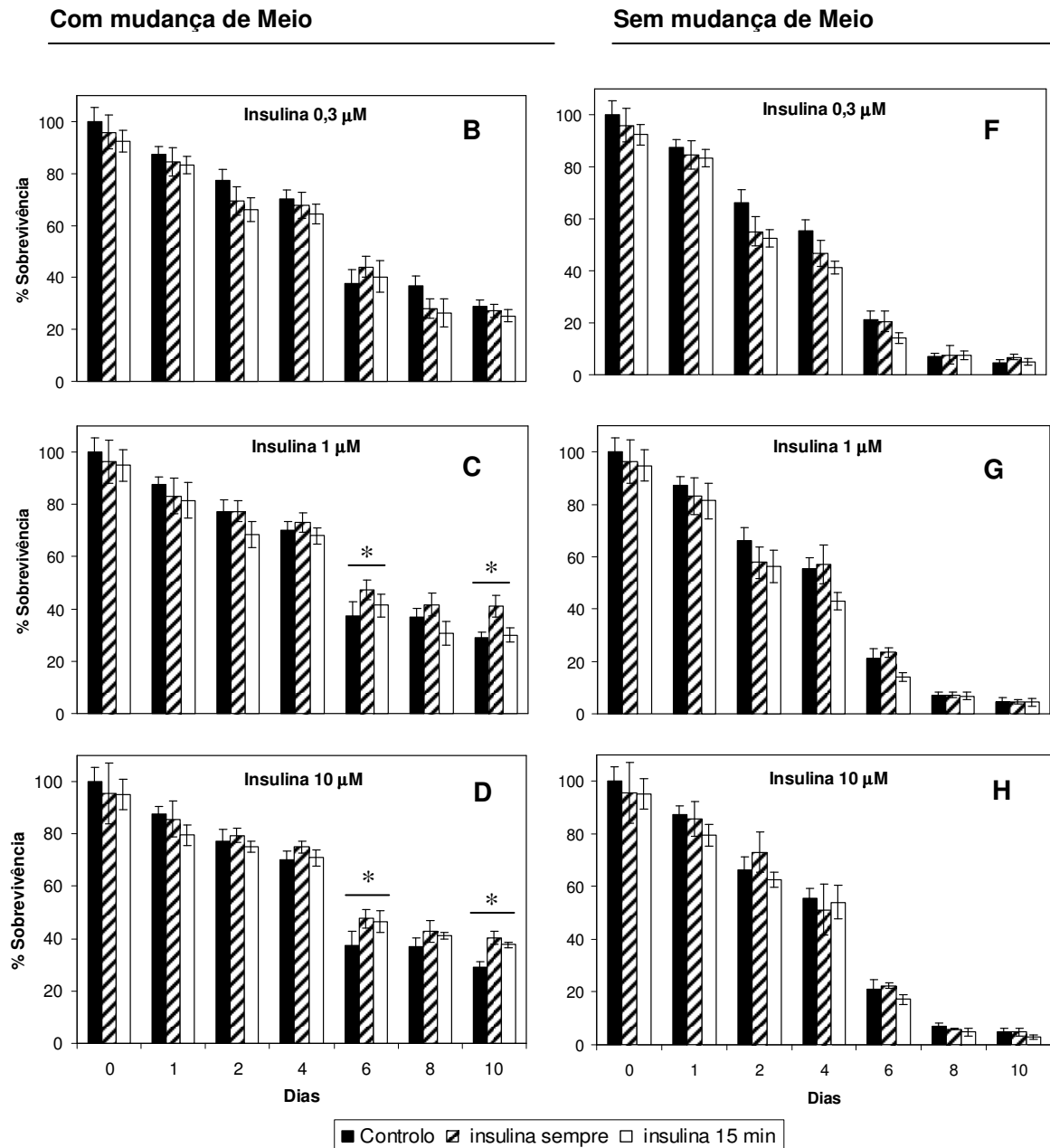
A adição de insulina no meio levou a ligeiras alterações na taxa de sobrevivência das células, dependendo este efeito tanto da concentração aplicada como da renovação do meio. De facto, nas condições sem mudança de meio, a adição de insulina (a todas as concentrações) não levou a quaisquer diferenças nas taxas de sobrevivência celular, mesmo em relação aos dias mais tardios da experiência. No entanto, quando o meio foi renovado, algum efeito da insulina pode-se observar a partir de dia 6, mas só a concentrações superiores ou iguais a 1  $\mu\text{M}$ .

Com mudança de Meio



Sem mudança de Meio



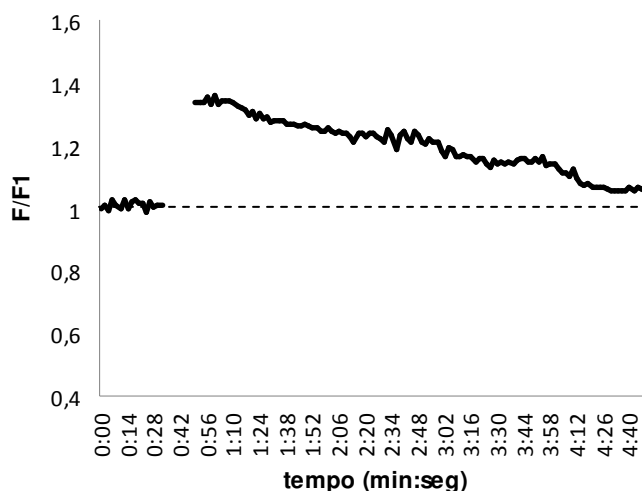


**Figura 12.** Efeito da insulina na sobrevivência celular por ensaio de MTT, em condições de cultura com (A-D) e sem mudança de meio (E-H), durante um período de 10 dias. Os valores expressos em % de sobrevivência decaem ao longo dos dias mais acentuadamente em condições de controlo (sem insulina) a partir da concentração de 0,3 µM (barras pretas). A insulina tem o seu efeito mais pronunciado nas condições de cultura em que há renovação do meio de diferenciação e uma exposição à insulina permanente (barras listadas). A Insulina esteve presente no decorrer dos ensaios de MTT, e foi aplicada a 4 concentrações: a 0,1 µM (A e E ; n=18), 0,3 µM (B e F; n=18). 1 µM (C e G; n=18) e 10 µM (D e H; n=18). Significância estatística em relação ao controlo do dia (barra preta):  $p > 0.05$  – diferença não significativa;  $0.01 < p < 0.05$  – diferença significativa (\*); barra de erro S.E.M.

Na análise global destes resultados poder-se-á referir que a insulina não infere no efeito neuroprotector marcado nos dias de cultura em que a mortalidade não é considerável. Só se observa alguma neuroprotecção ao fim de 6 dias de cultura no caso em que há mudança de meio, quando os níveis de mortalidade aumentam consideravelmente. Este ensaio permitiu assim desenhar os protocolos experimentais usados nos ensaios com os vários agressores celulares. Uma vez que, pretendeu-se por um lado utilizar células já diferenciadas (depois do dias 3 – dados não mostrados) e, por outro, condições em que a mortalidade não fosse excessiva (não produzindo valores de absorvância “trabalháveis”). Decidiu-se que as experiências seriam todas elaboradas ao dia 4 de diferenciação.

### 3.2 Relação da insulina com o cálcio citoplasmático

Uma vez que fenómenos de neuroprotecção e neurotoxicidade estão associados a processos que recrutam  $\text{Ca}^{2+}$  (Dajas-Bailador *et al.*, 2000), investigou-se se a activação de receptores de insulina teria um efeito na dinâmica de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático. Assim, adicionou-se a insulina a células de neuroblastoma carregadas com Fluo-3, um marcador fluorescente sensível ao  $\text{Ca}^{2+}$ , monitorizando-se a sua fluorescência.



**Figura 13. Insulina induz um aumento transitório no  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático em células neuroblastoma N1E-115.** Exemplo de registo de fluorescência proveniente de células carregadas com Fluo-3 AM. A aplicação de 3  $\mu\text{M}$  de insulina, correspondente à descontinuidade temporal do registo (42 segundos), induziu um marcado aumento nos valores de fluorescência registados a cada 2 segundos (0,5 Htz) e normalizados à primeira leitura (F/F1).

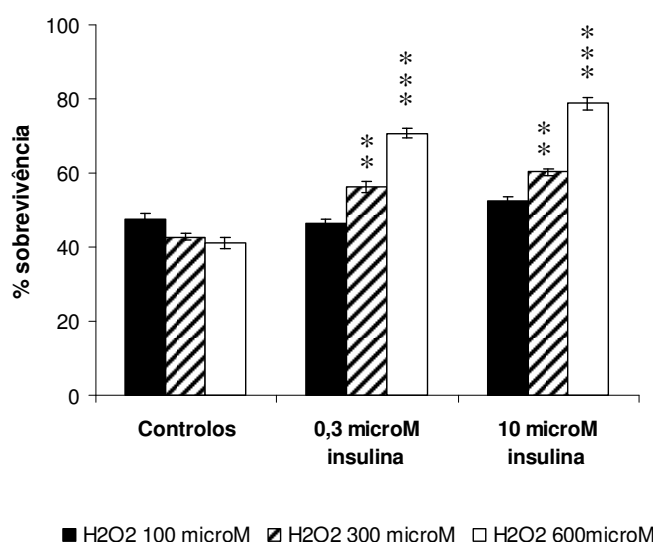
A aplicação de insulina (3  $\mu\text{M}$ ) gerou um aumento rápido nos níveis de fluorescência. Esse aumento demonstrou ser transitório, uma vez que ao fim de 4 minutos os valores retomaram aos iniciais. Este facto demonstrou que a activação do receptor de insulina produz um aumento no  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático, que é consequentemente extraído, permitindo à célula normalizar a homeostase de  $\text{Ca}^{2+}$ .

### 3.3 Efeito neuroprotector da insulina e Way-123,398-A-5 (WAY) perante exposições a agressores

#### 3.3.1 $\text{H}_2\text{O}_2$

##### 3.3.1.1 Tratamento com insulina

Com o intuito de se averiguar o eventual efeito neuroprotector da insulina perante a exposição das células a várias concentrações do agressor  $\text{H}_2\text{O}_2$  (100 $\mu\text{M}$ , 300 $\mu\text{M}$  e 600 $\mu\text{M}$ ), procederam-se a ensaios de viabilidade celular (MTT).



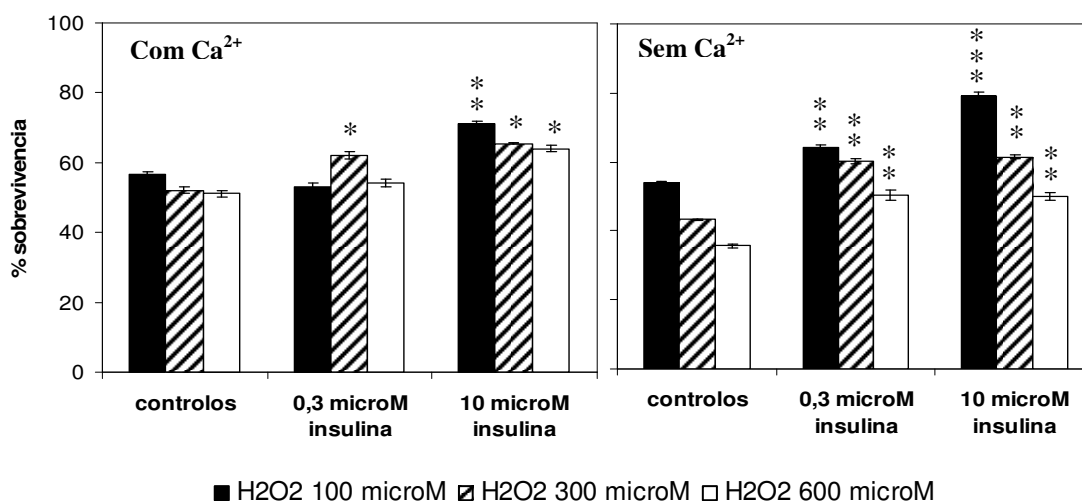
**Figura 14. Efeito da insulina na diminuição da sobrevivência celular induzida por várias concentrações do agressor  $\text{H}_2\text{O}_2$ .** As células N1E-115 são expostas a 100  $\mu\text{M}$  (barras pretas), a 300  $\mu\text{M}$  (barras listadas) e a 600  $\mu\text{M}$  (barras brancas) de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Os valores expressos em % de sobrevivência decaem com o aumento de concentração do agressor (controlo). Aquando da co-aplicação de 0,3  $\mu\text{M}$  e

10  $\mu\text{M}$  de insulina, observou-se uma diminuição da mortalidade induzida por  $\text{H}_2\text{O}_2$ . O efeito neuroprotector da insulina é mais notório com maiores concentrações do agressor. A insulina esteve sempre presente no meio de cultura (meio de diferenciação). Significância estatística em relação aos controlos:  $p>0.05$  – diferença não significativa;  $0.01<p<0.05$  – diferença significativa (\*);  $0.001<p<0.01$  – diferença muito significativa (\*\*);  $p<0.001$  – diferença altamente significativa (\*\*\*) ;  $n=12$ ; barra de erro S.E.M.

Na Figura 14, pode observar-se que o  $\text{H}_2\text{O}_2$  induziu um dramático abaixamento nas taxas de sobrevivência. Para além disso, quanto maior a concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  aplicada, mais tóxico este se tornou para as células. A 100  $\mu\text{M}$ , o  $\text{H}_2\text{O}_2$  matou cerca de 50% das células, ao passo que, a uma concentração de 600  $\mu\text{M}$  a taxa de mortalidade atingiu os 60%, o que é estatisticamente diferente.

Mais interessante para este estudo foi verificar que a insulina não só demonstrou um efeito neuroprotector, como esse efeito é directamente proporcional à concentração de insulina aplicada. De notar que este efeito neuroprotector é bastante ténue e não significativo quando o agressor foi aplicado a 100  $\mu\text{M}$  de concentração. No entanto, a concentrações superiores de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (300  $\mu\text{M}$  e 600  $\mu\text{M}$ ), o tratamento com insulina diminui consideravelmente a taxa de mortalidade. Nomeadamente, a taxa de sobrevivência é cerca do dobro quando 600  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  é co-aplicada com a insulina (10  $\mu\text{M}$ ) em relação ao controlo. A análise dos resultados da Figura 14 mostrou ainda que a neuroprotecção pela insulina é dependente da dose, uma vez que os valores encontrados para 10  $\mu\text{M}$  de insulina foram estatisticamente superiores aos obtidos com 0,3  $\mu\text{M}$ , para as concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $p<0.001$ ;  $n=12$ ).

Com o objectivo de se observar a dependência do  $\text{Ca}^{2+}$  externo no papel neuroprotector da insulina face aos insultos com  $\text{H}_2\text{O}_2$ , incubaram-se as células em solução externa contendo 25 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  e em solução externa sem  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 15) e posteriormente procedeu-se ao mesmo esquema experimental usado na experiência anterior.



**Figura 15. Efeito do Ca<sup>2+</sup> externo no efeito protector da insulina a agressões celulares com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** As células de neuroblastoma foram incubadas em solução externa com cálcio (à esquerda) e em solução externa sem cálcio (à direita) e tratadas com insulina a 0,3 µM e 10 µM. Posteriormente, foram expostas a 100 µM (barras pretas), 300 µM (barras listadas) e 600 µM (barras brancas) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Observou-se neuroprotecção da insulina nas duas condições, sendo este efeito mais acentuado na ausência de Ca<sup>2+</sup>. Significância estatística em relação aos controlos: p>0.05 – diferença não significativa; 0.01<p<0.05 – diferença significativa (\*); 0.001<p<0.01 – diferença muito significativa (\*\*); p<0.001 – diferença altamente significativa (\*\*\*); n=8; barra de erro S.E.M.

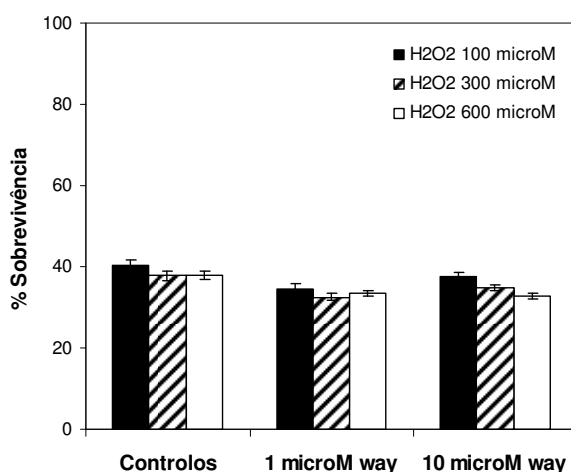
Os resultados apresentados na Figura 15 mostram que a mortalidade causada pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> era atenuada com a insulina, quando as células eram incubadas com a solução externa com e sem Ca<sup>2+</sup>. De uma maneira geral, essa protecção foi mais marcada na ausência de Ca<sup>2+</sup> externo. No entanto, é de realçar que os índices de mortalidade causados pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram mais elevados com a solução externa sem Ca<sup>2+</sup> (ver valores de controlo). Igualmente, o efeito da dose de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na mortalidade é mais acentuado nas condições de ausência de Ca<sup>2+</sup>. Estas comparações levantam questões sobre o aparente aumento do efeito neuroprotector da insulina quando as experiências foram executadas na ausência de Ca<sup>2+</sup>. Este aparente aumento é patenteado no maior nível de significância nas diferenças encontradas em condições de ausência de Ca<sup>2+</sup>.

É de realçar que em ambas condições (solução externa com e sem Ca<sup>2+</sup>), o efeito neuroprotector é mais reduzido quando comparado com a experiência efectuada com meio de cultura (Figura 14). Contrariamente ao observado na Figura 14, em que a insulina protegeu mais com concentrações crescentes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, no caso dos resultados da Figura 15, quanto maior a concentração do agressor, menor foi o efeito

neuroprotector da insulina. Igualmente relevante, foi constatar que as amostras quando incubadas nas soluções externas (com e sem  $\text{Ca}^{2+}$ ) apresentavam valores de absorvância marcadamente inferiores aos adquiridos quando a incubação era feita com o meio de cultura (meio de diferenciação) (Figura 14). Assim, será importante revisitar a questão da dependência do  $\text{Ca}^{2+}$  externo no futuro, conduzindo experiências semelhantes mas com meios de cultura alterados, isto é, com e sem  $\text{Ca}^{2+}$ .

### 3.3.1.2 Tratamento com WAY

Como referido na introdução teórica da presente dissertação, a insulina aumenta a neuroexcitabilidade inibindo correntes de potássio, que, em células de neuroblastoma N1E-115, são mediados por canais tipo ERG (Lima *et al.*, 2008). Com o objectivo de averiguar se o efeito neuroprotector da insulina contra insultos de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figura 14 e 15) segue a mesma via celular do efeito da insulina na neuroexcitabilidade, isto é, a via que modula os canais ERG, incubaram-se as células de neuroblastoma com várias concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (100 $\mu\text{M}$ , 300 $\mu\text{M}$  e 600 $\mu\text{M}$ ), na presença e ausência do bloqueador específico de canais ERG, WAY (1  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$ ). Consequentemente, procederam-se a ensaios de viabilidade celular (MTT), como anteriormente.



**Figura 16. Ausência do efeito de WAY na diminuição de sobrevivência celular induzida por várias concentrações do agressor  $\text{H}_2\text{O}_2$ .** As células N1E-115 foram expostas a 100  $\mu\text{M}$  (barras pretas), a 300  $\mu\text{M}$  (barras listradas) e a 600  $\mu\text{M}$  (barras brancas) de agressor  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Os valores expressos em % de sobrevivência decaem ligeiramente com o aumento de concentração do agressor (controlo). Aplicou-se 1 $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$  de WAY o que não induziu efeito significativo na sobrevivência das células N1E-115. O

WAY esteve sempre presente no meio de cultura (meio de diferenciação). Significância estatística:  $p > 0.05$  – diferença não significativa;  $n=12$ ; barra de erro S.E.M.

Neste estudo obteve-se uma taxa de mortalidade aproximadamente 40%, quando as células foram incubadas com  $H_2O_2$  sem WAY (controlos). Verificou-se também que esta taxa aumenta ligeiramente com o aumento de concentração deste agressor. O tratamento com WAY (10  $\mu M$ ) não alterou a sobrevivência celular face às agressões com todas as concentrações de  $H_2O_2$  usadas. Se tanto, houve uma pequena diminuição nos valores que, de qualquer modo, não são significativos ( $p > 0,05$ ). Assim, se bloquearmos os canais ERG não fomentamos qualquer neuroprotecção face a insultos com o  $H_2O_2$ . Consequentemente, a insulina não recruta a via dos canais ERG no seu mecanismo de neuroprotecção.

#### 3.3.1.3 Relação de $H_2O_2$ com o cálcio citoplasmático

Com o objectivo de se verificar o efeito de várias concentrações de  $H_2O_2$  (100  $\mu M$ , 300  $\mu M$  e 600  $\mu M$ ) no cálcio citoplasmático dos neuroblastomas, procederam-se a medições de fluorescência, recorrendo a Fluo-3AM, como descrito na secção 2.6 deste relatório.

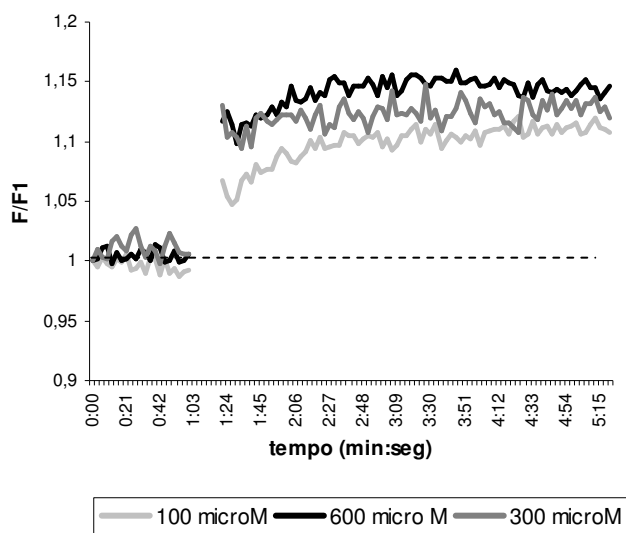


Figura 17. O  $H_2O_2$  induz um aumento lento mas não reversível no  $Ca^{2+}$  citoplasmático em células de neuroblastoma N1E-115. Exemplos de registos de fluorescência proveniente de células carregadas com

Fluo-3 AM. A aplicação das várias concentrações (100  $\mu\text{M}$ , 300  $\mu\text{M}$  e 600  $\mu\text{M}$ ) de  $\text{H}_2\text{O}_2$  correspondente à descontinuidade temporal no registo induziu um aumento lento nos valores de fluorescência registados a cada 2 segundos (0,5 Htz) e normalizados à primeira leitura (F/F1).

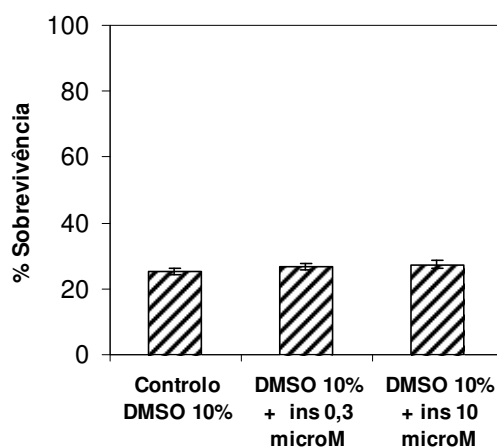
Verificou-se que existe um aumento lento nos valores de fluorescência em resposta a qualquer uma das concentrações testadas, sendo que o maior aumento corresponde à exposição com maior concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Este aumento lento induzido pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$  (cerca de 10%) não foi transitório uma vez que os valores de fluorescência, mantiveram-se elevados uma hora após a adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a todas as concentrações (dados não mostrados na Figura 17).

Assim, mostrou-se que o  $\text{H}_2\text{O}_2$  perturba a homeostase de  $\text{Ca}^{2+}$  e que essa perturbação é persistente o que pode explicar a morte neuronal induzida pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$  anteriormente verificada, uma vez que os resultados sugerem que a célula não consegue repor a dinâmica “normal” do  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático após a agressão.

### 3.3.2 DMSO

#### 3.3.2.1 Tratamento com insulina

Com o intuito de se averiguar o eventual efeito neuroprotector da insulina perante a exposição das células ao agressor DMSO a 10%, procederam-se a ensaios de viabilidade celular (MTT).

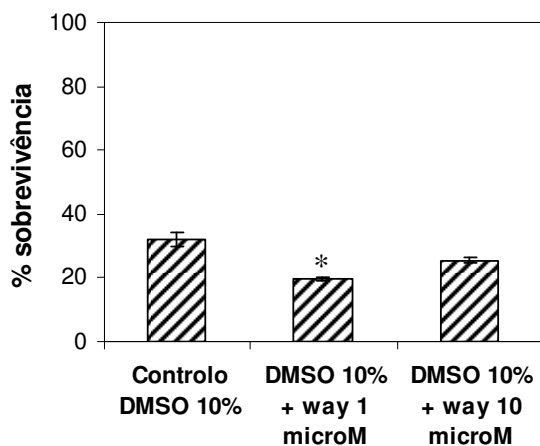


**Figura 18.** Ausência do efeito da insulina perante a presença do agressor DMSO a 10%. As células N1E-115 foram expostas a DMSO 10%. Os valores expressos em % de sobrevivência não foram alterados com a presença de insulina a 0,3  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$  ( $p > 0,05$  – diferença não significativa;  $n=12$ ; barra de erro S.E.M).

O tratamento com DMSO a 10% resultou num dramático decréscimo na sobrevivência das células para aproximadamente 25% das células. Quando o mesmo tratamento foi repetido mas na presença de insulina, tanto a 0,3  $\mu\text{M}$  como a 10  $\mu\text{M}$ , não se observaram quaisquer alterações no efeito na taxa de sobrevivência ( $p > 0,05$ ). Os resultados mostram então que a insulina é ineficaz perante a agressão operada pelo DMSO.

## 3.3.2.2 Tratamento com WAY

Com o objectivo de verificar se o bloqueamento dos canais ERG poderiam alterar a toxicidade pelo DMSO, aplicou-se o DMSO (10%) na presença de WAY (1  $\mu$ M e 10  $\mu$ M) e, os resultados de % de sobrevivência comparados com o respectivo controlo (Figura 19)



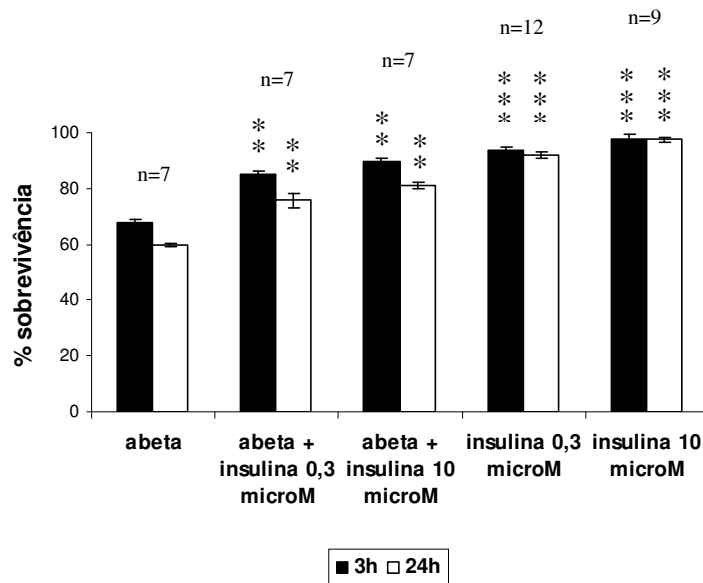
**Figura 19. Ausência do efeito neuroprotector do WAY perante a presença do agressor DMSO a 10%.** As células N1E-115 foram exposta a DMSO 10%. Os valores expressos em % de sobrevivência não foram alterados com a presença de WAY 10  $\mu$ M ( $p > 0,05$  – diferença não significativa;  $n = 12$ ; barra de erro S.E.M.). No entanto, com WAY 1  $\mu$ M, observou-se um pequeno decréscimo na sobrevivência celular aquando da aplicação de DMSO (diferença pouco significativa (\*);  $0,01 < p < 0,05$ ;  $n = 12$ ; barra de erro S.E.M.).

O DMSO 10% reduziu a sobrevivência das células em cerca de 70%. Em células tratadas com WAY, não se observou qualquer aumento na viabilidade celular. Inclusivamente, a 1  $\mu$ M de WAY, observou-se um pequeno decréscimo adicional na taxa de sobrevivência. Estes resultados mostram inequivocamente que o WAY não protege as células de neuroblastoma perante a toxicidade inferida pelo DMSO.

3.3.3  $\beta$ -amilóide

3.3.3.1 Tratamento com insulina

O estudo da toxicidade da  $\beta$ -amilóide, bem como o do possível papel neuroprotector da insulina, são centrais na presente dissertação. Com o objectivo de investigar o efeito do péptido  $A\beta_{1-42}$  na viabilidade celular e verificar se a insulina oferece um efeito neuroprotector na presença de  $A\beta_{1-42}$ , procedeu-se à incubação de culturas de células de neuroblastoma N1E-115 com 1  $\mu$ M de  $A\beta_{1-42}$  durante 3 e 24 horas. Tais incubações foram repetidas em amostras previamente tratadas com insulina (0,3  $\mu$ M e 10  $\mu$ M). Consequentemente, procederam-se a ensaios de viabilidade celular (MTT) como descrito anteriormente. Os resultados encontram-se sumarizados na Figura 20.



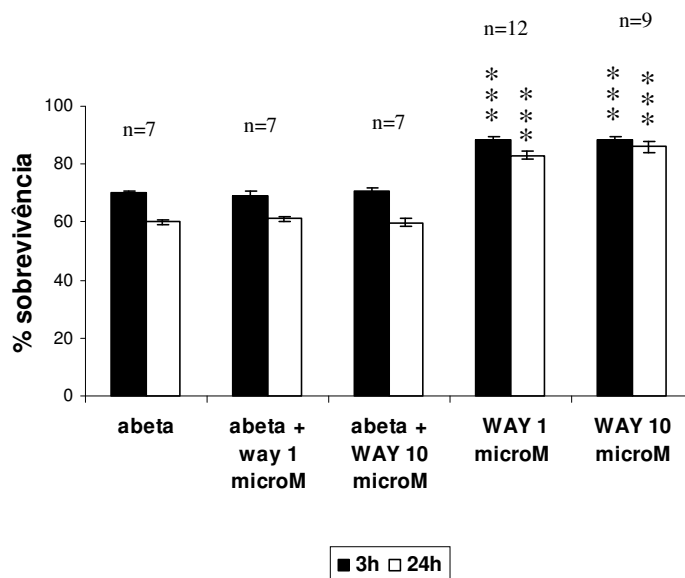
**Figura 20. Efeito da insulina na diminuição da sobrevivência celular induzida por  $A\beta_{1-42}$ .** As células N1E-115 foram expostas 1  $\mu$ M de  $A\beta_{1-42}$  (abeta) durante 3 horas (barras pretas) e 24 horas (barras brancas). Os valores expressos em % de sobrevivência decaem com o aumento do tempo de exposição. Aquando da co-aplicação de 0,3  $\mu$ M e 10  $\mu$ M de insulina, observou-se uma diminuição da mortalidade induzida pela  $A\beta_{1-42}$ . Efeitos notórios tanto às 3 horas como às 24 horas de incubação. Os resultados da aplicação controlo da insulina (na ausência de  $A\beta_{1-42}$ ) são igualmente apresentados para comparação. Significância estatística em relação aos valores adquiridos com  $A\beta_{1-42}$  apenas:  $p > 0.05$  – diferença não significativa;  $0.01 < p < 0.05$  – diferença significativa (\*);  $0.001 < p < 0.01$  – diferença muito significativa

(\*\*);  $p < 0.001$  – diferença altamente significativa (\*\*\*); o tamanho das amostras encontram-se apresentados no topo das colunas da Figura; barra de erro S.E.M.

Na análise dos resultados da Figura 20, pode-se constatar primariamente o efeito neurotóxico do  $A\beta_{1-42}$  – a taxa de sobrevivência às 3 horas de incubação ( $67,7 \pm 1,32\%$ ) é cerca de 10% superior em relação à incubação de 24 horas ( $59,5 \pm 0,57\%$ ) com este agressor. Foi interessante observar-se que na presença de insulina os valores de viabilidade celular aumentaram significativamente: quando a concentração de insulina aplicada foi de  $0,3 \mu\text{M}$  a taxa de sobrevivência das células às 3 horas foi de cerca de  $85,1 \pm 1,07\%$  e às 24 horas foi de cerca de  $75,7 \pm 1,54\%$ . Já quando se aplicou insulina numa concentração de  $10 \mu\text{M}$  observou-se que às 3 horas  $89,5 \pm 1,46\%$  das células sobreviveram e às 24 horas essa sobrevivência foi de  $81,3 \pm 1,18\%$ . Este facto demonstra que a insulina, tanto a  $0,3 \mu\text{M}$  como a  $10 \mu\text{M}$ , protegeu as células numa taxa de 15% e 20% respectivamente. Estas diferenças nos valores encontrados, que materializam o efeito da insulina, foram significativas ( $p < 0,001$ ). Igualmente observou-se um efeito neuroprotector ligeiramente mais elevado com a dose mais alta de insulina ( $10 \mu\text{M}$ ) que não foi significativo.

### **3.3.3.2 Tratamento com WAY**

Com o objectivo de averiguar se o efeito neuroprotector da insulina contra insultos com  $A\beta_{1-42}$  (Figura 14 e 15) recruta a mesma via celular do efeito da insulina na neuroexcitabilidade, ou seja, a via que modula os canais ERG, incubaram-se células de neuroblastoma com  $1 \mu\text{M}$   $A\beta_{1-42}$  durante 3 e 24 horas, na presença e ausência do bloqueador específico de canais ERG, WAY ( $1 \mu\text{M}$  e  $10 \mu\text{M}$ ). Consequentemente, procederam-se aos ensaios de viabilidade celular (MTT), como anteriormente descrito.



**Figura 21. Ausência de efeito do WAY na diminuição de sobrevivência celular induzida por  $A\beta_{1-42}$ .** As células N1E-115 foram expostas a 1  $\mu\text{M}$  de  $A\beta_{1-42}$  durante 3 (barras pretas) e 24 horas (barras brancas). Os valores expressos em % de sobrevivência decaem com o aumento do tempo de exposição. Quando se aplicou o  $A\beta_{1-42}$  a poços previamente tratados com 1  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$  de WAY, não se observaram quaisquer alterações na mortalidade induzida pelo  $A\beta_{1-42}$ . Os resultados da aplicação controle da WAY (na ausência de  $A\beta_{1-42}$ ) são igualmente apresentados para comparação. Significância estatística em relação aos valores adquiridos com  $A\beta_{1-42}$  apenas:  $p > 0.05$  – diferença não significativa;  $0.01 < p < 0.05$  – diferença pouco significativa (\*);  $0.001 < p < 0.01$  – diferença significativa (\*\*);  $p < 0.001$  – diferença muito significativa (\*\*\*) ; o tamanho das amostras encontram-se apresentados no topo das colunas do gráfico; barra de erro S.E.M.

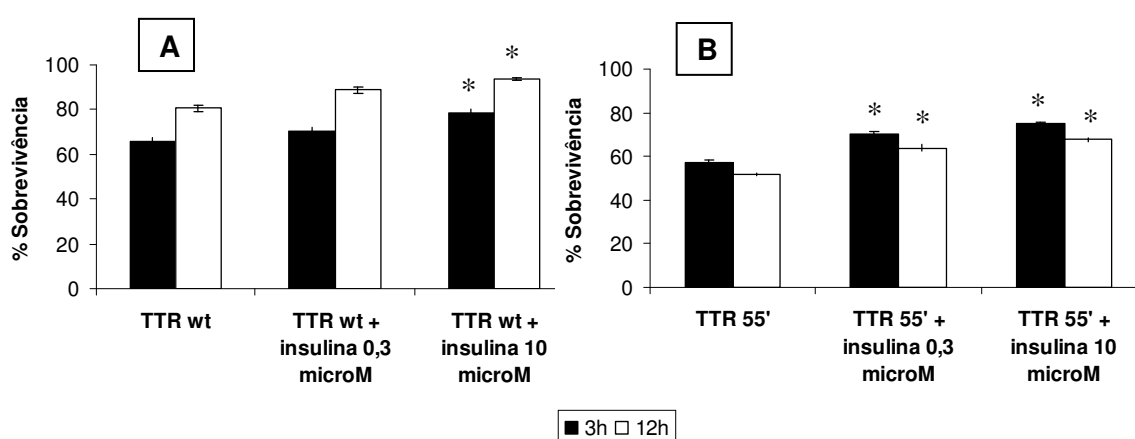
Os resultados explanados na Figura 21 mostram que, a incubação das células com 1  $\mu\text{M}$  de  $A\beta_{1-42}$ , sem qualquer outro tipo de tratamento, provoca taxas de mortalidade similares ao observado anteriormente (Figura 20). Ou seja, este agressor provoca a morte celular em cerca de 30% às 3 horas de exposição e 40% às 24 horas. Muito importante foi constatar que o WAY, quer a 1  $\mu\text{M}$  quer a 10  $\mu\text{M}$ , não teve nenhum efeito perante esta agressão, o que é corroborado pelos testes estatísticos efectuados ( $p > 0,5$ ). À semelhança com o que foi observado para as agressão com  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a inibição dos canais ERG não fomentam qualquer protecção contra a toxicidade do  $A\beta$ .

## 3.3.4 TTRs

Como mencionado na Introdução teórica da presente dissertação, existem dados em número crescente em que apontam funções importantes da transtirretina (TTR) na fisiologia do sistema nervoso e nos fenómenos associados com neuropatologias. Neste sentido, é relevante investigar sobre as funções neuroprotectoras ou neurotóxicas da TTR, na sua forma nativa (*wt* - *wild type*) ou mutada. Assim, estudou-se no presente trabalho os efeitos da TTR *wt* e a TTR 55' (uma das mutações mais tóxicas) na viabilidade celular de neuroblastomas em cultura. Investigou-se também se a insulina (e o WAY) poderia influenciar de qualquer forma tais efeitos.

## 3.3.4.1 Tratamento com insulina

À semelhança de todos os outros agressores usados neste trabalho, também para a TTR se quis verificar o eventual efeito neuroprotector da insulina na presença deste agressor ao longo do tempo. Para tal, incubaram-se as células com 1  $\mu\text{M}$  de TTR *wt* e seus variantes (mutação 55') durante 3 e 12 horas. Repetiu-se o mesmo em amostras com o pré-tratamento com a insulina (0,3 e 10  $\mu\text{M}$ ), segundo o mesmo procedimento anteriormente descrito. Procedeu-se então a ensaios de viabilidade celular (MTT). A Figura seguinte mostra os resultados obtidos.



**Figura 22.** Efeito da TTR *wt* e TTR 55' na viabilidade de celular de neuroblastoma N1E-115, na ausência e presença de insulina. As células foram incubadas com TTR *wt* (A) e TTR 55' (B), ambos a uma concentração de 1  $\mu\text{M}$ , durante 3 horas (barras pretas) e 12 horas (barras brancas).

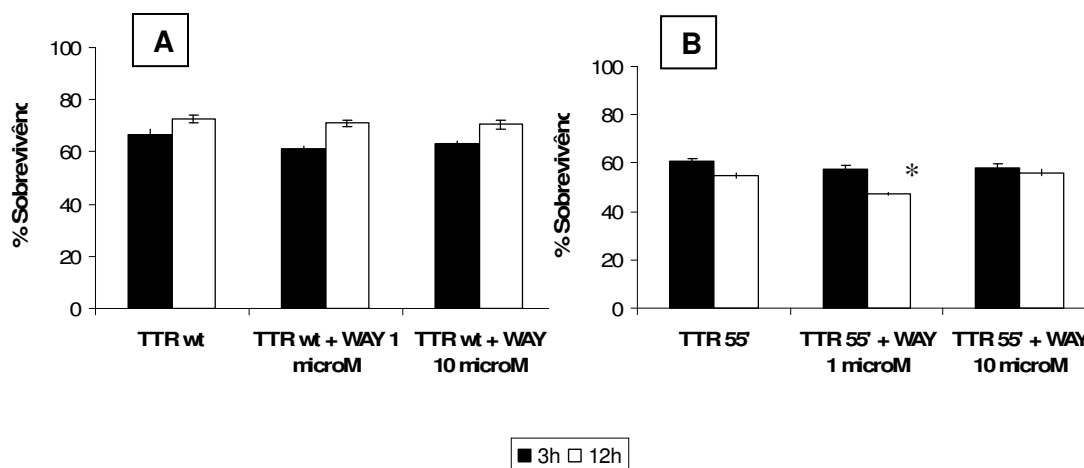
Ao longo deste período de tempo, os valores expressos em % de sobrevivência aumentam com TTR *wt*, e decaem com TTR 55'. As taxas de sobrevivência aumentam nos dois casos quando a incubação se dá nos poços previamente tratados com 0,3  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$  de insulina. O efeito neuroprotector da insulina é notório tanto às 3 horas como às 12 horas de incubação. A insulina esteve sempre presente no meio de cultura, durante o decorrer do ensaio. Significância estatística em relação aos controlos:  $p > 0.05$  – diferença não significativa;  $0.01 < p < 0.05$  – diferença pouco significativa (\*);  $0.001 < p < 0.01$  – diferença significativa (\*\*);  $n = 14$ ; barra de erro S.E.M. Nas incubações com TTR *wt* existe diferença significativa entre as incubações de 3 e 12 horas, tanto na condição de controlo, como nos tratamentos prévios com insulina (não mostrado na Figura).

A TTR *wt* tem por si só algum efeito neuroprotector ao longo do tempo, uma vez que às 3 horas a taxa de sobrevivência é de aproximadamente  $65,7 \pm 1,60\%$  e ao fim de 12 horas essa taxa apresenta uma subida para  $80,7 \pm 1,38\%$ , este facto é corroborado pelos estudos estatísticos efectuados, existindo diferença significativa entre estes valores ( $0,01 < p < 0,05$ ). Quando a TTR *wt* foi incubada na presença de insulina, observa-se um pequeno acréscimo nos valores de sobrevivência, significativo para o caso de  $10 \mu\text{M}$  de insulina ( $0,001 < p < 0,01$ ).

Em relação ao mutante 55' da TTR, observou-se que a sua adição se torna mais prejudicial para as células ao longo do tempo. De notar que às 3 horas este agressor matou cerca de  $42,96 \pm 1,13\%$  das células e às 12 horas,  $48,37 \pm 0,53\%$ . No entanto, esta agressão não foi tão eficaz, na presença de  $0,3 \mu\text{M}$  de insulina, baixando cerca de 10% a taxa de mortalidade e, cerca de 15%, quando a insulina se encontrava a uma concentração de  $10 \mu\text{M}$ . O efeito protector das duas concentrações de insulina, face aos insultos operados pela TTR 55' é confirmado pela diferença significativa dos respectivos valores (ver Figura 22).

## 3.3.4.2 Tratamento com WAY

À semelhança do efectuado para o  $\beta$ -amilóide e  $H_2O_2$ , pretendeu-se averiguar se os canais ERG influenciam de alguma maneira os efeitos da TTR na viabilidade celular. Assim, repetiram-se as experiências com TTR *wt* e TTR55' (3.3.4.1; Figura 22) na ausência e presença de WAY (1  $\mu$ M e 10  $\mu$ M). A Figura 23 mostra os resultados obtidos.



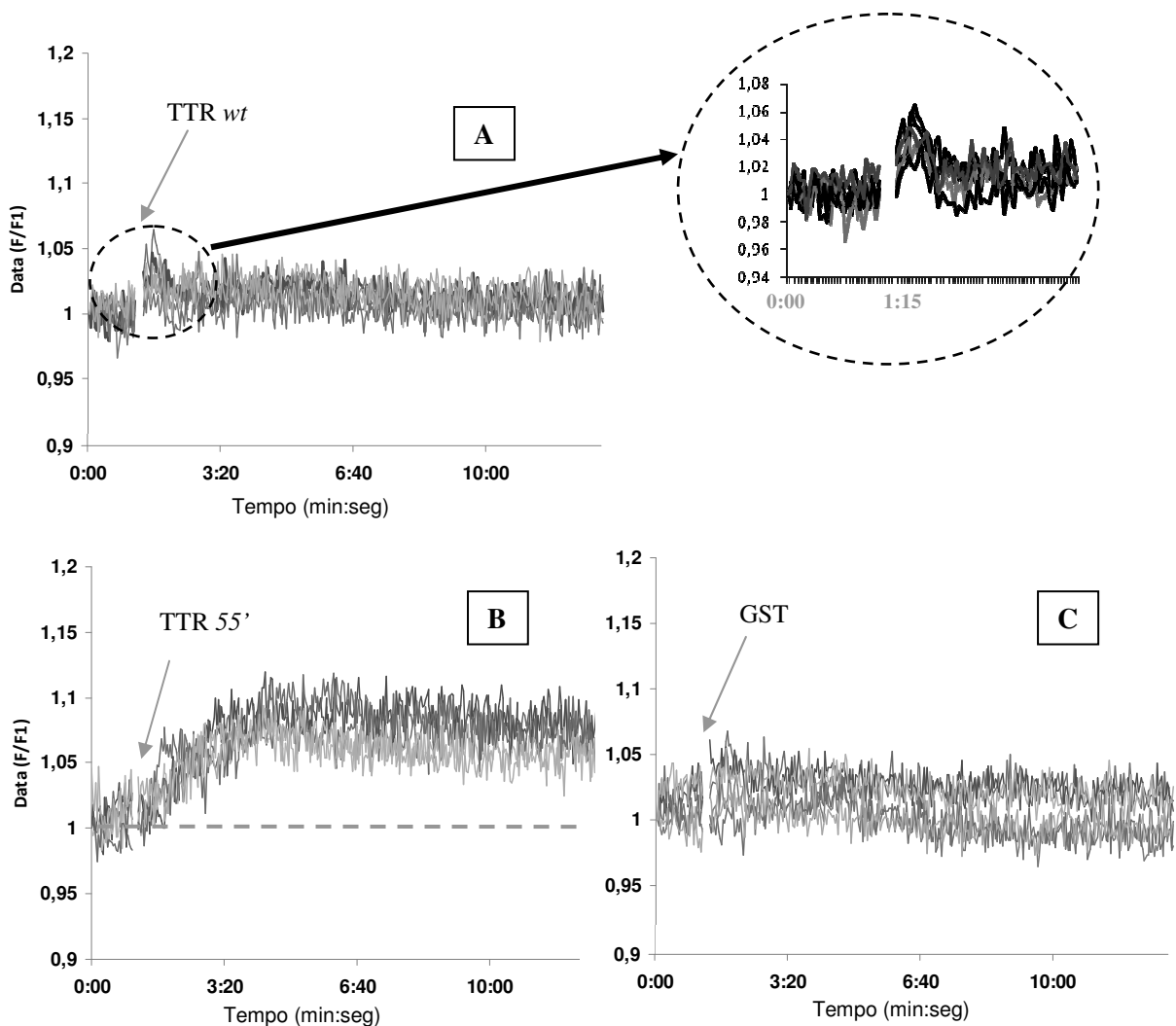
**Figura 23.** Ausência de efeito do WAY no aumento da sobrevivência celular induzido pela TTR *wt* (A) e na diminuição da sobrevivência celular causado pelo TTR 55' (B). As células foram incubadas com TTR *wt* (A) e TTR 55' (B), ambos a uma concentração de 1  $\mu$ M, durante 3 horas (barras pretas) e 12 horas (barras brancas). Ao longo deste período de tempo, os valores expressos em % de sobrevivência aumentam com TTR *wt*, e decaem com TTR 55'. De uma maneira geral, as taxas de sobrevivência não são alteradas nos dois casos quando a incubação se dá nos poços previamente tratados com 01  $\mu$ M e 10  $\mu$ M de WAY- excepção observada com 10  $\mu$ M de WAY em que se observa um pequena diminuição nos valores, ao fim de 12 horas de incubação com 10  $\mu$ M de WAY. O WAY esteve sempre presente no meio durante o decorrer do ensaio de MTT. Significância estatística em relação aos controlos:  $p > 0.05$  – diferença não significativa;  $0.01 < p < 0.05$  – diferença pouco significativa (\*);  $n = 14$ ; barra de erro S.E.M.

Como observado na experiência anterior (3.3.4.1; Figura 22), a incubação com TTR *wt* resultou num efeito neuroprotector ao longo do tempo, e, ao viés, a incubação com TTR 55' resultou num decréscimo dos valores de sobrevivência celular. No entanto, ao contrário da insulina, o WAY, quer a 1  $\mu$ M quer a 10  $\mu$ M, não alterou significativamente o efeito destes. Claramente, não aumentou os valores de viabilidade. Quanto muito, assistiu-se a um pequeno acréscimo nos índices. De qualquer modo, tal como anteriormente observado para as agressões de  $H_2O_2$  e de  $\beta$ -amilóide, é claro que

bloqueando os canais ERG com WAY, não se activa qualquer fenómeno de neuroprotecção sobre o efeito das TTRs.

### 3.3.4.3 Relação de TTRs com o cálcio citoplasmático

Considerando os resultados dos testes de viabilidade celular que mostram que a TTR *wt*, TTR 55' têm um efeito antagónico na sobrevivência da célula, investigou-se se a TTR *wt*, TTR 55' teriam um efeito na dinâmica de  $Ca^{2+}$  citoplasmático. À semelhança disto também se pretendeu inferir na eventual dependência de GST, uma TTR associada a Glutathione S-transferase nesta mesma dinâmica do  $Ca^{2+}$  citoplasmático. Assim, adicionaram-se estes amilóides a células de neuroblastoma carregadas com Fluo-3, um marcador fluorescente sensível ao  $Ca^{2+}$ , monitorizando-se a fluorescência.



**Figura 24. A TTR *wt* e a TTR 55' induzem diferentes alterações no  $Ca^{2+}$  citoplasmático em células de neuroblastoma N1E-115.** Exemplos de registo da fluorescência proveniente de células carregadas com Fluo-3 AM. A aplicação de 1  $\mu$ M TTR *wt* (A), resultou num pequeno e transitório aumento nos níveis de fluorescência. O pequeno aumento transitório é mostrado no detalhe da Figura. A aplicação de 1  $\mu$ M TTR 55' (B) induziu um aumento considerável e duradouro nos níveis de fluorescência. Em (C), a adição de 1  $\mu$ M de GST não induziu mudanças resolvíveis na fluorescência. Leituras de fluorescência a cada 2 segundos (0.5 Htz) e normalizados à primeira leitura (F/F1).

A adição de TTR *wt* (1 $\mu$ M) evocou um pequeno aumento nos valores de fluorescência. Esse aumento era transitório em que a fluorescência baixava para valores basais em menos de 15 segundos. A natureza desta resposta sugere assim que TTR *wt* produz um aumento ténue de  $Ca^{2+}$ , que é consequentemente extraído pela célula.

Em relação ao mutante TTR 55', observou-se que também este eleva os níveis de  $Ca^{2+}$  citoplasmático na célula. No entanto, este aumento é mais elevado e progressivo ao longo do tempo. Ao contrário do que se observa na resposta à TTR *wt*, os níveis de fluorescência não voltam aos valores basais. Já quando as células foram expostas à TTR associada a Glutathione S-transferase (GST), não se observaram quaisquer alterações nos valores de fluorescência.

## IV. DISCUSSÃO DE RESULTADOS

Como foi referido anteriormente os neuroblastomas constituem um excelente modelo neuronal, como tal estas células contém entre muitos outros componentes de membrana, canais iónicos e receptores de insulina (Ostlund *et al.*, 2001). Ao ter isto em conta e o tendo em mente os objectivos deste trabalho testou-se o efeito neuroprotector da insulina, tanto *per si*, como na presença de vários agressores relevantes na DA. Averiguou-se ainda se os canais ERG responsáveis pela corrente de  $K^+$  sensível à insulina, estão envolvidos nas vias do mecanismo através do qual se dá esta neuroprotecção.

### 4.1 Efeito da insulina *per si* nas taxas de sobrevivência controlo vs período de incubação ao longo do tempo

Os resultados demonstraram que a insulina não induziu mudanças marcadas nas taxas de sobrevivência. Na análise global destes resultados poder-se-á referir que a insulina não infere um efeito neuroprotector marcado nos dias de cultura em que a mortalidade não é considerável. Só se observa alguma neuroprotecção ao fim de 6 dias de cultura no caso em que há mudança de meio, quando os níveis de mortalidade aumentam consideravelmente.

Os resultados correspondentes aos ensaios de fluorescência evidenciaram também que a insulina promove um aumento do  $Ca^{2+}$  citoplasmático nos neuroblastomas, sendo este processo transitório. Ou seja, as células ao fim de alguns segundos após a aplicação de insulina conseguem restabelecer a homeostase de  $Ca^{2+}$ . Esta observação foi também recentemente reportada como sendo uma consequência da função da insulina como hormona aceleradora de metabolismo celular por Henquin (2009).

É um facto conhecido de que a insulina atravessa a barreira hemato-encefálica e entra no cérebro (Baskin *et al.*, 1987; Baura *et al.*, 1993), sendo que uma pequena porção de insulina que é encontrada neste órgão é produzida no mesmo (Woods, 2003; Banks, 2004). Sabe-se ainda que esta hormona quando encontrada no cérebro, desempenha vários papéis fisiológicos como a regulação de ingestão de alimento (Woods *et al.*, 1979; Spanswick *et al.*, 2000) ou a sua acção nas funções cognitivas

(Havrankova *et al.*, 1978; Freychet, 2000). Os resultados apresentados neste relatório indicam que a acrescentar a essa lista de papéis desempenhados pela insulina no cérebro, esta hormona desempenhe também um ténue papel de neuroprotector natural.

### **4.2 Efeito neuroprotector da insulina em neuroblastomas na presença de agressores**

Os estudos demonstraram que existe um efeito neuroprotector por parte da insulina aquando a exposição dos agressores testados, exceptuando o DMSO 10%, que como anteriormente referido, é um agressor de membrana celular (Kimhi *et al.*, 1976). Este facto leva a crer que a acção neuroprotectora da insulina depende da integridade da membrana.

Em relação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verificou-se que quanto maior a concentração deste agressor, mais morte celular é observada. Este resultado vai de encontro com os estudos desenvolvidos por Dringen *et al.* (2005), que constatou que a sobrecarga celular de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se traduz em stress oxidativo na célula, o que provoca um desequilíbrio persistente entre a produção de radicais derivados do peróxido e a sua remoção, resultando em danos neuronais e morte. Surpreendentemente os resultados apresentados neste relatório, mostraram que quanto maior a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aplicado e por consequência maior a intensidade da agressão, mais intensa é a resposta neuroprotectora por parte da insulina. Tal observação é difícil de ser explicada, tendo em conta o estudo de Zhong e Lee (2007), que obtiveram resultados que sugeriam que a resistência/insensibilidade neuronal à insulina poderia ser induzida por uma sobrecarga de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, resultando na morte neuronal. No entanto, Moreira *et al.* (2004) observou que a insulina protegia neurónios de ratos diabéticos que se encontravam sob stress oxidativo. Este stress oxidativo, provocado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e focalizado na mitocôndria dos neurónios foi parcialmente revertido aplicando insulina. Este facto é interessante pois pode apontar para uma via de neuroprotecção por parte da insulina à fisiologia mitocôndrial dos neuroblastomas.

Este estudo debruçou-se também na agressão temporal por parte da  $\beta$ A. Os resultados demonstraram que a agressão se intensifica ao longo do tempo. Este facto pode ser explicado através da possível e progressiva agregação do  $\beta$ A, tornando-a cada vez mais tóxica. Como descrito na introdução teórica deste relatório, esta toxicidade

pode estar associada ao facto de fomentar a disfunção de correntes de  $\text{Ca}^{2+}$  (Stutzmann, 2005), inibe canais de potássio, bloqueando as suas correntes (Murphy *et al.*, 1996) e promove stress oxidativo mitocondrial. Verificou-se também que a insulina protegeu as células, sendo que esta neuroprotecção foi dependente da concentração de insulina. Ou seja, quanto maior a concentração de insulina aplicada, maior este efeito neuroprotector. Esta constatação não foi de modo algum inesperada, uma vez que Gasparini *et al.* (2001) e Selkoe (2001) mostraram que a insulina inibia os efeitos tóxicos da  $\beta\text{A}$ . Também Hong *et al.* (1997) e Lesort *et al.* (2000) evidenciaram que a insulina reduzia a fosforilação da proteína tau, um dos principais efeitos do  $\beta\text{A}$ . E Lee em 2001, observou que um decréscimo da insulina elevava a toxicidade de  $\beta\text{A}$  no cérebro. À semelhança do agressor  $\text{H}_2\text{O}_2$ , Moreira *et al.* (2004) mostrou ainda que na presença de  $\beta\text{A}$ , a insulina reverte o efeito tóxico do stress oxidativo mitocondrial.

Por fim testou-se o efeito da TTR *wt* e de uma variante mutante (55') ao longo do tempo em neuroblastomas. Os resultados mostraram que a TTR *wt* tem por si só algum efeito neuroprotector ao longo do tempo. Esta observação pode ser de algum modo apoiada pelo estudo Costa *et al.* (2008) que provou que a TTR *wt* se comporta como uma molécula neuroprotectora em cultura celular, inibindo efeitos de apoptose. Neste caso a insulina demonstrou um ligeiro efeito protector adicional à protecção por parte da própria TTR *wt*. Em relação ao mutante 55', verificou-se que se torna mais prejudicial aos neuroblastomas ao longo do tempo. No entanto, esta agressão perdeu alguma intensidade, na presença de insulina. Como foi documentado em Costa *et al.* (2003) é um facto que variantes derivadas de mutações de TTR afectam a homeostase de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático e promovem stress oxidativo nas células. Levanta-se então a possibilidade de que a insulina à semelhança do que foi referido para as agressões de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\beta\text{A}$ , tenha revertido o efeito nocivo provocado pelo stress oxidativo (Moreira *et al.*, 2004). Pode então dizer-se que para se observar um efeito neuroprotector da insulina intenso é necessário haver uma agressão efectiva.

### **4.3 Mecanismo da neuroprotecção da insulina**

Com excepção dos resultados encontrados para o efeito de DMSO que é inalterado por pré-incubação com a insulina, os resultados com outros agressores testados permitem tecer algumas considerações sobre os mecanismos envolvidos. Para tal, foram úteis os resultados provenientes dos ensaios onde se utilizou WAY que bloqueia especificamente canais de potássio do tipo ERG, responsáveis pela corrente de  $K^+$  sensível à insulina em células diferenciadas de N1E-115 (Lima *et al.*, 2008). O presente estudo mostrou que a protecção da insulina não recruta a via dos canais de potássio ERG. Este facto remete para a evidência, de que a insulina apesar de modelar as correntes de potássio via ERG como descrito em estudos anteriores (Lima *et al.*, 2008), não é de todo a via que segue no seu mecanismo de neuroprotecção e de modo algum está relacionada com a via PKB-akt associada à neuroprotecção (Bayascas, 2008). Na realidade, os resultados são apoiados por literatura que levanta a possibilidade de uma via mitocondrial (Moreira *et al.*, 2004), pois estes três agressores testados provocam stress oxidativo nas mitocôndrias das células.

Em relação aos resultados de fluorescência, estes mostraram que TTR *wt*, se comporta de forma algo semelhante à insulina, promovendo um aumento de  $Ca^{2+}$  transitório na célula. Esta observação vai de encontro com os estudos de Costa *et al.* (2008), que provou que iões de  $Ca^{2+}$  estão envolvidos na protecção em cultura celular através da inibição da apoptose. Este estudo também demonstrou que os agressores  $H_2O_2$  e TTR 55' promovem um aumento de  $Ca^{2+}$  citoplasmático de forma progressiva e persistente ao longo do tempo, não permitindo às células restabelecer a homeostase de  $Ca^{2+}$  e como consequência levando à morte neuronal. Estas observações estão de acordo com os estudos de Mattson e Liu (2002) e de Teepker *et al.* (2007) que verificaram que  $H_2O_2$  promovia de facto um distúrbio na homeostase de  $Ca^{2+}$  citoplasmático em células neuronais. Costa *et al.* (2008) verificou mais tarde que formas mutadas de TTR também induziam essa perturbação celular. Dadas estas evidências e tendo em conta que a insulina actuou de forma protectora nos neuroblastomas, quando estes foram expostos aos agressores em causa ( $H_2O_2$  e TTR 55'), é possível dizer-se que o mecanismo de neuroprotecção da insulina recruta uma via relacionada com o  $Ca^{2+}$ .

No entanto, pode especular-se acerca da possível existência de outra via independente do cálcio, recrutada pela insulina no seu mecanismo de neuroprotecção,

tendo em conta a experiência em que as células foram incubadas em solução externa na presença e ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  e agredidas com  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Nesta experiência observou-se que a taxa de mortalidade aumenta com o aumento de concentração deste agressor, sendo esse aumento mais acentuado em condições de ausência de  $\text{Ca}^{2+}$ . Esta constatação leva a crer que o distúrbio na homeostase de  $\text{Ca}^{2+}$  que está documentada (Mattson e Liu, 2002; Teepker *et al.*, 2007) é apenas uma consequência celular deste agressor e não a via principal de agressão. Os resultados revelaram também que a insulina, quer na presença ou ausência de  $\text{Ca}^{2+}$ , neuroprotegeu as células. Isto poderá ter duas explicações: (1) a via de neuroprotecção da insulina é independente do  $\text{Ca}^{2+}$ ; (2) a via neuroprotectora da insulina depende de variações do  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático (induzidas pela insulina) mas estas são mediadas por libertação de  $\text{Ca}^{2+}$  armazenado em organelos envolvendo a activação do receptor de IP3 (dados não publicados) e, conseqüentemente, com reduzida dependência do  $\text{Ca}^{2+}$  externo.

De qualquer modo, é legítimo afirmar que poderá haver mais do que uma via no mecanismo de neuroprotecção da insulina, uma relacionada com o  $\text{Ca}^{2+}$  e outra independente deste.

## V. CONCLUSÕES

O presente trabalho permitiu tecer as seguintes conclusões:

- Em células de neuroblastoma N1E-115 mantidas em cultura, a insulina neuroprotege contra as agressões celulares: Peróxido de Hidrogénio ( $H_2O_2$ ), DMSO,  $\beta$ -amilóide ( $A\beta_{1-42}$ ), e mutante da transtirretina TTR 55'.
- O  $H_2O_2$  e TTR 55' evocam um aumento duradouro no  $Ca^{2+}$  citosólico assim como acontece com  $A\beta_{1-42}$ , como mostra a literatura. A natureza de tais respostas é consistente com o papel neurotóxico. Coerente com um papel neuroprotector, é o facto da insulina evocar um aumento transitório no  $Ca^{2+}$ .
- A toxicidade de  $H_2O_2$  aumenta com a sua concentração, e a neuroprotecção pela insulina é tanto maior quanto maior for a concentração do  $H_2O_2$ .
- A neuroprotecção da insulina é dependente da sua concentração.
- A TTR *wt* aumenta a sobrevivência celular ao passo que a TTR 55' a reduz; consistente com tais factos, a TTR *wt* induz um aumento breve, e pequeno no  $Ca^{2+}$  citoplasmático contrastando com uma elevação considerável, lenta e persistente nos níveis de  $Ca^{2+}$  causada pela TTR 55'.
- O tratamento com o bloqueador específico para os canais de  $K^+$  tipo ERG, Way-123,398-A-5, não induz qualquer protecção face a todas as agressões celulares usadas neste trabalho, o que leva a concluir que a via celular recrutada pela função neuroprotectora da insulina não é coincidente com a via da insulina que conduz à modulação inibitória dos canais ERG (neuroexcitatória). Ou seja, a via PKB-akt (relacionada com a neuroprotecção da insulina), é independente da via recrutada no efeito excitatório da insulina.

## VI. PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabalho levantou várias possibilidades para estudos futuros.

Primeiramente e dado que nos ensaios de viabilidade celular onde se incubaram as células em solução externa com e sem  $\text{Ca}^{2+}$ , o efeito neuroprotector da insulina era mais reduzido face à agressão de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , quando comparado com experiências efectuadas com meio de cultura; levanta-se a hipótese de que o meio de diferenciação tem algum componente que potencia o efeito neuroprotector da insulina. Seria interessante utilizar meios de cultura existentes com várias concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  na sua constituição. Não obstante disto e à semelhança destes ensaios que apenas se fizeram para  $\text{H}_2\text{O}_2$ , há que considerar a repetição da mesma experiência com os agressores de TTRs e  $\beta\text{A}$ .

As questões levantadas com os presentes resultados relacionados com a dependência de  $\text{Ca}^{2+}$  no fenómeno de neuroprotecção da insulina levanta a necessidade de se estudar em detalhe a natureza do efeito da insulina na dinâmica de  $\text{Ca}^{2+}$ . Esse estudo deverá recorrer a marcadores de  $\text{Ca}^{2+}$  com dois comprimentos de onda (como o Fura-2 ou Mag-Fura) de modo a se compararem respostas com maior acuidade através de medidas racionométricas.

Dado às considerações tecidas quanto à possível via mitocondrial seguida pela insulina no seu mecanismo de neuroprotecção, seria relevante aprofundar esta questão, recorrendo a ensaios adequados para o efeito, utilizando por exemplo marcadores específicos.

O facto da TTR *wt* se ter comportado como uma molécula neuroprotectora em células de neuroblastoma levantam várias possibilidades para investigações futuras. Por exemplo seria importante estabelecer se a TTR *wt* altera a neurotoxicidade do  $\text{A}\beta$ . De igual modo, parece premente investigar se o “desempenho” neuroprotector da insulina é alterado (e quem sabe potenciado) na presença de TTR *wt*.

## VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Åberg M.A.I., (2000). Peripheral infusion of IGF-1 induces neurogenesis in the adult rat hippocampus. *J. Neurosci.* 20: 2896-2903

Alkon DL., Thomas. JN., Miao-Kun S., Jarin H., (2008). Insulin, PKC signaling pathways and synaptic remodeling during memory storage and neuronal repair. *European Journal of Pharmacology*, 585: 76–87

Amano, T., Richelson, E., and Nirenberg, M. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **69**, 258–263.  
and Littauer, U. Z., Palfrey, C., Kimhi, Y., and Spector, I. (1976) in Third Decennial Review Conference: Cell, Tissue, and Organ Culture, pp. 333–337, National Cancer Institute Monograph, Lake Placid, NY

Banks W.A. (2004). The source of cerebral insulin. *Eur J Pharmacol.* 490:5-12

Barnham K.J., Masters C.L., Bush A.I. (2004). Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev. Drug Discov.*, 3: 205-14

Baskin, D.G., Porte, D. Jr, Guest, K. & Dorsa, D.M. (1983) Regional concentrations of insulin in the rat brain. *Endocrinology*, 112, 898–903.

Bayascas J.R., (2008). Dissecting the role of the 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) signalling pathways. *Cell Cycle.*, 7(19): 2978-82.

Bell GI, Pictet RL, Rutter WJ, Cordell B, Tischer E, Goodman HM, (1980). Sequence of the human insulin gene. *Nature*, 284(5751):26-32

Benech J.C., Lima P.A., Sotelo J.R., Brown E.R., (2000). Ca(2+) dynamics in synaptosomes isolated from the squid optic lobe. *J Neurosci Res.*; 62(6):840-6

Blake CC, Geisow MJ, Oatley SJ, Rerat B, Rerat C (1978) Structure of prealbumin: secondary, tertiary and quaternary interactions determined by Fourier refinement at 1.8 Å. *J Mol Biol* 121: 339–356.

Bloch-Damti A., Bashan N., (2005). Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal.* 7: 1553-1567

Brookmeyer R, Gray S, Kawas C., (1998). Projections of Alzheimer's disease in the United States and the public health impact of delaying disease onset. *Am J Public Health.*88(9):1337-42

Carro E, Trejo JL, Gomez-Isla T, LeRoith D, Torres-Aleman I (2002) Serum insulin-like growth factor I regulates brain amyloid-beta levels. *Nat Med* 8: 1390–7.

Caughey B., Lansbury P.T., (2003). Protofibrils, pores and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu Rev Neurosci.*, 26:267-98

Chang X, Jorgensen AM, Bardrum P, Led JJ., (1997). Solution structures of the R6 human insulin hexamer. *J. Biochem.*, 36(31):9409-22.

Chang L., Lambert M.P., Viola K.L., Gong Y., Yu J., Venton D.L., Krafft G.A., Finch C.E., Klein W.L., (2001). Nonfibrillar A $\beta$  toxins in AD: an immunoassay to characterize ADDL formation and identify ADDL-blocker compounds. *Soc. Neurosci. Abs.*, 27(11): 322

Cheatham, B., Vlahos, C. J., Cheatham, L., Wang, L., Blenis, J. and Kahn, C. R. (1994) Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation. *Mol Cell Biol*, **14**, 4902-4911.

Chen V., Anuzzo CD., (1982). Metabolic alterations in skeletal muscle of chronically streptozotocin-diabetic rats. *Arch. Biochem. Biophys.*, 217: 131-8

Choi SH, Leight SN, Lee VM, Li T, Wong PC, et al. (2007) Accelerated A-Beta deposition in APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>deltaE9</sup> mice with hemizygous deletions of TTR (transthyretin). *J Neurosci* 27: 7006–10.

Costa R, Gonçalves A, Saraiva MJ, Cardoso I (2008) Transthyretin binding to A-Beta peptide-impact on A-Beta fibrillogenesis and toxicity. *FEBS Lett* 582: 936–42

Craft S., Ashtana S., Newcomer J.W., Wilkinson C.W., Matos I.T., Baker L.D., Cherrier M., Lofgreen C., Latendresse S., Petrova A., Plymate S., Raskind M., Grimwood K., Veith R.C. (1999). Enhancement of memory in Alzheimer Disease with insulin and somatostatin, but not glucose. *Arch. Gen. Psychiatry* 56: 1135-1140

Craft S., Watson G.S. (2004). Insulin and neurodegenerative disease: shared and specific mechanisms. *Lancet Neurol.*, 3: 169-178

Dajas-Bailador F.A., Lima P.A., Wonnacott S., (2000). The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor subtype mediates nicotine protection against NMDA excitotoxicity in primary hippocampal cultures through a Ca(2+) dependent mechanism. *Neuropharmacology.*; 39(13):2799-807

Dahlmann B., (1979). Myofibrillar protein degradation and muscle proteinases in normal and diabetic rats. *Biochem. Med.*, 21: 33-9.

Das P, Parsons AD, Scarborough J, Hoffman J, Wilson J, Thompson RN, Overton JM, Fadool DA. (2005). Electrophysiological and behavioural of insulin receptor defective mice. *Physiol Behav.* ;86(3):287-96

Dent, P., Lavoigne, A., Nakielny, S., Caudwell, F. B., Watt, P. and Cohen, P. (1990) The molecular mechanism by which insulin stimulates glycogen synthesis in mammalian skeletal muscle. *Nature*, **348**, 302-308.

Dringen R., Pawlowski P.G., Hirrlinger J. (2005). Peroxide detoxification by brain cells. *J. Neurosci. Res.*, 79(1-2):157-65.

Duarte AI., Santos P., Oliveira CR., Santos MS., Rego AC., (2008). Insulin neuroprotection against oxidative stress is mediated by Akt and GSK-3 $\beta$  signaling pathways and changes in protein expression. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1783: 994–1002

Dunn MF., (2005). Zinc-ligand interactions modulate assembly and stability of the insulin hexamer - a review. *Biometals.*, 18(4):295-303

Duprat F., Guillemare E., Romey G., Fink M., Lesage F., Lazdunski M., Honore E. (1995). Susceptibility of cloned K<sup>+</sup> channels to reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 11796-11800

Eisai Co., Ltd., (2007). Eisai and BioArctic Neuroscience Enter Exclusive Licensing Agreement with Novel Antibody Treatment for Alzheimer's Disease. The antibody targets the neurotoxin believed to cause Alzheimer's disease. *Report n° 07-47*

Fadool D.A., Tucker K., Perkins R., Fasciani G., Thompson R.N., Parsons A.D., Overton J.M., Koni P.A., Flavell R.A., Kaczmareck L.K. (2004). Kv 1.3 channel gene-targeted deletion produces “Super-Smeller Mice” with altered glomeruli, interacting scaffolding proteins, and biophysics. *Neuron*, 41: 389-404

Faravelli L., Arcangeli A., Olivotto M., Wanke E., (1996). A HERG-like K<sup>+</sup> channel in rat F-11 DRG cell line: pharmacological identification and biophysical characterization. *J. Physiol.*, 496: 13-23.

Fehm H.L., Perras B., Smolnik R., Kern W., Born J. (2000). Manipulating neuropeptidergic pathways in humans: a novel approach to neuropharmacology? *Eur J Pharmacol*, 405, 43-54

Freshney, R.I: 1994; Culture of Animal Cells. *A manual of basic technique*; 3<sup>a</sup> Ed; Willey-Liss

Freychet P., (2000). Insulin receptors and insulin actions in the nervous system. *Diabetes Metab. Res. Rev.*, 16: 390-2

Fulks R.M., (1975). Effects os insulin glucose and amino acids on protein turnover in rat diaphragm. *J. Biol. Chem.*, 250: 290-8.

Gasparini L., Gouras G.K., Wang R., Gross R.S., Beal M.F., Greengard P., Xu H., (2001). Stimuli of beta-amyloid precursor protein trafficking by insulin reduces intraneuronal beta-amyloid and requires mitogen-activated protein kinase signalling. *J Neurosci.*;21(8):2561-70

Gasparini L., Netzer W.J., Greengard P., Xu H. (2002). Does insulin dysfunction play a role in Alzheimer's disease? *Trends Pharmacol Sci*, 23: 288-293

German D.C., Eisch A.J., (2004). Mouse models of Alzheimer's disease: insight into treatment. *Rev Neurosci.*, 15: 353-369

Giuffrida M.L., Caraci F., Pignataro B., Cataldo S., De Bona P., Bruno V., Molinaro G., Pappalardo G., Messina A., Garozzo D., Nicoletti F., Rizzarelli E., Copani A., (2009). Beta-amyloid monomers are neuroprotective. *J Neurosci.*; 29(34):10582-7.

Goedert M, Spillantini MG, Crowther RA., (1991). Tau proteins and neurofibrillary degeneration. *Brain Pathol.*, 1(4):279-86

Harper J.D., Wong S.S., Lieber C.M., Lansbury Jr. P.T., (1997). Observation of metastable A $\beta$  amyloid protofibrils by atomic force microscopy. *Chem. Biol.*, 4: 119-125

Hartley D., Walsh D.M., Ye C.P., Diehl T., Vasquez P.M., Teplow D.B., Selkoe D.J., (1999). Protofibrillar intermediates of amyloid  $\beta$ -protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons. *J. Neurosci.*, 19: 8876-8884

Hartmann T., Bieger S.C., Bruhl B., Tienari P.J., Ida N., Allsop D., Roberts G.W., Masters C.L., Dotti C.G., Unsicker K., Beyreuther K. (1997). Distinct sites of

intracellular production for Alzheimer's disease A $\beta$  40/42 amyloid peptides. *Nat. Med.* 3: 1016-1020

Havrankova J., Roth J., Brownstein M., (1978). Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. *Nature*, 272: 827-9

Henquin J.C., (2009). Regulation of insulin secretion: a matter of phase control and amplitude modulation. *Diabetologia.*, 52(5):739-51.

Hong M., Lee V.M.-Y., (1997). Insulin and insulin-like growth factor-1 regulate tau phosphorylation in cultured human neurons. *J. Biol. Chem.*, 272: 19547-19553

Huang XF., Arvant P., (1994). Formation of the insulin- containing secretory granule core occurs within immature  $\beta$ -granules. *J. Biol. Chem.*, 269: 20838-20844

Jacobson, D. R., D. E. McFarlin, et al. (1992). "Transthyretin Pro55, a variant associated with early-onset, aggressive, diffuse amyloidosis with cardiac and neurologic involvement." *Hum Genet* 89(3): 353-6.

Ji-eun O., Karlin R. K., Joo-ho S., Arnold P., Freilinger A., Hengstschla" ger M., and Lubec G.(2005) Differentiation of Neuroblastoma Cell Line N1E-115 Involves Several Signaling Cascades. *Neurochemical Research*, Vol. 30, No. 3, March pp. 333–348

Kamenetz F., Tomita T., Hsieh H., Seabrook G., Borchelt D., Iwatsubo T., Sisodia S., Malinow R. (2003). APP processing and synaptic function. *Neurons* 37: 925-937

Kimhi Y., Palfrey C., Spector I., Barak Y., Littauer U.Z. (1976). Maturation of neuroblastomas cells in the presence of dymethylsulfoxide; *Proc. Nat. Acad. Sci.*: 73(2): 462-466

Kahn, C. R. and White, M. F. (1988) The insulin receptor and the molecular mechanism of insulin action. *J Clin Invest*, 82: 1151-1156.

Klein W.L., Felice F.G., Vieira M.N.N., Bomfim T., Decker H., Velasco P.T., Lambert M., Viola K., Zhao W., Ferreira S., (2008). Protection of synapses against Alzheimer's-linked toxins: Insulin signaling prevents the pathogenic binding of A $\beta$  oligomers. *PNAS* 106 : 1971–1976

Klein W.L. (2002). A $\beta$  toxicity in Alzheimer's disease: globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets. *Neurochem. International*, 41: 345-352

Klein W.L., Krafft G.A., Finch C.E., (2001). Targeting small Abeta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum?; *Trends Neurosci.*, 24: 219-224

Kourier J.L. (1998). Interaction of reactive oxygen species with species with ion transport mechanisms. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 275: C1- 24

LaFerla F.M., Kim N., Oddo G., Oddo S., (2007). Intracellular amyloid-b in alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience* 8: 499-509

Lars L.P., Ramakers G.M., Smidt M.P. (2006). Insulin signalling in the central nervous system: learning to survive. *Prog. Neurobiol.* 79(4):205-21

Lee V.M.-Y., (2001). Tauists and  $\beta$ aptists united- well almost!. *Science*, 293: 1446-1447

Lesort M., Johnson G.V.W., (2000). Insulin-like growth factor-1 and insulin mediate transient site-selective increases in tau phosphorylation in primary cortical neurons. *Neuroscience*, 99: 305-316

Lima P.A., Vicente M.I., Alves F.M., Dionísio J.C., Costa P.F. (2008). Insulin increases excitability via dose-dependent dual inhibition of voltage-activated K<sup>+</sup> currents in differentiated N1E-115 neuroblastoma cells. *Eur J. Neurosci.*, 27(8): 2019-32

Mattson M.P., Liu D., (2002). Energetics and oxidative stress in synaptic plasticity and neurodegenerative disorders. *Neuromol. Med.*, 2: 215-231

Marchant-Brustel Y., Gual P., Gremeaux T., Gonzalez T., Barre R., Tanti J.F., (2003). Fatty acid-induced insulin resistance: role of insulin receptor substrate 1 serine phosphorylation in the retroregulation of insulin signalling. *Biochemical Society Transactions*. 31(5): 1152-1157

Mayer R.J., Doherty F., (1986). Intracellular protein catabolism: state of the art. *FEBS Lett.*, 198: 181-93

Metha P.D., Pirttila T., Patrick B.A., Barshatzky M., Metha S.P. (2001). Amyloid beta protein 1-40 and 1-42 levels in matched cerebrospinal fluid and plasma from patients with Alzheimer disease. *Neurosci Lett.*;304(1-2):102-6

Moreira P.I., Santos M.S., Sena C., Seica R., Oliveira C.R., (2004). Insulin protects against b-peptide toxicity in brain mitochondria of diabetic rats. *Neurobiol.*, 18: 628-637

Müller W., Bittner K. (2002). Differential oxidative modulation of voltage-dependent K<sup>+</sup> currents in rat hippocampal neurons. *J. Neurophysiol*, 87: 2990-2995

Müller W., Connor J.A., (1991). Cholinergic input uncouples Ca<sup>2+</sup> changes from K<sup>+</sup> conductance activation and amplifies intradendritic Ca<sup>2+</sup> changes in hippocampal neurons. *Neuron*, 6: 901-905

Müller W., Misgeld U., (1990). Inhibitory role of dentate hilus neurons in guinea pig hippocampal slice. *J. Neurophysiol* 64: 46-56

Müller W., Misgeld U., (1991). Picrotoxin- and 4-aminopyridine-induced activity in hilar neurons in the guinea pig hippocampal slice. *J. Neurophysiol* 65: 141-147

Müller W., Misgeld U., Heinemann U.(1988). Carbachol effects on hippocampal neurons *in vitro*: dependence on the rate of rise of carbachol tissue concentration. *Exp. Brain Res* 72: 287-298

Murphy R.M., Good T.A., Smith D.O., (1996). Beta-amyloid peptide blocks the fast-inactivating K<sup>+</sup> current in rat hippocampal neurons. *Biophys J.*; 70(1):296-304

Ostlund P., Lindegren H., Pettersson C., Bedecs K. (2001). Up-regulation of functionally impaired insulin-like growth factor-1 receptor in scrapie-infected neuroblastoma cells. *J. Biol Chem.*, 276(39):36110-5.

Ostlund P., Lindegren H., Pettersson C., Bedecs K. (2001). Altered insulin receptor processing and function in scrapie-infected neuroblastoma cell lines. *Brain Res Mol Brain Res.*, 97(2):161-70

Pearson H.A., Peers C. (2006). Physiological roles for amyloid beta peptides. *J Physiol.*;575(Pt 1):5-10.

Pearson H.A., Plant L.D., Boyle J.P., Peers C. (2003). The production of amyloid beta peptide is a critical requirement for the viability of central neurons. *J Neurosci*; 23(13):5531-5

Pellmar T.C. (1987). Peroxide alters neuronal excitability in the CA1 region of guinea-pig hippocampus in vitro. *Neuroscience.*; 23(2):447-56.

Peretz S., Jensen R., Baserga R., Glazer P.M. (2001). ATM-dependent expression of the insulin-like growth factor-I receptor in a pathway regulating radiation response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 1676-1681

Pittas, AG and Greenberg AS., (2003). Contemporary Diagnosis and Management of Diabetes. *Handbooks in Health Care Co*, Newtown, PA.

Plant L.D., Boyle J.P., Pearson H.A., Peers C. (2003). The production of amyloid beta peptide is a critical requirement for the viability of central neurons. *J Neurosci*; 23(13):5531-5

Plant L.D., Webster N.J., Boyle J.P., Ramsden M., freir D.B., Peers C., Pearson H.A., (2005). Amyloid beta peptide as a physiological modulator of neuronal A-type K<sup>+</sup> current. *Neurobiol. Aging*.

Pongs O. (1999). Voltage-gated potassium channels: from hyperexcitability to excitement. *FEBS Let*, 452: 31-35

Probst A, Langui D, Ulrich J., (1991). Alzheimer's disease: a description of the structural lesions. *Brain Pathol.*,1(4):229-39

Ramsden M., Henderson Z., Pearson H.A., (2002). Modulation of Ca<sup>2+</sup> channel currents in primary cultures of rat cortical neurones by amyloid beta protein (1-40) is dependent on solubility status. *Brain Res.*, 956(2): 254-61

Ramsden M., Plant L.D., Webster N.J., Vaughan P.F., Henderson Z., Pearson H.A., (2001). Differential effects of unaggregated and aggregated amylois beta protein (1-40) on K<sup>+</sup> channel currents in primary cultures of rat cerebellar granule and cortical neurones. *J. Neurochem.*, 79(3): 699-712

Reichman, W.E. 2003. Current pharmacologic options for patients with Alzheimer's disease. *Ann Gen Hosp Psychiatry*. 2:1-14

Rhee S.G., Kang S.W., Jeong W., Chang T.S., Yang K.S., Woo H.A. (2005). Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins. *Curr Opin Cell Biol.*; 17(2):183-9.

Richardson SJ, Bradley AJ, Duan W, Wettenhall RE, Harms PJ, et al. (1994) Evolution of marsupial and other vertebrate thyroxine-binding plasma proteins. *Am J Physiol* 266: R1359–1370.

Riisøen H. (1988). Reduced prealbumin (transthyretin) in CSF of severely demented patients with Alzheimer's disease. *Acta Neurol. Scand.*, 78(6): 455-9

Robakis N.K., Neve R.L. (1998). Alzheimer's disease: a re-examination of the amyloid hypothesis. *Trends Neurosci.*;21(1):15-9

Saltiel, A.R., Kahn, C.R., (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414: 799-806.

Schulingkamp R.J., Pagano T.C., Hung D., Raffa R.B. (2000). Insulin receptors and insulin action in the brain: review and clinical implications. *Neurosci. Behav. rev.* 24, 855-872

Schwarzman AL, Goldgaber D (1996) Interaction of transthyretin with amyloid beta-protein: binding and inhibition of amyloid formation. *Ciba Found Symp* 199: 146–60.

Schwarzman AL, Gregori L, Vitek MP, Lyubski S, Strittmatter WJ (1994) Transthyretin sequesters amyloid beta protein and prevents amyloid formation. *Proc Natl Acad Sci* 91: 8368–8372.

Selkoe D.J., (2001). Clearing the brain's cobwebs. *Neuron.*, 32: 177-180

Selkoe D.J., Schenk D., (2003). Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.*, 43: 545-584

Serot J.M., Christmann D., Dubost T., Couturier M., (1997). Cerebrospinal fluid transthyretin: aging and late onset Alzheimer's disease. *J. Neurol. Neurosur Ps.*, 63(4): 506-8

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.

Stein TD, Anders NJ, DeCarli C, Chan SL, Mattson MP, et al. (2004) Neutralization of transthyretin reverses the neuroprotective effects of secreted amyloid precursor protein (APP) in APPSW mice resulting in tau phosphorylation and loss of hippocampal neurons: support for the amyloid hypothesis. *J Neurosci* 24: 7707–17.

Stein TD, Johnson JA (2002) Lack of neurodegeneration in transgenic mice overexpressing mutant amyloid precursor protein is associated with increased levels of transthyretin and the activation of cell survival pathways. *J Neurosci* 22: 7380–8.

Stutzmann G.E., (2005). Calcium dysregulation, IP3 signaling, and Alzheimer's disease. *Neuroscientist*.;11(2):110-5

Taglialatela M., Castaldo P., Iossa S., Pannaccione A., Fresi A., Ficker E., Annunziato L. (1997). Regulation of the human ether-a-gogo related gene (HERG) K<sup>+</sup> channels by reactive oxygen species. *Proc. Natl Acad Sci USA*, 94: 11698-11703

Teepker M., Anthes N., Fischer S., Krieg J.C., Vedder H. (2007). Effects of oxidative challenge and calcium on ATP-levels in neuronal cells. *Neurotoxicol.* 28(1): 19-26

Trejo JL, Carro E, Busiguina S, Torres-Aleman I., (2001). Circulating insulin-like growth factor I mediates the protective effects of physical exercise against brain insults of different etiology and anatomy. *J. Neurosci.*, 21: 1628-1634

Unger JW, Betz M. (1998). Insulin receptors and signal transduction proteins in the hypothalamo-hypophyseal system: A review on morphological findings and functional implications. *Histol Histopathol* 13:1215–24.

Vega-Saenz de Miera E., Rudy B. (1992). Modulation of K<sup>+</sup> channels by hydrogen peroxide. *Biochem Biophys Res Commun*, 186: 1681-1687

Venters HD, Broussard SR, Zhou JH, Bluthé RM, Freund GG, Johnson RW, Dantzer R, Kelley KW., (2001). Tumor necrosis factor (alpha) and insulin-like growth factor-I in the brain: is the whole greater than the sum of its parts?. *J Neuroimmunol.*, 119(2):151-65.

Walsh D.M., Lomakin A., Benedek G.B., Maggio J.E., Condron M.M., Teplow D.B., (1997). Amyloid  $\beta$ -protein fibrillogenesis: detection of a protofibrillar intermediate. *J. Biol. Chem.*, 272: 22364-22374

Wang Y., Luo W., Reiser G., (2008). Trypsin and trypsin-like proteases in the brain: proteolysis and cellular functions. *Cell Mol Life Sci.*, 65(2):237-52

Whiteaker K.L., Sullivan J.P., Gopalakrishnan M., (2000). Cell Based Assays Using the Fluorometric Imaging Plate Reader (FLIPR). *Current Protocols in Pharmacology*; UNIT 9.2

White, M. F. and Kahn, C. R. (1994) The insulin signaling system. *J Biol Chem*, **269**, 1-4.

Woeber KA, Ingbar SH (1968) The contribution of thyroxine-binding prealbumin to the binding of thyroxine in human serum, as assessed by immunoabsorption. *J Clin Invest* 47: 1710–21.

Wolfgang F., Hecker M. (2008). Endothelial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: A bad guy turning good?. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 28: 1691-1693

Woods S.C., Seeley R.J., Baskin D.G., Schwartz M.W. (2003). Insulin and the blood-brain barrier. *Curr Pharm Res* 9:795-800

Younkin S.G., (1998). The role of Abeta 42 in Alzheimer's disease. *J. Physiol Paris.*, 92: 289-292

Yu S.P., (2003). Regulation and critical role of potassium homeostasis in apoptosis. *Prog. Neurobiol.*, 70: 363-386

Zhao W.Q., Chen H., Xu H., Moore E., Meiri N., Quon M.J., Alkon D.L., (1999). Brain insulin receptors and spatial memory. Correlated changes in gene expression, tyrosine phosphorylation, and signalling molecules in the hippocampus of water maze trained rats. *J. Biol Chem*, 274: 34893 – 902

Zhao W.Q., Alkon D.L. (2001). Role of insulin and insulin receptor in learning and memory. *Mol. Cell Endocrinol*, 177: 125-134

Zhong J., Lee W.H. (2007). Hydrogen peroxide attenuates insulin-like growth factor-1 neuroprotective effect, prevented by minocycline. *Neurochem Int.*; 51(6-7):398-404.