

# **Universidade de Lisboa**

## **Faculdade de Ciências**

**Departamento de Química e Bioquímica**



# **Aspectos fisiológicos da insulina e seu receptor em neurónios do hipocampo**

**Miguel Angelo Segão Mondragão**

Mestrado em Bioquímica

Especialização em Bioquímica Médica

2010

# **Universidade de Lisboa**

## **Faculdade de Ciências**

**Departamento de Química e Bioquímica**



### **Aspectos fisiológicos da insulina e seu receptor em neurónios do hipocampo**

**Miguel Angelo Segão Mondragão**

**Mestrado em Bioquímica**

**Especialização em Bioquímica Médica**

**Dissertação orientada pelo Doutor Pedro Lima e pelo  
Professor Doutor Pedro Costa**

**2010**

O trabalho experimental descrito nesta tese foi realizado na Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa e na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, sob orientação do Doutor Pedro Lima e do Professor Doutor Pedro Costa.

# Índice

AGRADECIMENTOS	VII
LISTA DE ABREVIATURAS	VIII
RESUMO	X
ABSTRACT	XI
I. INTRODUÇÃO TEÓRICA	01
1. Insulina e o seu receptor	02
1.1. Perspectiva histórica, estrutura e função	02
1.2. Diabetes <i>Mellitus</i>	04
1.3. Efeitos da insulina e do seu receptor na neurofisiologia	05
2. Doença de Alzheimer (DA)	10
2.1. Características da doença	10
2.2. Insulina na Doença de Alzheimer	11
2.3. Relação entre a DA e a Diabetes	12
3. Canais de Potássio (K <sup>+</sup> )	13
3.1. Canais de Potássio dependentes-da-voltagem	15
3.1.1. Selectividade e activação	16
3.1.2. Inactivação	16
3.1.3. Famílias de canais de potássio dependentes-da-voltagem	17
3.2. Canais Kv1.3	20
3.3. Canais ERG	21
4. Modelo Experimental	22
4.1. Hipocampo	22
4.2. Fatias <i>versus</i> células isoladas	24
4.3 Correntes de K <sup>+</sup> activadas por voltagem em neurónios piramidais da região CA1 do hipocampo	25
5. Enquadramento do presente projecto	27
II. OBJECTIVOS	29
III. MATERIAIS E MÉTODOS	32

1. Electrofisiologia	33
1.1. Modelo Experimental	33
1.2. Registo de correntes e sistema de perfusão	33
1.3. Protocolos de voltagem	36
1.4. Selecção de células piramidais da zona CA1 do hipocampo para registos electrofisiológicos	36
1.5. Composição das soluções salinas	37
1.6. Adição de fármacos/toxinas	38
1.6.1. Margatoxina (MgTx)	38
1.6.2. Insulina	39
1.7. Tratamento e análise de dados	39
2. Electroforese e <i>western-blot</i>	41
2.1. Amostras e sua preparação	41
2.1.1. Preparação dos homogenatos	41
2.1.2. Quantificação	42
2.2. <i>SDS-PAGE</i>	42
2.3. <i>Western-blot</i>	42
2.3.1. Transferência	42
2.3.2. Marcação com anticorpos	43
2.3.3. Revelação	44
2.3.4. Análise de dados	45
2.4. Soluções utilizadas	45
3. Imunocitoquímica	47
3.1. Preparação das células	47
3.2. Preparação das lamelas	47
3.3. Fixação das células	47
3.4. Permeabilização e bloqueio	47
3.5. Incubação com anticorpos	47
3.5.1. Anticorpo primário	47
3.5.2. Anticorpo secundário	48

3.6. Montagem	48
3.7. Visualização e análise	48
IV. RESULTADOS	50
1. Electrofisiologia	51
1.1. Estudo sobre o efeito da Margatoxina nas correntes de $K^+$ activadas por voltagem	51
1.1.1. Efeito da MgTx nas correntes de $K^+$ — neurónios isolados da zona CA1 do hipocampo de animais em período de pós-prandial	51
1.1.2. Efeito da MgTx nas correntes de $K^+$ — neurónios piramidais isolados da zona CA1 do hipocampo de animais em período de jejum	55
1.1.3. Comparação entre o efeito da MgTx nas correntes de $K^+$ de neurónios piramidais isolados da zona CA1 do hipocampo de animais em período de jejum e em período de pós-prandial	57
1.1.4. Efeito da MgTx na dependência à voltagem nas correntes de canais de $K^+$ em células isoladas da zona CA1 do hipocampo de ratos em pós-prandial	58
1.2. Relação entre o efeito da MgTx e o efeito da insulina sobre as correntes de $K^+$ dos neurónios piramidais da zona CA1 do hipocampo de ratos em pós-prandial	60
1.3. Efeito da insulina em correntes mediadas por Canais de $K^+$ tipo ERG	64
2. Estudos com anticorpos	65
2.1. Expressão do InsR em tecidos cerebrais de animais em jejum e em pós-prandial	65
2.2. Expressão do InsR no cérebro de modelos animais	68
2.3. Expressão do canal de $K^+$ Kv1.3 no hipocampo de animais em jejum e em pós-prandial	70
3. Imunocitoquímica	71
V. DISCUSSÃO	75
1. Qual o canal de $K^+$ subjacente à corrente sensível à insulina?	76
2. Como explicar as diferenças nos efeitos da insulina na corrente	

$I_{slow}$ e na neuroexcitabilidade? Diferente padrão de expressão do InsR em jejum e em pós-prandial?	79
3. O canal de $K^+$ subjacente à corrente sensível à insulina é também “parte participante” da dinâmica encontrada entre os estados de jejum e pós-prandial?	81
4. Relevância e enquadramento no contexto da fisiopatologia	82
5. Perspectivas Futuras	84
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
VII. APÊNDICE	96
1. Obtenção de células piramidais da zona CA1 do hipocampo	97
1.1. Remoção do cérebro	97
1.2. Extração do hipocampo e obtenção de fatias de hipocampo	98
1.3. Dissociação das células do hipocampo	101

# Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer ao meu orientador, ao Doutor Pedro Lima por me ensinar tudo o que sei sobre electrofisiologia, por me ajudar em tudo que precisei e por me incentivar a continuar naquelas tardes em que as células teimavam em não querer selar. Por ser mais do que um orientador, por ser um amigo.

Ao Professor Doutor Pedro Costa, também meu orientador, por me aceitar no seu laboratório sem o qual teria sido impossível elaborar este trabalho, pelas suas sugestões, disponibilidade e simpatia.

Quero também agradecer ao Doutor Gonçalo Costa por me orientar no caminho das electroforeses e dos *western-blot* e ao Doutor Carlos Cordeiro por disponibilizar o acesso incondicional ao seu laboratório.

À Doutora Cláudia Valente com a qual aprendi e realizei as experiências de imunocitoquímica de modo a trazer algum colorido ao meu trabalho.

À Professora Paula Macedo pelo fornecimento dos modelos animais.

Ao Doutor Gabriel Martins por disponibilizar o microscópio confocal, sem o qual não poderíamos ter obtido as imagens de imunocitoquímica.

Quero agradecer também aos meus pais, por me orientarem o melhor que puderam, pelo seu apoio incondicional e por me ensinarem a ser a pessoa que sou hoje. Sem eles e sem a sua ajuda, não teria chegado até aqui.

Ao meu grupo de amigos, onde os segredos “quase” não existem. A todos eles, que embora não percebam nada de bioquímica me apoiam sempre e me fazem esquecer, por momentos, as dificuldades que atravessamos nesta vida.

À Catarina, a minha namorada, por me dar todo o seu apoio, por me obrigar a trabalhar nos dias que estou mais preguiçoso e por me fazer feliz.

A todos, muito obrigado.

## Lista de Abreviaturas

4-AP	4-aminopiridina
ATP	Adenosina Tri-fosfato
A $\beta$	Proteína $\beta$ -amilóide
BK	Canais de K <sup>+</sup> +activados por Ca <sup>2+</sup> de grande condutância
DA	Doença de Alzheimer
DG	Giro Dentado
DM	Diabetes <i>Mellitus</i>
DMT1	Diabetes <i>Mellitus</i> Tipo 1
DMT2	Diabetes <i>Mellitus</i> Tipo 2
DTM	Domínio transmembranar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
IGF	<i>Insulin Growth Factor</i>
Ins	Insulina
InsR	Receptor da Insulina
LZR	<i>Lean Zucker Rat</i>
MgTx	Margatoxina
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
OZR	<i>Obese Zucker Rat</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PBST	<i>Phosphate buffered saline triton</i>
PBSTw	<i>Phosphate buffered saline tween</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate poly-acrylamide gel electrophoresis</i>
So	<i>Stratum oriens</i>

Sp	<i>Stratum pyramidale</i>
Sr	<i>Stratum radiatum</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered saline tween</i>
TEA	Tetraetilamónio
ZDF	<i>Zucker Diabetic fatty</i>

# Resumo

O papel da [insulina](#) e do seu receptor (InsR) no cérebro é ainda obscuro conhecendo-se contudo funções importantes na aprendizagem e na memória; aponta-se também para uma associação entre [doença de Alzheimer](#) (DA) e a [Diabetes](#). Sabe-se igualmente que a insulina controla a neuroexcitabilidade em neurónios específicos. No nosso laboratório demonstrou-se que a insulina inibe a componente lenta-  $I_{slow}$  das correntes de  $K^+$  activadas-por-voltagem em neurónios piramidais da zona CA1 do hipocampo de ratos. Tal efeito é observado unicamente em neurónios provenientes de animais em período pós-prandial (e não em jejum).

Este trabalho propõe (a) identificar o canal de  $K^+$  sensível à insulina nestes neurónios; (b) investigar os fenómenos fisiológicos subjacentes à referida diferença observada entre "preparações em jejum" e "em pós-prandial". Recorreu-se à técnica *whole-cell voltage-clamp* e a técnicas de *western-blotting* e imunocitoquímica com anticorpos contra InsR e o canal de  $K^+$  candidato.

Registos de corrente revelaram que a Margatoxina (bloqueador específico de canais  $K^+$  tipo-KV1.3) inibe também especificamente  $I_{slow}$  ( $EC_{50}=125$  pM), alterando a dependência da activação à voltagem. Experiências com tratamentos articulados de insulina e várias concentrações de margatoxina indicam o canal Kv1.3 como o responsável pelo efeito da insulina nos neurónios CA1.

Demonstrou-se, por electrofisiologia e por *western-blot*, que a expressão do InsR é maior no período de pós-prandial. Mostra-se ainda que o canal Kv1.3 é mais expresso em "hipocampus em pós-prandial" e assim postula-se uma oscilação na expressão do InsR e do canal Kv1.3 durante o ciclo jejum/pós-prandial.

Finalmente, usando amostras de cérebro de ratos-modelo obesos (OZR) e diabéticos (ZDF), verificou-se que a expressão do InsR nestes dois é inferior à do controlo, o que atribui protagonismo ao cérebro no contexto das diabetes.

Assim, a insulina- neural controla a neuroactividade num processo dependente do ciclo alimentar. Questiona-se consequentemente a ideia do cérebro como uma entidade isolada dos ciclos metabólicos.

**Palavras-Chave:** [insulina](#); [hipocampo](#); [margatoxina](#); [Kv1.3](#); [receptor de insulina](#); [ciclo jejum-posprandial](#); [Diabetes](#).

# Abstract

The role of [insulin](#) and its [receptor](#) (InsR) in the brain is still poorly understood; yet some important functions in learning and memory are known. There is evidence of a relationship between [Alzheimer's disease](#) (DA) and [Diabetes](#) and also, that insulin controls the neuroexcitability in specific neurons. In our laboratory, it was demonstrated that insulin inhibits the slow component-  $I_{slow}$  of voltage-dependent  $K^+$  currents in CA1 isolated pyramidal neurons of rat hippocampus. This effect was only observed in neurons from fed but not fasted animal.

The major aims of this work were: (a) identify the insulin sensitive  $K^+$  channel; (b) investigate physiological phenomena correlated with the observed difference between “fasted and fed preparations”. A combination of approaches was used: whole-cell voltage-clamp recordings and western-blotting and immunocytochemistry techniques with antibodies against the InsR and the  $K^+$  channel-candidate.

Current recordings revealed that [margatoxin](#) (selective blocker of [Kv1.3](#)  $K^+$  channels), like insulin, inhibits  $I_{slow}$  specifically ( $IC_{50}=125pM$ ) by shifting the voltage-dependence of activation. Experiments with insulin in pretreated neurons with different margatoxin concentrations, reveal that Kv1.3 is responsible for the insulin effect in CA1 neurons.

Using electrophysiology and western-blotting techniques, it was demonstrated that InsR expression is higher in fed animals. Similarly, it was shown that the Kv1.3 channel is over expressed in fed animals. Therefore, there are oscillations in the expression patterns of InsR and Kv1.3 during the “[fast-feeding](#)” cycle.

Finally, by using brain samples of obese (OZR) and diabetic (ZDF) rat models, a lower InsR expression in comparison to control was revealed, attributing a major role of the brain in diabetes.

In short, neural insulin controls neuroactivity in a process depending on the feeding-cycle, which questions somehow the general idea of the brain as isolated from the metabolic cycles and oscillations.

**Key-words:** [insulin](#); [hippocampus](#); [margatoxin](#); [Kv1.3](#); [insulin receptor](#); “[fast-feeding](#)” cycle; [diabetes](#).

# I. Introdução Teórica

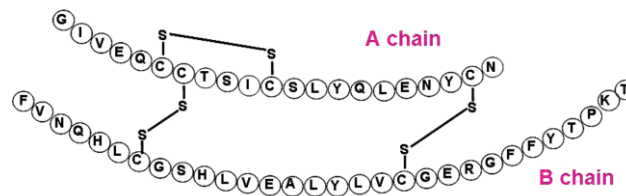
- 1- Insulina e o seu receptor
- 2- Doença de Alzheimer (DA)
- 3- Canais de Potássio ( $K^+$ )
- 4- Modelo Experimental
- 5- Enquadramento do presente projecto

# I. INTRODUÇÃO

## 1. Insulina e o seu receptor

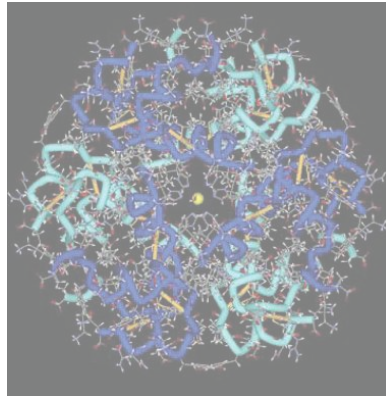
### 1.1. Perspectiva histórica, estrutura e função

A insulina foi pela primeira vez isolada por Frederick Banting e Charles Best no Verão de 1921, surgindo como uma espécie de milagre para as pessoas com diabetes. Antes da sua descoberta, não existia qualquer terapia para os doentes com diabetes. Em poucos meses após a descoberta, os primeiros pacientes ressuscitaram literalmente e em 1923 valeu o prémio Nobel (De Meyts, 2004).



**Figura 1.1-** Estrutura da insulina com a respectiva sequência de aminoácidos. São visíveis as duas cadeias A e B, bem como as ligações dissulfureto. Uma destas ligações é intracadeia A6-A11, as outras duas são intercadeia, entre os aminoácidos A7-B7 e A20-B19. (adaptado de Mayer, et al., 2007).

A insulina circulante e biologicamente activa é produzida pelas células  $\beta$  dos ilhéus de Langerhans do pâncreas (Marchetti, et al., 2008) e consiste num monómero de 6 KDa (Moult e Harvey, 2008) formado por duas cadeias, A e B, com 21 e 30 aminoácidos respectivamente. Estas duas cadeias encontram-se ligadas por duas pontes dissulfureto, A7-B7 e A20-B19, e, para além destas, a cadeia A possui ainda uma ponte dissulfureto intra-cadeia, entre os aminoácidos 6 e 11 (De Meyts, 2004). A insulina dimeriza a concentrações na ordem do micromolar ( $\mu\text{M}$ ) e na presença de iões zinco ( $\text{Zn}^{2+}$ ), associa-se em hexâmeros.

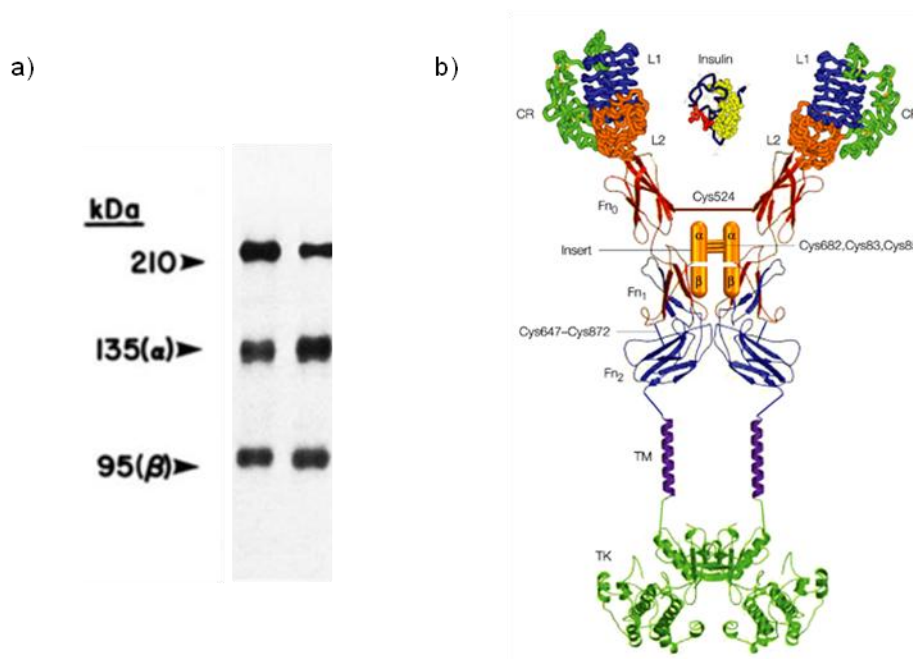


**Figura 1.2-** Estrutura tridimensional do hexâmero de insulina. Coordenadas obtidas por ressonância magnética nuclear (RMN). Ficheiro PDB número 1AIY. Um monômero de cada dímero está colorido a azul escuro e o outro a azul claro, o ponto amarelo no centro da estrutura é o  $Zn^{2+}$  (adaptado de De Meyts, 2004).

A principal função da insulina a nível periférico é manter os níveis sanguíneos de glucose numa gama estreita de concentrações. Qualquer alteração na sua concentração tem um forte impacto na homeostase da glucose, uma produção excessiva causa hipoglicémia, enquanto um *deficit* na sua secreção pode conduzir a diabetes (Henquin, 2000).

O receptor da insulina (InsR) é um membro da família de receptores tirosina cinase, que catalisa a transferência do fosfato  $\gamma$  do ATP para resíduos de tirosina de substratos proteicos, sendo o primeiro o próprio receptor (De Meyts, 2004). O InsR é sintetizado como um precursor de alto peso molecular (210kDa) e de cadeia única, com um tempo de meia vida de cerca de 3h (Olson, et al., 1988). Este precursor é posteriormente glicosilado, *folded* e dimerizado, dando origem ao receptor maduro.

O receptor maduro é um tetramero composto por duas subunidades  $\alpha$  e por duas subunidades  $\beta$ . Estes dois tipos de subunidades possuem massas moleculares diferentes, tendo a subunidade  $\alpha$  135kDa e a subunidade  $\beta$ , 95kDa (Figura 1.3). A subunidade  $\alpha$  é responsável pela ligação à insulina enquanto, por seu lado, a subunidade  $\beta$  possui a função tirosina cinase, sendo que, a afinidade para a insulina é inicialmente, na forma de precursor, não funcional.



**Figura 1.3-** Receptor de insulina (InsR). a) gel de *SDS-PAGE* no qual se podem observar três bandas. A superior (210kDa) corresponde ao precursor e as inferiores, 135 e 95kDa correspondem às subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  respectivamente (adaptado de (Olson, et al., 1988)); b) estrutura do InsR, L1 e L2 representam domínios ricos em Leucina, Cr representa domínios ricos em Cisteína, F $n_0$ , F $n_1$  e F $n_2$  domínios de fibronectina tipo III, TM representam domínios transmembranares, TK representa o domínio tirosina cinase. A insulina liga-se ao domínio F $n_1$ , representado pelo *insert* na figura (adaptado de De Meyts e Whittaker, 2002).

O receptor de insulina desempenha um papel fulcral na regulação do metabolismo da glucose periférica e na homeostase energética. Problemas na sua função são caracterizados por uma capacidade reduzida da insulina estimular a utilização da glucose, uma síndrome associada com a diabetes *mellitus* tipo II, a hipertensão e a obesidade

## 1.2. Diabetes mellitus

A Diabetes *Mellitus* (DM) é definida pelo *American Diabetes Association Expert Committee* como um grupo de doenças metabólicas caracterizado pela hiperglicémia resultante de defeitos na secreção da insulina, na sua acção, ou por ambos. A hiperglicémia crónica está associada com danos a longo prazo, disfunções e falhas em vários órgãos, principalmente nos olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos (Balkau e Eschwege, 2003).

A Diabetes *Mellitus* tipo 1 (DMT1) é causada pela deficiência absoluta de insulina proveniente destruição auto-imune das células  $\beta$  do pâncreas. Este problema é causado pela presença de linfócitos T auto-reactivos e por anticorpos contra antígenos das células  $\beta$ .

Por outro lado, a Diabetes *Mellitus* tipo 2 (DMT2) é uma desordem metabólica que pode ser caracterizada por *deficits* relativos de insulina, resultantes de problemas na secreção da mesma pelas células  $\beta$ . No entanto, esta desordem também pode ser causada devido a uma reduzida sensibilidade dos tecidos à insulina. Alguns pacientes são caracterizados

preponderantemente por resistência à insulina, enquanto outros pela deficiência na sua secreção. A DM2 representa mais de 80% dos casos totais de diabetes. A prevalência desta doença está a aumentar muito para além do esperado, provavelmente devido ao aumento da obesidade (Raslova, 2010).

Em condições fisiológicas normais, a glucose permanece numa gama estreita de concentrações, ou seja, embora varie a concentração entre os períodos de jejum e pós-prandial, o seu valor nunca ultrapassa certos limites. Esta regulação depende de um delicado equilíbrio entre a secreção de insulina e a sua sensibilidade (Kahn, 2003). Em indivíduos com tolerância normal à glucose, uma pequena diminuição à sensibilidade da insulina resulta num aumento da sua secreção por parte das células  $\beta$  do pâncreas e a glicemia é mantida normal. No entanto, uma falha neste mecanismo compensatório, conduz à intolerância à glucose e à diabetes (Kahn, 2003; Arslanian, 2005).

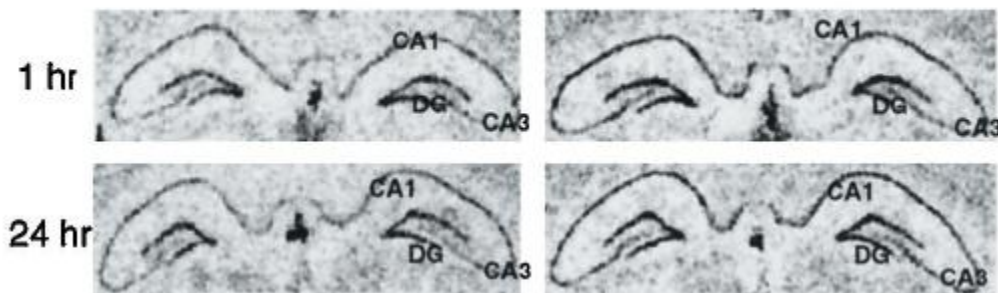
Actualmente, acredita-se que a DM2 é uma doença “2 hit”, ou seja, a resistência à insulina tem de ser necessariamente acompanhada por um *deficit* na sua secreção (Bergman, et al., 2002; Kahn, 2003). No entanto, o desenvolvimento destas deficiências ainda é desconhecido, não se sabendo qual das formas que surge primeiro. Mesmo assim, existe um consenso de que a resistência à insulina acompanhada de hiperinsulinémia compensatória é uma das características mais precoces da doença (Gungor, et al., 2005).

Desta forma, a resistência à insulina, a incapacidade dos tecidos responderem correctamente à insulina, apresenta-se como um dos factores de risco para desenvolver a DM2. Como veremos mais adiante, estudos recentes têm demonstrado que a resistência à insulina também é uma das causas da Doença de Alzheimer (DA). Este facto tem levado à recente associação destas duas doenças. O valor do presente estudo alicerça-se nesta correlação.

### **1.3. Efeitos da insulina e do seu receptor na neurofisiologia**

Embora os efeitos da insulina a nível periférico estejam bem estudados, o mesmo não acontece a nível do sistema nervoso. Até há bem pouco tempo, pensava-se inclusivamente, que o cérebro era insensível à insulina. No entanto, nos últimos tempos, surgiram vários estudos que provam que o sistema nervoso não é insensível à acção da mesma. Vários estudos já identificaram receptores de insulina distribuídos por regiões específicas do cérebro, como por exemplo, no bulbo olfactivo, no hipotálamo, no hipocampo e no cerebelo (Unger, et al., 1991; Schulingkamp, et al., 2000). Nestes casos, a insulina participa numa variedade de funções através de mecanismos que diferem dos da sua regulação directa da glucose nos órgãos periféricos. Embora o papel da insulina no cérebro seja pouco conhecido, existem alguns estudos que sugerem que a insulina controla vários mecanismos no sistema nervoso central, como a regulação da ingestão de comida pelo hipotálamo (Woods, et al., 1979; Spanswick, et al., 2000) e o controlo do olfacto no bulbo olfactivo (Fadool, et al., 2004; Das, et al., 2005). Resultados recentes indicam também a insulina como um potenciador da memória e

da aprendizagem. Por exemplo, o trabalho de Fehn (Fehm, et al., 2000) demonstra que a injeção intracerebroventricular de insulina aumenta a memória em ratos em tarefas de aprendizagem. A observação de Craft (Craft, et al., 1999) em que a injeção intravenosa de insulina aumenta *story recall*. Outro estudo verificou diferenças a nível da expressão do InsR entre animais treinados no labirinto aquático em relação ao controlo. Depois de sacrificados, e de os hipocampos marcados para o mRNA do InsR ou para a proteína em si, verificou-se então que os animais treinados evidenciavam uma maior expressão, quer ao nível do mRNA (Figura 1.4), quer do InsR em si (Zhao, et al., 1999)



**Figura 1.4-** Cerebelos marcados por histoquímica para o mRNA do InsR. À esquerda animais controlo, à direita animais treinados no labirinto aquático. Estão identificadas as zonas CA1, CA3 e giro dentado. Os animais foram sacrificados após 1h ou após 24h (adaptado de Zhao, et al., 1999).

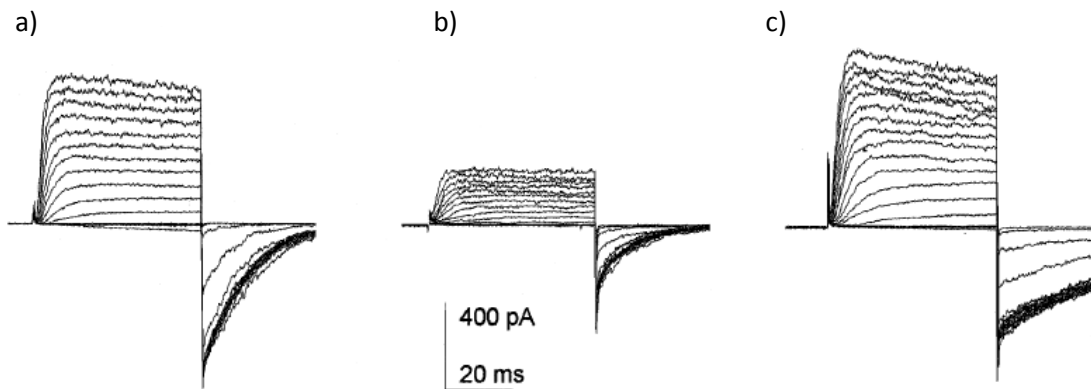
Outros trabalhos apontam igualmente para que, de um modo geral, se direcione para a insulina e o seu receptor como intervenientes nas funções de aprendizagem e memorização, provavelmente através da modulação de eventos relacionados com a plasticidade sináptica (Zhao e Alkon, 2001). Para além disso, estão envolvidos na sobrevivência neuronal. Consistentes 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) (ver secções 2.2. e 2.3).

Por outro lado, a acção da insulina e dos seus receptores, 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 neuroexcitabilidade. Nos neurónios do bulbo olfactivo – região cerebral com níveis mais elevados de insulina (Baskin, et al., 1983) e de receptores de insulina (Schulingkamp, et al., 2000) – a insulina aumenta a excitabilidade ao inibir canais de potássio do tipo Kv1.3, responsáveis pela maioria da corrente de potássio nesses neurónios. O jejum, ao contrário do que ocorre nos tecidos periféricos, aumenta os níveis de insulina no bulbo olfactivo, diminuindo a actividade dos canais Kv1.3 (levando a um aumento da neuroexcitabilidade) e apurando, deste modo, o sentido olfactivo (Fadool, et al., 2000).

Trabalhos prévios demonstraram que ratos aos quais foi eliminado o gene do InsR possuíam deficiências a nível da memória e da aprendizagem. Em termos de reconhecimento de objectos familiares, os animais heterozigóticos (InsR<sup>+/-</sup>), demonstraram ter problemas na

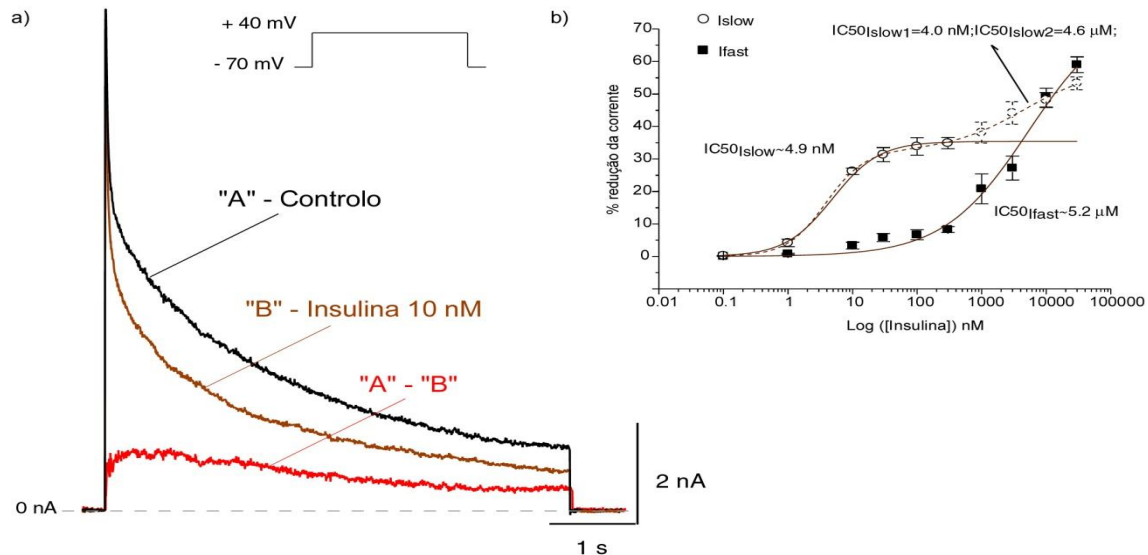
memória a curto prazo (1h) e de longo prazo (24h). Foram realizadas experiências electrofisiológicas em neurónios em cultura do bulbo olfactivo de animais *InsR*<sup>+/-</sup> e *InsR*<sup>-/-</sup>, nas quais se verificou que a amplitude do pico de corrente estava diminuída em comparação com os neurónios de animais *wild-type*. Estes estudos sugerem que a perda de um ou dois alelos do *InsR* modifica o fenótipo eléctrico de neurónios do bulbo olfactivo (Das, et al., 2005).

Por outro lado, também foi demonstrado que o receptor da insulina diminui a corrente de K<sup>+</sup> através da fosforilação dos canais Kv1.3 (Fadool, et al., 2000). Neste estudo, células foram clonadas com o canal de potássio Kv1.3 o que originou uma grande corrente *outward*, após aplicação da insulina a corrente diminuiu, verificando-se depois que os canais Kv1.3 tinham sido alvo de fosforilações em vários resíduos. No entanto, quando o *InsR* era mutado, ou o domínio cinase eliminado, não ocorria quer modulação das correntes, quer fosforilação dos canais Kv1.3.



**Figura 1.5-Registos de** *voltage-clamp* em configuração *cell-attached (giant-patch)* em células HEK 293 cotransfectadas com Kv1.3 e *InsR*: activação do *InsR* induz a diminuição da corrente de Kv1.3. A voltagem foi mantida a -90mV e foram realizados pulsos com incrementos de 10mV até 0mV. A) controlo, solução externa normal; b) após 20min de perfusão de solução externa contendo 0,1µg/mL de insulina; c) célula cotransfectada com Kv1.3 e *InsR* contendo a subunidade  $\beta$  truncada (domínio cinase) (adaptado de Fadool, et al., 2000))

O efeito da insulina em correntes de potássio activadas por voltagem foi também estudado em células diferenciadas de neuroblastoma N1E-115. Como se pode observar na Figura 1.6, a insulina reduz claramente, e de um modo dependente da concentração, duas componentes da corrente de K<sup>+</sup> (Lima, et al., 2008).

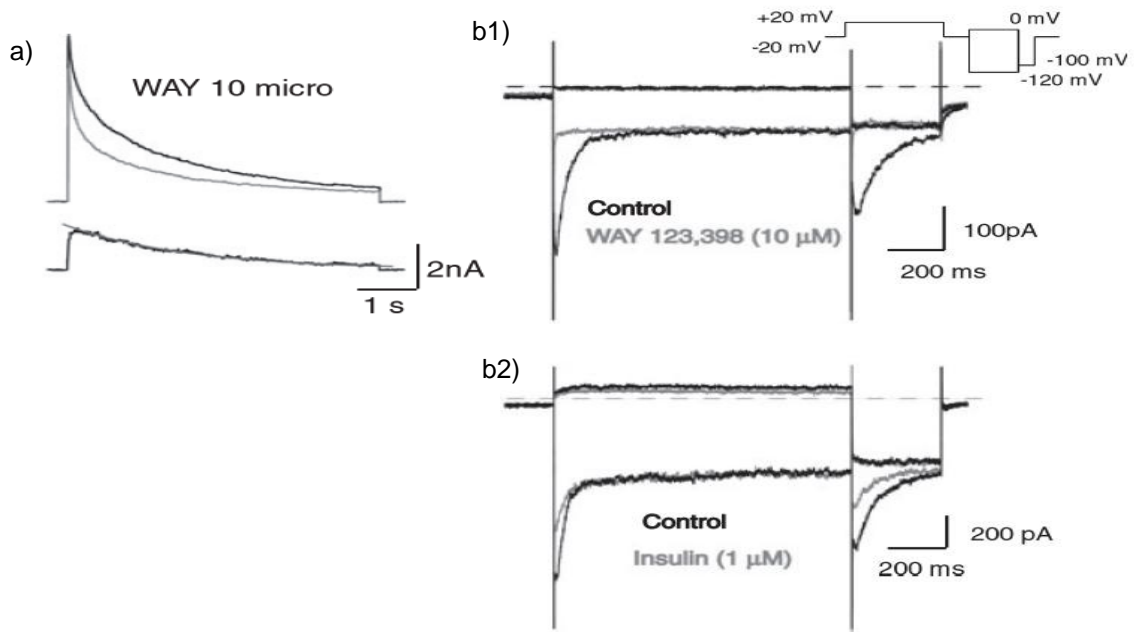


**Figura 1.6** – A insulina, 10 nM, inibiu apenas a componente lenta da corrente de  $K^+$ . a) Correntes de  $K^+$  evocadas por pulsos para +40 mV, a partir de -70 mV antes e depois da aplicação de insulina. A corrente sensível era obtida por subtração da corrente resultante do efeito da insulina (B) à corrente controlo (A). b) Relação dose-resposta para a redução, de ambas as componentes da corrente de  $K^+$ , pelo Way, evocada por pulsos para +40 mV, a partir de -70 mV (adaptado de Lima, et al., 2008).

A insulina, em concentrações na ordem dos nanomolar, inibe apenas uma das componentes (componente lenta -  $I_{slow}$ ). No entanto, se a concentração for maior, na ordem dos micromolar, ocorre também uma redução da componente rápida -  $I_{fast}$  (Lima, et al., 2008).

De modo a se determinar a natureza do canal subjacente à corrente sensível à insulina nas células N1E-115, utilizaram-se diferentes bloqueadores de canais de potássio. Pelas razões já mencionadas, seriam candidatos. O bloqueador margatoxina (MgTx) foi assim testado em correntes *whole-cell* destas células. Após a adição da MgTx, não se verificou qualquer efeito quer em  $I_{slow}$  ou  $I_{fast}$  (n=9) (Lima, et al., 2008).

Contrariamente, após adição de WAY123,398, um bloqueador de canais ERG, verificou-se uma redução na corrente *outward*. A adição de 10  $\mu$ M de WAY reduziu maioritariamente a  $I_{slow}$ , sendo a subtração das correntes semelhante a aquela obtida com a insulina. Uma vez que os canais tipo ERG são normalmente estudados evocando correntes de potássio *inward*, foi utilizada uma solução extracelular contendo 50mM de  $K^+$ . Utilizou-se um protocolo complexo que visa a monitorização de correntes de  $K^+$  a conduzirem para o interior da célula. As correntes encontradas, típicas de uma corrente ERG e abolidas por WAY123,398 (Figura 1.7- b1) mostraram-se ser sensíveis à insulina (Figura 1.7- b2). Assim, em células diferenciadas de neuroblastoma N1E-115, a corrente de  $K^+$  sensível à insulina é, pelo menos em parte mediada por canais tipo ERG.

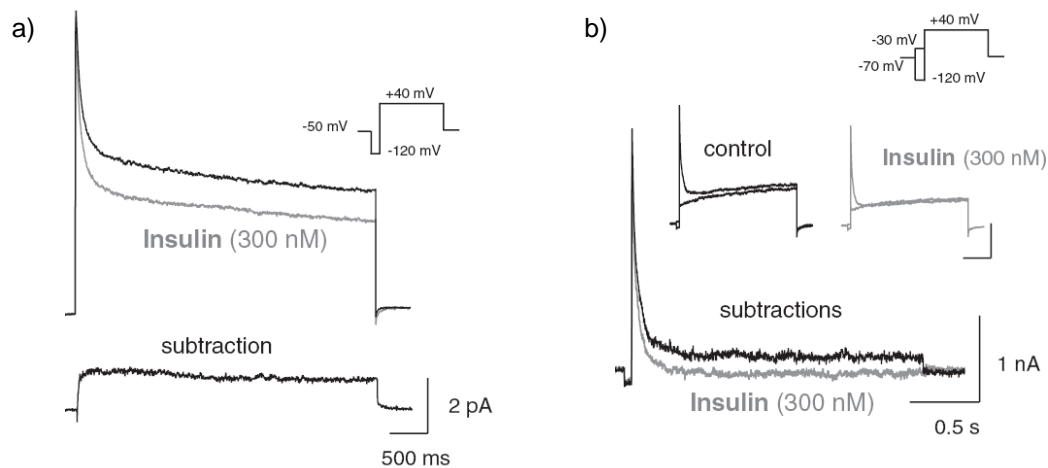


**Figura 1.7-** Efeito inibitório do bloqueador WAY123,398 e da insulina nos canais ERG. a) efeito de WAY na componente  $I_{slow}$  em correntes evocadas por um pulso despolarizante para +40mV (*holding potencial* -70mV) no controlo (traço preto) e na presença de 10 $\mu$ M de WAY (traço cinzento). b) Correntes de  $K^+$  *inward* eliminadas por 10 $\mu$ M de WAY (b1) e diminuídas por 1 $\mu$ M de insulina (b2) (adaptado de Lima, et al., 2008)).

Em neurónios do hipotálamo, a insulina activa os canais  $K_{ATP}$ , provocando uma hiperpolarização e conseqüentemente, uma diminuição do consumo de glucose (Woods, et al., 1979; Spanswick, et al., 2000).

No hipocampo, contudo, surge informação contraditória quanto ao efeito da insulina e do IGF (do inglês *insulin growth factor*). Pensa-se que, por um lado, a insulina aumenta a condutância de correntes de potássio induzidas por canais BK, diminuindo deste modo a excitabilidade (O'Malley, et al., 2003; O'Malley e Harvey., 2004) e, por outro, o IGF-1 aumenta a excitabilidade ao inibir as correntes de canais de potássio activados pela voltagem (Xing, et al., 2006; Xing, et al., 2007).

No entanto, um estudo mais recente mostrou que a insulina reduz especificamente a componente lenta ( $I_{slow}$ ) das correntes de  $K^+$  acivadas por voltagem em neurónios isolados da zona CA1 do hipocampo de ratos (Figura 1.8-a; Lima, et al., 2008)). A corrente rápida ( $I_{fast}$ ), correspondente à corrente A, não é todavia alterada pela insulina (Figura 1.8-b; Lima, et al., 2008).



**Figura 1.8-** A insulina inibe a componente lenta da corrente de  $K^+$  em neurónios piramidais isolados da região CA1 do hipocampo de ratos. a) correntes evocadas por um pulso de +40mV (*holding potencial* de -50mV) precedido por um pulso hiperpolarizante a -120mV no controlo (traço preto) e na presença de 300nM de insulina (traço cinzento); subsequente subtração de traços demonstrando um decaimento lento. b) a insulina não faz efeito na componente rápida. As correntes foram evocadas por um pulso despolarizante a +40mV (*holding potencial* de -70mV), precedido por um pré-pulso a -30mV ou a -120mV; este protocolo era aplicado antes (traço preto) e após a adição de 300nM de insulina (traço cinzento). A subtração demonstra a componente rápida isolada (adaptado de (Lima, et al., 2008).

Estas observações foram aprofundadas subsequentemente no nosso laboratório e os resultados surpreendentes são a base do presente trabalho (ver enquadramento do presente trabalho- secção 5 desta Introdução)

## 2. Doença de Alzheimer (DA)

### 2.1. Características da doença

A Doença de Alzheimer (DA) é a forma mais comum de demência entre as pessoas adultas no mundo ocidental (De la Monte, 2009). A DA começa normalmente por um declínio subtil na memória e progride para uma deterioração global no funcionamento cognitivo e adaptativo (Watson e Craft, 2004). Existem várias características da doença que são importantes para as alterações no comportamento, entre as quais destacam-se os aglomerados de neurofibrilas, placas senis contendo proteína  $\beta$ -amilóide ( $A\beta$ ), perda de volume cerebral e alterações no sistema colinérgico.

As sinapses são consideradas o primeiro local de patologia, sendo a perda de sinapses a melhor correlação com os defeitos cognitivos presentes na doença de Alzheimer (Hamos, et al., 1989; DeKosky e Scheff, 1990; Terry, et al., 1991; Selkoe, 2002; Coleman e Yao, 2003). Os efeitos tóxicos da proteína  $\beta$ -amilóide ( $A\beta$ ) extracelular nas sinapses são conhecidos há anos, mostrando estas, conjuntamente com as neurites danificadas, co-localização com a

proximidade das placas formadas por esta proteína (Dong, et al., 2007; Meyer-Luehmann, et al.).

No entanto, os efeitos do A $\beta$  são ainda não claros e existe muita discussão em torno desta questão. Por um lado, existem estudos que afirmam que o aumento da actividade sináptica conduz a uma maior libertação de A $\beta$  (Kamenetz, et al.; Cirrito, et al., 2005; Cirrito, et al., 2008) levando ao surgimento da DA, uma vez que esta proteína é conhecida por diminuir a plasticidade e alterar a função sináptica (Selkoe, 2002; Trinchese, et al., 2004; Almeida, et al., 2005; Snyder, et al., 2006; Hsieh, et al., 2006; Shankar, et al., 2008; Deshpande, et al., 2009).

Por outro lado, verifica-se que a secreção de A $\beta$  ocorre em condições fisiológicas normais. Havendo estudos que demonstram que concentrações baixas de A $\beta$  podem aumentar a plasticidade sináptica e a memória (Puzzo, et al., 2008; Garcia-Osta e Alberini, 2009). Havendo estudos que sugerem que a actividade neuronal pode levar a uma menor probabilidade do desenvolvimento da doença (Stern, 2006).

Estas aparentes contradições dependem em grande escala do estado de agregação e da sequência de aminoácidos da forma de A $\beta$  em questão. No entanto está a ficar claro que a actividade sináptica diminui os níveis intraneuronais de A $\beta$  e protege da DA, muito embora aumente a secreção da proteína para o ambiente extracelular (Tampellini, et al., 2009). Acredita-se assim, que o aumento dos níveis de A $\beta$  intracelulares é prejudicial (Gouras, et al., 2000; D'Andrea, et al., 2001; Gyure, et al., 2001; Wirths, et al., 2001; Mori, et al., 2002; Oddo, et al., 2003; Cataldo, et al., 2004), levando a crer que a acumulação intracelular da proteína leva à sua libertação para o ambiente extracelular, não por secreção mais sim por degeneração da própria sinapse (Tampellini e Gouras, 2010).

## 2.2. Insulina na Doença de Alzheimer

A diminuição da produção de energia/ATP é uma das disfunções que ocorre na doença de Alzheimer. De facto, recentemente, têm sido realizados diversos estudos que apontam que disfunções no metabolismo da glucose ou na actividade da insulina podem conduzir ao declínio cognitivo em pacientes com a DA. Por exemplo, tem vindo a ser sugerido que a inibição do InsR nos neurónios pode funcionar como um modelo *in vivo* para o Alzheimer (Frolich, et al., 1999; Hoyer e Lannert, 1999; Hoyer, et al., 2000). Hoyer também propôs que a dessensibilização do InsR contribui para a DA (Hoyer, 2002). A diminuição dos níveis de insulina no sistema nervoso central (SNC) e da expressão do InsR resultam em níveis reduzidos de formação de acetil-colina e uma diminuição da circulação sanguínea no cérebro. Há ainda evidências de que nos estádios iniciais da DA, a utilização da glucose no cérebro fica reduzida em cerca de 45% (Hoyer e Nitsch, 1989), sendo esta característica notória ainda antes dos primeiros sintomas de demência.

Análises *postmortem* de cérebros humanos demonstram que a DA está associada com uma redução significativa de factores tróficos de Ins/IGF e dos seus receptores. Estas análises

revelam ainda que estas deficiências aumentam com a progressão da demência e da neurodegeneração (Steen, et al., 2005; Rivera, et al., 2005). Consistentes com estes resultados, estão também os estudos clínicos nos quais se verifica que induzindo hiperinsulinémia enquanto se mantém a euglicémia, pode facilitar a memória de pacientes com Alzheimer (Craft, et al., 1996; Craft, et al., 1999; Craft, et al., 2003).

Defeitos e disfunções no metabolismo da glucose e na actividade da insulina estão associados a defeitos crónicos no metabolismo oxidativo do cérebro, verificando-se assim, um aumento na acidez intracelular. Este aumento na acidez, principalmente no Complexo de Golgi e no retículo endoplasmático, interfere com o processamento das proteínas, como por exemplo, a A $\beta$ , uma proteína que como já foi visto atrás, encontra-se fortemente implicada na patogenicidade da doença de Alzheimer. Consistentes com esta teoria, os cérebros de pacientes com DA possuem uma reduzida marcação de InsR e de actividade tirosina cinase (Frolich, et al., 1998).

A insulina modula os níveis da proteína A $\beta$  em neurónios em cultura, promovendo a sua libertação intracelular e acelera o seu tráfego do Golgi para a membrana plasmática (Gasparini, et al., 2001). Desta forma, a redução nos níveis de insulina pode reduzir a libertação de A $\beta$  do compartimento intracelular para o extracelular.

Todos estes estudos apontam que a DA está de certa forma associada com a resistência à insulina.

### **2.3. Relação entre Doença de Alzheimer e a Diabetes**

Com todas estas evidências, é legítimo estabelecer uma relação entre a DA e a diabetes. O interesse em estabelecer esta relação entre a diabetes *mellitus* tipo 2 (DMT2) (com as suas características da resistência à insulina e da hiperinsulinémia) com os problemas cognitivos e a DA, começou há menos de 10 anos atrás (De la Monte e Wands, 2005; Hoyer e Nitsch, 1989; Schubert, et al., 2003; Craft, 2007). Existe agora uma evidência sólida de que muitos dos aspectos críticos da DA podem ser explicados com base em problemas na sinalização da insulina (De la Monte e Wands, 2005; De la Monte e Wands, 2008).

A ideia de que as doenças nas quais se encontra a resistência à insulina, incluindo a obesidade e a DMT2, contribuem para defeitos cognitivos e para a neurodegeneração é suportada por vários factos, entre os quais:

- 1- A mortalidade por DA, DMT2 e obesidade tem aumentado rapidamente durante as últimas duas a três décadas (De la Monte, et al., 2009);
- 2- Indivíduos com DMT2, ou obesidade, possuem um maior risco de desenvolverem defeitos cognitivos, demência ou DA (Pasquier, et al., 2006);
- 3- A DA está associada com o progressivo aumento da resistência à insulina (Steen, et al., 2005; Rivera, et al., 2005; Craft, 2007);

- 4- A DMT2 em modelos experimentais causa deficiências cognitivas (Winocur, et al., 2005);
- 5- Indução experimental de resistência à insulina no cérebro causa degenerações do tipo da DA e deficiências cognitivas (Lester-Coll, et al., 2006);
- 6- Administração intranasal de insulina aumenta a performance cognitiva em modelos experimentais e em pacientes humanos de DA (De la Monte, et al., 2006; Landreth, 2007; Reger, et al., 2008);
- 7- Características anormais moleculares, bioquímicas e mecânicas são partilhadas entre a DA e a DMT2 (Nicolls, 2004).

Como se pode constatar, a relação entre estas duas doenças é evidente. É assim preponderante estudar a dinâmica fisiológica do InsR em neurónios centrais. Sendo o hipocampo um dos locais mais afectados na DA, e pela sua importância no estabelecimento da memória, o modelo usado para este estudo é adequado. Serão realizadas experiências de *SDS-PAGE* e *western-blot* de modo a se descobrir qual a variação da expressão do InsR durante o ciclo pós-prandial/jejum. Uma vez que a relação DMT2 e obesidade com a DA é tão evidente, serão realizados ensaios semelhantes com modelos animais experimentais *obese zucker rats* (OZR) e *zucker diabetic fatty rats* (ZDF). É também essencial conhecer-se o canal de K<sup>+</sup> sensível à insulina nestes neurónios e conhecer como este se enquadra nos resultados recentes do nosso laboratório (ver secção 5 desta Introdução). Face a esse objectivo central, é importante rever o essencial do estado de conhecimento sobre os canais de K<sup>+</sup>.

### 3. Canais de potássio (K<sup>+</sup>)

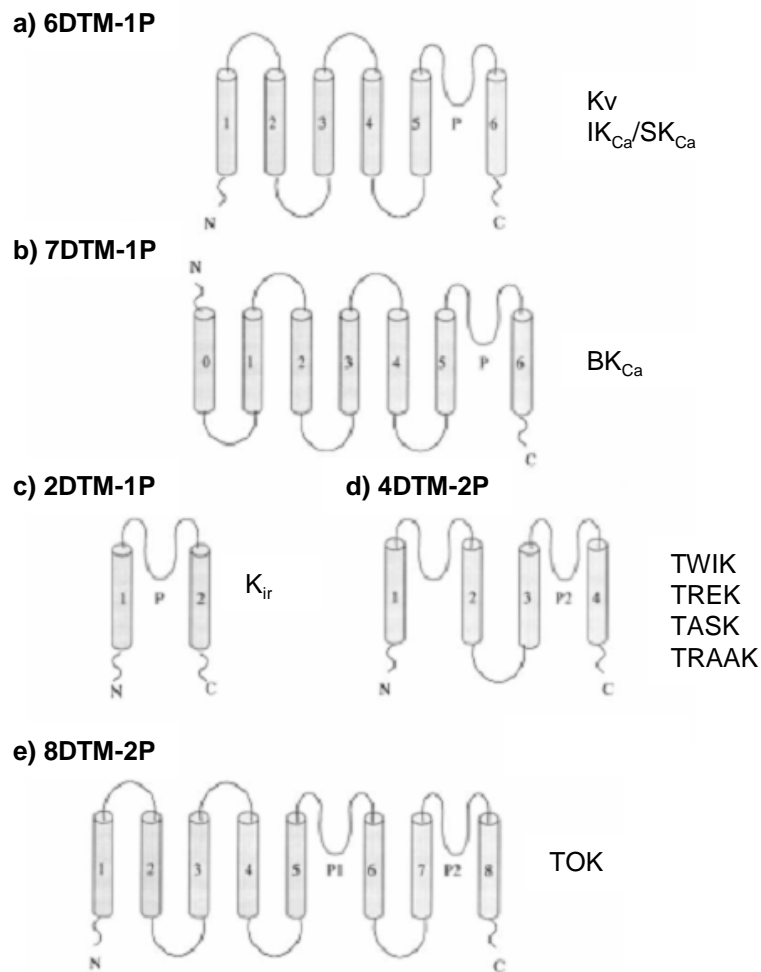
Os canais selectivos a K<sup>+</sup> constituem o maior e mais diverso grupo de canais iónicos, representado por cerca de 70 *loci* conhecidos no genoma dos mamíferos. Os membros desta família desempenham funções críticas em processos de transdução de sinal que regulam, por exemplo, a libertação de neurotransmissores, o batimento cardíaco, a secreção de insulina, a excitabilidade neuronal, o transporte epitelial de electrólitos, a contracção do músculo liso e a regulação do volume celular (Hille, 1992).

Em células excitáveis, o papel dos canais de K<sup>+</sup> está relacionado com a estabilização do potencial de membrana, uma vez que aproximam o potencial membranar do potencial de equilíbrio do K<sup>+</sup> e o afastam do *threshold* de disparo. Desta forma, os canais de K<sup>+</sup> determinam o potencial de repouso, mantêm os potenciais de acção curtos, terminam períodos de actividade intensa, separam intervalos entre potenciais de acção durante disparos repetitivos e, usualmente, quando no estado aberto, diminuem a eficácia de *inputs* excitatórios numa célula (Hille, 1992).

Os canais de  $K^+$  são proteínas integrais de membrana capazes de conduzirem selectivamente iões  $K^+$ , de acordo com o seu potencial electroquímico, a taxa de  $10^6$  a  $10^8$  iões/s. Como qualquer canal iónico, os canais de potássio são constituídos por um poro aquoso que permite a passagem dos iões através da membrana celular, um poro de selectividade que especifica os iões  $K^+$  como as espécies permeantes, e um mecanismo de *gating* que permite a mudança entre as conformações aberta e fechada (Hille, 1992). Desde que o primeiro gene codificante de um canal de  $K^+$  foi clonado (Papazian, et al., 1987), foram já identificados dezenas de genes que codificam uma variedade de canais de  $K^+$ , todos eles contendo um segmento homólogo do poro da selectividade para iões  $K^+$  (Gutman, et al., 2005).

A principal proteína constituinte do poro nos canais de  $K^+$  é constituída por quatro subunidades distintas, cada uma denominada subunidade  $\alpha$ , que se associam na membrana formando o canal funcional (MacKinnon, 1991; Papazian, 1999). Desta forma, os canais de  $K^+$  tanto podem ser formados por quatro subunidades idênticas, homotetrámeros; como por subunidades diferentes pertencentes à mesma família, heterotetrámeros. Este facto confere uma enorme diversidade a estes canais (Gutman, et al., 2005).

Dependendo da topologia da subunidade  $\alpha$ , ou seja, o número de domínios transmembranares (DTMs) e *loops* do poro (*P-loops*), os canais de  $K^+$  podem ser classificados em cinco famílias. Estas famílias são por sua vez organizadas em sub-famílias de acordo com a homologia da sequência de aminoácidos (Robbins, 2001). Como se pode observar na Figura 1.9, os canais de  $K^+$  dependentes-da-voltagem, Kv, pertencem à família cuja subunidade  $\alpha$  é constituída por seis domínios transmembranares e um *P-loop* (6DTM-1P).



**Figura 1.9-** Representação esquemática da classificação estrutural dos canais de K<sup>+</sup>. (DTMs, domínios transmembranares, representados pelos cilindros cinzentos; P, posição e número dos P-loops; N e C extremidades amina e carboxilo das proteínas, respectivamente; Kv, canais de K<sup>+</sup> dependentes-da-voltagem; SK<sub>Ca</sub>, canal de K<sup>+</sup> sensível-a-Ca<sup>2+</sup> de condutância pequena; IK<sub>Ca</sub>, canal de K<sup>+</sup> sensível-a-Ca<sup>2+</sup> de condutância intermédia; BK<sub>Ca</sub>, canal de K<sup>+</sup> sensível a Ca<sup>2+</sup> de condutância elevada; Kir, canais de K<sup>+</sup> inward rectifiers; TWIK, two-pore weak inward rectifier; TREK, TWIK-related K<sup>+</sup> channel; TASK, TWIK-related acid-sensitive K<sup>+</sup> channel; TRAAK, TWIK-related arachidonic acid- stimulated K<sup>+</sup> channel (adaptado de Robbins, 2001).

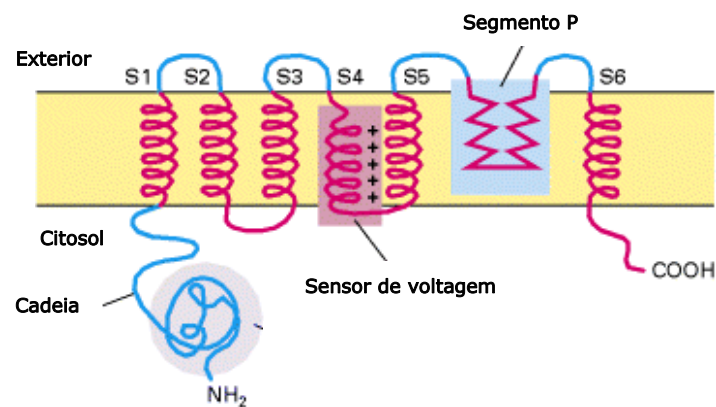
### 3.1. Canais de Potássio dependentes-da-voltagem

No cérebro, os Kv são essenciais para o transporte e processamento de informação, dado que terminam o potencial de acção, repolarizam o neurónio, determinam o potencial de repouso e regulam a libertação de neurotransmissores a partir do terminal pré-sináptico (Gutman, et al., 2005). Para além disso, praticamente cada tipo de célula excitável possui o seu conjunto único de canais de K<sup>+</sup>, em termos de dependência de voltagem, taxas de activação e inactivação e farmacologia. Dada a importância, versatilidade e especificidade destes canais de K<sup>+</sup> é possível compreender a impressionante diversidade e número de Kv no cérebro (Robbins, 2001).

### 3.1.1. Selectividade e activação

Tal como qualquer tipo de canal iónico, os elementos funcionais da família de Kv são caracterizados por dois aspectos complementares: a condutância e selectividade iónicas e o *gating* do poro.

O poro condutor de iões e o filtro de selectividade dos Kv são formados pelos segmentos S5 e S6 e pelo *P-loop* existente entre eles, onde se localiza uma sequência de aminoácidos altamente conservada dentro da superfamília de canais de  $K^+$ , e que constitui o núcleo do filtro de selectividade (Armstrong e Hille., 1998; Shieh, et al., 2000).



**Figura 1.10-** Estrutura do canal de  $K^+$  dependente-da-voltagem. O poro condutor de iões e o filtro de selectividade dos Kv são formados pelos segmentos S5 e S6 e pelo *P-loop* existente entre eles, onde se localiza a sequência de aminoácidos – Thr-X-X-Thr-X-Gly-Tyr-Gly – que constitui o núcleo do filtro de selectividade. Os elementos estruturais responsáveis pela abertura dependente da voltagem do poro são os segmentos S1 a S4. O segmento S4, que possui motivos repetidos formados por um resíduo de aminoácido carregado positivamente (arginina ou lisina) seguido por dois resíduos hidrófobos, representa o componente principal do sensor de voltagem. Por sua vez, a interacção electrostática entre cargas negativas nos segmentos S2 e S3 e o segmento S4, também contribui para o mecanismo de *gating* (adaptado de Lodish, et al., 2000).

Nos canais dependentes-da-voltagem a entrada de iões permeantes requer uma despolarização anterior da membrana, o que provoca uma alteração na conformação do canal. Nos Kv, os elementos estruturais responsáveis pela abertura dependente da voltagem do poro são os segmentos S1 e S4 (Figura 1.10), constituindo o segmento S4 o componente principal do sensor de voltagem (Shieh, et al., 2001).

### 3.1.2. Inactivação

Os Kv podem sofrer três mecanismos diferentes de inactivação, entendendo-se por inactivação, um estado não condutor que ocorre quando os canais são mantidos sob despolarização. Estes mecanismos são regulados por domínios estruturais diferentes do canal e são denominados por inactivação tipo-N, tipo-C e tipo-P. A inactivação tipo-N é um processo rápido, no qual os resíduos da extremidade N do canal  $K^+$  se ligam à cadeia que une os segmentos S4 e S5, tapando o poro quando o canal abre (Shieh, et al., 2000). Por sua vez, a inactivação tipo-C e tipo-P é mais lenta, uma vez que envolve a modulação de estruturas

próximas da boca extracelular do canal e de resíduos específicos no poro, respectivamente (Grissmer, 1997).

### 3.1.3. Famílias de canais de potássio dependentes-da-voltagem

Os canais de  $K^+$  dependentes-da-voltagem, devido à sua importância, versatilidade e especificidade constituem um grupo de canais de  $K^+$ , além de numeroso, muito diverso. Na Tabela 1.1 encontram-se os nomes dos membros do grupo de canais Kv, de acordo com a União Internacional de Farmacologia (*International Union of Pharmacology*, IUPHAR), bem como o respectivo significado funcional e a distribuição nos tecidos.

**Tabela 1.1- Membros do grupo de canais de  $K^+$  dependentes-da-voltagem e respectivo significado funcional e distribuição nos tecidos (Kv, canal de  $K^+$  dependente-da-voltagem; eag, canal de  $K^+$  ether-a-go-go; elk, canal de  $K^+$  ether-a-go-go-like; (h)erg, canal de  $K^+$  ether-a-go-go-related (humano);  $I_{DR}$ , corrente rectificadora retardada;  $I_A$ , corrente tipo A;  $I_{ur}$ , corrente de  $K^+$  com activação ultra-rápida;  $I_{DR(S)}$ , corrente de  $K^+$  com activação lenta;  $I_{cAMP}$ , corrente de  $K^+$  activada-por-cAMP;  $I_M$ , corrente tipo M;  $I_{DR(R)}$ , componente rápida da corrente rectificadora retardada de  $K^+$  no coração) (adaptado de Robbins, 2001; Gutman, et al., 2005; Coetzee et al., 1999).**

Subunidade de família	Nome do canal	Corrente / Significado funcional	Distribuição nos tecidos
<b>Kv1 (Shaker)</b>	Kv1.1	$I_{DR}$	Cérebro, coração, músculo-esquelético
	Kv1.2	$I_{DR}$	Cérebro, coração, músculo-liso
	Kv1.3	$I_{DR}$	Cérebro, pulmão, retina, baço, linfócitos, rim
	Kv1.4	$I_A$	Cérebro, coração, músculo-esquelético
	Kv1.5	$I_{DR} / I_{ur}$	Coração, rim, músculo-liso, músculo-esquelético, cérebro, pulmão, pituitária, artérias aorta e pulmonária
	Kv1.6	$I_{DR}$	Cérebro, coração, pulmão
	Kv1.7	$I_{DR} /$ componente de $I_{ur}$	Placenta, âmnio, músculo-esquelético, coração, pulmão, rim, cérebro
	Kv1.8	$I_{DR} /$ componente de $I_{ur}$	Rim, cérebro, coração, músculo-esquelético
<b>Kv2 (Shab)</b>	Kv2.1	$I_{DR}$	Cérebro, coração, músculo-esquelético
	Kv2.2	$I_{DR}$	Cérebro, coração
<b>Kv3 (Shaw)</b>	Kv3.1	$I_{DR}$	Cérebro, músculo-esquelético, coração, linfócitos T, pulmão
	Kv3.2	$I_{DR}$	Cérebro, coração
	Kv3.3	$I_A$	Cérebro, coração, timo
	Kv3.4	$I_A$ (inactivação rápida)	Paratiróide, próstata, cérebro, músculo-esquelético, coração
<b>Kv4 (Shal)</b>	Kv4.1	$I_A$	Cérebro, coração, pulmão, fígado, rim
	Kv4.2	$I_A$	Cérebro, coração
	Kv4.3	$I_A$	Coração, cérebro, músculo-liso
<b>Kv5</b>	Kv5.1	Modificador de Kv2	Cérebro, coração, músculo-esquelético, fígado, rim, pâncreas
<b>Kv6</b>	Kv6.1	Modificador/	Músculo-esquelético, cérebro, útero,

		silenciador de Kv2	ovário, fígado, rim, pulmão
	Kv6.2	Modificador/ Silenciador	Coração, cérebro
	Kv6.3	Modificador/ Silenciador	Cérebro
	Kv6.4	Modificador/ Silenciador	Cérebro, fígado, intestino delgado, cólon
<b>Kv7</b>	Kv7.1 / KVLQT1	$I_{DR(S)}$ (com KCNE1) $I_{cAMP}$ (com KCN3)	Coração, rim, pulmão, pâncreas, placenta
	Kv7.2 / KQT2	$I_M$	Cérebro, coração, neuroblastomas
	Kv7.3 / KQT3	$I_M$	Cérebro
	Kv7.4 / KQT4	IKn, IKL	Cóclea, placenta
<b>Kv8</b>	Kv8.1 / Kv2.3	Modificador/ Silenciador	Cérebro, rim
	Kv8.2	Modificador/ Silenciador	Pulmão, fígado, rim, pâncreas, baço, timo
<b>Kv9</b>	Kv9.1	Modificador/ Silenciador	Cérebro
	Kv9.2	Modificador/ Silenciador	Cérebro
	Kv9.3	Modificador/ Silenciador	Cérebro, coração, rim, pulmão
<b>Kv10</b>	Kv10.1 / eag1	IK <sub>DR</sub>	Cérebro, músculo-esquelético, tumores
	Kv10.2 / eag2	IK <sub>DR</sub> (não inactivante)	Cérebro
<b>Kv11</b>	Kv11.1 / erg1 / HERG	$I_{DR(R)}$ (com propriedades <i>inwardly rectifying</i> )	Coração, cérebro, neuroblastomas
	Kv11.2 / erg2	--	Cérebro, neuroblastomas
	Kv11.3 / erg3	--	Cérebro
<b>Kv12</b>	Kv12.1 / elk1, elk3	(activação e desactivação lentas)	Gânglios simpáticos, cérebro
	Kv12.2 / elk2	--	Cérebro, tumores
	Kv12.3 / elk1	(activação lenta)	Cérebro, neuroblastomas

Os canais de  $K^+$  dependentes-da-voltagem formam um grupo muito mais diverso do que aquele que seria previsto apenas com base no número distinto de genes que os codificam. Esta diversidade tem origem em diversos factores, como a heteromultimerização, que possibilita que os canais de  $K^+$  possam ser formados tanto por quatro subunidades idênticas, como por subunidades diferentes pertencentes à mesma família. As subunidades “modificadoras”, que embora não produzindo canais funcionais, podem formar heterotetrâmeros com subunidades da família Kv2, aumentando assim a diversidade funcional dentro desta família. Outro factor importante são as proteínas acessório, que podem associar-se com tetrâmeros de Kv, modificando as propriedades, o *splicing* alternativo de mRNA, e por último as modificações pós-traducionais, como por exemplo a fosforilação (Gutman, et al., 2005).

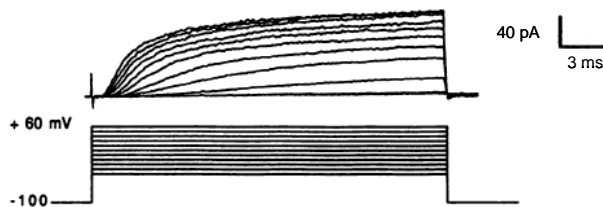
Os canais de  $K^+$  dependentes-da-voltagem são a base molecular de, principalmente, três grandes tipos de correntes de  $K^+$ , como se pode observar na Tabela 1.1. Na Tabela 1.2

encontram-se as principais propriedades, funções e bloqueadores das correntes rectificadora retardada (*delayed rectifier*,  $I_{DR}$ ), tipo A ( $I_A$ ) e tipo M ( $I_M$ ) e na Figura 1.11 exemplos ilustrativos destas correntes.

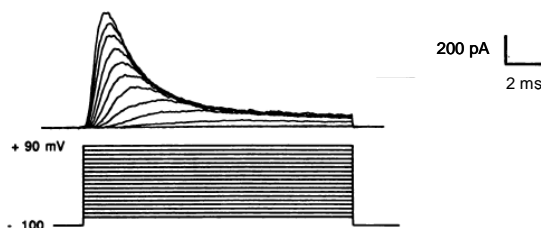
**Tabela 1.2 – Tipos de correntes de  $K^+$  dependentes-da-voltagem (TEA, tetraetilamónio; 4-AP, 4-aminopiridina; 3,4-DAP, 3,4-diaminopiridina) (adaptada de Hille, 1992)**

Corrente	Propriedades e funções	Bloqueadores
<b>Rectificadora Retardada, <math>I_{DR}</math></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Activada por despolarização</li> <li>- Activação retardada</li> <li>- Inactivação lenta</li> <li>- Condutância: &lt;1-20 pS</li> <li>- Responsável pela repolarização do potencial de acção.</li> </ul>	TEA, 4-AP, 3,4-DAP, $Cs^+$ , $Ba^{2+}$ , dendrotoxinas, quinidina
<b>Tipo A, <math>I_A</math></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Activada por despolarização</li> <li>- Activação e inactivação rápidas</li> <li>- Condutância: &lt;1-20 pS</li> </ul>	TEA, 4-AP, 3,4-DAP, quinidina
<b>Tipo M, <math>I_M</math></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Activada por despolarização</li> <li>- Activação lenta</li> <li>- Não inactivante</li> <li>- Desactivação lenta</li> <li>- Condutância: 5-18 pS</li> <li>- Contribui para a condutância de potássio de repouso.</li> <li>- Inactivada por ACh, que actua sobre receptores muscarínicos, e por péptidos, sendo a inactivação em ambos os casos através de sistemas de mensageiros.</li> <li>- Aumenta a velocidade de repolarização de potenciais de acção e potenciais sinápticos.</li> </ul>	Muscarina, linopirdina, bradiquinina, substância P, XE-911, $Ba^{2+}$

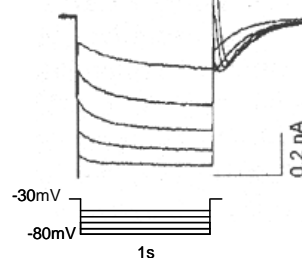
a) Corrente rectificadora retardada



b) Corrente tipo A



c) Corrente tipo M



**Figura 1.11-** Tipos de correntes de  $K^+$  dependentes-da-voltagem. a) Corrente rectificadora retardada em neurónios piramidais do hipocampo (Rehm, et al., 1991). b) Corrente tipo A em neurónios piramidais do hipocampo, (Rehm, et al., 1991). c) Corrente tipo M em neurónios do gânglio cervical superior (Wang, et al., 1998).

### 3.2. Canais Kv1.3

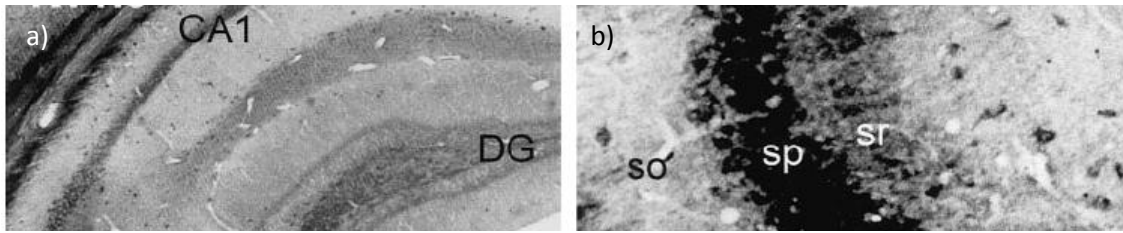
Como se pode verificar na Tabela 1.1, os canais Kv1.3 constituem o subtipo de canais Kv encontrado principalmente em células de origem mielóide, incluindo os linfócitos T e B e as plaquetas. Nas células T, os Kv1.3 são conhecidos por serem o principal regulador da activação celular, mantendo o potencial de membrana e contrabalançando o fluxo de potássio necessário para manter o influxo de  $Ca^{2+}$  (Cahalan e Chandy., 1997; Lewis e Cahalan., 1995). O bloqueio dos Kv1.3 atenua a produção de citocinas pro-inflamatória. Para além disso, os canais Kv1.3 são considerados como um alvo terapêutico importante para doenças auto-imunes, como por exemplo a esclerose múltipla, onde o bloqueio selectivo deste canal desacelera a progressão da doença em modelos experimentais da mesma (Colden-Stanfield e Gallin, 1998).

Como se pode observar na Tabela 1.1, os canais Kv1.3 encontram-se expressos por diversos tecidos, nomeadamente nos pulmões, retina, baço, rim e cérebro. No cérebro, a expressão é particularmente notória no bolbo olfactivo, no cerebelo e no hipocampo (Coetzee, et al., 1999).

Por outro lado, os canais Kv1.3 estão bem caracterizados biofísicamente. Estes canais possuem cinéticas de *gating* características que diferem de outros tipos de corrente do mesmo género. Em resposta a pulsos despolarizantes, as correntes de Kv1.3 são activadas em poucos milissegundos, sofrendo posteriormente uma inactivação lenta, da qual recupera após vários segundos. A constante de tempo ( $\tau$ ) de inactivação ( $\tau_{inact}$ ) pode variar entre 250 a 600ms, segundo estudos em sistemas de expressão heteróloga (Coetzee, et al., 1999), e um  $\tau$  de activação ( $\tau_{act}$ ) de 3ms (Gutman, et al., 2005).

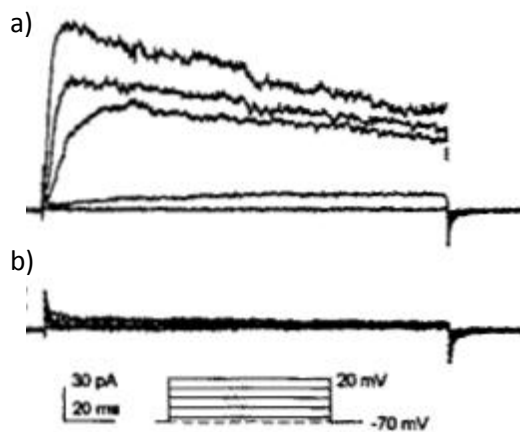
Como já foi referenciado, os canais Kv1.3 existem no bolbo olfactivo e no hipocampo. Estudos recentes demonstram que estes canais desempenham funções importantes no bolbo olfactivo. Delecção do gene que codifica este canal produz ratos “*super-smeller*” (Fadool, et al., 2004). A relação fisiológica deste canal com o sentido do olfacto e com o InsR foi explanada na secção 1.3 desta introdução.

No hipocampo, estes canais encontram-se nomeadamente nas células piramidais da zona CA1. Sendo esta zona do cérebro uma das mais afectadas na DA e tendo em conta os estudos anteriores que já foram mencionados, este canal apresenta-se como alvo principal de estudo no presente projecto.



**Figura 1.12-** Localização dos canais Kv1.3. a) no hipocampo de ratos, nomeadamente na zona CA1 e giro dentado (DG). b) em camadas diferentes a marcação difere, existe uma maior expressão dos canais no extracto piramidal (sp) do que no *stratum radiatum* (sr) e *stratum oriens* (so) (adaptado de Grosse, et al., 2000).

Para tal, usaremos como bloqueador a margatoxina (MgTx), um bloqueador selectivo de canais Kv1.3 isolada a partir do escorpião *centruroides margaritatus*. A MgTx é um péptido de 39 aminoácidos (Garcia-Calvo, et al., 1993). Na Figura 1.13 está demonstrada a inibição provocada por adição de 1nM de MgTx.



**Figura 1.13-** Inibição do Kv1.3 por MgTx. a) solução extracelular controlo. b) solução extracelular contendo 1nM de MgTx. A experiência foi realizada em linfócitos T humanos. O *holding-potencial* era de -70mV e os pulsos ocorriam de -60mV até -20mV a intervalos de +20mV. Os pulsos tinham a duração de 180ms (adaptado de Garcia-Calvo, et al., 1993).

### 3.3. Canais ERG

Uma vez que (a) os canais ERG são responsáveis pela corrente K<sup>+</sup> sensível à insulina em células de neuroblastoma N1E-115 (Lima et al., 2008) e, (b) os canais ERG formam correntes funcionais em nerónios piramidais de CA1 (Alves et al., em preparação), os canais ERG são também candidatos à corrente sensível à insulina nos neurónios do hipocampo,

Os canais EAG (*ether-à-go-go gene*) formam uma família de canais de potássio dependentes da voltagem com 3 sub-famílias: eag, elk (eag-like) e erg (eag-related gene).

Tanto os canais erg humanos como os de rato, expressos em oócitos de *Xenopus laevis* (CHO) e em células de mamífero (HEK 293), respectivamente, são responsáveis por mediar correntes membranares e exibir propriedades cinéticas características. Em

despolarizações para potenciais inferiores a 0 mV o tempo de activação das correntes erg é muito lento, atingindo o estado estacionário somente após alguns segundos. Uma despolarização mais forte despoleta um padrão típico de correntes erg. Tal é explicado se se assumir que os canais de potássio erg têm um mecanismo de fecho e de abertura inverso ao dos canais de potássio de correntes rectificadoras retardadas dependentes da voltagem clássicos. Um exemplo deste facto é que apresentam uma inactivação mais rápida do que a activação e a recuperação da inactivação é considerável mais rápida que a desactivação.

Apesar de se conhecer bem o papel destes canais nas células cardíacas, existe pouca informação relativa à função destes canais nos neurónios cerebrais. Sabe-se contudo que formam correntes funcionais com relevância no controle de padrões de disparo em células de Purkinge (Sacco, et al., 2003), em neurónios de cultura romboencefálicos (Hirdes, et al., 2005) e neurónios do sistema auditivo (Hardman & Forsythe, 2009) .

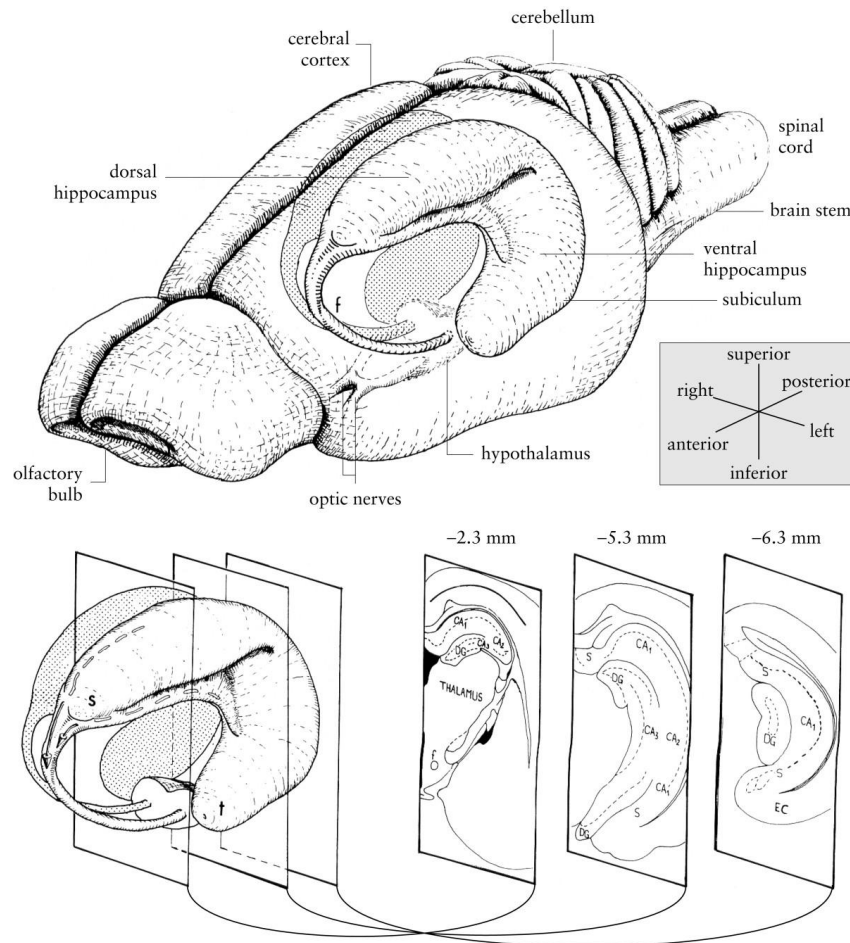
Em termos farmacológicos os canais erg de potássio apresentam um perfil característico e distinto dos restantes canais de potássio. São selectiva e reversivelmente bloqueados por metanosulfoanilidas como o E-4031, o Way 123,398, a dofetilida e uma toxina de escorpião (toxina erg). Estas substâncias estão descritas como ferramentas importantes na separação de correntes erg de correntes nativas.

## **4. Modelo experimental**

### **4.1. Hipocampo**

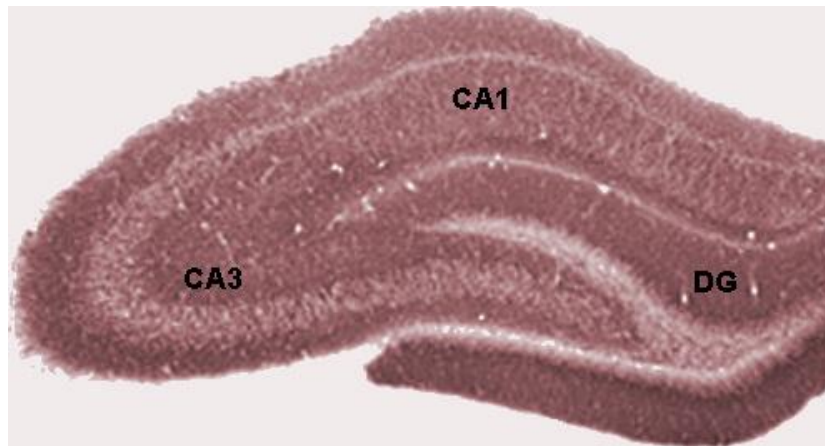
O hipocampo está envolvido em mecanismos de memória e aprendizagem e encontra-se entre as estruturas corticais melhor caracterizadas. O seu estudo tem particular interesse devido ao facto de uma fisiopatologia nesta estrutura ter consequências clínicas importantes, por exemplo: é um alvo para desordens neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer (Craft, et al., 1996) e sabe-se que também está envolvido na epilepsia do lobo temporal.

Neste modelo experimental utilizaram-se hipocampos de cérebro de rato. O hipocampo é uma estrutura reniforme cilíndrica situada em cada hemisfério cerebral, do lado interno do lobo temporal, em posição dorsal relativamente ao tálamo e ao hipotálamo e os seus eixos longitudinais formam um semi-círculo em torno do tálamo (Figura 1.14).



**Figura 1.14-** Diagrama do hipocampo de rato. Esquema do cérebro de rato, em que se evidencia a estrutura tridimensional do hipocampo e as estruturas relacionadas. Em baixo e do lado direito da figura encontram-se três secções do hipocampo esquerdo. EC – córtex entorinal; f – fórmix; s – região septal do hipocampo; S – subículo; t – região temporal do hipocampo (adaptado de Cheung e Cardinal, 2005)).

O hipocampo pode ser dividido em quatro regiões, tradicionalmente designadas por CA1-CA4 (do latim *cornu Ammon*, que significa corneta de Ammon, devido à sua semelhança com os chifres de carneiro), apesar de por vezes se utilizar uma nomenclatura introduzida por Cajal, que divide o hipocampo em duas regiões: região superior e região inferior. Neste trabalho utilizar-se-á a designação tradicional (Figura 1.15). As regiões CA1 e CA3 distribuem-se por quase todo o hipocampo e por oposição a região CA2 é tão pequena e indistinguível em algumas espécies, que muitas vezes é ignorada (Cheung e Cardinal, 2005).



**Figura 1.15-** Fotografia de um corte longitudinal de um hipocampo de rato com 30 meses de idade, em que se evidenciam as regiões CA1-3 (adaptado de O'Keefe e Dostrovsky, 1971)).

Pode-se dividir o hipocampo em camadas e as três mais importantes são: a camada polimórfica (*stratum oriens*), a piramidal (*stratum pyramidale*) e a molecular (*stratum radiatum* e *stratum lacunosum-moleculare*). Os neurónios mais abundantes no hipocampo são os neurónios piramidais, cujos corpos celulares estão organizados e localizados na camada piramidal. Esta camada forma uma folha curva com uma espessura variável de 2 a 3 células. Os corpos celulares piramidais são cónicos (piramidais) com um diâmetro de 20-40µm na base e 40-60µm no topo, possuem uma dendrite apical fina com 5-10µm de diâmetro e esta atravessa toda a camada molecular. Na sua constituição cada neurónio possui várias dendrites basais que se prolongam por 200-300µm e formam a camada polimórfica. A morfologia das células piramidais varia gradualmente no hipocampo, ficando com os corpos celulares cada vez mais pequenos e com as dendrites apicais mais longas, finas e regulares no seu padrão de formação, à medida que nos afastamos da região CA3 e nos aproximamos da região CA1 (Alshuaib, et al., 2001).

O hipocampo integrando o córtex límbico, tem sido utilizado como modelo em diversos estudos, devido à sua estrutura relativamente simples. A sua utilização como modelo engloba vastos campos das neurociências, dos quais destacam-se: estudos de aprendizagem e memória; de função sináptica e de integração neuronal. Uma vantagem deste modelo prende-se com a sua relativa facilidade de remoção do cérebro.

#### **4.2. Fatias versus células isoladas**

Fatias de estruturas cerebrais são utilizadas em estudos electrofisiológicos desde 1966, altura em que se conseguiu manter uma população neuronal electricamente excitável *in vitro* (fatias do córtex olfactivo). Alguns anos mais tarde, estudos em fatias transversais de hipocampo provaram que apesar de as suas propriedades diferirem em alguns aspectos do hipocampo intacto, quando cortadas no plano correcto mantinham a sua função sináptica.

As principais vantagens na utilização de fatias prendem-se com o controlo apertado do meio envolvente dos neurónios que constituem a preparação; a possibilidade de manter uma preparação viável por períodos de tempo relativamente longos; ausência de pulsação arterial; controlo visual aumentado para o correcto posicionamento dos eléctrodos. Apesar de ser possível efectuar registos de *patch-clamp* em fatias (Blanton, et al., 1989; Edwards, et al., 1989), há situações em que é preferível realizar experiências em neurónios isolados. Primeiro, porque ao cortar-se a árvore dendrítica da célula minimiza-se o problema de controlo da voltagem (*space-clamp*), permitindo deste modo um estudo detalhado da biofísica do canal através da técnica de *voltage-clamp* (White, et al., 1995). Permite também remover as interações eléctricas e químicas que se estabelecem com as células vizinhas. Finalmente, as barreiras difusoras existentes nas fatias fazem com que não haja controle das soluções experimentais. Deste modo, a dissociação surge como um método eficaz para o isolamento de neurónios do sistema nervoso central de mamíferos maduros<sup>1</sup>. Este método, foi inicialmente desenvolvido por Kay e Wong em 1986 para isolar neurónios e consequentemente explorar as propriedades biofísicas de canais através de *patch-clamp*, contudo, este método também provou ser útil para a utilização em: imunocitoquímica, PCR (*Polymerase Chain Reaction*), selecção de células por fluorescência e culturas secundárias de neurónios maduros.

O baixo custo deste método, quando comparado com a cultura de tecidos tornam-no extremamente atractivo. Contudo, este método não é o mais apropriado para estudar acontecimentos celulares que ocorram numa escala temporal de horas. A estrutura neuronal, neste método, é preservada e também permite o isolamento de botões sinápticos ligados ao soma ou às dendrites (Kay e Wong, 1986), sendo capazes de libertar neurotransmissores (Drewe, et al., 1988). Este protocolo permite isolar os neurónios das células da glia em aproximadamente 45 minutos após o sacrifício do animal, apesar de os neurónios perderem as suas ramificações dendríticas, a estrutura próxima do corpo celular é mantida, permitindo deste modo a identificação morfológica do tipo de neurónio.

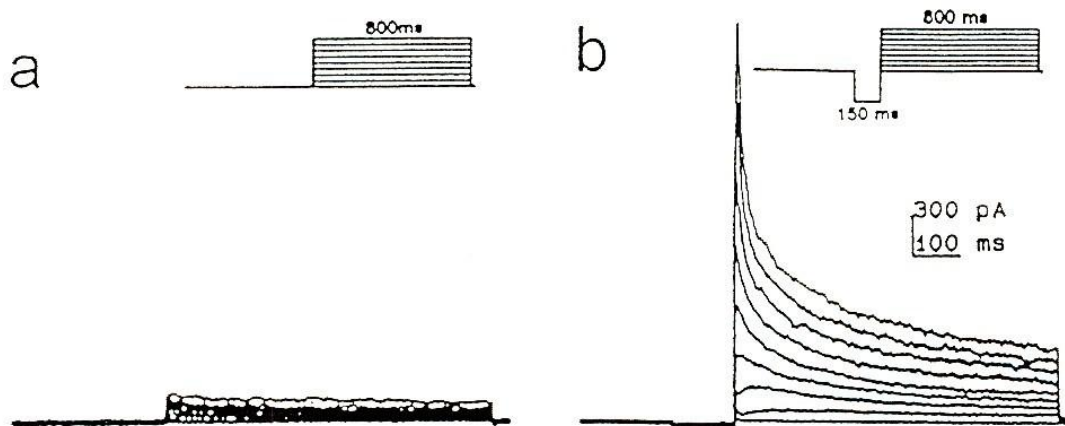
### **4.3. Correntes de K<sup>+</sup> activadas por voltagem em neurónios piramidais da região CA1 do hipocampo**

Estão identificadas várias correntes macroscópicas de potássio dependentes da voltagem em células da região CA1 do hipocampo através de técnicas de *whole-cell voltage-clamp*. A corrente rectificadora retardada ( $I_{K_{DR}}$ ) e a corrente A ( $I_{K_A}$ ) são dois tipos de correntes de potássio dependentes da voltagem e desempenham um papel fulcral na regulação da excitabilidade neuronal (Wong e Traub, 1983; Klee, et al., 1995). Enquanto a primeira é responsável pela repolarização do potencial de acção, a segunda regula o potencial de membrana entre PA (Alshuaib, et al., 2001). Existem várias estratégias que permitem a separação de ambas as correntes, nomeadamente algumas que tiram partido de diferentes

---

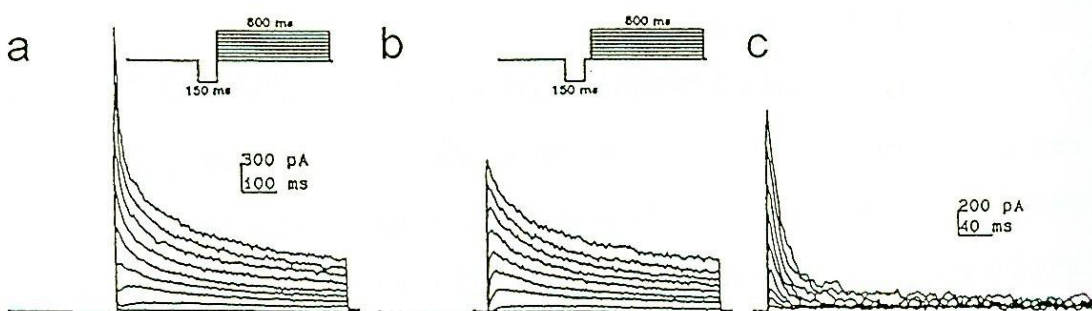
<sup>1</sup> Entenda-se maduros como o atingir do estado estacionário do desenvolvimento morfológico e bioquímico dos componentes neuronais

dependências à voltagem. Sabe-se que a aplicação de pulsos despolarizantes de 800 ms (até +30mV) a partir de -50mV evoca uma corrente positiva e o padrão desta corrente é substancialmente diferente se a membrana for hiperpolarizada antes das despolarizações, como se pode observar na Figura 1.16 (Costa, et al., 1994).



**Figura 1.16-** Corrente *outward* de  $K^+$  em células da região CA1 do hipocampo. a) Corrente evocada por uma série de pulsos despolarizantes (ver *inset*) a partir do potencial de repouso (-50mV). b) Corrente de potássio evocada quando um pré-pulso hiperpolarizante para -110mV é aplicado antes do conjunto de pulsos despolarizantes (adaptado de Costa, et al., 1994).

A hiperpolarização recruta a corrente A, que possui um tempo de ascensão curto e uma inativação rápida (Connor e Stevens, 1971). Esta corrente pode ser isolada através de um conjunto de protocolos, como o representado na Figura 1.17.



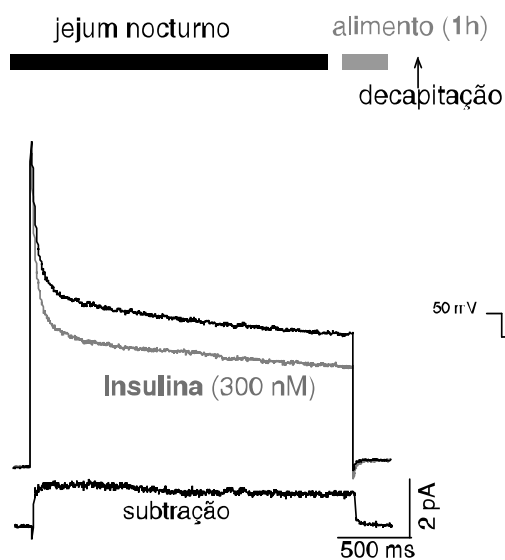
**Figura 1.17-** Isolamento da corrente  $I_{K_A}$  num neurónio da região CA1 do hipocampo. a) As correntes foram evocadas por um conjunto de pulsos despolarizantes até +30mV em passos de 10mV, antecedido por um pulso hiperpolarizante para -110mV (ver *inset*). b) Protocolo idêntico a a) com um pulso a -50mV durante 50ms a seguir ao pulso hiperpolarizante, para inactivar a corrente  $I_{K_A}$ . A corrente  $I_{K_A}$  é obtida por subtração das correntes evocadas em a) e b) (a-b) (adaptado de Costa, et al., 1994).

## 5. Enquadramento do presente projecto

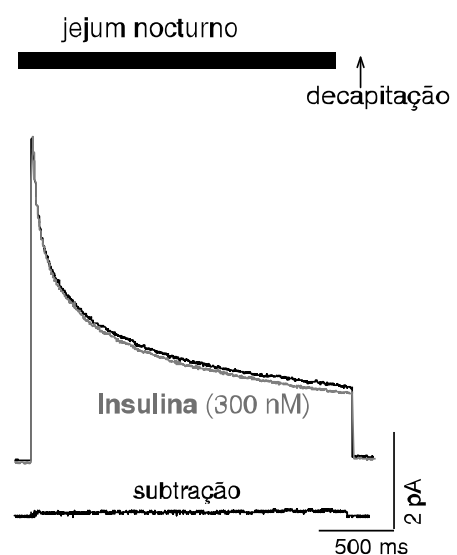
O efeito inibitório da insulina sobre a componente lenta ( $I_{slow}$ ) das correntes de  $K^+$  activadas por voltagem (Lima et al., 2008) revelou-se inicialmente com alguma incerteza. Esta incerteza prende-se com o que ficou claro mais tarde: o efeito da insulina só é visível em neurónios de animais “em condição pós-prandial”. Com vista a se controlar o estado de alimentação do animal, usaram-se neurónios provenientes de animais com dois tipos diferentes de pré-condicionamento: ratos *wistar* (P21-30) foram sujeitos a (a) um jejum durante a noite e, sacrificados de seguida, ou, (b) após idêntico período de jejum, alimentados por uma hora e sacrificados de imediato. Consequentemente, e como descrito na secção 1.1 do capítulo “Materiais e Métodos”, obtiveram-se assim dois grupos de neurónios da região CA1 do hipocampo: “neurónios em jejum” e “neurónios em pós-prandial”, para simplificação. Este método é largamente usado na investigação ligada à doença de diabetes.

A resposta da corrente de  $K^+$  ( $I_{slow}$ ) a 300nM de insulina só se observou em “neurónios em pós-prandial”. Nenhuma resposta foi observada em “neurónios em jejum”. (Figura 1.18) (Lima, resultados não publicados).

### a) neurónios "pós-prandial"



### b) neurónios "jejum"

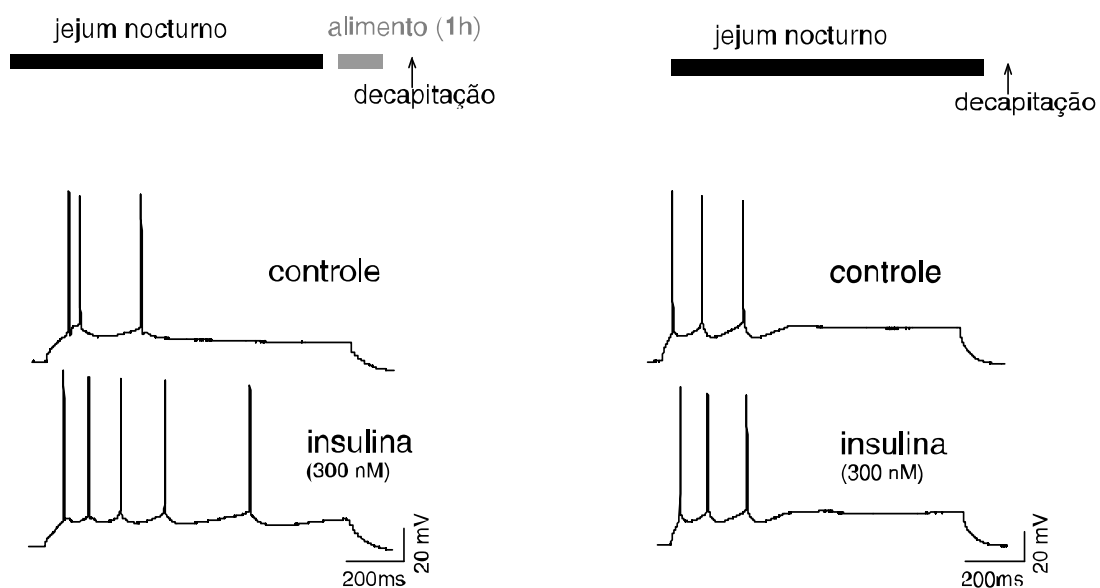


**Figura 1.18-** Registos de *whole-cell voltage-clamp* de neurónios piramidais isolados da zona CA1 do hipocampo. Ratos *wistar* (P21-30), foram sujeitos a jejum durante a noite e posteriormente alimentados durante 1h (a), ou sacrificados imediatamente (b). As correntes foram despoletadas por um pulso a +40mV precedido de pré-pulso a -120mV, o *holding-potential* foi de -50mV. Nos neurónios obtidos de animais em período de pós-prandial (a), a adição de 300nM de insulina diminuiu apenas a componente  $I_{slow}$ , como se pode observar pela subtração das correntes. Por outro lado, nos neurónios provenientes de animais em jejum, a insulina foi incapaz de provocar qualquer resposta (b).

Este resultado interessante e algo surpreendente foi seguido no que diz respeito à sua relevância funcional. Assim, procederam-se a registos de *whole-cell current-clamp* a partir dos mesmos neurónios mas agora em fatias de cérebro (Figura 1.19) (Lima, resultados não publicados). Os resultados são coerentes com os resultados obtidos em *voltage-clamp*. A insulina induz um aumento da neuroexcitabilidade (aumento na frequência de disparo e diminuições do período de primeira latência e do limiar de indução- dados não mostrados), concordante com a diminuição da corrente de  $K^+$ . Mais relevante foi constatar que, também nestas experiências, o efeito era confinado aquelas executadas com “preparações em pós-prandial”.

## a) neurónios "pós-prandial"

## b) neurónios "jejum"



**Figura 1.19-** Registos de *current-clamp* a partir de neurónios piramidais da zona CA1 do hipocampo, de fatias de cérebro. Ratos *wistar* (P21-30), foram sujeitos a jejum durante a noite e posteriormente alimentados durante 1h (a), ou sacrificados imediatamente (b). ‘Salvas’ de 3 potenciais de acção evocadas por uma injeção de corrente (1s) mostrando padrão com adaptação, típico destes neurónios. Aplicação de 300nM insulina aumentou consideravelmente o número de disparos nos “neurónios em pós-prandial” (a) mas não em “neurónios em jejum” (b).

Estas observações levantam várias questões. As mais prementes são:

1. Haverá uma alteração na expressão do InsR durante o ciclo jejum/pós-prandial?
2. Qual o canal de  $K^+$  subjacente à corrente de  $K^+$  sensível à insulina (ou melhor à activação de InsR)?
3. Haverá também uma variação na expressão deste canal de  $K^+$  durante o ciclo pós-prandial?

Tais questões constituem a base dos objectivos do presente trabalho.

## II. Objetivos

## II. Objectivos

Os resultados deste trabalho podem ter impacto no modo como se entendem certas situações patológicas, nomeadamente a Doença de Alzheimer (DA) e a diabetes *mellitus* tipo 2 (DMT2). A incidência destas duas doenças tem aumentado bastante nos últimos anos, principalmente no mundo ocidental. Estudos recentes têm vindo a demonstrar que estas duas doenças se encontram profundamente relacionadas. Actualmente, é credível conceber a insulina como o elo de ligação entre estas duas doenças, estando a DA cada vez mais associada a fenómenos de resistência à insulina, uma das causas da DTM2. Apesar de vários estudos atribuírem à insulina um papel importante nos processos de aprendizagem e memorização, ainda pouco se sabe sobre a fisiologia da insulina no cérebro, particularmente ao nível celular e à sua dinâmica com ciclos biológicos.

Existe porém alguma informação sobre o efeito da insulina na neuroexcitabilidade em alguns neurónios especializados. Nos neurónios piramidais de hipocampo, a insulina inibe selectivamente uma corrente lenta de  $K^+$  activada pela voltagem. (Lima, et al., 2008) mas só se a preparação for proveniente de animais em condição pós-prandial (“neurónios em pós-prandial”); em “neurónios em jejum”, não se observa nenhum efeito da insulina (Lima, et al., em preparação).

O presente trabalho visa investigar os assuntos relacionados com essas observações abordando questões que delas emergem, tais como:

1. As diferenças nos efeitos da insulina são consequência de variações na expressão de InsR, ou mesmo, na do canal subjacente à corrente de  $K^+$  sensível à insulina?
2. Qual a identidade do canal de  $K^+$  responsável pela corrente sensível à insulina?

Especificamente, os objectivos deste projecto foram:

- Determinar o efeito da margatoxina (MgTx- bloqueador específico de canais KV1.3) sobre as propriedades electrofisiológicas das componentes da corrente de  $K^+$  em neurónios da zona CA1 de hipocampo de ratos *wistar*; determinar a sua sensibilidade à concentração assim como o seu modo de acção (questão 2).
- Investigar a eventual diferença no efeito de MgTx nas correntes de  $K^+$  de neurónios de animais no estado de pós-prandial e no estado de jejum (questão 1 e 2).
- Estudar a possível relação entre o efeito induzido pela MgTx e o efeito da insulina: experiências de *voltage-clamp* em que se quantifica o efeito inibitório da insulina em correntes pré-inibidas por diferentes concentrações de MgTx (Questão 2)

- Investigar o eventual efeito da insulina em registos que isolam a corrente de K<sup>+</sup> tipo ERG (questão 2).
- Determinar a expressão de receptor de insulina (InsR) em diferentes zonas do cérebro de animais nos estados de pós-prandial e de jejum através de técnicas de *immunoblotting* e de imunocitoquímica (questão 1)
- Investigar a relevância dos resultados no contexto da associação entre as diabetes e alterações do foro neurofisiológico: determinar a expressão do InsR no cérebro de modelos animais de diabetes e obesidade (LZR, OZR e ZDF) através de técnicas de *immunoblotting*;
- Determinar a expressão do canal Kv1.3 no hipocampo de animais nos estados de pós-prandial e de jejum utilizando técnicas de *blotting* (questão 1).

# III. Materiais e Métodos

1. Electrofisiologia
2. Electroforese e *Western-Blot*
3. Immunocitoquímica

## III. Materiais e Métodos

### 1. Electrofisiologia

#### 1.1. Modelo Experimental

Para as experiências de electrofisiologia utilizaram-se como modelo experimental células piramidais isoladas da zona CA1 do hipocampo de ratos *wistar* em períodos pós-prandial e jejum. Dois tipos de preparações foram obtidos a partir de dois grupos de animais: após um período de jejum durante a noite (~12 horas), os animais eram sacrificados de seguida (“animais/preparações/neurónios em jejum”) ou eram subsequentemente alimentados por 1 hora, período após o qual eram sacrificados (“animais/preparações/neurónios em pós-prandial”). Os animais eram do sexo feminino e as suas idades estavam compreendidas entre os 21 e os 30 dias (P<sub>21-30</sub>). Os animais foram sacrificados por luxação cervical e decapitados.

Os procedimentos de remoção do cérebro e do hipocampo, assim como os que levam ao isolamento enzimático e mecânico dos neurónios, são descritos e ilustrados em detalhe no Apêndice 1.

#### 1.2. Registo das correntes e sistema de perfusão

Os registos das correntes membranares foram realizados utilizando a configuração *whole-cell voltage-clamp*. A Figura 3.1 apresenta o setup de *patch-clamp* utilizado no laboratório, onde foram realizados os registos electrofisiológicos.



**Figura 3.1-** Setup de patch-clamp. a) vista geral; b) pormenor do *setup* de *patch-clamp* colocado sobre a mesa anti-vibratória. 1- mesa anti-vibratória, 2- gaiola de Faraday, 3- microscópio invertido, 4- fonte de iluminação, 5- manipulador, 6- manipulador hidráulico, 7- pré-amplificador, 8- osciloscópio, 9- interface de conversão A/D, 10- electrómetro, 11- computador, 12- sistema de perfusão, 13- recipiente colector integrante do sistema de vácuo.

Os sinais foram amplificados, detectados e filtrados num electrómetro (Axon Instruments, Axopatch 200B) (Figura 3.1a – 10), monitorizados num osciloscópio (Hitachi V-212) (Figura 3.1a – 8) e registados num computador (Figura 3.1a – 11) com o *software* apropriado (Clampex, versão 6.0.3, Axon Instruments).

As micropipetas utilizadas, possuíam uma resistência entre  $1,5\text{M}\Omega$  e  $3\text{M}\Omega$  e foram produzidas a partir de tubos de vidro de borossilicato filamentado com um diâmetro externo de

1,5mm e interno de 1,05mm (Science Products GmbH, GB150T-8P), num estirador de pipetas horizontal (Sutter Instrument Co. Flaming/Brown P-87), e enchidas com solução interna. O eléctrodo de registo e o eléctrodo de referência eram filamentos de prata revestidos por cloreto de prata (Ag/AgCl). O eléctrodo de referência encontrava-se imerso numa câmara separada da câmara de registo, unidas por uma ponte salina com 4% de agár em 2 M de KCl (Merck). O movimento da micropipeta realizava-se através dos dois manipuladores, um manipular (Narishige ONM-1) (Figura 3.1b – 5) para movimentos mais rápidos da micropipeta e um manipulador hidráulico (Narishige ONO-131) (Figura 3.1b – 6) para movimentos mais precisos.

O contacto da micropipeta com a membrana celular revelava-se por um pequeno aumento da resistência, monitorizado por uma deflexão no traço da corrente apresentado pelo osciloscópio. Após o toque, procedia-se à libertação da pressão positiva da micropipeta, provocando desta forma um aumento adicional da resistência. Seguidamente aplicava-se uma pressão negativa, ténue e constante, de modo a obter o giga-selo. O potencial do interior da pipeta ajustava-se ao potencial aproximado de repouso das membranas celulares dos neurónios em estudo e a capacitância associada à pipeta na solução era compensada.

Após a formação do giga-selo, aplicava-se sucção negativa (pulso rápido de pressão negativa que levava à ruptura da membrana (configuração *whole-cell*)). O acesso eléctrico ao interior da célula comprovava-se com o aparecimento de correntes capacitivas referentes à capacitância da membrana da célula no osciloscópio, cuja carga era superior à capacitância da micropipeta. A capacitância da membrana era então compensada e o valor registado. A resistência em série foi compensada em 80%, sendo o erro médio na voltagem devido à resistência em série de 11 mV (determinado para correntes máximas, evocadas a + 50mV). As correntes foram filtradas a 2 kHz e a frequência de amostragem foi de 5 kHz.

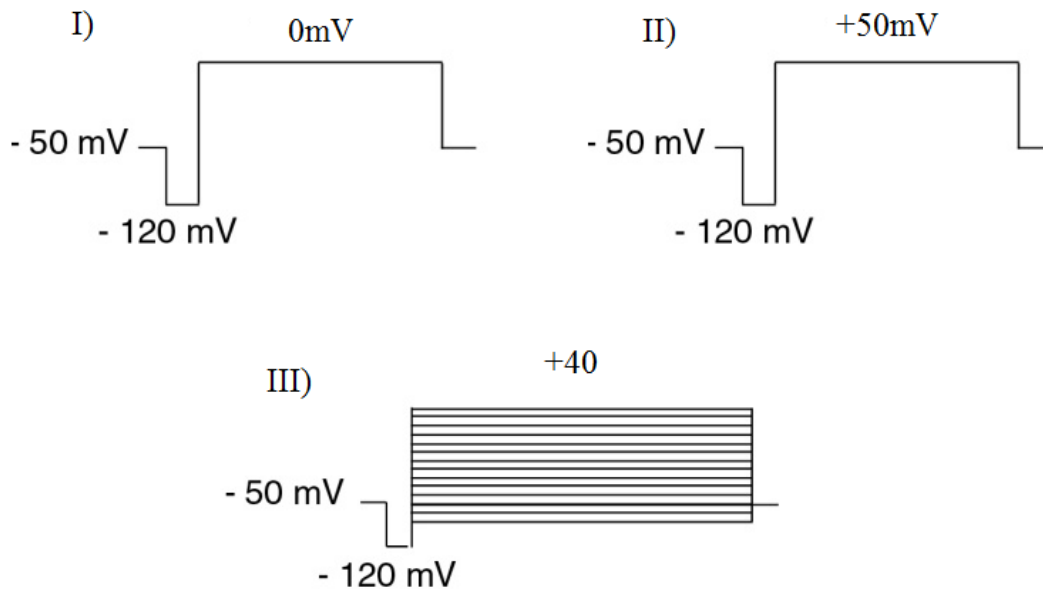
O sistema de perfusão (Figura 3.1b - 12) compunha-se por uma ampola de decantação de 50mL. A solução fluía, por acção da gravidade e a uma taxa de 2-3mL/min, por um tubo de polietileno com um “caça-bolhas” ligado à câmara de registo, e, ‘sugada’ por um sistema de vácuo (Figura 3.1b - 13).

As células que apresentavam uma resistência em série instável ou um decréscimo da corrente ao longo do tempo acentuado (*run-down*) eram rejeitadas. Todos os registos foram realizados à temperatura ambiente (20-23°C). Os protocolos de voltagem foram realizados com o *software* PClamp6 e um interface de conversão de sinal analógico em digital (A/D) (Axon Instruments, DigiData 1200) (Figura 3.1a – 9).

#### 1.3. Protocolos de voltagem

O *holding-potencial* (HP) destas células foi mantido a  $-50\text{mV}$ . As correntes de  $\text{K}^+$  eram então evocadas através de um pulso despolarizante para  $0\text{mV}$  durante  $1,3\text{s}$  (pulso comando), precedido por um pulso hiperpolarizante para  $-120\text{mV}$  durante cerca  $100\text{ms}$  (Figura 3.42- I). Após  $10$  segundos, aplicava-se o mesmo protocolo mas agora com o pulso comando para  $+50\text{mV}$  (Figura 3.2- II). As correntes obtidas eram assim usadas para monitorizar a amplitude e estado das mesmas ao longo da experiência.

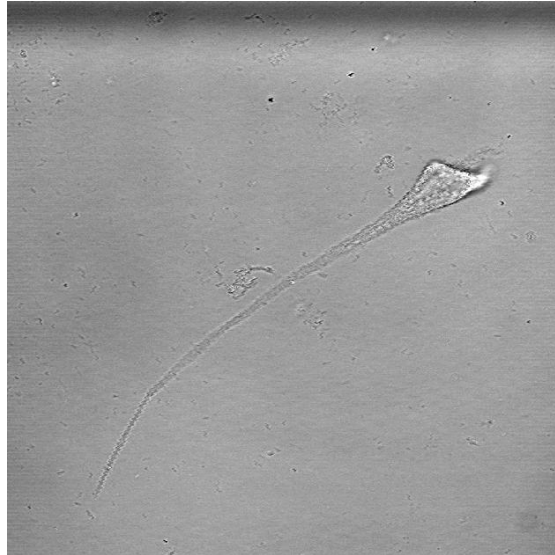
O protocolo de activação era composto por um conjunto de pulsos despolarizantes de  $-80\text{mV}$  a  $+40\text{mV}$ , através de incrementos de  $10\text{mV}$  e intervalos de  $5\text{s}$ , com a duração de  $1040\text{ms}$ , precedido por um grupo de pulsos de  $-65$  a  $-39\text{mV}$ , a incrementos de  $2\text{mV}$  e com a duração de  $160\text{ms}$  (Figura 3.2- III) Este protocolo visa o estudo da dependência da activação à voltagem.



**Figura 3.2-** Protocolos de voltagem utilizados para evocar correntes  $\text{K}^+$  em células piramidais isoladas da região CA1 de hipocampo. I) pulso-comando a  $0\text{mV}$ , II) pulso-comando a  $+50\text{mV}$ , III) protocolo de activação.

#### 1.4. Selecção de células piramidais da zona Ca1 do hipocampo para registos electrofisiológicos

As células seleccionadas apresentavam uma superfície lisa, uniforme, de contornos brilhantes e nas quais não era possível a distinção de organelos, de acordo com os critérios de viabilidade estabelecidos por Kay e Wong (1986). Só as células isoladas e piramidais eram seleccionadas para os registos.



**Figura 3.3-** Célula piramidal isolada da região CA1 do hipocampo de um rato com cerca de 30 dias. Exemplo de uma célula que seria utilizada para os registos de voltage-clamp (imagem de transmissão- microscópio confocal).

### 1.5. Composição das soluções salinas utilizadas

Tabela 3.1- Krebs de dissecação	
Constituintes	Concentração (mM)
NaCl (Merck)	124,00
KCl (Merck)	3,50
MgSO <sub>4</sub> (Merck)	2,00
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Merck)	1,25
NaHCO <sub>3</sub> (Merck)	24,00
Glucose (Merck)	10,00
CaCl <sub>2</sub> (Merck)	2,00

Tabela 3.2- Krebs de dissociação	
Constituintes	Concentração (mM)
NaCl	120,00
KCl	5,00
Pipes (Sigma)	20,00
CaCl <sub>2</sub>	1,00
MgCl <sub>2</sub> (Merck)	1,00
Glucose	25,00

Solução titulada com NaOH a pH=7,4.

Tabela 3.3- Solução de perfusão externa

Constituintes	Concentração (mM)
NaCl	135,00
KCl	5,40
Hepes (Sigma)	10,00
CaCl <sub>2</sub>	2,00
MgSO <sub>4</sub>	2,00
Glucose	25,00

Solução titulada com NaOH a pH=7,4; Osmolaridade 310mOsm.

Tabela 3.4- Solução interna

Constituintes	Concentração (mM)
KF (Merck)	140,00
Na <sub>1/2</sub> -Hepes	10,00
MgCl <sub>2</sub>	1,00
EGTA (Merck)	10,00
CaCl <sub>2</sub>	1,00
Na <sub>2</sub> -ATP (Merck)	2,00
Na-GTP (Merck)	0,40

Solução titulada com KOH a pH=7,3; Osmolaridade 300mOsm; para além disto a solução era centrifugada antes de utilizada de modo a remover impurezas que pudesse conter.

### 1.6. Adição de fármacos/toxinas

Antes de adicionar os fármacos, estes eram pré-diluídos em solução externa para a concentração pretendida e aplicados através de um sistema de perfusão constante. Para além disto, esperava-se tempo suficiente para que a corrente de K<sup>+</sup> estabilizasse (Vicente et al, 2010). Registava-se então a mesma durante 5-15 min, antes da do(s) fármaco(s), controlando-se tanto a taxa de *run-down* como também a qualidade do selo (resistências em serie e *holding-current*), parâmetros essenciais para a realização da experiência.

#### 1.6.1 Margatoxina (MgTx)

A MgTx utilizada foi Margatoxin- Sigma-Aldrich. A MgTx era adicionada de modo a bloquear os canais Kv 1.3 e a estudarmos o seu efeito sobre as correntes de K<sup>+</sup>. Para tal, a MgTx era diluída num balão volumétrico para a concentração pretendida, 100fM, 10pM, 100pM, 1nM, 3nM ou 10nM em solução externa e adicionada ao sistema de perfusão. O estudo foi realizado em correntes de K<sup>+</sup> evocadas da seguinte forma: pré-pulso a -120mV seguido de pulso despolarizante a 0mV, breve pausa, novo pré-pulso a -120mV seguido de um pulso a 50mV.

#### 1.6.2 Insulina (Ins)

A Insulina utilizada para as experiências foi Humulin R (Lilly), 100UI/mL. A adição de insulina era realizada após a adição prévia de MgTx. A Insulina era pré-diluída em solução externa para uma concentração de 100µM. Seguidamente era diluída num balão volumétrico para a concentração de 300nM, também em solução externa. Esta concentração foi utilizada de modo a se garantir que a Insulina não estava a actuar em mecanismos não específicos (ver dose resposta; Figura 1.6 da Introdução Teórica).

### 1.7. Tratamento e análise de dados

Na presença de 10mM de EGTA (quelante para o cálcio) a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  livre na solução interna foi estimada em 10nM (Webmaxclite, versão 1.15, MaxChelator). Esta concentração reduzida de  $\text{Ca}^{2+}$  na solução interna evita a activação de correntes de  $\text{K}^+$  sensíveis a  $\text{Ca}^{2+}$ .

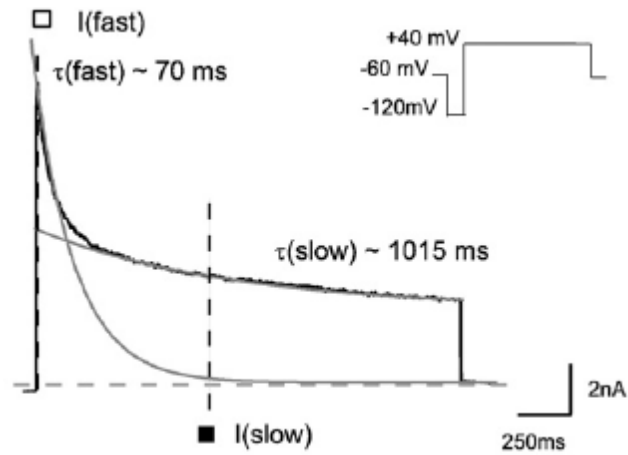
Uma vez que as correntes de  $\text{K}^+$  registadas com os protocolos já descritos induzem duas componentes distintas, anteriormente descritas (Lima et al., 2008), houve a necessidade de se medir as amplitudes destas duas componentes (componente lenta-  $I_{slow}$  e componente rápida  $I_{fast}$ ).

A fase de inactivação da corrente de  $\text{K}^+$  foi ajustada com uma ou mais funções exponenciais (Clampfit, versão 9.0.1.07, Axon Instruments, Inc.), cuja(s) equação(ões) eram da forma:

$$i_t = \sum_{i=1}^m a_i e^{-t/\tau_i} + c \quad 3.1$$

onde  $\tau_i$  e  $a_i$  são a constante de tempo e o coeficiente da amplitude da exponencial correspondente, respectivamente, é uma constante (da componente constante e da corrente de fuga) e  $m$  é o número de exponenciais que descrevem a queda da corrente de  $\text{K}^+$ .

A amplitude da corrente de  $\text{K}^+$  foi medida no pico e a cinco vezes a constante de tempo de inactivação da componente rápida,  $5\tau_f$  (Clampfit, versão 9.0.1.07, Axon Instruments, Inc.), que correspondem, respectivamente, à amplitude da componente rápida,  $I_{fast}$  e da componente lenta,  $I_{slow}$ . A medida da componente lenta é realizada a este tempo de modo a se garantir que já não existe interferência da componente rápida.



**Figura 3.4-** Corrente de  $K^+$  em células piramidais isoladas da zona CA1 de hipocampo de ratos wistar. É visível a separação das duas componentes  $I_{fast}$  e  $I_{slow}$  (adaptado de Vicente et al., 2010).

Para a construção das curvas de activação, mediram-se os valores de corrente no pico e a  $5\tau_f$  das correntes de  $K^+$  evocadas pelo protocolo de activação, aos quais foi subtraída a corrente de fuga (*leak-current*). Para se proceder a essa subtração, mediram-se os valores de corrente a uma gama potenciais com valores muito próximos de HP (incrementos de 1 mV), de modo a não induzir qualquer corrente. Com a respectiva relação corrente/voltagem, os pontos foram ajustados a uma regressão linear, que permitiu calcular, por extrapolação, a corrente de fuga a cada potencial. Esse valor era subtraído ao da corrente, para potencial usado no protocolo de activação.

Os valores de corrente resultantes foram convertidos em condutâncias através da relação:

$$G = I / (V_m - E_K) \quad (3.2)$$

Na qual  $V_m$  é a voltagem do pulso, e  $E_K$  o potencial de equilíbrio de  $K^+$  determinado para as presentes condições experimentais, e assumindo uma temperatura constante de 20°C ( $E_K = -82\text{mV}$ ). Os valores de condutância foram normalizados para a resposta máxima de cada componente e construiu-se o gráfico de  $G/G_{max}$  em função do potencial do pulso, de modo a obter as curvas que descrevem a dependência da voltagem da condutância. Os pontos foram ajustados por uma função de Boltzmann (*Microcal<sup>MT</sup> Origin<sup>MT</sup>*, versão 5.0, *Microcal Software, Inc.*), com uma equação da forma

$$G / G_{max} = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(V_{1/2} - V_m) / V_s}} + A_2 \quad (3.3)$$

Onde  $V_m$  é o potencial do pulso,  $V_{1/2}$  o potencial correspondente a metade da activação,  $V_s$  o factor do declive, e  $A_1$  e  $A_2$  são as amplitudes mínima e máxima da curva, respectivamente.

Para a análise estatística utilizada para se comparar os valores dos parâmetros da função de acentamento da relação I/V (Boltzmann), recorreu-se à análise de duas amostras emparelhadas com o teste t emparelhado, com uma distribuição gaussiana. Para tal, recorreu-se ao *software GraphPad Prism* versão 5.03 da *GraphPad Software, Inc.*. Para análises de variância recorreu-se à *One Way Analysis of Variance*, ANOVA, de medições repetidas e ao teste de comparação múltipla de Tukey.

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

Os resultados apresentam-se como média  $\pm$  erro padrão da média (*standard error to the mean*, S.E.M.) em que n representa a dimensão da amostra.

## 2. Electroforese e *western-blotting*

### 2.1. Amostras e sua preparação

As amostras utilizadas para a electroforese e *western-blot* foram cerebelo, hipocampo córtex de ratos *Wistar* em estados de jejum e pós-prandial. Os animais eram do sexo feminino e tinham idades entre os 21 e os 30 dias ( $P_{21-30}$ ). Também foram utilizados modelos especiais, *lean zucker rats* (LZR; servindo estes como controlo), *obese zucker rats* (OZR) e *zucker diabetic fatty rats* (ZDF). Os animais foram sacrificados por luxação cervical e decapitados. Todo o procedimento para a remoção dos cérebros foi idêntico ao descrito no Apêndice 1.

#### 2.1.1. Preparação dos homogenatos

Após remoção dos tecidos, estes eram congelados em azoto líquido e armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Depois de descongelado, o tecido colocava-se num tubo de Potter junto com  $\pm 1,5\text{mL}$  de tampão RIPA. Seguidamente utilizou-se um homogeneizador de Potter até desfazer o tecido. Feito isto, a mistura era passada para um *ependorf* e centrifugada a 14000rpm durante 15min a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Depois de terminada a centrifugação, recuperava-se o sobrenadante e colocava-se noutra *ependorf* para nova centrifugação em condições idênticas à anterior. O sobrenadante era recuperado novamente e passado para um tubo de 2mL.

#### 2.1.2. Quantificação

O método utilizado para a quantificação de proteínas totais nas amostras foi o método de Bradford. O método de Bradford é baseado na interação entre o corante G-250 e a cadeia

lateral básica dos aminoácidos. Esta promove a estabilização da forma aniónica do corante, que passa a absorver a um comprimento de onda de 595 nm.

Para tal, preparavam-se 20mL de solução de Bradford diluída 1:5. Um determinado volume dos homogenatos (correspondente à quantidade de proteína total pretendida) era colocado num tubo juntamente com 500  $\mu$ L de solução de Bradford diluída. Aguardava-se algum tempo até que a solução mudasse de cor.

Seguidamente procedia-se à medição das absorvências a 595nm no espectrofotómetro. O branco era realizado com solução de Bradford diluída. As absorvências eram registadas para cada uma das amostras e a quantidade relativa calculada. Deste modo sabia-se o volume a adicionar no gel de electroforese. De notar que a quantidade era calculada relativamente à amostra com menor valor de absorvência sem ser necessário recta de calibração.

#### **2.2. SDS-PAGE**

A separação de proteínas foi efectua em gel de poliacrilamida 12% em condições desnaturantes. O volume calculado para cada amostra no passo anterior era então colocado em *ependorfs* de 500 $\mu$ L aos quais se adicionava 10 $\mu$ L de *sample buffer*. Este tampão possuía qualidades redutoras. Após adicionado o *sample buffer* as amostras deviam ser aquecidas a 95-100°C durante um minuto.

O gel era então colocado num suporte e posto na tina, seguidamente, esta era cheia com *running buffer* 1x. Realizado o aquecimento das amostras, procedia-se ao carregamento das mesmas nos poços do gel da esquerda para a direita com uma micro-pipeta p10. No primeiro poço eram colocados 5 $\mu$ L do padrão de massas moleculares, *precision plus protein standard-all blue* da Bio-Rad.

Após carregar todas as amostras no gel, a tina era tapada tendo em atenção os pólos e ligava-se a corrente a 100V. A tina e todos os aparelhos necessários à realização da electroforese eram da Bio-Rad.

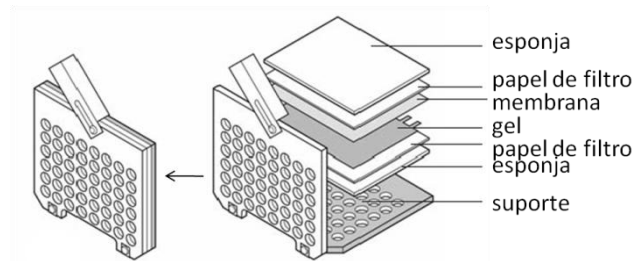
#### **2.3. Western-blot**

##### **2.3.1. Transferência**

Durante a separação electroforética devia-se começar a preparar o material para a realização do *western-blot*. Preparava-se então o tampão de transferência e cortavam-se uma membrana e dois papéis de filtro do tamanho das esponjas, por gel. Pôr metanol numa caixa de Petri e colocar a membrana lá dentro de forma a activar a mesma. Feito isto, a membrana ou membranas eram retiradas do metanol e colocadas noutra caixa de Petri com tampão de transferência para equilibrar. Num gobelé de 1L colocavam-se os papéis de filtro e as esponjas juntamente com tampão de transferência de forma aos mesmos serem equilibrados.

Após terminada a electroforese, o gel era retirado do suporte e o gel de concentração era separado do gel de separação. O último era então colocado numa caixa de Petri para equilibrar com tampão de transferência.

Realizada esta tarefa, procedia-se à preparação da montagem para a transferência. O suporte consistia em dois plásticos um negro e outro transparente, com orifícios, ligados entre si. A ordem da preparação era muito importante para a transferência correr devidamente, sendo assim, a ordem era a seguinte: 1- plástico negro, 2- esponjas, 3- dois papéis de filtro, 4- gel, 5- membrana, 6- dois papéis de filtro, 7- esponjas, 8- plástico transparente. Durante o processo de montagem devia-se garantir que não existiam bolhas de ar entre nenhuma das camadas, especialmente entre o gel e a membrana pois caso isso acontecesse, o resultado da transferência poderia estar comprometido. Para além disto, era vital colocar o gel do lado correspondente ao pólo negativo, de forma às proteínas serem transferidas correctamente para a membrana.



**Figura 3.5-** Esquema da montagem realizada para a transferência no *western-blotting* com as esponjas, os papéis de filtro, o gel e a membrana (adaptado de BioRad, 2009).

O suporte era então colocado na tina que por sua vez era enchida com tampão de transferência. No espaço que sobrava dentro da tina, era colocado um bloco de gelo de forma a impedirmos o aquecimento extremo durante a transferência. O rendimento da transferência era inversamente proporcional à temperatura. A tampa da tina era colocada tendo em atenção os pólos que eram conectados a um diferencial de 100V durante 65 min. Todos os constituintes necessários à realização da transferência eram da Bio-Rad.

#### 2.3.2. Marcação com anticorpos

A solução de bloqueio consistia numa solução de 5% de leite em pó em TBS-T. Terminada a transferência, a membrana era retirada do suporte e colocada em caixas de Petri de tal forma que a face anteriormente virada para o gel ficasse agora virada para cima. A membrana era submergida na solução de bloqueio, em agitação a 4°C durante um período que podia ir desde 1 a ±12 horas.

Para a incubação com o anti-corpo primário, eram então preparadas soluções de 1% de leite em pó em TBS-T em tubos de Falcon. Os anticorpos utilizados foram:

Tabela 3.5- Anticorpos

Anticorpo Primário	Diluição	Anticorpo Secundário	Diluição
Kv 1.3, Santa Cruz Biotechnology	1:200	Anti-goat IgG, HRP	1:10000
InsR, Santa Cruz Biotechnology	1:2000	Anti-rabbit IgG, Roche	1:5000
Fib, Calbiochem	1:25000	Anti-rabbit IgG, Roche	1:5000

O anti-corpo para o fibrinogénio era utilizado para a posterior normalização dos resultados (ver discussão). Feitas as soluções com os anti-corpos respectivos, retirava-se a solução de bloqueio das membranas e adicionava-se a solução com o anti-corpo pretendido. As membranas eram deixadas na presença de anti-corpo primário em agitação a 4°C durante a noite. Após a incubação, a solução de anti-corpo primário era retirada e as membranas eram lavadas três vezes com tampão TBS durante 15min de cada vez. Após as lavagens adicionava-se a solução com anticorpo secundário.

As membranas eram então incubadas com anticorpo secundário durante 3h com agitação e à temperatura ambiente. Finalmente, a solução de anticorpo secundário era removida e as membranas eram lavadas três vezes com TBS durante 15min cada vez.

### 2.3.3. Revelação

De modo a proceder à revelação preparava-se o seguinte material: tesoura, pinça, duas caixas de filmes, solução reveladora e fixador, tinas, papel, candeeiro de luz vermelha, pipetas (p1000 e p20) e respectivas pontas, solução de detecção (BM Chemiluminescence Western-Blotting Kit (Mouse/Rabbit), Roche), cassete, dois bocados de parafilme por membrana, uma tampa de caixa de petri, luvas e tubos de 2mL.

A revelação era realizada na câmara escura, devendo-se ter o maior cuidado para os filmes e a solução de detecção não apanharem luz. Uma vez preparada a solução de detecção, esta era espalhada pela membrana, previamente retirada do TBS. Realizada esta tarefa, a membrana era colocada na cassete com um bocado de filme, cortado à medida da membrana, por cima.

Realizada esta tarefa, deviam-se aguardar pelo menos 20s. O filme era então retirado da cassete colocado numa tina com revelador. Agitava-se então a tina até aparecerem as bandas. Quando estas fossem bem visíveis, o filme transferia-se para uma tina com fixador, agitando-se esta também algumas vezes. Finalmente colocava-se em água.

Por último os filmes eram deixados a secar.

### 2.3.4. Análise de dados

Depois secos, os filmes eram digitalizados. As imagens obtidas foram analisadas com o *software* ImageJ 1.42q Wayne Rasband, National Institute of Health, USA.

Para realizar a medição da intensidade da banda era seleccionada a ferramenta *rectangular selection*, seleccionando de seguida a banda pretendida. Era então realizada a medição da *integrated density* correspondendo esta ao produto da área da banda e da média da intensidade.

#### 2.4. Soluções utilizadas

Tabela 3.6- Tampão RIPA	
TrisHCl	50mM
NaCl	150mM
EDTA	2mM
NP- 40	1%
SDS	0,1%

Tabela 3.7- TBS 10x (1L)	
Tris (BioRad)	60,5g
NaCl	80,76g
pH	7,5 (ajustar com HCl)

Tabela 3.8- 0,5M Tris HCl, pH= 6,8	
Tris base	0,6g
H <sub>2</sub> O	60mL

O pH devia ser ajustado com HCL, por fim perfazia-se o volume até 100mL.

Tabela 3.9- 1,5M Tris HCl, pH 8,8	
Tris base	54,4g
H <sub>2</sub> O	150mL

O pH era ajustado com HCl concentrado e o volume completado com água destilada até 300mL.

Tabela 3.10- 5x Electode (running buffer)	
Tris base	45g
Glicina (Bio-Rad)	216g
SDS (Bio-Rad)	15g

Ajustar o volume com água destilada para 3L.

Tabela 3.11- Sample Buffer (SDS reducing buffer)	
H <sub>2</sub> O	3mL
0,5 Tris HCl, pH=6,8	1mL
Glicerol	1,6mL
10%SDS	1,6mL
β-mercaptoetanol	6,4mL
0,5%(v/v) bromofenol blue (in water)	0,4mL
<b>Total</b>	<b>8mL</b>

Tabela 3.12- Preparação do Gel		
	Gel de concentração 4%	Gel de separação 12%
H <sub>2</sub> O	3180μL	4350μL
Tris 8,8		2500μL
Tris 6,8	1260μL	
Acrilamida/bis40% (BioRad)	500μL	3000μL
10% SDS	50μL	100μL
10% APS	25 μL	50 μL
TEMED (Sigma)	10 μL	10 μL

Tabela 3.13- Tampão de Transferência	
Tris	4,656g
Glicina	2,345g
SDS 10%	3mL
H <sub>2</sub> O	640mL
Metanol (Merk)	160mL
<b>Total</b>	<b>800mL</b>

### 3. Imunocitoquímica

#### 3.1. Preparação das células

As células utilizadas para as experiências de imunocitoquímica foram células piramidais da região CA1 de ratos *Wistar* e a sua preparação foi igual à descrita no Apêndice 1.

#### 3.2. Preparação das lamelas

As lamelas utilizadas foram incubadas previamente à sua utilização em polilicina (PLL; Poly-L-lysine solution- Sigma-Aldrich) e deixadas na estufa a 37°C durante 2h. Seguidamente procedia-se a três lavagens com PBS de 5min cada após as quais as lamelas eram mantidas em KREBS de dissociação e estavam prontas a serem utilizadas.

### 3.3. Fixação das células

Após realizada a dissociação das células como descrito no ponto 1.1.3, a suspensão era deixada decantar durante 45s de modo a minimizarmos a quantidade de detritos celulares. Após os 45s, as células eram transferidas para as lamelas onde se deixavam decantar durante aproximadamente 25min. Realizado este processo, a solução de KREBS de dissociação era removida dos poços procedendo-se de seguida à fixação com paraformaldeído 4% (PFA). As lamelas eram então deixadas à temperatura ambiente durante 20min. Após a fixação, as lamelas eram lavadas três vezes com tampão PBS durante 5min de cada vez.

### 3.4. Permeabilização e bloqueio

De modo a se permeabilizar as células, o PBS era removido das lamelas e estas eram deixadas durante 10min em PBST (0,1% Triton em PBS), período após o qual, as lamelas eram lavadas duas vezes com tampão PBS durante 5min de cada vez.

Finalizado este processo, o PBS era removido mais uma vez e as lamelas eram incubadas com solução de bloqueio. Esta solução de bloqueio consistia numa solução 10% de soro de bovino (*fetal bovine serum*, FBS; GIBCO) em PBS. As lamelas ficavam em contacto com esta solução durante 1h30min.

### 3.5. Incubação com anticorpos

#### 3.5.1. Anticorpo Primário

A incubação com os anticorpos era realizada numa caixa forrada com papel de alumínio. Era então recortado um papel de filtro do tamanho da caixa e colocado no seu interior, este papel era posteriormente embebido em PBS e um parafilme com a parte transparente virada para cima, colocado sobre ele. Deste modo minimizava-se a evaporação.

Os anticorpos eram diluídos em solução de bloqueio segundo as condições explícitas na Tabela 3.14. O controlo negativo era efectuado usando apenas solução de bloqueio.

Tabela 3.14- Anticorpos

Anticorpo Primário	Diluição	Anticorpo Secundário	Diluição
InsR, Santa Cruz Biotechnology	1:500	Anti-rabbit IgG Invitrogen (Alexa488)	1:500

Realizadas as soluções com anticorpo, uma gota de 20µL para cada lamela era colocada sobre o parafilme da caixa. As lamelas eram então retiradas dos poços e colocadas com a parte contendo as células para baixo, sobre a gota. A caixa era então guardada a 4°C e deixada durante a noite.

#### 3.5.2. Anticorpo secundário

Após o período de *incubação*, as lamelas eram colocadas novamente nos poços, onde eram lavadas três vezes, durante 5min, com PBSTw (0,05% Tween-20 em PBS).

A incubação do anticorpo secundário era processada na mesma forma que para o primário. Há que referir apenas que a incubação era processada durante 3h a 4°C na ausência de luz.

#### 3.6. Montagem

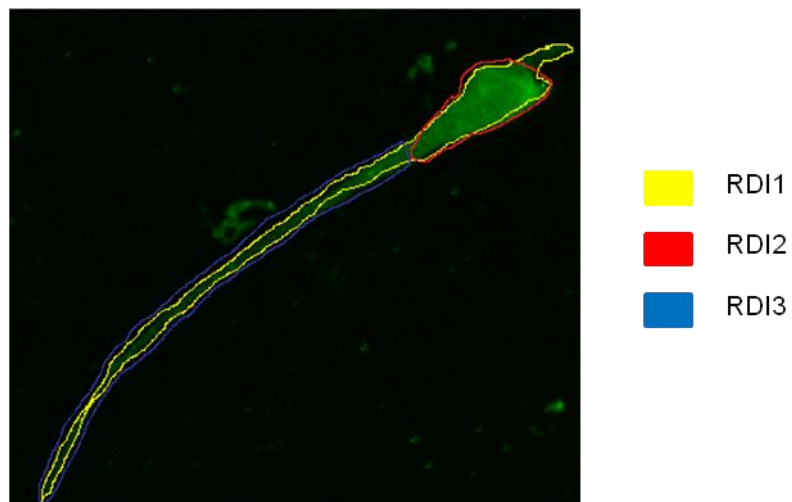
As lamelas eram retiradas da caixa e colocadas nos respectivos poços, com a face contendo as células virada para cima. De seguida eram lavadas três vezes com PBSTw, durante cinco minutos. Este tampão era então retirado e 50µL de solução DAPI, Sigma (diluição 1:15000) eram colocados sobre cada lamela. O DAPI era um fluoróforo capaz de penetrar no núcleo das células e ligar-se ao DNA, dando uma ideia a viabilidade das mesmas. As lamelas eram deixadas com DAPI durante 5min a temperatura após os quais este era retirado e as lamelas lavadas com PBSTw durante 10min, três vezes.

Finalizado este passo as lamelas eram lavadas uma vez mais com PBS e procedia-se à montagem nas lâminas para visualização. As lamelas eram então retiradas dos poços, secadas e colocadas sobre uma gota de Mowiol (meio de montagem) previamente colocada sobre a lâmina e deixadas secar durante pelo menos 24h. Passado este tempo as lâminas estavam prontas para visualização.

#### 3.7. Visualização e análise

As amostras foram observadas em microscópio confocal Leica TCS SPE e o *software* utilizado foi LAS AF version 2.1.2 build 4530, 2005-2009 Leica Microsystem CMS GmbH.

Para a medição da fluorescência foi utilizado o *software* ImageJ 1.42q Wayne Rasband, National Institute of Health, USA. Para tal, as imagens foram modificadas para *greyscale* e seleccionada a área da célula com a ferramenta *freehand selection* como apresentado na Figura 3.6. De notar que neste caso, foi medida a média da intensidade e não a *integrated density*, como no caso das experiências de *western*. Isto tem a ver com o facto de existirem células maiores que outras. Se tivéssemos em conta a área, células maiores teriam uma *integrated density* maior, podendo-nos levar a retirar as conclusões erradas.



**Figura 3.6-** Imagem de imunocitoquímica da marcação (a verde) com anticorpo anti-InsR numa célula piramidal isolada da zona CA1 do hipocampo de um rato *wistar*. Estão marcadas a cores diferentes as várias regiões de interesse (RDI) para o estudo realizado. RDI1: toda a célula; RDI2: corpo celular; RDI3: dendrite.

# IV. Resultados

1. Electrofisiologia
2. Estudos com anticorpos
3. Imunocitoquímica

## IV. Resultados

### 1. Electrofisiologia

A corrente de  $K^+$  sensível à insulina em neurónios CA1 do hipocampo surge como alvo de estudo importante (ver secção 5. da Introdução Teórica). É assim preponderante investigar qual o canal subjacente a tal corrente. Como já referido, o presente trabalho destina-se a investigar dois canais-candidato: o canal KV1.3 e o canal ERG. A secção seguinte descreve o estudo sobre os canais KV1.3 que são bloqueados especificamente pela Margatoxina (MgTx). Face à informação limitada sobre o efeito da MgTx nos neurónios CA1 do hipocampo, houve assim a necessidade de começar por se caracterizar esse efeito em termos de especificidade, sensibilidade e modo de acção.

#### 1.1. Estudo sobre o efeito da Margatoxina nas correntes de $K^+$ activadas por voltagem

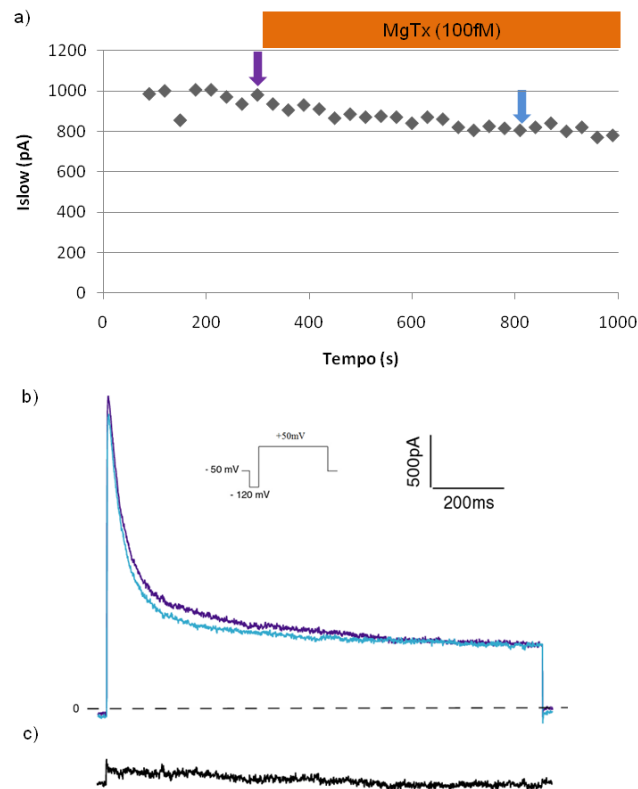
A MgTx inibe significativamente as correntes de  $K^+$  dependentes-da-voltagem. Para a determinação do efeito da MgTx sobre as correntes de  $K^+$  utilizaram-se os resultados obtidos em 33 células isoladas da região CA1 do hipocampo de ratos *wistar*. Os registos foram realizados na configuração *whole-cell voltage-clamp*. O estudo foi realizado em animais em pós-prandial e em jejum. Para os neurónios provenientes de animais que se encontravam em período de pós-prandial (“neurónios em pós-prandial”), foram utilizadas as seguintes concentrações de MgTx: 100fM, 10pM, 100pM, 1nM, 3nM e 10nM. Para neurónios provenientes de animais em jejum (“neurónios em jejum”), apenas foram utilizadas concentrações de 100pM e de 3nM.

##### 1.1.1. Efeito da MgTx nas correntes de $K^+$ - neurónios isolados da zona CA1 do hipocampo de animais em período de pós-prandial

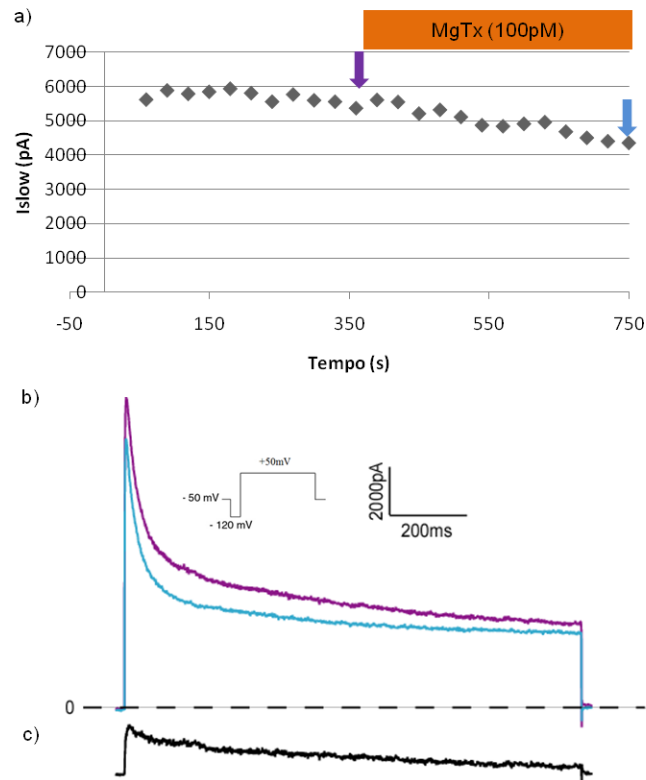
Após a adição de MgTx, observa-se uma diminuição da corrente de  $K^+$ . No entanto, o efeito é específico para a componente lenta da corrente ( $I_{slow}$ ), uma vez que a componente rápida ( $I_{fast}$ ) permanecia inalterável. Este facto é expectável, visto que a MgTx é um inibidor selectivo dos canais Kv1.3. Canais estes caracterizados por despoletarem correntes com taxas de inactivação também lentas, idênticas a  $I_{slow}$  (ver em baixo secção 1.1.4). Como se pode verificar pelas figuras 4.1 a 4.3, a diminuição da componente  $I_{slow}$  era tanto maior quanto maior fosse a concentração de MgTx adicionada. As concentrações maiores, por exemplo [MgTx]=3nM, ocorre também uma aparente e pequena diminuição da  $I_{fast}$ . No entanto, esta é diminuta quando em comparação com a observada em  $I_{slow}$ . O efeito em  $I_{fast}$  é negligenciável tendo também em conta que a  $I_{slow}$  está subjacente a  $I_{fast}$  - isto é, uma redução de  $I_{slow}$

considerável pode, per se, resultar numa redução do pico da corrente total, medida usada para se quantificar a amplitude de  $I_{fast}$ .

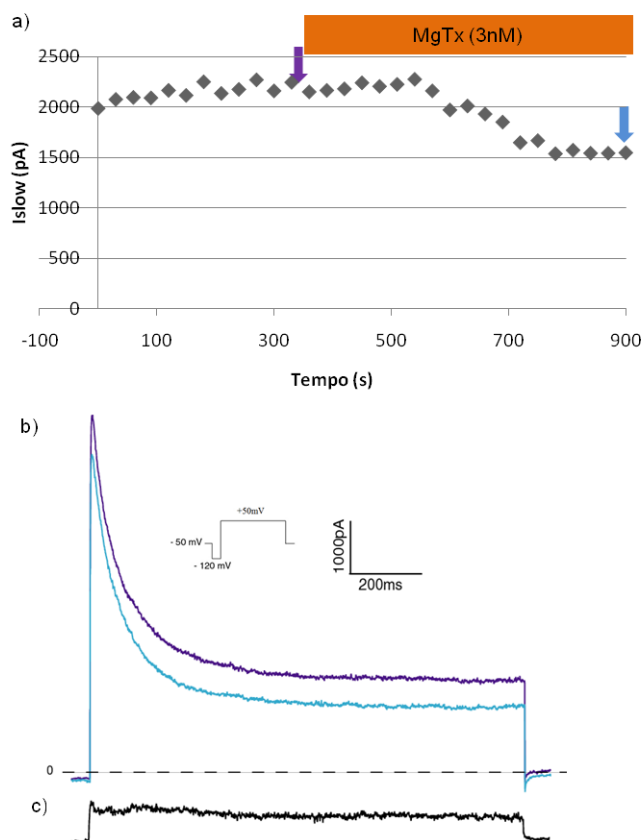
Em seguida, são apresentados exemplos dos efeitos nas correntes obtidas e da variação da  $I_{slow}$ , assim como a variação das amplitudes da corrente ao longo do decorrer das experiências (*time-course*). Os resultados apresentados nas figuras 4.1 a 4.3 correspondem a concentrações “chave” na relação dose-resposta (Figura 4.4). É de assinalar o facto que a inibição provocada pela MgTx não era reversível com a remoção da mesma da solução de perfusão (resultados não ilustrados).



**Figura 4.1-** Efeito de 100fM de MgTx na corrente total de  $K^+$ - registo de *whole-cell voltage-clamp* em neurónios piramidais isolados da zona CA1 do hipocampo de um animal no período de pós-prandial. a) variação da amplitude de  $I_{slow}$  ao longo da experiência; b) corrente total de  $K^+$  antes e após adição, as correntes foram despoletadas por um pulso despolarizante a +50mV precedido de um pré-pulso a -120mV, o *holding-potencial* foi de -50mV; c) subtração das correntes. Legenda: — antes da adição de MgTx (t=330s); — após adição de MgTx (t=810s).



**Figura 4.2-** Efeito de 100pM de MgTx na corrente total de  $K^+$  registo de *whole-cell voltage-clamp* em neurónios piramidais isolados da zona CA1 do hipocampo de um animal no período de pós-prandial. a) variação da amplitude de  $I_{slow}$  ao longo da experiência; b) corrente total de  $K^+$  antes e após adição, as correntes foram despoletadas por um pulso despolarizante a +50mV precedido de um pré-pulso a -120mV, o *holding-potencial* foi de -50mV; c) subtração das correntes. Legenda: — antes da adição de MgTx (t=360s); — após adição de MgTx (t=750s).

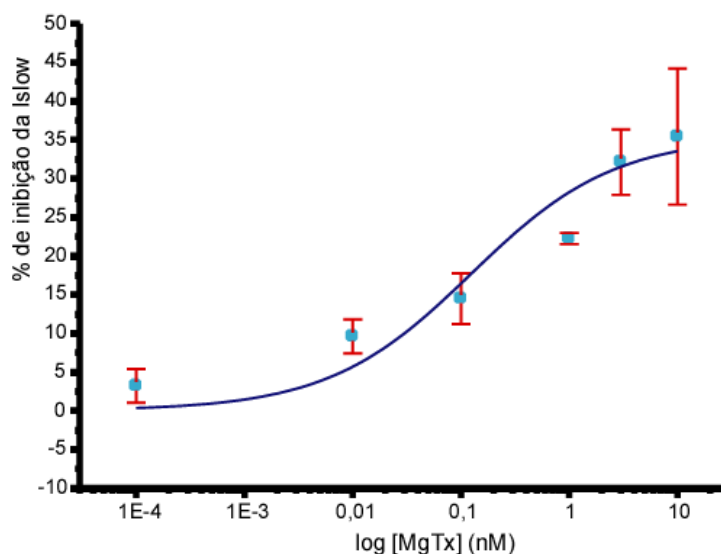


**Figura 4.3-** Efeito de 3nM de MgTx na corrente total de  $K^+$  - registro de *whole-cell voltage-clamp* em neurónios piramidais isolados da zona CA1 do hipocampo de um animal no período de pós-prandial. a) variação da amplitude de  $I_{slow}$  ao longo da experiência; b) corrente total de  $K^+$  antes e após adição, as correntes foram despoletadas por um pulso despolarizante a +50mV precedido de um pré-pulso a -120mV, o *holding-potencial* foi de -50mV; c) subtração das correntes. Legenda: — antes da adição de MgTx (t=330s); — após adição de MgTx (t=900s).

Como se pode observar pelas figuras 4.1 a 4.3, o efeito inibitório na corrente aumenta com a concentração da MgTx, produzindo um efeito quase nulo à concentração de 100fM (Figura 4.1) e atingindo uma % de inibição de  $I_{slow}$  de cerca de 31,69% à concentração de 3nM (Figura 4.3). O efeito verifica-se sobretudo na componente  $I_{slow}$ , permanecendo a  $I_{fast}$  praticamente inalterada. A Tabela 4.1 apresenta os valores obtidos de % de inibição por parte da MgTx para cada concentração utilizada. A Figura 4.4 apresenta a relação dose-resposta. Os pontos da curva foram ajustados com uma função de Hill na qual o valor de  $EC_{50}$  foi de 125pM.

**Tabela 4.1-** Efeito da MgTx na componente  $I_{slow}$  das correntes de  $K^+$  de neurónios piramidais isolados da região CA1 do hipocampo de ratos em período de pós-prandial

[MgTx]	Número de amostras	% de inibição da $I_{slow}$	Erro padrão
100fM	2	3,18	2,18
10pM	6	9,59	2,20
100pM	5	14,46	3,27
1nM	3	22,23	0,72
3nM	4	32,10	4,22
10nM	3	35,39	8,79

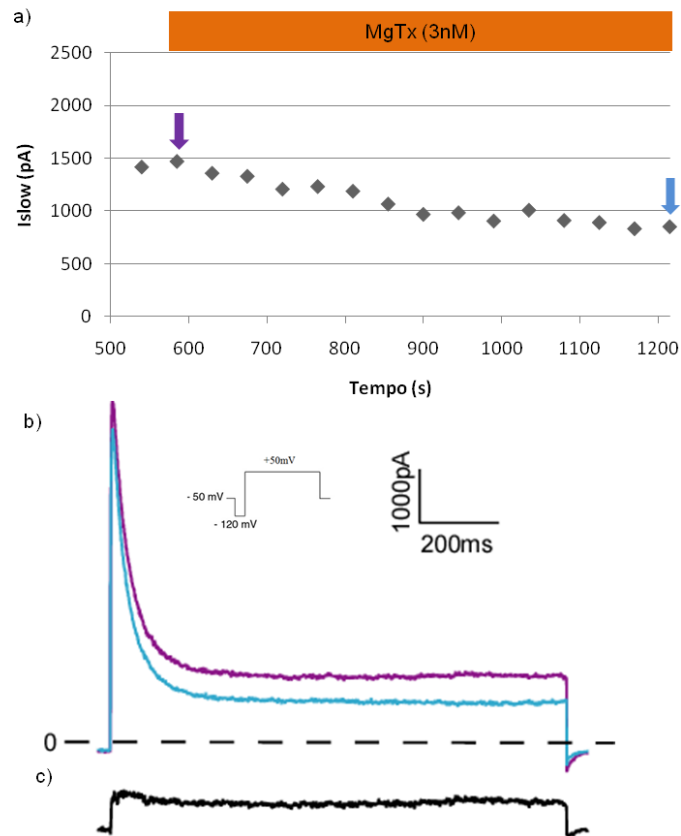


**Figura 4.4-** Ilustração da relação dose-resposta da MgTx na componente lenta ( $I_{slow}$ ) das correntes de  $K^+$  de neurónios piramidais isolados da zona CA1 de hipocampus de ratos *wistar* em pós-prandial. Os pontos foram ajustados com uma função de Hill, cujos parâmetros coeficiente de Hill e  $EC_{50}$  foram de 0,65 e de 125pM respectivamente. Legenda: ● erro padrão; ● ajustamento com função de Hill.

Os dados obtidos foram analisados através de um teste *One-Way ANOVA*, mostrando que o efeito produzido por concentrações mais baixas de MgTx, 100fM, 10pM e 100pM, é significativamente diferente daquele produzido pelas concentrações mais elevadas, 3nM e 10nM. Ou seja, comprova-se que o efeito da MgTx aumenta à medida que se aumenta a sua concentração.

#### 1.1.2. Efeito da MgTx nas correntes de $K^+$ - neurónios piramidais isolados da zona CA1 do hipocampo de animais em período de jejum

Os resultados apresentados para as experiências com “neurónios em jejum” são provenientes de 11 animais. Foram unicamente testadas as concentrações de MgTx de 100pM e de 3nM. Ou seja, uma concentração relativamente baixa mas que dá um efeito mensurável nos “neurónios em pós-prandial” (100pM), e, outra concentração considerável (3nM) com efeito quase máximo nos “neurónios em pós-prandial”. A Figura 4.5 ilustra as correntes obtidas numa das experiências bem como a variação temporal de  $I_{slow}$ . O efeito de 3nM de MgTx em  $I_{slow}$  no exemplo apresentado é de 18,17%.



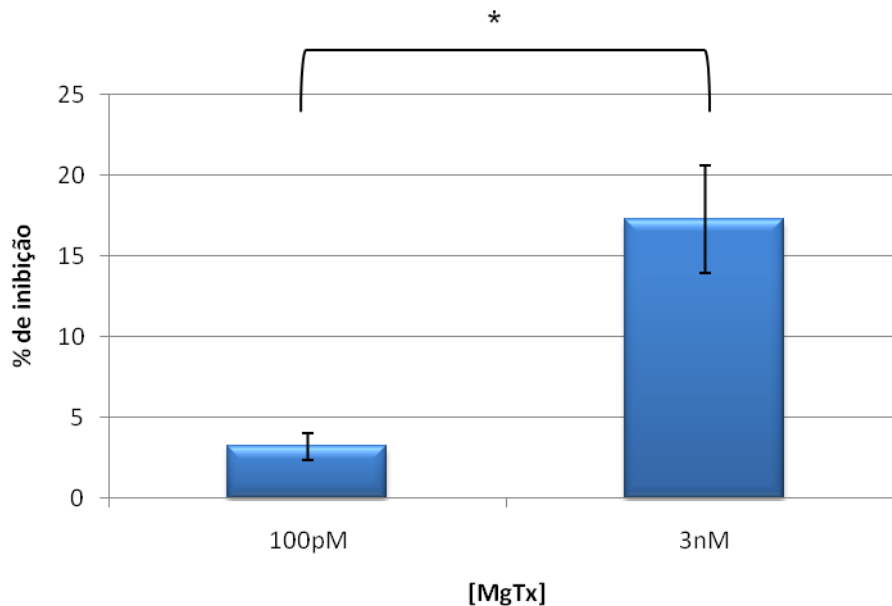
**Figura 4.5-** Efeito de 3nM de MgTx na corrente total de  $K^+$  registo de *whole-cell voltage-clamp* em neurónios piramidais isolados da zona CA1 do hipocampo de um animal no período de jejum. a) variação da amplitude de  $I_{slow}$  ao longo da experiência; b) corrente total de  $K^+$  antes e após adição, as correntes foram despoletadas por um pulso despolarizante a +50mV precedido de um pré-pulso a -120mV, o *holding-potencial* foi de -50mV; c) subtração das correntes. Legenda: — antes da adição de MgTx ( $t=585s$ ); — após adição de MgTx ( $t=1215s$ ).

A Tabela 4.2 apresenta os resultados obtidos para as experiências realizadas em “neurónios em jejum”. Tal como nas experiências em “neurónios em pós-prandial”, a % de inibição da componente  $I_{slow}$  aumenta com o aumento de concentração de MgTx. A componente  $I_{fast}$  permanece, uma vez mais, quase inalterada, como se pode observar na Figura 4.5. A comparação dos resultados obtidos nesta experiência com aqueles apresentados na Figura 4.4, nota-se bem o efeito menor provocado pela MgTx, em “neurónios em jejum”.

Também é conveniente dizer que no caso de algumas das experiências realizadas, principalmente no caso da concentração mais baixa, 100pM, o efeito quer na  $I_{fast}$  quer na  $I_{slow}$  é nulo ou muito próximo de 0, daí a dispersão dos valores.

**Tabela 4.2-** Efeito da MgTx na componente  $I_{slow}$  das correntes de  $K^+$  de neurónios piramidais isolados da região CA1 do hipocampo de ratos em período de jejum

[MgTx]	Número de amostras	% inibição da $I_{slow}$	Erro Padrão
100pM	3	3,20	0,82
3nM	8	17,39	3,36



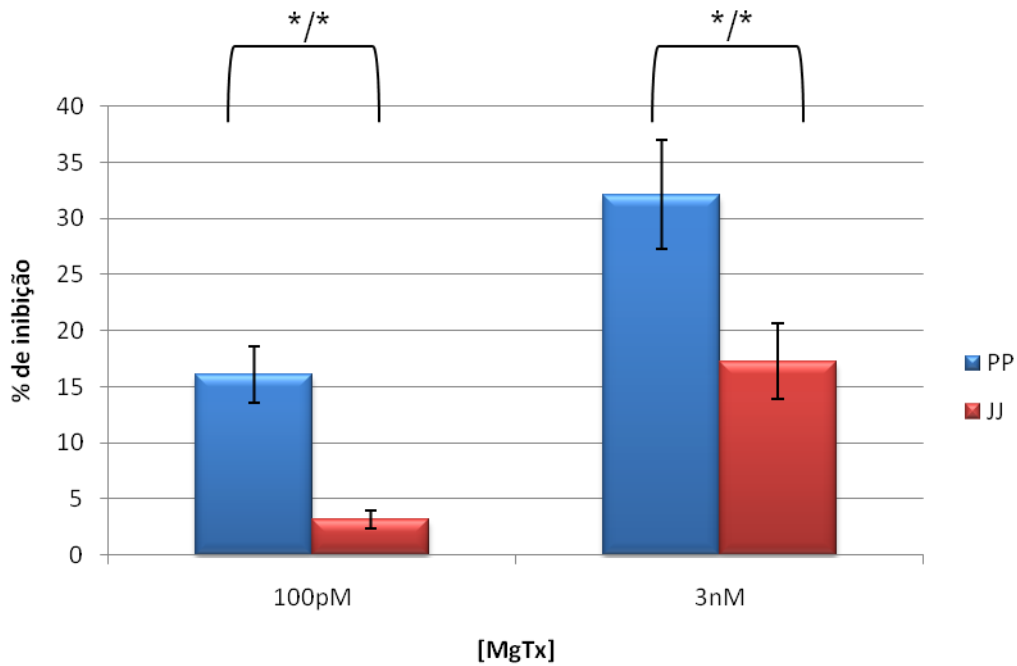
**Figura 4.6-** Gráfico de barras representando a relação dose-resposta da MgTx na componente  $I_{slow}$  das correntes de  $K^+$  de neurónios isolados da região CA1 de hipocampus de ratos em jejum. Para 100pM obteve-se um valor médio de inibição da  $I_{slow}$  de  $3,20 \pm 0,82\%$  ( $n=3$ ); Para 3nM obteve-se um valor médio de inibição da  $I_{slow}$  de  $17,39 \pm 3,36\%$  ( $n=8$ ). A diferença entre a % de inibição a cada concentração é significativa (\*) pelo teste t não emparelhado ( $P=0,0354$ ).

No gráfico de barras da Figura 4.6 é visível a diferença na % de inibição na  $I_{slow}$  produzida por uma adição de 100pM e 3nM de MgTx. Existe uma diferença significativa entre o efeito de concentrações diferentes de MgTx, segundo o teste t emparelhado, com  $P=0,0354$ .

### 1.1.3. Comparação entre o efeito da MgTx nas correntes de $K^+$ de neurónios piramidais isolados da zona CA1 do hipocampo de animais em período de jejum e em período de pós-prandial

Após a análise dos dados procedeu-se à comparação dos resultados obtidos em células de animais no estado de jejum e no estado pós-prandial. Como se pode observar na Figura 4.8, o efeito da margatoxina é muito mais notório no estado de pós-prandial do que no estado de jejum. Por aplicação dos testes estatísticos verifica-se que a diferença é significativa (\*) quer pelo teste de Mann Whitney quer pelo teste t não emparelhado, para as duas concentrações, 100pM e 3nM.

Por outro lado, também se pode proceder à comparação entre as experiências em pós-prandial e jejum na qual se adicionou a mesma concentração de MgTx, 3nM (Figuras 4.3 e 4.5). Como se pode visualizar, a diminuição da corrente é muito mais significativa nos “neurónios em pós-prandial” (Figura 4.3), nomeadamente na componente  $I_{slow}$ .

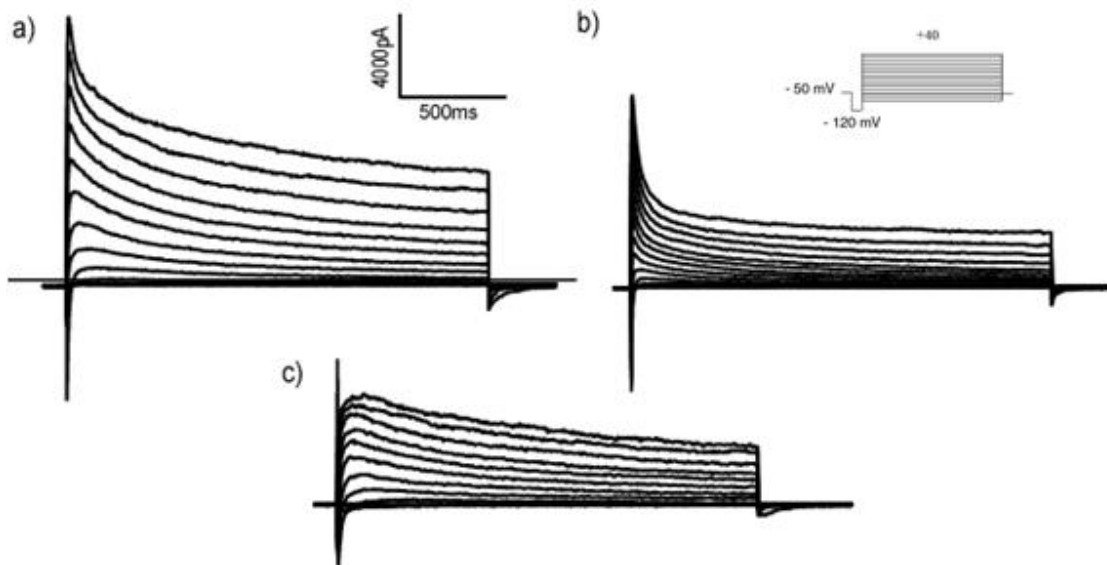


**Figura 4.7-** Comparação entre o efeito da MgTx na componente  $I_{slow}$  das correntes de  $K^+$  em células isoladas de ratos em estado de jejum (jj) e de pós-prandial (pp). Para a concentração de 100pM, a diferença é significativa (\*) pelo teste de Mann Whitney ( $P=0,0357$ ) e pelo teste t não emparelhado ( $P=0,0431$ ). Para a concentração de 3nM a diferença é significativa (\*) pelo teste de Mann Whitney ( $P=0,0162$ ) e pelo teste t não emparelhado ( $P=0,0249$ ).

Existe como tal, uma diferença significativa na sensibilidade à MgTx das correntes de  $K^+$  das células isoladas de ratos em períodos diferentes. Uma vez que a MgTx actua selectivamente nos canais Kv1.3, o facto de o seu efeito variar entre as células em estados diferentes, pode querer dizer que a expressão destes canais nos neurónios CA1 é diferente nos períodos de jejum e de pós-prandial.

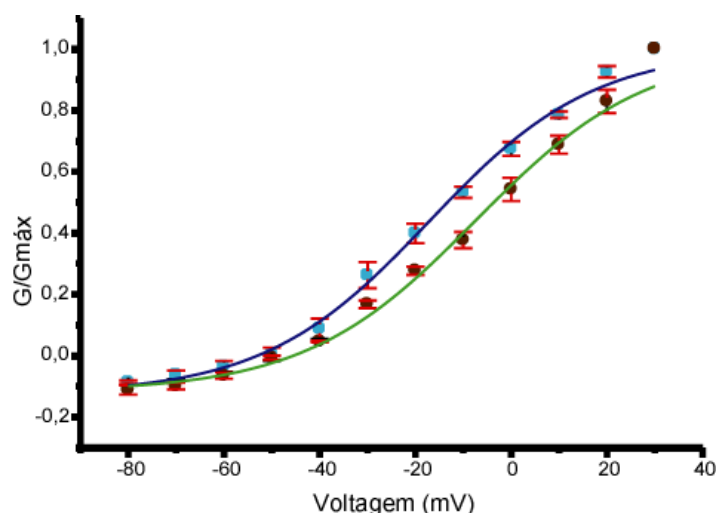
#### 1.1.4. Efeito da MgTx na dependência à voltagem nas correntes de canais de $K^+$ em células isoladas da zona CA1 do hipocampo de ratos em pós-prandial

De modo a se indagar como a a MgTx inibe os canais, foi estudado o efeito na dependência à voltagem da activação das correntes em foco. Para tal, foram utilizados protocolos de activação como descritos na secção 1.3 dos Materiais e Métodos. O protocolo foi aplicado antes e depois da adição de MgTx. Nestas experiências a concentração de MgTx aplicada foi de 1nM.



**Figura 4.8-** Ilustração do efeito de 1nM de MgTx na dependência à voltagem das correntes de  $K^+$  em neurónios piramidais isolados da zona CA1 de hipocampo de animais em pós-prandial. a) correntes totais de  $K^+$  antes da adição de MgTx; b) correntes totais de  $K^+$  após adição de MgTx; c) subtração das correntes. O protocolo de activação era composto por um conjunto de pulsos despolarizantes de -80mV a +40mV, através de incrementos de 10mV e intervalos de 5s, com a duração de 1040ms, precedido por um grupo de pulsos de -65 a -39mV, a incrementos de 2mV e com a duração de 160ms.

Como é visível na Figura 4.8, o efeito da MgTx é particularmente notório na componente  $I_{slow}$ . A Figura 4.8-c apresenta a subtração das correntes antes e após a adição de MgTx. Estas correntes resultantes correspondem às correntes sensíveis à MgTx. As fases de activação e inactivação podem ser ajustadas com curvas monoexponenciais ( $\tau_{act}=13ms$  a 40mV e um  $\tau_{inact}=900ms$  a 40mV). Estes resultados são aproximados daqueles registados na literatura (Coetzee, et al., 1999) para as correntes despoletadas pelos canais Kv1.3. É ainda de assinalar que o decaimento desta corrente resultante pode ser ajustado com uma função monoexponencial, mais uma vez justificando que a  $I_{fast}$  não é afectada.



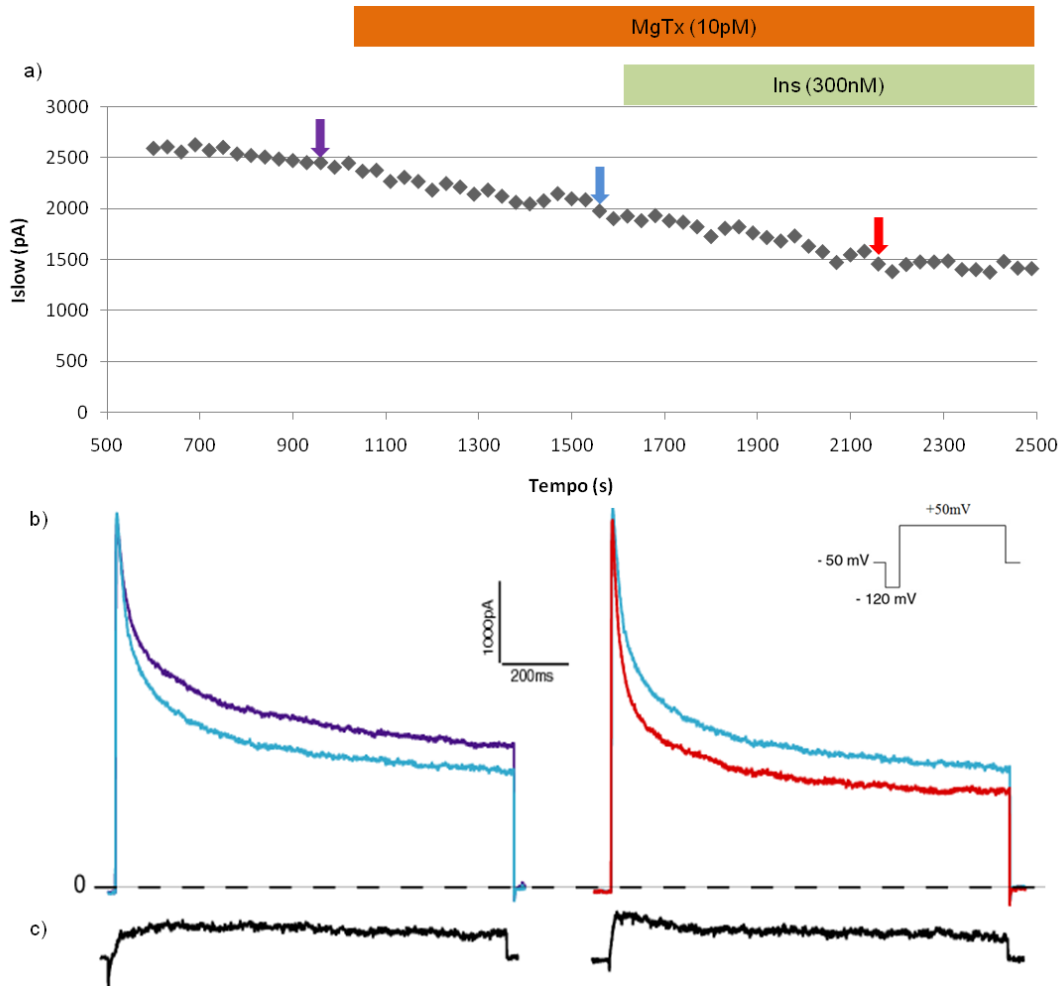
**Figura 4.9-** Comparação da componente  $I_{slow}$  dependente da voltagem antes e depois da adição de 1nM de MgTx. Legenda: ● antes da adição de MgTx; ● após adição de MgTx; ● erro padrão; ● ajustamento antes da adição de MgTx; ● ajustamento após a adição de MgTx. O ajustamento foi realizado com uma função de Boltzmann. Os valores obtidos pelo ajustamento para os parâmetros foram: antes da adição,  $V_{1/2} = -17,17$  e  $V_S = 17,27$ ; após a adição,  $V_{1/2} = -7,4$   $V_S = 17,81$ .

A figura 4.9 apresenta as relações  $I_{slow}$  voltagem antes e depois da adição de MgTx ajustadas com uma função de Boltzmann. Após a adição de MgTx, a curva de activação sofre um desvio para potenciais mais despolarizados. O valor de  $V_{1/2}$ , o potencial correspondente a metade da activação, era de  $-14,9 \pm 3,16$  mV e de  $-3,55 \pm 2,77$  mV ( $n=3$ ) para antes e depois da adição de MgTx, respectivamente. Isto significa que ao mesmo potencial, há mais canais activos antes da adição do que depois. Foi aplicado um teste t emparelhado aos dados de  $V_{1/2}$  para antes e depois da adição, dando como resultado uma diferença muito significativa (\*\*), com  $P=0,0035$ .

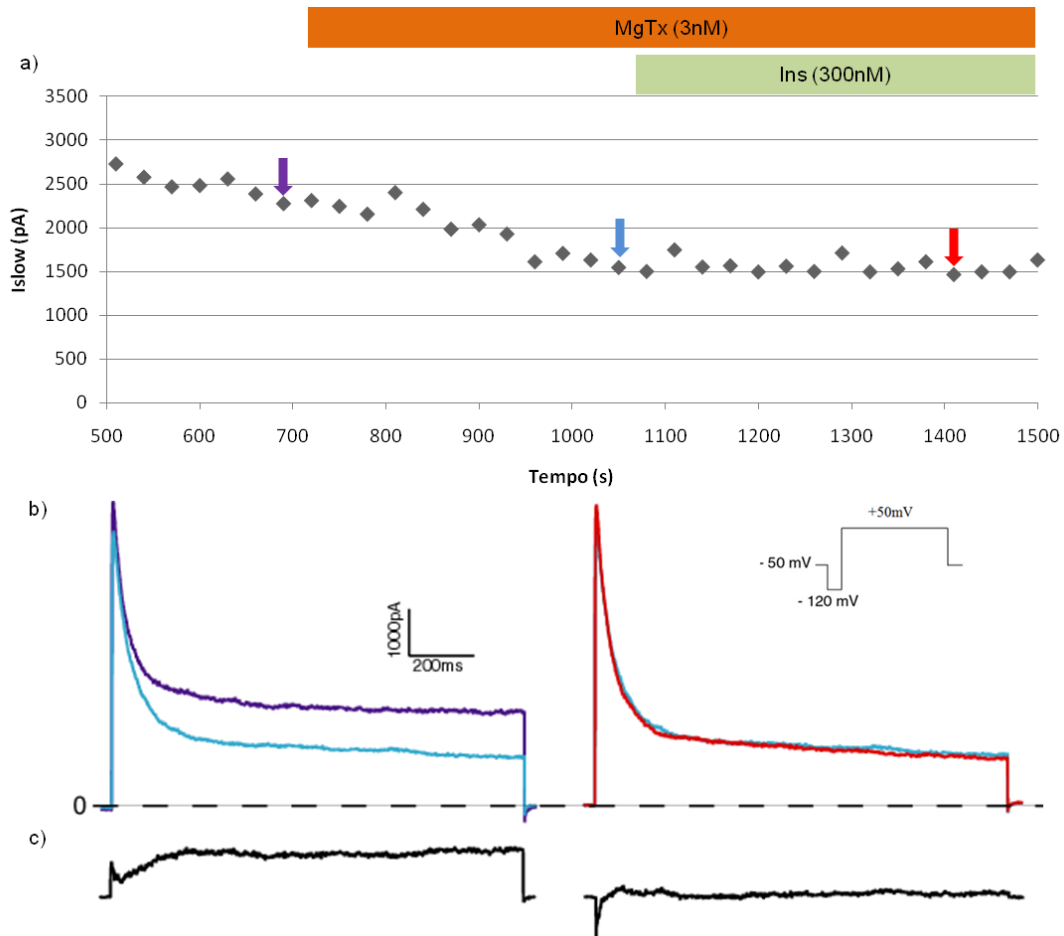
### 1.2. Relação entre o efeito da MgTx e o efeito da insulina sobre as correntes de $K^+$ dos neurónios piramidais isolados da zona CA1 do hipocampo de ratos em pós-prandial

Como descrito anteriormente, a insulina tem um efeito sobre as correntes de  $K^+$  em neurónios piramidais isolados da zona CA1 do hipocampo de ratos, sendo este efeito selectivo para a componente  $I_{slow}$  (Lima, et al., 2008). Neste estudo, a redução de  $I_{slow}$  induzida por 300nM de insulina é de 33,3% ( $\pm 2,9\%$ ;  $n=6$ ). Por outro lado, verifica-se que a insulina unicamente reduz a  $I_{slow}$  em “neurónios em pós-prandial”, não alterando as correntes obtidas a partir de “neurónios em jejum” (ver secção 5 da Introdução Teórica). Para se testar se o KV1.3 é o canal responsável pela corrente sensível à insulina, elaboraram-se experiências nas quais adicionava-se 300nM de insulina após a adição de concentrações variáveis de MgTx. Após a adição da MgTx, esperava-se que ocorresse o seu efeito característico e que estabilizasse, seguidamente adicionava-se a insulina. Estas experiências foram todas realizadas “neurónios em pós-prandial”.

A concentração adicionada de insulina foi sempre de 300nM, de modo a garantirmos que a redução da corrente não ocorria devido a mecanismos não específicos, por exemplo, para concentrações acima deste valor, a  $I_{fast}$  também é afectada (Lima, et al., 2008). A concentração de MgTx foi variável. As figuras 4.10 e 4.11 apresentam apenas exemplos de duas concentrações de MgTx: 10pM e 3nM.



**Figura 4.10-** Efeito de 10pM de MgTx na corrente total de  $K^+$  com posterior adição de 300nM de insulina (Ins) - registo de *whole-cell voltage-clamp* em neurónios piramidais isolados da zona CA1 do hipocampo de um animal no período de pós-prandial. a) variação da amplitude de  $I_{slow}$  ao longo da experiência. b) correntes totais de  $K^+$  durante a experiência, as correntes foram despoletadas por um pulso despolarizante a +50mV precedido de um pré-pulso a -120mV, o *holding-potencial* foi de -50mV; c) subtracção de correntes. Legenda: — antes da adição de MgTx (t=990s); — após adição de MgTx (t=1590s); — após adição de Ins (t=2160s).



**Figura 4.11-** Efeito de 3nM de MgTx na corrente total de  $K^+$  com posterior adição de 300nM de insulina (Ins) - registo de *whole-cell voltage-clamp* em neurónios piramidais isolados da zona CA1 do hipocampo de um animal no período de pós-prandial. a) variação da amplitude de  $I_{slow}$  ao longo da experiência. b) correntes totais de  $K^+$  durante a experiência, as correntes foram despoletadas por um pulso despolarizante a +50mV precedido de um pré-pulso a -120mV, o *holding-potencial* foi de -50mV; c) subtração de correntes. Legenda: — antes da adição de MgTx ( $t=690$ ); — após adição de MgTx ( $t=1050$ ); — após adição de Ins ( $t=1410$ ).

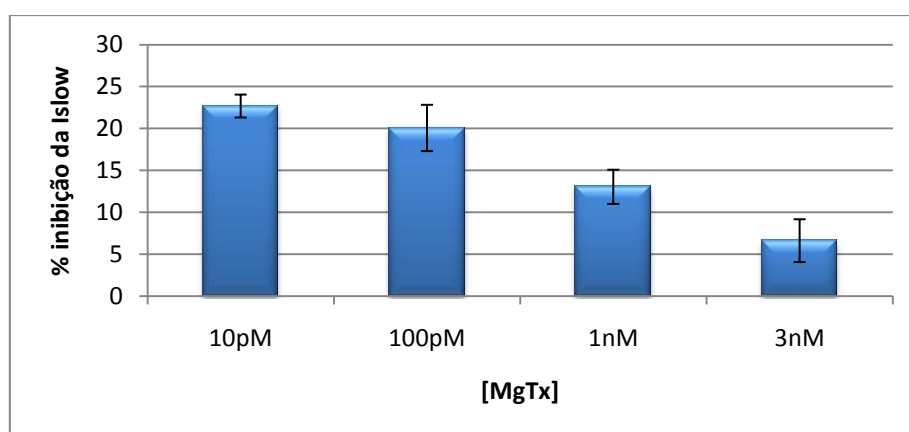
Como se pode observar nas figuras 4.10 e 4.11, o efeito da insulina na  $I_{slow}$  nos neurónios isolados da zona CA1 do hipocampo de animais em pós-prandial fica bastante reduzido à medida que se aumenta a concentração de MgTx. Este facto é melhor constatado pela subtração efectuada nas correntes antes e após a adição de insulina (Figuras 4.10-c e 4.11-c), sendo esta corrente resultante correspondente à corrente sensível à insulina. Nota-se assim que no caso de  $[MgTx]=10pM$  (Figura 4.10), a corrente sensível à insulina é considerável e cujo decaimento pode ser ajustado com uma função monoexponencial. No caso de  $[MgTx]=3nM$  (Figura 4.11), a corrente sensível à insulina é muito reduzida ou não existente.

A Tabela 4.3 apresenta os resultados obtidos para a % de inibição da  $I_{slow}$  por parte da insulina quando esta é adicionada após de uma dada concentração de MgTx. A Figura 4.12

representa um gráfico de barras das % de inibição da  $I_{slow}$  pela insulina, em função da concentração de MgTx previamente adicionada.

**Tabela 4.3- Efeito da Ins na componente  $I_{slow}$  das correntes de  $K^+$  na presença de MgTx - neurónios piramidais isolados da zona CA1 do hipocampo de ratos *wistar* em período pós-prandial.**

[MgTx]	Número de amostras	% inibição da $I_{slow}$	Erro Padrão
10pM	3	22,68	1,37
100pM	4	20,07	2,76
1nM	3	13,04	2,04
3nM	2	6,61	2,56



**Figura 4.12-** Gráfico de barras das percentagens de inibição da insulina sobre a  $I_{slow}$  das correntes de  $K^+$  de neurónios piramidais isolados da região CA1 do hipocampo de animais em pós-prandial, em função de concentrações variáveis de MgTx previamente adicionadas. Os valores médios de inibição foram: 10pM- 22,68± 1,37% (n=3); 100pM- 20,07± 2,76% (n=4); 1nM- 13,04± 2,04 (n=3); 3nM- 6,61±2,56 (n=2).

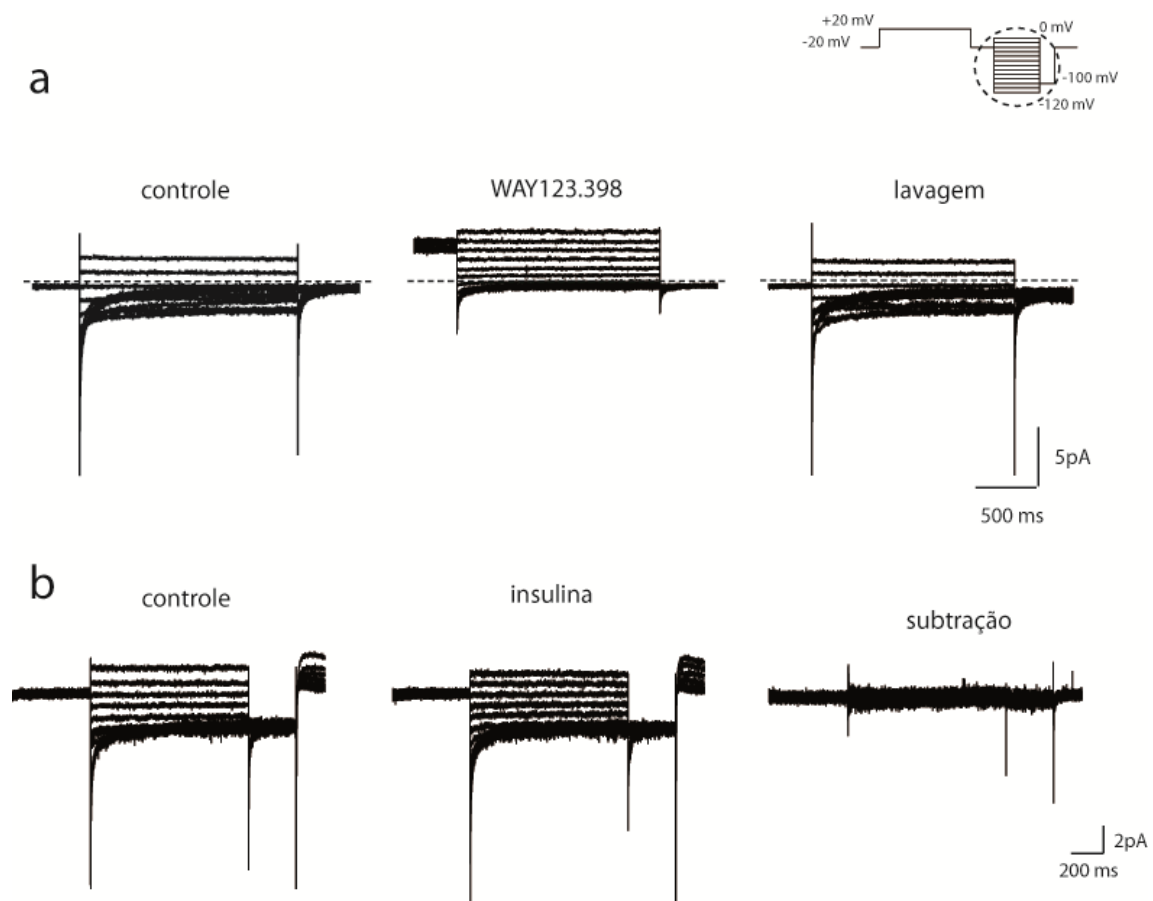
Os dados acima foram analisados estatisticamente através de um teste *One-Way ANOVA*, tendo como resultado uma diferença significativa (\*) entre as concentrações de MgTx mais pequenas, 10pM e 100pM, e a concentração de 3nM.

Como é visível, o efeito de uma concentração constante de insulina (300nM) é inversamente proporcional à concentração de MgTx pré-adicionada durante a experiência. Variando de uma % de inibição de 23% para 10pM de MgTx até 6,6% à concentração de 3nM. Tendo em atenção que a % de efeito da insulina sozinha é de 33% (±2,9%; n=6) (Lima, et al., 2008), verifica-se claramente uma redução no seu efeito na presença de MgTx. Estes resultados sugerem fortemente na presença de concentrações elevadas de MgTx, os canais Kv1.3 estão mais bloqueados, não permitindo assim a visualização do efeito da insulina. A concentrações mais moderadas de MgTx, onde o bloqueio de corrente mediada por Kv1.3 é mais ténue, o efeito da insulina é maior.

### 1.3. Efeito da Insulina em correntes medeadas por canais de K<sup>+</sup> tipo ERG.

De modo a investigar se o canal ERG, canal que expressa correntes funcionais nos “neurónios CA1” (Alves, et al., em preparação), está associado à corrente sensível à insulina, uma abordagem experimental diferente foi utilizada. Utilizaram-se registos de *whole-cell voltage-clamp* em condições de K<sup>+</sup> extracelular alto (40mM) e através de um protocolo de voltagem específico, condições que visam o registos de correntes de K<sup>+</sup> inwards, isto é, a conduzem K<sup>+</sup> para o interior da célula. Tais protocolos são protocolos aceites e usados para registar e isolar correntes tipo-ERG. O estudo de um eventual efeito da insulina foi então efectuado nessas correntes assim isoladas e típicas de ERG. Esta abordagem tem a vantagem de ser mais directa, uma vez que as correntes registadas são supostamente geradas quase especificamente por canais tipo-ERG.

A Figura 4.13 mostra os exemplos de correntes induzidas pelo protocolo de voltagem apresentado no insert. Em breve, este protocolo usa o carácter único das particularidades biophysicas das correntes ERG. Por exemplo, as correntes ERG inactivam mais rapidamente do que activam o que leva a que funcionem como inward-rectifiers (Saganish, et al., 2001).



**Figura 4.13.** Ausência de efeito da insulina sob correntes inward tipo-ERG em neurónios piramidais da região CA1 do hipocampo. As correntes inward, evocadas por um protocolo de voltagem diagnóstica de correntes tipo ERG (ver insert) são bloqueadas por 10 $\mu$ M de de WAY123,398, num efeito reversível com a lavagem (a) Essas mesmas correntes não são alteradas com a insulina (b). (Pedro Lima, resultados não publicados).

As correntes inward activadas por hiperpolarisação activam rapidamente ( $\leq 2$ ms) e a sua deactivação requer duas funções exponenciais para um acentamento adequado (componentes rápida e lenta). As constantes de tempo ( $\tau_{fast}$  de 5 a 40 ms;  $\tau_{slow}$  de 50 a 800 ms) mostram uma grande sensibilidade à voltagem. As correntes inward foram claramente bloqueadas por WAY123,398 (10 $\mu$ M), comprovando que são correntes medeadas por canais ERG (Figura 4.13-a). Comprovou-se também que esta abordagem é eficaz para isolar correntes ERG com vista a se estudar se a insulina actua em canais ERG nestes neurónios. Pela análise da Figura 4.13-b, constata-se que a insulina (1 $\mu$ M) não alterou a corrente inward sensível ao WAY123,398. A subtracção das correntes comprova a inexistência de uma corrente inward sensível à insulina. Os resultados não apontam assim os canais ERG como associados à corrente sensível à insulina. As experiencias da presente secção foram efectuadas em parceria com Pedro Lima.

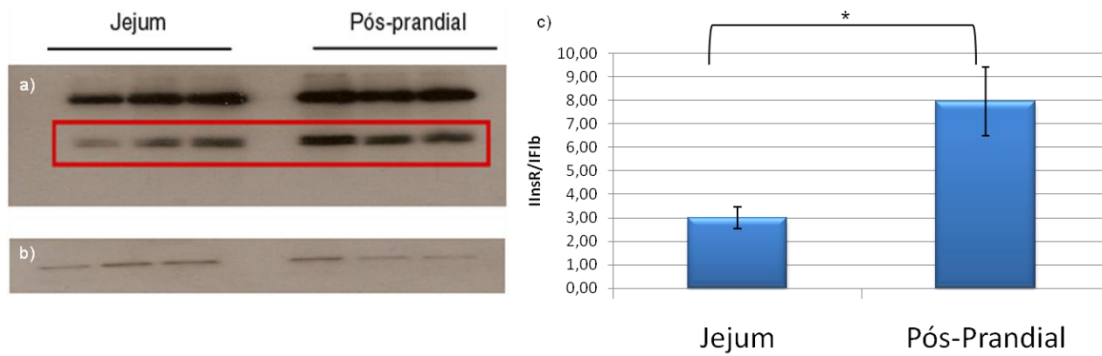
## 2. Estudos com anticorpos

### 2.1. Expressão do InsR em tecidos cerebrais de animais em jejum e em pós-prandial

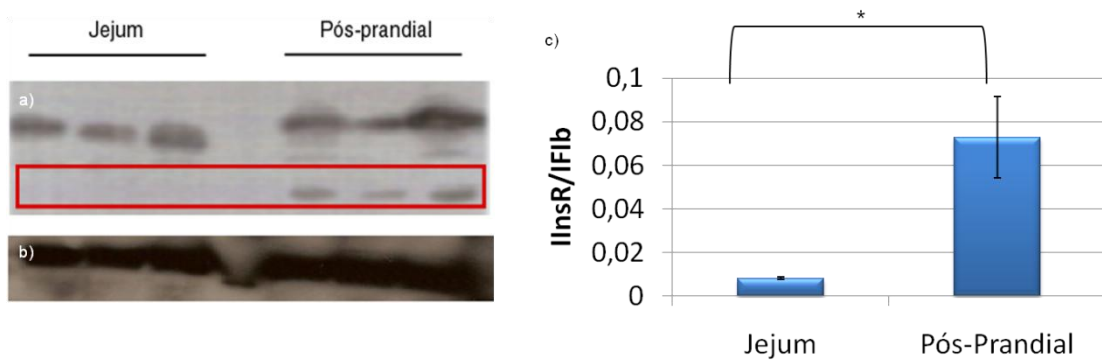
Como já foi revelado por dados do nosso laboratório, a insulina apenas provoca diminuição da componente  $I_{slow}$  das correntes de  $K^+$  em neurónios isolados a partir de animais em período de pós-prandial. No caso de “neurónios em jejum”, a insulina não origina qualquer efeito. Sendo assim, é importante descobrir se este facto se deve a uma expressão do seu receptor díspar nos períodos de jejum e de pós-prandial. Para este efeito, foram analisados três tecidos cerebrais, *whole-brain*, hipocampo e cerebelo para análise de *immunoblotting* com o anticorpo Anti-InsR.

Após a quantificação no espectrofotómetro foram calculadas as quantidades de homogenato a serem usadas no gel de electroforese, de modo a se manter constante a concentração de proteína total em cada poço (15 $\mu$ g).

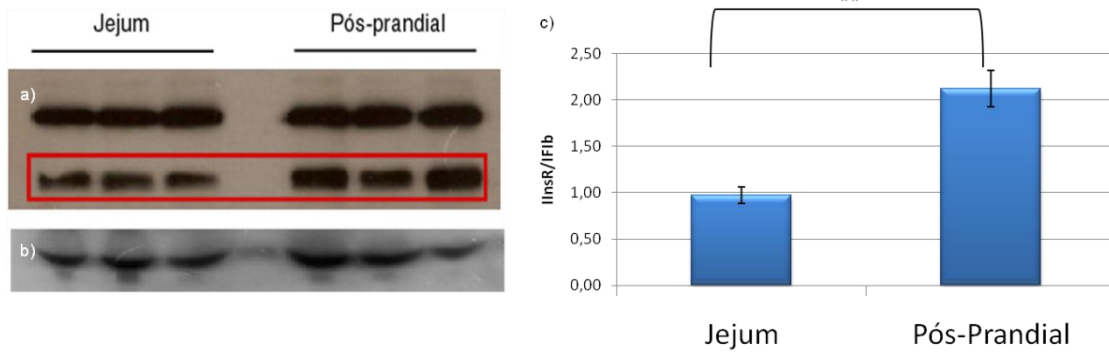
Depois da realização do *western-blot* e da revelação dos filmes, obtiveram-se os resultados apresentados nas figuras 4.14-4.16. Os valores da intensidade apresentados foram normalizados para a intensidade das bandas obtidas com o anticorpo para o fibrinogénio.



**Figura 4.14-** Estudo de *imunoblotting* para o InsR em amostras de *whole-brain*. Da esquerda para a direita, as bandas correspondem a: jejum- w1, w2, w3; pós-prandial- w2, w3, w4. a) membrana marcada com anticorpo para o InsR. As bandas superiores correspondem ao precursor do InsR, as inferiores ao InsR (marcadas a vermelho). b) membrana marcada com anticorpo para o fibrinogénio. c) gráfico de barras das médias das intensidades das bandas de InsR normalizadas para o fibrinogénio. Os valores obtidos foram: jejum-  $2,99 \pm 0,47$  (n=3); pós-prandial-  $7,96 \pm 1,46$  (n=3). A diferença entre os dois períodos é significativa (\*) pelo teste t não emparelhado, com  $P = 0,0316$ .



**Figura 4.15-** Estudo de *imunoblotting* para o InsR em amostras de hipocampo. Da esquerda para a direita, as bandas correspondem a: jejum- w1, w2, w3; pós-prandial- w2, w3, w4. a) membrana marcada com anticorpo para o InsR. As bandas superiores correspondem ao precursor do InsR, as inferiores ao InsR (marcadas a vermelho). b) membrana marcada com anticorpo para o fibrinogénio. c) gráfico de barras das médias das intensidades das bandas de InsR normalizadas para o fibrinogénio. Os valores obtidos foram: jejum-  $0,008 \pm 0,0005$  (n=3); pós-prandial-  $0,07 \pm 0,02$  (n=3). A diferença entre os dois períodos é significativa (\*) pelo teste t não emparelhado, com  $P = 0,0254$ .

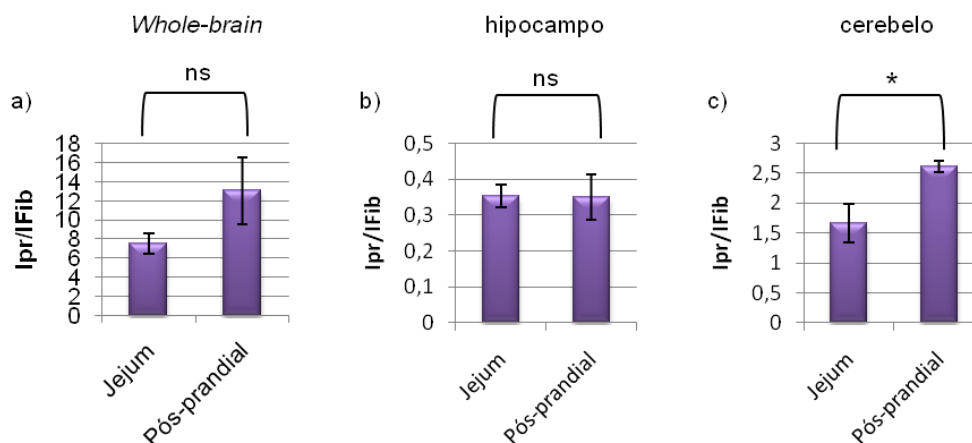


**Figura 4.16-** Estudo de *imunoblotting* para o InsR em amostras de cerebelo. Da esquerda para a direita, as bandas correspondem a: jejum- w1, w2, w3; pós-prandial- w2, w3, w4. a) membrana marcada com anticorpo para o InsR. As bandas superiores correspondem ao precursor do InsR, as inferiores ao InsR (marcadas a vermelho). b) membrana marcada com anticorpo para o fibrinogénio. c) gráfico de barras das médias das intensidades das bandas de InsR normalizadas para o fibrinogénio. Os valores obtidos foram: jejum-  $0,98 \pm 0,09$  (n=3); pós-prandial-  $2,12 \pm 0,19$  (n=3). A diferença entre os dois períodos é muito significativa (\*\*) pelo teste t não emparelhado, com  $P = 0,0061$ .

Como se pode contactar nas figuras acima (Figuras 4.14 a 4.16), a expressão do InsR sofre uma variação entre os estados de jejum e de pós-prandial, sendo maior neste último estado. Verifica-se também que a diferença ocorre nos três tecidos analisados, *whole-brain*, hipocampo e cerebelo. Os dados foram estudados estatisticamente através de um teste t não emparelhado, dando como resultado uma diferença muito significativa no caso do cerebelo e uma diferença significativa para o *whole-brain* e hipocampo. No caso do hipocampo, observa-se na Figura 4.15-a que nas amostras em jejum não há praticamente expressão do InsR, o que contrasta com a existência de bandas nítidas para amostras do estado de pós-prandial.

O cerebelo foi neste contexto também estudado para se verificar se as diferenças ao nível da expressão do InsR são generalizadas a outras zonas do cérebro, ou se pelo contrário consistia apenas num fenómeno localizado do hipocampo.

A mesma análise foi aplicada para o precursor do InsR (Figura 4.17). Neste caso, não há uma tendência clara entre o estado de jejum e o estado pós-prandial. No *whole-brain* e no hipocampo não existe diferença significativa entre a expressão nos dois estados. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 4.17.



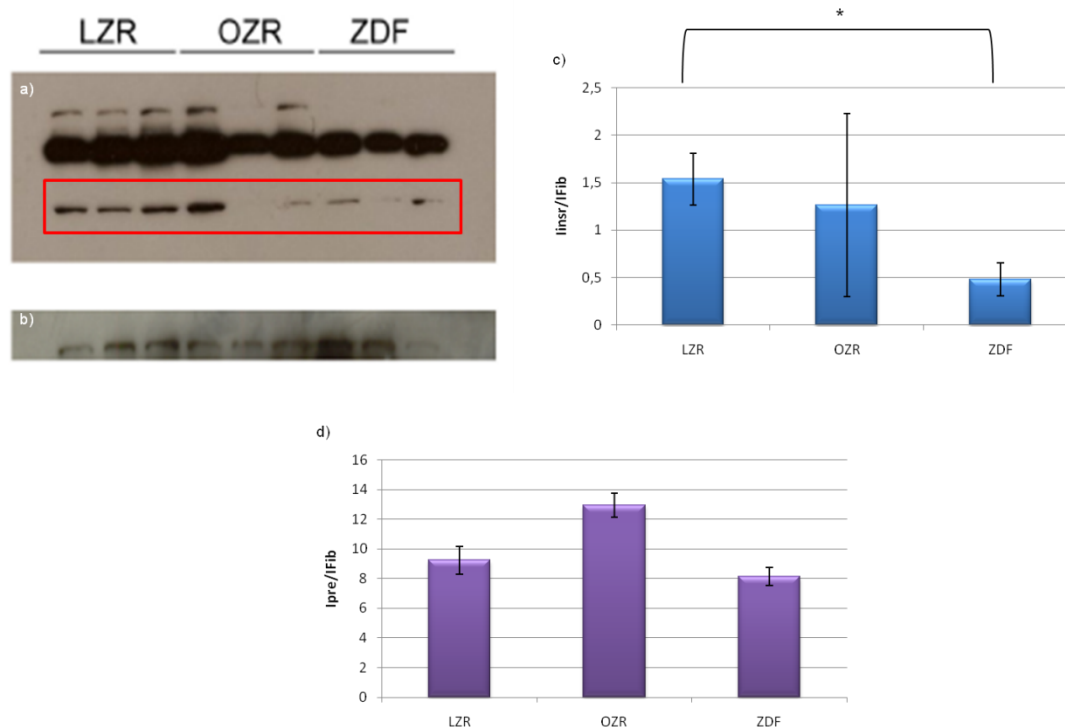
**Figura 4.17-** Estudo de imunoblotting para o precursor do InsR (pr), dados normalizados para a intensidade das bandas do fibrinogénio. a) *whole-brain*, os valores obtidos foram: jejum- 7,52±1,01 (n=3); pós-prandial- 13,03±3,45. A diferença entre os dois períodos não é significativa (ns); b) hipocampo, os valores obtidos foram: jejum- 0,35±0,03 (n=3); pós-prandial- 0,35±0,06 (n=3). A diferença entre os dois períodos não é significativa (ns); c) cerebelo, os valores obtidos foram: jejum- 1,66±0,32 (n=3); pós-prandial- 2,62±0,09. A diferença entre os dois períodos é significativa (\*) pelo teste t não emparelhado, com P= 0,047.

Parece assim que o precursor do InsR não varia de igual forma que o receptor em si. Tenhamos como exemplo os resultados obtidos para o precursor no hipocampo (Figura 4.17-c). Nesta zona do cérebro, a mais importante para o nosso estudo, verifica-se que a diferença no precursor entre o estado de jejum e o estado de pós-prandial é mínima e não significativa. No entanto, mesmo sem ter em conta os resultados dos gráficos, que foram normalizados, e olharmos para as bandas dos filmes, figuras 4.14 a 4.16, veremos que as bandas do precursor não sofrem tanta variação entre estados como as bandas do InsR. Pelos testes estatísticos (teste t não emparelhado), obtém-se uma diferença não significativa no caso do *whole-brain* e do hipocampo uma diferença significativa para os dados do cerebelo.

## 2.2. Expressão do InsR no cérebro de modelos animais

A expressão do InsR foi também estudada em modelos animais, nomeadamente em modelos OZR, ratos obesos, e em modelos ZDF, ratos diabéticos. Para controlo usou-se o modelo LZR, animais *lean*, é também importante assinalar que todos os animais utilizados nestas experiências se encontravam em período de pós-prandial.

Após a quantificação no espectrofotómetro foram calculadas as quantidades de homogenato que se usaram no gel de electroforese (15µg). Para a realização da experiência foram utilizados três animais para cada modelo.



**Figura 4.18-** Estudo de *immunoblotting* para o InsR em cérebros de modelos experimentais. As bandas correspondem, da esquerda para a direita a: LZR, OZR e ZDF. a) membrana incubada com anticorpo anti-InsR, as bandas superiores correspondem ao precursor do InsR e as inferiores ao InsR (marcadas a vermelho). b) membrana incubada com anticorpo anti-fib. c) gráfico de barras das médias das intensidades das bandas de InsR normalizadas para o fibrinogénio. Os valores obtidos foram: LZR- 1,54±0,27 (n=3); OZR- 1,26±0,96 (n=3); ZDF- 0,48±0,17 (n=3). d) gráfico de barras das médias das intensidades das bandas do precursor normalizadas para o fibrinogénio. Os valores obtidos foram: LZR- 9,23±0,94 (n=3); OZR- 12,94±0,82 (n=3); ZDF- 8,12±0,6 (n=3).

Observando os resultados da figura 4.18, verifica-se que a expressão do InsR varia conforme o modelo animal, sendo maior nos LZR, modelo que serve de controlo, e menor nos OZR, modelos obesos, e nos ZDF, modelos diabéticos. No entanto, o erro padrão é grande, principalmente no caso dos OZR, podendo induzir em erro na interpretação dos resultados. Mesmo assim, se tomarmos em conta o filme do gel (Figura 4.18-a), verifica-se que este erro é produzido pela primeira banda da esquerda dos animais OZR, sendo esta muito diferente das outras duas. Isto pode ter ocorrido devido a algum erro durante o carregamento do gel de electroforese. Devido a esta ocorrência no modelo OZR, estes resultados não foram utilizados para os testes estatísticos.

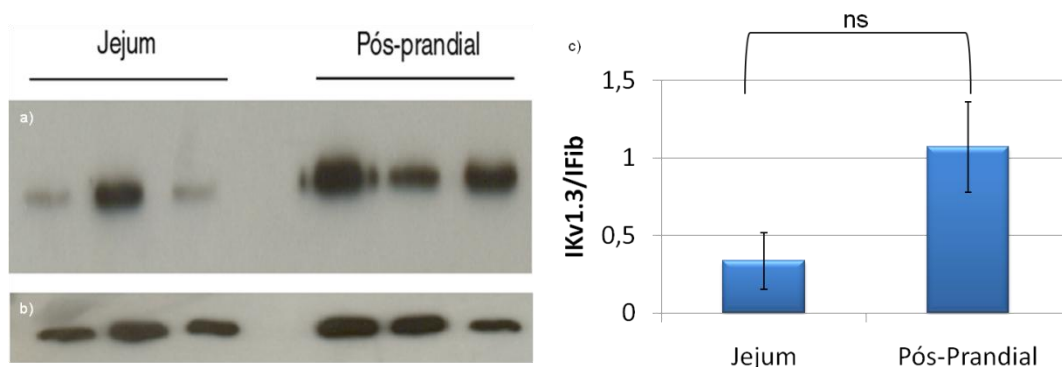
Por outro lado, no caso do modelo ZDF, verifica-se que existe uma diferença significativa (\*) na expressão do InsR em relação ao controlo (LZR), segundo o teste t não emparelhado. Assinala-se assim uma baixa expressão do InsR nas amostras dos ratos diabéticos.

Em relação ao precursor do InsR, verifica-se que a diferença não é significativa. Mesmo observando a Figura 4.18-a, conclui-se que a diferença não é tão grande nem tão notória como a que ocorre com o próprio InsR. Este resultado é semelhante ao obtido para

ratos *wistar*, nos quais a diferença a nível do precursor é mínima entre os períodos de pós-prandial e jejum.

### 2.3. Expressão do canal de K<sup>+</sup> Kv1.3 no hipocampo de animais em jejum e em pós-prandial

As experiências de electrofisiologia, apontaram no sentido de existir uma diferente expressão do Kv1.3 nas células piramidais isoladas da região CA1 do hipocampo durante os dois períodos. Como tal, é importante investigar mais profundamente esses resultados. Para tal, foi realizado uma experiência de *imunoblotting*. Esta experiência foi unicamente realizada em hipocampo, uma vez que este é o alvo principal do presente estudo. A Figura 4.19 apresenta os resultados obtidos.



**Figura 4.19-** Estudo de imunoblotting para o canal Kv1.3 em amostras de hipocampo. Da esquerda para a direita, as bandas correspondem a: jejum- w1, w2 e w3; pós-prandial- w4, w5 e w6. a) membrana incubada com anticorpo anti-Kv1.3; b) membrana incubada com anticorpo anti-fibrinogénio; c) gráficos representativos das médias das intensidades das bandas das amostras normalizadas para as intensidades das bandas do fibrinogénio. Os resultados obtidos foram: jejum-  $0,33 \pm 0,18$  (n=3); pós-prandial-  $1,06 \pm 0,29$  (n=3).

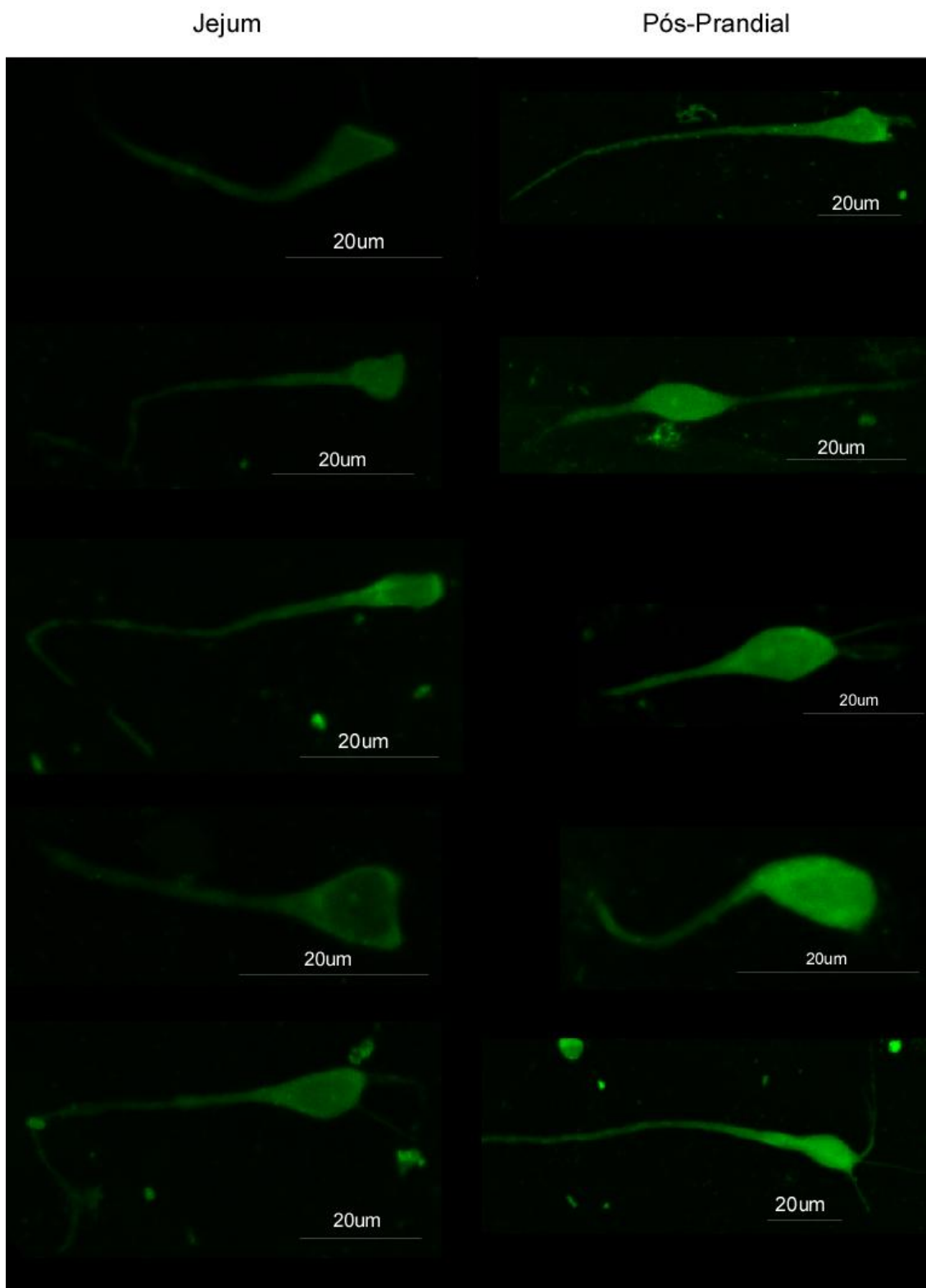
Observando a Figura 4.19, podemos verificar que no período de pós-prandial existe uma tendência para uma maior expressão do canal Kv1.3 do que no período de jejum. Embora quer através do teste de Mann Whitney quer do teste t não emparelhado, a diferença não seja significativa, nota-se uma clara tendência para haver mais expressão no estado pós-prandial. Estas experiências terão que ser repetidas para clarificar os resultados.

Deve-se dizer, por último, que a utilização do fibrinogénio para normalizar os resultados obtidos por *western-blot* não foi correcta. Em vez disso devia-se ter utilizado um anticorpo para a tubulina ou para a bomba de ATP.

### 3. Imunocitoquímica

Para as experiências de imunocitoquímica foram utilizadas células piramidais da zona CA1 do hipocampo de ratos *wistar*. O procedimento foi descrito na secção Materiais e Métodos. As células foram marcadas com anticorpo anti-InsR e com DAPI; para quantificação, foram utilizadas 8 células do animal em período de jejum e 11 do animal em pós-prandial. No entanto, as imagens adquiridas no microscópio confocal não mostram a marcação com DAPI e apenas uma análise visual foi possível efectuar.

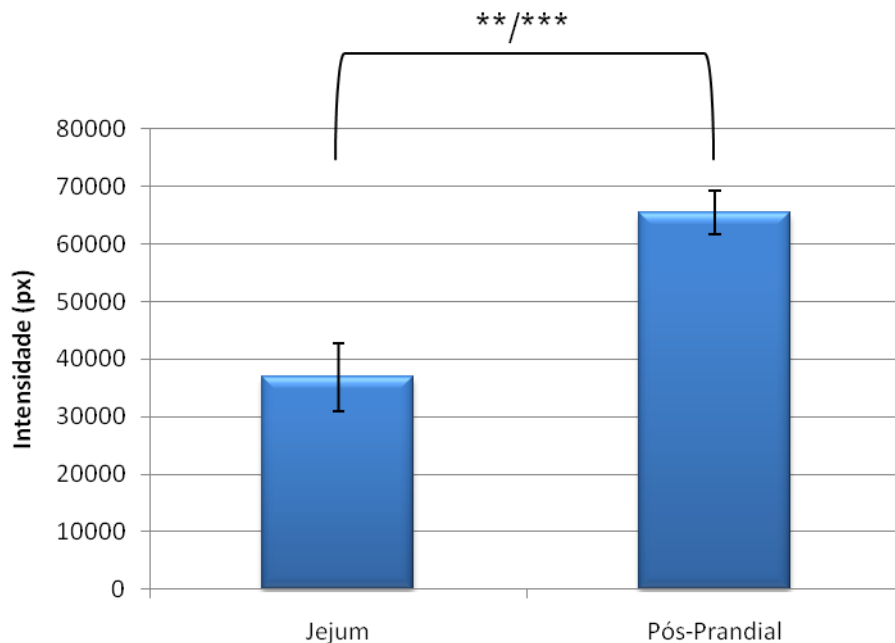
Como se pode observar na Figura 4.20, as células oriundas do animal em jejum exibem um menor nível de fluorescência ‘global’ do que naquelas provenientes do animal em pós-prandial - diferença que sugere que o receptor da insulina se encontra mais expresso nas células do hipocampo do “animal em pós-prandial”. Para além disso, numa observação mais cuidada, verifica-se que nas células do período de pós-prandial, podem-se distinguir aglomerados (clusters) de fluorescência mais elevada na célula. O mesmo não ocorre nas células em jejum. Por outro lado, nas células provenientes de animais em jejum, o núcleo é mais notório, caracterizado por zonas ovais de menor fluorescência.



**Figura 4.20-** Imagens de fluorescência obtidas com microscopia confocal de células piramidais da zona CA1 de hipocampo de ratos *wistar* marcadas com anticorpo primário anti-InsR (fluróforo associado ao anticorpo secundário-Alexa488). A coluna da esquerda apresenta células de animais no estado de jejum e a coluna da direita células de animais no estado pós-prandial.

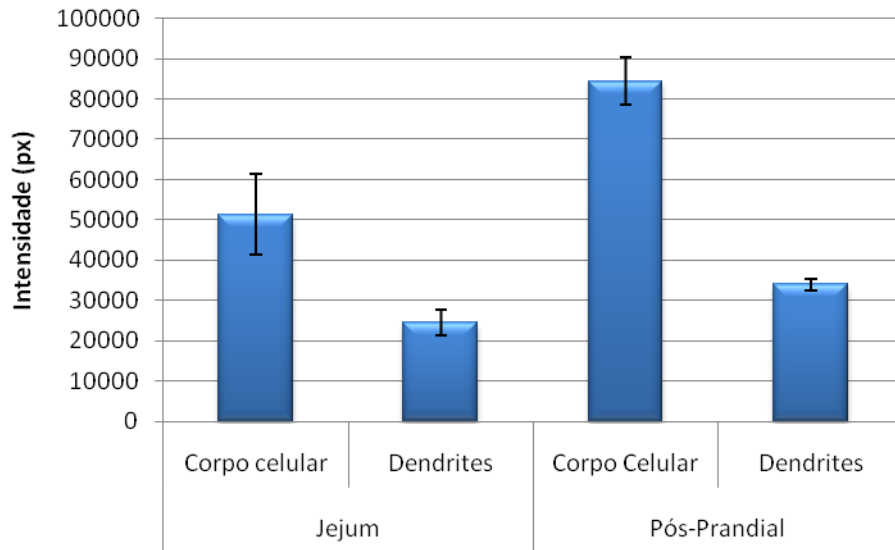
As intensidades médias de fluorescência foram medidas através do programa *ImageJ* em 11 células piramidais isoladas de um animal em pós-prandial e em 8 células de um animal

em jejum. Como se pode observar, na Figura 4.21, a diferença entre o período de jejum e de pós-prandial é notório, havendo mais fluorescência neste último. Foram utilizados dois testes para determinar o grau de significância das diferenças encontradas: pelo teste de Mann Whitney obteve-se uma diferença muito significativa (\*\*), com  $P=0,0028$ ; utilizando o teste t não emparelhado, obteve-se uma diferença altamente significativa (\*\*\*), com  $P=0,0005$ .



**Figura 4.21-** Gráfico de barras representando os valores de intensidade média da fluorescência provenientes das mostras de imunocitoquímica. As células foram incubadas com anticorpo anti-InsR e as intensidades de fluorescência registadas. Os valores obtidos foram: jejum-  $36844 \pm 5808$  ( $n=8$ ); pós-prandial-  $65515 \pm 3785$  ( $n=11$ ). A diferença entre os dados é muito significativa (\*\*) segundo o teste de Mann Whitney,  $P=0,0028$ ; a diferença é altamente significativa (\*\*\*) segundo o teste t não emparelhado,  $P=0,0005$ .

De modo a se ter uma melhor ideia sobre os padrões de expressão do InsR, foram ainda medidas as intensidades das fluorescências dos corpos celulares e das dendrites separadamente. Os resultados deste estudo são apresentados na Figura 4.22. Como se pode observar, quer num estado quer noutra, os corpos celulares possuem maior fluorescência que as dendrites, havendo no entanto, uma tendência mais clara na preparação dos “neurónios em pós-prandial”. Por outro lado, comparando os corpos celulares num estado e noutra, e as dendrites num estado e noutra, chega-se à conclusão que a maior diferença ocorre nos corpos celulares, permanecendo as dendrites quase na mesma.



**Figura 4.22-** Comparação entre as intensidades médias de fluorescência dos corpos celulares e as dendrites nas células piramidais isoladas da região CA1 de ratos nos estados de jejum e pós-prandial. Os valores obtidos foram: jejum- corpo celular 51326±9992, dendrites 24456±3107 (n=8); pós-prandial- corpo celular 84324±5903, dendrites 33952±1474 (n=11).

Para uma melhor distinção, foi aplicado um teste *One-Way ANOVA* seguido por um teste de Turkey a estes valores. Como resultado obteve-se:

- Comparação entre corpos celulares em jejum e dendrites em jejum- diferença significativa (\*);
- Comparação entre corpos celulares em pós-prandial e dendrites em pós-prandial- altamente significativa (\*\*\*)
- Comparação entre corpos celulares- diferença muito significativa (\*\*);
- Comparação entre dendrites- diferença não significativa (ns), embora exista maior expressão do InsR nos “neurónios em pós-prandial”

O resultado desta análise aponta assim que a diferença de expressão do InsR nos neurónios piramidais da zona CA1 do hipocampo de animais em jejum e em pós-prandial, é mais evidente ao nível dos corpos celulares.

## V. Discussão

## V. Discussão

Pretendia-se com este trabalho explicar a dinâmica e dependência do efeito da insulina nas correntes de  $K^+$  face a variações no ciclo jejum/pós-prandial, identificando o canal de  $K^+$  subjacente à corrente sensível à insulina, bem como o papel de tal canal na referida dinâmica.

### 1. Qual o canal de $K^+$ subjacente à corrente sensível à insulina?

Assim, o primeiro objectivo do presente trabalho consistiu em determinar qual é o canal responsável pelo efeito da insulina nas correntes de  $K^+$  de neurónios piramidais isolados da zona CA1 do hipocampo de ratos *wistar*. Como já anteriormente descrito, a insulina induz uma redução da corrente de  $K^+$  nestes neurónios, sendo este efeito específico para a componente lenta da corrente ( $I_{slow}$ ). Sugerido por trabalhos anteriores, dois canais-candidato foram testados, os canais Kv1.3 e os canais ERG.

Para se testar a hipótese dos canais Kv1.3, realizou-se primeiramente um estudo sobre o efeito da margatoxina (MgTx), inibidor selectivo de canais Kv1.3. As experiências foram realizadas em neurónios provenientes de animais no estado de pós-prandial. Verificou-se que o efeito da MgTx é específico para a componente  $I_{slow}$  das correntes de  $K^+$ , sendo este efeito proporcional à concentração de MgTx adicionada. Variando de uma redução quase nula para uma concentração de MgTx de 100fM, a uma redução de cerca de 30%, quando a concentração adicionada de MgTx era de 3nM. Ajustando-se uma função de Hill à relação dose-resposta, obteve-se um  $EC_{50}$  de 125pM. O valor encontrado para este parâmetro na literatura (Coetzee et al., 1999) é de 230pM, valor na mesma ordem de grandesa. No entanto é possível que os canais em neurónios de hipocampo denotem uma maior sensibilidade dos Kv1.3 à MgTx.

Foi ainda estudado o efeito da MgTx sobre o comportamento das correntes de  $K^+$  em função da voltagem. Mais uma vez, verificou-se que a acção da MgTx é específica para a componente  $I_{slow}$  das correntes dos canais  $K^+$  dos neurónios em estudo. Este facto assinala-se pela subtracção realizada às correntes antes e depois da adição da toxina, sendo o decaimento da corrente resultante passível de ser ajustada com uma função mono-exponencial, confirmando deste modo que a componente rápida ( $I_{fast}$ ) não é afectada pela MgTx. Após o ajuste com uma função mono-exponencial à fase inactivante da curva, obteve-se um  $\tau_{inact}$  entre os 600 e os 1000ms, estando estes valores aproximados daqueles registados para outros modelos (Coetzee et al., 1999).

Com vista a se obter informação referente ao modo de acção desta toxina de escorpião no canal, a partir dos perfis de voltagem (relação corrente-voltagem), foram calculados os  $V_{1/2}$  dos resultados obtidos da  $I_{slow}$  antes e depois da adição, obtendo-se os valores -14,9 e -3,55

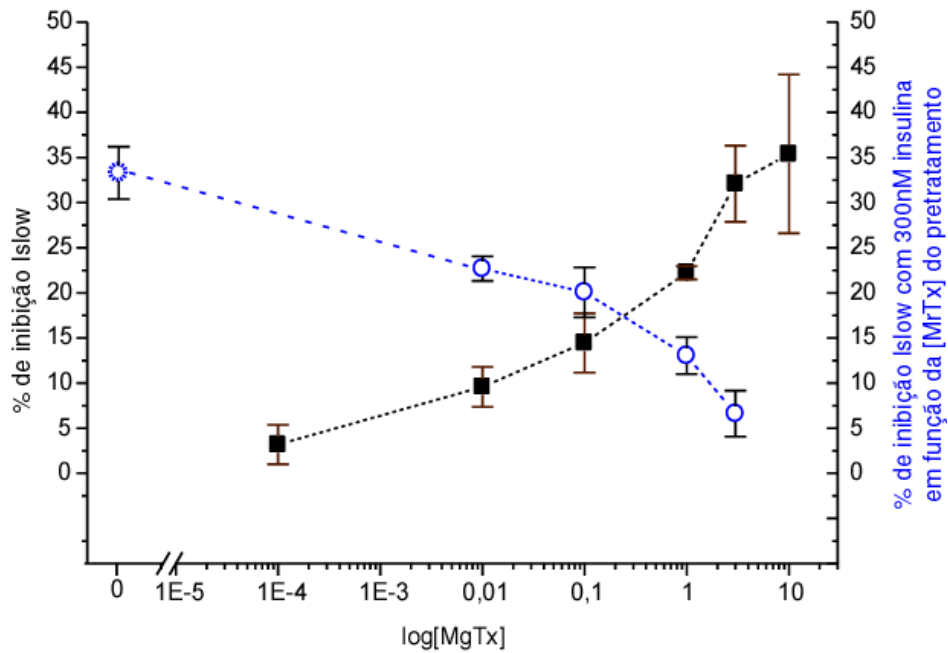
respectivamente. Estes resultados apontam no sentido de haver uma diferença significativa, nomeadamente uma deslocação para valores 11mV mais despolarizados no perfil de activação dos canais Kv1.3, depois de adicionada a MgTx. Assim, a MgTx deve actuar no 'sensor de voltagem' de modo a que a activação do canal fique menos sensível à activação pela voltagem.

Estas observações alargam o entendimento sobre o modo de acção desta toxina e sobretudo no seu efeito em neurónios da região CA1 do hipocampo, uma vez que, até à data só se conhecia o papel facilitatório da MgTx na excitabilidade através de estudos de *current-clamp* executados em culturas de hipocampo (Kupper, et al., 2002). Igualmente, não se conhecia a sensibilidade deste antagonista em modelos neuronais.

Por outro lado, foi também estudado o efeito da insulina na presença de MgTx, de modo a se determinar se, de facto, seria o Kv1.3 o canal responsável pelo efeito da insulina nas correntes de  $K^+$  de neurónios isolados da zona CA1 de hipocampo de ratos. Estas experiências foram realizadas em "neurónios em pós-prandial", uma vez que, resultados do nosso laboratório apontam que no estado de jejum a insulina não surge efeito.

Esta abordagem foi de alguma forma condicionada pelo facto de o efeito provocado pela MgTx não ser reversível com a lavagem. Assim, adicionaram-se concentrações variáveis de MgTx, e depois de estabilizado o efeito da mesma, eram adicionados 300nM de insulina. Verificou-se que, embora a concentrações pequenas de MgTx a insulina inibia claramente  $I_{slow}$ , nomeadamente às concentrações de 10pM e de 100pM, a concentrações mais significativas, o efeito da insulina tendia a diminuir, até ser quase nulo a uma concentração de MgTx de 3nM.

Se compararmos a relação da % inibição em  $I_{slow}$  / dose de MgTx com o efeito da insulina (a 300nM) (% de inibição) em função do pré-tratamento com diferentes doses de MgTx (Figura 5.1), verifica-se uma relação reveladora.



**Figura 5.1-** Análise comparada dos resultados obtidos para o efeito da insulina na presença de MgTx em células isoladas da região CA1 do hipocampo de ratos *wistar*. Legenda:  $\square$  efeito MgTx;  $\circ$  efeito da Ins na presença de MgTx; barras- erro padrão.  $\odot$  % de inibição em  $I_{slow}$  com 300nM de insulina na ausência de MgTx (Lima, et al., 2008). É notória uma diminuição do efeito da insulina à medida que o efeito e a concentração de MgTx aumentam.

A Figura 5.1 demonstra que o efeito da insulina depende de uma forma inversamente proporcional ao efeito e concentração de MgTx, ou seja, quanto maior for a inibição com MgTx (dependente da sua concentração), menor é o efeito da aplicação consequente de insulina. Há que lembrar aqui que, tratando-se de registos em configuração de *whole-cell*, tem-se o somatório de várias correntes. Se a insulina exerce a sua acção através de outros canais para além dos Kv1.3, esperar-se-ia que o efeito da insulina se mantivesse na presença de MgTx. Como a MgTx está a bloquear os canais Kv1.3, sugere-se que a insulina actua sobre estes mesmos canais, uma vez que quando estes estão bloqueados, a insulina não provoca qualquer efeito sobre as correntes de  $K^+$ . Resumindo, sendo a MgTx um inibidor selectivo dos canais Kv1.3, estes resultados sugerem que estes canais de  $K^+$  medeiam a corrente sensível à insulina em neurónios piramidais da zona CA1 do hipocampo.

De qualquer modo, há a considerar a possibilidade da insulina actuar também em outras correntes de  $K^+$ , nomeadamente aquelas mediadas por canais ERG. Esta hipótese era plausível uma vez que os canais ERG formam correntes funcionais nos neurónios CA1 do hipocampo (Alves, et al., em preparação) e são subjacentes à corrente sensível à insulina em células diferenciadas de neuroblastoma N1E-115 (Lima, et al., 2008). Sendo os canais ERG caracterizados por induzirem correntes de  $K^+$  *inward*, o estudo foi realizado com uma solução extracelular de concentração de  $K^+$  elevada. Por estudos realizados no nosso laboratório, verificou-se que após a adição de insulina, não havia redução da corrente despoletada pelos canais ERG, levando a concluir que não são estes os canais responsáveis pelo efeito da insulina nestes neurónios.

## 2. Como explicar as diferenças nos efeitos da insulina na corrente $I_{slow}$ e na neuroexcitabilidade? Diferente padrão de expressão do InsR em jejum e em pós-prandial?

Como formulado anteriormente, as marcadas diferenças no efeito da insulina em correntes obtidas em “neurónios em pós-prandial” e “em jejum” poderiam ser devidas a oscilações da expressão do receptor da insulina (InsR). Tal hipótese vislumbrava-se como a mais plausível. Assim, foram efectuadas experiências de *western-blotting* e de imunocitoquímica de maneira a se saber um pouco mais sobre o comportamento do receptor de insulina (InsR) no cérebro, durante o ciclo de alimentação.

Os resultados com a técnica de *western-blotting* mostraram que o anticorpo usado (InsR, Santa Cruz Biotechnology) bem como o secundário, eram adequados para objectivo de estudo. Confirmou-se que o InsR é expresso no hipocampo e no cerebelo, tal como tinha sido revelado anteriormente (Schulingkamp, et al., 2000; Unger, et al., 1991). No entanto, o controle usado, com o anticorpo anti-fibrinogénio, revelou-se inadequado para as amostras em causa. A grande variabilidade e a intensidade de reactividade constituíram um aumento de dispersão nos valores quantificados, isto é nos valores do *ratio* (Intensidade InsR/ Intensidade Fibr). Em varios casos apontados na secção dos resultados as diferenças encontradas entre as preparações de jejum e pós-prandial, terão sido inclusivamente contaminadas pela má qualidade das bandas do controlo. Isto é, após a normalização, em alguns casos obteve-se uma diferença menor do que aquela que era espectável pela simples observação dos filmes de *western-blot*. Outros anticorpos como os reactivos à  $\alpha$ -tubulina deverão ser usados para amostras neuronais.

Mesmo assim, verifica-se uma clara tendência para a ocorrência de maior expressão do InsR no período de pós-prandial do que no período de jejum. Esta diferença é claramente notória no hipocampo, onde no período de jejum não há praticamente a existência de bandas assinaláveis. Também é conveniente dizer que o número de amostras foi reduzido, utilizando apenas três animais para cada período, o que pode ter originado algumas irregularidades a nível estatístico.

Por outro lado também se verifica que o precursor do InsR não sofre a mesma variação durante o ciclo jejum/pós-prandial que o InsR maduro. Nos três tecidos analisados, a diferença não é significativa, este facto parece apontar que a regulação no nível de expressão do InsR durante o ciclo jejum/pós-prandial ocorre ao nível da maturação do receptor e não da sua transcrição.

No entanto, os resultados obtidos por *western-blot* estão de acordo com aqueles resultantes das experiências de imunocitoquímica. Nestas experiências foram utilizadas células neuronais da região CA1 do hipocampo de animais em jejum e em pós-prandial, iguais às

usadas com a abordagem electrofisiológica. Tal como nos resultados dos *western*, as experiências de imunocitoquímica apontam para uma maior expressão do InsR nas células de animais em pós-prandial, sendo estas caracterizadas por uma maior fluorescência global. Além disso, quando foram analisados separadamente a fluorescência proveniente dos corpos celulares e a das pequenas porções de dendrites, verifica-se que a diferença ocorre principalmente nos corpos celulares. Há que realçar que a preparação utilizada não é a mais conveniente para se estudar a expressão de proteínas nas projecções neuronais uma vez que apenas pequenas porções proximais de dendrites são mantidas após o processo de isolamento. A análise usada serve sobretudo para refutar os resultados obtidos nos géis conferindo as diferenças de expressão aos neurónios em si. De facto, as diferenças obtidas com as experiências de *western blotting* poderiam dever-se a uma participação diferencial do sinal proveniente de outros constituintes celulares das amostras como as células da glia ou vasos sanguíneos, também eles expressantes do receptor de insulina (observações não ilustradas) (Schulingkamp, et al., 2000; Unger, et al., 1991).

Os resultados da imunocitoquímica não são suficientes porém para se entender se a diminuição dos padrões de expressão do InsR durante o jejum são devidos a uma expressão diferencial na membrana do neurónio ou indagar sobre processos de retenção durante fenómenos de *trafficking*.

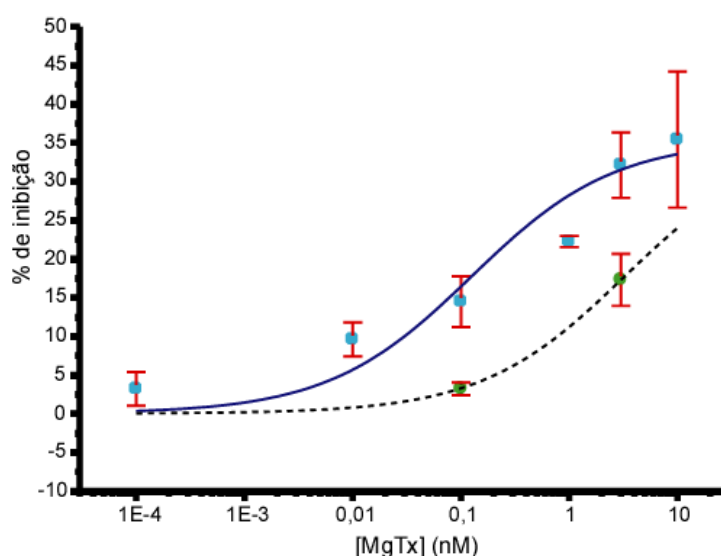
Com o grau de resolução das imagens obtidas, não é informativa a interpretação das aparentes diferenças da expressão do receptor a nível sub-celular. Para efeito de planeamento experimental futuro, há que notar que as imagens obtidas são a reconstrução de planos confocais com uma espessura considerável (devido a constrangimentos de equipamento). As experiências futuras deverão usar secções ópticas mais finas de maneira a que, conjuntamente com as imagens reconstruídas consequentes, se entenda, por exemplo, se o InsR está mais à superfície do neurónio em pós-prandial.

De qualquer forma, todos os resultados com o anticorpo Anti-InsR apontam colectivamente no sentido de que no período de jejum, a expressão do InsR no cérebro é menor que durante o período de pós-prandial. Este facto, para além de constituir uma explicação para a ausência de efeito da insulina sobre as correntes de  $K^+$  nas células neuronais provenientes de “preparações em jejum”, abre uma nova perspectiva sobre a fisiologia dos processos que controlam a neuroexcitabilidade- demonstram que esses são dependentes do estado metabólico do animal, contrariando ideias gerais que indicavam que no cérebro, os mecanismos existentes visavam o salvaguardar de uma constância na ‘maquinaria de suporte’ para padrões essenciais da actividade neuronal (Peters, et al., 2004; Hitze, et al., 2010). A relevância fisiológica do que é mostrado aqui está porém para ser revelada.

### 3. O canal de $K^+$ subjacente à corrente sensível à insulina é também “parte participante” da dinâmica encontrada entre os estados de jejum e pós-prandial?

O efeito da MgTx sobre as correntes de  $K^+$  foi também estudado em neurónios piramidais isolados da zona CA1 do hipocampo de ratos no estado de jejum (“neurónios em jejum”). Neste caso, apenas foram utilizadas duas concentrações de MgTx, 100pM e 3nM.

Após a análise dos resultados observou-se que o efeito provocado pela MgTx na componente  $I_{slow}$  das células provenientes de animais em jejum era muito menor do que naquelas provenientes de animais em pós-prandial. Obtiveram-se assim reduções nas correntes de 3,20% e de 17,39% para as concentrações de 100pM e 3nM respectivamente. Estes valores contrastam com aqueles obtidos em “neurónios em pós-prandial”, em que as reduções de  $I_{slow}$  se pautaram em 14,26% e 32,10% para as mesmas concentrações. Denota-se assim uma diferença significativa no efeito da MgTx entre os dois períodos. Uma vez que só possuíamos dois pontos referentes a duas concentrações, foi forçado um ajustamento com a função de Hill com os parâmetros  $V_{máx}$  e coeficiente de Hill provenientes da função referente aos resultados em “neurónios pós-prandial” (ver Figura 5.2). Pela análise visual da Figura 5.2 o ajustamento é bom e, deste modo obteve-se um  $EC_{50}=3,24nM$ .



**Figura 5.2-** Curva dose-resposta para o efeito da MgTx em células isoladas da região CA1 do hipocampo de ratos *wistar*. Legenda: ● pós-prandial; ● jejum; — ajustamento da curva da função de Hill aos valores referentes aos “neurónios em pós-prandial”; - - - ajustamento da curva com os mesmos parâmetros da função encontrada para os “valores de pós-prandial”, aplicados aos valores de “neurónios em jejum”; barras vermelhas- erro padrão.

A Figura 5.2 sumariza assim os resultados obtidos para o efeito da MgTx sobre  $I_{slow}$  em “neurónios em pós-prandial” e em “neurónios em jejum”. É bem visível que no estado de jejum, a curva sofre um desvio para concentrações mais elevadas, observação comprovada pela diferença entre o  $EC_{50}$  em pós-prandial, 125pM, e em jejum, 3,24nM. Estes resultados indicam claramente que é necessário maior concentração de MgTx nas células de animais em jejum

para atingir o mesmo efeito que nas células oriundas de animais em pós-prandial. Este facto pode significar que os canais Kv1.3 exibem diferentes graus de expressão num estado e nouro nestas células.

Para se testar essa hipótese, foram realizadas experiências de *western-blot* com amostras de hipocampos de animais no período de jejum e de pós-prandial marcadas com anticorpo anti-Kv1.3. Os resultados sugerem a existência de uma maior expressão do canal Kv1.3 nos hipocampos de animais em pós-prandial do que nos de animais em jejum. Mais uma vez, provavelmente devido ao tamanho da amostra, e/ou o facto de os resultados estarem normalizados para os valores do fibrinogénio, os testes estatísticos apontam para uma diferença não significativa. No entanto, visualmente, o resultado dos filmes alude para uma tendência na maior expressão do canal no período de pós-prandial, onde surgem bandas bem definidas, o que não ocorre no estado de jejum. Para além disso, estes resultados apontam na mesma direcção que os resultados da electrofisiologia, na qual ocorre maior efeito da MgTx nos neurónios dos animais em pós-prandial do que nos de animais em jejum.

Os resultados que apontam para que haja uma maior expressão de canais de Kv1.3 durante o período pós prandial (em relação ao jejum) também constituem mais um indicador que o canal sensível à insulina é, nestes neurónios, o canal Kv1.3.

Uma vez que se aponta aqui que existem duas proteínas que sobre-expressam durante o período pós-prandial (em relação ao jejum), será importante estudar outras proteínas, como a bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  que antecipadamente se considerará como controle negativo.

#### **4. Relevância e enquadramento no contexto da fisio-patologica**

Pretendendo-se obter mais informação que nos ajude a revelar a profundidade da significância dos resultados obtidos, foram também realizadas experiências de *western-blotting* com o anticorpo anti-InsR mas agora em cérebros de modelos animais LZR, OZR e ZDF. Os resultados obtidos nestas experiências apontam que nos modelos OZR, animais obesos, e ZDF, animais diabéticos, a expressão do InsR está diminuída quando comparada com o controlo LZR. No entanto, os testes estatísticos não atribuem significância às diferenças encontradas. Tal facto pode dever-se aos constrangimentos experimentais já referidos. Mesmo assim, visualmente apercebe-se uma tendência na qual os animais LZR possuem maior expressão de InsR caracterizada por bandas fortes e bem definidas, o que não ocorre nos modelos OZR e ZDF onde as bandas são pouco nítidas ou quase inexistentes.

A resistência à insulina é, a nível sistémico, explicado em parte por expressão insuficiente dos receptores de insulina nos tecidos alvo (musculo e tecido adiposo, principalmente) (Bertacca, et al., 2007). Ao nível do cérebro, nada se sabe a este respeito. Os resultados com as amostras de cérebro dos animais modelo mostram que, ao nível do cérebro, um estado de resistência à insulina é acompanhado com uma sub-expressão do InsR.

Por outro lado, o jejum é encarado como um estado 'normal' de resistência à insulina (Lautt 2002). Os resultados do presente trabalho são importantes na medida em que correlacionam os resultados obtidos em animais no período de jejum com os modelos diabéticos (as amostras usadas provinham de animais no estado pós-prandial), uma vez que em ambos se verifica uma redução na expressão do InsR. Logo será preponderante repetir a mesma abordagem nos mesmos modelos animais mas agora com animais em jejum.

O presente trabalho localiza o Kv1.3 "como protagonista celular importante na resposta – e quem sabe na sensibilidade à insulina. É interessante constatar que este canal de  $K^+$  tem sido implicado na resistência/sensibilidade à insulina periférica (Xu, et al., 2004). A inibição dos canais Kv1.3 é necessária para que ocorra a translocação para a membrana do transportador de glucose GLUT4 (Xu, et. al, 2004; Li, et al., 2007). O canal Kv1.3 é inclusivamente apontado como potencial alvo para as diabetes (Desir 2005; Choi e Hahn, 2010).

Curiosamente, em neurónios centrais como os do hipocampo não é claro ainda se a internalização da glucose é um processo sensível à insulina (Craft e Watson, 2004; Holsher e Li, 2008; Gasparini e Xu, 2003) uma vez que o GLUT3 (transportador de glucose independente à insulina) é o mais abundante no cérebro (Uemura e Greenlee, 2006). No entanto, áreas específicas do cérebro incluindo o hipocampo expressam também o GLUT4 (Fernando, et al., 2008; Apelt, et al., 1999), transportador sensível à insulina. Apesar da aparente contradição na literatura, sabe-se também que no hipocampo a translocação de GLUT3 para a membrana plasmática pode ser induzida por despolarizações (Uemura e Greenlee, 2006). É possível que essa despolarização possa ser levada a cabo pela inibição dos Kv1.3 pela insulina. Assim, é possível que a activação do receptor de insulina, ao levar à inibição da corrente de  $K^+$  mediada por canais KV1.3, leve ao aumento de importação de glucose para a célula, através de um processo indirecto que envolve transportadores GLUT3, e/ou através de um processo mais directo que recruta transportadores GLUT4.

No contexto da importância dos canais Kv1.3 na resistência a insulina, será esclarecedor desenvolver estudos da expressão do canal Kv1.3 nos mesmos modelos de animais diabéticos, usados neste trabalho.

Finalmente, há que referir que os dados aqui apresentados, apesar de adicionarem informação relevante no contexto da fisiologia da insulina neuronal, suscitam inúmeras questões. Por exemplo, não se percebe como as dinâmicas encontradas ao nível das proteínas estudadas e dos padrões de excitabilidade, inerentes ao ciclo jejum/pós-prandial, se contextualizam no papel facilitatório da insulina na memória e aprendizagem. Podemos apenas especular ao considerar que a insulina ao aumentar a neuroexcitabilidade (através da inibição de canais Kv1.3) facilita fenómenos de plasticidade sináptica como o LTP e, conseqüentemente, a memória. No entanto, esse processo estará limitado ao período pós-prandial, não ocorrendo o mesmo durante o jejum, período no qual, apenas níveis basais de

glucose intracelular deverão ser mantidos (recrutando apenas um tipo de transportador de glucose).

### 5. Perspectivas Futuras

Embora o presente trabalho responda a algumas perguntas, suscita e levanta outras questões pertinentes. Em primeiro lugar será importante repetir as experiências de *immunoblotting*, desta vez efectuando a normalização para a tubulina, uma vez que a normalização com o fibrinogénio é inadequada para as amostras neuronais.

Será importante também verificar-se se existem diferenças ao nível da expressão do Kv1.3 noutras regiões do cérebro. Estudos anteriores apontam para a existência destes canais no bulbo olfactivo (Fadool, et al., 2000) e no cerebelo (Chung, et al., 2005), nomeadamente nas células de Purkinje. Tendo-se já estudado a importância destes canais no bulbo olfactivo, é será preponderante investigar se há alterações ao nível da sua expressão durante o ciclo jejum/pós-prandial..

Por outro lado, poder-se-á também efectuar mais estudos de *immunoblotting* nos modelos animais obesos e diabéticos, uma vez estes podem relacionar o presente estudo com a DA e a DTM2. Será portanto importante verificar a expressão do InsR nestes modelos mas em condições de jejum.

Deve-se ainda estudar o comportamento do canal Kv1.3 nestes modelos. Será que, tal como para o InsR, a expressão do Kv1.3 é mais baixa no modelos diabéticos em relação ao controlo?

Finalmente, poder-se-á realizar experiências de *real-time PCR* (RT-PCR), de modo a sabermos um pouco mais sobre o mecanismo de regulação da expressão do InsR durante o ciclo jejum/pós-prandial.

## VI. Bibliografia

## VI. Bibliografia

- Almeida, C. G., Tampellini, D., Takahashi, R. H., Grengard, P., Lin, M. T., Snyder, E. M., et al. (2005). Beta-amyloid accumulation in APP mutant neurons reduces PSD-95 and GluR1 in synapses. *Neurobiology* , 187-198.
- Alshuaib, W., Hasan, S., Cherian, S., Mathew, M., Hasan, M., & Fahim, M. (2001). Reduced potassium currents in old rat CA1 hippocampal neurons. *J Neurosci Res* , 176-84.
- Apelt, J., Mehlhorn, G., & Schliebs, R. (1999). Insulin-sensitive GLUT4 glucose transporters are colocalized with GLUT3-expressing cells and demonstrate a chemically distinct neuron-specific localization in rat brain. *J Neurosci Res* , 693-705.
- Armstrong, C., & Hille, B. (1998). Voltage-gated ion channels and electrical excitability. *Neuron* , 371-380.
- Arslanian, S. A. (2005). Clamp techniques in paediatrics: what have we learned? *Horm Res* , 16-24.
- Balkau, B., & Eschwege, E. (2003). The diagnosis and classification of diabetes mellitus and impaired glucose regulation. In J. C. Pickup, & G. Williams, *Textbook of Diabetes*. Oxford: Blackwell Science.
- Baskin, D., Porte, D. J., Guest, K., & Dorsa, D. (1983). Regional concentrations of insulin in the rat brain. *Endocrinology* , 898-903.
- Bayer, T. A., & Wirths, O. (2010). Intracellular accumulation of amyloid-beta— a predictor for synaptic dysfunction and neuron loss in Alzheimer's disease. *Front. Aging Neurosci.* , 1-10.
- Bergman, R. N., Ader, M., Huecking, K., & Van Citters, G. (2002). Accurate assessment of  $\beta$ -cell function: the hyperbolic correction. *Diabetes* , 212-220.
- Bertacca, A., Ciccarone, A., Cecchetti, P., Vianello, B., Laurenza, I., Del Prato, S., et al. (2007). High insulin levels impair intracellular receptor trafficking in human cultured myoblasts. *Diabetes Res Clin Pract* , 316-23.
- Blanton, M., Turco, L., & Krigstein, A. (1989). Whole cell recording from neurons in slices of reptilian and mammalian cerebral cortex. *J Neurosci Methods* , 203-210.
- Brange, J., & Langkjoer, L. (1993). Insulin structure and stability. *Pharm Biotechnol* , 315-50.
- Cahalan, M. D., & Chandy, K. G. (1997). Ion channels in the immune system as targets for immunosuppression. *Curr Opin Biotechnol* , 749-756.
- Cataldo, A. M., Petanceska, S., Terio, N. B., Peterhoff, C. M., Durham, R., Mercken, M., et al. (2004). A $\beta$  localization in abnormal endosomes: association with earliest A $\beta$  elevations in AD and Down syndrome. *Neurobiology of Aging* , 1263-1272.
- Cheung, T., & Cardinal, R. (2005). Hippocampal lesions facilitate instrumental learning with delayed reinforcement but induce impulsive choice in rats. *BMC Neuroscience* .
- Chiu, S.-L., Chen, C.-M., & Cline, H. T. (2008). Insulin receptor signaling regulates synapse number, dendritic plasticity and circuit function in vivo. *Neuron* , 708-709.

- Choi, B., & Hahn, S. (2010). Kv1.3: a potential pharmacological target for diabetes. *Acta Pharmacol Sin*, 1031-5.
- Chung, Y., Joo, K., Kim, Y., Lee, W., & Cha, C. (2005). Immunohistochemical study on the distribution of the voltage-gated potassium channels in the gerbil cerebellum. *Neurosci*, 58-62.
- Cirrito, J. R., Kang, J. E., Lee, J., Steward, F. R., Verges, D. K., Silverio, L. M., et al. (2008). Endocytosis is required for synaptic activity-dependent release of amyloid-beta in vivo. *Neuron*, 42-51.
- Cirrito, J. R., Yamada, K. A., Finn, M. B., Sloviter, R. S., Bales, K. R., May, P. C., et al. (2005). Synaptic activity regulates interstitial fluid amyloid-beta levels in vivo. *Neuron*, 913-922.
- Coetzee, W. A., Amarillo, Y., Chiu, J., Chow, A., Lau, D., McCormack, T., et al. (1999). Molecular Diversity of K<sup>+</sup> Channels. *Ann N Y Acad Sci*, 233-285.
- Colden-Stanfield, M., & Gallin, E. K. (1998). Modulation of K<sup>+</sup> currents in monocytes by VCAM-1 and E-selectin on activated human endothelium. *Am J Physiol Cell Physiol*, 267-277.
- Coleman, P. D., & Yao, P. J. (2003). Synaptic slaughter in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 1023-1027.
- Connor, J., & Stevens, C. (1971). Prediction of repetitive firing behaviour from voltage clamp data on an isolated neurone soma. *J Physiol*, 31-53.
- Costa, P., Santos, A., & Ribeiro, M. (1994). Potassium currents in acutely isolated maturing rat hippocampal CA1 neurones. *Brain Res Dev Brain Res*, 216-23.
- Craft, S. (2007). Insulin resistance and Alzheimer's disease pathogenesis: potential mechanisms and implications for treatment. *Curr. Alzheimer*, 147-152.
- Craft, S., & Watson, G. (2004). Insulin and neurodegenerative disease: shared and specific mechanisms. *Lancet Neurol*, 169-178.
- Craft, S., Asthana, S., Cook, D. G., Baker, L. D., Cherrier, M., Purganon, K., et al. (2003). Insulin dose-response effects on memory and plasma amyloid precursor protein in Alzheimer's disease: interactions with apolipoprotein E genotype. *Psychoneuroendocrinology*, 809-822.
- Craft, S., Asthana, S., Newcomer, J. W., Wilkinson, C. W., Matos, I. T., Baker, L. D., et al. (1999). Enhancement of memory in Alzheimer disease with insulin and somatostatin, but not glucose. *Arch. Gen. Psychiatry*, 1135-1140.
- Craft, S., Newcomer, J., Kanne, S., Dagogo-Jack, S., Cryer, P., Sheline, Y., et al. (1996). Memory improvement following induced hyperinsulinemia in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 123-130.
- Craft, S., Newcomer, J., Kanne, S., Dagogo-Jack, S., Cryer, P., Sheline, Y., et al. (1996). Memory improvement following induced hyperinsulinemia in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 123-30.
- D'Andrea, M. R., Nagele, R. G., Wang, H. Y., Peterson, P. A., & Lee, D. H. (2001). Evidence that neurones accumulating amyloid can undergo lysis to form amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Histopathology*, 120-134.

- Das, P., Parsons, A. D., Scarborough, J., Hoffman, J., Wilson, J., Thompson, R. N., et al. (2005). Electrophysiological and behavioral phenotype of insulin receptor defective mice. *Physiology and Behavior* , 287-296.
- De la Monte, S. M. (2009). Insulin resistance and Alzheimer's disease. *BMB reports* , 475-481.
- De la Monte, S. M., & Wands, J. R. (2008). Alzheimer's disease is type 3 diabetes: evidence reviewed. *J. Diabetes Sci. Tech* , 1101-1113.
- De la Monte, S. M., & Wands, J. R. (2005). Review of insulin and insulin-like growth factor expression, signaling, and malfunction in the central nervous system: relevance to Alzheimer's disease. *J. Alzheimers* , 45-61.
- De la Monte, S. M., Neusner, A., Chu, J., & Lawton, M. (2009). Epidemiological trends strongly suggest exposures as etiologic agents in the pathogenesis of sporadic Alzheimer's disease, diabetes mellitus, and non-alcoholic steatohepatitis. *J. Alzheimer Dis.* , 519-529.
- De la Monte, S. M., Tong, M., Lester-Coll, N., Plater, M., & Jr. and Wands, J. R. (2006). Therapeutic rescue of neurodegeneration in experimental type 3 diabetes: relevance to Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* , 89-109.
- De Meyts, P. (2004). Insulin and its receptor: structure, function and evolution. *Bioessays* , 1351-62.
- De Meyts, P., & Whittaker, J. (2002). Structural biology of insulin and IGF1 receptor: implications for drug design. *Nature Reviews Drug Discovery* , 769-783.
- DeKosky, S. T., & Scheff, S. W. (1990). Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with severity. *Ann. Neurol.* , 457-464.
- Deshpande, A., Kawai, H., Metherate, R., Glabe, C. G., & Busciglio, J. (2009). A role for synaptic zinc in activity-dependent Abeta oligomer formation and accumulation at excitatory synapses. *Journal of Neuroscience* , 4004-4015.
- Desir, G. (2005). Kv1.3 potassium channel blockade as an approach to insulin resistance. *Expert Opin Ther Targets* , 571-9.
- Dong, H., Martin, M. V., Chambers, S., & Csernansky, J. G. (2007). Spatial relationship between synapse loss and beta-amyloid deposition in Tg2576 mice. *J. Comp. Neurol.* , 311-321.
- Drewe, J., Childs, G., & Kunze, D. (1988). Synaptic transmission between dissociated adult mammalian neurons and attached synaptic boutons. *Science* , 1810-3.
- Edwards, F., Konnerth, A., Sakmann, B., & Takasashi, T. (1989). A thin slice preparation for patch clamp recordings from neurones of the mammalian central nervous system. *Pfluger Arch* , 600-612.
- Fadool, D. A., Tucker, K., Perkins, R., Fasciani, G., Thompson, R. N., Parsons, A. D., et al. (2004). Kv1.3 channel gene-targeted deletion produces "Super-Smeller Mice" with altered glomeruli, interacting scaffolding proteins, and biophysics. *Neuron* , 389-404.
- Fadool, D. A., Tucker, K., Phillips, J. J., & Simmen, J. A. (2000). Brain insulin receptor causes activity-dependent current suppression in the olfactory bulb through multiple phosphorylation of Kv1.3. *J Neurophysiol* , 2332-48.

- Fehm, H., Perras, B., Smolnik, R., Kern, W., & Born, J. (2000). Manipulating neuropeptidergic pathways in humans: a novel approach to neuropharmacology? *Eur J Pharmacol.* , 43-54.
- Fernando, R., Albiston, A. L., & Chai, S. (2008). The insulin-regulated aminopeptidase IRAP is colocalised with GLUT4 in the mouse hippocampus-potential role in modulation of glucose uptake in neurons? *Eur J Neurosci* , 588-98.
- Frolich, L., Blum-Degen, D., Bernstein, H. G., Engelsberg, S., Humrich, J., & Laufer, S. (1998). Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease. *J. Neural Transm* , 423-438.
- Frolich, L., Blum-Degen, D., Riederer, P., & Hoyer, S. (1999). A disturbance in the neuronal insulin receptor signal transduction in sporadic Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* , 145-158.
- Garcia-Calvo, M., Leonard, R. J., Novick, J., Stevens, S. P., Schmalhofer, W., Kaczorowski, G. J., et al. (1993). Purification, Characterization, and Biosynthesis of Margatoxin, a Component of *Centruroides margaritatus* Venom That Selectively Inhibits Voltage-dependent Potassium Channels. *The Journal of Biological Chemistry* , 18866-74.
- Garcia-Osta, A., & Alberini, C. M. (2009). Amyloid beta mediates memory formation. *Learn. Mem.* , 267-272.
- Gasparini, L., & Xu, H. (2003). Potential roles of insulin and IGF-1 in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* , 404-6.
- Gasparini, L., Gouras, G. K., Wang, R., Gross, R. S., Beal, M. F., & Greengard, P. (2001). Stimulation of beta-amyloid precursor protein trafficking by insulin reduces intraneuronal beta-amyloid and requires mitogen-activated protein kinase signaling. *Journal of Neuroscience* , 2561-2570.
- Gasparini, L., Netzer, W., Greengard, P., & Xu, H. (2002). Does insulin dysfunction play a role in Alzheimer's disease? *Trends Pharmacol Sci* , 288-293.
- Gouras, G. K., Almeida, C. G., & Takahashi, R. H. (2005). Intraneuronal Abeta accumulation and origin of plaques in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* , 1235-1244.
- Gouras, G. K., Tsai, J., Naslund, J., Vincent, B., Edgar, M., Checler, F., et al. (2000). Intraneuronal Abeta42 accumulation in human brain. *Am. J. Pathol.* , 15-20.
- Grissmer, S. (1997). Potassium channels still hot. *Trends Pharmacol Sci* , 347-350.
- Grosse, G., Draguhn, A., Höhne, L., Tapp, R., Veh, R. W., & Ahnert-Hilger, G. (2000). Expression of Kv1.3 potassium channels in mouse hippocampal primary cultures: development and activity-dependent regulation. *The Journal of Neuroscience* , 1869-1882.
- Gungor, N., Hannon, T., Libman, I., Bacha, F., & Arslanian, S. (2005). Type 2 diabetes mellitus in youth the complete picture to date . *Pediatr Clin North Am* , 1579-1609.
- Gutman, G. A., Chandy, K. G., Grissmer, S., Lazdunski, M., McKinnon, D., Pardo, L. A., et al. (2005). International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and Molecular Relationships of Voltage-Gated Potassium Channels. *Pharmacological Reviews* , 473-508.
- Gyure, K. A., Durham, R., Stewart, W. F., Smialek, J. E., & Troncoso, J. C. (2001). Intraneuronal abeta-amyloid precedes development of amyloid plaques in Down syndrome. *Pathol. Lab Med.* , 489-492.

- Hamos, J. E., DeGennaro, L. J., & Drachman, D. A. (1989). Synaptic loss in Alzheimer's disease. *Neurology* , 355-361.
- Hardman, R., & Forsythe, I. (2009). Ether-à-go-go-related gene K<sup>+</sup> channels contribute to threshold excitability of mouse auditory brainstem neurons. *J Physiol* , 2487-97.
- Henquin, J. (2000). Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes* , 49, 1751-60.
- Hille, B. (1992). Pumping ions. *Science* , 742.
- Hirdes, W., Schweizer, M., Schricht, K., Guddat, S., Wulfsen, I., Bauer, C., et al. (2005). Fast erg K<sup>+</sup> currents in rat embryonic serotonergic neurones. *J Physiol* , 33-49.
- Hitze, B., Hubold, C., Van Dyken, R., Schlichting, K., Lehnert, H., Entringer, S., et al. (2010). How the selfish brain organizes its supply and demand. *Frontiers in Neuroenergetics* .
- Holsher, C., & Li, L. (2008). New roles for insulin-like hormones in neuronal signalling and protection: New hopes for novel treatments of Alzheimer's disease? *Neurobiol Aging* , 7183.
- Hoyer, S. (2004). Glucose metabolism and insulin receptor signal transduction in Alzheimer disease. *Eur. J. Pharmacol.* , 115-125.
- Hoyer, S. (2002). The aging brain. Changes in the neuronal insulin/insulin receptor signal transduction cascade trigger late-onset sporadic Alzheimer disease. *J. Neural Transm.* , 991-1002.
- Hoyer, S., & Lannert, H. (1999). Inhibition of the neuronal insulin receptor causes Alzheimer-like disturbances in oxidative/energy brain metabolism and in behavior in adult rats. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* , 301-303.
- Hoyer, S., & Nitsch, R. (1989). Cerebral excess release of neurotransmitter amino acids subsequent to reduced cerebral glucose metabolism in early-onset dementia of Alzheimer type. *J. Neural. Transm.* , 227-232.
- Hoyer, S., Lee, S. K., Loffler, T., & Schliebs, R. (2000). Inhibition of the neuronal insulin receptor. An in vivo model for sporadic Alzheimer disease? *Ann. N.Y. Acad. Sci.* , 256-258.
- Hsieh, H., Boehm, J., Sato, C., Iwatsubo, T., Tomita, T., Sisodia, S., et al. (2006). AMPAR removal underlies Aβ-induced synaptic depression and dendritic spine loss. *Neuron* , 831-843.
- Kahn, S. E. (2003). The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia* , 3-19.
- Kamenetz, F., Tomita, T., Hsieh, H., Seabrook, G., Borchelt, D., Iwatsubo, T., et al. (n.d.). APP processing and synaptic function. *Neuron* , 925-937.
- Kang, J. E., Lim, M. M., Bateman, R. J., Lee, J. J., Smyth, L. P., Cirrito, J. R., et al. (2009). Amyloid-beta dynamics are regulated by orexin and the sleep-wake cycle. *Science* , 1005-1007.
- Kay, A., & Wong, R. (1986). Isolation of neurons suitable for patch-clamping from adult mammalian central nervous systems. *J Neurosci Methods* , 227-38.
- Klee, R., Ficker, E., & Heinemann, U. (1995). Comparison of voltage-dependent potassium currents in rat pyramidal neurons acutely isolated from hippocampal regions CA1 and CA3. *J Neurophysiol* , 1982-95.

- Kupper, J., Prinz, A. A., & Fromherz, P. (2002). Recombinant Kv1.3 potassium channels stabilize tonic firing of cultured rat hippocampal neurons. *Eur J Physiol* , 541-547.
- LaFerla, F. M., Green, K. N., & Oddo, S. (2007). Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* , 499-509.
- Landreth, G. (2007). Therapeutic use of agonists of the nuclear receptor PPARgamma in Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res* , 159-164.
- Lautt, W. (2002). New paradigm for the mechanism and treatment of insulin resistance. *Proc West Pharmacol Soc* , 223-4.
- Lester-Coll, N., Rivera, E. J., Soscia, S. J., Doiron, K., Wands, J. R., & De la Monte, S. M. (2006). Intracerebral streptozotocin model of type 3 diabetes: relevance to sporadic Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* , 13-33.
- Lewis, R. S., & Cahalan, M. D. (1995). Potassium and calcium channels in lymphocytes. *Annu Rev Immunol* , 623-653.
- Li, Y., Wang, P., Xu, J., & Desir, G. (2006). Voltage-gated potassium channel Kv1.3 regulates GLUT4 trafficking to the plasma membrane via a Ca<sup>2+</sup>-dependent mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol* , 345-351.
- Lima, P. A., Vicente, M. I., Alves, F. M., Dionísio, J. C., & Costa, P. F. (2008). Insulin increases excitability via a dose-dependent dual inhibition of voltage-activated K<sup>+</sup> currents in differentiated N1E-115 neuroblastoma cells. *European Journal of Neuroscience* , 1-14.
- Lodish, H., Berk, A., Zypursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., & Darnell, J. (2000). *Molecular Cell Biology 4th Edition*.
- MacKinnon, R. (1991). Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* , 232-235.
- Marchetti, P., Dotta, F., Lauro, D., & Purrello, F. (2008). An overview of pancreatic beta-cell defects in human type 2 diabetes: implications for treatment. *Regul Pept* , 146, 4-11.
- Mayer, J. P., Zhang, F., & DiMarchi, R. D. (2007). Insulin structure and function. *Biopolymers* , 687-713.
- Meyer-Luehmann, M., Mielke, M., Spires-Jones, T. L., Stoothoff, W., Jones, P., Bacskai, B. J., et al. (n.d.). A reporter of local dendritic translocation shows plaque-related loss of neural system function in APP-transgenic mice. *Journal of Neuroscience* , 12636-12640.
- Mori, C., Spooner, E. T., Wisniewsk, K. E., Wisniewsk, T. M., Yamaguch, H., Saido, T. C., et al. (2002). Intraneuronal Aβ<sub>42</sub> accumulation in Down syndrome brain. *Amyloid* , 88-102.
- Moult, P. R., & Harvey, J. (2008). Hormonal regulation of hippocampal dendritic morphology and synaptic plasticity. *Cell Adh Migr* , 269-75.
- Nicolls, M. R. (2004). The clinical and biological relationship between Type II diabetes. *Curr. Alzheimer Res.* , 47-54.
- O'Malley, D., & Harvey, J. (2004). Insulin activates native and recombinant large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated potassium channels via a mitogen-activated protein kinase-dependent process. *Mol Pharmacol* , 1352-63.

- Oddo, S., Caccamo, A., Cheperd, J. D., Murphy, M. P., Golde, T. E., Kaye, R., et al. (2003). Tripletransgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* , 409-421.
- O'Keefe, J., & Dostrovsky, J. (1971). The hippocampus as a spatial map: preliminary evidence from unit activity in the freely moving rat. *Brain Res.* , 171-175.
- Olson, T. S., Bamberger, M. J., & Lane, M. D. (1988). Post-translational changes in tertiary and quaternary structure of the insulin proreceptor. *The Journal of Biological Chemistry* , 7342-7351.
- O'Malley, D., Shanley, L., & Harvey, J. (2003). Insulin inhibits rat hippocampal neurons via activation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> and large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. *Neuropharmacology* , 855-63.
- Papazian, D. (1999). Potassium channels: some assembly required. *Neuron* , 7-10.
- Papazian, D., Schwarz, T., Tempel, B., Jan, Y., & Jan, L. (1987). Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from Drosophila. *Science* , 749-753.
- Pasquier, F., Boulogne, A., Leys, D., & Fontaine, P. (2006). Diabetes mellitus and dementia. *Diabetes Metab.* , 403-414.
- Peters, A., Schweiger, U., Pellerin, L., Hubold, C., Oltmanns, K., Conrad, M., et al. (2004). The selfish brain: competition for energy resources. *Neuroscience and Behavioral reviews* , 143-180.
- Puzzo, D., Privitera, L., Leznik, E., Fa, M., Staniszewski, A., Palmeri, A., et al. (2008). Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. *Journal of Neuroscience* , 14537-14545.
- Raslova, K. (2010). An update on the treatment of type 1 and 2 diabetes mellitus: focus on insulin detemir, a long-acting human insulin analog. *Vascular Health and Risk Management* , 399-410.
- Reger, M. A., Watson, G. S., Green, P. S., Wilkinson, C. W., Baker, L., D., Cholerton, B., et al. (2008). Intranasal insulin improves cognition and modulates {beta}-amyloid in early AD. *Neurology* , 440-448.
- Rehm, H., & Tempel, B. (1991). Voltage-gated K<sup>+</sup> channels of the mammalian brain. *FASEB J* , 164-70.
- Rivera, E. J., Goldin, A., Fulmer, N., Tavares, R., Wands, J. R., & De la Monte, S. M. (2005). Insulin and insulin-like growth factor expression and function deteriorate with progression of Alzheimer's disease: link to brain reductions in acetylcholine. *J. Alzheimers* , 247-268.
- Robbins, J. (2001). KCNQ potassium channels: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Ther* , 1-19.
- Sacco, T., Bruno, A., Wanke, E., & Tempia, F. (2003). Functional roles of an ERG current isolated in cerebellar Purkinje neurons. *J Neurophysiol* , 1817-28.
- Saganich, M., Machado, E., & Rudy, B. (2001). Differential expression of genes encoding subthreshold-operating voltage-gated K<sup>+</sup> channels in brain. *J Neurosci* , 4609-24.

- Schubert, M., Brazil, D. P., Burks, D. J., Kushner, J. A., Ye, J., Flint, C. L., et al. (2003). Insulin receptor substrate-2 deficiency impairs brain growth and promotes tau phosphorylation. *Journal of Neuroscience* , 7084-7092.
- Schulinkamp, R., Pagano, T., Hung, D., & Raffa, R. (2000). Insulin receptors and insulin action in the brain: review and clinical implications. *Neurosci Biobehav* , 855-872.
- Selkoe, D. J. (2002). Alzheimer's disease is a synaptic failure. *European Journal of Biological Chemistry* , 35722-35732.
- Shankar, G. M., Li, S., Mehta, T. H., Garcia-Munoz, A., Shepardson, N. E., Smith, I., et al. (2008). Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat. Med.* , 837-842.
- Shieh, C., Coghlan, M., Sullivan, J., & Gopalakrishnan, M. (2000). Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. 557-94.
- Shieh, C., Feng, J., Buckner, S., Brioni, J., Coghlan, M., Sullivan, J., et al. (2001). Functional implication of spare ATP-sensitive K(+) channels in bladder smooth muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther* , 669-75.
- Snyder, E. M., Nong, Y., Almeida, C. G., Paul, S., Moran, T., Choi, E. Y., et al. (2006). Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Neuroscience* , 1051-1058.
- Spanswick, D., Smith, M., Mirshamsi, S., Routh, V., & Ashford, M. (2000). Insulin activates ATP-sensitive K+ channels in hypothalamic neurons of lean, but not obese rats. *Nat Neurosci* , 757-758.
- Steen, E., Terry, B. M., Rivera, E. J., Cannon, J. L., Neely, T. R., Tavares, R., et al. (2005). Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease— is this type 3 diabetes? *J. Alzheimers* , 63-80.
- Stern, Y. (2006). Cognitive reserve and Alzheimer disease. *Alzheimer's Dis. Assoc. Disord.* , 69-74.
- Takahashi, R. H., Almeida, C. G., Kearney, P. F., Yu, F., Lin, M. T., Milner, T. A., et al. (2004). Oligomerization of Alzheimer's beta-amyloid within processes and synapses of cultured neurons and brain. *Journal of Neuroscience* , 3592-3599.
- Takahashi, R. H., Milner, T. A., Li, F., Nam, E. E., Edgar, M. A., Yamaguchi, H., et al. (2002). Intraneuronal Alzheimer abeta42 accumulates in multivesicular bodies and is associated with synaptic pathology. *Am. J. Pathol.* , 1869-1879.
- Tampellini, D., & Gouras, G. K. (2010). Synapses, synaptic activity and intraneuronal Abeta in Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience* .
- Tampellini, D., Rahman, N., Gallo, E. F., Huang, Z., Dumont, M., Capetillo-Zarate, E., et al. (2009). Synaptic activity reduces intraneuronal Abeta promotes APP transport to synapses, and protects against Abeta-related synaptic alterations. *Journal Neuroscience* , 9704-9713.
- Terry, R. D., Masliah, E., Salmon, D. P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., et al. (1991). Physical basics of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann. Neurol.* , 572-580.

- Trinchese, F., Liu, S., Battaglia, F., Walter, S., Mathews, P. M., & Arancio, O. (2004). Progressive age-related development of Alzheimer-like pathology in APP/PS1 mice. *Ann. Neurol.* , 801-814.
- Uemura, E., & Greenlee, H. (2006). Insulin regulates neuronal glucose uptake by promoting translocation of glucose transporter GLUT3. *Experimental Neurology* , 48-53.
- Unger, J., Moss, A., & Livingston, J. (1991). Immunohistochemical localization of insulin receptors and phosphotyrosine in the brainstem of the adult rat. *Neuroscience* , 853-861.
- Vicente, M., Costa, P., & Lima, P. (2010). Galantamine inhibits slowly inactivating K<sup>+</sup> currents with a dual dose-response relationship in differentiated N1E-115 cells and in CA1 neurones. *Eur J Pharmacol* , 16-25.
- Wang, H., Pan, Z., Shi, W., Brown, B., Wymore, R., Cohen, I., et al. (1998). KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: molecular correlates of the M-channel. *Science* , 1890-3.
- Watson, G. S., & Craft, S. (2004). Modulation of memory by insulin and glucose: neuropsychological observations in Alzheimer's disease. *European Journal of Pharmacology* , 97-113.
- White, J., Sekar, N., & Kay, A. (1995). Errors in persistent inward currents generated by space-clamp errors: a modeling study. *J Neurophysiol* , 2369-77.
- Winocur, G., Greenwood, C. E., Piroli, G. G., Grillo, C. A., Reznikov, L. R., Reagan, L. P., et al. (2005). Memory impairment in obese Zucker rats: an investigation of cognitive function in an animal model of insulin resistance and obesity. *Behav. Neurosci.* , 1389-1395.
- Wirhlich, O., Multhaup, G., Czech, C., Blanchard, V., Moussaoui, S., Tremp, G., et al. (2001). Intraneuronal Aβ accumulation precedes plaque formation in beta-amyloid precursor protein and presenilin-1 double-transgenic mice. *Neurosci. Lett.* , 116-120.
- Wong, R., & Traub, R. (1983). Synchronized burst discharge in disinhibited hippocampal slice. I. Initiation in CA2-CA3 region. *J Neurophysiol* , 442-58.
- Woods, S., Lotter, E., McKay, L., & Porte, D. J. (1979). Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature* , 503-505.
- Xing, C., Yin, Y., & Xie, Z. (2006). Effects of insulin-like growth factor 1 on voltage-gated ion channels in cultured rat hippocampal neurons. *Brain Res* , 30-35.
- Xing, C., Yin, Y., Chang, R., Gong, X., He, X., & Xie, Z. (2007). Effects of insulin-like growth factor 1 on synaptic excitability in cultured rat hippocampal neurons. *Exp Neurol* , 222-229.
- Xu, J., Wang, P., Li, Y., Kaczmarek, L., Wu, Y., Koni, P., et al. (2004). The voltage-gated potassium channel Kv1.3 regulates peripheral insulin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA* , 3112-7.
- Zhao, W., & Alkon, D. (2001). Role of insulin and insulin receptor in learning and memory. *Mol Cell Endocrinol* , 125-134.
- Zhao, W.-Q., Chen, H., XU, H., Moore, E., Meiri, N., Quon, M. J., et al. (1999). Correlated changes in gene expression, tyrosine phosphorylation, and signaling molecules in the hippocampus of water maze trained rats. *Journal of Biological Chemistry* , 34893-34902.

Zhao, W.-Q., De Felice, F. G., Fernandez, S., Chen, H., Lambert, M. P., Quon, M. J., et al. (2008). Amyloid beta oligomers induce impairment of neuronal insulin receptors. *The FASEB Journal*, 246-260.

## VII. Apêndice

## VII. Apêndice

### 1. Obtenção de células piramidais da zona CA1 do hipocampo

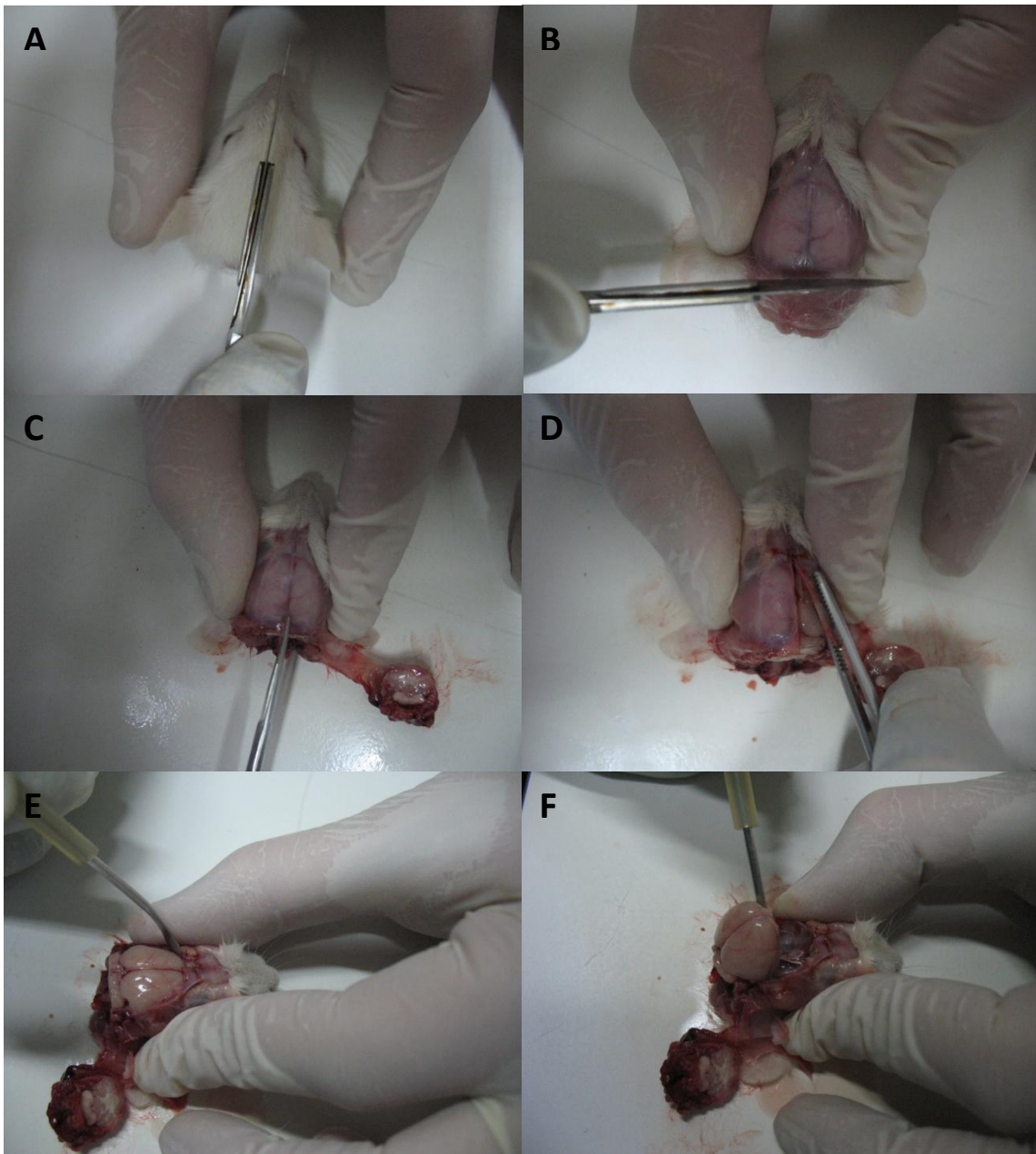
Seguidamente descreve-se o método pelo qual foram obtidas as células piramidais isoladas da região CA1 do hipocampo de ratos *wistar*. Estas células foram utilizadas quer nas experiências de electrofisiologia, quer nas experiências de imunocitoquímica e o método utilizado para a sua obtenção foi o mesmo.

#### 1.1. Remoção do cérebro

A Figura 8.1 demonstra os passos principais para remover o cérebro do rato. Após decapitar o animal, o crânio era segurado entre o polegar e o indicador, fazendo-se de seguida um corte longitudinal ao longo do escalpe com um bisturi. Este corte deve ser feito na direcção caudal e serve para remover a pele e o pêlo, deixando os ossos do crânio à vista. Seguidamente era efectuado um corte na região anterior perpendicular ao precedente permitindo desta forma remover o osso interparietal, possibilitando assim, o acesso ao cérebro. Posteriormente, introduzia-se uma tesoura de pontas finas no buraco occipital, fazendo uma incisão ao longo das suturas occipito-interparietal e temporo-parietal. Os ossos frontais eram então cortados um pouco à frente da sutura coronal e acima do bolbo olfactivo, permitindo assim, expor o córtex cerebral. Com uma pinça devem-se retirar os ossos parietais como uma única peça. Feito isto, o córtex devia ser humedecido com solução salina de dissecação (KREBS dissecação) e caso as meninges não tivessem sido removidas, seriam então retiradas com uma pinça de pontas finas. Utilizando um bisturi, separavam-se os hemisférios ao longo da fissura longitudinal e utilizando uma espátula curva, o cérebro era removido da caixa craniana para um gobelé contendo KREBS de dissecação a uma temperatura de aproximadamente 4°C.

Esta solução era previamente saturada em carbogéneo (95% de oxigénio e 5% de dióxido de carbono). Realizar a preparação a uma temperatura baixa é importante, uma vez que, desta forma, diminui-se a taxa de metabolismo durante todo o tempo em que ocorre lesão, torna-se mais robusta a consistência do tecido, o que facilita a dissecação e, por último, aumenta-se a viabilidade da preparação, bem como a solubilidade do oxigénio na solução de KREBS.

Este processo deveria ser realizado o mais rápido possível e não ultrapassava os dois minutos.



**Figura 8.1** – Sequência fotográfica que evidencia os principais passos na remoção do cérebro do rato. A) O escalpe é cortado ao longo da linha média na direcção caudal; B) Corte perpendicular a A para facilitar o acesso ao córtex; C) Tesoura inserida no buraco occipital e a caixa craniana é cortada ao longo da linha média; D) Pinça permite a remoção do osso como uma única peça; E-F) Espátula curva permite separar os hemisférios cerebrais do tronco cerebral e do bulbo olfativo, possibilitando assim a sua transferência.

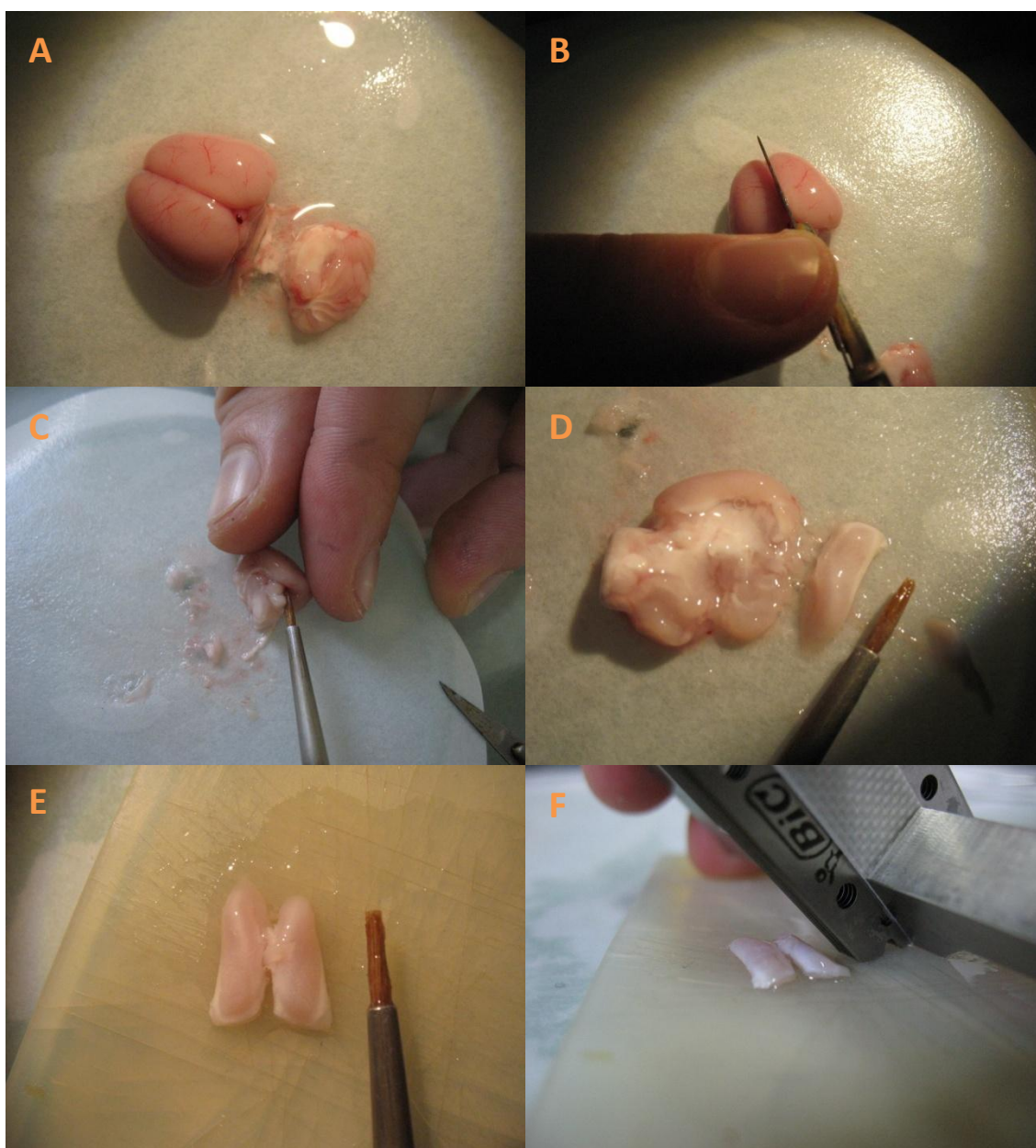
### 1.2. Extracção do hipocampo e obtenção de fatias de hipocampo

A Figura 8.2 evidencia os passos principais para a dissecação do hipocampo. A dissecação dos hipocampos era realizada separadamente, ou seja, primeiro realizava-se num hemisfério e depois no outro. Assim, um hemisfério era retirado do gobelé com KREBS de dissecação e colocado numa caixa de petri contendo gelo e coberta por um papel de filtro. Seguidamente, procedia-se ao correcto posicionamento do hemisfério cerebral, ou seja, com a face dorsal apoiada no plano de suporte e a face mediana exposta. Posteriormente, era

inserida uma espátula curva através do terceiro ventrículo e a região do tálamo e do hipotálamo era rebatida para a frente, desvendando desta forma a face ventral do hipocampo. A introdução de uma espátula com a face côncava virada para cima no ventrículo lateral, entre o córtex e a face dorsal do hipocampo, sincronizada com a aplicação de pressão no tecido contra os dedos nas suas extremidades septal e temporal, libertava o hipocampo nas suas faces anterior e posterior. Em seguida, cortava-se o fornix pré-comissural e seguindo a fímbria rebatia-se o hipocampo sob a sua face interna com o auxílio de um pincel fino. O isolamento do hipocampo terminava com um corte ao longo do bordo postero-interior, separando-o do córtex entorrinal adjacente.

Após o isolamento, o hipocampo era transferido para a superfície de corte (constituída por uma placa de silicone mole com uma gota de solução de dissecação fria) com a face convexa para cima. Este posicionamento é importante de modo a reduzir os danos na zona CA1 aquando do corte das fatias. Sempre que possível, eram utilizados os dois hipocampos, no entanto, à mínima suspeita de dano, o mesmo era descartado, minimizando desta forma possíveis problemas/contaminações celulares. Seguia-se o corte das fatias transversais com cerca de 500 $\mu$ m de espessura, para tal, deveria colocar-se o conjunto de corte sobre o terço médio de cada hipocampo, assumindo o primeiro uma posição perpendicular em relação ao eixo longitudinal do segundo, de acordo com a literatura, este é o corte que melhor preserva a estrutura laminar da rede neural. Este conjunto de corte consistia num agregado composto por um número variável de lâminas de barbear e pequenos separadores rígidos com 500 $\mu$ m de espessura, montados alternadamente, como um pente, num suporte adequado.

Normalmente eram cortadas seis fatias de cada hipocampo, sendo estas retiradas cautelosamente do sistema de corte com um pincel fino e embebido em KREBS de dissecação e meticulosamente transferidas para uma caixa de petri com o fundo revestido por uma borracha de silicone (Silgard) e humedecida com KREBS. A espessura das fatias é de fulcral importância neste passo, visto que, por um lado, deverá ser grande o suficiente para manter o maior número possível de processos celulares, por outro lado, deverá ser pequena de forma a permitir a difusão de oxigénio para o seu interior e facilitar o acesso dos enzimas. Seguidamente, as secções correspondentes à região CA1 do hipocampo eram cortadas, mantendo as fatias na placa.

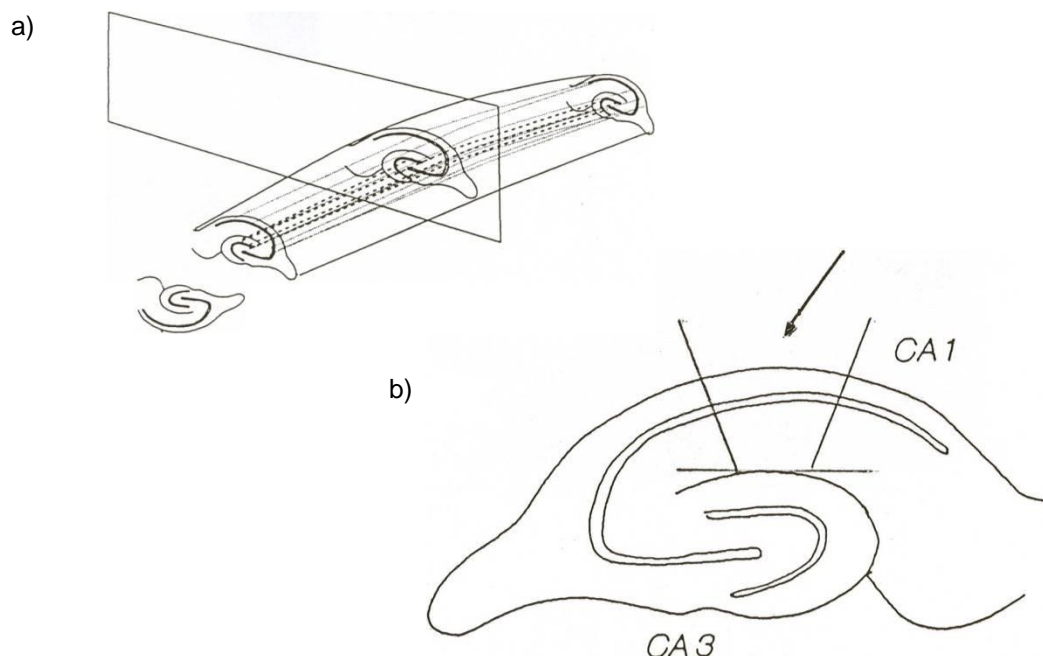


**Figura 8.2** – Sequência fotográfica que evidencia a dissecação do hipocampo do cérebro. A) O cerebelo, caso exista, é cortado; B) Os hemisférios cerebrais são separados através de um corte ao longo da fissura longitudinal; C) Espátula curva inserida no terceiro ventrículo permite rebater o tálamo e o hipotálamo, expondo o hipocampo; D) Hipocampo isolado; E) Hipocampos sob a superfície de corte com a fase convexa exposta; F) Posicionamento do conjunto de corte relativamente aos hipocampos.

Estas secções ou sub-fatias (Figura 8.3) possuíam cerca de  $2\text{mm}^2$  e eram separadas através de dois golpes laterais na fatia, perpendiculares ao seu eixo longitudinal, de ambos os lados da porção média da região CA1 e de um terceiro corte desferido imediatamente acima da fissura do hipocampo e perpendicular aos anteriores. Todos estes cortes eram realizados com um bisturi. Depois de cortadas as sub-fatias dava-se por terminada a fase de dissecação, tendo levado todo o processo cerca de cinco a dez minutos.

De notar que quanto mais rápida for a transferência do tecido para a câmara de incubação, mais saudável o tecido estaria, uma vez que uma preparação rápida resulta numa

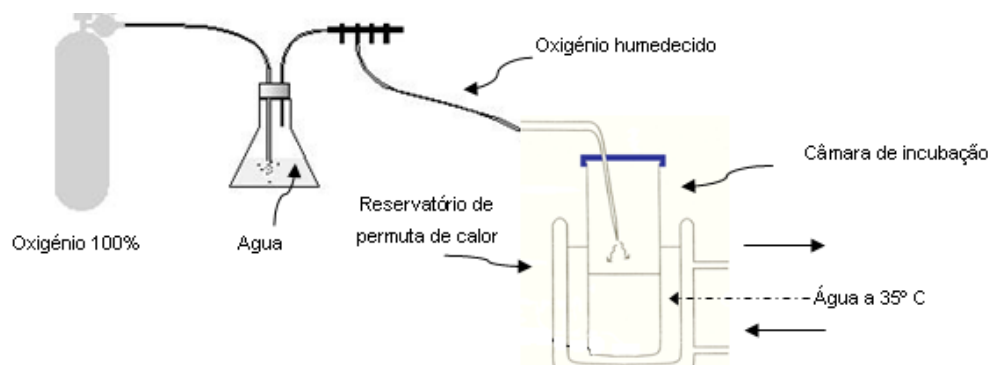
menor probabilidade de lesionar o tecido por anoxia. Tão importante como o tempo de preparação é o cuidado dispendido na manipulação, visto que o mínimo trauma provocado durante a dissecação não só prejudica a rentabilidade da preparação como também produz actividade anómala ou subnormal no registo das correntes.



**Figura 8.3-** Esquema do sistema usado no corte das fatias a) e das sub-fatias b) de hipocampo para a obtenção de células isoladas.

### 1.3. Dissociação das células do hipocampo

A dissociação das células é composta por duas fases, uma primeira na qual as células são incubadas numa solução enzimática, correspondendo esta a uma dissociação química, e uma segunda fase na qual ocorre dissociação mecânica, (Kay e Wong, 1986). As sub-fatias obtidas durante a fase de dissecação transferiram-se para uma câmara de incubação, um copo de vidro de parede dupla. Entre estas paredes circulava água proveniente de um banho-maria exterior, a 35° C. Dentro deste copo mergulhava-se a câmara de incubação propriamente dita, um pequeno frasco, contendo 10mL de KREBS de dissociação e tripsina a uma concentração de 0,6mg/mL (*Sigma-Aldrich – tipo XI*). Esta câmara recebia continuamente um influxo de oxigénio puro (*Gasin*) humedecido, permitindo deste modo a oxigenação constante das sub-fatias (Figura 8.4).



**Figura 8.4-** Esquema do sistema usado para a incubação das sub-fatias de hipocampo para a obtenção de células isoladas. A câmara de incubação é constituída por um copo de parede dupla entre as quais circula água a uma temperatura de aproximadamente 35°C. Esta água provem de um banho-maria externo. Mergulhado parcialmente neste copo encontra-se um pequeno frasco com 10mL de KREBS de dissociação. Colocada por baixo do copo encontra-se uma placa de agitação magnética que induz a rotação de um pequeno agitador no interior do frasco de dissociação. À superfície da solução de dissociação faz-se incidir um jacto de oxigénio humedecido, tendo o cuidado de não o fazer borbulhar muito, uma vez que as bolhas de oxigénio podem danificar as células.

Este sistema além de manter a solução de dissociação em equilíbrio térmico com o banho-maria externo e a sua contínua oxigenação, garante uma oxigenação constante durante todo o período de acção enzimática (geralmente 45min). Após este período de incubação, as sub-fatias que mantinham a sua estrutura intacta transferiam-se para outro frasco contendo solução de digestão sem enzima e à temperatura ambiente, parando, deste modo, a dissociação enzimática. Este frasco também estava a receber continuamente um influxo de oxigénio puro humedecido, permitindo desta forma que as sub-fatias permanecessem viáveis durante um longo período de tempo (6 a 8 horas).

Finalizada a digestão enzimática, as células piramidais isoladas eram obtidas por dissociação mecânica das sub-fatias, à medida da necessidade. Para o efeito, transferia-se uma sub-fatia para um tubo *ependorf* de 1,5mL de capacidade contendo solução de dissociação e esta era forçada a passar repetidamente por pipetas de Pasteur com diâmetros de pontas variáveis entre 1,0 e 2,0mm. Este trabalho realizava-se começando pela pipeta com maior diâmetro e terminando na menor. Durante o processo, o tecido ia-se fragmentando lenta e progressivamente, fracturando-se quase sempre pela camada piramidal. Quando se deixava de sentir atrito à passagem do tecido pela ponta de uma determinada pipeta, mudava-se para a de diâmetro inferior imediatamente a seguir. Ao longo do processo era de vital importância impedir a formação de bolhas, uma vez que a sua formação poderia provocar perturbações mecânicas ou isolar o tecido da solução, originando assim uma situação de anóxia. Terminada a dissociação mecânica, deixava-se repousar a mistura durante algum tempo, cerca de 20 a 30s, após os quais a solução sobrenadante, contendo as células piramidais isoladas e livre dos pedaços de tecido de maiores dimensões, que se agregavam no fundo do tubo, era transferida para uma caixa de Petri (*Nunc*) com 3cm de diâmetro e contendo cerca de 2mL de solução de perfusão, na qual se iria proceder aos registos.

A dissociação mecânica das sub-fatias pré-tratadas enzimaticamente correspondia a outra fase crítica do processo, dado que qualquer alteração no processo determinaria o rendimento da colheita e sobretudo a qualidade da preparação.