



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Estudo de alterações na atividade enzimática e/ou expressão da Na,K-ATPase na Diabetes tipo 2: resultados obtidos num modelo animal da doença.

Cátia Patrícia Arcado Roque

Orientação: Prof^a. Doutora Ana R. Costa

Prof^a. Doutora Célia M. Antunes

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Évora, 2014

“Dictionary is the only place that success comes before work.”

Vince Lombardi

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer, em primeiro lugar, às entidades financiadoras que contribuíram para a execução deste trabalho, sem as quais o mesmo não teria sido realizado, nomeadamente, ao Departamento de Química da Universidade de Évora, ao Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrâneas (ICAAM), bem como, ao Centro de Neurociências e Biologia Celular (CNC).

Em segundo lugar, agradeço à Professora Doutora Ana Costa, por traçar comigo este caminho, que não se cinge apenas à duração do estágio realizado para esta tese de mestrado, mas sim às inúmeras horas que, presencialmente e via correio eletrónico, contámos juntas. Esse tempo foi muito mais do que trabalho, esse tempo foi ajuda, foi companheirismo, foi amparo, foi segurança e foi, acima de tudo, força e coragem de uma orientadora inigualável. Quero agradecer também à Professora Doutora Célia Antunes, pela experiência, pela orientação, por todos os conhecimentos teóricos que me transmitiu, pela forma como direcionou o estruturar e organizar dos dados deste trabalho e por toda a envolvimento com que me ajudou a concluir o mesmo. Agradeço ainda ao Professor Doutor Fernando Capela, pela acessibilidade e por todo o tempo disponibilizado, pelos conhecimentos de histologia e fisiologia de tecidos, sem os quais este trabalho não estaria completo.

Aos meus pais. Pilares insubstituíveis da minha vida, que como ninguém me apoiaram, que como ninguém me aplaudiram nos bons momentos, mas que acima de tudo, como ninguém me ajudaram a erguer nos momentos mais complicados. Sempre. A postura, a educação e a pessoa que hoje sou, devo-a a eles... Meu incondicional porto de abrigo. Este mestrado é tanto deles como meu!

Ao meu irmão, Vítor Roque. Aos meus avós paternos e maternos. A toda a minha família... Todos eles são uma referência e cada um, ao seu jeito, tem um papel fundamental e imprescindível neste meu percurso académico.

Ao meu namorado, Lino Malhão. Pela força, coragem e indescritível compreensão... Pela preocupação, pelo ombro amigo, por fazer, inevitavelmente, vir ao de cima, o que de melhor há em mim. Obrigado por me fazeres estar num mundo melhor.

À Rita Nunes. Pela amizade, pelo partilhar de uma licenciatura e de um mestrado e de todos os momentos académicos vividos. Por seres quem estive lá, sempre... até ao fim. A todos os meus amigos.

Quero agradecer ainda, à Universidade de Évora, enquanto estabelecimento onde me licenciiei e onde me proponho a concluir o mestrado em Bioquímica, instituição que me abraçou durante estes cinco anos e que me permitiu formar-me enquanto estudante e pessoa.

ÍNDICE

CONTEÚDO

Agradecimentos.....	v
Índice	vii
Lista de tabelas	x
Lista de figuras.....	xi
Abreviaturas	xiii
Unidades.....	xvi
Resumo.....	xvii
Abstract.....	xviii
1. Introdução teórica	1
1.1. Na,K-ATPase: Função, estrutura e regulação.....	2
1.1.1. Breve descrição e função da Na,K-ATPase	2
1.1.2. Estrutura da Na,K-ATPase.....	4
1.1.3. Regulação da Na,K-ATPase	9
1.2. A Na,K-ATPase nos diversos tecidos	14
1.2.1. Tecido nervoso.....	14
1.2.1.1. Fisiologia do tecido nervoso.....	14
1.2.1.2. Papel da Na,K-ATPase na fisiologia do tecido nervoso.....	18
1.2.2. Tecido hepático	19
1.2.2.1. Fisiologia do tecido hepático.....	19
1.2.2.2. Papel da Na,K-ATPase na fisiologia do tecido hepático.....	20
1.2.3. Tecido renal	21
1.2.3.1. Fisiologia do tecido renal.....	21
1.2.3.2. Papel da Na,K-ATPase na fisiologia do tecido renal.....	22
1.2.4. Tecido cardíaco.....	24
1.2.4.1. Fisiologia do tecido cardíaco	24
1.2.4.2. Papel da Na,K-ATPase na fisiologia do tecido cardíaco.....	25
1.3. A Na,K-ATPase na DT2	27
1.3.1. DT2	27
1.3.2. Evidências de alterações da Na,K-ATPase descritas na DT2	29
1.3.3. Modelos animais da patologia	32
2. Projeto	35
2.1. Problemática	36

2.2. Objetivos	37
2.3. Estratégia experimental	38
2.4. Organigrama.....	40
3. Materiais e métodos.....	41
3.1. Reagentes e soluções	42
3.2. Modelo animal	43
3.3. Procedimento experimental	44
3.3.1. Preparação de frações celulares enriquecidas em sinaptossomas	44
3.3.2. Preparação de frações celulares enriquecidas em membranas	44
3.3.3. Determinação da concentração de proteína (Método de <i>Bradford</i>).....	45
3.3.3.1. Preparação dos padrões de BSA	45
3.3.3.2. Preparação das diluições das amostras	45
3.3.3.3. Determinação da concentração de proteína da fração preparada	46
3.3.4. Ensaio de atividade enzimática da Na,K-ATPase	47
3.3.4.1. Elaboração de uma curva de calibração para Fosfato inorgânico (<i>P_i</i>)	47
3.3.4.2. Determinação da atividade da Na,K-ATPase.....	48
3.3.5. <i>Western Blot</i>	49
3.3.5.1. Preparação das amostras	49
3.3.5.2. Eletroforese SDS-PAGE.....	50
3.3.5.3. Transferência eletroforética	51
3.3.5.4. Imunodeteção	53
3.3.5.5. Remarcação das membranas – “Stripping”	54
3.3.6. Imuno-histoquímica.....	55
3.4. Análise dos resultados	58
3.4.1. Análise dos blots	58
3.4.2. Análise das fotomicrografias	58
3.4.3. Análise estatística.....	58
4. Resultados.....	59
4.1. Atividade enzimática da Na,K-ATPase.....	60
4.2. Avaliação da expressão isoenzimática da Na,K-ATPase.....	62
4.2.1. Avaliação da expressão por <i>Western Blot</i>	63
4.2.1.1. Otimização da técnica	64
4.2.1.2. Resultados da aplicação da metodologia otimizada para <i>Western Blot</i>	68
4.2.2. Avaliação da localização “ <i>in situ</i> ” das isoformas da subunidade alfa da Na,K-ATPase nos diferentes tecidos.....	70

5. Discussão	74
6. Conclusão.....	79
7. Referências bibliográficas	81
8. Anexos.....	92
8.1. Reagentes.....	93
8.2. Material e equipamento.....	96
8.3. Soluções.....	97
8.4. Figuras complementares.....	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características cinéticas das isoenzimas da Na,K-ATPase de rato expressas em células Sf-9 de inseto.	8
Tabela 2: Resumo das principais alterações, em modelos de diabetes, de atividade e/ou expressão isoenzimática da Na,K-ATPase, em diferentes tecidos ou órgãos.....	30
Tabela 3: Esquema das soluções e respectivas composições utilizadas no procedimento experimental.....	42
Tabela 4: Esquema das soluções usadas no ensaio de atividade enzimática da Na,K-ATPase. .	49
Tabela 5: Tabela comparativa de alterações de atividade e expressão isoenzimática das isoformas $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$ da Na,K-ATPase, em rim, fígado, cérebro e coração.....	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura das P-ATPases (A: SERCA; B: Na,K-ATPase; C: H,K-ATPase (modelo); D: H-ATPase).....	2
Figura 2: Representação do ciclo funcional da Na,K-ATPase.....	3
Figura 3: Representação da organização e distribuição das subunidades da Na,K-ATPase na membrana plasmática.	5
Figura 4: Representação esquemática do processo de transdução de sinal mediado pela ligação de CTS à Na,K-ATPase – hipótese do signalossoma da Na,K-ATPase.....	12
Figura 5: Mecanismos de regulação da Na,K-ATPase (NKA), mediada pela insulina – Ativação pela concentração intracelular de Na ⁺ ([Na ⁺] _i), aumento da sensibilidade/afinidade à [Na ⁺] _i , fosforilação/desfosforilação e biossíntese da NKA.	13
Figura 6: Organização do cérebro nos diferentes lóbulos.....	16
Figura 7: Esquema da constituição típica de um neurónio.....	17
Figura 8: Representação da condução do potencial de ação.....	18
Figura 9: Representação esquemática da estrutura de um lóbulo hepático.....	20
Figura 10: Estrutura esquemática de um rim humano.....	21
Figura 11: Diagrama do nefrónio.....	22
Figura 12: Esquema representativo da relação da Na,K-ATPase com o transporte de solutos em 1: Células do túbulo proximal; 2: Células do canal ascendente medular; 3: Células do túbulo coletor principal.....	23
Figura 13: Histologia do músculo cardíaco.	25
Figura 14: Diagrama esquemático do movimento do cálcio no acoplamento excitação- contração do músculo cardíaco.	26
Figura 15: Provas de tolerância à glucose por via oral (PTGO) de ratos Wistar e GK com idades diferentes.....	33
Figura 16: Insulinemia em jejum de ratos Wistar e GK com 4 ^a . e 12 ^a . semanas de vida.....	34
Figura 17: Esquema representativo da preparação dos padrões de BSA.....	45
Figura 18: Esquema representativo da preparação das diluições das amostras.....	46
Figura 19: Representação das alterações estruturais do reagente de Bradford na presença de proteínas, reação esta que é utilizada para determinação da concentração proteica.	46
Figura 20: Exemplo de curva de calibração para quantificação de proteína pelo método de Bradford.....	47
Figura 21: Exemplo de curva de calibração para quantificação de Pi, de acordo com o método colorimétrico desenvolvido por Taussky and Shorr (1953).....	48
Figura 22: Esquema representativo da preparação das amostras para a corrida eletroforética.	50
Figura 23: Esquema representativo da preparação do gel.....	51
Figura 24: Esquema representativo da eletroforese SDS-PAGE.....	51
Figura 25: Esquema representativo da transferência eletroforética.....	52
Figura 26: Esquema representativo dos procedimentos de imunodeteção.	53
Figura 27: Representação do procedimento de imuno-histoquímica.....	56
Figura 28: Representação da atividade enzimática total, insensível à ouabaína e da Na,K-ATPase, respetivamente, em ratos controlo e GK, em rim, fígado, cérebro e coração. Resultados	

representativos da média \pm desvio padrão de um conjunto de cinco determinações de atividade por cada amostra de controlo e GK.....	60
Figura 29: Determinação da atividade enzimática da Na,K-ATPase individual e média, em ratos controlo e GK, em rim, fígado, cérebro e coração, respetivamente. Resultados representativos da média \pm epm de um conjunto de animais por cada grupo.....	61
Figura 30: Estudos de otimização do método de análise da expressão isoenzimática da Na,K-ATPase por Western Blot (*: Rim; +: Coração).....	66
Figura 31: Quantificação da intensidade das bandas da Na,K-ATPase em amostras de rim obtidas por Western Blot em função da concentração de proteína.....	67
Figura 32: Avaliação da expressão da isoforma $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$ -NKA em amostras controlo e GK de rim.....	68
Figura 33: Avaliação da expressão da isoforma $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$ -NKA em amostras controlo e GK de fígado.	69
Figura 34: Avaliação da expressão da isoforma $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$ -NKA em amostras controlo e GK de cérebro.....	69
Figura 35: Avaliação da expressão da isoforma $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$ -NKA em amostras controlo e GK de coração.....	70
Figura 36: Análise qualitativa da expressão imuno-histoquímica das isoformas $\alpha 1$ e $\alpha 2$ da Na,K-ATPase em secções de rim, fígado e coração, de ratos controlo.	71
Figura 37: Análise qualitativa da expressão imuno-histoquímica das isoformas $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$ da Na,K-ATPase em secções de cérebro, de ratos controlo.	72
Figura 38: Representação da expressão e determinação da massa molecular (kDa) da isoforma $\alpha 1$ -Na,K-ATPase e respetiva α -tubulina, da membrana com amostras controlo e GK de rim.	99
Figura 39: Representação da expressão e determinação da massa molecular (kDa) da isoforma $\alpha 2$ e $\alpha 3$ -Na,K-ATPase e respetiva α -tubulina, da membrana com amostras controlo e GK de rim.	99

ABREVIATURAS

Na seguinte lista encontram-se enumeradas as abreviaturas, acrónimos, estrangeirismos e respetiva tradução utilizados ao longo deste trabalho.

Acril/Bis	Acrilamida/Bisacrilamida
ANOVA	Análise de variância
APS	Persulfato de amónio
ATP	5'-trifosfato de adenosina (do inglês: <i>Adenosine triphosphate</i>)
BSA	Albumina de soro bovino (do inglês: <i>Bovine serum albumin</i>)
cAMP	5'-Monofosfato de adenosina cíclica (do inglês: <i>Cyclic Adenosine monophosphate</i>)
cAMP-PK	Proteína cinase dependente de cAMP
CTS	Esteróides cardiotónicos (do inglês: <i>Cardiotonic steroids</i>)
DAB	Diaminobenzidina
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
DT1	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1
DT2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
DTT	Di-tiotreitól
EDTA	Ácido etilenodiamino-tetra-acético
EGF-R	Recetor do fator de crescimento epitelial
Erk 1/2	Cinase regulada por sinais extracelulares 1/2 (do inglês: <i>Extracellular-signal-regulated kinase 1/2</i>)
FFA	Ácidos gordos livres (do inglês: <i>Plasma free fatty acid</i>)
FXFD	Família de pequenas proteínas de membrana que têm em comum uma sequência de 35 aminoácidos que se inicia com a sequência PFXFD e que contém 7 aminoácidos invariantes e 6 muito conservados
GK	Ratos Goto-Kakizaki
g_k	Condutância de K ⁺

g_{Na}	Condutância de Na^+
HEPES	Ácido N-[2-hidroxiethyl] piperazina-N'-[2-etanossulfônico] (do inglês: <i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>)
HGP	Produção hepática de glucose
<i>Housekeeping</i>	Corresponde ao desempenho de funções constitutivas
HRP	Peroxidase de rábano (do inglês: <i>Horseradish peroxidase</i>)
IHC	Imuno-histoquímica
I_k	Corrente de K^+
$I_{máx}$	Corrente iônica máxima
I_{Na}	Corrente de Na^+
IP₃R	Recetor do IP ₃
K_i	Constante de inibição
K_m	Constante de Michaelis
LCR	Líquido cefalorraquidiano
<i>Loop</i>	Zona da sequência peptídica sem estrutura secundária definida que liga segmentos com estrutura secundária definida
MBG	Marinobufagenina
mRNA	RNA mensageiro
Na,K-ATPase	Adenosina trifosfatase estimulada por Na^+ e K^+
PBS	Tampão fosfato salino (do inglês: <i>Phosphate buffered saline</i>)
PBS-T	Tampão fosfato salino com <i>Tween</i> (do inglês: <i>Phosphate buffered saline with tween</i>)
PHSF	Fluoreto de fenilmetilo
P_i	Fosfato inorgânico
PI3K	Fosfoinositídeo-3-cinase (do inglês: <i>Phosphoinositide 3-Kinase</i>)
PLC	Fosfolipase C
PKA	Proteína cinase A (do inglês: <i>Protein kinase A</i>)

PKC	Proteína cinase C (do inglês: <i>Protein kinase C</i>)
PTGO	Provas de tolerância à glucose por via oral
PVDF	Difluoreto de polivinilideno (do inglês: <i>Polyvinylidene difluoride</i>)
RMP	Potencial de repouso da membrana
RS	Retículo sarcoplasmático
SB	Substância branca
SC	Substância cinzenta
SDS	Duodecil Sulfato de Sódio (do inglês: <i>Sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com duodecil sulfato de sódio (do inglês: <i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SERCA	Adenosina trifosfatase transportadora de Ca ²⁺ do retículo sarcoplasmático (do inglês: <i>Sarcoplasmic reticulum calcium pump</i>)
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
Src	Proteína tirosina cinase
STZ	Estreptozotocina
TBS	Tampão salino Tris-HCl (do inglês: <i>Tris-HCl buffer saline</i>)
TBS-T	Tampão salino Tris-HCl com <i>Tween</i> (do inglês: <i>Tris-HCl buffer saline with tween</i>)
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina
Tm	Capacidade máxima tubular de reabsorção renal
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
UA	Unidades arbitrárias

UNIDADES

Na seguinte lista encontram-se enumeradas as principais grandezas e unidades utilizadas ao longo deste trabalho.

%	Porcentagem
°C	Graus celsius
A; mA; nA	Ampere; miliamperes (10^{-3} A); nanoamperes (10^{-9} A)
m; cm; μm	Metro; centímetro (10^{-3} m); micrómetro (10^{-6} m)
Da; kDa	Dalton; quilo-Dalton (10^3 Da)
g	Velocidade gravitacional
g; mg; μg	Gramas; miligrama (10^{-3} g); micrograma (10^{-6} g)
h	Hora
L; mL; μL	Litro; mililitro (10^{-3} L); microlitro (10^{-6} L)
M; mM; μM	Molar (mole/dm³); milimolar (10^{-3} M); micromolar (10^{-6} M)
min	Minuto
MM	Massa molecular
N	Normalidade
nm	Nanómetros
nmol	Nanomol (10^{-9} mole)
s; ms; ns	Segundo; milisegundo (10^{-3} s); nanosegundos (10^{-9} s)
V; mV	Volt; milivoltes (10^{-3} V)
W	Watt

RESUMO

Alterações de atividade, expressão isoenzimática e/ou número de unidades da Na,K-ATPase, têm sido associadas à diabetes, com resultados contraditórios, provavelmente devido aos modelos de diabetes usados.

O principal objetivo deste trabalho foi investigar possíveis alterações na atividade/expressão da Na,K-ATPase em cérebro, rim, coração e fígado, em ratos espontaneamente diabéticos (Goto-Kakizaki, GK), modelo da diabetes tipo-2 (DT2).

Os resultados mostraram alterações na expressão e atividade da Na,K-ATPase em tecidos específicos. Embora pareça existir associação entre a atividade da bomba e a expressão da isoforma- $\alpha 1$, não é claro se as alterações de expressão são um fator-chave para a diferença de atividade da Na,K-ATPase.

Estes resultados demonstram que alterações na atividade e/ou expressão isoenzimática da Na,K-ATPase em cérebro, rim, coração e fígado de GK, podem contribuir para consequências associadas à DT2. Este trabalho destaca a relevância de uma investigação mais aprofundada sobre a regulação e o papel da Na,K-ATPase na fisiopatologia da DT2.

ABSTRACT

Changes associated with Na,K-ATPase in brain, kidney, heart and liver of the spontaneously diabetic Goto-Kakizaki rat

Alterations in Na,K-ATPase activity, isoenzyme expression and/or number of pump units in the plasma membrane have been associated with diabetes, with contradictory results probably resulting from the model of diabetes used.

The major goal of this work was to investigate putative modifications in Na,K-ATPase enzymatic activity or expression in brain, kidney, heart and liver from spontaneously diabetic rats (Goto-Kakizaki), an animal model of type-2 diabetes (T2D).

Our results have shown tissue specific changes in Na,K-ATPase expression and activity. Although, an association between pump activity and $\alpha 1$ -expression is apparent, it is unclear whether the changes in isoenzyme expression is a key factor for differential Na,K-ATPase activity.

These results have uncover changes in Na,K-ATPase activity and/or enzymatic expression in GK brain, kidney, heart and liver that may contribute to the undesirable conditions associated with T2D. This work highlight the relevance of further investigation about Na,K-ATPase regulation and role in physiopathology of T2D.

1. INTRODUÇÃO TEÓRICA

1.1. Na,K-ATPASE: FUNÇÃO, ESTRUTURA E REGULAÇÃO

1.1.1. BREVE DESCRIÇÃO E FUNÇÃO DA Na,K-ATPASE

A adenosina trifosfatase estimulada por sódio (Na^+) e potássio (K^+) (Na,K-ATPase ou bomba de Na^+ e K^+ , (E.C. 3.6.3.9.)) é uma proteína intrínseca de membrana que realiza o transporte de íões Na^+ e K^+ contra os seus gradientes de concentração transmembranares, à custa da hidrólise de 5'-trifosfato de adenosina (ATP) (Siddiqui et al. 2006; Tsimaratos et al. 2001). Exerce um papel fundamental na função celular, garantindo um adequado gradiente de Na^+/K^+ transmembranar que é crucial para a vitalidade da célula, na manutenção do equilíbrio osmótico celular, no potencial de membrana basal da maior parte dos tecidos e é essencial para a transmissão nervosa e contração muscular, excitabilidade e muitas outras funções celulares. Por estas razões, a Na,K-ATPase desempenha um papel fundamental na manutenção dos fluídos corporais e na homeostasia eletrolítica (Bagrov, Shapiro, and Fedorova 2009; Blanco and Mercer 1998).

Além do transporte de cátions, a Na,K-ATPase permite ainda o restabelecimento das condições de repouso nas células excitáveis, bem como o transporte de metabolitos e nutrientes (Läuger 1979; Yatime et al. 2011).

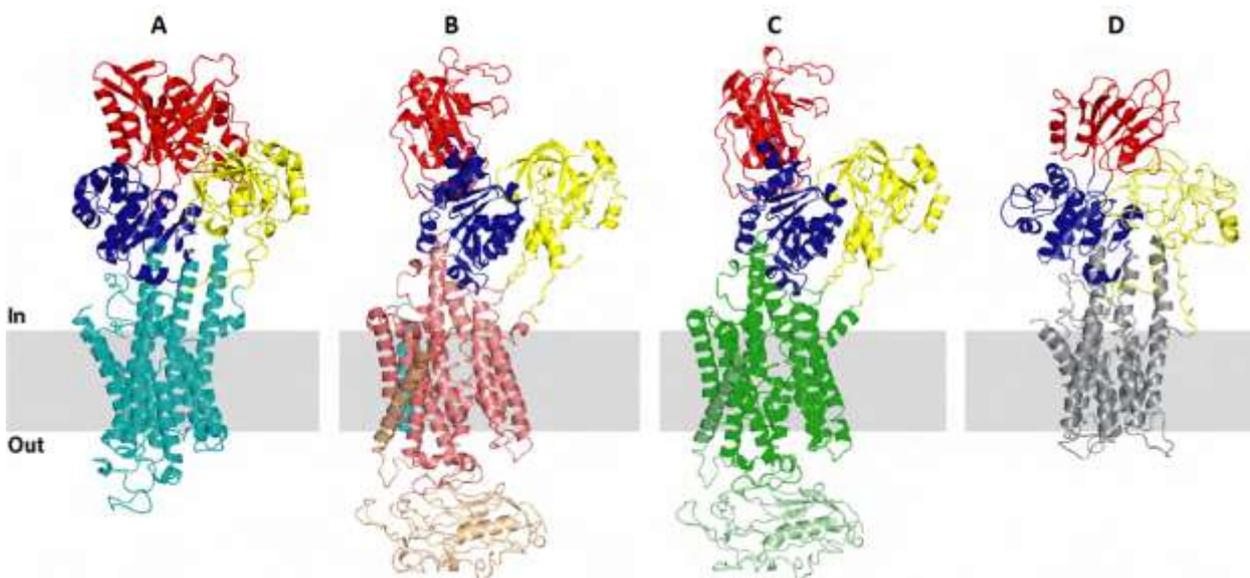


Figura 1: Estrutura das P-ATPases (A: SERCA; B: Na,K-ATPase; C: H,K-ATPase (modelo); D: H-ATPase). (Adaptado de: Bublitz et al. 2010).

A descoberta da Na,K-ATPase e a proposta do seu papel na exportação ativa de Na^+ a partir da célula nervosa foi efetuada por Jens C. Skou, em 1957, o qual mereceu a atribuição do Prémio Nobel da Química pelos trabalhos por si desenvolvidos até 1997 (SKOU 1965; Xie and Askari 2002).

É ainda de realçar que a Na,K-ATPase pertence a uma família de ATPases tipo-P (**Figura 1**), as quais são responsáveis pelo transporte ativo de uma variedade de cátions, nomeadamente H^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} e Cd^{2+} , através das membranas celulares, graças a um mecanismo reacional comum. Além disso, estas exibem ainda estruturas terciárias comparáveis, organização topológica membranar semelhante, bem como vários domínios altamente conservados (Blanco and Mercer 1998; Bublitz et al. 2010).

Estas ATPases definem-se como tipo-P na medida em que as mesmas sofrem uma etapa de fosforilação no seu ciclo funcional catalítico, na qual ocorre a transferência do γ -fosfato da molécula de ATP para o resíduo aminoacídico aspartato D376. O conjunto de etapas de fosforilação e desfosforilação destas enzimas é responsável pela oclusão, ligação e transporte de cátions entre o meio intra e extracelular (Horisberger 2004).

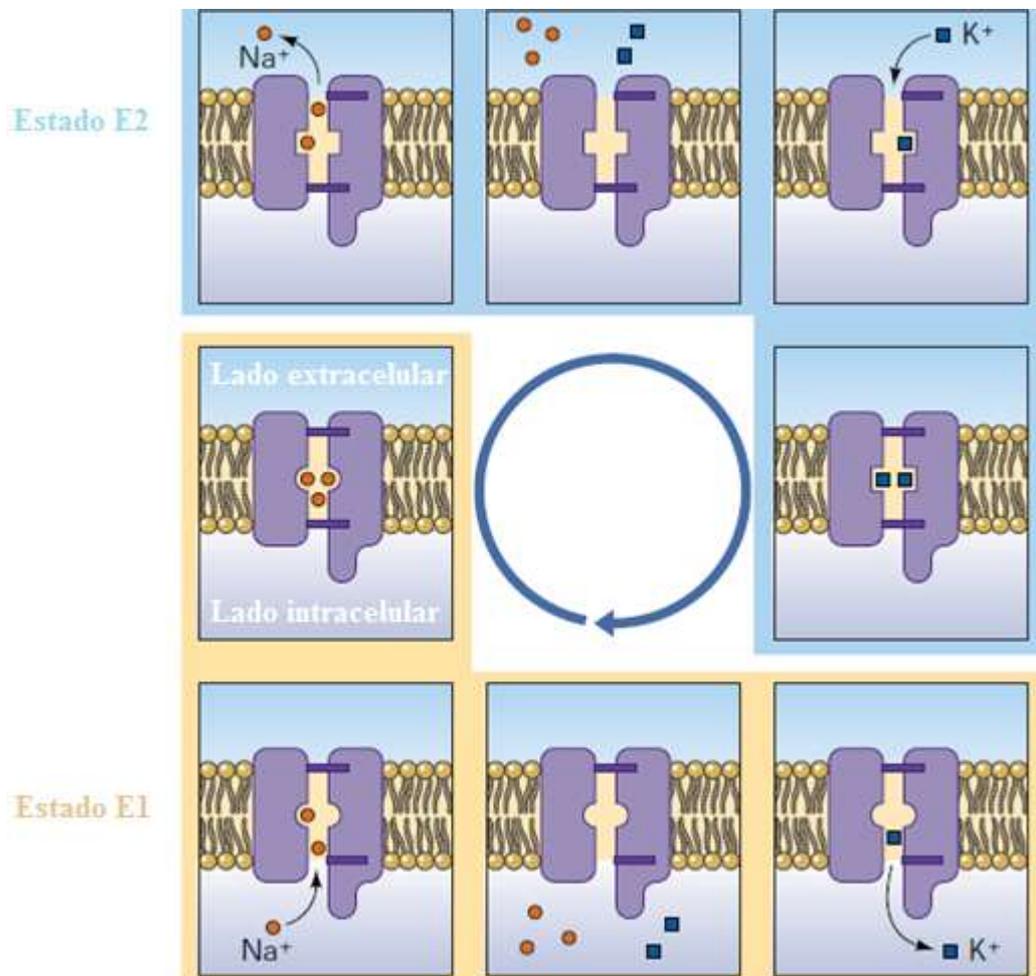


Figura 2: Representação do ciclo funcional da Na,K-ATPase. O acesso alternado de íons à Na,K-ATPase, a qual se encontra incorporada na membrana com o lado extracelular na parte superior e o intracelular na parte inferior, é controlado por duas zonas peptídicas representadas por duas barras horizontais escuras, que permitem a entrada e saída de íons de Na^+ e K^+ , respetivamente, na conformação E1 e a saída e entrada de Na^+ e K^+ , respetivamente, na conformação E2 (Adaptado de: Horisberger 2004).

A Na,K-ATPase, tal como as restantes ATPases tipo-P, oscila entre duas principais conformações, E1 e E2, como se pode observar na figura anterior, na qual se representa o ciclo funcional desta bomba (**Figura 2**).

Este modelo inicialmente proposto por Läuger, considera que a conformação E1 apresenta uma maior afinidade para Na^+ e para ATP, ao passo que a conformação E2 exibe uma maior afinidade para K^+ , de acordo com um ciclo de transições conformacionais decorrentes de um ciclo catalítico, o qual pode incluir muitos estados ou sub-estados. O princípio deste modelo define que a Na,K-ATPase incorporada na membrana plasmática (com o extremo superior do lado extracelular e o extremo inferior do lado citoplasmático), exibe um acesso alternado aos iões, o qual define as duas principais conformações já referidas, E1 e E2.

Na conformação E1 ocorre a fosforilação da bomba através da transferência do γ -fosfato do ATP. Enquanto a Na,K-ATPase se encontra neste estado, ocorre a saída de dois iões K^+ e a entrada de três iões Na^+ pela parte inferior da bomba, ou seja, no lado citoplasmático. Subsequentemente três Na^+ são ocluídos no interior da enzima, a qual permanece fosforilada. Posteriormente há um aumento da afinidade da Na,K-ATPase para o K^+ e uma diminuição da afinidade para o Na^+ , fenómenos que promovem a saída de três Na^+ e a entrada de dois K^+ pela parte superior da bomba, ou seja, no lado extracelular. Nesta conformação, E2, a bomba de sódio encontra-se desfosforilada, mantendo-se neste mesmo estado durante a oclusão do K^+ que se segue (Läuger 1979; Scheiner-Bobis 2002).

O acesso dos iões de Na^+ e K^+ aos locais de ligação na Na,K-ATPase é controlado por zonas peptídicas que constituem um acesso de entrada, ilustradas na figura por duas barras horizontais escuras, de cada um dos lados da enzima (**Figura 2**). Quando estes dois locais de acesso se encontram fechados simultaneamente, ocorre a oclusão dos catiões no interior da estrutura peptídica. Esta é uma fase intermédia entre as duas conformações. Além da abertura e fecho destas zonas peptídicas, há também uma alteração da estrutura proteica nos locais de ligação aos catiões, a qual resulta numa modificação da afinidade seletiva para os mesmos, o que permite a sua libertação (Horisberger 2004; Läuger 1979).

1.1.2. ESTRUTURA DA Na,K-ATPASE

A Na,K-ATPase é constituída por dois grandes polipéptidos, designados por subunidade α e β , e por um terceiro polipéptido de menores dimensões, a subunidade γ , os

quais existem na membrana na proporção 1:1:1 (Blanco and Mercer 1998; Vague et al. 2004).

A subunidade α , com 10 segmentos transmembranares, de massa molecular aproximadamente de 112.000 Da, é responsável pelas propriedades catalíticas e de transporte da Na,K-ATPase, sendo nesta subunidade que se localizam os locais de ligação para o Na^+ e para esteróides cardiotônicos (CTS), nos segmentos extracelulares, e para o K^+ e ATP, nos segmentos intracelulares. A subunidade β , de massa molecular entre 40.000 e 60.000 Da, é uma subunidade regulatória essencial para a atividade enzimática da bomba e parece estar envolvida na oclusão de K^+ e na modulação da afinidade deste íon e de Na^+ para com a bomba. A subunidade γ , de massa molecular entre 8.000 e 14.000 Da, apesar de ser um pequeno polipéptido hidrofóbico, parece também ser importante para a função da Na,K-ATPase (Bagrov, Shapiro, and Fedorova 2009; Blanco and Mercer 1998).

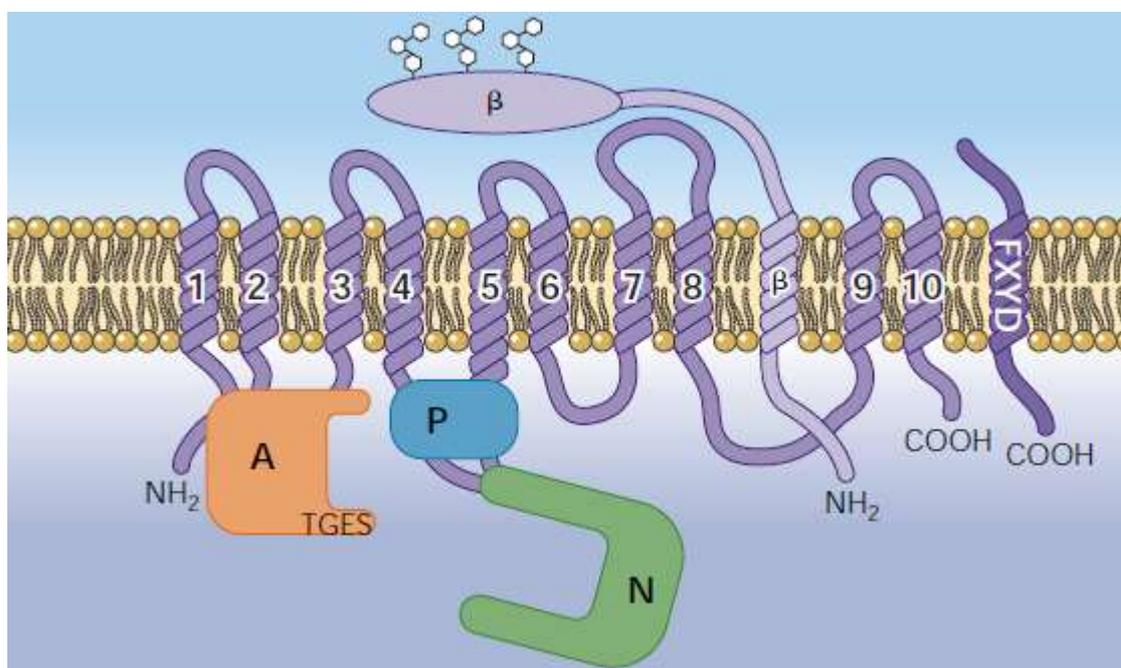


Figura 3: Representação da organização e distribuição das subunidades da Na,K-ATPase na membrana plasmática. A: Domínio atuador constituído pelo segmento do terminal NH_2 que precede o 1.º segmento transmembranar, o qual contém o motivo TGES; P: Domínio fosforilado, constituído pelo *loop* intracelular entre o 4.º e o 5.º segmento transmembranar; N: Domínio nucleotídico composto maioritariamente pelo grande *loop* intracelular, local de ligação ao ATP; A subunidade β é constituída por um único segmento transmembranar, com um segmento intracelular curto com o terminal $-\text{NH}_2$ e um grande domínio extracelular com vários locais de glicosilação (Horisberger 2004).

Na subunidade α distinguem-se três importantes domínios, domínio A, P e N, os quais formam o “motor central” de ATPases tipo-P. Na figura acima (**Figura 3**) é possível observar o motivo TGES, composto pelos resíduos aminoácídicos Thr-Gly-Glu-Ser (resíduos de treonina-glicina-glutamina-serina), o qual se encontra localizado na região em torno do resíduo de aspartato fosforilado (Blanco and Mercer 1998; Bublitz et al. 2010), no domínio atuador A, constituído pelo segmento do terminal $-\text{NH}_2$, que precede o 1.º segmento

transmembranar e o *loop* intracelular existente entre o 2.º e o 3.º segmento transmembranar, envolvido assim na desfosforilação da enzima. O domínio onde ocorre a fosforilação, P, é constituído pelo *loop* intracelular entre o 4.º e o 5.º segmento transmembranar, ao passo que o domínio nucleotídico N é composto maioritariamente pelo grande *loop* intracelular, correspondente ao local de ligação à molécula de ATP (Horisberger 2004).

Da subunidade α conhecem-se 4 isoformas ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ e $\alpha 4$) e três isoformas da subunidade β ($\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 3$), as quais adquirem várias combinações $\alpha\beta$ nos diferentes tecidos, com características distintas, nomeadamente com diferentes sensibilidades para os iões e para os vários CTS, dos quais se destaca a ouabaína, um importante inibidor da Na,K-ATPase.

A isoforma $\alpha 1$ está ubiquamente distribuída pelos tecidos, no entanto, é de destacar que é a principal isoforma expressa nos rins. A isoforma $\alpha 2$ é expressa essencialmente no músculo cardíaco adulto, músculo liso vascular, músculo esquelético, cérebro, tecido adiposo, cartilagem e osso. Já a isoforma $\alpha 3$ é predominante em tecidos excitáveis, principalmente tecidos do sistema nervoso central e periférico, bem como, no sistema condutivo do coração. Por fim, destaca-se a isoforma $\alpha 4$, a qual parece ser específica do testículo.

A subunidade β é constituída por um único segmento transmembranar, com um segmento intracelular curto com o terminal $-NH_2$ e um grande domínio extracelular com vários locais de glicosilação (dos quais apenas 3 estão representados).

A isoforma $\beta 1$ está também ubiquamente distribuída, no entanto, as isoformas $\beta 2$ e $\beta 3$ apresentam ambas uma expressão mais específica, nomeadamente no cérebro, cartilagem e eritrócitos. Além destes tecidos, nos quais estas duas últimas isoformas apresentam uma expressão comum, a isoforma $\beta 2$ expressa-se também no músculo cardíaco, ao passo que a isoforma $\beta 3$ se expressa ainda nos tecidos pulmonares (Bagrov, Shapiro, and Fedorova 2009; Blanco and Mercer 1998).

A subunidade α e β da Na,K-ATPase associam-se a uma terceira, a subunidade γ , pertencente à família de proteínas de mamíferos FXYD (Blanco and Mercer 1998; Horisberger 2004), constituídas por sete membros, FXYD1-FXYD7, caracterizados por dois resíduos de glicina conservados no domínio transmembranar e um resíduo de serina (Käthi Geering 2008; K J Sweadner and Rael 2000), tendo sido a FXYD2 a primeira a ser identificada (Forbush, Kaplan, and Hoffman 1978) e apenas em 1993 ocorreu a sequenciação do seu gene (Mercer 1993). Estes estudos vieram confirmar que esta entidade proteolípídica é um componente específico e não um contaminante ou produto de

degradação da subunidade α ou β , possibilidade que tinha sido anteriormente levantada, destacando-se que, ao contrário da subunidade β , a γ não é glicosilada (Mercer 1993).

Nos tecidos em que a sua existência foi confirmada, esta última subunidade existe na mesma proporção que a α e β , apesar do dímero $\alpha\beta$ ser funcional por si só (Mobasheri et al. 2000). Além disso, o elevado grau de homologia da subunidade γ descrito entre várias espécies sugere que esta pode ser importante quanto à funcionalidade da Na,K-ATPase (Blanco and Mercer 1998) e esta, tal como todas as proteínas FXYD, modula e está associada à bomba, alterando a sua afinidade aparente para Na^+ e K^+ ou ainda a sua corrente iônica máxima ($I_{\text{máx}}$), estando também descrito na literatura a sua função protetora contra a inativação térmica da Na,K-ATPase, assegurando a estabilidade da bomba (Bell et al. 2008; K. Geering 2006; Pestov et al. 2007; K J Sweadner and Rael 2000).

Esta descrição estrutural da bomba de sódio é indispensável para a compreensão das suas propriedades isoenzimáticas e caracterização das propriedades funcionais das diferentes combinações entre os polipéptidos α e β , a qual é uma análise extremamente complexa, ainda mais quando na mesma célula são expressas mais do que uma isoforma (Blanco and Mercer 1998). Por isso, muitos dos estudos efetuados incidem sobre o rim, um dos órgãos de excelência para a compreensão da estrutura, mecanismos reacionais bioquímicos e propriedades cinéticas da bomba de sódio, pois é ao nível do rim que a atividade da mesma é mais elevada. Na literatura está descrita uma menor afinidade de ATP e maior afinidade para com os catiões Na^+ e K^+ para a isoenzima $\alpha 1\beta 1$ renal, em comparação com as isoformas $\alpha 2$ e $\alpha 3$ do tecido neuronal. Já em tecido adiposo de rato, foi descrito que a isoforma $\alpha 1$ apresenta um valor de constante de Michaelis, K_m , para os iões Na^+ três vezes menor do que o da isoforma $\alpha 2$ (J Lytton 1985; Jonathan Lytton, Lin, and Guidotti 1985).

Shyjan, *et al.*, descreveram outras diferenças ao nível das propriedades enzimáticas da Na,K-ATPase, a partir da glândula pineal, na qual a afinidade para iões Na^+ relativamente à isoenzima $\alpha 3\beta 2$ é superior à da isoenzima $\alpha 1\beta 1$ renal (Shyjan et al. 1990).

Apesar dos vários estudos sugerirem diferenças quanto às propriedades enzimáticas das isoenzimas da Na,K-ATPase, verificam-se no entanto várias discrepâncias nos parâmetros cinéticos já publicados, os quais conferem algumas incertezas quanto às características funcionais das isoenzimas da bomba. Ainda assim, é possível sumarizar de uma forma geral os parâmetros cinéticos das isoenzimas da Na,K-ATPase de rato, expressas no sistema heterólogo de células de insetos (úteis pois expressam uma baixa concentração de unidades da bomba nativas), tal como está descrito na tabela seguinte (**Tabela 1**) (Blanco and Mercer 1998).

Tabela 1: Características cinéticas das isoenzimas da Na,K-ATPase de rato expressas em células *Sf-9* de inseto. Os valores são expressos pelas médias \pm SE; Km: Afinidades aparentes ($K_{0.5}$) e Ki: Constante de inibição, foram calculados a partir de parâmetros de curvas de dose-resposta da atividade da Na,K-ATPase para os efetores indicados, por comparação com a isoenzima $\alpha 1\beta 1$ nativa a partir do rim (Adaptado de: Blanco and Mercer 1998).

Isoenzima	Ativação por Na ⁺ ($K_{0.5}$, mM)	Ativação por K ⁺ ($K_{0.5}$, mM)	Ativação por ATP (K_m , mM)	Inibição por Ouabaína (K_i , M)	Inibição por Ca ²⁺ (K_i , M)
$\alpha 1\beta 1$ nativa	17.5 \pm 0.4	2.1 \pm 0.7	0.32 \pm 0.04	9.8 \pm 0.9 X 10 ⁻⁵	
$\alpha 1\beta 1$	16.4 \pm 0.7	1.9 \pm 0.2	0.46 \pm 0.10	4.3 \pm 1.9 X 10 ⁻⁵	1.0 \pm 0.2 X 10 ⁻⁴
$\alpha 2\beta 1$	12.4 \pm 0.5	3.6 \pm 0.3	0.11 \pm 0.01	1.7 \pm 0.1 X 10 ⁻⁷	
$\alpha 2\beta 2$	8.8 \pm 1.0	4.8 \pm 0.4	0.11 \pm 0.02	1.5 \pm 0.2 X 10 ⁻⁷	7.3 \pm 4.6 X 10 ⁻⁶
$\alpha 3\beta 1$	27.9 \pm 1.3	5.3 \pm 0.3	0.09 \pm 0.01	3.1 \pm 0.3 X 10 ⁻⁸	
$\alpha 3\beta 2$	17.1 \pm 1.0	6.2 \pm 0.4	0.07 \pm 0.02	4.7 \pm 0.4 X 10 ⁻⁸	1.9 \pm 1.0 X 10 ⁻⁵

Através da análise dos parâmetros cinéticos das isoenzimas da Na,K-ATPase para rato expressas em células de insetos, é possível observar que a afinidade aparente para Na⁺ varia do seguinte modo:

$$* \alpha 2\beta 2 > \alpha 2\beta 1 > \alpha 1\beta 1 = \alpha 3\beta 2 > \alpha 3\beta 1.$$

Por sua vez, a afinidade aparente para K⁺ varia de acordo com a seguinte sequência:

$$* \alpha 1\beta 1 > \alpha 2\beta 1 = \alpha 2\beta 2 > \alpha 3\beta 1 = \alpha 3\beta 2.$$

Através da ativação por ATP, as isoformas $\alpha 2$ e $\alpha 3$ parecem exibir valores de K_m equivalentes, os quais são cerca de 4 vezes mais baixos do que os apresentados para a isoenzima $\alpha 1\beta 1$. No entanto, é de realçar que a diferença cinética mais evidente entre as isoenzimas corresponde à inibição da bomba através da ouabaína, sendo as isoenzimas $\alpha 3\beta 1$ e $\alpha 3\beta 2$ as que exibem maior sensibilidade à ouabaína, ao passo que as isoenzimas $\alpha 2\beta 1$ e $\alpha 2\beta 2$ exibem uma sensibilidade intermédia e a isoenzima $\alpha 1\beta 1$ uma baixa sensibilidade para a mesma. Curiosamente, a isoenzima de rato $\alpha 1\beta 1$ expressa em células de inseto é cerca de 2 mais vezes mais sensível e a $\alpha 3\beta 1$ aproximadamente 20 vezes menos sensível à ouabaína do que a enzima nativa.

Esta diferença de sensibilidade entre a isoenzima nativa e a expressa pela Na,K-ATPase pode ser um resultado de diferentes ambientes lipídicos, um outro fator de regulação da bomba. Alternativamente, a sensibilidade para a ouabaína pode ser influenciada pela subunidade γ ou pela estrutura oligomérica da subunidade α (Blanco and Mercer 1998).

1.1.3. REGULAÇÃO DA Na,K-ATPASE

A heterogeneidade estrutural que caracteriza a Na,K-ATPase não representa uma redundância simples, no entanto, contribui para um esclarecimento evolutivo da distribuição da mesma e, conseqüentemente da sua diversidade funcional de acordo com os tecidos nos quais esta se expressa. Por isso, é coerente que os mecanismos reguladores da bomba tenham desenvolvido um ajuste entre a sua expressão e atividade de acordo com as necessidades de cada célula sob várias condições fisiológicas e patológicas (Blanco and Mercer 1998).

Deste modo, o esclarecimento e compreensão do modo como varia a atividade da Na,K-ATPase é extremamente relevante, pois a sua atividade contribui de modo geral para o controle do pH celular, equilíbrio osmótico e, conseqüentemente para a manutenção do volume celular, bem como, para o transporte de Na^+ acoplado a nutrientes, tais como, aminoácidos e vitaminas em todas as células. A regulação desta proteína considera-se assim crucial e determinante para os processos nos quais esta intervém, de modo a que esta desempenhe adequadamente as suas funções de *housekeeping*, bem como funções mais específicas nos diferentes tecidos (Sweeney and Klip 1998).

São vários os mecanismos pelos quais é modulada a atividade da Na,K-ATPase, nomeadamente pela modulação do número de moléculas de enzima presente na membrana plasmática, regulação a longo termo, ou pela regulação da atividade desta ao nível da superfície celular, regulação de curto termo (Blanco and Mercer 1998).

Quanto à regulação a longo termo considera-se que, de acordo com as diferentes exigências ao nível de cada tipo de tecido, a Na,K-ATPase exhibe então diferentes concentrações nos diferentes tecidos, estando descrito que a sua concentração é cerca de 160.000 vezes menor em eritrócitos relativamente à concentração que esta apresenta no córtex cerebral. É coerente que a concentração da Na,K-ATPase e conseqüentemente, a atividade da bomba, seja muito superior em tecidos excitáveis ou contrácteis, nomeadamente no córtex cerebral e coração, pois estes estão associados a fluxos passivos de Na^+ e K^+ muito superiores, quando comparados com aqueles que ocorrem, por exemplo, nos eritrócitos (Clausen 1998).

A longo prazo, destacam-se ainda alterações na transcrição do gene, na tradução do gene ou degradação da proteína (Sweeney and Klip 1998). Esta regulação é frequentemente resultado de alterações da taxa de síntese da Na,K-ATPase, destacando-se que alterações do

sistema endócrino e do estado eletrolítico celular, atividade física e insuficiência cardíaca estão associadas a diferentes concentrações da Na,K-ATPase em músculo esquelético e miocárdio humano (Clausen 1998).

Na regulação a curto prazo, destaca-se a regulação pela disponibilidade de substratos, pela ação de moléculas reguladoras endógenas ou exógenas, por fosforilação/desfosforilação ou ainda por alterações na velocidade de translocação das subunidades para a membrana plasmática (Blanco and Mercer 1998; Clausen 1998).

É ainda importante destacar que a atividade da Na,K-ATPase está sob controlo de uma grande variedade de mensageiros intracelulares capazes de modular a função das isoenzimas particulares de uma forma específica. As proteínas cinase A (PKA) e cinase C (PKC), por exemplo, provocam a fosforilação específica das isoformas $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$ em diferentes locais podendo contribuir para estratégias de regulação específicas que podem ser importantes na função da bomba e respetiva adaptação às necessidades de cada célula (Blanco and Mercer 1998).

A fosforilação da isoforma $\alpha 1$ pela PKA tem lugar no resíduo Ser⁹⁴³ numa região citoplasmática altamente conservada, entre o 8.º e o 9.º segmento transmembranar, parecendo este resíduo aminoacídico estar envolvido na fosforilação de diferentes isoformas, nomeadamente $\alpha 1$ e $\alpha 3$, pela mesma proteína cinase. Já um estímulo da PKC provoca uma diminuição da atividade da bomba, descrita em $\alpha 2\beta 1$ e $\alpha 3\beta 1$, a qual sugere que a fosforilação de outros resíduos de Serina, além dos mais bem descritos, Ser¹⁶ e Ser²³, possa ocorrer dentro do mesmo domínio da proteína nestas isoenzimas.

Por exemplo, a ativação específica das isoenzimas $\alpha 3\beta 1$, concomitante com a inibição das outras duas isoenzimas da bomba, pode levar a subtis variações dos gradientes iónicos de Na⁺ e K⁺ e, conseqüentemente, a alterações do potencial de membrana e excitabilidade celular, fenómenos estes particularmente importantes nas células neuronais, onde predomina a expressão da isoforma $\alpha 3$ da Na,K-ATPase. Assim, a atividade da bomba pode ser regulada diretamente, a qual proporciona uma rápida adaptação das funções da Na,K-ATPase de acordo com o tipo de tecido em questão (Blanco and Mercer 1998).

Até este ponto fez-se uma descrição da regulação da bomba de sódio a curto e longo termo, no entanto, alguns fatores atuam em ambos os tipos de regulação, nomeadamente os esteróides cardiotónicos e a insulina.

Os esteróides cardiotónicos (CTS), que se dividem em duas famílias, os cardenólidos, como a digoxina e a ouabaína, e os bufadienólidos, tal como a marinobufagenina (MBG), são ligantes extracelulares extremamente seletivos e os mais bem

caracterizados que se ligam à Na,K-ATPase. Originalmente descobertos como constituintes de plantas e toxinas de anfíbios, sabe-se hoje que os CTS são também importantes devido à sua função enquanto reguladores endógenos em mamíferos (Fontana et al. 2013; Kathleen J Sweadner 2008).

A ouabaína, que é talvez, o CTS mais bem estudado, liga-se à subunidade α do lado extracelular da bomba de sódio, na cavidade do domínio transmembranar na interface constituída por seis segmentos transmembranares α M1-6 (Fontana et al. 2013). A sua afinidade relativamente à Na,K-ATPase é maior quando a enzima se encontra fosforilada, no entanto, a sua ligação pode ocorrer em todos os seus estados conformacionais (Yatime et al. 2011).

A ouabaína endógena, em concentrações muito baixas, insuficientes para inibir a Na,K-ATPase, desencadeia, em células intactas, sinalização intracelular, após ligação à bomba e, conseqüentemente, ocorre uma amplificação do tráfego intracelular de transportadores iónicos, incluindo da própria bomba de sódio, o que pode, eventualmente, resultar num aumento da sua atividade (Kathleen J Sweadner 2008).

Esta regulação afeta assim a distribuição e função da bomba de sódio através da ligação de várias proteínas aos diferentes motivos funcionais dos seus três domínios, envolvidos na interação com outras proteínas, recetores e moléculas de sinalização (**Figura 4**), nomeadamente a proteína tirosina cinase (Src), fosfolipase C (PLC), fosfoinosítideo-3-cinase (PI3K), recetor do IP_3 (IP_3R), anquirina, aducina e caveolinas (Liu and Xie 2010). Da interação direta e constitutiva do domínio N da isoforma $\alpha 1$ da Na,K-ATPase com o domínio cinase da Src resulta a formação de recetores funcionais para os CTS, complexo este que é mantido num estado inativo. Este estado é alterado após a ligação da ouabaína, a qual promove então a ativação do complexo Na,K-ATPase/Src e subsequentemente a fosforilação em resíduos de tirosina em múltiplas proteínas. Conseqüentemente há uma transativação do recetor do fator de crescimento epitelial (EGF-R) e, subsequente, ativação das vias de sinalização a jusante do mesmo, nomeadamente, do PI3K, da PLC/PKC e da cinase regulada por sinais extracelulares 1/2 (Erk 1/2), aspetos já descritos em células tubulares proximais renais e de músculo liso (Fontana et al. 2013; Liu and Shapiro 2007). Esta sequência de eventos é conhecida como a hipótese do signalossoma, correspondente à ativação dos processos de transdução de sinal associados às múltiplas vias representadas na **Figura 4**.

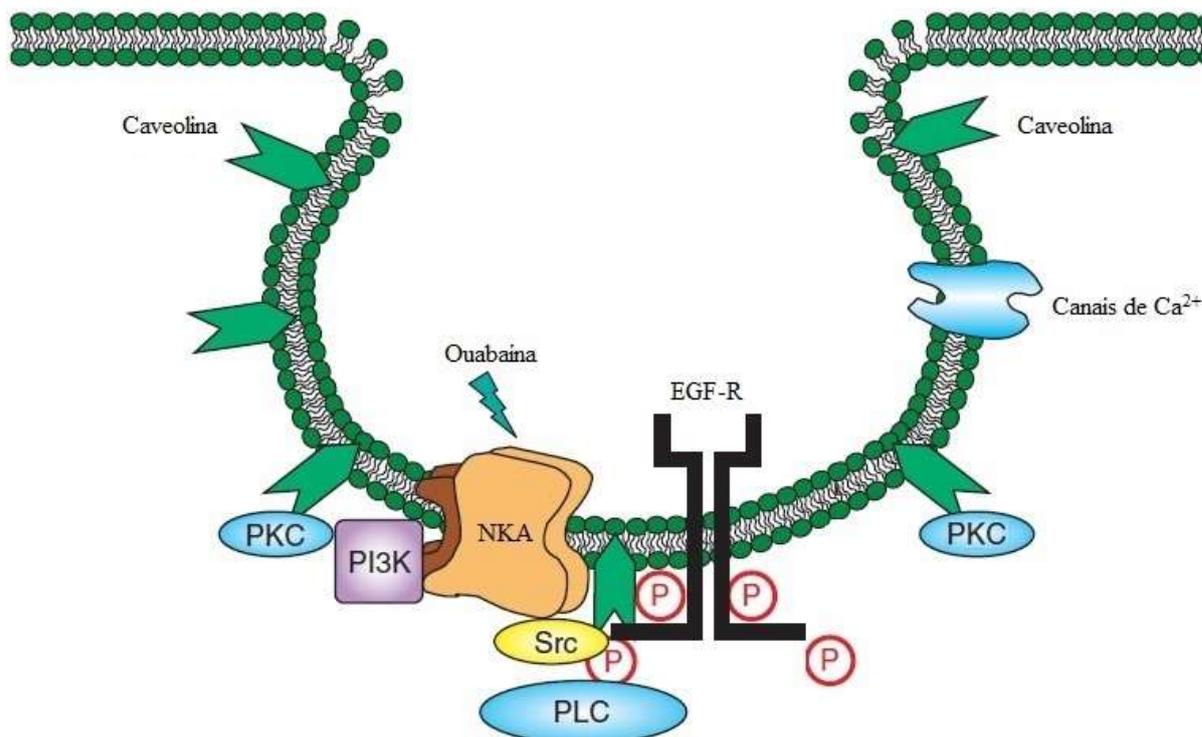


Figura 4: Representação esquemática do processo de transdução de sinal mediado pela ligação de CTS à Na,K-ATPase – hipótese do sinalossoma da Na,K-ATPase.

O sinalossoma é ativado por ligação da ouabaina endógena à Na,K-ATPase (NKA) que se encontra em invaginações da membrana plasmática ricas em caveolina (caveolae) e noutros elementos celulares que lhe estão associados, sendo desencadeados processos de transdução de sinal através de múltiplas vias. Recetor do fator de crescimento epitelial (EGF-R); Proteína cinase C (PKC); Fosfoinositídeo-3-cinase (PI3K); Proteína tirosina cinase (Src); Fosfolipase C (PLC) (adaptado de: Xie and Cai 2003).

É ainda de referir que a Na,K-ATPase e o IP₃R podem formar um microdomínio de sinalização que provoca oscilações de Ca²⁺. Mais tarde, foi demonstrado que a anquirina, que se liga com a extremidade N-terminal da bomba e IP₃R, atua como uma proteína estabilizante de suporte estrutural dentro deste microdomínio de sinalização. Há ainda evidências que apontam para um efeito protetor do tecido através das oscilações de Ca²⁺ durante a programação do desenvolvimento adverso e após a exposição às toxinas bacterianas (Fontana et al. 2013).

Além dos CTS, também a insulina induz uma regulação a curto e longo prazo da Na,K-ATPase (**Figura 5**), sendo esta uma hormona extremamente importante no controlo do transporte e metabolismo de glucose, assim como na absorção de K⁺ e, conseqüentemente, na concentração deste ião no plasma (Chibalin 2007).

O músculo esquelético é considerado como um dos mais importantes tecidos alvo da insulina e como tal, um dos primeiros efeitos desta hormona a ser descrito na literatura é precisamente a diminuição da concentração de K⁺ extracelular (Chibalin 2007). Além disso, destaca-se a translocação das subunidades da bomba a partir de um local de armazenamento intracelular na membrana plasmática em resposta à insulina no músculo esquelético, efeito

este que corresponde a um dos principais mecanismos de regulação da atividade da Na,K-ATPase (Sweeney and Klip 1998).

Por outro lado, a insulina pode ainda aumentar o influxo de Na^+ , através da estimulação do co-transporte Na/K/2Cl ou através de canais de Na^+ , apesar do aumento da $[\text{Na}^+]_i$ por si só ser suficiente para aumentar a atividade de Na,K-ATPase, aspeto pouco claro em adipócitos (Sweeney and Klip 1998).

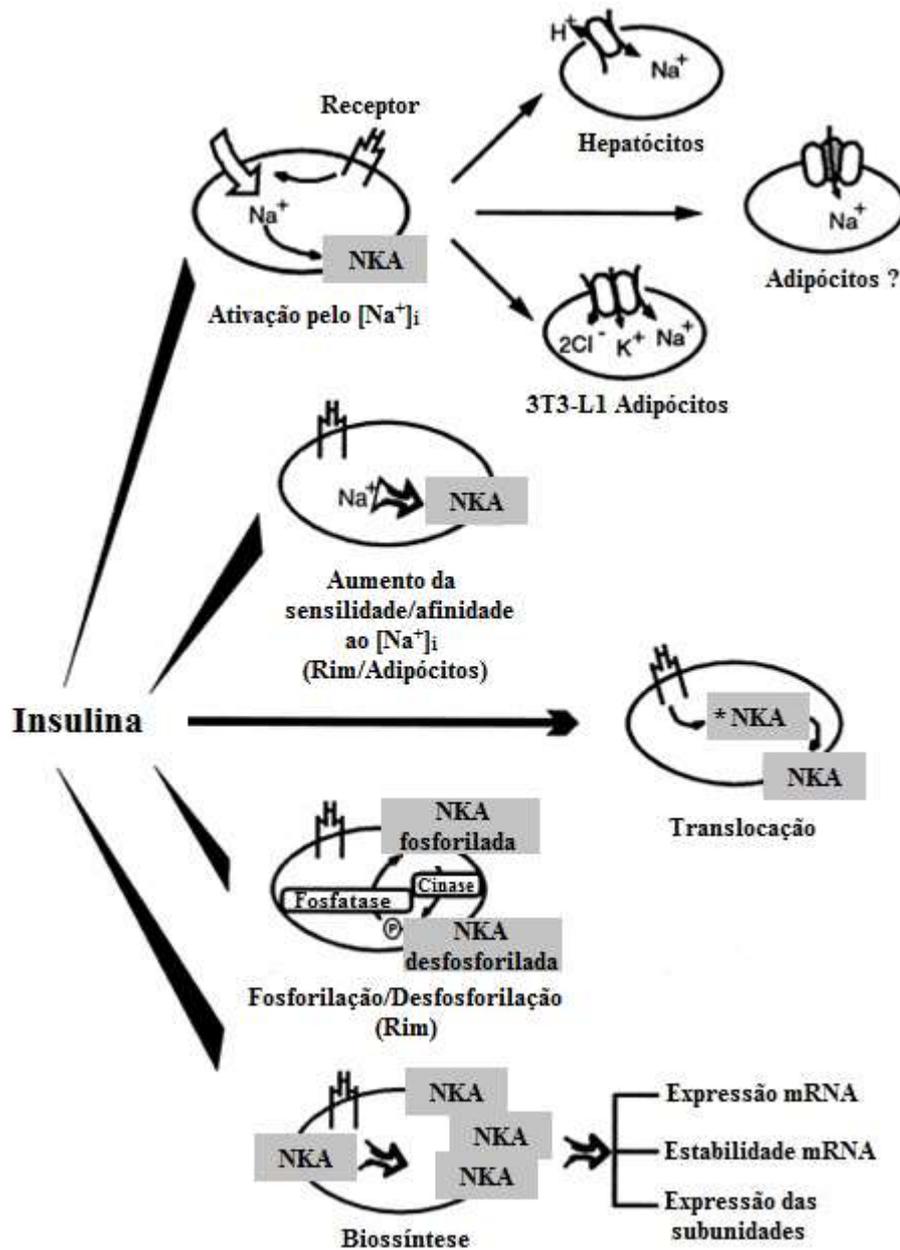


Figura 5: Mecanismos de regulação da Na,K-ATPase (NKA), mediada pela insulina – Ativação pela concentração intracelular de Na^+ ($[\text{Na}^+]_i$), aumento da sensibilidade/afinidade à $[\text{Na}^+]_i$, fosforilação/desfosforilação e biossíntese da NKA.

(Adaptado de: Sweeney and Klip 1998).

Uma outra forma de regulação consiste na fosforilação da Na,K-ATPase, a qual está muito bem descrita através da ação de cinases, tais como a PKA e PKC, ou por agonistas, os quais estimulam a atividade da bomba *in vivo*, mas também pela insulina. As alterações por fosforilação podem, causar alterações conformacionais que poderiam potencialmente alterar a afinidade da bomba para com um ou mais dos seus substratos. Alternativamente, as alterações nos estados de fosforilação podem alterar o volume catalítico das várias subunidades e, por isso mesmo, pode prever-se que esta tenha a capacidade de controlar a taxa de internalização das subunidades e subsequentemente a sua degradação (Chibalin 2007; Sweeney and Klip 1998).

A insulina é também capaz de regular a Na,K-ATPase, através do efeito anti-natriurético desta hormona a nível renal. Feraille *et al.* (1992), demonstraram que ao nível do túbulo convoluto proximal de rato, bem como, no túbulo coletor cortical, ocorre a estimulação da bomba por ação da insulina neste tecido, a qual não é mediada por alterações da $[Na^+]_i$, por translocação das subunidades ou por alterações da atividade hidrolítica da Na,K-ATPase. Em vez disso, a insulina parece aumentar a sensibilidade da bomba ao Na^+ , o que é evidenciado pela diminuição da constante de dissociação do local de ligação de Na^+ (Sweeney and Klip 1998).

A regulação a longo termo pela insulina a nível celular culmina num controlo adicional emergente da bomba de sódio, a qual inclui mudanças nos níveis de expressão do gene. O tratamento a longo prazo de fibroblastos 3T3-L1 com insulina induz um aumento dos níveis de mRNA da isoforma $\alpha 2$ e uma diminuição dos de mRNA da isoforma $\beta 1$ (Russo and Sweadner 1993). Do mesmo modo, em células do músculo liso vascular, o mRNA da isoforma $\alpha 2$ é seletivamente regulado por níveis elevados de insulina, sem alterações no mRNA da isoforma mais abundantemente expressa, a isoforma $\alpha 1$ (Tirupattur et al. 1993).

1.2. A Na,K-ATPASE NOS DIVERSOS TECIDOS

1.2.1. TECIDO NERVOSO

1.2.1.1. FISILOGIA DO TECIDO NERVOSO

O sistema nervoso, do ponto de vista anatómico, divide-se em Sistema Nervoso Central (SNC) e Sistema Nervoso Periférico (SNP). Do ponto de vista funcional divide-se

em Sistema Nervoso Somático, envolvido nas funções voluntárias, e Sistema Nervoso Autônomo, exercendo controlo sobre muitas funções involuntárias (Kierszenbaum 2007).

O SNC é constituído, em termos genéricos pelo cérebro, cerebelo e espinal medula, encontra-se revestido pelas meninges (pia-máter, aracnoide e dura-máter) e está protegido pela estrutura óssea do crânio e da coluna vertebral. O SNP é constituído pelos nervos cranianos, nervos raquidianos e recetores sensoriais. O SNC é constituído por neurónios (condução de impulsos), células da glia (suporte e nutrição) e vasos sanguíneos. Histologicamente todo o sistema nervoso consiste em variações no arranjo dos neurónios e dos seus tecidos de sustentação. No SNC há uma certa separação entre os corpos celulares dos neurónios e os seus prolongamentos. Isto faz com que sejam reconhecidas no cérebro e na espinal medula duas porções distintas, denominadas substância cinzenta (SC) e substância branca (SB), assim chamadas porque mostram essas colorações quando observadas macroscopicamente. A SC é formada principalmente por corpos celulares de neurónios e células da glia, contendo também prolongamentos de neurónios. A SB não contém corpos de neurónios, sendo constituída por prolongamentos dos neurónios e pelas células da glia. A sua cor deriva da presença de grande quantidade de mielina (Kierszenbaum 2007; Bruce M. Koeppen and Stanton 2009).

O cérebro, um dos constituintes do SNC, está contido dentro do crânio, o qual é responsável pela proteção deste. O SNC em conjunto com o SNP constituem o sistema nervoso. Dos componentes básicos do SNC destacam-se os neurónios e a glia (astrócitos e oligodendrócitos), ao passo que o SNP inclui as células de Schwann e as células satélite (Kierszenbaum 2007).

O córtex cerebral, o qual corresponde à camada mais externa do cérebro dos vertebrados, rico em neurónios, no ser humano, ocupa um volume de cerca de 600 cm^3 e tem uma área superficial de cerca de 2500 cm^2 . A superfície do córtex cerebral é altamente contorcida e dobrada, contendo áreas protuberantes, conhecidas como giros, separadas por sulcos (quando se tratam de vales pouco profundos) ou fissuras (se menos profundos). Esta irregularidade aumenta grandemente a área superficial do córtex que pode encaixar-se no limitado volume que este apresenta dentro do crânio (Bruce M. Koeppen and Stanton 2009).

O córtex cerebral pode ser dividido em dois hemisférios, o hemisfério direito e esquerdo e, conseqüentemente subdividido numa série de lóbulos, incluindo o lóbulo frontal, parietal, temporal e occipital, como se pode observar na figura seguinte (**Figura 6**).

O lóbulo frontal, responsável pelo pensamento, memória e comportamento, e o lóbulo parietal, responsável pela linguagem e sensibilidade ao tato, são separados pelo sulco

central, os quais, por sua vez são separados do lóbulo temporal pela fenda lateral, sendo este último responsável pela audição, aprendizagem e emoções. O lóbulo occipital, principal responsável pelo processamento visual, e o lóbulo parietal são separados pela fissura parietoccipital. Dentro da fissura lateral encontra-se um outro lóbulo, a ínsula. O lóbulo límbico é formado pelo córtex na face medial do hemisfério, que faz fronteira com o tronco cerebral (Bruce M. Koeppen and Stanton 2009).

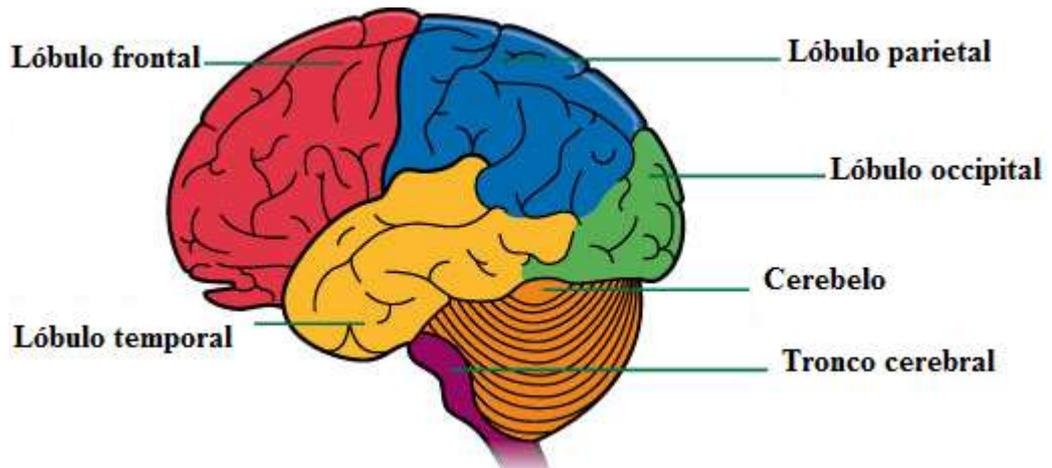


Figura 6: Organização do cérebro nos diferentes lobos.
(Adaptado de: <http://www.macmillan.org.uk/Cancerinformation/Cancertypes/Brain/Aboutbraintumours/Thebrain.aspx>).

O sistema nervoso é composto por células, tecido conjuntivo e vasos sanguíneos. Os principais tipos de células são os neurónios (células nervosas) e as células da glia.

Os neurónios são anatomicamente e fisiologicamente especializados na comunicação e sinalização, propriedades que são fundamentais para o funcionamento do sistema nervoso. A neuróglia, tradicionalmente designada por células gliais, é caracterizada pela sua função de suporte, destacando-se que estas células sustentam os neurónios, metabolicamente e fisicamente, além de garantirem também o isolamento dos neurónios, uns relativamente aos outros, bem como, a manutenção do meio interno do sistema nervoso (Bruce M. Koeppen and Stanton 2009).

Os neurónios apresentam uma constituição típica (**Figura 7**), a qual consiste num corpo celular, ou soma, num número variável de dendrites e num axónio, que se estende a partir da soma. O corpo celular do neurónio contém o núcleo e o nucléolo da célula e também possui um aparelho biossintético muito bem desenvolvido para a produção de componentes membranares, enzimas sintéticas entre outras substâncias químicas necessárias para as funções especializadas das células nervosas (Bruce M. Koeppen and Stanton 2009).

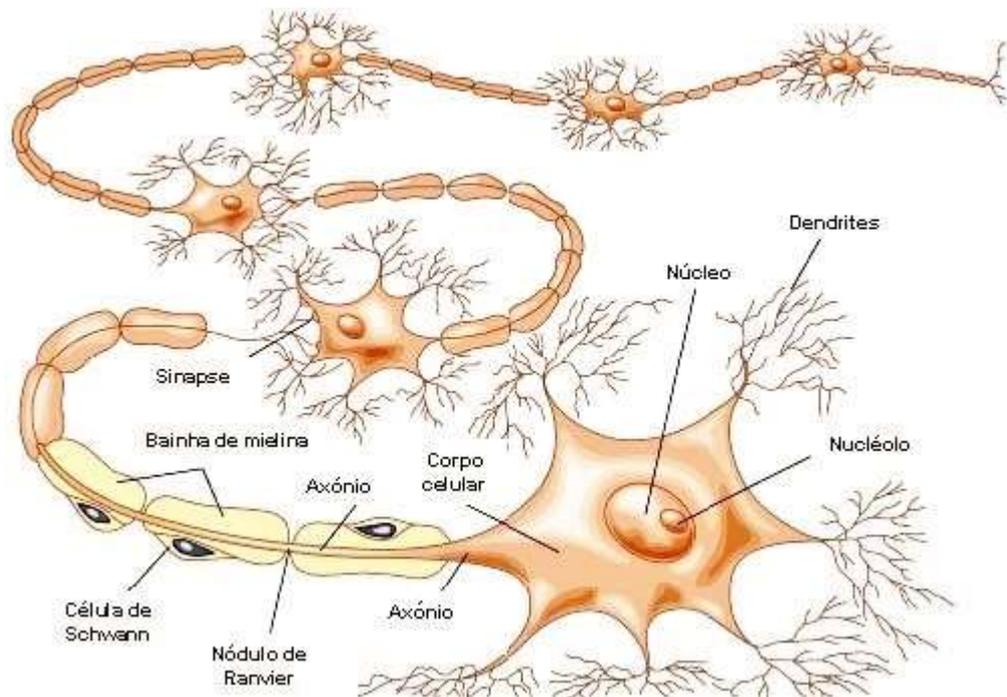


Figura 7: Esquema da constituição típica de um neurónio.
 (Adaptado de: <http://umaquestaodecerebro.blogs.sapo.pt/2009/01/>).

Tal como todas as células do nosso organismo, também os neurónios apresentam um potencial elétrico, resultante da diferença de concentração das várias espécies iónicas de cada um dos lados da membrana. É ao nível das concentrações iónicas intra e extracelulares que intervém variadas bombas, transportadores e canais existentes na membrana plasmática, dos quais se destaca a Na,K-ATPase que utiliza a energia resultante da hidrólise de ATP para o transporte iónico contra um gradiente de concentração (Ashcroft 2000).

Assim, uma entrada de corrente é capaz de produzir uma despolarização das membranas de células excitáveis, suficiente para despoletar um potencial de membrana limite, o qual gera um potencial regenerativo, designado por potencial de ação (**Figura 8**), no qual interagem duas correntes elétricas principais, a corrente dependente da voltagem de Na⁺, responsável pela subida do potencial de ação, e de K⁺, responsável pela descida desse mesmo potencial (Ashcroft 2000; Bruce M. Koeppen and Stanton 2009).

A despolarização, que causa uma ativação inicial dos canais de Na⁺ dependentes de voltagem, seguida pela ativação dos canais de K⁺ dependentes de voltagem, despolariza completamente a membrana e o potencial de membrana inverte de negativo para positivo. O potencial de ação seguidamente retorna para o potencial de membrana de repouso quase tão rapidamente como decorreu a despolarização, na medida em que a corrente resultante induz um decréscimo do potencial de membrana, aproximando-se este do valor do potencial para o potássio (Ashcroft 2000; Bruce M. Koeppen and Stanton 2009).

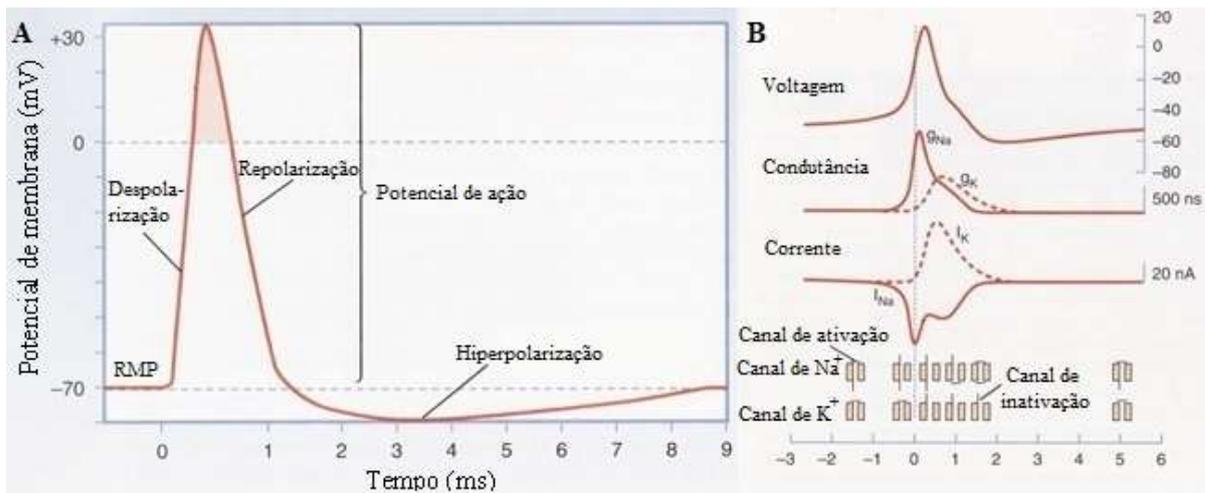


Figura 8: Representação da condução do potencial de ação.

A: Componentes do potencial de ação em função da voltagem ao longo do tempo (ms: milissegundos; mV: milivoltes; RMP: Potencial de Repouso da Membrana); **B:** Variação do potencial de ação em função da voltagem, condutância e corrente ao longo do tempo (g_{Na} , g_K : Condutância de Na^+ e de K^+ , respectivamente; I_{Na} , I_K : Corrente de Na^+ e de K^+ , respectivamente; ns: nanosegundos; nA: nanoamperes) (Adaptado de: Bruce M. Koeppen and Stanton 2009).

Uma vez que os canais de K^+ dependentes de voltagem demoram algum tempo a fechar, pode observar-se transitoriamente um decréscimo do potencial de membrana até valores inferiores ao do potencial de repouso, produzindo-se assim uma hiperpolarização. A despolarização do potencial de ação tem uma duração de 1 a 2 ms., mas a hiperpolarização pode persistir durante alguns 100 ms., dependendo do tipo específico de neurónios (Bruce M. Koeppen and Stanton 2009).

1.2.1.2. PAPEL DA Na,K-ATPASE NA FISIOLÓGIA DO TECIDO NERVOSO

O papel da Na,K-ATPase nos neurónios é particularmente importante na manutenção dos gradientes iónicos de Na^+ e K^+ , função que é crucial após o desencadeamento de vários potenciais de ação na propagação do impulso nervoso, na manutenção do potencial de membrana em repouso e na homeostasia do volume celular. Além do papel da bomba nos neurónios, esta é também essencial nas células gliais, na medida em que, em situação de hipoxia e isquemia, os astrócitos exercem uma função protetora do sistema nervoso, aumentando o tempo de vida dos neurónios, de acordo com a literatura (Rose, Waxman, and Ransom 1998).

A proteção que a Na,K-ATPase confere às células gliais é exercida ao nível da libertação de lactato, da regulação de glutamato extracelular e respetiva concentração iónica (Rose, Waxman, and Ransom 1998).

A nível dos neurónios, está descrita a expressão das isoenzimas $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 1\beta 2$, $\alpha 1\beta 3$, $\alpha 3\beta 1$ e $\alpha 3\beta 2$. Já a nível da glia, a literatura aponta para a expressão das isoenzimas $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 1\beta 2$, $\alpha 1\beta 3$, $\alpha 2\beta 1$ e $\alpha 2\beta 2$ (Lecuona et al. 1996; Peng, Martin-Vasallo, and Sweadner 1997).

1.2.2. TECIDO HEPÁTICO

1.2.2.1. FISIOLOGIA DO TECIDO HEPÁTICO

O fígado, a maior glândula do corpo humano, localiza-se no interior da cavidade abdominal, e as suas funções estão intimamente relacionadas com as dos outros órgãos do sistema gastrointestinal. O fígado é considerado como o primeiro local de processamento dos nutrientes absorvidos e também segrega ácidos biliares, desempenhando assim um papel crítico na absorção de lípidos da dieta alimentar.

O fígado é o órgão metabolicamente mais ativo do nosso organismo, promovendo a metabolização dos produtos residuais e xenobióticos, convertendo-os nas formas adequadas para que estes possam ser excretados. Portanto, as principais funções do fígado são de uma forma sucinta: a contribuição para o metabolismo de todo o organismo, desintoxicação e excreção de resíduos de produtos proteicos e lipídicos (Bruce M. Koeppen and Stanton 2009).

A nível histológico, o fígado, composto por quatro lóbulos mal definidos, é revestido por uma camada de tecido conjuntivo fina, a cápsula de Glisson, a qual está alinhada com o peritoneu. Os lóbulos consistem em sinusóides e placas de células parenquimatosas (hepatócitos), organizadas radialmente ao redor de uma veia central. Os sinusóides são capilares que ocupam o espaço entre as placas de hepatócitos. Os hepatócitos têm funções exócrinas e endócrinas, as quais correspondem à parte funcional do lóbulo hepático.

A unidade estrutural e funcional clássica do fígado é o lóbulo central, no qual é enfatizada a função endócrina dos hepatócitos libertando as suas moléculas na veia central (**Figura 9**). No conceito dos lóbulos acinares é enfatizada a heterogeneidade dos hepatócitos, os quais são metabolicamente mais ativos quanto mais perto estiverem dos espaços portais.

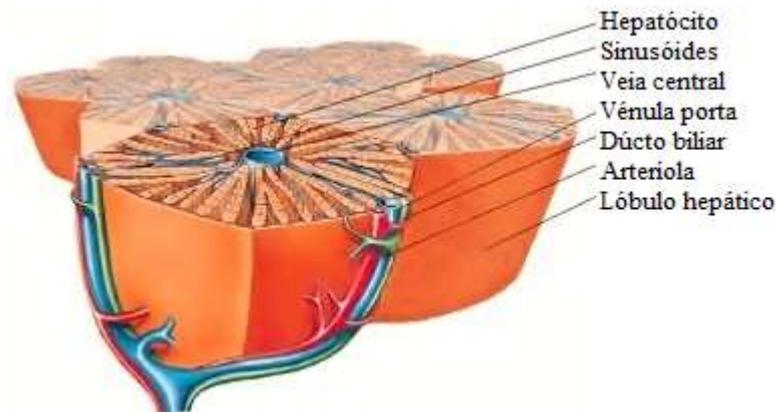


Figura 9: Representação esquemática da estrutura de um lóbulo hepático. (Adaptado de: http://medstnews.blogspot.pt/2012_10_01_archive.html).

Nos interstícios de três ou mais lóbulos, ocorrem os espaços (áreas) portais. Cada trato contém um ou mais ramos de uma veia porta, uma artéria hepática, um duto biliar e um vaso linfático. Esses vários componentes são sustentados por uma estrutura de tecido conjuntivo. Os componentes da tríade portal, incorporado no tecido conjuntivo, são separados a partir do lóbulo hepático através de uma placa de limitação de hepatócitos, e deste modo o sangue da veia porta e da artéria hepática flui para os sinusóides e é drenado pela vénula central, sendo que a bÍlis flui na direção oposta, a partir de hepatócitos para o canal biliar (Kierszenbaum 2007).

1.2.2.2. PAPEL DA Na,K-ATPASE NA FISILOGIA DO TECIDO HEPÁTICO

Em hepatócitos, uma infinidade de sistemas de transporte na membrana plasmática estão envolvidos na regulação da homeostasia intracelular de iões, do potencial de membrana, do pH intracelular e do próprio transporte iónico, os quais são dependentes de um gradiente de Na^+ e, por isso mesmo, estão dependentes do papel da Na, K-ATPase, o qual é assim essencial também no tecido hepático (Landmann et al. 1998).

A localização e composição da bomba de sódio no tecido hepático não estão ainda totalmente esclarecidos, no entanto, todos os autores de uma forma geral descrevem que a isoforma $\alpha 1$ existe no fígado. Já a existência das isoformas da subunidade β parece estar menos esclarecida, ainda assim, Simon *et al.*, demonstraram que a isoforma $\beta 1$ está localizada na superfície da membrana sinusoidal, indicam ainda que, a $\alpha 1$ se encontra presente em ambos os domínios, sinusoidal e apical (Simon et al. 1996). Ainda assim está descrito que nos hepatócitos se verifica a expressão das isoenzimas $\alpha 1\beta 1$ e $\alpha 1\beta 3$

(Arystarkhova and Sweadner 1997; Lu and Leffert 1991; Schenk and Leffert 1983; Sun and Ball 1992).

1.2.3. TECIDO RENAL

1.2.3.1. FISILOGIA DO TECIDO RENAL

Os rins, em conjunto com os ureteres emparelhados, a bexiga urinária e a uretra constituem em conjunto o sistema urinário. Por sua vez, cada rim tem um córtex, o qual está subdividido em córtex exterior e justamedular, e uma medula, subdividida em medula exterior e interior. Esta última é formada por massas cónicas e pirâmides medulares, nas quais as bases estão localizadas na junção corticomedular.

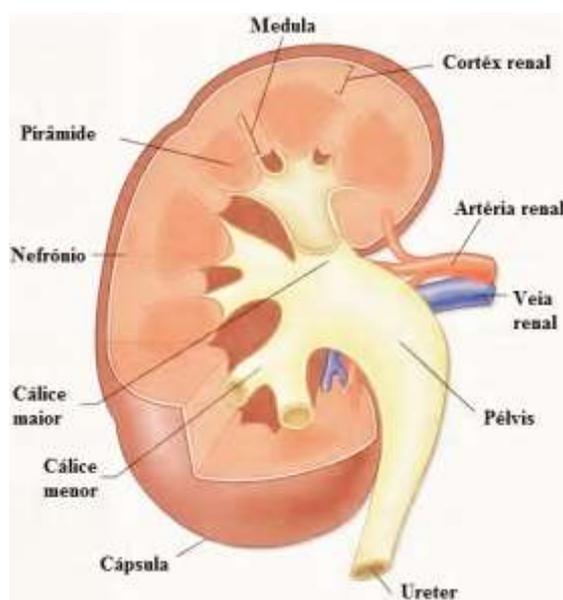


Figura 10: Estrutura esquemática de um rim humano.
(Adaptado de: Bruce M. Koeppen and Stanton 2009).

A pirâmide medular, em conjunto com a região cortical, constituem assim um lóbulo renal, do qual se destaca a cápsula renal, a base deste lóbulo, tal como se pode observar na **Figura 10** (Bruce M. Koeppen and Stanton 2009).

Os limites laterais de cada lóbulo são as colunas renais, denominadas colunas de Bertin, estruturas residuais que representam a fusão dos lóbulos primitivos dentro do blastema metanéfrico. O ápice destes termina numa papila de forma cônica, a qual por sua vez, está rodeada por um cálice menor. Cada um dos cálices menores converge para formar os grandes cálices, que, por sua vez, formam a pélvis (Kierszenbaum 2007).

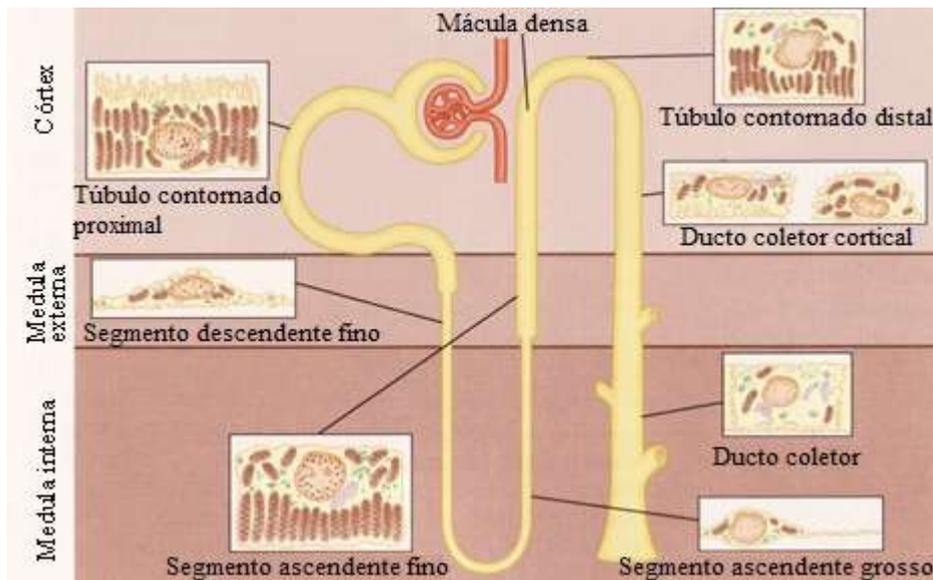


Figura 11: Diagrama do nefrônio.
(Adaptado de: Bruce M. Koeppen and Stanton 2009).

Mais especificamente é de destacar que a unidade funcional dos rins é o nefrônio. Os nefrônios são tubos ocos compostos por uma camada única de células, os quais consistem num corpúsculo renal, no qual se inserem os glomérulos capilares e a cápsula de Bowman, num túbulo proximal, na Ansa de Henle, num túbulo distal e num sistema de ductos (**Figura 11**).

O túbulo proximal forma inicialmente várias bobinas, que posteriormente formam uma secção reta, a qual dá então origem ao próximo segmento da medula, a Ansa de Henle, que é composta pela parte reta do túbulo proximal, pelo segmento descendente fino, pelo segmento ascendente fino e pelo segmento ascendente grosso. Na extremidade deste, o nefrônio passa entre as arteríolas aferentes e eferentes do mesmo nefrônio. Esta pequena secção do segmento ascendente grosso é chamada de mácula densa.

O túbulo distal começa a uma curta distância para além da mácula densa e estende-se para o córtex, onde dois ou mais nefrônios se juntam para formar uma conduta de recolha cortical. O ducto coletor cortical entra na medula e divide-se em ducto medular externo e interno.

1.2.3.2. PAPEL DA Na,K-ATPASE NA FISIOLÓGIA DO TECIDO RENAL

A Na,K-ATPase no nefrônio é responsável pelo transporte ativo primário de metade da reabsorção global de sódio e pelo transporte ativo secundário de uma série de solutos nos

túbulos proximais. Esta é particularmente importante na reabsorção de Na^+ , ao nível do segmento ascendente da ansa de Henle, do túbulo contornado distal e dos canais coletores. Nos túbulos proximais, a bomba transporta cerca de um terço do Na^+ filtrado que entra na região citoplasmática de baixo potencial eletroquímico através do co-transporte com glucose, aminoácidos, P_i , entre outros, ou por sistemas de anti-transporte com Ca^{2+} ou prótons, exercendo assim um papel importante na regulação renal (Arystarkhova et al. 2002; Lücking et al. 1996). A figura seguinte (**Figura 12**) retrata então a influência da bomba de sódio no transporte de solutos nas células renais.

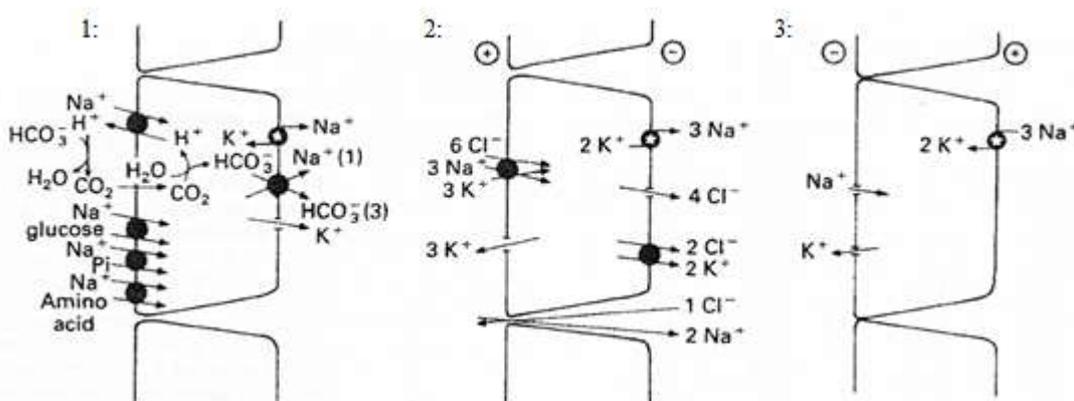


Figura 12: Esquema representativo da relação da Na,K-ATPase com o transporte de solutos em 1: Células do túbulo proximal; 2: Células do canal ascendente medular; 3: Células do túbulo coletor principal.

Nas células do túbulo proximal, a Na,K-ATPase assegura o porte energético de vários co-transportes dependentes de Na^+ , nomeadamente, Na^+ -glucose, Na^+ - P_i e Na^+ -aminoácidos. O bicarbonato é reabsorvido na forma de CO_2 , o qual se difunde através da membrana luminal da célula, e por co-transporte passivo de HCO_3^- - Na^+ , através da membrana basolateral. Nas células do canal ascendente a Na,K-ATPase energiza o co-transporte eletroneutral luminal de Na^+ / K^+ / 2Cl^- . Nas células do túbulo coletor principal, os gradientes de Na^+ e Cl^- gerados pela bomba de sódio são principalmente dissipados através de canais condutores localizados na membrana plasmática luminal, promovendo assim a reabsorção de Na^+ e a secreção de K^+ (Doucet 1988).

Ao nível do túbulo proximal, a Na,K-ATPase é responsável pelo controlo do volume das células epiteliais, contribuindo assim para a manutenção do gradiente eletroquímico mesmo em situações de pressão osmótica elevada. Do transporte de todos os solutos representados na figura em (1), são os de Na^+ , glucose, aminoácidos e P_i , os que dependem indiretamente da bomba na membrana basolateral, devido à necessidade de uma diferença de potencial, a qual é então assegurada pela Na,K-ATPase (Doucet 1988).

Apesar da ansa de Henle não se encontrar representada na figura acima, a distribuição da Na,K-ATPase nesta é uma característica particular do rim de mamífero, destacando-se que a reabsorção ativa de NaCl é particularmente importante, pois gera a energia necessária para a regulação da excreção de água. O gradiente assim gerado nos canais ascendentes é transmitido aos gradientes de ureia e NaCl na medula interna, através de características específicas de permeabilidade dos túbulos da ansa de Henle, túbulos convolutos distais e canais coletores (Jørgensen 1980).

Sabe-se que é na zona mais interna da medula externa, que contém os canais ascendentes, que existe uma maior concentração de unidades da bomba, entre todos os tecidos de mamífero. No entanto, é nas células epiteliais dos canais ascendentes medulares da ansa de Henle, que a bomba se encontra em maior quantidade no lado basal (Jørgensen 1980). A existência de canais condutores de Cl^- e K^+ nas membranas celulares basolaterais e luminais, respetivamente, na presença de uma acumulação intracelulares de ambos os iões de equilíbrio acima referidos induz uma diferença de potencial transepitelial positivo do lúmen. Esta voltagem transepitelial é desviada em parte pelo transporte de Na^+ e Cl^- ao longo das junções intercelulares condutoras (Doucet 1988).

Nos túbulos distais e canais coletores, o papel da bomba de sódio é mais claro, estando descrito que esta regula o ajuste final da excreção dos iões Na^+ e K^+ , processo este que depende de regulação hormonal. Assim a Na,K-ATPase tem a função de manter o potencial de membrana celular, que nestas zonas é negativo relativamente ao lúmen, fator parcialmente dependente da secreção de K^+ (Doucet 1988; Jørgensen 1980).

Sumariamente, no tecido renal, em particular nas células do túbulo renal, está descrita a expressão da isoenzima $\alpha 1\beta 1$ da Na,K-ATPase (Arystarkhova and Sweadner 1997; Farman 1996).

1.2.4. TECIDO CARDÍACO

1.2.4.1. FISIOLOGIA DO TECIDO CARDÍACO

O coração é um tubo dobrado, cuja parede endotelial atua como uma bomba regulada, sendo este órgão o principal determinante da pressão arterial sistémica. Assim, a parede cardíaca é constituída por três camadas, tal como se pode observar na **Figura 13**:

1. Endocárdio: O qual consiste num revestimento endotelial e tecido conjuntivo subendotelial.

2. Miocárdio: Um sincício funcional de fibras musculares estriadas cardíacas, formando três tipos de músculo cardíaco: músculo atrial, músculo ventricular e excitatório especializado e fibras musculares condutivas.

3. Epicárdio: Uma superfície de baixa fricção caracterizada pelo mesotélio em contacto com o espaço seroso pericárdico.

O coração é composto por dois sincícios de fibras musculares: sincício atrial, o qual forma a parede dos dois ventrículos, e por tecido fibroso conjuntivo, que cerca as aberturas valvulares entre os átrios e ventrículos (Kierszenbaum 2007).

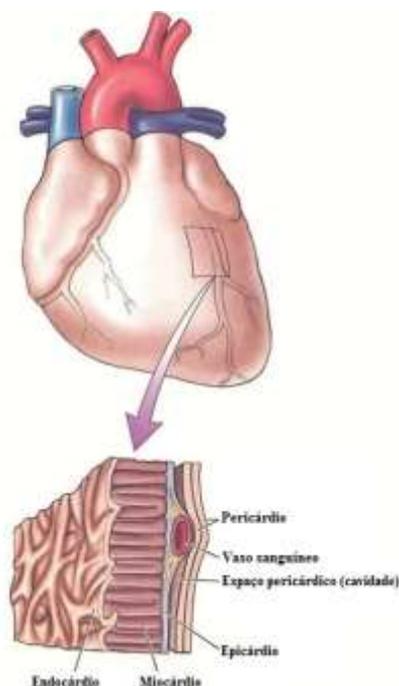


Figura 13: Histologia do músculo cardíaco.

(Adaptado de: <http://fisiologiahumanainfoco.blogspot.pt/2012/04/camadas-da-parede-cardiaca.html>).

O coração tem como principal função bombear o sangue através do sistema circulatório, a qual é conseguida através da contração altamente organizada das células do músculo cardíaco. Especificamente, as células do músculo cardíaco estão ligadas entre si para formar um sincício elétrico, através das ligações elétricas e mecânicas entre as células do músculo cardíaco adjacente.

Um potencial de ação iniciado numa região especializada do coração é, assim, capaz de passar rapidamente ao longo do coração, de modo a facilitar a contração sincronizada das células do músculo cardíaco, sincronização que é extremamente importante para o bombear do coração (Bruce M. Koeppen and Stanton 2009).

1.2.4.2. PAPEL DA Na,K-ATPASE NA FISIOLOGIA DO TECIDO CARDÍACO

A Na,K-ATPase tem ainda um importante papel na reposição dos gradientes de Na^+ e K^+ , no tecido muscular, após o desenvolvimento de um potencial de ação, o que consequentemente contribui para a manutenção do potencial de membrana, tal como foi já descrito para o tecido nervoso. O gradiente eletroquímico desenvolvido afeta

consequentemente a translocação de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, importante na extrusão de Ca^{2+} do meio intracelular, de Na^+/H^+ , importante na manutenção do pH citoplasmático, bem como, ao nível do co-transporte de $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ e de $\text{Na}^+/\text{glucose}$, indispensável à atividade contráctil (Clausen 1998).

Assim sendo, em suma, a corrente gerada pela bomba tem efeitos diretos sobre a atividade elétrica do músculo cardíaco, na medida em que pequenas variações nesta corrente alteram drasticamente a duração do potencial de ação.

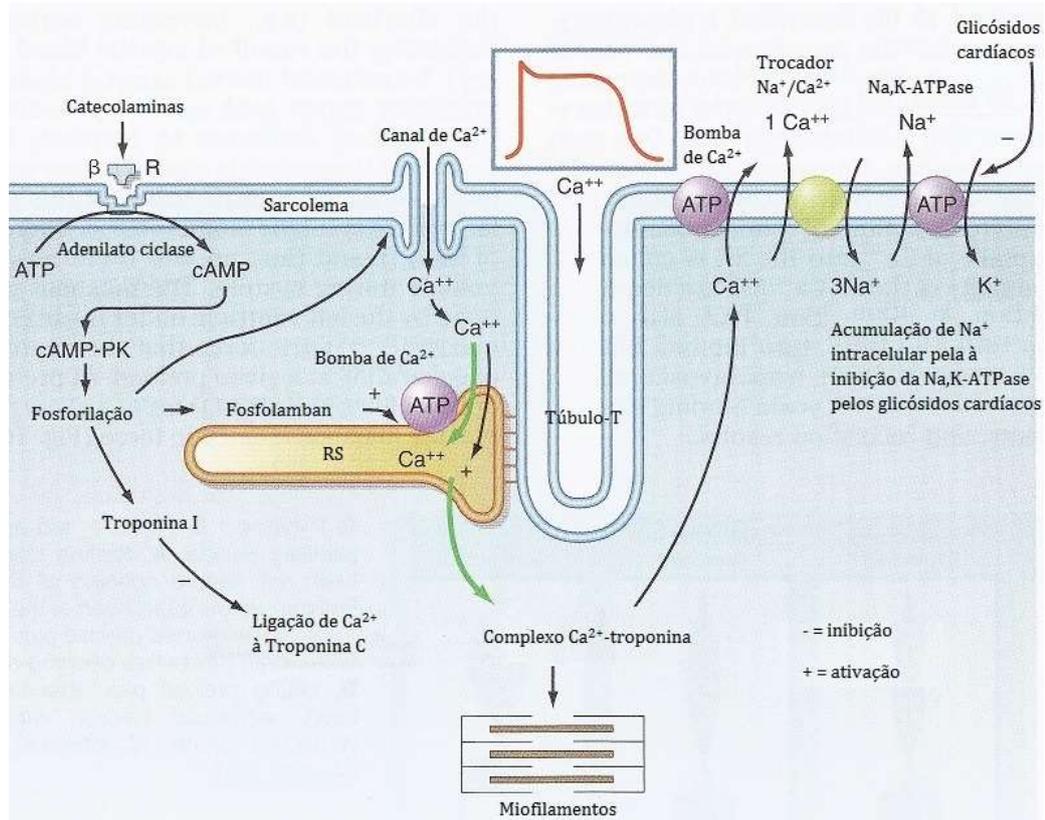


Figura 14: Diagrama esquemático do movimento do cálcio no acoplamento excitação-contracção do músculo cardíaco. O influxo de Ca^{2+} , a partir do líquido intersticial, durante a excitação provoca a libertação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS). O Ca^{2+} citosólico livre ativa a contração dos miofilamentos durante a sístole, ao passo que, no relaxamento cardíaco, na diástole, ocorre como um resultado da absorção de Ca^{2+} pelo RS, por extrusão de Ca^{2+} intracelular, através do anti-portador $3\text{Na}^+-1\text{Ca}^{2+}$, num grau limitado pela bomba de Ca^{2+} -ATPase. Legenda: βR : Recetor β -adrenérgico; cAMP-PK: proteína cinase dependente de cAMP.

A atividade da Na,K-ATPase é alvo da ação de glicósidos cardíacos, por exemplo, os quais provocam uma inibição da mesma (Figura 14). O gradiente eletroquímico da membrana não será suficiente para ativar a trocadora $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, após a sua inibição pelos glicósidos cardíacos, o que leva a que uma parte do cálcio não seja expelida para o exterior da célula, tal como deveria de ocorrer, e seja assim armazenado ao nível do retículo sarcoplasmático, de forma que, na ocorrência de nova despolarização, o excedente de cálcio libertado dará origem a um aumento da força contráctil (Clausen 1998).

No músculo cardíaco, nomeadamente em miócitos, destaca-se a expressão das isoenzimas $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 1\beta 2$, $\alpha 1\beta 3$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 2\beta 2$, $\alpha 2\beta 3$, $\alpha 3\beta 2$, bem como, $\alpha 3\beta 3$ (Arystarkhova and Sweadner 1997; Nakagawa, Qiao, and Asano 1990; Shamraj, Melvin, and Lingrel 1991; Wang et al. n.d.).

1.3. A Na,K-ATPASE NA DT2

1.3.1. DT2

A hiperglicemia é, sem dúvida, a anomalia metabólica mais evidente e que, até hoje, tem sido utilizada para diagnosticar e caracterizar a diabetes (Holt et al. 2011), uma doença crónica cada vez mais frequente na nossa sociedade, para a qual a prevalência aumenta com a idade, atingindo ainda assim ambos os sexos e todas as idades (Gardete Correia et al. 2012). Esta patologia compreende um grupo heterogéneo de distúrbios caracterizados pela hiperglicemia tanto em jejum, como no estado pós-prandial, consoante os quais diferem as várias etiologias da diabetes. Apesar das várias etiologias, destacam-se duas em particular, do ponto de vista metabólico, as quais diferem do grupo de deficiência de insulina presente, a diabetes *mellitus* tipo 1, DT1, e a diabetes *mellitus* tipo 2, DT2 (Holt et al. 2011).

Na DT2, apesar do pâncreas endócrino ter capacidade de produzir, segregar e manter em circulação concentrações de insulina, estas são inadequadas e insuficientes face às concentrações de glucose no organismo. Assim, a DT2 caracteriza-se pela inadequada ação da insulina, insuficiente secreção da mesma, ou ambos (Holt et al. 2011).

Esta é uma patologia multifatorial, para a qual contribuem fatores como a obesidade, alimentação inadequada, inatividade física, envelhecimento, insulinoresistência, história familiar de diabetes, ambiente intrauterino deficitário, etnia, entre outros (Gardete Correia et al. 2012).

Além das imensas causas que podem contribuir para o seu desenvolvimento, também extremamente preocupantes são as muitas consequências que a sua evolução despoleta, as quais afetam com o tempo muitos órgãos e tecidos do paciente. Estas consequências derivam essencialmente de uma elevada concentração de glucose no sangue, que afetam de um modo geral diversos órgãos, mas principalmente, os rins (nefropatia), olhos (retinopatia), nervos periféricos (neuropatia), sistema vascular (doença vascular periférica e cerebral) e coração (doença coronária), as quais podem levar a amputação de certos membros (como por ex.: pé

diabético), ou serem mesmo fatais com a evolução da patologia (Gardete Correia et al. 2012).

Face ao desconhecimento dos mecanismos moleculares subjacentes à DT2, é assim de extrema importância que se proceda ao estudo das alterações que os principais órgãos afetados por esta patologia destacados anteriormente apresentam, as quais podem ou não dever-se a alterações da atividade/expressão isoenzimática da Na,K-ATPase.

Na DT2 os principais defeitos fisiopatológicos são a insulinoresistência no músculo e fígado e a falência da célula β -pancreática, mas não menos importante é o aumento da lipólise no tecido adiposo, o aumento da reabsorção de glucose a nível renal, bem como, a insulinoresistência no cérebro. No fígado, a insulina inibe a glicogenólise e a gluconeogénese e, portanto, deste modo promove um aumento da formação de glicogénio. No tecido hepático a insulinoresistência provoca então um aumento da produção hepática de glucose endógena (Holt et al. 2011).

No músculo a insulinoresistência manifesta-se por captação de glucose diminuída num estado pós-prandial e resulta em hiperglicemia também neste estado. A insulina estimula ainda o transporte de glucose e o seu armazenamento como glicogénio, bem como, a atividade do ciclo dos ácidos tricarboxílicos.

Contrariamente aos dois tecidos anteriormente descritos, as células β -pancreáticas são capazes de aumentar a secreção de insulina de modo a compensar a insulinoresistência. No entanto, com o tempo, a falência das células β -pancreáticas agrava-se e, conseqüentemente ocorre um aumento dos níveis de glucose no plasma, no estado pós-prandial. A concentração de glucose no plasma, em jejum, aumenta, com o aparecimento de diabetes evidente (DeFronzo 2009).

Coletivamente, a insulinoresistência no músculo e a falência de células hepáticas e células β têm sido referidos como o trio da DT2. Além deste trio, destacam-se também os adipócitos, os quais contribuem para o conhecido quarteto “desarmonioso”, na patogénese da DT2. Cronicamente há um aumento dos níveis de ácidos gordos livres, FFA, no plasma estimulando a gluconeogénese, induzindo insulinoresistência hepática e muscular, a qual prejudica a secreção de insulina, sendo estas alterações traduzidas na lipotoxicidade. Quando a capacidade de armazenamento dos adipócitos é excedida, é ao nível dos músculos, fígado e células β que se verifica um armazenamento lipídico excessivo, promovendo a insulinoresistência do tecido muscular e hepático, mas também em células lisas vasculares arteriais, e conseqüentemente uma aceleração da aterosclerose (DeFronzo 2009).

Além destes, destacam-se ainda os rins. É descrito na literatura que, tanto para modelos animais da DT1 e DT2, a capacidade máxima tubular de reabsorção renal, T_m , aumenta com o aumento da glicose. Portanto, o rim apresenta uma resposta adaptativa por forma a conservar a glicose, essencial aos gastos energéticos do cérebro e de outros tecidos neurais. Assim, em pacientes diabéticos verifica-se que o rim conserva a glicose, em vez de a excretar através da urina e, com o tempo, este órgão tende a reabsorver a glicose, resultado de um aumento absoluto na capacidade de reabsorção renal de glicose (DeFronzo 2009).

Estudos realizados por Obici, *et al.*, em roedores também forneceram evidências ao nível da insulinoresistência cerebral, de que esta parece conduzir a um aumento da produção hepática de glicose, HGP, e reduzir a absorção da glicose muscular (Obici et al. 2001, 2002).

A insulinoresistência, mesmo quando presente em indivíduos não diabéticos, é caracterizada não só por alterações na homeostase de glicose, mas também pela deficiência na regulação de insulina, do metabolismo lipídico e do ácido úrico, da função vascular, da hemóstase e coagulação. Estas consequências, reconhecidas clinicamente pela síndrome metabólica, estão associadas com muitos componentes que podem potencialmente ser modificados para evitar a aterosclerose prematura e doenças cardiovasculares, a principal causa de mortalidade excessiva em pacientes com DT2 (Holt et al. 2011).

A insulinoresistência pode então ter origem principalmente em fatores genéticos e fatores ambientais (Holt et al. 2011), mas esta por si só não implica o aparecimento da diabetes, ainda assim contribui como um fator de *stress* ao qual as células β se submetem e que, consequentemente levaram a uma progressiva falência destas mesmas células, seguida de um aumento da glicemia, inicialmente num estado pós-prandial e posteriormente mesmo em jejum, despoletando esta situação o desenvolvimento da DT2 (DeFronzo 2009).

1.3.2. EVIDÊNCIAS DE ALTERAÇÕES DA Na,K-ATPASE DESCRITAS NA DT2

A problemática deste trabalho destaca-se pela importância que este estudo das alterações, quer de atividade, quer de expressão isoenzimática da Na,K-ATPase, num modelo animal não obeso da DT2, poderá constituir para uma futura clarificação e compreensão da patologia e da forma como a regulação desta bomba é afetada em pacientes diabéticos, visto ser este o único modelo em que permite a avaliação de alterações a nível

celular e molecular, as quais podem contribuir para o conhecimento/esclarecimento dos mecanismos subjacentes à referida patologia, e futuramente levar ao desenvolvimento de estratégias de prevenção e diagnóstico ou até mesmo ao desenvolvimento de novos alvos terapêuticos.

Este estudo pretende assim complementar a literatura até à data publicada, na qual estão registados diferentes tipos de alterações na Na,K-ATPase, associadas à diabetes, mas maioritariamente em modelos de diabetes induzidos quimicamente, os quais são “modelos” não representativos da patologia (ver **Tabela 2**), sendo os modelos de diabetes induzida quimicamente, quer por Estreptozotocina, quer por Aloxano, mais adequados para a DT1 do que para a DT2.

Tabela 2: Resumo das principais alterações, em modelos de diabetes, de atividade e/ou expressão isoenzimática da Na,K-ATPase, em diferentes tecidos ou órgãos.

Tecido	Alterações na expressão	Alterações na atividade	Modelo animal	Referência
Rim	Aumento da $\alpha 1$ e $\beta 1$	Aumento	Diabetes induzida com Estreptozotocina (STZ)	(Ng, Tolerico, and Book 1993)
Músculo cardíaco	Decréscimo da $\alpha 2$ e $\beta 1$ Sem alteração da $\alpha 1$	Decréscimo	Diabetes induzida com Estreptozotocina (STZ)	(Ng, Tolerico, and Book 1993)
Córtex cerebral	Decréscimo da $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\beta 1$ e $\beta 2$ Sem alteração da $\alpha 2$	Decréscimo	Diabetes induzida com Estreptozotocina (STZ)	(Vér et al. 1995)
Nervo	Decréscimo da $\alpha 1$ Sem alteração da $\alpha 2$ e $\alpha 3$	Decréscimo	Diabetes induzida com Estreptozotocina (STZ)	(Fink, Datta, and Mata 1994)
Nervo vago	-	Decréscimo	Diabetes induzida com Estreptozotocina (STZ)	(Nowak et al. 1995)
Cérebro	-	Sem alteração	Diabetes induzida com Aloxano	(Mayanil, Kazmi, and Baquer 1982)
Gânglios da raiz dorsal	-	Decréscimo	Diabetes induzida com Estreptozotocina (STZ)	(Green et al. 1985)
Hipocampo e córtex cerebral	-	Decréscimo	Diabetes induzida com Estreptozotocina (STZ)	(Leong and Leung 1991)
Tálamo, hipotálamo e tronco cerebral	-	Decréscimo	Diabetes induzida com Estreptozotocina (STZ)	(Leong and Leung 1991)
Corpo estriado e cerebelo	-	Sem alteração	Diabetes induzida com Estreptozotocina (STZ)	(Leong and Leung 1991)
Gânglio cervical superior	-	Decréscimo	Diabetes induzida com Estreptozotocina (STZ)	(Greene and Mackway 1986)
Nervo ciático	-	Decréscimo	Diabetes induzida com Estreptozotocina (STZ)	(Das et al. 1976)

Sarcolema cardíaco	-	Decréscimo	Diabetes induzida com Estreptozotocina (STZ)	(Pierce and Dhalla 1983)
Músculo ventricular cardíaco	-	Decréscimo	Diabetes induzida com Estreptozotocina (STZ)	(Kjeldsen et al. 1987)
Rim	-	Aumento	Diabetes induzida com Estreptozotocina (STZ) e Aloxano	(Clark, Hamel, and Queener 1983)
Túbulo coletor	-	Aumento	Diabetes Insipidus (DI)	(Trinh-Trang-Tan et al. 1985)
Segmento ascendente cortical	-	Sem alteração	Diabetes Insipidus (DI)	(Trinh-Trang-Tan et al. 1985)
Glomérulos intatos	-	Decréscimo	Diabetes induzida com Estreptozotocina (STZ)	(Cohen, Dasmahapatra, and Shapiro 1985)
Segmento ascendente medular	-	Sem alteração	Diabetes Insipidus (DI)	(Trinh-Trang-Tan et al. 1985)
Segmento ascendente medular	-	Decréscimo	Diabetes induzida com Estreptozotocina (STZ)	(Tsimarato et al. 2001)
Medula e córtex renal	-	Aumento	Diabetes induzida com Estreptozotocina (STZ)	(Wald and Popovtzer 1984)
Túbulo renal	-	Aumento	Diabetes induzida com Estreptozotocina (STZ)	(Ku, Sellers, and Meezan 1986)
Hepatócitos	-	Decréscimo	Diabetes induzida com Estreptozotocina (STZ)	(Carnovale et al. 1991)
Fígado	-	Aumento	Diabetes induzida com Estreptozotocina (STZ)	(Sennoune et al. 2000)

As complicações associadas à diabetes, das quais se destacam, a nefropatia, a retinopatia, a neuropatia, bem como, desordens a nível cardíaco estão associadas a alterações de atividade da bomba de sódio (Chibalin 2007).

Tal como se pode observar na **Tabela 2**, está descrito um aumento da atividade da Na,K-ATPase e um aumento da expressão das isoformas $\alpha 1$ e $\beta 1$, em rim, num modelo induzido por Estreptozotocina (DT1), segundo Ng, Tolerico, and Book 1993. De acordo com estes mesmos autores, já em músculo cardíaco, córtex cerebral e nervo está descrita uma diminuição da atividade da bomba e um decréscimo da expressão da isoforma $\alpha 2$ e $\beta 1$, da isoforma $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\beta 1$ e $\beta 2$, e da isoforma $\alpha 1$, respetivamente.

Alguns autores sugerem também que o funcionamento da bomba de sódio pode ser afetado na diabetes por ação inadequada da insulina sobre a bomba. Neste sentido, é assim tida em conta a hipótese da Na,K-ATPase constituir um possível alvo terapêutico a considerar, nestas patologias associadas à DT2. Por isso, ser de extrema relevância avaliar o seu funcionamento num “bom” modelo desta patologia.

1.3.3. MODELOS ANIMAIS DA PATOLOGIA

Os animais de laboratório são ferramentas fundamentais para a compreensão e estudo da base molecular das complicações da patogênese e da utilidade de diferentes agentes terapêuticos. Deste modo, os modelos animais são cruciais na investigação científica, nomeadamente em patologias multifatoriais, como por exemplo, a DT2. A variabilidade genética, os fatores ambientais e muitas outras causas fazem com que a diabetes, nomeadamente a DT2, se possa manifestar em várias condições fisiopatológicas e clínicas e, por isso, esta doença é considerada como um fenómeno único e característico de cada indivíduo. Assim, não existe um único modelo animal representativo para a investigação sobre a DT2 humana ou dos processos do seu desenvolvimento. Por isso, têm sido desenvolvidos diferentes modelos animais com o intuito de dar resposta à variabilidade e multiplicidade fisiopatológica de patologias complexas como a DT2 (Chatzigeorgiou et al. 2009).

Assim, destacam-se modelos animais com hiperglicemia severa, com possível evolução para um estado de insulino dependência na sequência da degenerescência da célula β , conhecidos como ratinho db/db, com hiperglicemia moderada, ratinho ob/ob e rato GK, ou ainda os que apresentam uma anomalia da tolerância à glucose, rato fatty Zucker, fa/fa. As síndromes descritas podem ser induzidas quimicamente, nomeadamente através da administração de estreptozotocina e de aloxano, no estado adulto ou neonatal, ou ainda por seleção dietética, bem como, por administração de doses excessivas de hormonas com efeitos contrários no que diz respeito à regulação dos níveis de glucose plasmáticos, como os glucocorticoides e glucagina, os quais induzem estados equivalentes aos das endocrinopatias (FLATT and LENZEN 1994a).

Neste trabalho foram utilizados ratos Wistar *outbred*, como controlos, e ratos Goto-Kakizaki, GK, uma variante dos primeiros obtida por *inbreeding*, como modelo animal espontâneo não obeso característico da DT2, através de reprodução seletiva.

Os ratos GK adultos caracterizam-se por hiperglicemia moderada em jejum e intolerância à glucose, insulinoresistência hepática e periférica, hiperinsulinemia em jejum, e diminuição da secreção de insulina em resposta à glucose *in vivo* e *in vitro*. Por isso, os ratos GK são uma estirpe que apresenta algumas características importantes da DT2 humana ao nível do metabolismo da glucose, na medida em que este modelo animal desenvolve hiperglicemia em jejum, diminuição da secreção de insulina em resposta à glucose, bem

como, insulinoresistência nos tecidos periféricos e no tecido hepático (FLATT and LENZEN 1994b).

Este modelo animal progressivamente caracterizado por Goto e Kakizaki, no Japão, foi produzido por reprodução endogâmica seletiva ao longo de várias gerações, com início numa colónia de ratos Wistar não diabéticos e tendo como índice seletivo a intolerância à glucose, dos quais 18 ratos foram selecionados e acasalados (endogamia) ao longo de gerações, e nos quais se conseguiu tornar a diabetes estável a partir da trigésima geração, afetando igualmente machos e fêmeas (Ceixa 1998).

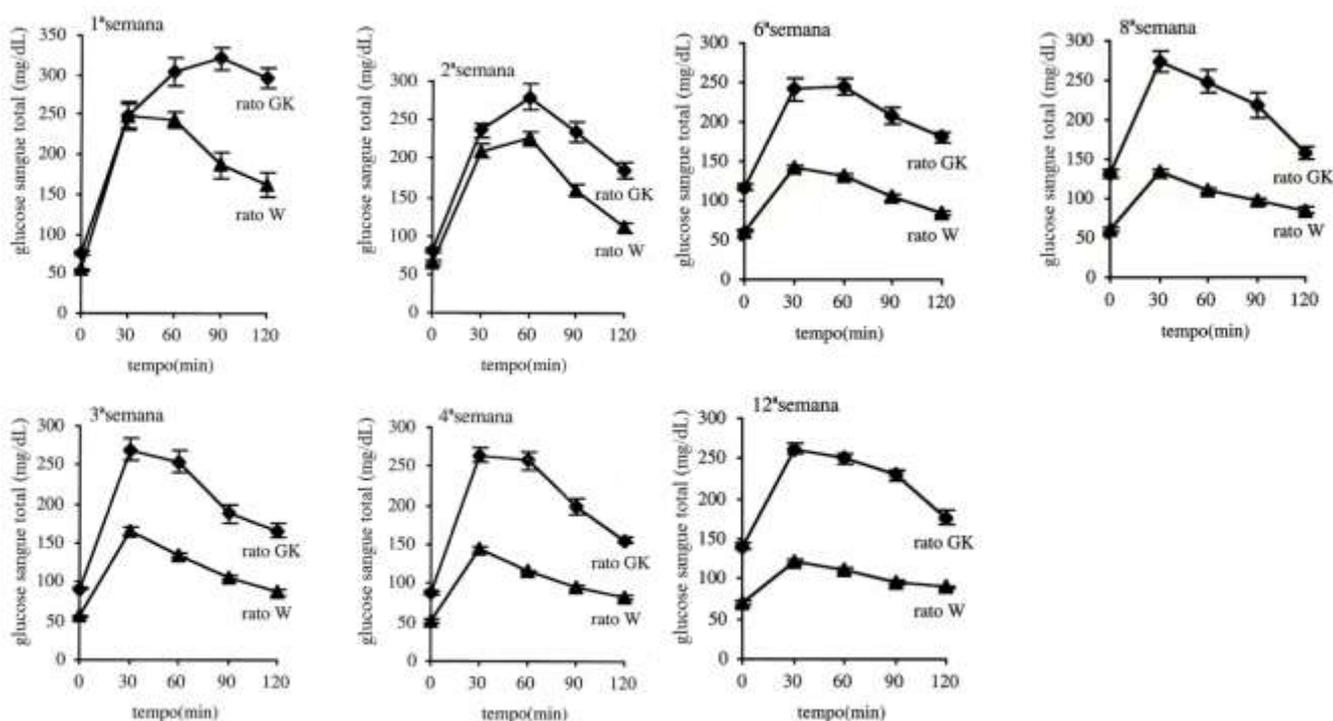


Figura 15: Provas de tolerância à glucose por via oral (PTGO) de ratos Wistar e GK com idades diferentes. (Adaptado de: Ceixa 1998).

De acordo com a figura anterior (**Figura 15**) é possível observar que os ratos Wistar, oriundos da colónia de Coimbra, apresentam uma moderada intolerância à glucose nas duas primeiras semanas de vida e uma normalização e estabilização do perfil glicémico a partir da terceira, ao passo que os ratos diabéticos exibem em qualquer idade uma marcada intolerância à glucose e hiperglicemia em jejum a partir da sexta semana de vida. Além destes dados foi também descrito que os mesmos animais diabéticos, GK, são, em jejum, normoinsulinémicos à quarta semana de vida e hiperinsulinémicos à décima segunda semana de vida (Ceixa 1998).

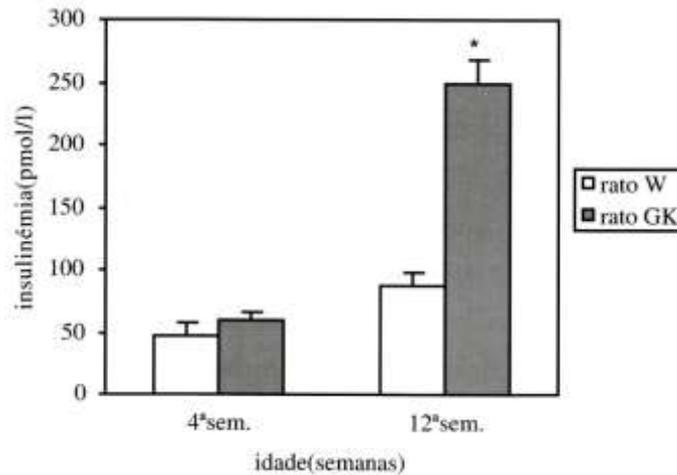


Figura 16: Insulinemia em jejum de ratos Wistar e GK com 4ª. e 12ª. semanas de vida. (Adaptado de: Ceíça 1998).

É ainda de realçar que apenas à 12ª. semana a insulinemia em jejum dos ratos GK, difere significativamente à dos ratos normais, sendo a destes últimos cerca de 2,9 vezes menor (**Figura 16**) e, portanto, os ratos GK são considerados normoinsulinémicos, em jejum, à 4ª. semana de vida e hiperinsulinémicos à 12ª. (Ceíça 1998).

Apesar de alguns sistemas do modelo animal escolhido eventualmente não corresponderem aos sistemas fisiológicos existentes em humanos adultos, este é provavelmente o melhor modelo animal para a realização deste estudo, na medida em que permite a avaliação de alterações a nível celular e molecular, as quais podem contribuir para o conhecimento/esclarecimento dos mecanismos subjacentes à referida patologia, e futuramente levar ao desenvolvimento de estratégias de prevenção e diagnóstico ou até mesmo ao desenvolvimento de novos alvos terapêuticos.

2. PROJETO

2.1. PROBLEMÁTICA

A diabetes *mellitus*, DM, uma doença metabólica de várias etiologias, é caracterizada pela hiperglicemia crônica, bem como, por perturbações do metabolismo glucídico, lipídico e proteico, resultantes da insuficiente ou inexistente secreção de insulina, da inadequada ação da insulina, ou ambos. Na DT2 os principais defeitos fisiopatológicos são a insulinoresistência no músculo e fígado e a falência da célula β -pancreática, mas não menos importante é o aumento da lipólise no tecido adiposo, o aumento da reabsorção de glicose a nível renal, bem como, a insulinoresistência no cérebro (DeFronzo 2009). Os mecanismos subjacentes à DT2 são ainda desconhecidos, o que demonstra a importância da investigação dos mesmos, para além de que se prevê que em 2030 o número de diabéticos aumente para 438 milhões, um aumento de 54% relativamente a 2010 (Holt et al. 2011).

Das principais consequências da DT2 destacam-se as complicações microvasculares específicas características da retinopatia, as quais podem conduzir à cegueira, nefropatia associada a uma potencial falência renal, e neuropatia, bem como, complicações macrovasculares (Holt et al. 2011). Apesar das consequências da DT2 serem já bem conhecidas, o conhecimento sobre as desordens das funções da membrana em diabéticos são limitadas, sendo que os danos membranares estão principalmente relacionados com a desregulação da síntese de proteínas de membrana devido a uma deficiência de insulina. Deste modo, a Na,K-ATPase, uma enzima membranar que catalisa a hidrólise de ATP e que exerce um papel fundamental na função celular, garantindo um adequado gradiente de Na^+/K^+ transmembranar, é o principal alvo de estudo deste trabalho, uma vez que exerce um papel crucial na fisiologia dos diferentes tecidos e, deste modo, é um potencial alvo terapêutico (Chibalin 2007; Siddiqui et al. 2006; Tsimaratos et al. 2001). Na literatura estão descritas algumas alterações da atividade e da expressão isoenzimática da Na,K-ATPase associadas à diabetes, em diferentes órgãos e tecidos, no entanto a grande parte destas foi realizada em modelos da diabetes quimicamente induzida, não sendo bons modelos da DT2 (Chibalin 2007). É então extremamente importante proceder-se à avaliação e estudo das referidas alterações da bomba em modelos que caracterizem bem a patologia, nomeadamente, ratos GK (animais diabéticos) relativamente a ratos Wistar (animais controlo).

Assim, neste trabalho é proposto avaliar a atividade e a expressão isoenzimática da Na,K-ATPase em diferentes órgãos (fígado, cérebro, coração e rim) num modelo animal da DT2.

2.2. OBJETIVOS

Este trabalho tem como principais objetivos averiguar eventuais alterações na atividade e/ou expressão isoenzimática da Na,K-ATPase em fígado, coração, cérebro e rim na DT2.

Para tal, recorreu-se a um modelo animal não obeso da DT2, ratos Goto Kakizaki – GK, usando como controlo ratos Wistar com idades semelhantes.

Assim, propôs-se:

- ✓ Avaliação das possíveis alterações na atividade da Na,K-ATPase em ratos Wistar e ratos GK, através da diferença de atividade ATPásica relativamente à atividade de ATPases insensíveis à ouabaína;
- ✓ Estudo de alterações na expressão isoenzimática da Na,K-ATPase em ratos Wistar e ratos GK, através de *Western Blot*, por determinação da intensidade das bandas das subunidades da respetiva bomba, e de imuno-histoquímica, por avaliação da expressão de proteínas de interesse e relacionamento das zonas de expressão com a morfologia do tecido.

2.3. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

Para a realização deste trabalho seguiu-se a estratégia experimental abaixo descrita, tendo em conta as seguintes condições:

✓ Realização do trabalho:

- **Local:** Laboratório de Bioquímica da Universidade de Évora, Departamento de Química da Universidade de Évora, Portugal.

- **Duração:** 1 ano letivo.

✓ Modelo animal e respetivas características:

- Modelo animal:

* Ratos da estirpe GK, um modelo animal não obeso da DT2;

* Ratos da estirpe Wistar (*wild-type*), da qual derivam os primeiros, como controlos.

- **Local de manutenção dos animais:** Biotério da Universidade de Évora, Portugal.

- **Crítérios de seleção dos animais:** Idade e género (fêmeas de 17 semanas).

- **Tipo de alimentação e condições de manutenção:** Alimento e água *ad libitum*, com temperatura e humidade do biotério controlados, e ciclos de 12 horas de luz e escuridão alternados.

✓ **Enzima alvo:** Na,K-ATPase (EC 3.6.3.9).

✓ **Métodos e técnicas utilizadas:**

- Determinação da atividade enzimática da Na,K-ATPase:

Para avaliação da atividade enzimática da Na,K-ATPase será efetuou-se uma prévia preparação de frações celulares enriquecidas em membranas de fígado, rim e coração e uma fração enriquecida em sinaptossomas para cérebro. A concentração de proteína da fração preparada foi determinada utilizando o método de *Bradford*.

A atividade foi determinada com base no método de Erdmann (1971) acoplada à determinação do fosfato inorgânico pelo método colorimétrico desenvolvido por Taussky and Shorr (1953).

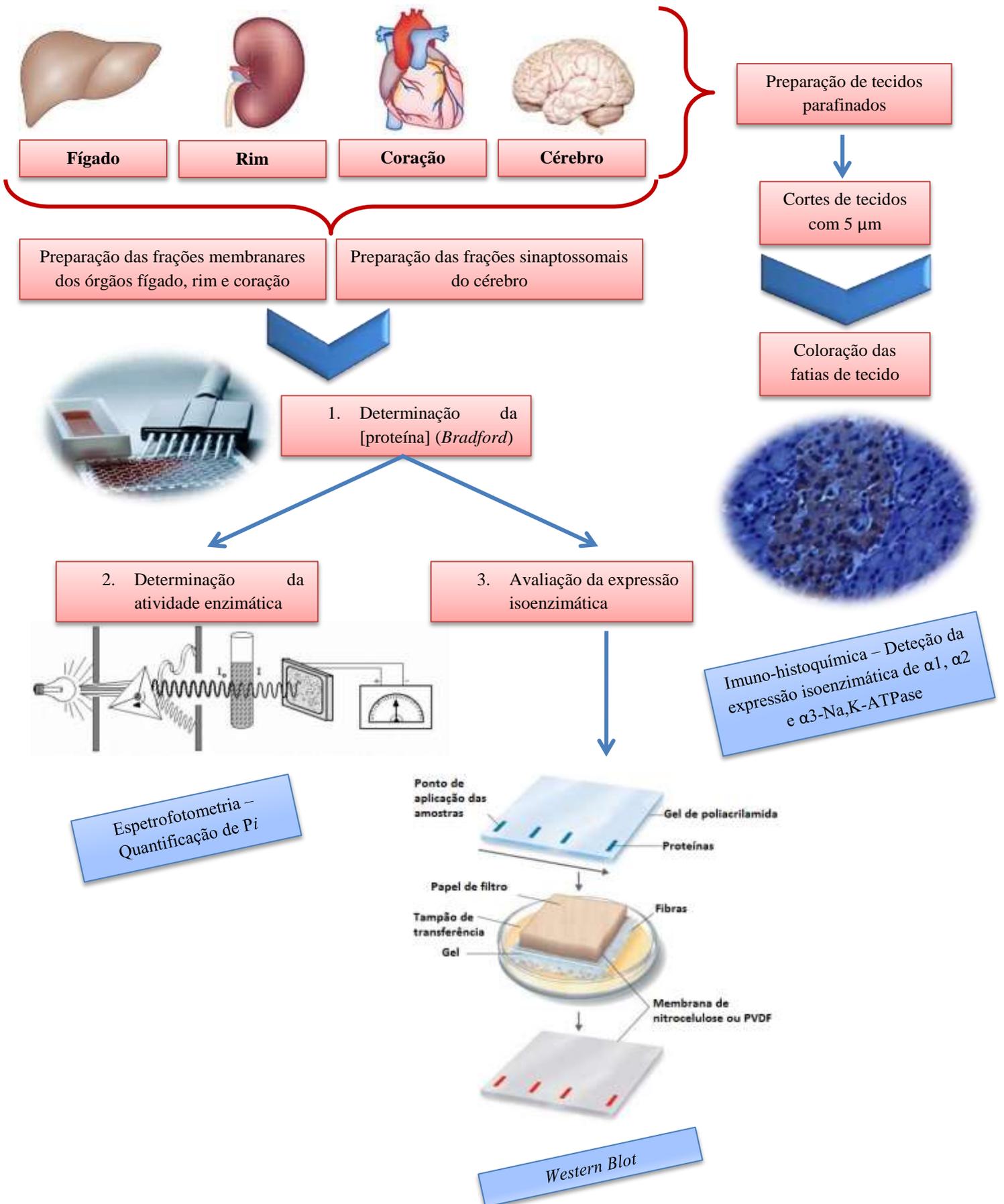
- Avaliação da expressão isoenzimática:

A expressão das várias isoenzimas da Na,K-ATPase foi avaliada por *Western Blot*. A expressão isoenzimática foi avaliada em comparação com a α -tubulina, uma proteína considerada *housekeeping*.

Para complementar a informação obtida por blot, utilizou-se a imuno-histoquímica, que permitiu avaliar a expressão isoenzimática da Na,K-ATPase *in situ*. Para isso, foi aplicado um protocolo de coloração de cortes histológicos dos tecidos em análise (*UltraVision Detection System Anti-Polyvalent, HRP/DAB kit*, Thermo Scientific).

Nota: Este plano de trabalho prevê a utilização de animais mas apenas para efetuar colheita de órgãos para o estudo. Neste sentido, e de acordo com a alínea h) do art.º 3º do DL-113/2003 que estabelece o quadro legal para a proteção de animais utilizados para fins experimentais e outros fins científicos, não se configura um *procedimento* em experimentação animal. Mais se informa que, em conformidade com o mesmo Decreto-Lei, a eutanásia dos animais decorrerá de acordo com as normas estabelecidas e por pessoa considerada competente, com creditação pelos Serviços de Saúde e proteção animal do Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas.

2.4. ORGANIGRAMA



3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. REAGENTES E SOLUÇÕES

No seguinte esquema (**Tabela 3**) encontram-se enumeradas as soluções e reagentes utilizados para a elaboração das mesmas, necessários para a realização deste trabalho.

Tabela 3: Esquema das soluções e respectivas composições utilizadas no procedimento experimental.

Preparação de frações celulares enriquecidas em sinaptossomas	Solução de isolamento:	Sacarose (0,32 M); EDTA (1 mM); Tris-HCl (50 mM); pH 7,5.
	Solução de ressuspensão:	Sacarose (0,32 M); Tris-HCl (5 mM); Hepes (5 mM); pH 7,4.
Preparação de frações celulares enriquecidas em membranas	Solução de isolamento:	NaHCO ₃ (20 mM); Sacarose (0,25 M); PHSF (0,1 mM); pH 7,0.
	Solução de ressuspensão:	Sacarose (0,32 M); Tris-HCl (5 mM); Hepes (5 mM); pH 7,4.
Determinação da concentração de proteína	Padrões:	BSA (25, 50, 75, 125, 250, 500 µg/mL) (em água).
	Reagente de Bradford:	Azul brilhante de Coomassie G-250 (0,12 mM); C ₂ H ₆ O (4,75%); H ₃ PO ₄ (8,5%) (em água).
Determinação de atividade enzimática da Na,K-ATPase	Solução-mãe de KH₂PO₄:	TCA 11,5% (2 mM); Tris-HCl (128 mM); pH 7,5; ATP (40 mM).
	Padrões para determinação da concentração de Pi:	KH ₂ PO ₄ (5, 11, 23, 45, 92, 183, 367 µM de Pi) em TCA (11,5%).
	Solução A:	NaCl (80,55 mM); KCl (6,94 mM); MgCl ₂ .6H ₂ O (5,55 mM) em tampão Tris-HCl (127,78 mM); pH 7,5; TCA (11,5%).
	Solução B:	NaCl (15,55 mM); MgCl ₂ .6H ₂ O (5,55 mM); ouabaína (1,11 mM) em tampão Tris-HCl (127,78 mM); pH 7,5; TCA (11,5%).
	Reagente sulfato de ferro-molibdato de amónio:	Molibdato de amónio (1%); Sulfato de ferro II (5%) em ácido sulfúrico (1N).

Preparação das amostras	Tampão de amostra (6x):	Glicerol (30%); Tris-HCl (1,5 M); SDS (12%); DTT (600 mM); Azul de bromofenol (0,06%); pH 6,8.
Eletroforese SDS-PAGE	Gel de resolução (7,5%):	2,5 mL Tris-HCl (1,5 M); 100 µL SDS (10%); 4,9 mL H ₂ O; 2,5 mL Acril/Bis (30%); 75 µL APS (10%); 5 µL TEMED.
	Gel de concentração (4%):	1 mL Tris-HCl (0,5 M); 40 µL SDS (10%); 2,43 mL H ₂ O; 0,53 mL Acril/Bis (30%); 24 µL APS (10%); 4,4 µL TEMED.
	Tampão de corrida pH 8,3:	Tris-HCl (250 mM); Glicina (250 mM); SDS (0,1%).
Western Blot	Tampão de transferência:	Tris-HCl (25 mM); Glicina (192 mM); Metanol (20%); SDS (0,037%); pH 8,3.
	Ponceau S (0,2%):	Ponceau S (0,2%); Ácido acético (3%).
	TBS-T (<i>Tris-HCl Buffer Saline with Tween</i>):	Tris-HCl (25 mM); NaCl (150 mM); Tween-20 (0,1%); pH 7,6.
	TBS (1x):	Tris-HCl (25 mM); NaCl (150 mM); pH 7,6.

3.2. MODELO ANIMAL

Neste trabalho foram utilizados ratos GK, da colónia de Coimbra, para obtenção do material biológico necessário para a realização do mesmo (fígado, coração, rim e cérebro). Foram utilizadas fêmeas, com idades semelhantes, cerca de 17 semanas. Como controlos, foram utilizados ratos Wistar, também do género feminino e com idades semelhantes aos anteriores.

Os animais, oriundos do biotério do Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra, CNC, foram transferidos para o biotério do Departamento de Química da Universidade de Évora, onde foram mantidos com alimento e água *ad libitum*, com temperatura e humidade do biotério controlados, e ciclos de 12 horas de luz e escuridão alternados.

A eutanásia dos animais decorreu por decapitação, de acordo com as normas do Decreto de Lei n.º113/2003, o qual estabelece o quadro legal para a proteção de animais utilizados para fins experimentais e outros fins científicos.

Os órgãos recolhidos foram congelados em azoto líquido e mantidos a -80°C até serem analisados.

3.3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.3.1. PREPARAÇÃO DE FRAÇÕES CELULARES ENRIQUECIDAS EM SINAPTOSSOMAS

Para a obtenção de frações celulares enriquecidas em sinaptossomas, procedeu-se inicialmente à descongelação do cérebro (congelado a -80°C) e, posteriormente, efetuou-se a sua pesagem.

De seguida, cortou-se o tecido em pequenos pedaços, os quais foram transferidos para o copo do homogeneizador de *Potter*, contendo 20 volumes de solução de isolamento (relativamente à massa). Após a homogeneização do tecido adicionou-se 10 μL de PHSF, um inibidor de proteases, com a finalidade de evitar a degradação proteolítica da amostra. Procedeu-se então à centrifugação do homogeneizado a 1000 g, durante 5 min, em centrífuga refrigerada (a 4°C), da qual se recolheu cuidadosamente o sobrenadante. Este último foi submetido posteriormente a uma centrifugação de 12000 g, durante 20 min, em centrífuga refrigerada (a 4°C), da qual se recolheu o sedimento, isto é, a fração mitocondrial rica em sinaptossomas. Procedeu-se então à ressuspensão do sedimento em 0,5 mL de solução de ressuspensão, tendo o cuidado de manter sempre o extrato em gelo até ao início das experiências.

O método seguido para a preparação desta fração celular enriquecida em sinaptossomas é bastante simples e rápido (Gordon-Weeks 2000), através do qual não se obtém um extrato com um grau de purificação muito elevado, sendo, no entanto, adequado para o trabalho a realizar.

3.3.2. PREPARAÇÃO DE FRAÇÕES CELULARES ENRIQUECIDAS EM MEMBRANAS

Para a obtenção de frações celulares enriquecidas em membranas, procedeu-se inicialmente ao descongelamento do órgão em estudo (coração, rim ou fígado) (preservado a

-80°C) e, posteriormente efetuou-se a sua pesagem e respetivo protocolo de preparação de frações celulares (Siddiqui et al. 2006).

Cortou-se o tecido em pequenos pedaços. Estes foram transferidos para o copo do homogeneizador de *Potter*, ao qual se adicionou inicialmente 5 mL de solução de isolamento. Depois de uma parcial homogeneização do tecido, adicionou-se novamente 5 mL de solução de isolamento ao copo. Após a homogeneização total do tecido adicionou-se 10 µL de PHSF, um inibidor de proteases, com a finalidade de evitar a degradação proteolítica da amostra. Procedeu-se então à centrifugação do homogeneizado a 1200 g, durante 10 min, em centrífuga refrigerada (a 4°C), da qual se recolheu cuidadosamente o sobrenadante. Este último foi submetido posteriormente a uma centrifugação de 9000 g, durante 10 min, em centrífuga refrigerada (a 4°C), da qual se recolheu também o sobrenadante. Posteriormente efetuou-se uma terceira centrifugação a 105000 g, durante 65 min, na ultracentrífuga (a 4°C), da qual se desprezou o sobrenadante e recolheu o sedimento. Por fim, procedeu-se à ressuspensão do sedimento em 0,5 mL de tampão de ressuspensão, mantendo sempre o extrato em gelo até ao início das experiências.

3.3.3. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA (MÉTODO DE *BRADFORD*)

3.3.3.1. PREPARAÇÃO DOS PADRÕES DE BSA

Os padrões de BSA (25, 50, 75, 125, 250, 500 µg/mL) foram preparados a partir de uma solução de 2 mg/mL de BSA, do seguinte modo (**Figura 17**):

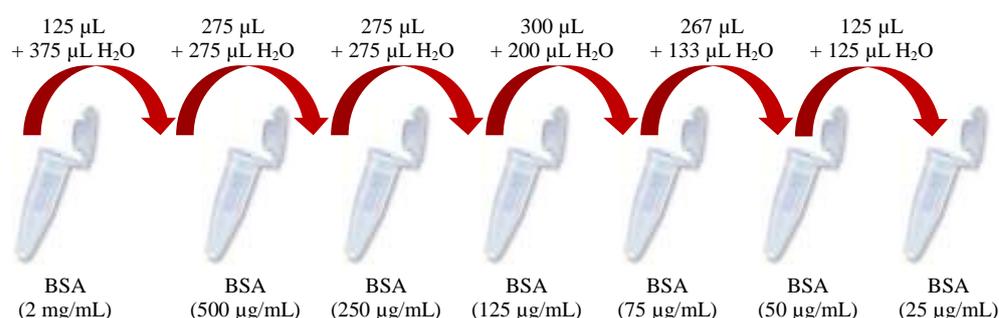


Figura 17: Esquema representativo da preparação dos padrões de BSA.

3.3.3.2. PREPARAÇÃO DAS DILUIÇÕES DAS AMOSTRAS

Seguidamente procedeu-se à preparação de três diluições das amostras em estudo (1:10; 1:250; 1:500), tal como representa o esquema seguinte (**Figura 18**):

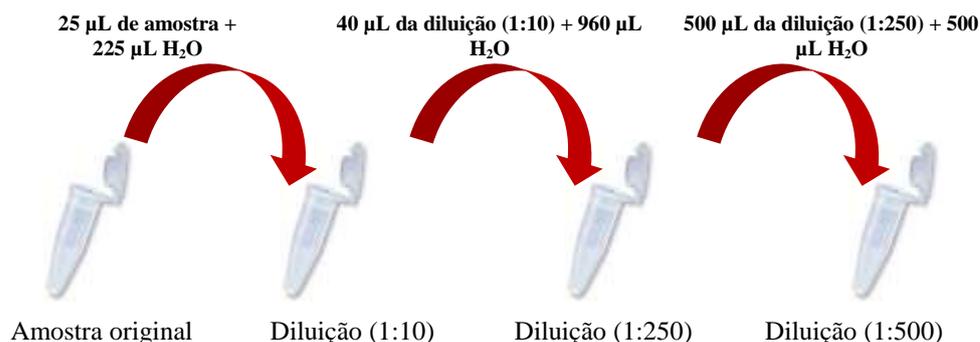


Figura 18: Esquema representativo da preparação das diluições das amostras.

3.3.3.3. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA DA FRAÇÃO PREPARADA

Finalmente procedeu-se à determinação da concentração de proteína da fração preparada, adicionando 10 µL de padrões e amostras e 200 µL do reagente de *Bradford* à microplaca, de acordo com o método de *Bradford* (Bradford 1976).

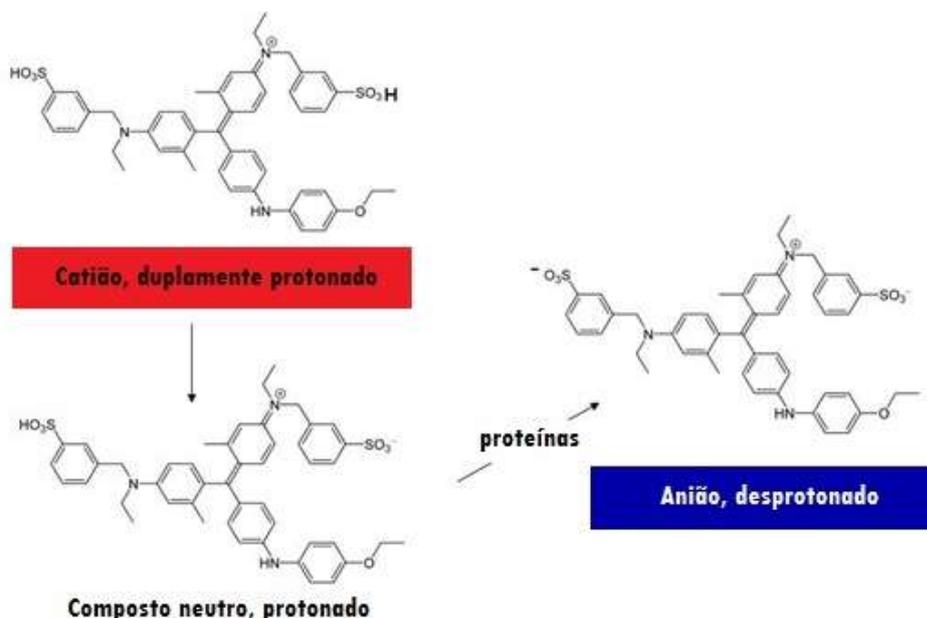


Figura 19: Representação das alterações estruturais do reagente de *Bradford* na presença de proteínas, reação esta que é utilizada para determinação da concentração proteica.

Este método é baseado na mudança de coloração do reagente azul brilhante de Coomassie G-250 de vermelho para azul após a sua ligação às proteínas na amostra (**Figura 19**). Este complexo, proteína-corante, caracteriza-se por ter um elevado coeficiente de absorvidade molar e, portanto, confere a este método uma elevada sensibilidade na determinação da concentração de proteína. É também descrito como um método bastante reprodutível e rápido, cuja reação demora aproximadamente apenas 2 minutos e mantém-se estável até cerca de 1 hora.

A leitura de absorvância da microplaca deveria ter sido efetuada a 650 nm, no entanto, devido ao equipamento utilizado esta foi efetuada a 630 nm (comprimento de onda programado no computador utilizado).

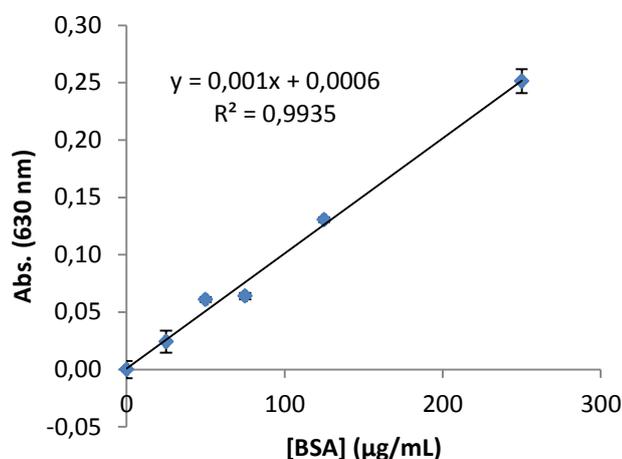


Figura 20: Exemplo de curva de calibração para quantificação de proteína pelo método de *Bradford*. Na figura representa-se uma curva exemplificativa da quantificação de proteína efetuada em todos os ensaios utilizando o método de *Bradford*. Os dados são representativos da média de três replicados, com o respetivo desvio padrão. Os parâmetros da regressão linear realizada no programa Microsoft Office Excel 2010 estão apresentados no canto superior direito da figura.

Na figura acima (**Figura 20**) é então possível observar um exemplo de uma curva de calibração para a quantificação de proteína de acordo com este método.

3.3.4. ENSAIO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA Na,K-ATPASE

3.3.4.1. ELABORAÇÃO DE UMA CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA FOSFATO INORGÂNICO (P_i)

Para a determinação de fosfato inorgânico (P_i) libertado, procedeu-se inicialmente à preparação de padrões de KH₂PO₄ em TCA 11,5%, para a elaboração de uma curva de calibração, de acordo com o método colorimétrico desenvolvido por Taussky and Shorr (1953). De acordo com este método, na presença de molibdato de amónio, o P_i libertado forma um complexo de fosfomolibdato, o qual após a redução pela ação do sulfato de ferroso, desenvolve uma coloração azul.

O uso do sulfato ferroso enquanto agente redutor confere especificidade ao método, bem como rapidez, na medida em que a cor desenvolvida no final da reação por este agente redutor ocorre muito rapidamente e permanece estável durante cerca de, pelo menos, duas horas. Além disso, é ainda de salientar a simplicidade introduzida por este agente redutor que faz com que este método seja o mais adequado para a determinação quantitativa de P_i (TAUSSKY and SHORR 1953).

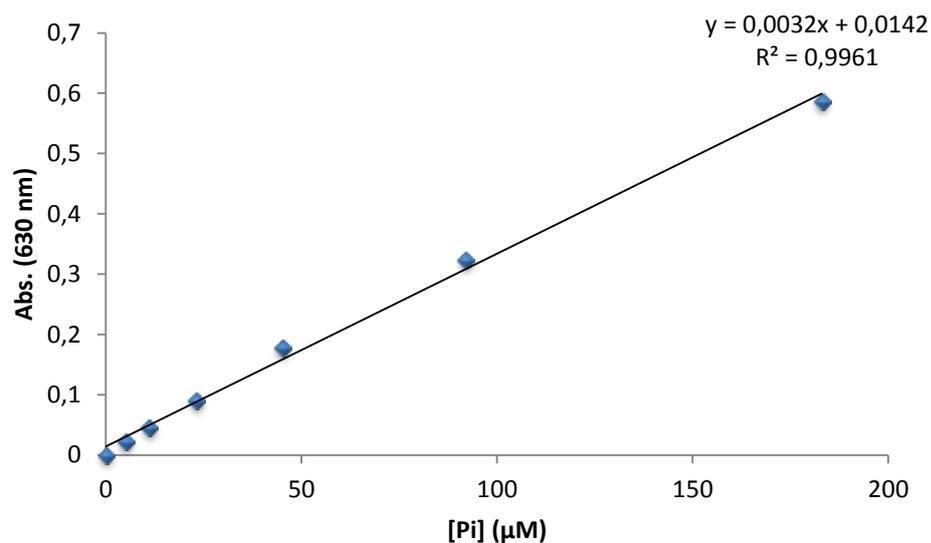


Figura 21: Exemplo de curva de calibração para quantificação de P_i , de acordo com o método colorimétrico desenvolvido por Taussky and Shorr (1953).

Na figura representa-se uma curva exemplificativa da quantificação de P_i efetuada pelo método de Taussky and Shorr. Os dados são representativos da média de três replicados, com o respetivo desvio padrão. Os parâmetros da regressão linear realizada no programa Microsoft Office Excel 2010 estão apresentados no canto superior direito da figura.

Na figura acima (**Figura 21**), é apresentado um exemplo de uma curva de calibração para a quantificação de P_i , de acordo com o método colorimétrico desenvolvido por Taussky and Shorr (1953), para a qual se preparam padrões com as concentrações finais: 5, 11, 23, 45, 92, 183, 367 μM de P_i , a partir de uma solução-mãe de KH_2PO_4 (2 mM) em TCA 11,5%.

3.3.4.2. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA Na,K-ATPase

A determinação da atividade enzimática da Na,K-ATPase foi efetuada tendo em conta o método colorimétrico proposto por Taussky e Shorr, através do qual é possível quantificar o P_i resultante da hidrólise de ATP por ação das ATPases (TAUSSKY and SHORR 1953). Assim, neste ensaio procedeu-se à quantificação da atividade enzimática das ATPases totais, bem como da atividade enzimática de todas as ATPases à exceção da Na,K-ATPase , por inibição da mesma através da presença de ouabaína e de um meio pobre em Na^+ e sem K^+ (Erdmann, Bolte, and Lüderitz 1971).

Para tal procedeu-se previamente à diluição das frações celulares de modo a que a concentração final de proteína fosse de 25 $\mu\text{g/mL}$ em todas as amostras e preparou-se uma série de tubos com as soluções apresentadas na tabela seguinte (**Tabela 4**).

Tabela 4: Esquema das soluções usadas no ensaio de atividade enzimática da Na,K-ATPase.

	Branco A	ATPases totais	Branco B	Na,K-ATPase inibida
Solução A	0,9 cm ³	0,9 cm ³	-	-
Solução B	-	-	0,9 cm ³	0,9 cm ³
Fração celular	-	0,05 cm ³	-	0,05 cm ³
Tris-HCl, 128 mM, pH 7,5	0,05 cm ³	-	0,05 cm ³	-
Pré-incubação a 37°C, 10 minutos				
ATP 40 mM	0,05 cm ³	0,05 cm ³	0,05 cm ³	0,05 cm ³
Incubação 10 minutos				
TCA 11,5%	1 cm ³	1 cm ³	1 cm ³	1 cm ³

Após a realização do ensaio propriamente dito, os tubos foram submetidos a uma centrifugação de 3000 g, durante 5 min, de modo a sedimentar a proteína. De seguida, preparou-se o reagente sulfato de ferro-molibdato de amónio, o qual foi adicionado numa proporção de 80 µL a uma microplaca, à qual se adicionou previamente 120 µL de padrões e frações a analisar. Após 1 min, no qual ocorreu o desenvolvimento da coloração azul na solução, procedeu-se à leitura de absorvância da microplaca, a qual deveria ter sido efetuada a 762 nm, no entanto, devido ao equipamento utilizado, esta foi efetuada a 630 nm (comprimento de onda programado no computador utilizado).

A atividade da Na,K-ATPase foi então obtida calculando a diferença entre os resultados da atividade das ATPases totais e a atividade da Na,K-ATPase inibida.

3.3.5. WESTERN BLOT

3.3.5.1. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

As frações celulares dos órgãos em estudo então obtidas foram preparadas para a subsequente separação de proteínas por eletroforese SDS-PAGE (**Figura 22**). Deste modo, calculou-se o volume de amostra a aplicar para que a concentração de proteína fosse igual em todos os poços. Adicionou-se então o tampão de amostra 6x, tendo em conta o fator de diluição e a razão: 1/6 Tampão de amostra e 5/6 amostra. Sempre que necessário, para completar o volume de 20 µL, adicionou-se ainda tampão da amostra 1x.

As amostras, depois de preparadas, foram colocadas num banho térmico a 45°C, durante 30 min. De seguida, estas foram colocadas em gelo e antes da sua aplicação no gel foram submetidas a um *spin* prévio, em centrífuga de bancada.

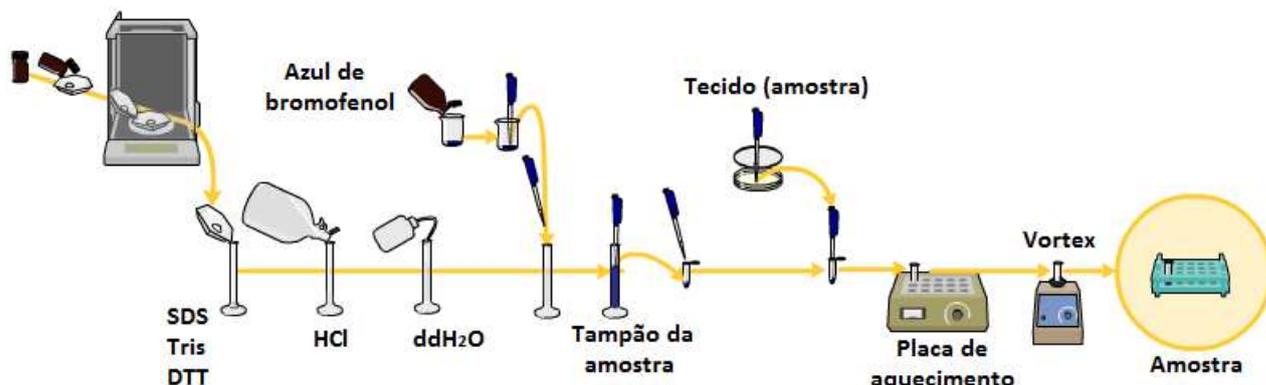


Figura 22: Esquema representativo da preparação das amostras para a corrida eletroforética. (Adaptado de: <http://protocolsonline.com/protein-science/western-blotting/>).

3.3.5.2. ELETROFORESE SDS-PAGE

A eletroforese SDS-PAGE é uma técnica essencial para a separação de proteínas, nomeadamente em amostras biológicas complexas (Cleveland et al. 1977; Rath et al. 2009), a qual é conseguida através da aplicação de um campo elétrico. A migração das proteínas ocorre a uma determinada velocidade, a qual depende da massa molecular e da carga global das macromoléculas em estudo. No sistema SDS-PAGE o tampão incorpora o SDS e um agente redutor tiólico (β -mercaptoetanol ou di-tiotreitol). Assim, neste sistema, as proteínas são desnaturadas pelo calor, as ligações dissulfureto eventualmente existentes são reduzidas, e o SDS liga-se às proteínas para que estas adquiram uma razão uniforme entre a carga e massa, sendo assim separadas exclusivamente em função da sua massa molecular (LAEMMLI 1970).

Inicialmente efetuou-se a montagem do sistema de eletroforese *Mini-Protean-3* da Bio-Rad. Procedeu-se paralelamente à preparação da solução de persulfato de amónio (APS) 10% (m/v), a qual foi de seguida colocada em gelo, protegida da luz. De seguida, efetuou-se o gel de resolução (7,5%) e, adicionou-se imediatamente essa solução ao sistema, com uma micropipeta, até 1 cm abaixo dos pentes, tendo o cuidado de não criar bolhas de ar. Adicionou-se H₂O destilada e aguardou-se cerca de 30 a 45 min, de modo a garantir a polimerização do gel. Procedeu-se então à preparação do gel de concentração e à sua aplicação no sistema, até ao topo do vidro. Por fim, colocou-se o pente e deixou-se polimerizar o gel de concentração durante cerca de 30 a 45 min, tendo o cuidado de não criar

bolhas de ar. Após a polimerização do gel de concentração, retirou-se o pente e procedeu-se à lavagem dos poços com H₂O destilada (**Figura 23**).

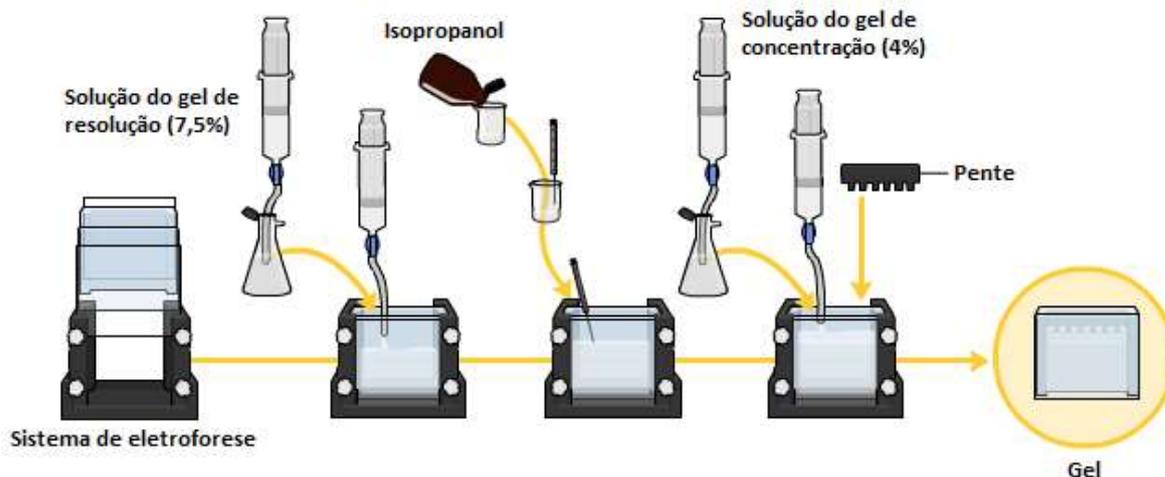


Figura 23: Esquema representativo da preparação do gel.
(Adaptado de: <http://www.answers.com/topic/sds-polyacrylamide-gel-electrophoresis>).

Foi adicionado Tampão de corrida à “câmara interna”, e foi aplicado um volume de 20 µL de amostras e 10 µL de padrão. Posteriormente foi adicionado Tampão de corrida à “câmara externa”, a qual foi completamente preenchida com este. Finalmente ligou-se a fonte de alimentação com as seguintes condições: Voltagem constante, 140 V (60 mA, 15 W), durante aproximadamente 1.30 h (**Figura 24**).

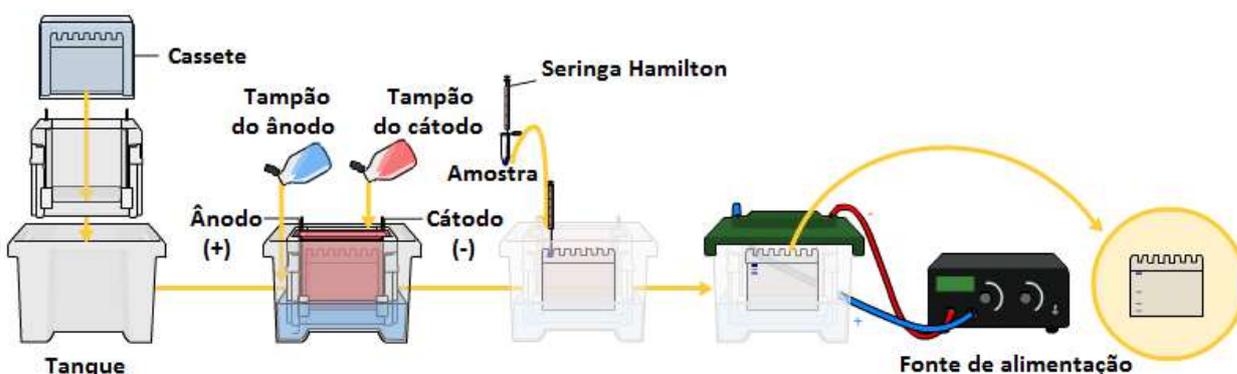


Figura 24: Esquema representativo da eletroforese SDS-PAGE.
(Adaptado de: <http://protocolsonline.com/protein-science/western-blotting/>).

3.3.5.3. TRANSFERÊNCIA ELETROFORÉTICA

O *Western Blot* (*protein blotting* ou *immunoblotting*) é uma importante técnica analítica através da qual é possível proceder à imunodeteção de proteínas após a sua separação por eletroforese SDS-PAGE (Bolt and Mahoney 1997; Hames and Rickwood 1998). Esta técnica inicia-se com a transferência das proteínas previamente separadas num

gel de poliacrilamida para uma membrana adsorvente de nitrocelulose ou PVDF (acrónimo para *Polyvinylidene difluoride*). Este processo de transferência é conseguido através da aplicação de uma corrente elétrica no gel em contacto com a membrana, na qual se forma uma réplica exata do gel. Após a transferência eletroforética procede-se então à imunodeteção, onde a membrana é sujeita à incubação com um anticorpo primário, um anticorpo secundário e respetivo substrato reacional. O *Western Blot* é assim uma ferramenta poderosa para detetar e caracterizar um grande número de proteínas (Harlow and Lane 1999; Kurien and Scofield 2006).

Retirou-se o gel do sistema de eletroforese e com uma espátula removeu-se o gel de concentração. De seguida, equilibrou-se o gel e embebeu-se a membrana (previamente ativada com metanol durante 5 s, e posteriormente lavada com H₂O destilada durante 5 min), o papel de filtro e as placas de fibras no Tampão de transferência previamente preparado (mantido a 4°C), durante cerca de 30 min. Após a preparação da *sandwich*, fechou-se a cassette e colocou-se a mesma no módulo. Repetiu-se o mesmo procedimento para a montagem da segunda cassette (**Figura 25**).

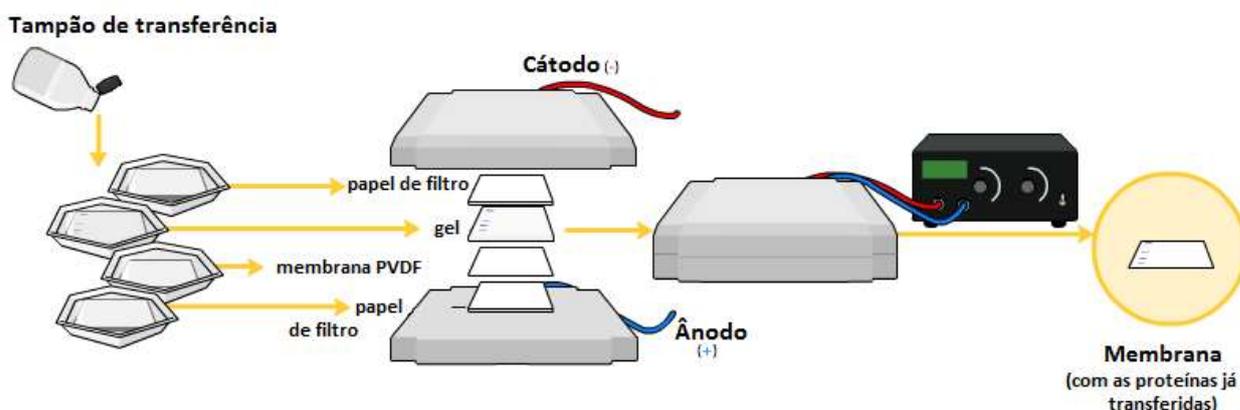


Figura 25: Esquema representativo da transferência eletroforética. (Adaptado de: <http://protocolsonline.com/protein-science/western-blotting/>).

De seguida, colocou-se a unidade de arrefecimento e encheu-se completamente o tanque com Tampão de transferência. Iniciou-se então a transferência electroforética numa tina *Mini-Trans-Blot* (Bio-Rad), após a ligação dos cabos à fonte de alimentação, tendo em conta as seguintes condições: Amperagem constante; 350 mA; 150 V; 40 W, durante cerca de 1 h. Por fim, a membrana foi corada com solução Ponceau S (0,2%) durante 15 min. Seguiram-se 3 lavagens da membrana com H₂O destilada (quando necessário, repetiu-se este procedimento até 3 vezes, para uma melhor visualização das bandas do padrão) e captação da imagem num *scanner* convencional.

3.3.5.4. IMUNODETECÇÃO

Procedeu-se inicialmente ao bloqueio da membrana com tampão TBS-T suplementado com 5% de leite magro, durante 2 h, ou *overnight* (à temperatura ambiente ou a 4°C, respetivamente). Após o bloqueio, a membrana foi lavada com solução TBS-T. Assim, marcou-se a membrana com o anticorpo primário policlonal anti- α 2-Na,K-ATPase (1:1000), produzido em coelho (*), durante 2 h, ou *overnight* (à temperatura ambiente ou a 4°C, respetivamente).

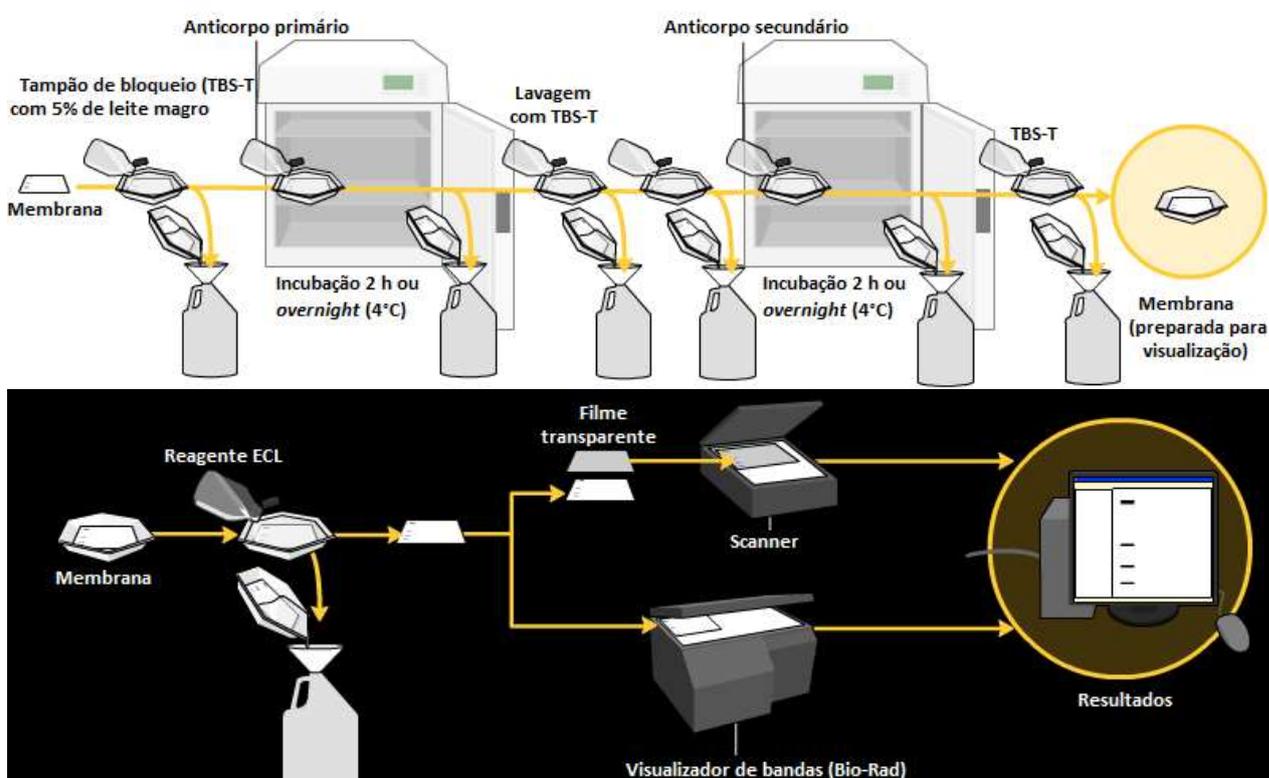


Figura 26: Esquema representativo dos procedimentos de imunodeteção.
(Adaptado de: <http://protocolsonline.com/protein-science/western-blotting/>).

Posteriormente lavou-se a membrana, durante 15 min, 3 vezes com TBS-T suplementado com 0,5% de leite magro e, de seguida, procedeu-se à sua incubação com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina, (1:10.000) (**), 2 h, ou *overnight* (à temperatura ambiente ou a 4°C, respetivamente). Seguidamente procedeu-se a 4 lavagens da membrana, durante 5 min, com TBS-T.

* Fornecido por Millipore Corporation, by: CHEMICON International, Inc. ** Fornecido por GE Healthcare, UK Limited. *** Fornecido por Sigma-Aldrich Co. LLC.

Por fim, procedeu-se à incubação com o reagente luminescente ECF *Plus Western Blotting Detection Reagents* (**), o substrato da fosfatase alcalina. Para tal, as membranas foram aplicadas sobre as gotas do respetivo reagente e, esperou-se cerca de 2/4 min, de modo a desenvolver a cor, no escuro, resultante do produto da reação (**Figura 26**).

3.3.5.5. REMARCAÇÃO DAS MEMBRANAS – “STRIPPING”

Procedeu-se à remoção do substrato ECF *Plus Western Blotting Detection Reagents*, de acordo com o método *Stripping*, de modo a remover os anticorpos das membranas, submergindo-se as mesmas durante 5 s, em metanol, à temperatura ambiente. De seguida, efetuou-se uma lavagem com água destilada, durante 5 min. Posteriormente procedeu-se a uma incubação com NaOH (0,2M), durante 5 min, seguida de nova lavagem com água destilada, também durante 5 min.

De seguida, deu-se início ao protocolo de imunodeteção, através do bloqueio das membranas com TBS-T suplementado com 5% de leite magro, durante 2 h, ou *overnight* (à temperatura ambiente ou a 4°C, respetivamente). Lavou-se a membrana com TBS-T e procedeu-se então à incubação da membrana com o anticorpo primário monoclonal anti- α -tubulina (1:200), produzido em ratinho (***), durante 2 h, ou *overnight* (à temperatura ambiente ou a 4°C, respetivamente).

Posteriormente lavou-se a membrana, durante 15 min, 3 vezes com TBS-T com 0,5% de leite magro e, de seguida, procedeu-se à sua incubação com o anticorpo secundário anti-IgG de ratinho conjugado com peroxidase de rábano-HPR (1:10.000) (***), 2 h, ou *overnight* (à temperatura ambiente ou a 4°C, respetivamente). Seguidamente procedeu-se a 4 lavagens da membrana, durante 5 min, com TBS-T.

Por fim, a membrana foi revelada com o substrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), do qual foram aplicados cerca de 2 a 3 mL sobre a membrana até ao aparecimento da coloração das bandas de interesse. Após a sua revelação, a membrana foi imediatamente submersa em água ultra pura e, de seguida, foi obtida a sua imagem através de um *scanner* convencional.

O mesmo protocolo foi efetuado para a marcação com o anticorpo primário monoclonal anti- α 1-Na,K-ATPase (1:150), produzido em ratinho (***) e para o anticorpo primário monoclonal anti- α 3-Na,K-ATPase (1:200), produzido em ratinho (***), usando-se para ambos o anticorpo secundário anti-IgG de ratinho conjugado com HPR (1:10.000).

3.3.6. IMUNO-HISTOQUÍMICA

A imuno-histoquímica (IHC) surge em 1941, data em que começou a ser descrita a utilização de anticorpos para a deteção de antigénios em cortes de tecido, e que marcou o nascimento da IHC. Desde então, o número de testes, a sua especificidade e sensibilidade têm aumentado grandemente. Embora a sua principal aplicação inicialmente fosse a caracterização de neoplasias, esta técnica atualmente tem aplicações mais amplas e mais orientadas clinicamente ao nível do diagnóstico, prognóstico, tomada de decisão terapêutica e patogénese. Essencialmente, a IHC preenche a lacuna existente entre a histopatologia clássica e a patologia molecular e, por isso mesmo, considera-se que relaciona três disciplinas fundamentais, a imunologia, histologia e química (Ramos-Vara and Miller 2014).

Esta técnica tem como princípio básico a localização visual da célula ou tecido alvo, recorrendo à utilização de anticorpos específicos para os antigénios a detetar, numa razão satisfatória de sinal-ruído e embora seja conceitualmente simples, a sua metodologia tornou-se mais complexa, com requisitos mais rigorosos de sensibilidade e especificidade e torna-se particularmente importante na medida em que, além de permitir a avaliação da expressão de proteínas alvo, permite também relacionar essa expressão com as zonas da estrutura morfológica dos tecidos em que a mesma se verifica.

Os métodos iniciais simples (diretos) permitiam produzir resultados rápidos, mas a sua sensibilidade ficava aquém do pretendido. Atualmente, os métodos extremamente sensíveis podem detetar um ou vários antigénios, simultaneamente, ou podem mesmo englobar centenas de tecidos, na mesma secção (tecnologia de *microarrays* de tecido) para detetar a presença de um antigénio particular. É ainda de realçar que a IHC permite uma co-localização de um antigénio com uma lesão, aumentando assim drasticamente a interpretação de diagnóstico e compreensão da patogenia, ao contrário de muitas outras técnicas de deteção (Ramos-Vara and Miller 2014).

A imuno-histoquímica é uma técnica potencialmente utilizada na investigação científica para localização da Na,K-ATPase em vários tecidos, tanto em condições fisiológicas como patológicas (Kobayashi et al. 2003), sendo assim considerada uma importante ferramenta que permite efetuar tanto uma avaliação semi-quantitativa dos níveis de expressão isoenzimática da referida bomba, como também, nos permite situá-los morfológicamente no tecido em análise. Esta técnica baseia-se assim na marcação das secções do tecido em análise com anticorpos específicos, os quais estabelecem uma reação

com o respetivo antigénio, através de uma reação histoquímica que é detetada por microscopia de luz visível ou por fluorescência de luz ultravioleta. Assim é possível obter uma avaliação da expressão de proteínas de interesse, tal como, o relacionamento das zonas de expressão com a morfologia do tecido (Ramos-Vara 2005).

Para preparação das secções de parafina, as secções de tecido a analisar foram desparafinadas com xileno e re-hidratadas numa série graduada de etanol. De seguida, procedeu-se à lavagem do tecido a preparar num banho de PBS durante 10/15 min, antes de se iniciar o processo de coloração (**Figura 27** – etapa 1).

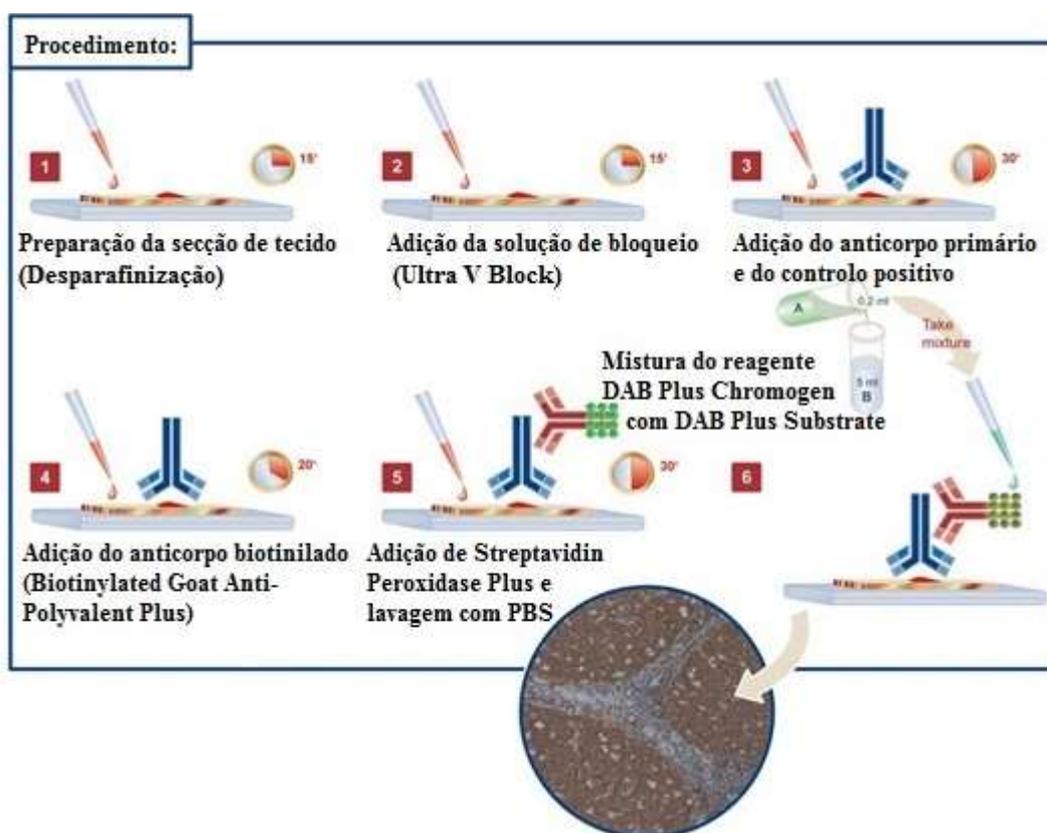


Figura 27: Representação do procedimento de imuno-histoquímica.
(Adaptado de: <http://withfriendship.com/images/h/38739/Immunohistochemistry-image.jpg>).

Seguidamente, acrescentou-se 2 gotas (aproximadamente 100 μ L) de solução *Ultra V Block* a cada secção de tecido durante 10/15 min, de modo a concretizar o bloqueio destas mesmas secções (**Figura 27** – etapa 2). Por fim drenou-se a solução, sem enxaguar.

Posteriormente aplicou-se cerca de 100 μ L de cada um dos anticorpos primários, em câmara húmida, durante 30 a 60 min (**Figura 27** – etapa 3). Após o tempo de incubação, enxaguou-se com PBS-T, 4 vezes, durante cerca de 2 min. Procedeu-se de seguida à aplicação de 2 gotas do anticorpo biotilado, *Biotinylated Goat Anti-Polyvalent Plus*, a cada preparação, durante cerca de 20 min. Enxaguou-se com PBS-T, 4 vezes, durante cerca de 2

min (**Figura 27** – etapa 4). Numa quinta etapa procedeu-se à aplicação de *Streptavidin Peroxidase Plus*, enxaguando-se de seguida com PBS-T, como nas etapas anteriores.

Finalmente, procedeu-se à mistura de 40 µL do reagente DAB Plus Chromogen com 2 mL de DAB Plus Substrate, de modo a obter a solução Cromogénio DAB, aplicando-se 2 gotas desta a cada secção, enxaguando-se por fim com água destilada. Este cromogéneo permite a visualização da expressão da proteína de interesse com coloração castanha.

Fez-se a coloração de contracoloração com 2 gotas de Hematoxilina e colocaram-se as lâminas em PBS até ficarem azuis. De seguida, lavaram-se as mesmas com água destilada e aplicaram-se 2 gotas de CLEARMOUNT, aqueceu-se a 37°C *overnight*, ou a 60°C durante 30/60 min.

3.4. ANÁLISE DOS RESULTADOS

3.4.1. ANÁLISE DOS BLOTS

A imagem de fluorescência das membranas foi captada e analisada pelo sistema *Bio-Rad Gel-doc (system e software)* e a determinação das massas moleculares, foi efetuada no *software* de análise de imagem Quantity One (Bio-Rad). Nas membranas em que a revelação se fez utilizando o TMB, o produto de reação não é fluorescente e, nesse caso, a captação da imagem foi feita num *scanner* convencional.

As bandas detetadas foram delineadas e quantificadas no *software* de análise de imagem *SIGMA Scan Pro 5*, por forma a determinar a intensidade destas, as quais foram expressas em intensidade/mm² das bandas selecionadas, relativamente à expressão da intensidade da α -tubulina, utilizada como padrão.

3.4.2. ANÁLISE DAS FOTOMICROGRAFIAS

A análise das lâminas histológicas foi efetuada por microscopia ótica com um microscópio Nikon Eclipse 600 acoplado a uma câmara digital Nikon DN100, com a qual se obtiveram as fotomicrografias. Foram assim efetuadas uma média de seis fotografias por lâmina com ampliações de 4, 10 e 400X, registando-se uma classificação da intensidade da coloração apenas qualitativamente.

3.4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados obtidos foi efetuada com recurso ao teste de análise de variância (ANOVA), do programa Microsoft Office Excel 2010, para a avaliação do significado estatístico da diferença entre os valores médios de dois grupos de resultados, modelos animais controlo e GK, respetivamente. Foi assim considerado um valor de $p < 0,05$ como significativo em todos os casos, excetuando os gráficos de atividade enzimática da Na,K-ATPase (**Figura 29**) para os quais se considerou um valor de $p < 0,10$.

Os resultados apresentados consideram os valores médios de cada amostra respetivamente \pm erro padrão da média (e.p.m.).

Os gráficos apresentados foram realizados no programa *OriginPro 8 (OriginLab Corporation, USA)*.

4. RESULTADOS

4.1. ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA Na,K-ATPASE

Neste capítulo, encontram-se os resultados referentes à primeira etapa do trabalho de determinação e avaliação da atividade enzimática da Na,K-ATPase em frações sinaptossomais e frações membranares de rim, fígado e coração, de acordo com o método de Erdmann (1971) acoplado à determinação do fosfato inorgânico pelo método colorimétrico desenvolvido por Taussky and Shorr (1953).

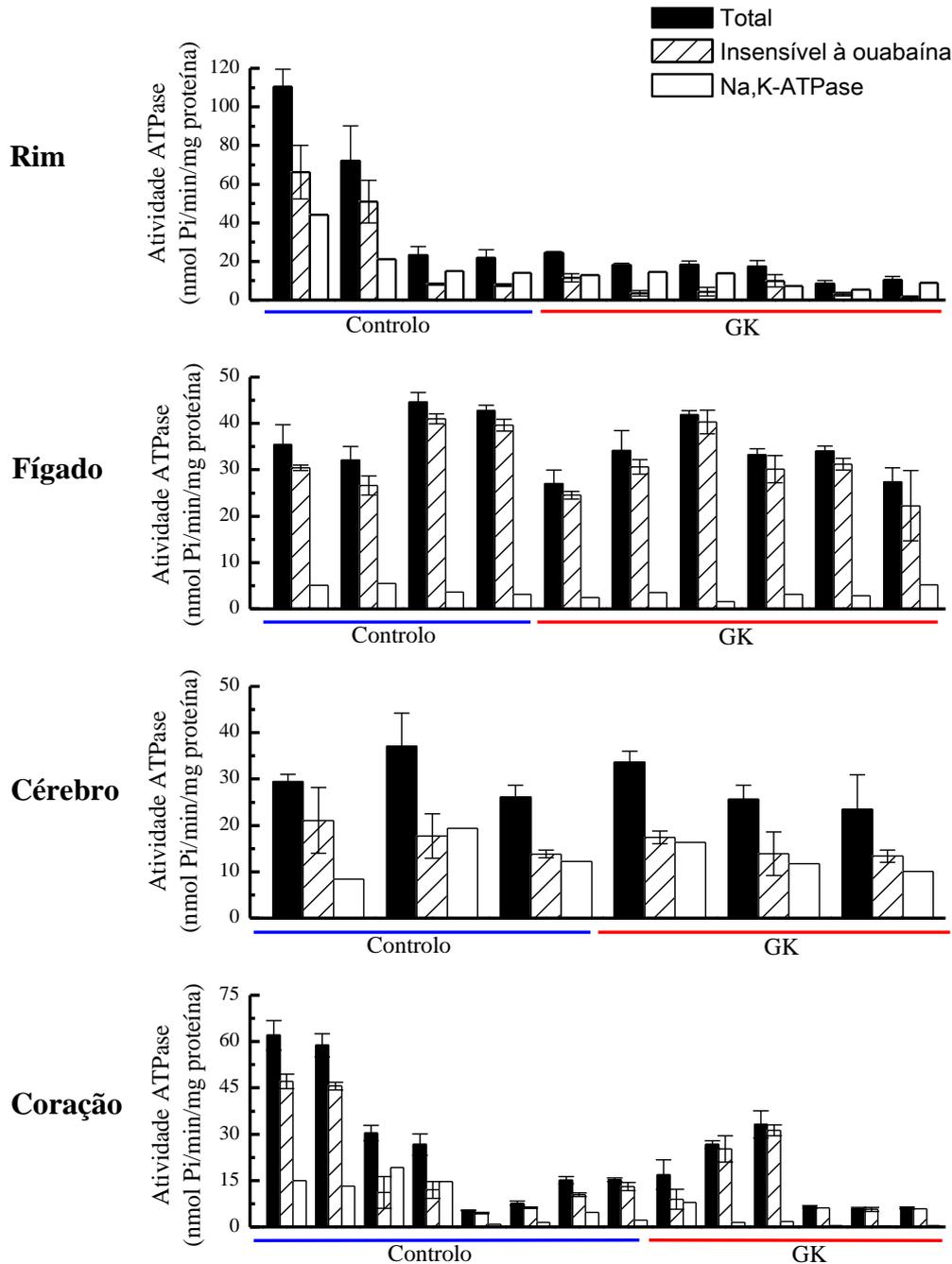


Figura 28: Representação da atividade enzimática total, insensível à ouabaína e da Na,K-ATPase, respetivamente, em ratos controlo e GK, em rim, fígado, cérebro e coração. Resultados representativos da média \pm desvio padrão de um conjunto de cinco determinações de atividade por cada amostra de controlo e GK.

A figura anterior (**Figura 28**) representa a atividade enzimática das ATPases totais (barras pretas), bem como a atividade enzimática de todas as ATPases à exceção da Na,K-ATPase (barras riscadas), o que é conseguido por inibição da mesma através da presença de ouabaína (1mM) e de um meio pobre em Na⁺ e sem K⁺ (Erdmann, Bolte, and Lüderitz 1971). A atividade da Na,K-ATPase corresponde à diferença entre a atividade das ATPases totais e a atividade insensível à ouabaína e está também representada no gráfico (barras brancas).

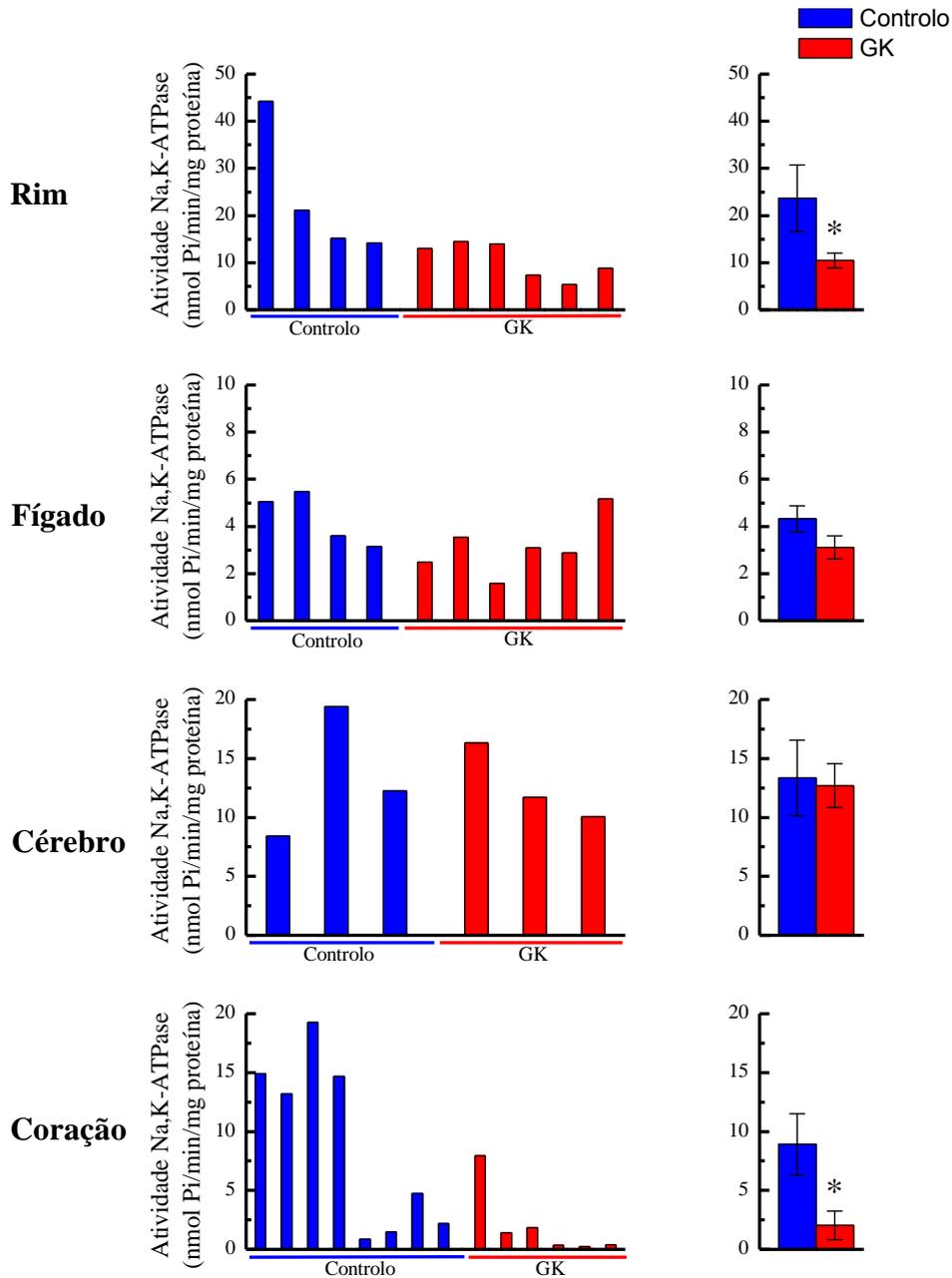


Figura 29: Determinação da atividade enzimática da Na,K-ATPase individual e média, em ratos controlo e GK, em rim, fígado, cérebro e coração, respetivamente. Resultados representativos da média ± epm de um conjunto de animais por cada grupo.

Os gráficos da **Figura 29** representam apenas os valores de atividade da Na,K-ATPase, equivalentes aos da figura anterior, embora num sistema de eixos que permite uma melhor comparação entre indivíduos. Representam-se ainda, no painel da direita, as médias calculadas dentro de cada grupo, com o objetivo de comparar a atividade enzimática entre controlos e GK.

Os resultados obtidos apontam para uma redução da atividade da Na,K-ATPase em tecido renal de 55,7 % em GK (n=6 para GK e n=4 para Wistar), com uma atividade de $23,7 \pm 0,7$ e $10,5 \pm 1,6$ nmol Pi/min/mg de proteína, em controlo e GK, respetivamente.

Em fígado e cérebro não se registaram alterações significativas. Em fígado registou-se uma atividade de $4,3 \pm 0,6$ e $3,1 \pm 0,5$ nmol Pi/min/mg de proteína, em controlo e GK, respetivamente (n=6 para GK e n=4 para Wistar). Em cérebro registou-se uma atividade de $13,4 \pm 3,2$ e $12,7 \pm 1,9$ nmol Pi/min/mg de proteína, em controlo e GK, respetivamente (n=3 para GK e Wistar).

Em tecido cardíaco, foi registado, tal como em tecido renal, um decréscimo da atividade da Na,K-ATPase, mas neste caso de 77,5% em GK (n=6 para GK e n=8 para Wistar), com uma atividade de $8,9 \pm 2,6$ e $2,0 \pm 1,2$ nmol Pi/min/mg de proteína, em controlo e GK, respetivamente.

Em suma, estes resultados sugerem que a atividade enzimática da Na,K-ATPase parece sofrer uma diminuição, em animais GK relativamente a ratos controlo, em tecido renal, bem como em tecido cardíaco e, portanto, a função da bomba de sódio parece estar comprometida no modelo animal GK. Por outro lado, em cérebro e fígado, a atividade enzimática da bomba de sódio parece não variar significativamente.

Por fim, os resultados obtidos neste capítulo podem sugerir que, subjacentes às alterações de atividade verificadas podem estar alterações da expressão isoenzimática e/ou um desacoplamento na cascata de sinalização, através da regulação da bomba de sódio.

4.2. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO ISOENZIMÁTICA DA Na,K-ATPASE

Tendo em conta as diferenças de atividade enzimática da Na,K-ATPase entre ratos controlo e GK (ver capítulo 4.1), surgiu a necessidade de avaliar se estas alterações poderão contribuir para diferenças da expressão isoenzimática da bomba de sódio, pois, noutros tecidos que não o do pâncreas, a regulação desta é extremamente complexa e envolve vários mecanismos de regulação, nomeadamente, a regulação da expressão isoenzimática. Assim,

procedeu-se à avaliação da expressão isoenzimática das isoformas α_1 , α_2 e α_3 da Na,K-ATPase por *Western Blot* e por imuno-histoquímica.

O *Western Blot* é uma técnica analítica extremamente utilizada para detetar proteínas específicas numa determinada amostra, a partir da separação das mesmas por eletroforese em gel e consequente transferência para uma membrana adsorvente, onde posteriormente é possível proceder à imunodeteção das proteínas de interesse (Bolt and Mahoney 1997).

Esta técnica permite então detetar, caraterizar e quantificar múltiplas proteínas, principalmente quando estas se encontram em pequenas quantidades na amostra em estudo. Nesta técnica beneficia-se do fácil manuseamento e da maleabilidade das membranas, da rapidez e simplicidade com que se imobilizam as proteínas na membrana e de como estas ficam uniformemente disponíveis aos diferentes ligantes, além de que é possível fazer várias réplicas do mesmo gel e do facto de, após transferência ser possível utilizar a mesma membrana para remarcação das mesmas amostras com diferentes anticorpos (Kurien and Scofield 2006).

Assim considera-se que este método é extremamente sensível e específico, o qual é considerado como o método de eleição para diagnóstico de inúmeras doenças (Kurien and Scofield 2006). No entanto, há que ter em consideração que é frequente a ocorrência de reatividade cruzada e/ou inespecífica que origina falsos positivos.

A imuno-histoquímica, IHC, é uma técnica que tem como princípio básico a localização visual da célula ou tecido de um alvo molecular específico, com anticorpos específicos, os quais estabelecem uma reação com o respetivo antigénio, através de uma reação histoquímica que é detetada por microscopia de luz visível ou por fluorescência de luz ultravioleta. Assim é possível obter uma avaliação da expressão de proteínas de interesse, tal como, o relacionamento das zonas de expressão com a morfologia do tecido (Ramos-Vara 2005).

Deste modo, ambas as técnicas serão aplicadas para avaliação das alterações da expressão isoenzimática da Na,K-ATPase, com o intuito de complementar e comparar a informação dada por cada uma destas técnicas.

4.2.1. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO POR *WESTERN BLOT*

A Na,K-ATPase apresenta diferentes isoenzimas, compostos por diferentes combinações da subunidade $-\alpha$ e $-\beta$. Sendo a subunidade $-\alpha$ a responsável pela oclusão dos

iões, bem como a que contém o local de fosforilação e a zona reconhecida pela ouabaína, é esta a subunidade que será alvo de avaliação neste trabalho. As várias isoformas da subunidade α apresentam um padrão de expressão que é específico de cada tecido e, até, de cada linha celular dentro dum determinado tecido. Essa diferenciação de expressão permite que a Na,K-ATPase, para além da função geral de manutenção do potencial de membrana, possa ter ações diferenciadas e desempenhe papéis adequados a determinadas funções específicas nos vários tecidos, o que se deve à diferente sensibilidade que os vários isoenzimas apresentam para os catiões e para o ATP e também ao facto de apresentarem vias de regulação intracelulares específicas. É assim importante caracterizar então a expressão da subunidade α nos tecidos estudados. Assim, foi necessário proceder-se inicialmente à otimização desta técnica para adequar a mesma a cada tipo de amostra (tecido) em estudo.

4.2.1.1. OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA

A primeira fase de otimização da técnica de *Western Blot* é ao nível da preparação das diferentes amostras a aplicar no gel de eletroforese. Este processo de otimização tem então em consideração as características intrínsecas das respetivas amostras. Uma das observações mais evidentes foi que, após preparação dos homogeneizados com tampão de amostra, a sua desnaturação proteica realizada em banho seco proporcionava uma aplicação e distribuição no gel muito mais homogénea, aquecendo as amostras a 45°C durante 30 min, ao invés de se proceder a esse aquecimento a 95°C durante 5 min.

Assim seguiu-se o procedimento do protocolo fornecido para *Western Blot* para o anticorpo anti- α 2-Na,K-ATPase (Millipore) segundo o qual se considera a hipótese de ocorrer a formação de agregados proteicos quando a desnaturação de proteínas é efetuada a temperaturas muito elevadas, como a 95°C, e assim optou-se por estandardizar o processo de desnaturação efetuando o mesmo a 45°C durante 30 min (**Figura 30**).

Um outro aspeto em consideração foi a solução de bloqueio da membrana a utilizar, pois duas das opções seriam uma solução de BSA ou de leite magro. Após se terem testado ambas verificou-se que, de facto, não se conseguiam melhorias significativas com o BSA e assim optou-se pela utilização de uma solução de leite magro (mais económica).

Membranas com frações de rim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	30 µg	60 µg	100 µg	150 µg	P BioRad	30 µg	60 µg	100 µg	150 µg	X	30 µg	60 µg	100 µg	150 µg	P BioRad	30 µg	60 µg	100 µg	150 µg	X
Marcação com $\alpha 1$ -Na,K-ATPase					Marcação com α -tubulina					Marcação com $\alpha 1$ -Na,K-ATPase					Marcação com α -tubulina					
Membranas com frações de fígado	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	30 µg	60 µg	150 µg	200 µg	P BioRad	30 µg	60 µg	150 µg	200 µg	150 µg*	20 µg	25 µg	30 µg	60 µg	P BioRad	20 µg	25 µg	30 µg	60 µg	20 µg+
Marcação com $\alpha 1$ -Na,K-ATPase					Marcação com α -tubulina					Marcação com $\alpha 1$ -Na,K-ATPase					Marcação com α -tubulina					
Membranas com frações sinaptossomais	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	20 µg	35 µg	50 µg	75 µg	P BioRad	20 µg	35 µg	50 µg	75 µg	20 µg+	20 µg	35 µg	50 µg	75 µg	P BioRad	20 µg	35 µg	50 µg	75 µg	100 µg*
Marcação com $\alpha 1$ -Na,K-ATPase					Marcação com α -tubulina					Marcação com $\alpha 1$ -Na,K-ATPase					Marcação com α -tubulina					

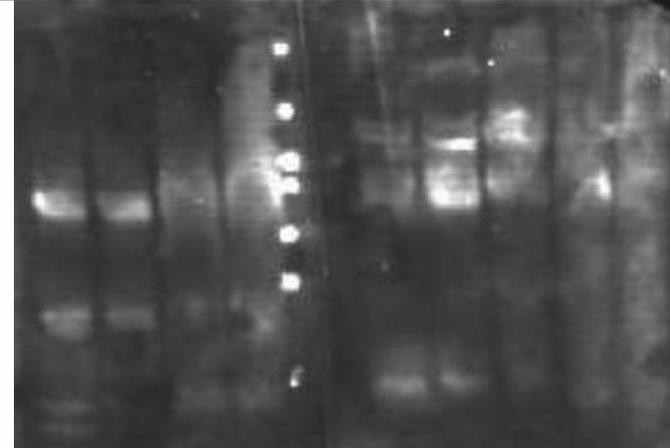
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	20 µg	30 µg	50 µg	60 µg	P BioRad	20 µg	30 µg	50 µg	60 µg	150 µg*	100 µg*	60 µg	50 µg	30 µg	20 µg	P BioRad	60 µg	50 µg	30 µg	20 µg
Membranas com frações de coração																				
	Marcação com α 1-Na,K-ATPase					Marcação com α -tubulina					Marcação com α 1-Na,K-ATPase					Marcação com α -tubulina				

Figura 30: Estudos de otimização do método de análise da expressão isoenzimática da Na,K-ATPase por *Western Blot* (*: Rim; +: Coração).

Neste processo de otimização foram também testadas quais as melhores diluições a aplicar aos anticorpos, considerando-se assim para o anticorpo primário monoclonal anti- α -tubulina uma diluição de 1:200, para o anticorpo primário monoclonal anti- α 1-Na,K-ATPase, produzido em ratinho, uma diluição de 1:150, e para o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina uma diluição de 1:10.000.

Um outro aspeto também crucial para a qualidade da revelação das membranas corresponde ao tempo de incubação com o substrato ECF *Plus Western Blotting Detection Reagents*. De acordo com o fabricante, este pode ser aplicado durante 2 a 4 min, no entanto, pelas experiências realizadas neste tipo de amostras, concluiu-se que o tempo suficiente para obter bandas bem visíveis e definidas e com uma boa razão sinal-ruído, a incubação deveria ser no máximo de apenas 1 min.

Além disso, foram também testadas diferentes concentrações de amostra, por forma a visualizar qual a concentração “ideal” para a obtenção de bandas bem visíveis e com uma boa razão de sinal-ruído. Com esta gama de concentrações foi possível proceder à execução de curvas de calibração em que se expressa o volume das bandas detetadas em função da concentração de proteína de amostra aplicada, como o exemplo apresentado na figura seguinte (**Figura 31**).

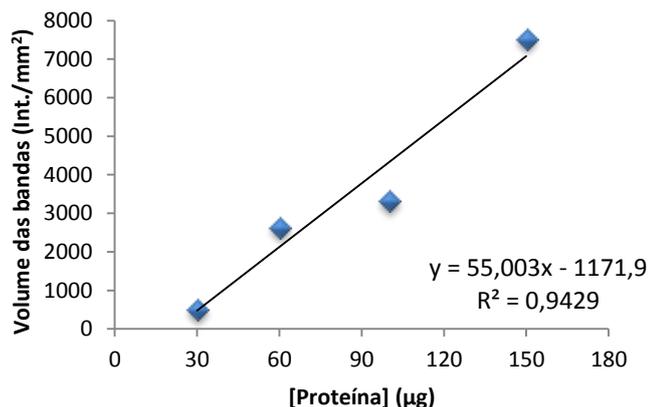


Figura 31: Quantificação da intensidade das bandas da Na,K-ATPase em amostras de rim obtidas por *Western Blot* em função da concentração de proteína.

Na figura representa-se uma curva de calibração exemplificativa do volume das bandas da Na,K-ATPase de rim em função da [proteína] aplicada. A curva de calibração foi realizada no programa Microsoft Office Excel 2010. O mesmo tratamento estatístico foi aplicado às amostras de fígado, cérebro e coração para análise da intensidade de Na,K-ATPase e da α -tubulina.

Assim foram escolhidas as concentrações de 100, 50, 10 e 50 μg , para rim, fígado, cérebro e coração, respetivamente.

Fez ainda parte da otimização do *Western Blot* analisar se as bandas detetadas com cada um dos anticorpos utilizados correspondiam a marcação da proteína alvo ou a alguma eventual marcação inespecífica. Utilizou-se a determinação da massa molecular da proteína detetada na marcação imunológica como método para fazer essa diferenciação. A massa molecular da proteína em avaliação é determinada tendo em conta a mobilidade eletroforética da mesma, bem como a de uma série de proteínas padrão, de massa molecular conhecida, que permitem a construção de uma curva de calibração.

A massa molecular da isoforma $\alpha 1$ foi de $91,43 \pm 3,30$; $105,69 \pm 4,65$; $109,93 \pm 10,41$ e $101,69 \pm 3,08$, para as amostras de rim, fígado, cérebro e coração, respetivamente, semelhantes à descrita pelo fabricante, 100 kDa. O mesmo tratamento foi aplicado à α -tubulina (usada como controlo), para a qual se obteve uma média de $47,17 \pm 1,20$; $51,40 \pm 1,33$; $56,28 \pm 1,14$ e $46,64 \pm 1,01$, para as amostras de rim, fígado, cérebro e coração, respetivamente, semelhantes à descrita pelo fabricante, 50 kDa (Ver Anexo I).

A massa molecular da isoforma $\alpha 2$ foi de $87,22 \pm 1,57$; $94,37 \pm 3,45$; $99,95 \pm 2,68$ e $94,33 \pm 2,67$, para as amostras de rim, fígado, cérebro e coração, respetivamente, semelhantes à descrita pelo fabricante, 100 kDa. O mesmo tratamento foi aplicado à isoforma $\alpha 3$ para a qual se obteve uma média de $106,10 \pm 2,25$ e $109,98 \pm 2,50$ para as amostras de rim e cérebro, respetivamente, semelhantes à descrita pelo fabricante, 110 kDa e para a α -tubulina, para a qual se obteve uma média de $50,12 \pm 0,00$; $55,60 \pm 3,89$; $51,47 \pm 1,71$ e $48,50 \pm 1,27$, para as

amostras de rim, fígado, cérebro e coração, respetivamente, semelhantes à descrita pelo fabricante, 50 kDa (Ver Anexo II).

Estes resultados permitiram-nos confirmar que as bandas marcadas pelos anticorpos correspondiam às proteínas de interesse.

4.2.1.2. RESULTADOS DA APLICAÇÃO DA METODOLOGIA OTIMIZADA PARA *WESTERN BLOT*

Com a técnica de *Western Blot* otimizada, procurou-se avaliar a expressão das isoformas $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$ da Na,K-ATPase em homogeneizados de tecidos de animais controlo e GK.

A **Figura 32** mostra que a expressão da isoforma $\alpha 1$ -Na,K-ATPase em rim não apresenta alterações significativas entre ratos controlo e GK, para os quais se registou uma expressão de $1,929 \pm 0,107$ e $1,923 \pm 0,124$ (unidades arbitrárias - UA), respetivamente. Por sua vez, a expressão da isoforma $\alpha 2$ -Na,K-ATPase foi de $0,009 \pm 0,002$ UA e $0,021 \pm 0,006$ UA, em ratos controlo e GK, respetivamente, as quais são diferentes significativamente entre si. A isoforma $\alpha 3$ -Na,K-ATPase apenas foi identificada em ratos GK para os quais se observou uma expressão de $0,539 \pm 0,021$ UA.

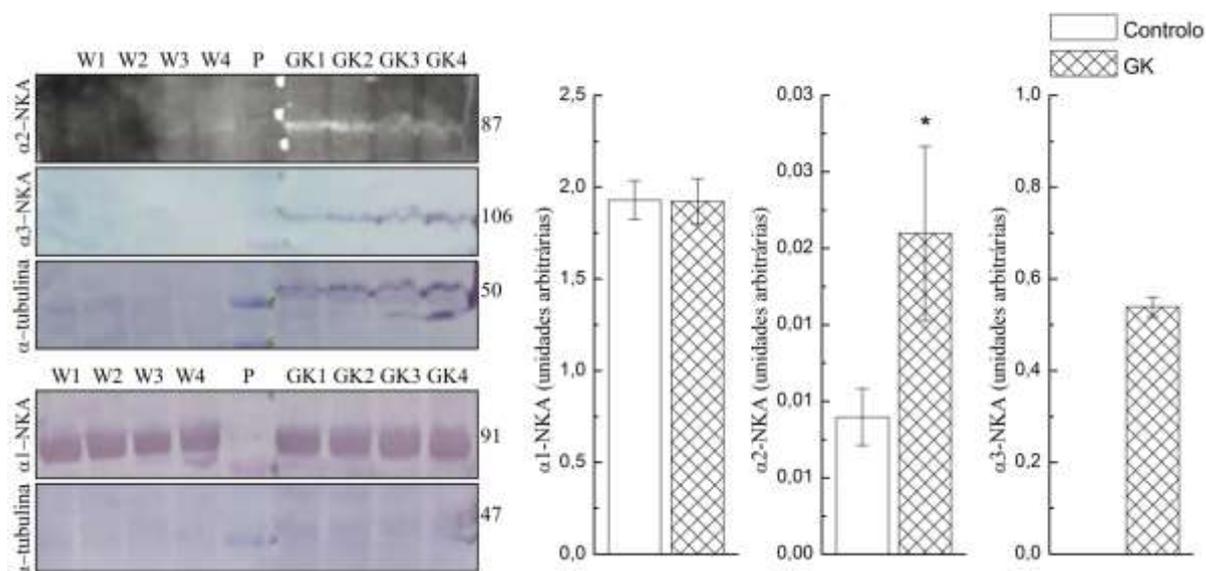


Figura 32: Avaliação da expressão da isoforma $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$ -NKA em amostras controlo e GK de rim.

No canto superior esquerdo da figura encontra-se representado um conjunto de 3 imagens de secções dos blots com marcação para a isoforma $\alpha 2$ e para a $\alpha 3$ após *Stripping* da mesma membrana, acoplado à marcação para a α -tubulina correspondente. No canto inferior esquerdo da figura encontra-se representado um conjunto de 2 imagens de secções dos blots para a isoforma $\alpha 1$, acoplado à marcação para a α -tubulina respetiva (W: Wistar; GK: Goto-Kakizaki). Os gráficos são representativos da média \pm e.p.m da razão da intensidade/mm² das bandas de $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$ -NKA, relativamente à tubulina.

A expressão da isoforma $\alpha 1$ -Na,K-ATPase em fígado de ratos controlo e GK foi de $1,295 \pm 0,095$ e $0,856 \pm 0,084$ UA, respetivamente, registando-se assim uma alteração significativa da sua expressão. Por sua vez, a expressão da isoforma $\alpha 2$ -Na,K-ATPase foi de

0,040±0,027 e 0,024±0,004 UA, em ratos controlo e GK, respetivamente, não se registando uma diferença significativa diferente entre si (**Figura 33**).

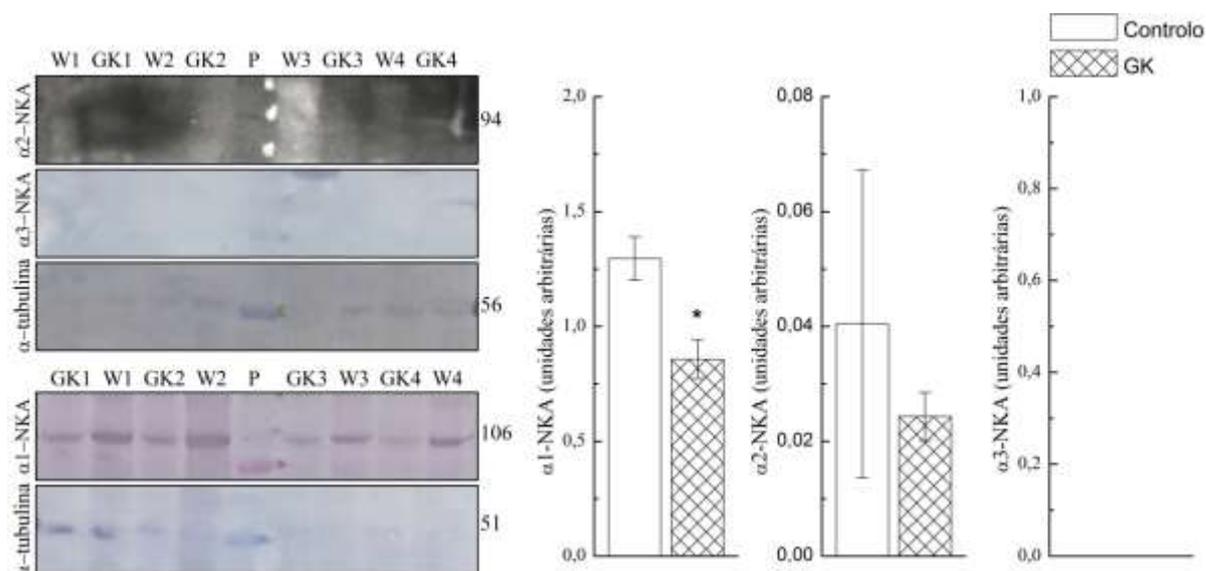


Figura 33: Avaliação da expressão da isoforma α1, α2 e α3-NKA em amostras controlo e GK de fígado. No canto superior esquerdo da figura encontra-se representado um conjunto de 3 imagens de secções dos blots marcados para a isoforma α2 e para α3 após *Stripping* da mesma membrana, acoplado à marcação para a α-tubulina correspondente. No canto inferior esquerdo da figura encontra-se representado um conjunto de 2 imagens de secções dos blots marcados para a isoforma α1, acoplado à marcação para a α-tubulina correspondente (W: Wistar; GK: Goto-Kakizaki). Os gráficos são representativos da média ± e.p.m da razão da intensidade/mm² das bandas de α1, α2 e α3-NKA, relativamente à tubulina.

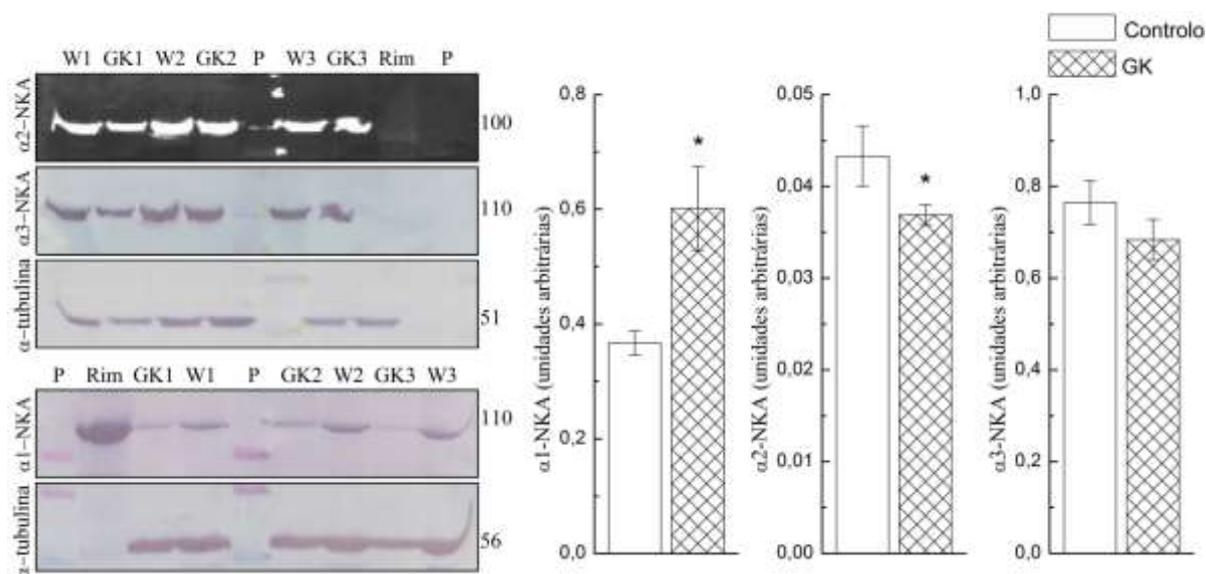


Figura 34: Avaliação da expressão da isoforma α1, α2 e α3-NKA em amostras controlo e GK de cérebro. No canto superior esquerdo da figura encontra-se representado um conjunto de 3 imagens de secções dos blots da marcação para a isoforma α2 e para a α3 após *Stripping* da mesma membrana, acoplado à marcação para α-tubulina correspondente. No canto inferior esquerdo da figura encontra-se representado um conjunto de 2 imagens de secções dos blots marcados para a isoforma α1, acoplado à marcação para a α-tubulina correspondente (W: Wistar; GK: Goto-Kakizaki). Os gráficos são representativos da média ± e.p.m da razão da intensidade/mm² das bandas de α1, α2 e α3-NKA, relativamente à tubulina.

Na figura anterior (**Figura 34**), observa-se que a expressão da isoforma α1-Na,K-ATPase em cérebro, em ratos controlo e GK, é de 0,367±0,021 e de 0,602±0,073 UA, respetivamente. Assim é possível observar uma diferença significativa da expressão registada para esta isoforma entre ratos controlo e GK. O mesmo se verifica na expressão da

isoforma $\alpha 2$ -Na,K-ATPase, para a qual se registaram os valores de $0,043 \pm 0,003$ e $0,037 \pm 0,001$ UA, em ratos controlo e GK, respetivamente. Ao contrário da isoforma $\alpha 1$ e $\alpha 2$, a $\alpha 3$ -Na,K-ATPase não difere significativamente entre ratos controlo e GK, para a qual se observou uma expressão de $0,765 \pm 0,047$ e $0,684 \pm 0,044$ UA, respetivamente.

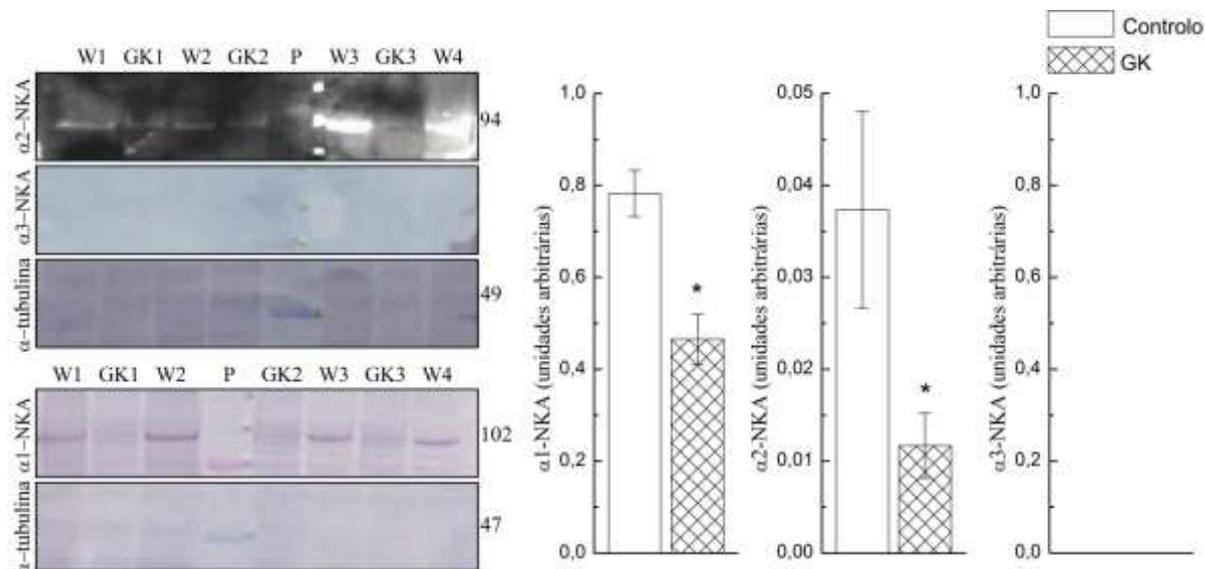


Figura 35: Avaliação da expressão da isoforma $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$ -NKA em amostras controlo e GK de coração. No canto superior esquerdo da figura encontra-se representado um conjunto de 3 imagens de secções dos blots da marcação para a isoforma $\alpha 2$ e para a $\alpha 3$ após *Stripping* da mesma membrana, acoplado à marcação para α -tubulina correspondente. No canto inferior esquerdo da figura encontra-se representado um conjunto de 2 imagens de secções dos blots marcados para a isoforma $\alpha 1$, acoplado à marcação para a α -tubulina correspondente (W: Wistar; GK: Goto-Kakizaki). Os gráficos são representativos da média \pm e.p.m da razão da intensidade/mm² das bandas de $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$ -NKA, relativamente à tubulina.

A expressão da isoforma $\alpha 1$ -Na,K-ATPase em coração de ratos controlo e GK foi de $0,782 \pm 0,050$ e $0,465 \pm 0,054$ UA, respetivamente, registando-se assim uma alteração significativa da expressão desta isoforma da bomba de sódio. A expressão da isoforma $\alpha 2$ -Na,K-ATPase foi de $0,037 \pm 0,011$ e $0,012 \pm 0,004$, em ratos controlo e GK, respetivamente, para a qual também se observa que a expressão entre ratos controlo e GK é significativamente diferente (**Figura 35**).

4.2.2. AVALIAÇÃO DA LOCALIZAÇÃO “*IN SITU*” DAS ISOFORMAS DA SUBUNIDADE ALFA DA Na,K-ATPASE NOS DIFERENTES TECIDOS

Para a investigação da distribuição isoenzimática da Na,K-ATPase recorreu-se a procedimentos de imuno-histoquímica, através dos quais foi possível analisar e avaliar a marcação imunológica das isoformas $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$ desta bomba. Na figura seguinte encontram-se exemplos de um conjunto de fotomicrografias representativas de secções de

cada um dos tecidos em análise sujeitas a imunomarcaco com os anticorpos contra as isoformas $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$ da Na,K-ATPase.

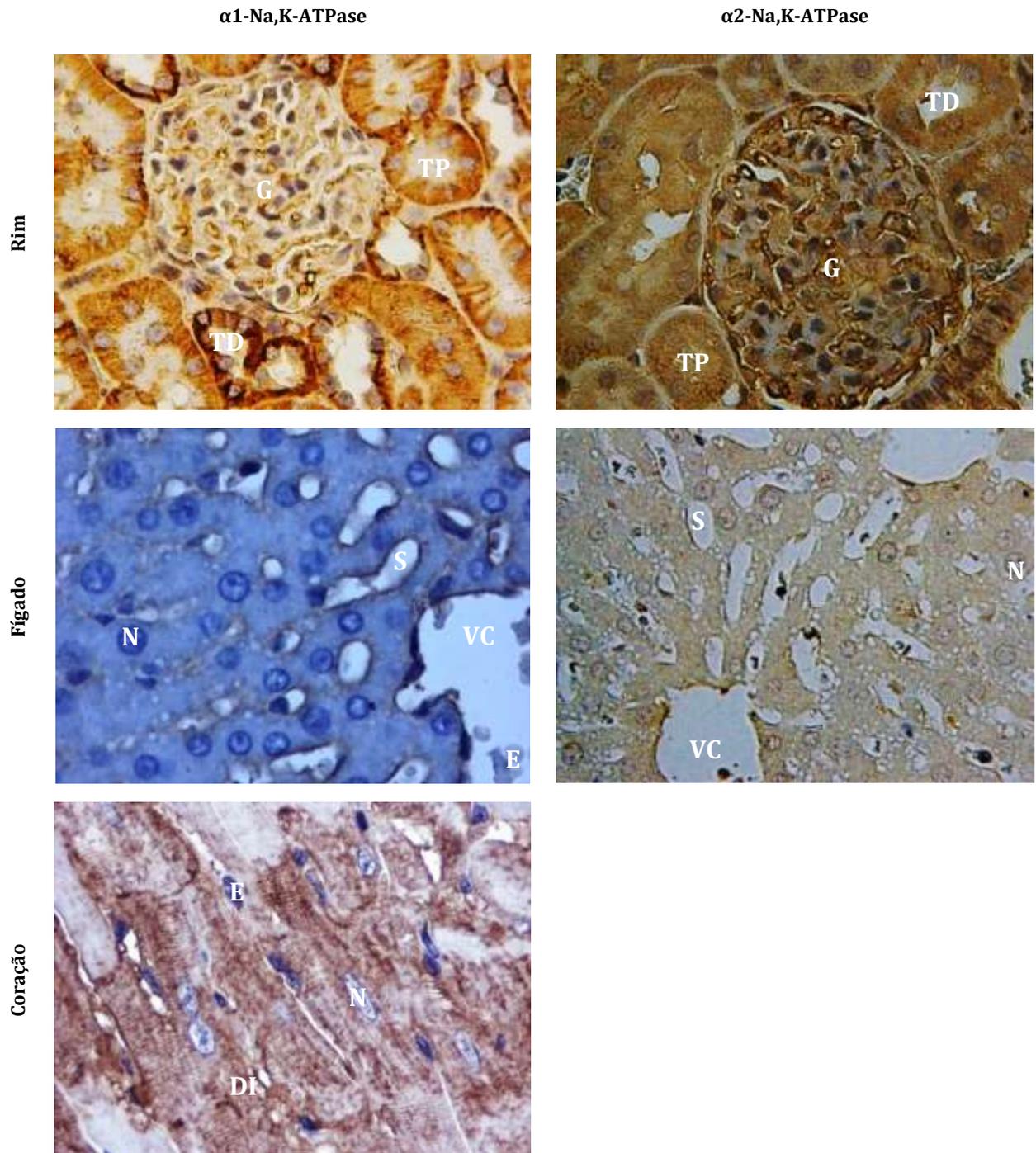
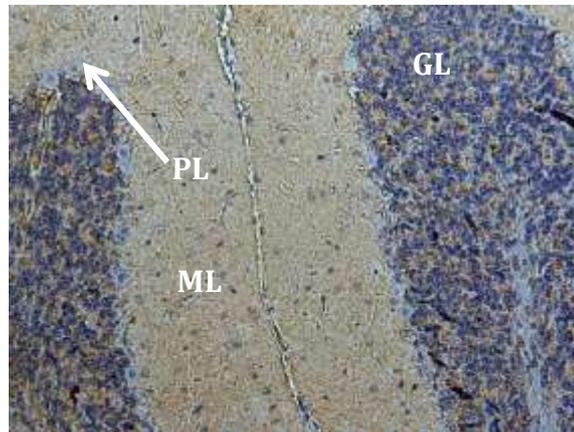


Figura 36: Análise qualitativa da expressão imuno-histoquímica das isoformas $\alpha 1$ e $\alpha 2$ da Na,K-ATPase em secoes de rim, figado e coraco, de ratos controle. Foram analisadas uma média de 6 fotomicrografias por lâmina com diferentes ampliaoes (10, 40 e 100X) das quais se mostram apenas imagens com ampliao de 400X (Legenda: G: Glomrulo; TP: Túbulo proximal; TD: Túbulo distal; VC: Veia central; S: Sinusides; N: Núcleo; E: Eritrócitos; DI: Discos intercalares).

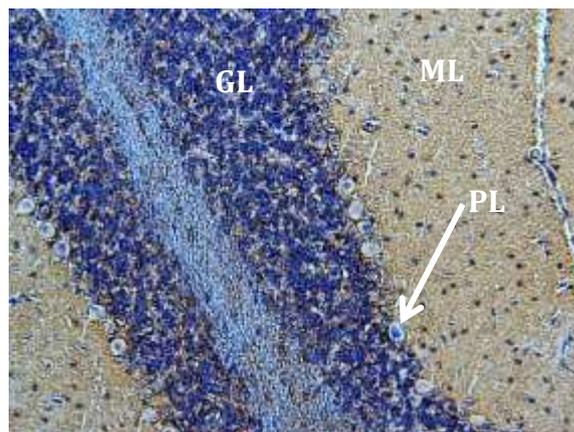
Tal como se pode observar na imagem da lâmina de rim marcada com o anticorpo para a isoforma $\alpha 1$ da Na,K-ATPase (**Figura 36**), os glomérulos exibem uma marcao

muito pouco intensa. Por sua vez, os túbulos proximais exibem uma marcação intermédia, enquanto os túbulos distais tem uma marcação já muito intensa (castanho muito escuro). No que diz respeito à subunidade $\alpha 2$, a estrutura celular que surge com marcação mais intensa é o glomérulo, não havendo uma diferenciação entre túbulos proximais e distais.

$\alpha 1$ -Na,K-ATPase



$\alpha 2$ -Na,K-ATPase



$\alpha 3$ -Na,K-ATPase

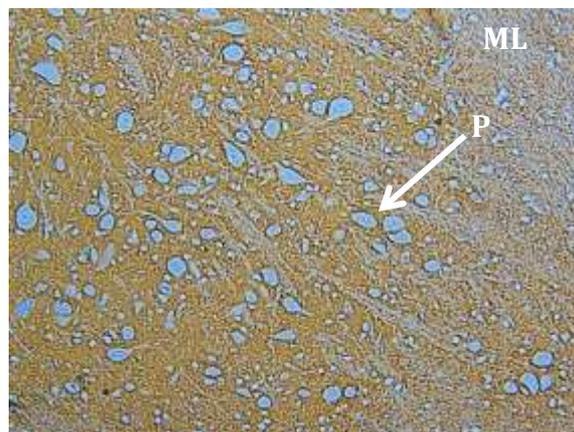


Figura 37: Análise qualitativa da expressão imuno-histoquímica das isoformas $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$ da Na,K-ATPase em secções de cérebro, de ratos controlo.

Foram analisadas uma média de 6 fotomicrografias por lâmina com diferentes ampliações (10, 40 e 100X) das quais se mostram apenas imagens com ampliação de 100X (Legenda: GL: Camada granulosa; PL: Camada de células de Purkinje; ML: Camada molecular; P: Células de Purkinje).

Na lâmina de fígado marcada para a isoforma $\alpha 1$ observa-se claramente que o citoplasma dos hepatócitos não apresenta qualquer marcação (a azul) e apenas as membranas dos sinusóides e da veia central exibem uma coloração acastanhada, onde se confirma a marcação para esta isoforma da bomba de sódio. No entanto, para a lâmina de fígado marcada com o anticorpo para a isoforma $\alpha 2$ da Na,K-ATPase, verifica-se que além das membranas, também o citoplasma exibe alguma marcação, apesar desta parecer um pouco menos intensa.

Na lâmina de coração marcada para a isoforma $\alpha 1$ observa-se que os núcleos dos miócitos (a azul) não estão marcados, mas o citoplasma dos miócitos exibe uma evidente marcação para esta isoforma da subunidade α da bomba de sódio. Os discos intercalares exibem uma marcação mais intensa do que a dos miócitos, sendo estes bem evidentes devido ao tom castanho-escuro observável entre os miócitos.

Na **Figura 37** é possível observar, na lâmina de SNC marcada com o anticorpo para a isoforma $\alpha 1$ que a camada granulosa, onde se localizam os neurónios, está maioritariamente corada de azul e, por isso, considera-se que tem marcação nula ou muito pouco intensa para a $\alpha 1$ -Na,K-ATPase, ao contrário da camada molecular (a castanho) que se considera marcada com uma coloração de tonalidade intermédia. Ainda nesta lâmina é possível observar que a camada de células de Purkinje exibe uma coloração azul e, portanto, não está marcada para esta isoforma da bomba de sódio. As mesmas considerações se retiram da observação da lâmina de SNC marcada para a isoforma $\alpha 2$.

Da lâmina marcada para a $\alpha 3$ -Na,K-ATPase, verifica-se uma evidente marcação da camada molecular, ao contrário das inúmeras células de Purkinje que podem ser observadas, em que todas elas apresentam uma coloração azul.

5. DISCUSSÃO

São diversos os trabalhos que referenciam a existência de alterações na atividade (Sweeney and Klip 1998; Vague et al. 2004) e/ou expressão isoenzimática (Sweeney and Klip 1998) da bomba em modelos animais da diabetes. Contudo, os resultados são controversos e em alguns casos contraditórios, não havendo consenso sobre as alterações observadas na Na,K-ATPase nos diferentes tecidos, o que pode estar relacionado com os diferentes modelos animais da doença utilizados (Ver capítulo 1.3.3).

Neste trabalho procedeu-se ao estudo e avaliação de possíveis alterações de atividade e expressão isoenzimática da Na,K-ATPase em diferentes órgãos de ratos GK, conhecidos por desenvolverem espontaneamente uma síndrome semelhante à diabetes tipo 2 humana (Ceixa 1998), relativamente a ratos normoglicémicos.

Os resultados obtidos mostram uma redução da atividade da Na,K-ATPase, em tecido renal em GK. Apesar da diminuição de atividade observada em rim, a expressão isoenzimática (ver capítulo 4.2.1) da subunidade $\alpha 1$, a subunidade mais abundante neste tecido (Blanco and Mercer 1998), não foi significativamente diferente entre ratos controlo e GK. Contudo, estes últimos apresentaram uma expressão aumentada da subunidade $\alpha 2$ e apenas nestes foi possível detetar a subunidade $\alpha 3$, sugerindo uma alteração no balanço entre as diferentes isoformas, com uma diminuição relativa da $\alpha 1$.

Além disso, a diminuição na atividade da bomba observada em tecido cardíaco foi acompanhada da redução de expressão, quer da isoforma $\alpha 1$ quer da $\alpha 2$, sugerindo uma relação entre os dois parâmetros.

No entanto, em fígado e em cérebro observou-se uma alteração da expressão de $\alpha 1$ da Na,K-ATPase em GK que não se refletiu numa redução significativa da atividade enzimática da bomba, embora pareça haver uma tendência para a atividade enzimática da Na,K-ATPase ser inferior em tecido hepático de GK.

De facto, tendo em conta o conjunto de resultados obtidos nos diferentes órgãos, cujo resumo se apresenta de forma esquemática na **Tabela 5**, com exceção do cérebro, existe uma alteração do balanço entre isoformas em que a diminuição da proporção relativa da $\alpha 1$ parece estar associada a uma diminuição da atividade total da Na,K-ATPase no tecido (**Tabela 5**).

Tabela 5: Tabela comparativa de alterações de atividade e expressão isoenzimática das isoformas $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$ da Na,K-ATPase, em rim, fígado, cérebro e coração.

	Atividade enzimática	Expressão isoenzimática		
		$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\alpha 3$
Rim	↓	Sem alteração	↑	Só identificada em GK
Fígado	Sem alteração	↓	Sem alteração	
Cérebro	Sem alteração	↑	↓	Sem alteração
Coração	↓	↓	↓	

Muito embora estas alterações de expressão da subunidade α , em particular em cérebro, não se traduzam numa alteração global de atividade catalítica, se tivermos em conta que a expressão de cada uma das isoformas está associada a tipos celulares distintos, como demonstra a localização *in situ* da bomba por imuno-histoquímica (Ver capítulo 4.2.2), e que cada isoforma apresenta sensibilidade para os catiões e para os agentes de regulação fina (ouabaína endógena e pelas vias de sinalização intracelulares) distintos (Blanco and Mercer 1998), é espectável que ocorram alterações do funcionamento da Na,K-ATPase em tecido cerebral em GK resultantes da alteração da expressão relativa das diferentes isoenzimas.

Por outro lado, em tecido renal, apesar de não se registar alteração na expressão da subunidade $\alpha 1$, podem ocorrer nesta subunidade processos de regulação fina da atividade, nomeadamente por fosforilação pela PKC ou pela PKA, que podem contribuir para a alteração da sua atividade. As isoformas da subunidade α da Na,K-ATPase são também expressas diferencialmente em regiões particulares do tecido renal.

Na realidade desconhece-se ainda como é que a atividade da bomba nos diferentes tecidos é afetada pela expressão quantitativa diferencial das isoformas da subunidade α . Finalmente, os resultados apresentados neste trabalho não permitem excluir a possibilidade da existência de alterações na expressão das isoformas da subunidade β da Na,K-ATPase que, por afetar a regulação da função da bomba (Blanco and Mercer 1998), possa contribuir para explicar as alterações da atividade aqui descritas.

É ainda de realçar que a distribuição tecidual das isoformas da subunidade α da Na,K-ATPase apresentada neste trabalho é concordante com a literatura no que respeita aos tecidos analisados (Blanco and Mercer 1998; Vér et al. 1995), apresentando pela primeira vez evidências da existência da isoforma $\alpha 2$ em tecido hepático (Ver capítulo 4.2.2).

Os resultados apresentados neste trabalho mostram ainda pela primeira vez a atividade e expressão da Na,K-ATPase num modelo espontâneo da DT2. Estes põem em evidência diferenças face à literatura, com os quais está por vezes em desacordo. É de realçar, porém, que esta contradição pode residir no facto de se tratar de modelos de diabetes com etiologia diferente. Efetivamente, muitos estudos tiveram por base modelos de diabetes quimicamente induzida (assunto revisto no capítulo 1.3.2) por estreptozotocina (Ng, Tolerico, e Book (1993); Clark, Hamel, e Queener (1983)) ou aloxano (Carnovale et al. 1991; Clark, Hamel, and Queener 1983; Mayanil, Kazmi, and Baquer 1982; Tsimarato et al. 2001).

Por um lado, o aloxano e a estreptozotocina são análogos da glucose, que penetram nas células pelos transportadores de glucose (GLUTs), que para além de apresentarem toxicidade para as células β -pancreáticas, apresentam também alguma toxicidade hepática e renal, o que torna os resultados relativos à atividade ou expressão da Na,K-ATPase dificilmente comparáveis com os que foram obtidos neste trabalho.

Por outro lado, a administração de estreptozotocina e aloxano gera modelos da DT1, se a dose administrada for suficiente para que ocorra desaparecimento total das células β -pancreáticas, ou de DT2, se a dose administrada conduzir apenas a uma redução do número de células β -pancreáticas funcionais (Holt et al. 2011). Em qualquer dos casos, fenotipicamente estas doenças são distintas da DT2, que se desenvolve espontaneamente, na medida em que se caracterizam por apresentar secreção insuficiente de insulina, mas não hiperinsulinemia em jejum ou insulinoresistência nos tecidos periféricos (DeFronzo 2009), condições típicas da DT2 humana (Holt et al. 2011). Assim sendo, não é de esperar que a diabetes quimicamente induzida constitua o modelo mais adequado para estudar alterações associadas à fisiopatologia da DT2, em particular em situações em que a insulina desempenha um papel relevante como é o caso da regulação da expressão isoenzimática da Na,K-ATPase.

As alterações isoenzimáticas e de atividade que foram identificadas nos tecidos estudados neste trabalho podem ser resultado da desregulação dos níveis circulantes de insulina, pois são uma característica deste modelo animal (Ceíça 1998). A insulina desencadeia vias de transdução de sinal distintas nos vários tecidos, que dependem fundamentalmente dos substratos do recetor de insulina presentes nesse tecido. Assim podem ser desencadeadas pela insulina quer alterações genómicas, que levem à expressão diferencial de isoformas da bomba, quer alterações de regulação fina da bomba, que podem ocorrer em consequência da ativação de fosfatases ou cinases (Sweeney and Klip 1998).

Assim, muito sucintamente, este trabalho sugere que as alterações de expressão isoenzimática ou de regulação intracelular da Na,K-ATPase poderão contribuir para disfunções da Na,K-ATPase nos tecidos estudados de animais GK.

6. CONCLUSÃO

Este trabalho mostra a caracterização da atividade enzimática e da expressão das isoformas da subunidade α em diversos tecidos num modelo animal da DT2 humana.

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

- ✓ Em ratos GK, a atividade da Na,K-ATPase foi significativamente diferente em tecido renal e cardíaco, observando-se um decréscimo da atividade da Na,K-ATPase, em tecido renal de 55,7% e em tecido cardíaco de 77,5%; contrariamente, em tecido hepático e cerebral não se registaram diferenças estatisticamente significativas de atividade da bomba;
- ✓ Há alterações significativas da expressão isoenzimática da Na,K-ATPase em GK; a expressão da isoforma $\alpha 1$, em fígado e coração sofreu um decréscimo significativo em ratos GK, ao invés do observado em cérebro, em que se observou um aumento significativo da expressão da $\alpha 1$ em ratos GK; a nível renal observou-se um aumento significativo da expressão da isoforma $\alpha 2$ em ratos GK, contrariamente aos resultados obtidos em cérebro e coração, para os quais se observou um decréscimo significativo da expressão dessa isoforma;
- ✓ No seu conjunto estes resultados apontam para alterações na expressão relativa das isoenzimas podendo estas originar as alterações observadas na atividade da bomba.
- ✓ No que respeita à distribuição *in situ*, observou-se uma distribuição diferencial e característica das células e estruturas dos tecidos, em concordância com a literatura; De realçar que foi descrita pela primeira vez a existência de $\alpha 2$ em tecido hepático.

Em suma, estes resultados em conjunto permitem concluir que a atividade da Na,K-ATPase parece estar afetada na DT2, em tecidos renal, hepático, cardíaco e cerebral, podendo estas alterações contribuir para o desenvolvimento das co-morbilidades associadas à diabetes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arystarkhova, Elena, Claudia Donnet, Natalya K Asinovski, and Kathleen J Sweadner. 2002. "Differential Regulation of Renal Na,K-ATPase by Splice Variants of the Gamma Subunit." *The Journal of biological chemistry* 277(12): 10162–72. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11756431> (March 21, 2014).
- Arystarkhova, Elena, and Kathleen J. Sweadner. 1997. "Tissue-Specific Expression of the Na,K-ATPase {beta}3 Subunit: THE PRESENCE OF {beta}3 IN LUNG AND LIVER ADDRESSES THE PROBLEM OF THE MISSING SUBUNIT." *J. Biol. Chem.* 272(36): 22405–8. <http://www.jbc.org/content/272/36/22405> (March 21, 2014).
- Ashcroft, F. 2000. *Ion Channels and Disease*. 1st Ed. ed. ACADEMIC PRESS. Orlando.
- Bagrov, Alexei Y, Joseph I Shapiro, and Olga V Fedorova. 2009. "Endogenous Cardiotonic Steroids: Physiology, Pharmacology, and Novel Therapeutic Targets." *Pharmacological reviews* 61(1): 9–38. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2763610&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (December 11, 2013).
- Bell, James R, Erika Kennington, William Fuller, Kushal Dighe, Pamela Donoghue, James E Clark, Li-Guo Jia, Amy L Tucker, J Randall Moorman, Michael S Marber, Philip Eaton, Michael J Dunn, and Michael J Shattock. 2008. "Characterization of the Phospholemman Knockout Mouse Heart: Depressed Left Ventricular Function with Increased Na-K-ATPase Activity." *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 294(2): H613–21. <http://ajpheart.physiology.org/content/294/2/H613> (February 28, 2014).
- Blanco, G, and R W Mercer. 1998. "Isozymes of the Na-K-ATPase: Heterogeneity in Structure, Diversity in Function." *The American journal of physiology* 275(5 Pt 2): F633–F650.
- Bolt, M W, and P A Mahoney. 1997. "High-Efficiency Blotting of Proteins of Diverse Sizes Following Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis." *Analytical biochemistry* 247(2): 185–92. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9177676> (December 11, 2013).
- Bradford, M M. 1976. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding." *Analytical biochemistry* 72: 248–54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051>.
- Bublitz, Maike, Hanne Poulsen, J Preben Morth, and Poul Nissen. 2010. "In and out of the Cation Pumps: P-Type ATPase Structure Revisited." *Current opinion in structural biology* 20(4): 431–39. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20634056> (November 27, 2013).
- Carnovale, C E, M G Roma, J A Monti, and E A Rodriguez Garay. 1991. "Studies on the Mechanism of Bile Salt-Independent Bile Flow Impairment in Streptozotocin-Induced Hepatotoxicity." *Toxicology* 68(3): 207–15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1654601> (March 21, 2014).

- Ceiça, R.M. 1998. “Bases Fisiológicas Da Diabetes Mellitus Tipo 2 Num Modelo Animal - Aspectos Clínicos E Estudos Morfológicos E de Secreção de Insulina de Ilhéus de Langerhans.” Universidade de Coimbra, Portugal.
- Chatzigeorgiou, Antonios, Antonios Halapas, Konstantinos Kalafatakis, and Elli Kamper. 2009. “The Use of Animal Models in the Study of Diabetes Mellitus.” *In vivo (Athens, Greece)* 23(2): 245–58. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19414410> (December 11, 2013).
- Chibalin, Alexander V. 2007. “Regulation of the Na,K-ATPase: Special Implications for Cardiovascular Complications of Metabolic Syndrome.” *Pathophysiology : the official journal of the International Society for Pathophysiology / ISP* 14(3-4): 153–58. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17977697> (December 11, 2013).
- Clark, D L, F G Hamel, and S F Queener. 1983. “Changes in Renal Phospholipid Fatty Acids in Diabetes Mellitus: Correlation with Changes in Adenylate Cyclase Activity.” *Lipids* 18(10): 696–705. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6318007> (March 21, 2014).
- Clausen, T. 1998. “Clinical and Therapeutic Significance of the Na⁺,K⁺ Pump*.” *Clinical science (London, England : 1979)* 95(1): 3–17. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9662481> (December 11, 2013).
- Cleveland, D W, S G Fischer, M W Kirschner, and U K Laemmli. 1977. “Peptide Mapping by Limited Proteolysis in Sodium Dodecyl Sulfate and Analysis by Gel Electrophoresis.” *The Journal of biological chemistry* 252(3): 1102–6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/320200> (December 11, 2013).
- Cohen, M P, A Dasmahapatra, and E Shapiro. 1985. “Reduced Glomerular Sodium/potassium Adenosine Triphosphatase Activity in Acute Streptozocin Diabetes and Its Prevention by Oral Sorbinil.” *Diabetes* 34(11): 1071–74. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2995180> (March 21, 2014).
- Das, P K, G M Bray, A J Aguayo, and M Rasminsky. 1976. “Diminished Ouabain-Sensitive, Sodium-Potassium ATPase Activity in Sciatic Nerves of Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes.” *Experimental neurology* 53(1): 285–88. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/134901> (March 21, 2014).
- DeFronzo, Ralph a. 2009. “Banting Lecture. From the Triumvirate to the Ominous Octet: A New Paradigm for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus.” *Diabetes* 58(4): 773–95. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2661582&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (November 8, 2013).
- Doucet, A. 1988. “Function and Control of Na-K-ATPase in Single Nephron Segments of the Mammalian Kidney.” *Kidney international* 34(6): 749–60. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2850394>.
- Erdmann, E., H.-D. Bolte, and B. Lüderitz. 1971. “The (Na⁺ + K⁺)-ATPase Activity of Guinea Pig Heart Muscle in Potassium Deficiency.” *Archives of Biochemistry and*

- Biophysics* 145(1): 121–25.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003986171900178> (January 10, 2014).
- Farman, N. 1996. “Na,K-Pump Expression and Distribution in the Nephron.” *Mineral and electrolyte metabolism* 22(5-6): 272–78.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8933498> (March 21, 2014).
- Fink, D J, S Datta, and M Mata. 1994. “Isoform Specific Reductions in Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase Catalytic (alpha) Subunits in the Nerve of Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes.” *Journal of neurochemistry* 63(5): 1782–86.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7931333>.
- FLATT, Peter, and Sigurd LENZEN, eds. 1994a. “Autonomic Control of Insulin Secretion.” In *Frontiers of Insulin Secretion and Pancreatic B-Cell Research*, Eldred Smith-Gordon, 343–52.
http://books.google.pt/books/about/Frontiers_of_Insulin_Secretion_and_Pancr.html?id=HmcXAAAACAAJ&pgis=1 (February 13, 2014).
- , eds. 1994b. “Cellular Basis of Glucose Refractoriness of Pancreatic B-Cells in Non-Insulin-Dependent Diabetes.” In *Frontiers of Insulin Secretion and Pancreatic B-Cell Research*, Eldred Smith-Gordon, 461–72.
http://books.google.pt/books/about/Frontiers_of_Insulin_Secretion_and_Pancr.html?id=HmcXAAAACAAJ&pgis=1.
- Fontana, Jacopo M, Ievgeniia Burlaka, Georgiy Khodus, Hjalmar Brismar, and Anita Aperia. 2013. “Calcium Oscillations Triggered by Cardiotonic Steroids.” *The FEBS journal* 280(21): 5450–55. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23890276> (February 19, 2014).
- Forbush, B, J H Kaplan, and J F Hoffman. 1978. “Characterization of a New Photoaffinity Derivative of Ouabain: Labeling of the Large Polypeptide and of a Proteolipid Component of the Na, K-ATPase.” *Biochemistry* 17(17): 3667–76.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/210802> (February 24, 2014).
- Gardete Correia, L., J.M. Boavida, J.P. Fragoso de Almeida, S. Massano Cardoso, J. Dores, J. Sequeira Duarte, R. Duarte, H. Ferreira, F. Guerra, J.L. Medina, J.S. Nunes, M. Pereira, and J. Raposo. 2012. “Diabetes: Factos E Números 2012 - Relatório Anual Do Observatório Nacional Da Diabetes 02/2013.” *Sociedade Portuguesa da Diabetologia*.
<http://www.apdp.pt/index.php/comunicacao/noticias/relatorio-anual-do-observatorio-nacional-da-diabetes>.
- Geering, K. 2006. “FXYP Proteins : New Regulators of Na-K-ATPase.” *Am J Physiol Renal Physiol* 290(88): 241–50.
- Geering, Käthi. 2008. “Functional Roles of Na,K-ATPase Subunits.” *Current opinion in nephrology and hypertension* 17(5): 526–32.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18695395>.

- Gordon-Weeks, Phillip R. 2000. *Neuronal Growth Cones*. Cambridge University Press.
<http://books.google.com/books?id=g2kpuAAACAAJ&pgis=1> (January 10, 2014).
- Green, R J, R H King, P K Thomas, and D N Baron. 1985. "Sodium-Potassium-ATPase Activity in the Dorsal Root Ganglia of Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes." *Diabetologia* 28(2): 104–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2984069> (March 21, 2014).
- Greene, D A, and A M Mackway. 1986. "Decreased Myo-Inositol Content and Na⁺-K⁺-ATPase Activity in Superior Cervical Ganglion of STZ-Diabetic Rat and Prevention by Aldose Reductase Inhibition." *Diabetes* 35(10): 1106–8.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3019804> (March 21, 2014).
- Hames, B.D., and D. Rickwood. 1998. *Gel Electrophoresis of Proteins : A Practical Approach: A Practical Approach*.
http://books.google.pt/books/about/Gel_Electrophoresis_of_Proteins_A_Practi.html?id=nI1RSmX0GXUC&pgis=1 (January 10, 2014).
- Harlow, Edward, and David Lane. 1999. *Using Antibodies: A Laboratory Manual*.
http://books.google.pt/books/about/Using_Antibodies.html?id=vHL7FZHYcLIC&pgis=1 (January 10, 2014).
- Holt, R.I.G., C. Cockram, A. Flyvbjerg, and B.J. Goldstein. 2011. *Textbook of Diabetes*.
<http://www.google.pt/books?id=mGV4wu8AkPwC&pgis=1> (January 10, 2014).
- Horisberger, J-D. 2004. "Recent Insights into the Structure and Mechanism of the Sodium Pump." *Physiology (Bethesda, Md.)* 19: 377–87.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15546856> (December 11, 2013).
- Jørgensen, P L. 1980. "Sodium and Potassium Ion Pump in Kidney Tubules." *Physiological reviews* 60(3): 864–917. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6248909> (March 21, 2014).
- Kierszenbaum, Abraham L. 2007. *Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology*. Mosby Elsevier.
<http://books.google.com/books?id=GTXhS0xyYUQC&pgis=1> (January 10, 2014).
- Kjeldsen, K, H Braendgaard, P Sidenius, J S Larsen, and A Nørgaard. 1987. "Diabetes Decreases Na⁺-K⁺ Pump Concentration in Skeletal Muscles, Heart Ventricular Muscle, and Peripheral Nerves of Rat." *Diabetes* 36(7): 842–48.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3034710> (March 21, 2014).
- Kobayashi, Chujiro, Masayoshi Hayama, Oi Harada, Fumiko Terasawa, Nobuo Okumura, Atsushi Sugiyama, and Hiroyoshi Ota. 2003. "Immunohistochemical Localization of Sodium-Potassium ATPase in Human Normal Stomach and Gastric Adenocarcinomas." *Histochemistry and cell biology* 119(4): 317–22.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12684814> (December 18, 2013).
- Koeppen, B.M., and A.S. Koeppen. 2010. *BERNE & LEVY PHYSIOLOGY. SIXTH EDIT.* eds. Bruce M. Koeppen and Bruce A. Koeppen. Philadelphia: Mosby.

- Koeppen, Bruce M., and Bruce A. Stanton. 2009. *Berne & Levy Physiology, Updated Edition*.
http://books.google.pt/books/about/Berne_Levy_Physiology_Updated_Edition.html?id=rVSOC3q3QJ0C&pgis=1 (January 10, 2014).
- Ku, D D, B M Sellers, and E Meezan. 1986. "Development of Renal Hypertrophy and Increased Renal Na,K-ATPase in Streptozotocin-Diabetic Rats." *Endocrinology* 119(2): 672–79. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3015553> (March 21, 2014).
- Kurien, Biji T, and R Hal Scofield. 2006. "Western Blotting." *Methods (San Diego, Calif.)* 38(4): 283–93. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16483794> (November 9, 2013).
- LAEMMLI, U. K. 1970. "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680–85. <http://dx.doi.org/10.1038/227680a0> (December 11, 2013).
- Landmann, L., S. Angermuller, C. Rahner, and B. Stieger. 1998. "Expression, Distribution, and Activity of Na⁺,K⁺-ATPase in Normal and Cholestatic Rat Liver." *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 46(3): 405–10.
<http://jhc.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/002215549804600315> (March 28, 2014).
- Läuger, P. 1979. "A Channel Mechanism for Electrogenic Ion Pumps." *Biochim Biophys Acta* 552: 143–61.
- Lecuona, E, S Luquín, J Avila, L M García-Segura, and P Martín-Vasallo. 1996. "Expression of the Beta 1 and Beta 2(AMOG) Subunits of the Na,K-ATPase in Neural Tissues: Cellular and Developmental Distribution Patterns." *Brain research bulletin* 40(3): 167–74. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8736577>.
- Leong, S F, and T K Leung. 1991. "Diabetes Induced by Streptozotocin Causes Reduced Na-K ATPase in the Brain." *Neurochemical research* 16(10): 1161–65.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1665546> (March 21, 2014).
- Liu, Jiang, and Joseph I Shapiro. 2007. "Regulation of Sodium Pump Endocytosis by Cardiotonic Steroids: Molecular Mechanisms and Physiological Implications." *Pathophysiology : the official journal of the International Society for Pathophysiology / ISP* 14(3-4): 171–81.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2169384&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (March 18, 2014).
- Liu, Jiang, and Zi-Jian Xie. 2010. "The Sodium Pump and Cardiotonic Steroids-Induced Signal Transduction Protein Kinases and Calcium-Signaling Microdomain in Regulation of Transporter Trafficking." *Biochimica et biophysica acta* 1802(12): 1237–45. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20144708> (March 17, 2014).
- Lu, X.P., and H.L. Leffert. 1991. "Induction of Sodium Pump &-Subunit mRNA Expression during Hepatocellular Growth Transitions." 266(14): 9276–84.
- Lücking, K, J M Nielsen, P A Pedersen, and P L Jørgensen. 1996. "Na-K-ATPase Isoform (alpha 3, Alpha 2, Alpha 1) Abundance in Rat Kidney Estimated by Competitive RT-

- PCR and Ouabain Binding.” *The American journal of physiology* 271(2 Pt 2): F253–60. <http://classic.ajprenal.physiology.org/content/271/2/F253.abstract> (March 21, 2014).
- Lytton, J. 1985. “Insulin Affects the Sodium Affinity of the Rat Adipocyte (Na⁺,K⁺)-ATPase.” *The Journal of biological chemistry* 260(18): 10075–80. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2991273>.
- Lytton, Jonathan, C Lin, and Guido Guidotti. 1985. “Identification of Two Molecular Forms of (Na + , K +) -ATPase in Rat Adipocytes.”
- Mayanil, C S, S M Kazmi, and N Z Baquer. 1982. “Na⁺,K⁺-ATPase and Mg²⁺-ATPase Activities in Different Regions of Rat Brain during Alloxan Diabetes.” *Journal of neurochemistry* 39(4): 903–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6126523> (March 21, 2014).
- Mercer, R. W. 1993. “Molecular Cloning and Immunological Characterization of the Gamma Polypeptide, a Small Protein Associated with the Na,K-ATPase.” *The Journal of Cell Biology* 121(3): 579–86. <http://jcb.rupress.org/cgi/content/long/121/3/579> (February 28, 2014).
- Mobasheri, a, J Avila, I Cózar-Castellano, M D Brownleader, M Trevan, M J Francis, J F Lamb, and P Martín-Vasallo. 2000. “Na⁺, K⁺-ATPase Isozyme Diversity; Comparative Biochemistry and Physiological Implications of Novel Functional Interactions.” *Bioscience reports* 20(2): 51–91. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10965965>.
- Nakagawa, R, Y Qiao, and G Asano. 1990. “Immunohistochemical Localization of Na⁺, K(+)-ATPase and Calmodulin in Rat Myocardium.” *Nihon Ika Daigaku zasshi* 57(6): 541–46. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1962791> (March 21, 2014).
- Ng, Y. C., P. H. Tolerico, and C. B. Book. 1993. “Alterations in Levels of Na(+)-K(+)-ATPase Isoforms in Heart, Skeletal Muscle, and Kidney of Diabetic Rats.” *Am J Physiol Endocrinol Metab* 265(2): E243–251. <http://ajpendo.physiology.org/content/265/2/E243.full-text.pdf+html> (March 21, 2014).
- Nowak, T V, C Castelaz, K Ramaswamy, and J P Weisbruch. 1995. “Impaired Rodent Vagal Nerve Sodium-Potassium-ATPase Activity in Streptozotocin Diabetes.” *The Journal of laboratory and clinical medicine* 125(2): 182–86. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7844468> (March 21, 2014).
- Obici, Silvana, Zhaohui Feng, George Karkanias, Denis G Baskin, and Luciano Rossetti. 2002. “Decreasing Hypothalamic Insulin Receptors Causes Hyperphagia and Insulin Resistance in Rats.” *Nature neuroscience* 5(6): 566–72. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12021765> (January 28, 2014).
- Obici, Silvana, Zhaohui Feng, Jianzhen Tan, Lisen Liu, and George Karkanias. 2001. “Central Melanocortin Receptors.” 108(7): 963–64.
- Peng, L, P Martin-Vasallo, and K J Sweadner. 1997. “Isoforms of Na,K-ATPase Alpha and Beta Subunits in the Rat Cerebellum and in Granule Cell Cultures.” *The Journal of*

neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 17(10): 3488–3502.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9133374>.

Pestov, Nikolay B, Nisar Ahmad, Tatiana V Korneenko, Hao Zhao, Rossen Radkov, Danièle Schaer, Sophie Roy, Stéphanie Bibert, Käthi Geering, and Nikolai N Modyanov. 2007. “Evolution of Na,K-ATPase Beta M-Subunit into a Coregulator of Transcription in Placental Mammals.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(27): 11215–20.
<http://www.pnas.org/cgi/content/long/104/27/11215> (February 28, 2014).

Pierce, G N, and N S Dhalla. 1983. “Sarcolemmal Na⁺-K⁺-ATPase Activity in Diabetic Rat Heart.” *The American journal of physiology* 245(3): C241–7.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6137147> (March 21, 2014).

Ramos-Vara, J a. 2005. “Technical Aspects of Immunohistochemistry.” *Veterinary pathology* 42(4): 405–26. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24129895>.

Ramos-Vara, J a, and M a Miller. 2014. “When Tissue Antigens and Antibodies Get along: Revisiting the Technical Aspects of Immunohistochemistry--the Red, Brown, and Blue Technique.” *Veterinary pathology* 51(1): 42–87.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24129895> (August 1, 2014).

Rath, Arianna, Mira Glibowicka, Vincent G Nadeau, Gong Chen, and Charles M Deber. 2009. “Detergent Binding Explains Anomalous SDS-PAGE.” 106(6): 1760–65.

Rose, C R, S G Waxman, and B R Ransom. 1998. “Effects of Glucose Deprivation, Chemical Hypoxia, and Simulated Ischemia on Na⁺ Homeostasis in Rat Spinal Cord Astrocytes.” *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18(10): 3554–62. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9570787> (March 21, 2014).

Russo, J. J., and K. J. Sweadner. 1993. “Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-ATPase Subunit Isoform Pattern Modification by Mitogenic Insulin Concentration in 3T3-L1 Preadipocytes.” *Am J Physiol Cell Physiol* 264(2): C311–316.
<http://ajpcell.physiology.org/content/264/2/C311.full-text.pdf+html> (March 21, 2014).

Scheiner-Bobis, Georgios. 2002. “The Sodium Pump.” *European Journal of Biochemistry* 269(10): 2424–33. <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1432-1033.2002.02909.x> (February 11, 2014).

Schenk, D. B., and H. L. Leffert. 1983. “Monoclonal Antibodies to Rat Na⁺,K⁺-ATPase Block Enzymatic Activity.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80(17): 5281–85. <http://www.readcube.com/articles/10.1073/pnas.80.17.5281?locale=en> (March 21, 2014).

Sennoune, S, A Gerbi, M J Duran, J P Grillasca, E Compe, S Pierre, R Planells, M Bourdeaux, P Vague, G Pieroni, and J M Maixent. 2000. “Effect of Streptozotocin-Induced Diabetes on Rat Liver Na⁺/K⁺-ATPase.” *European journal of biochemistry / FEBS* 267(7): 2071–78. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10727947> (March 21, 2014).

- Shamraj, O.I., D. Melvin, and J.B. Lingrel. 1991. 179 Biochemical and Biophysical Research Communications *Expression of Na,K-ATPase Isoforms in Human Heart*. http://journals.ohiolink.edu/ejc/article.cgi?issn=0006291x&issue=v179i0003&article=1434_eonihh (March 21, 2014).
- Shyjan, a W, V Ceña, D C Klein, and R Levenson. 1990. "Differential Expression and Enzymatic Properties of the Na⁺,K⁺-ATPase Alpha 3 Isoenzyme in Rat Pineal Glands." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87(3): 1178–82. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=53434&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Siddiqui, Mohammad Rizwan, Krishnan Moorthy, Asia Taha, Mohd Ejaz Hussain, and Najma Zaheer Baquer. 2006. "Low Doses of Vanadate and Trigonella Synergistically Regulate Na⁺/K⁺ -ATPase Activity and GLUT4 Translocation in Alloxan-Diabetic Rats." *Molecular and cellular biochemistry* 285(1-2): 17–27. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16622606> (December 11, 2013).
- Simon, Francis R, John Fortune, Mieko Iwahashi, Rolf Dahl, Eileen Sutherland, and Alice Alexander. 1996. "Membranes and Bioenergetics : Increased Hepatic Na , K-ATPase Activity during Hepatic Regeneration Is Associated with Induction of the B 1 -Subunit and Expression on the Bile Canalicular Domain Increased Hepatic Na , K-ATPase Activity during Hepatic Regen."
- SKOU, J C. 1965. "ENZYMATIC BASIS FOR ACTIVE TRANSPORT OF NA⁺ AND K⁺ ACROSS CELL MEMBRANE." *Physiological reviews* 45: 596–617. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14337569> (December 11, 2013).
- Sun, Y, and W J Ball. 1992. "Determination of Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-ATPase Alpha- and Beta-Isoforms and Kinetic Properties in Mammalian Liver." *The American journal of physiology* 262(6 Pt 1): C1491–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1319675> (March 21, 2014).
- Sweadner, K J, and E Rael. 2000. "The FXYD Gene Family of Small Ion Transport Regulators or Channels: cDNA Sequence, Protein Signature Sequence, and Expression." *Genomics* 68(1): 41–56. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0888754300962748> (February 28, 2014).
- Sweadner, Kathleen J. 2008. "A Third Mode of Ouabain Signaling. Focus on 'Regulation of ERK1/2 by Ouabain and Na-K-ATPase-Dependent Energy Utilization and AMPK Activation in Parotid Acinar Cells'." *American journal of physiology. Cell physiology* 295(3): C588–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18684986> (February 19, 2014).
- Sweeney, G., and A. Klip. 1998. "Regulation of the Na⁺/K⁺-ATPase by Insulin: Why and How?" *Molecular and Cellular Biochemistry* 182: 121–33. <http://www.ingentaconnect.com/content/klu/mcbi/1998/00000182/F0020001/00156865> (December 11, 2013).

- TAUSSKY, H H, and E SHORR. 1953. "A Microcolorimetric Method for the Determination of Inorganic Phosphorus." *The Journal of biological chemistry* 202(2): 675–85. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13061491> (December 11, 2013).
- Tirupattur, P R, J L Ram, P R Standley, and J R Sowers. 1993. "Regulation of Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase Gene Expression by Insulin in Vascular Smooth Muscle Cells." *American journal of hypertension* 6(7 Pt 1): 626–29. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8398004> (March 21, 2014).
- Trinh-Trang-Tan, M M, L Bankir, A Doucet, G el Mernissi, M Imbert-Teboul, M Montégut, S Siaume, and F Morel. 1985. "Influence of Chronic ADH Treatment on Adenylate Cyclase and ATPase Activity in Distal Nephron Segments of Diabetes Insipidus Brattleboro Rats." *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 405(3): 216–22. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2999694> (March 21, 2014).
- Tsimarato, M, T C Coste, A Djemli-Shipkolye, L Daniel, F Shipkolye, P Vague, and D Raccach. 2001. "Evidence of Time-Dependent Changes in Renal Medullary Na,K-ATPase Activity and Expression in Diabetic Rats." *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)* 47(2): 239–45. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11354996> (March 21, 2014).
- Tsimaratos, Michel, Thierry C. Coste, Anissa Djemli-Shipkolye, Philippe Vague, Gerard Pieroni, and Denis Raccach. 2001. "{gamma}-Linolenic Acid Restores Renal Medullary Thick Ascending Limb Na⁺,K⁺-ATPase Activity in Diabetic Rats." *J. Nutr.* 131(12): 3160–65. <http://jn.nutrition.org/content/131/12/3160.full> (December 11, 2013).
- Vague, P, T C Coste, M F Jannot, D Raccach, and M Tsimaratos. 2004. "C-Peptide, Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase, and Diabetes." *Experimental diabetes research* 5(1): 37–50. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2478626&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (February 11, 2014).
- Vér, A, P Csermely, T Bányász, T Kovács, and J Somogyi. 1995. "Alterations in the Properties and Isoform Ratios of Brain Na⁺/K⁽⁺⁾-ATPase in Streptozotocin Diabetic Rats." *Biochimica et biophysica acta* 1237(2): 143–50. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7632707> (March 21, 2014).
- Wald, H, and M M Popovtzer. 1984. "The Effect of Streptozotocin-Induced Diabetes Mellitus on Urinary Excretion of Sodium and Renal Na⁺-K⁺-ATPase Activity." *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 401(1): 97–100. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6089093> (March 21, 2014).
- Wang, Jiangnan, Robert H G Schwinger, Konrad Frank, Jochen Müller-ehmsen, Pablo Martin-vasallo, Thomas A Pressley, Anny Xiang, Erland Erdmann, and Alicia A Mcdonough. "Regional Expression of Sodium Pump Subunit Isoforms and Na⁺ 3⁻Ca²⁺ 3² Exchanger in the Human Heart." (11).
- Xie, Zijian, and Amir Askari. 2002. "Na⁽⁺⁾/K⁽⁺⁾-ATPase as a Signal Transducer." *European journal of biochemistry / FEBS* 269(10): 2434–39. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12027880> (December 11, 2013).

Xie, Zijian, and Ting Cai. 2003. "From Protein Interaction to Cellular Function." 3(3): 157–68.

Yatime, Laure, Mette Laursen, J Preben Morth, Mikael Esmann, Poul Nissen, and Natalya U Fedosova. 2011. "Structural Insights into the High Affinity Binding of Cardiotonic Steroids to the Na⁺,K⁺-ATPase." *Journal of structural biology* 174(2): 296–306. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21182963> (November 24, 2013).

Sites consultados:

- ❖ <http://protocolsonline.com/protein-science/western-blotting/> (accedido a 11/02/2014)
- ❖ <http://www.answers.com/topic/sds-polyacrylamide-gel-electrophoresis> (accedido a 06/02/2014)
- ❖ <http://withfriendship.com/images/h/38739/Immunohistochemistry-image.jpg> (accedido a 11/02/2014)
- ❖ <http://www.macmillan.org.uk/Cancerinformation/Cancertypes/Brain/Aboutbraintumours/Thebrain.aspx> (accedido a 05/12/2013)
- ❖ http://medstnews.blogspot.pt/2012_10_01_archive.html (accedido a 05/12/2013)
- ❖ <http://fisiologiahumanainfoco.blogspot.pt/2012/04/camadas-da-parede-cardiaca.html> (accedido a 05/12/2013)
- ❖ <http://umaquestaodecerebro.blogs.sapo.pt/2009/01/> (accedido a 26/03/2014)

8.1. REAGENTES

- ❖ 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) (Sigma Aldrich, Inc. 3050 Spruce Street Saint Louis, Missouri 63103 USA)
- ❖ Ácido acético (3%)
- ❖ Ácido clorídrico concentrado
- ❖ Ácido fosfórico (8,5%)
- ❖ Ácido sulfúrico (1N)
- ❖ Ácido tricloroacético (11,5%) 2mM
- ❖ Acrilamida/Bisacrilamida (30%)
- ❖ Água bidestilada, destilada e ultrapura
- ❖ Albumina do Soro Bovino 2mg/mL
- ❖ Anticorpo primário monoclonal anti- Na^+/K^+ -ATPase (isoforma $\alpha 1$) clone M8-P1-A3, produzido em ratinho (Sigma Aldrich, Inc. 3050 Spruce Street Saint Louis, Missouri 63103 USA)
- ❖ Anticorpo primário monoclonal anti- Na^+/K^+ -ATPase (isoforma $\alpha 3$) clone M7-PB-E9, produzido em ratinho (Sigma Aldrich, Inc. 3050 Spruce Street Saint Louis, Missouri 63103 USA)
- ❖ Anticorpo primário monoclonal anti- α -tubulina clone B-5-1-2, produzido em ratinho (Sigma Aldrich, Inc. 3050 Spruce Street Saint Louis, Missouri 63103 USA)
- ❖ Anticorpo primário policlonal anti- $\alpha 2$ - Na^+/K^+ -ATPase, produzido em coelho (*Millipore Corporation, CHEMICON International, Inc.*)
- ❖ Anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina (*GE Healthcare, UK Limited*)

- ❖ Anticorpo secundário anti-IgG de ratinho conjugado com peroxidase de rábano-HRP (Sigma Aldrich, Inc. 3050 Spruce Street Saint Louis, Missouri 63103 USA)
- ❖ APS (10%) (m/v)
- ❖ ATP 40mM
- ❖ Azul brilhante de Coomassie G-250 0,12mM
- ❖ Azul de bromofenol (0,06%)
- ❖ Bicarbonato de Sódio 20mM
- ❖ *Biotinylated Goat Anti-Polyvalent Plus*
- ❖ Cloreto de Magnésio Hexa-hidratado 5,55mM
- ❖ Cloreto de Potássio 6,94mM
- ❖ Cloreto de Sódio 150mM; 80,55mM e 15,55mM
- ❖ *DAB Plus Chromogen*
- ❖ *DAB Plus Substrate*
- ❖ Ditiotreititol 600mM
- ❖ EDTA 1mM
- ❖ Etanol (4,75%)
- ❖ Glicerol (30%)
- ❖ Glicina 192mM e 250mM
- ❖ Hematoxilina
- ❖ Hepes 5mM
- ❖ Leite magro
- ❖ Metanol (20%)
- ❖ Molibdato de amónio (1%)
- ❖ NaOH 0,2M
- ❖ Ouabaína 1,11mM

- ❖ Padrão *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards#161-0374* (Bio-Rad)
- ❖ Peróxido de hidrogénio
- ❖ PBS
- ❖ PBS-T
- ❖ PHSF 0,1mM
- ❖ Ponceau S (0,2%) (v/v)
- ❖ Reagente de *Bradford*
- ❖ Reagente de Sulfato de ferro-molibdato de amónio
- ❖ Reagente luminescente *ECF Plus Western Blotting Detection Reagents* (GE Healthcare)
- ❖ Sacarose 0,32M e 0,25M
- ❖ SDS (12%; 10%; 0,1% e 0,037%)
- ❖ *Streptavidin Peroxidase Plus*
- ❖ Sulfato de ferro II (5%)
- ❖ TEMED
- ❖ Tris 25mM, pH 8.3
- ❖ Tris-HCl 0,5M, pH 6.8
- ❖ Tris-HCl 1,5M, pH 6.8
- ❖ Tris-HCl 25mM, pH 7.6
- ❖ Tris-HCl 50mM e 128mM, pH 7.5
- ❖ Tris-HCl 5mM, pH 7.4
- ❖ Tween-20 (0,1%)
- ❖ Xileno

8.2. MATERIAL E EQUIPAMENTO

- ❖ Agitador magnético
- ❖ Balança analítica *METTLER AE200*
- ❖ Balões volumétricos
- ❖ Banho seco
- ❖ Banho termostatizado a 37°C com agitação
- ❖ Centrífuga de bancada (*spin*)
- ❖ Centrífuga Refrigerada *HERMLE Z 323 K*
- ❖ Congelador
- ❖ Copos de vidro
- ❖ Cronómetro
- ❖ Eppendorfs (1,5 e 2 mL)
- ❖ Esguichos
- ❖ Espátulas
- ❖ Espectrofotómetro
- ❖ Etiquetas
- ❖ Frigorífico
- ❖ Gelo
- ❖ Homogeneizador de Potter *FALC Instruments S.R.L Treviglio (BG) Italy*
- ❖ Luvas descartáveis
- ❖ Medidor de pH *Inolab pH Level 1*
- ❖ Membrana PDVF (acrónimo para *Polyvinylidene difluoride*) (Hybond-P, GE Healthcare)
- ❖ Micropipeta multicanal

- ❖ Micropipetas P2, 20, P200, P1000, P5000
- ❖ Microplaca 96 poços
- ❖ Microscópio *Nikon Eclipse 600* com câmara digital *Nikon DN100*
- ❖ Papel de alumínio
- ❖ Papel de filtro
- ❖ Parafilm
- ❖ Pinças
- ❖ Pipetas de Pasteur
- ❖ Pontas para micropipetas
- ❖ Seringa *Hamilton*
- ❖ Sistema *Bio-Rad Gel-doc* (system e software)
- ❖ Sistema de eletroforese *Mini-Protean-3* da Bio-Rad (USA)
- ❖ Sistema *Mini Trans-Blot Electroforetic Transfer Cell* da Bio-Rad (USA)
- ❖ Tubos de centrífuga
- ❖ Tubos de *Falcon* (50 mL)
- ❖ Ultracentrifuga *BECKMAN Optima™ LE-80K Ultracentrifuge* (USA)
- ❖ Varetas de vidro
- ❖ Vortex ZX3

8.3. SOLUÇÕES

- ❖ Cromogénio DAB
- ❖ Gel de concentração (4%)
- ❖ Gel de resolução (7,5%)
- ❖ Ponceau S (0,2%)
- ❖ Solução A para determinação de atividade enzimática

- ❖ Solução B para determinação de atividade enzimática
- ❖ Solução CLEARMOUNT
- ❖ Solução de isolamento
- ❖ Solução de KH_2PO_4
- ❖ Solução de peroxidase
- ❖ Solução de ressuspensão
- ❖ Solução Ultra V Block
- ❖ Tampão de amostra (6x)
- ❖ Tampão de corrida (10x) pH 8.3
- ❖ Tampão de homogeneização
- ❖ Tampão de transferência
- ❖ Tampão Tris-salino
- ❖ TBS (10x)
- ❖ TBST
- ❖ TBST suplementado com 0,5% de leite magro
- ❖ TBST suplementado com 5% de leite magro

8.4. FIGURAS COMPLEMENTARES

Anexo I

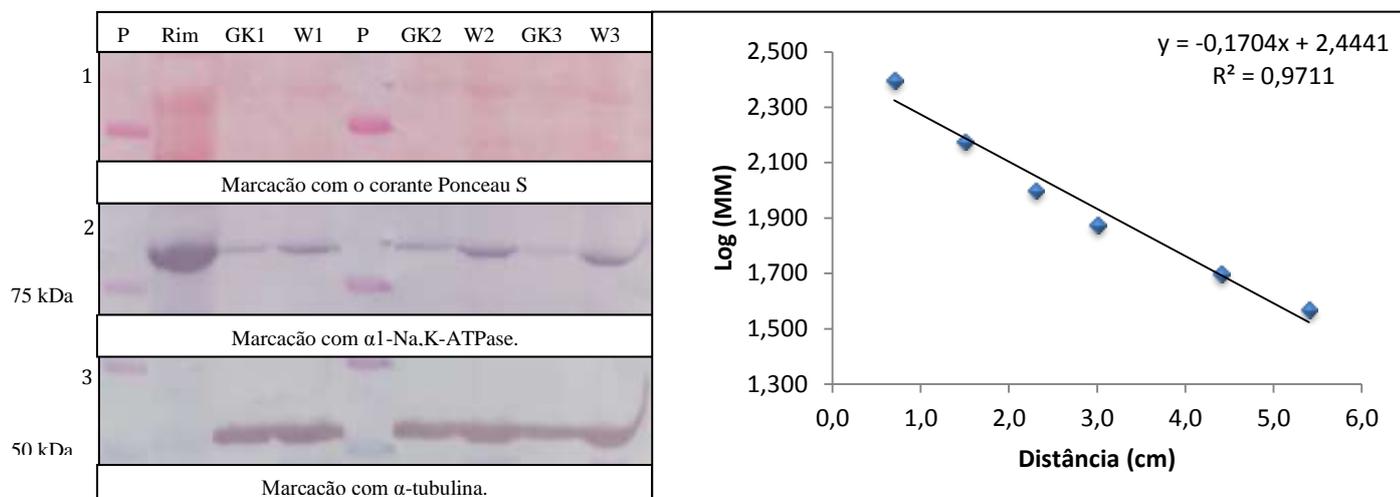


Figura 38: Representação da expressão e determinação da massa molecular (kDa) da isoforma $\alpha 1$ -Na,K-ATPase e respetiva α -tubulina, da membrana com amostras de cérebro, com o corante Ponceau S (1); com a isoforma $\alpha 1$ -Na,K-ATPase (2) e com a α -tubulina (3). No painel direito representa-se uma curva exemplificativa da determinação da massa molecular da isoforma $\alpha 1$ -Na,K-ATPase e respetiva α -tubulina, efetuada em todas as amostras. A estatística da linearidade da curva, realizada no programa Microsoft Office Excel 2010, é expressa no canto superior direito da figura.

Anexo II

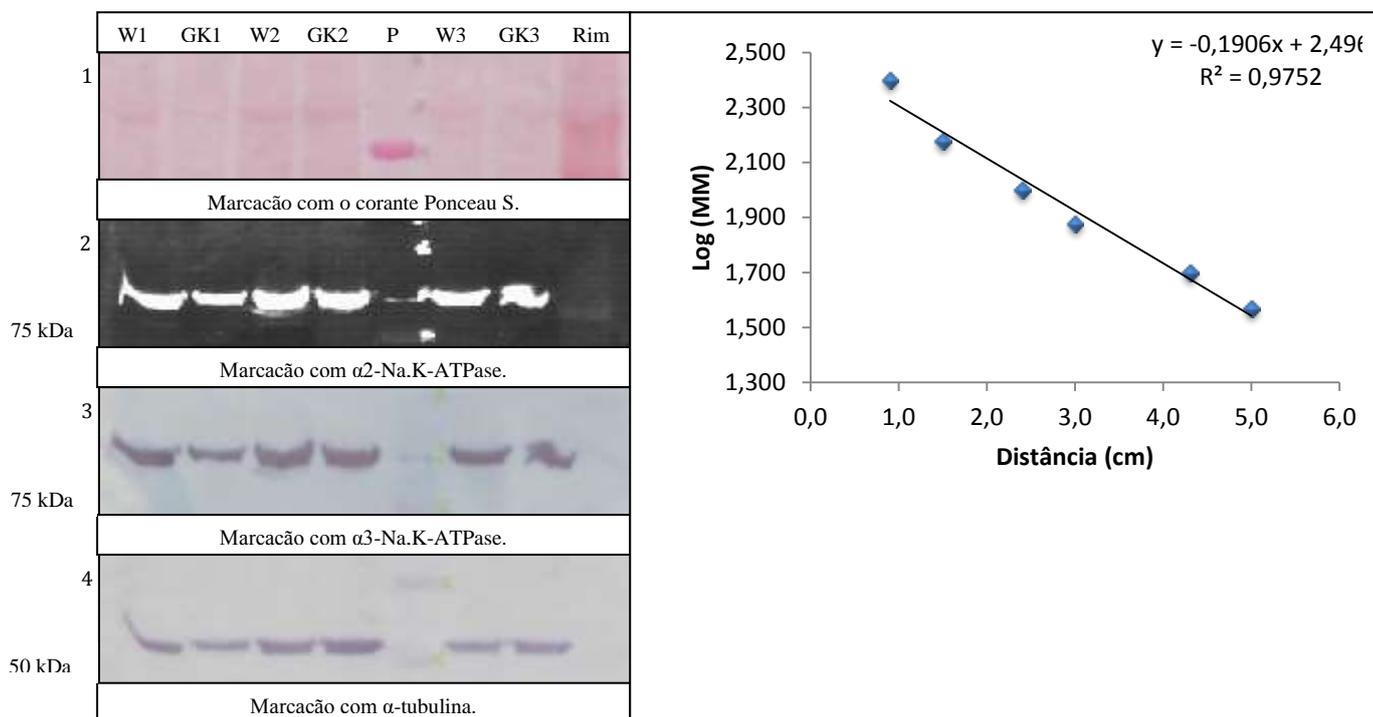


Figura 39: Representação da expressão e determinação da massa molecular (kDa) da isoforma $\alpha 2$ e $\alpha 3$ -Na,K-ATPase e respetiva α -tubulina, da membrana com amostras de cérebro, com o corante Ponceau S (1); com a isoforma $\alpha 2$ -Na,K-ATPase (2); com a isoforma $\alpha 3$ -Na,K-ATPase (3) e com a α -tubulina (4). No painel direito representa-se uma curva exemplificativa da determinação da massa molecular da isoforma $\alpha 2$ e $\alpha 3$ -Na,K-ATPase e respetiva α -tubulina, efetuada em todas as amostras. A estatística da linearidade da curva, realizada no programa Microsoft Office Excel 2010, é expressa no canto superior direito da figura.

Anexo III

Rim – Atividade enzimática Na,K-ATPase

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
44,23747	3	50,49409	16,83136	14,42225
13,01587	5	50,00882	10,00176	16,42453

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	87,4564	1	87,4564	5,550284	0,0566	5,987378
Dentro de grupos	94,54262	6	15,7571			
Total	181,999	7				

Fígado – Atividade enzimática Na,K-ATPase

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
5,050505	3	12,22814	4,076046	1,510946
2,491582	5	16,22935	3,245871	1,678208

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	1,292232	1	1,292232	0,796467	0,406518	5,987378
Dentro de grupos	9,734725	6	1,622454			
Total	11,02696	7				

Cérebro – Atividade enzimática Na,K-ATPase

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
8,417508	2	31,64983	15,82492	25,47586
16,30208	2	21,77083	10,88542	1,388889

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	24,39865	1	24,39865	1,816407	0,310111	18,51282
Dentro de grupos	26,86475	2	13,43237			
Total	51,2634	3				

Coração – Atividade enzimática Na,K-ATPase

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
14,89899	7	56,40331	8,057616	55,97241
7,946429	5	4,234209	0,846842	0,519745

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	151,6528	1	151,6528	4,48792	0,060178	4,964603
Dentro de grupos	337,9134	10	33,79134			
Total	489,5663	11				

Anexo IV

Rim $\alpha 1$ - Expressão isoenzimática Na,K-ATPase

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Controlo	4	7,71789274	1,929473185	0,04538909
GK	4	7,69096732	1,922741831	0,0612354

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	9,06223E-05	1	9,06223E-05	0,00169984	0,968451	5,98737761
Dentro de grupos	0,319873454	6	0,053312242			
Total	0,319964076	7				

Rim $\alpha 2$ - Expressão isoenzimática Na,K-ATPase

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Controlo	4	0,03586374	0,008965935	1,3722E-05
GK	4	0,083867071	0,020966768	0,000130275

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,00028804	1	0,00028804	4,000643075	0,092405725	5,987377607
Dentro de grupos	0,000431991	6	7,19984E-05			
Total	0,00072003	7				

Fígado $\alpha 1$ - Expressão isoenzimática Na,K-ATPase

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Controlo	4	5,17926071	1,294815178	0,03607839
GK	4	3,425918	0,856479501	0,02825647

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,384276332	1	0,384276332	11,9461317	0,013528	5,98737761
Dentro de grupos	0,193004568	6	0,032167428			
Total	0,577280899	7				

Fígado $\alpha 2$ - Expressão isoenzimática Na,K-ATPase

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Controlo	2	0,08097955	0,040489773	0,00143908
GK	2	0,04858876	0,024294379	3,5282E-05

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,000262291	1	0,000262291	0,35580116	0,6113718	18,5128205
Dentro de grupos	0,001474367	2	0,000737184			
Total	0,001736658	3				

Cérebro α 1 - Expressão isoenzimática Na,K-ATPase

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
W	3	1,10161275	0,367204248	0,00130908
GK	3	1,80534761	0,601782535	0,0159563

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,082540459	1	0,082540459	9,56138469	0,0364981	7,70864742
Dentro de grupos	0,034530755	4	0,008632689			
Total	0,117071214	5				

Cérebro α 2 - Expressão isoenzimática Na,K-ATPase

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Controlo	3	0,129892826	0,04329761	3,23914E-05
GK	3	0,110697707	0,03689924	3,86064E-06

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	6,14088E-05	1	6,1409E-05	3,387881244	0,13949813	7,7086474
Dentro de grupos	7,2504E-05	4	1,8126E-05			
Total	0,000133913	5				

Cérebro $\alpha 3$ - Expressão isoenzimática Na,K-ATPase

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Controlo	3	2,294698024	0,76489934	0,006699677
GK	3	2,051286172	0,68376206	0,005759046

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,009874888	1	0,00987489	1,585216734	0,27647711	7,7086474
Dentro de grupos	0,024917446	4	0,00622936			
Total	0,034792335	5				

Coração $\alpha 1$ - Expressão isoenzimática Na,K-ATPase

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Controlo	4	3,12930997	0,782327493	0,01019874
GK	3	1,39590886	0,465302953	0,0088748

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,17229353	1	0,17229353	17,8188598	0,0083179	6,60789097
Dentro de grupos	0,048345835	5	0,009669167			
Total	0,220639364	6				

Coração $\alpha 2$ - Expressão isoenzimática Na,K-ATPase

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Controlo	4	0,14947621	0,037369051	0,00045558
GK	3	0,03506242	0,011687473	3,7331E-05

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,001130646	1	0,001130646	3,92204276	0,1045227	6,60789097
Dentro de grupos	0,001441399	5	0,00028828			
Total	0,002572045	6				