

**O PAPEL DA PROTEÍNA PRION
CELULAR NA REGULAÇÃO DA RESPOSTA
À INSULINA**

GIOVANNA DE BRITO

**Tese apresentada à Fundação Antônio
Prudente para a obtenção do título de Doutor
em Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

Orientadora: Dra. Glauca Noeli Maroso Hajj

São Paulo

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Brito, Giovanna de

O papel da proteína prion celular na regulação da resposta à insulina / Giovanna de Brito – São Paulo 2014.

94p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração:
Oncologia.

Orientadora: Glaucia Noeli Maroso Hajj

Descritores: 1. INSULINA. 2. PROTEÍNAS PrPC. 3. TRANSDUÇÃO DE SINAL. 4. DIABETES MELLITUS. 5. TRANSPORTADOR DE GLUCOSE TIPO 6. OBESIDADE.

DEDICATÓRIA

“(...) E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria (...)”

Paulo 1 Coríntios 13:2

Dedico a tese

A Deus e a Jesus pela oportunidade de realizar um grande sonho. Por me dar saúde e forças para concluir este trabalho. Por aliviar meu coração sempre que este está sobrecarregado.

À espiritualidade amiga, que está sempre presente ao meu lado, me amparando e me inspirando.

Aos meus pais José e Sonia, sem sua paciência, persistência, apoio financeiro e incentivos de todas as formas este trabalho não teria sido realizado.

Ao meu noivo Leonardo, a pessoa que mais me incentivou durante toda a minha vida e que faz minha estrela brilhar. Quem me ensinou a olhar pra cima sempre, a persistir nos meus sonhos, acreditando na minha capacidade e na minha força mesmo quando eu mesma não o fazia.

Ao meu irmão Marco e a minha sobrinha Marcella por proporcionarem momentos tão felizes na minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a minha orientadora Dra. Gláucia N. M. Hajj pela oportunidade, por todos os conhecimentos passados ao longo destes quatro anos e pelo esforço para a realização de nosso trabalho.

À Dra. Vilma R. Martins por ter cedido seu laboratório para a realização dos experimentos e pelo auxílio de diversas formas.

À instituição CIPE – A C Camargo Cancer Center

A todo grupo de Biologia Celular e Molecular, especialmente:

À amiga Fernanda Lupinacci por todo o auxílio e amizade;

Dr. Tiago Góss dos Santos por todos experimentos que realizou comigo;

Dr. Martin Roffé pelos ensinamentos científicos e técnicos;

Aos bioteristas Oraci Leite e Wanderlei Gonçalves, por todo auxílio nos experimentos com os camundongos;

Dra. Michele C. Landemberger pela genotipagem de todos os animais utilizados neste trabalho;

Ao auxílio dos amigos Bianca Teixeira, Dr. Marcos Salles, Bruna Roz Rodrigues e do técnico Felipe Moreira.

À banca de qualificação Dr. Vladimir C. Cordeiro de Lima e Dra. Kil Sun Lee pelas avaliações e dicas para o trabalho.

À Suely Francisco pelas correções desta tese.

À FAPESP pelo auxílio financeiro.

RESUMO

Brito G. **O papel da proteína prion celular na regulação da resposta à insulina.** São Paulo; 2014. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

A proteína Prion Celular ou PrPc, é uma molécula de superfície celular responsável por desencadear várias cascatas de transdução de sinal e mediar muitos processos fisiológicos como proteção contra apoptose, indução da proliferação, adesão celular entre outros. Devido à sua grande gama de efeitos, hoje se acredita que PrPc seja um organizador de plataformas lipídicas, ou lipid rafts, na membrana celular. O receptor de insulina é uma proteína transmembrana também presente em plataformas lipídicas e, interessante, a ausência de componentes destas plataformas, como caveolinas, por exemplo, leva a uma deficiência na resposta a insulina. Desta maneira, acreditávamos que a ausência de PrPc poderia levar a uma desregulação das plataformas lipídicas e a uma sinalização ineficiente do receptor de insulina. De fato, pudemos observar a influência de PrPc no controle da glicemia sérica, através de experimentos com camundongos que fizeram ingestão de rações com conteúdo controlado de gordura. Foi possível verificar que camundongos deficientes para PrPc não possuem controle adequado da glicemia, de peso e dos níveis de insulina. Estes resultados foram confirmados em duas cepas diferentes de camundongos deficientes para PrPc. Por outro lado, camundongos que superexpressam PrPc apresentam controle adequado de glicemia por mais tempo que camundongos do tipo-selvagem quando alimentados com dietas de alta porcentagem de gordura, sugerindo que a superexpressão de PrPc promoveria uma resistência ao diabetes tipo II, com maior sensibilidade a insulina. As análises histológicas também mostraram que os animais deficientes para PrPc apresentam esteatose hepática mais acentuada do que os animais do tipo selvagem, assim como hipertrofia dos adipócitos, o

que é característico de obesidade. Porém ao longo dos nossos estudos com fibroblastos derivados de camundongos deficientes para PrPc, do tipo selvagem e que superexpressam PrPc, pudemos verificar que nossa hipótese inicial de alteração na atividade do receptor de insulina não foi comprovada. No entanto, pudemos observar que os camundongos deficientes para PrPc possuem menor quantidade de PPAR- γ , um fator de transcrição envolvido na diferenciação de adipócitos que possui influência na regulação da glicemia. Adicionalmente, através de citometria de fluxo, verificamos que a translocação do transportador de glicose Glut4 para a membrana após o estímulo por insulina é altamente influenciada pela presença de PrPc. Desse modo, nossos dados indicam que PrPc exerce influência sobre o metabolismo de glicose através da translocação de Glut4 para a membrana e expressão de PPAR- γ , podendo contribuir para sensibilidade a insulina ou resistência ao diabetes tipo II.

SUMMARY

Brito G. [**The role of cellular prion protein in the regulation of insulin signaling**]. São Paulo; 2014. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

The cellular prion protein or PrPc is a cell surface molecule responsible for triggering various signal transduction cascades and mediate many physiological processes such as protection against apoptosis, inducing proliferation, cell adhesion, among others. Due to its wide range of effects, it is believed that PrPc is a lipid raft organizer in the cell membrane. The insulin receptor is a transmembrane protein also present in lipid rafts. Interestingly, the absence of lipid rafts's components as caveolins, for example, leads to a deficiency in insulin response. Thus, we believed that the absence of PrPc could lead to a dysregulation of lipid rafts and inefficient insulin receptor signaling. In fact, we observed the influence of PrPc in the control of serum glucose, through experiments with mice that ingested diets with controlled fat content. We found that mice deficient for PrPc do not have adequate control of blood glucose, weight gain and insulin levels. These results were confirmed in two different strains of PrPc knockout mice. On the other hand, mice overexpressing PrPc exhibit adequate control of blood glucose longer than wild-type mice when fed with high fat chow, suggesting that overexpression of PrPc promote resistance to Type II diabetes, with greater insulin sensitivity. The histological analysis also showed that PrPc deficient mice exhibit more pronounced hepatic steatosis than wild-type animals, as well as adipocyte hypertrophy, which is characteristic of obesity. However, throughout our studies with fibroblasts derived from mice deficient for PrPc, wild-type and overexpressing PrPc, we could not prove our initial hypothesis of change in insulin receptor activity. However, we observed that mice deficient for PrPc have lesser amounts of PPAR- γ , a transcription factor involved in adipocyte differentiation that has influence on glucose regulation.

Additionally, by flow cytometry, we found that the translocation of the glucose transporter Glut4 to the membrane after insulin stimulation is highly influenced by the presence of PrPc. Thus, our data indicate that PrPc influences the metabolism of glucose through the translocation of Glut4 to the membrane and expression of PPAR- γ , which may contribute to insulin sensitivity or resistance to type II diabetes.

LISTA DE FIGURAS E QUADRO

Figura 1	Tráfego intracelular de PrPc.....	5
Figura 2	Via de sinalização de insulina.....	8
Figura 3	Resistência à insulina.....	9
Figura 4	Glicemia camundongos Zrchl 2 meses.....	29
Figura 5	Glicemia camundongos Zrchl 3 meses.....	30
Figura 6	Comparação glicemias de jejum camundongos Zrchl.....	31
Figura 7	Glicemia camundongos Edbgl 2 meses.....	33
Figura 8	Glicemia camundongos Edbgl 3 meses.....	34
Figura 9	Glicemia camundongos Edbgl 4 meses.....	35
Figura 10	Insulina camundongos Zrchl.....	36
Figura 11	HOMA-IR camundongos Zrchl.....	37

Figura 12	Insulina e HOMA IR camundongos Edbgl.....	38
Figura 13	Curva de tolerância a insulina.....	39
Figura 14	Curva de tolerância a glicose.....	40
Figura 15	Ganho de peso camundongos Zrchl.....	42
Figura 16	Ração consumida camundongos Zrchl.....	43
Figura 17	Ganho de peso camundongos Edbgl.....	44
Figura 18	Ração consumida camundongos Edbgl.....	44
Figura 19	Triglicérides camundongos Zrchl.....	45
Figura 20	Triglicérides camundongos Edbgl.....	46
Figura 21	Cortes histológicos tecidos camundongos Edbgl.....	48
Figura 22	Cortes histológicos tecidos camundongos Edbgl.....	49
Figura 23	WB extrato de fígado AKT.....	51

Figura 24	WB extrato de fígado Gluts.....	52
Figura 25	WB extrato de fígado IR.....	53
Figura 26	WB extrato de cérebro AKT.....	55
Figura 27	WB extrato de cérebro Gluts.....	57
Figura 28	WB extrato de tecido adiposo AKT.....	59
Figura 29	WB extrato de tecido adiposo Gluts.....	61
Figura 30	WB extrato de tecido adiposo PPAR-y.....	63
Figura 31	WB extrato de músculo AKT.....	64
Figura 32	WB extrato de músculo Gluts.....	66
Figura 33	Captação de glicose P-MEF com insulina.....	68
Figura 34	Captação de glicose P-MEF com metformina.....	70
Figura 35	WB células P-MEF PrPc.....	72

Figura 36	WB células P-MEF IRS-1.....	72
Figura 37	WB células P-MEF IR.....	73
Figura 38	WB células P-MEF AKT.....	74
Figura 39	WB células P-MEF Gluts.....	76
Figura 40	Citometria de fluxo P-MEF - Glut4.....	77
Quadro 1	Valores de referência HOMA-IR.....	38

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AKT	Proteína quinase B
BSE	Encefalopatia espongiforme bovina
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
Edbgl	Camundongos Edinburg I
<i>EPrnp</i>^{-/-}	Camundongos Edinburg I deficientes para PrPc
<i>EPrnp</i>^{+/+}	Camundongos Edinburg I do tipo selvagem para PrPc
Glut	Transportador de glicose
IR	Receptor de insulina
IRS	Substrato do receptor de insulina
KO	Camundongos deficientes para PrPc
P-MEF	Fibroblastos embrionários primários de camundongo
PPAR-γ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PrP	Proteína prion
PrPc	Proteína prion celular
PrPsc	Proteína prion scrapie
TG20	Camundongos que superexpressam PrPc
TSE	Encefalopatia espongiforme transmissível
TZD	Tiazolidinedionas
WB	Western Blot
WT	Camundongos do tipo selvagem para PrPc
<i>Zprnp</i>^{+/+}	Camundongos do tipo selvagem para PrPc
<i>Zprnp</i>^{0/0}	Camundongos deficientes para PrPc
Zrchl	Camundongos Zurichl

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Doenças Priônicas.....	1
1.2	Proteína Prion Celular (PrPc).....	2
1.3	Insulina e seu Receptor.....	5
1.4	Plataformas Lipídicas, PrPc E o Receptor de Insulina	10
1.5	Doenças Priônicas, Obesidade e Resistência a Insulina.....	12
1.6	PPAR- γ e Resistência à Insulina.....	15
2	OBJETIVOS	17
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1	Camundongos	18
3.2	Medidas da Concentração de Glicose e Insulina in Vivo.....	20
3.3	Curva de Tolerância a Insulina e Glicose	21
3.4	Triglicérides Monoreagente	21
3.5	Remoção dos Tecidos para Análise	22
3.6	Western Blot.....	22
3.7	Cultura Primária de Fibroblastos Embrionários (P-MEF) e Tratamento com Insulina	23
3.8	Captação de Glicose dos Fibroblastos após Tratamento com Insulina ou Metformina.....	24
3.9	Citometria de Fluxo com Células P-MEF.....	25
3.10	Análise Estatística	26
4	RESULTADOS.....	27
4.1	Medidas de Glicemia e Insulina Sérica.....	27
4.1.1	Medidas de Glicemia dos Animais Zrchl e TG20.....	28
4.1.2	Medidas de Glicemia dos Animais Edinburgh I	32
4.1.3	Medidas de Insulina Zrchl e TG20.....	35

4.1.4	Medidas de Insulina Edinburgh I	38
4.1.5	Curvas de Tolerância à Insulina e Glicose	39
4.2	Medidas de Peso e Triglicérides.....	41
4.2.1	Medidas de Peso dos Animais ZurichI	41
4.2.2	Medidas de Peso dos Animais Edbgl	43
4.2.3	Medida de Triglicérides Nos Camundongos Zurich I e TG20	45
4.2.4	Medida de Triglicérides nos Camundongos Edinburgh I	45
4.3	Parâmetros Histológicos.....	46
4.4	Western Blot para Avaliação de Vias de Sinalização	49
4.4.1	Extrato de Fígado	50
4.4.2	Extrato de cérebro:	55
4.4.3	Extrato de tecido adiposo:	59
4.4.4	Extrato de músculo estriado esquelético	64
4.5	Captação de Glicose P-MEF	68
4.6	Captação de Glicose P-MEF com Tratamento de Metformina.	69
4.7	Western Blots do Tratamento das Células P-MEF com Insulina	71
4.8	Citometria de Fluxo	77
5	DISCUSSÃO	79
6	CONCLUSÃO	86
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

ANEXO

Anexo 1 Carta de aprovação do Comitê de Ética no uso de Animais

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇAS PRIÔNICAS

As doenças de prion pertencem a um grupo crescente de enfermidades chamadas *misfolding diseases*, que são atribuídas à deformação e agregação de proteínas em depósitos insolúveis que levam à neurodegeneração. Incluem a doença de Alzheimer, doença de Parkinson, amiloidose sistêmica, entre outras (POGGIOLINI et al. 2013).

As doenças de prion são enfermidades neurodegenerativas também conhecidas como encefalopatias espongiformes transmissíveis (TSEs) (BATE et al. 2011). Estas doenças são de natureza infecciosa, genética ou esporádica e se caracterizam por neurodegeneração e deposição de agregados de proteínas. Até o momento são doenças incuráveis e fatais (KNIGHT e WILL 2004). As TSEs incluem o scrapie em ovelhas, a encefalopatia espongiforme bovina (BSE) no gado, doença debilitante crônica em cervídeos, kuru, síndrome Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), e a doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD) em humanos (YUSA et al. 2012).

As doenças de prion são causadas pela alteração estrutural de uma proteína celular normal, a proteína prion celular ou PrP^c, em uma isoforma altamente insolúvel chamada de prion scrapie ou PrP^{Sc}, que se agrega formando depósitos amilóides (BIASINI et al. 2012).

PrPsc possui a mesma sequência de aminoácidos que PrPc, porém apresenta grande quantidade de estruturas secundárias denominadas folhas- β , sendo resistente à digestão por proteases (BIASINI et al. 2012). PrPsc age como um molde molecular, convertendo moléculas de PrPc em mais moléculas de PrPsc, através de um processo ainda não muito bem elucidado, mas que necessita da interação física entre as duas moléculas. Se atribui a este processo a natureza de auto propagação das infecções por prion (BIASINI et al. 2012).

1.2 PROTEÍNA PRION CELULAR (PrPc)

PrPc é uma glicoproteína endógena expressa em altos níveis no sistema nervoso central e está presente em uma grande variedade de espécies, desde peixes até mamíferos (AGOSTINI et al. 2013). PrPc é codificada pelo gene *Prnp* em humanos e está presente no cromossomo 20 (KNIGHT e WILL 2004). Diversas funções são atribuídas a PrPc, incluindo adesão celular, crescimento de neuritos, excitabilidade neuronal e neuroproteção (BIASINI et al. 2012).

A estrutura terciária de PrPc inclui um domínio N-terminal não estruturado (resíduos 23–124) e uma região globular C-terminal (resíduos 125–228) composta de três α -hélices e duas folhas- β . A metade N-terminal engloba uma região contendo repetições de octapeptídeos (resíduos 51–90) com uma série de histidinas que podem ligar íons metálicos como Cu^{2+} . A região central engloba uma região carregada (resíduos 105–111) seguida

por um domínio hidrofóbico altamente conservado (resíduos 112–130) (BIASINI et al. 2012).

A biossíntese de PrPc ocorre no retículo endoplasmático, onde o peptídeo sinal N-terminal (resíduos 1–22) é removido e uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) é ligada na porção C-terminal, no resíduo 230 (GALVAN et al. 2005). Duas cadeias de oligossacarídeos também são adicionadas (BIASINI et al. 2012).

PrPc permanece ancorado à face externa da membrana celular através da âncora de GPI e, assim como outras proteínas GPI-ancoradas, tem se demonstrado que PrPc se associa predominantemente com plataformas lipídicas, também chamadas *lipid rafts* (AGOSTINI et al. 2013). A proteína prion celular cicla continuamente entre a membrana plasmática e compartimentos endocíticos, conforme demonstrado na figura 1 (ZOMOSA-SIGNORET et al. 2008). Este processo está relacionado com a disponibilidade da proteína na superfície celular, e envolve vias de internalização que podem ser críticas para as funções fisiológicas de PrPc. O tráfego de PrPc é um evento celular complexo e pode envolver mais de um mecanismo de internalização (ZOMOSA-SIGNORET et al. 2008).

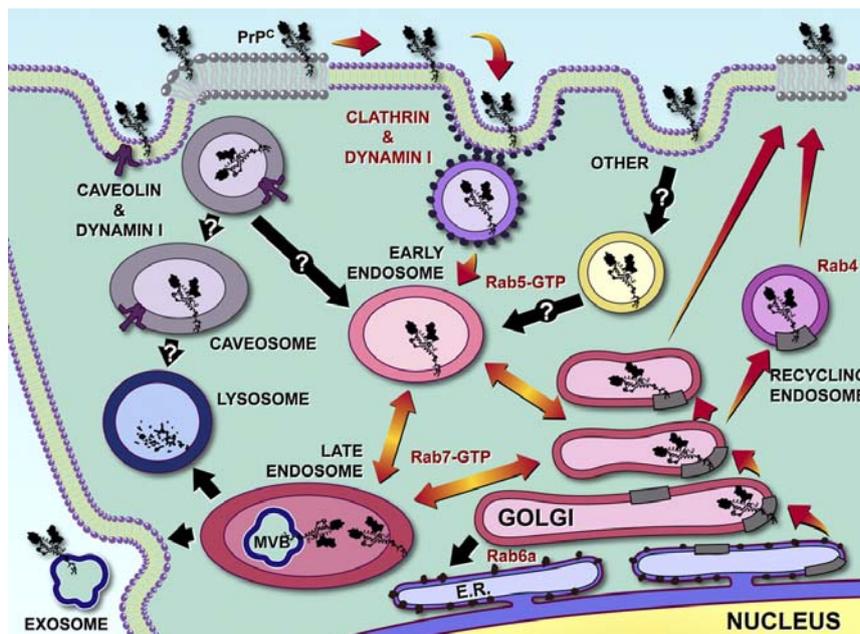
Em um dos mecanismos propostos, PrPc ainda na superfície celular, deixa a membrana e então entra em vesículas revestidas de clatrina (regiões da membrana celular especializadas na endocitose mediada por receptores), onde é endocitado. No entanto, PrPc endocitado não é direcionado para o retículo endoplasmático ou para o complexo de Golgi, mas retorna para a superfície celular. Assim, PrPc

cicla constitutivamente entre a membrana plasmática e endossomos primários, também através de um mecanismo clatrina-dependente (ZOMOSA-SIGNORET et al. 2008).

A endocitose de PrPc também pode se dar através de uma via não-clássica, como por exemplo, PETERS et al. (2003) estudaram a localização e a internalização de PrPc em células CHO utilizando microscopia eletrônica *cryoimmunogold*. Os complexos PrPc-ouro foram transportados para a região pericentriolar via caveola, para estruturas endocíticas, passando pela via de internalização mediada pelas vesículas cobertas por clatrina.

A saída de PrPc das plataformas lipídicas resulta em sua internalização. Nas células neuronais, por exemplo, através da ligação de cobre ao octapeptídeo N-terminal, PrPc é translocado para fora das plataformas lipídicas indo para regiões detergente-solúveis da membrana plasmática antes de ser endocitado pelo mecanismo clatrina-dependente (TAYLOR e HOOPER et al. 2006).

Parte de PrPc reciclado pode ser secretado para o meio extracelular associado a exossomos. Estas estruturas vesiculares são derivadas dos corpos multivesiculares formados dentro do sistema endossomal e tem sido associado à transferência de moléculas entre as células (LINDEN et al. 2008).



Fonte: LINDEN et al. (2008).

Figura 1 – Tráfego intracelular de PrPc. Os principais sistemas vesiculares envolvidos tanto na síntese (canto inferior direito), quanto o ciclo endocítico de PrPc, e sua liberação através de exossomos (canto inferior esquerdo) estão indicados com letras pretas. As moléculas envolvidas na via clatrina-dependente estão indicadas com letras vermelhas. As setas indicam o tráfego, os caminhos mais prováveis baseados em evidências experimentais atuais estão indicados por setas vermelhas. Clatrina está representada em círculos azuis escuros e a caveolina em roxo. PrPc está associado com as plataformas lipídicas na via secretória e PrPc da superfície celular deixa as plataformas para ser internalizado via clatrina.

1.3 INSULINA E SEU RECEPTOR

A insulina é o hormônio principal para a regulação do metabolismo da glicose. É liberado para a circulação pelas células β das ilhotas de Langerhans do pâncreas em resposta a mudanças dos níveis de glicose no sangue (LI et al. 2007).

O receptor de insulina (IR) pertence a uma subfamília de receptores tirosina-quinase. É uma proteína heterotetramérica que consiste de 2 subunidades α e 2 β que funcionam como enzimas alostéricas onde a subunidade α inibe a atividade tirosina-quinase da subunidade β após o estímulo por insulina (PATTI e KAHN 1998). A ligação da insulina à subunidade α leva a autofosforilação das subunidades β e uma mudança conformacional que posteriormente aumenta sua atividade quinase. A autofosforilação do receptor catalisa a fosforilação de proteínas celulares como os membros da família IRS (*insulin receptor substrate*), Shc e Cbl (PATTI e KAHN 1998).

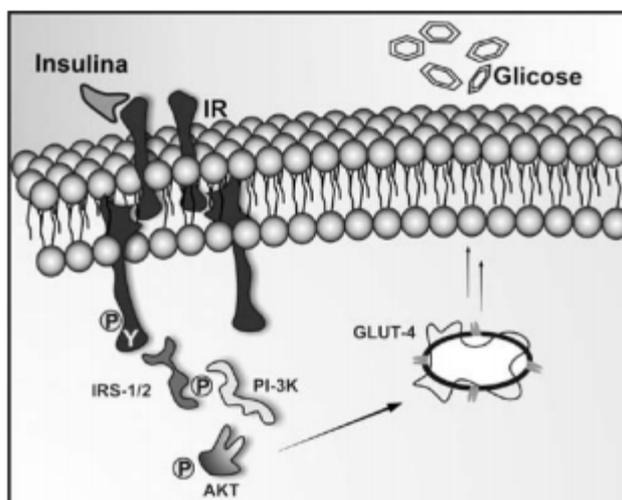
As proteínas IRS são uma família de proteínas adaptadoras citoplasmáticas que transmitem sinais dos receptores de insulina e IGF-1 (*insulin-like growth factor*) induzindo a resposta celular. IRS-1 é um dos primeiros mediadores na regulação do metabolismo da glicose na maioria dos tipos celulares. IRS-1 é recrutada e fosforilada em resíduos de tirosina pelo receptor de insulina ativado, gerando sítios de ligação para recrutar efetores “*downstream*”. IRS-1 contém múltiplos sítios de ligação que recrutam e ativam PI3K (fosfatidil-inositol 3 quinase). PI3K é uma quinase de lipídeos responsável por fosforilar fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) em fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3). O aumento de PIP3 recruta AKT para a membrana, onde esta é ativada através da fosforilação em T308 por PDK1. A ativação de AKT dispara diversas cascatas intracelulares que levam a diversos fenômenos biológicos distintos. Entre estes fenômenos está o aumento na captação de glicose. A ativação de AKT dependente de

IRS-1 estimula a fosforilação de AS160 (Akt Substrate of 160 kDa, Akt1S1), inibindo sua atividade GAP (GTPase activating protein) sobre as proteínas Rab (proteínas envolvidas com o tráfego de endossomos). Como resultado, as proteínas Rab permanecem em sua forma ativa ligadas a GTP e promovem o tráfego de transportadores de glicose (SHAW 2011).

A maioria das células de mamíferos importa glicose através de um processo de difusão facilitada mediada por membros da família de proteínas transportadoras de glicose - Glut. Quatorze proteínas Glut são expressas em humanos e incluem transportadores de outros substratos além de glicose, como frutose, por exemplo (ZAID et al. 2008).

Os transportadores de glicose 1 (Glut1) e 3 (Glut3) pertencem à família de transportadores de solutos 2 (SLC2) e são os dois Gluts mais importantes no cérebro, e, entre eles, Glut3 é o principal em neurônios, sendo responsável pela captação de glicose nestas células (YAN et al. 2014). Glut4 é um transportador de alta afinidade por glicose que é expresso predominantemente em células do músculo e do tecido adiposo. Na ausência de insulina, a maioria destas proteínas está distribuída entre endossomos, no complexo de Golgi e em vesículas de armazenamento. A quantidade de Glut4 na superfície celular é determinada pelo equilíbrio entre a endocitose e a exocitose de Glut4. Na ausência de insulina, a hipoglicemia é evitada através da rápida endocitose e da lenta exocitose deste transportador nos tecidos adiposo e muscular. Após o estímulo com insulina, através dos mecanismos descritos acima, os níveis de Glut4 na membrana

aumentam, levando ao aumento do transporte de glicose (LETO e SALTIEL 2012) (Figura 2).



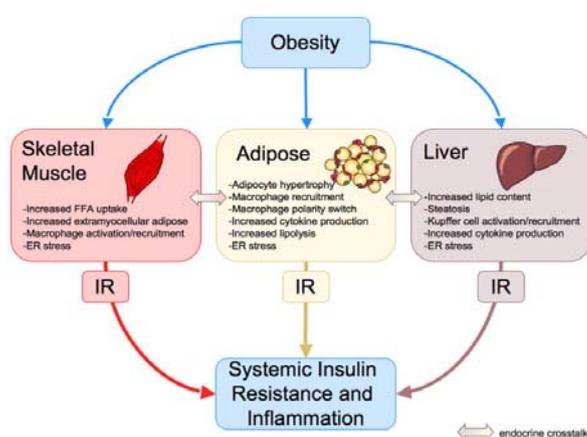
Fonte: PAULI et al. (2009).

Figura 2 - Via de sinalização de insulina. A insulina se liga ao receptor (IR), resultando na fosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS-1), levando a ativação de PI3K e AKT, que faz com que GLUT4 se transporte para a membrana, promovendo assim a entrada de glicose na célula

O controle sobre a sinalização de insulina também é dado por autorregulação, via “*feedback*” negativo. O receptor de insulina (IR) e as proteínas IRS são alvos desses mecanismos de controle, sendo a fosforilação das proteínas IRS em resíduos de serina, um ponto-chave para esse processo (GUAL et al. 2003; ZICK 2005). A ativação da via de PI3K/AKT por insulina, leva a ativação da proteína mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*) e seus efetores *downstream*, como S6K (70kDa ribossomal protein S6 kinase) (CARLSON et al. 2004). Interessantemente, S6K é capaz de fosforilar a Ser 636/639 de IRS, conferindo inibição de sua atividade (BOURA-HALFON e ZICK 2009).

Como visto, para a correta captação da glicose plasmática em resposta a um aumento de ingestão de alimentos, é necessário que haja um bom funcionamento do receptor de insulina e de sua sinalização *downstream*. Quando não há uma resposta adequada através deste receptor, pode se caracterizar a resistência à insulina.

A resistência à insulina (fig.3) é uma condição genética ou adquirida, na qual concentrações fisiológicas de insulina provocam uma resposta subnormal na captação de glicose pelas células, especialmente no músculo e adipócitos. Em consequência da menor captação de glicose, torna-se necessária uma maior produção de insulina pelo pâncreas para a manutenção dos níveis glicêmicos normais, aumentando-se desta forma os níveis circulantes de insulina e, portanto, a situação de resistência à insulina é acompanhada de hiperinsulinemia (PESSIN e SALTIEL 2000). Existem muitas causas para resistência à insulina: fatores genéticos, medicações, síndrome metabólica, gravidez, estresse, entre outras (CORREIA et al. 2002).



Fonte: DE LUCA et al. (2008)

Figura 3 - Resistência à insulina – defeito na utilização da insulina pela célula, fazendo com que a glicose continue na corrente sanguínea.

1.4 PLATAFORMAS LIPÍDICAS, PrPc E O RECEPTOR DE INSULINA

Como dito anteriormente, PrPc está ligado à membrana celular através de uma âncora de GPI e se localiza preferencialmente em domínios de membrana ricos em esfingolipídios e colesterol (plataformas lipídicas) (GALVAN et al. 2005).

As plataformas lipídicas são definidas como pequenos domínios heterogêneos, altamente dinâmicos, enriquecidos por colesterol e esfingolipídios que compartimentalizam processos celulares e podem ser estabilizados para formarem plataformas maiores através de interações proteína-proteína e proteína-lipídio (PIKE 2006).

Anormalidades nas plataformas lipídicas têm sido encontradas em diversas doenças, incluindo aterosclerose, diabetes, câncer, distrofia muscular e doenças neurodegenerativas como doença de Alzheimer.

Atualmente, acredita-se que PrPc poderia ser um organizador destas plataformas lipídicas. Um *cross-linking* entre moléculas de PrPc poderia induzir a um rearranjo das plataformas lipídicas através de movimento lateral (MAYOR e RAO 2004). De fato, o agrupamento de PrPc desencadeia vários processos de transdução de sinal, incluindo o recrutamento de moléculas de adesão (TAYLOR e HOOPER et al. 2006). Como as plataformas lipídicas contêm receptores e proteínas especializadas em sinalização celular, é possível que PrPc possa modular a atividade destas proteínas através da reorganização destas estruturas (LINDEN et al. 2008).

Em adipócitos, a localização do receptor de insulina se dá em estruturas denominadas cavéolas, invaginações da membrana consideradas como domínios especializados das plataformas lipídicas, que se originam da oligomerização das caveolinas (GUSTAVSSON et al. 1999). Interessantemente, a caveolina-1 funciona como um ativador da sinalização do receptor de insulina e animais deficientes para caveolinas-1 e 3 sofrem de resistência à insulina (COHEN et al. 2003; CAPOZZA et al. 2005). Desta maneira, a ativação do receptor de insulina depende das plataformas lipídicas e uma alteração em PrPc com a consequente modificação das plataformas, poderia afetar a atividade do receptor de insulina.

Além da hipótese de PrPc participar da regulação do receptor de insulina pelo fato de ambos estarem presentes nas plataformas lipídicas, também existe a possibilidade de uma regulação através da via de sinalização *downstream* do receptor de insulina. Por exemplo, já foi demonstrado que PrPc está envolvido na via de sinalização de PI3K-mTOR, mediando a síntese de proteínas em resposta a ligação com a proteína STI1 (STI1 – stress inducible protein 1) (ROFFÉ et al. 2010). Interessantemente, um dos substratos de mTOR, a quinase S6K1, está envolvida em um ciclo de “feedback” negativo para IRS1. S6K1 ativada aumenta a fosforilação dos resíduos S307 e S636/S639 de IRS1, que estão envolvidos com a resistência a insulina. Desta maneira, a ativação da via de mTOR em condições de abundância de nutrientes leva a uma ativação de S6K1 que regula negativamente a sinalização de insulina (UM et al. 2004).

Camundongos deficientes em S6K1 são hipoinsulinêmicos, intolerantes a glicose e possuem massa de células β diminuída. No entanto, estes mesmos camundongos mantêm os níveis de glicose normais após jejum, sugerindo hipersensibilidade à insulina (PENDE et al. 2000). Portanto, como PrPc é um ativador da via de mTOR e conseqüentemente de S6K1, levanta-se a possibilidade de que possa ter alguma influência sobre o “feedback” negativo da via de sinalização da insulina.

Em outro estudo recente, demonstrou-se que PrPc é altamente expresso em adenocarcinomas colorretais e está envolvido na regulação da expressão de Glut1 através da via Fyn-HIF2- α . Como Glut1 é um transportador de glicose e é necessário para a alta atividade da via glicolítica vista nos tumores colorretais, o silenciamento de PrPc reduziu a taxa de proliferação e a sobrevivência das células tumorais *in vitro* e *in vivo* (LI et al. 2011).

Deste modo, podemos levantar a hipótese de que PrPc influencia uma resposta celular e sistêmica à insulina através de diversos mecanismos distintos.

1.5 DOENÇAS PRIÔNICAS, OBESIDADE E RESISTÊNCIA À INSULINA

Existem diversos estudos que demonstram que a infecção por PrPsc altera funções fisiológicas importantes, como por exemplo, a deficiência na

sinalização do receptor de insulina, ou causando a obesidade até mesmo antes de aparecerem os primeiros sintomas clínicos das doenças.

STROM et al. (2013) demonstraram que a infecção de um macaco cinomolgo (*Macaca fascicularis*) por BSE (encefalopatia espongiforme bovina), causou ganho de peso em um estágio muito inicial da fase pré-clínica da infecção. Foi descrito também que a infecção por PrPsc causa obesidade em camundongos, mais especificamente a cepa scrapie ME7 (CARP et al. 1998). O mesmo grupo demonstrou anteriormente que camundongos infectados que se tornaram obesos também apresentaram intolerância à glicose e hiperglicemia (CARP et al. 1989).

Outro estudo demonstrou que o tráfego vesicular pós-Golgi é atrasado em células de neuroblastoma N2a com PrPsc. A expressão de PrPc na superfície celular diminuiu e se acumulou no complexo de Golgi. Também foi demonstrado que o receptor de insulina assim como sua autofosforilação e a proteína atractina estão reduzidos na superfície celular em células infectadas (UCHIYAMA et al. 2013). O estudo sugere que existe prejuízo na sinalização de insulina devido a redução de IR α na membrana por causa do comprometimento do tráfego de vesículas pós-Golgi (UCHIYAMA et al. 2013).

BAILEY et al. (2008) avaliou as alterações induzidas por prion no pâncreas após a infecção de hamsters com PrPsc, medindo as concentrações de insulina e a glicemia pós-prandial e de jejum. Após a infecção por prions os hamsters apresentaram hiperinsulinemia e hiperglicemia em estágios pré-clínicos da doença. Foram observadas

alterações das funções endócrinas do pâncreas, porém estas alterações não foram associadas à deposição de PrP^{sc} no mesmo órgão. O autor acredita que as alterações induzidas por prion na homeostase da energia podem ocorrer em áreas do hipotálamo que controlam a saciedade e em centros autonômicos que controlam as atividades pancreáticas (BAILEY et al. 2008). De fato, na presença de concentrações basais de insulina, o estímulo da sinalização de insulina no hipotálamo é suficiente para inibir a produção de glicose (pelo fígado). A perda desta regulação pode resultar em intolerância à glicose e, portanto a resistência à insulina no hipotálamo pode possuir papel na patofisiologia da diabetes mellitus tipo 2.

Além do envolvimento das infecções por príon na atividade do receptor de insulina, também foram observadas alterações no transportador de glicose Glut3 após infecção por TSEs em hamsters. Glut3 é o principal transportador de glicose em neurônios, sendo responsável pela captação de glicose nos mesmos. Os níveis de HIF-1 α (fator induzido por hipoxia -1) que regula positivamente a expressão de Gluts foram reduzidos significativamente no cérebro dos animais após a infecção, reduzindo assim a expressão de Glut3 muito antes do que o aparecimento dos sintomas clínicos (YAN et al. 2014).

Outro estudo também mostra a conexão da regulação da glicemia com a proteína prion celular. Neste estudo foi demonstrado que a expressão de PrP^c está suprimida em células β -pancreáticas de ratos hiperglicêmicos sugerindo uma regulação de PrP^c na homeostase da glicose. No mesmo estudo também observaram que camundongos deficientes para PrP^c

possuem intolerância à glicose, sem no entanto, estabelecer nenhum mecanismo para esta deficiência (STROM et al. 2011).

1.6 PPAR-Y E RESISTÊNCIA À INSULINA

Em condições normais o tecido adiposo branco armazena o excesso de energia na forma de gordura. Quando a entrada de energia é maior do que o gasto energético, o tecido adiposo se expande devido a hiperplasia e, principalmente pela hipertrofia dos adipócitos. Os adipócitos hipertrofiados secretam adipocinas (leptina, adiponectina e resistina, por exemplo) que podem interferir diretamente na sinalização de insulina (SIERSBAEK et al. 2010).

A adipogênese é um processo que envolve fatores de transcrição que agem em diferentes pontos durante a diferenciação. PPAR-y é um regulador-chave no desenvolvimento de adipócitos tanto *in vitro* como *in vivo*. PPARs são ativados por uma variedade de ácidos-graxos e seus derivados, como por exemplo, as prostaglandinas (SIERSBAEK et al. 2010).

Drogas agonistas de PPAR-y (Tiazolidinedionas – TZDs) aumentam a sensibilidade à insulina, além de aumentar a capacidade de armazenamento de ácidos-graxos nos adipócitos, diminuindo assim a quantidade de ácidos-graxos circulantes. PPAR-y ativa a expressão de adiponectina, que está envolvida na sensibilização do fígado e do músculo à insulina (SIERSBAEK et al. 2010).

A expressão e função de Glut4 pode ser regulada a níveis proteicos e de mRNA. As TZDs aumentaram o mRNA de Glut4 em tecido muscular. Uma vez que as TZDs se ligam a PPAR- γ , causam o desacoplamento de co-supressores e a ligação de co-ativadores, que levam ao desligamento de PPAR- γ do gene promotor de Glut4. Isto leva a diminuição da supressão gênica, aumentando a expressão de Glut4 e, subsequentemente, aumentando a resposta à insulina (KARNIELI e ARMONI 2008).

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é estabelecer a relação entre PrPc e a resposta sistêmica à insulina. Para isto, os objetivos específicos são:

- 1 Estabelecer a glicemia basal pós-prandial, no jejum e em resposta à administração de insulina em camundongos do tipo-selvagem, deficientes para PrPc e que superexpressam PrPc. Assim como estabelecer os níveis de insulina no jejum e após a administração de glicose.
- 2 Verificar o efeito de dietas de alta gordura sobre a glicemia basal pós-prandial e no jejum em animais do tipo-selvagem, deficientes para PrPc e que superexpressam PrPc.
- 3 Verificar o efeito de dietas de alta gordura sobre a estrutura dos tecidos e peso em animais tipo-selvagem, deficientes para PrPc e que superexpressam PrPc.
- 4 Determinar os mecanismos moleculares através dos quais PrPc afeta a resposta à insulina. Particularmente, determinar o estado de ativação das proteínas de resposta à insulina (IR, IRS), da via de AKT e dos transportadores de glicose em tecidos extraídos dos camundongos ou em células P-MEF dos três genótipos distintos.
- 5 Verificar a translocação de Glut4 para a membrana após o estímulo com insulina nas células P-MEF dos diferentes genótipos através de citometria de fluxo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CAMUNDONGOS

Os camundongos *Zrch* ou *ZPrnp^{0/0}* foram construídos por BÜELER et al. (1992) e tiveram o gene *Prnp* deletado na região dos aminoácidos 4 a 186, sendo que esta sequência foi substituída por um cassete de neomicina. Estes animais têm *background* genético misto C57/BL6J X 129 Sv.

Como controle para os experimentos, foram gerados camundongos controle *Zrch Prnp^{+/+}* (*ZPrnp^{+/+}*) através do acasalamento entre os animais C57/BL6J e 129 Sv. O cruzamento contínuo a partir dos F1 destes animais gerou a cepa tipo-selvagem de *background* misto que é controle para os camundongos *ZPrnp^{0/0}*.

Utilizamos também animais que superexpressam PrPc, denominados TG20 (FISCHER et al. 1996). Estes animais são transgênicos construídos a partir de blastocistos do camundongo *ZPrnp^{0/0}*. Neles foram inseridas cópias adicionais do gene de PrPc que levam a expressão de aproximadamente 6 vezes mais proteína do que os animais tipo-selvagem. Estes animais têm, portanto, o mesmo *background* genético dos *ZPrnp^{0/0}*.

Os experimentos foram repetidos em outra linhagem de animais deficientes para PrPc (Edinburgh I). Os camundongos *Edbg Prnp^{-/-}* foram construídos por MANSON et al. (1994), e neles o cassete de neomicina foi inserido no sítio de restrição da enzima Kpn-1 presente na ORF de *Prnp*.

Nos últimos anos estes animais foram re-acasalados com animais de background C57/BL10 por 20 gerações no Laboratório do Dr. Bruce Chesebro (Rocky Mountains NIH). Na tentativa de controlar o *background* genético desta linhagem dentro dos experimentos, animais heterozigotos (Edbg *Prnp*+/-) são continuamente acasalados com C57/BL10 (*backcross*). Os 50% de animais heterozigotos provenientes destes acasalamentos são acasalados entre si e geram uma prole onde 25% dos animais são homozigotos para a depleção (*EPrnp*-/-) 25% são controles homozigotos sem depleção *EPrnp*+/+ e 50% são heterozigotos (*EPrnp*+/-). Estas proles então são usadas para os experimentos, pois têm o mesmo *background* e o controle tipo-selvagem vindo do mesmo acasalamento.

Também foram utilizados os animais Backcross, que são o resultado do acasalamento dos animais Zrch I com C57/BL6 por no mínimo 10 gerações, para diminuir interferências de *background* genético.

Todas as linhagens foram divididas em gaiolas de acordo com o sexo, genótipo e porcentagem de gordura da ração. Logo após o desmame (3 semanas de idade) os camundongos foram alimentados exclusivamente com dietas de alto conteúdo de gordura (60% das calorias provenientes de gordura, catálogo número D12492I, 45% das calorias provenientes de gordura, catálogo número D12451I ou conteúdo normal de gordura, sendo 10% das calorias provenientes de gordura; D12450BI, todas da Research Diets). Duas vezes por semana, era adicionado conteúdo previamente pesado de ração, antes disso porém, o restante era pesado para se ter o

controle da ingestão. Os experimentos foram iniciados aos 2 meses de idade.

3.2 MEDIDAS DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE E INSULINA *IN VIVO*

Para a medida de glicemia e insulina em jejum foram utilizados camundongos sob alimentação normal ou sob jejum de 18 horas. Duas amostras de 20µl cada de sangue por camundongo foram obtidas. Para isso o camundongo foi colocado sobre uma superfície horizontal e foi realizada uma pequena punção da cauda, com o auxílio de uma agulha ou bisturi, com o intuito de promover um leve sangramento, não foi necessária a contenção do animal. Para a medida de insulina, glicemia, uma amostra de 20µl de sangue foi armazenada em um tubo de microcentrífuga com solução de fluoreto anticoagulante para obtenção de plasma, que é obtido com a centrifugação dos tubos por 15 minutos a 2500 rpm.

Para a medida de glicemia, foi utilizado o kit glicose monoreagente K082 da empresa Bioclin. Se trata de um teste enzimático colorimétrico, cujo princípio de ação é a oxidação enzimática da glicose pela glicose oxidase, gerando peróxido de hidrogênio, que, em presença da peroxidase reage com 4-Aminoantipirina e Fenol, formando um cromógeno vermelho cereja cuja intensidade é proporcional à concentração de glicose.

As amostras foram lidas em espectrofotometro a 505nm. Para a medida de insulina sérica foi utilizado o teste de ELISA (Cat. # EZRMI-13K) para camundongos, comercializado pela empresa Millipore.

3.3 CURVA DE TOLERÂNCIA A INSULINA E GLICOSE

Para a realização da curva de tolerância a insulina, foi retirada uma amostra de sangue de 20uL (como descrito no ítem 3.2) no período pós-prandial, depois injetou-se 0,012UI de insulina por camundongo, uma amostra de sangue de 20uL foi retirada a cada 30 minutos até completar 90 minutos. A medida da glicose foi feita como descrito no ítem 3.2.

Para a realização da curva de tolerância a glicose, os animais foram mantidos em jejum por 18 horas, após este período retirou-se uma amostra de 20uL de sangue. Injetou-se 2g/Kg de glicose por camundongo, uma amostra de sangue de 20uL foi retirada a cada 30 minutos até completar 90 minutos. A medida de insulina foi feita conforme descrito no ítem 3.2.

3.4 TRIGLICÉRIDES MONOREAGENTE

Os animais foram deixados em jejum por 18 horas. Foram coletados 20uL de sangue de cada animal através de punção na cauda em tubo contendo anticoagulante fluoreto. O sangue foi centrifugado a 2500rpm por 15 minutos e o plasma foi separado para análise. Foi utilizado o kit

Triglicérides monoreagente da Bioclin cat. K117, que é um teste colorimétrico. O princípio do teste se baseia na seguinte reação: Lipase Lipoprotéica – Glicerol Quinase – Glicerol-3-Fosfato Oxidase – Peroxidase – Cromógeno Cereja. As amostras foram lidas em espectrofotômetro a 505nm.

3.5 REMOÇÃO DOS TECIDOS PARA ANÁLISE

Os tecidos foram removidos dos animais após jejum de 18 horas. Foram extraídos fígado, cérebro, tecido adiposo e músculo. Os tecidos foram congelados imediatamente após a retirada em freezer -80°C para posterior análise ou foram fixados em formaldeído 10%, parafinizados, cortados, corados com hematoxilina-eosina e analisados em microscópio.

3.6 WESTERN BLOT

Os tecidos retirados dos camundongos e as células foram lisados com o seguinte tampão: Tris HCl pH 8,0- 50mM; NaCl – 150mM; EDTA – 1mM; NP40- 1%, deoxicolato de sódio – 0,5%, Inibidor de fosfatase - 10%; inibidor de protease - 10% e H₂O. Os lisados foram centrifugados a 14000rpm por 15 min e o sobrenadante transferido para novos tubos. Foi feita a quantificação em Bradford e adicionado tampão redutor. As amostras foram corridas em gel de SDS-PAGE em amperagem controlada. Após a corrida foi feita a transferência para membrana de nitrocelulose. Após a transferência a membrana foi bloqueada com TBST-5% leite por 1 hora. Foi

colocado um dos seguintes anticorpos primários “overnight”: (P-IRS-1 (Ser636/639) #2388 – 1:1000 em TBST 5% BSA; IRS-1 mouse mAb #3194 – 1:1000 em TBST 5% leite; P-IGF I Receptor β (Tyr1135/1136)/Insulin receptor β (Tyr1150/1151) Rabbit mAb #3024 – 1:1000 em TBST – 5% BSA; Insulin receptor β mouse mAb #3020 – 1:1000 em TBST 5% BSA; Glut4 mouse mAb #2213 – 1:1000 em TBST 5% leite; P-AKT (Ser473) rabbit mAb #4058 – 1:1000 em TBST 5% BSA; P-AKT (Thr 308) rabbit mAb – 1:1000 em TBST 5% BSA; AKT rabbit #9272 – 1:1000 em TBST 5% BSA; PPAR- γ rabbit mAb #2443 – 1:1000 em TBST 5% BSA; todos da Cell signaling; anti-Glut1 cat. 07-1001 – 1:1000 em TBST 5% BSA da Millipore e α -tubulin mouse monoclonal antibody T9026 – 1:10000 em TBST 5% BSA da Sigma-Aldrich. Após isso foi colocado o anticorpo secundário acoplado a peroxidase ECL Rabbit IgG #NA9310V ou ECL Mouse IgG #NA9310V ambos da GE – 1:5000 por 1 hora e a membrana foi revelada com kit de quimioluminescência da marca Thermo scientific cat. 3206.

3.7 CULTURA PRIMÁRIA DE FIBROBLASTOS EMBRIONÁRIOS (P-MEF) E TRATAMENTO COM INSULINA

Foram utilizados embriões de 14 dias dos animais Zurichl KO (*ZPrnp^{0/0}*), WT (*ZPrnp^{+/+}*) e TG20. Fêmeas grávidas 14 dias pós-coito foram sacrificadas por inalação de CO². Os embriões foram removidos da tuba uterina e dissecados para remover a cabeça, membros e órgãos internos. O restante do corpo foi picotado com auxílio de pinças e os pedaços colocados

em meio DMEM com tripsina. Os pedaços foram agitados em termomixer com temperatura de 37°C a 900-1050 rpm por 20 minutos. Foi retirado o sobrenadante e as células foram ressuspensas em DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium- low glucose-Gibco®) com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen). As culturas foram deixadas em estufa a 37°C. O meio foi trocado a cada 2 dias e as células repicadas a cada 4 dias.

As células dos três genótipos foram plaqueadas em densidade de 10^5 células por placa p60. No dia seguinte as mesmas foram carenciadas utilizando-se o mesmo DMEM porém sem soro fetal bovino por 1 hora. Após este tempo as células foram tratadas com 100nM de insulina por 15 min. Foi feito o extrato e o western blot como descrito no item 3.6.

3.8 CAPTAÇÃO DE GLICOSE DOS FIBROBLASTOS APÓS TRATAMENTO COM INSULINA OU METFORMINA

As células P-MEF dos três genótipos, KO, WT e TG20, foram plaqueadas utilizando-se 10^5 células e mantidas em cultura. No dia seguinte as células foram carenciadas por 1 hora utilizando-se meio DMEM sem soro, reservou-se uma alíquota deste meio para a realização da medição de glicose no tempo 0. Após este tempo adicionou-se insulina (100nM) ou metformina (1 e 5mM) por 6 horas. As placas controle não receberam nenhum tratamento. Após este período coletou-se 10uL de cada placa para a medição de glicose do meio, utilizando-se o kit de glicose monoreagente K082 da empresa Bioclin, conforme descrito no item 3.3. O cálculo da

captação de glicose foi realizado subtraindo a medida de glicose final da medida de glicose do tempo 0. Os experimentos foram feitos em triplicata.

3.9 CITOMETRIA DE FLUXO COM CÉLULAS P-MEF

As células P-MEF KO, WT e TG20 foram plaqueadas igualmente em P100 (5×10^5). No dia seguinte as células foram carenciadas por 1 hora com DMEM low glucose. As células receberam insulina (100nM) por 30 minutos. Após este período as células foram removidas das placas utilizando-se PBS com EDTA e com auxílio de *cell scraper*. Foram centrifugadas por 3 minutos a 2500rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet de células foi ressuspendido com 200uL de anticorpo Glut4 (1F8 Mouse mAb#2213 - Cell signaling) diluído 1:100 em PBS 0,5% BSA, por 1 hora a 4°C. Após este tempo as células foram lavadas 3 vezes com PBS 0,5% BSA e ressuspendidas com o anticorpo secundário Alexa Fluor[®] 488 ou 405 Dye – Life technologies, diluído 1:1000 em PBS 0,5% BSA, e incubadas por 1 hora no escuro a 4°C. Em seguida as células foram lavadas 3 vezes com PBS 0,5%BSA, filtradas e lidas em citometro *FACSCanto BD*. Utilizou-se como controle as células sem marcação e as marcadas somente com anticorpo secundário. A análise foi feita utilizando-se o software *Flowing software*.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o *software* GraphPad Prism 6 for Windows. Utilizamos os testes T de student (para se comparar a média de 2 grupos), na comparação de glicemia pos-prandial e de jejum. One Way ANOVA (comparar as médias de 2 ou mais amostras distintas com apenas uma variável independente). Teste de Kruskal Wallis (não-paramétrico), na análise de western blots dos tecidos. Utilizamos Two way ANOVA (análise de mais de uma variável independente e múltiplas observações para cada variável independente) para a análise dos experimentos realizados com os camundongos, onde havia mais de uma variável, como porcentagem de gordura da ração e genótipo. Considerou-se $p < 0,05$ como significativo.

4 RESULTADOS

4.1 MEDIDAS DE GLICEMIA E INSULINA SÉRICA

Iniciamos nossos trabalhos verificando se a presença de PrPc poderia alterar a resposta sistêmica a insulina. Para isso, utilizamos animais tipo selvagem, animais nocaute para PrPc e animais que superexpressam PrPc. Como podem existir alterações metabólicas dependentes de cepas de camundongos, utilizamos animais deficientes para PrPc provenientes de duas construções independentes e que foram feitas em cepas distintas: Zurich1 (tipo-selvagem ZPrnp^{+/+} e nocautes Zprnp^{0/0}) são animais com background misto BL6/129Sv e Edinburgh1 (tipo-selvagem EPrnp^{+/+} e nocautes EPrnp^{-/-}) são animais com background puro BL6. Os animais TG20 foram construídos a partir dos Zurich1 e por isso os resultados são comparados aos Zurich1. Para verificar também se influências ambientais poderiam alterar a resposta sistêmica a insulina, diferentes grupos de animais foram alimentados com rações contendo 10%, 45% ou 60% das calorias provenientes de gordura.

No primeiro experimento realizado, verificamos como estava o controle da glicemia sérica em condições pós-prandiais e em jejum. Em condições ideais, espera-se que haja diferença significativa entre as glicemias pós-prandial e de jejum, caracterizando-se assim a boa regulação da glicemia sérica.

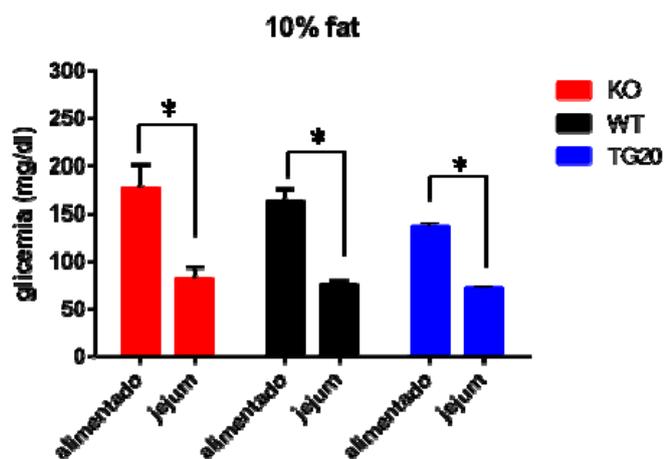
4.1.1 Medidas de Glicemia dos animais Zurichl E TG20

Podemos observar que aos dois meses de idade os animais TG20 apresentavam boa regulação da glicemia sérica, sendo o nível glicêmico pós-prandial significativamente maior que o nível glicêmico em jejum, em ambos os tratamentos (rações 10 e 60% de gordura) da mesma maneira que os camundongos tipo-selvagem. Já os camundongos deficientes para PrPc haviam perdido essa regulação (Figura 4), não apresentando diferenças entre a medida de glicemia pós-prandial e em jejum.

Aos 3 meses de idade, tanto os animais tipo-selvagem quanto os animais deficientes para PrPc haviam perdido a regulação glicêmica quando alimentados com a ração contendo 60% de gordura (Figura 5). No entanto, os animais que superexpressam PrPc continuavam mantendo esta regulação, demonstrando que a superexpressão de PrPc pode contribuir para uma melhor resposta a insulina.

Já os camundongos que fizeram a ingestão da ração contendo 10% de gordura, dos três genótipos, mantiveram a boa regulação da glicemia até o final do experimento, tanto aos dois meses de idade quanto aos três meses de idade (Figura 4A e 5A).

A



B

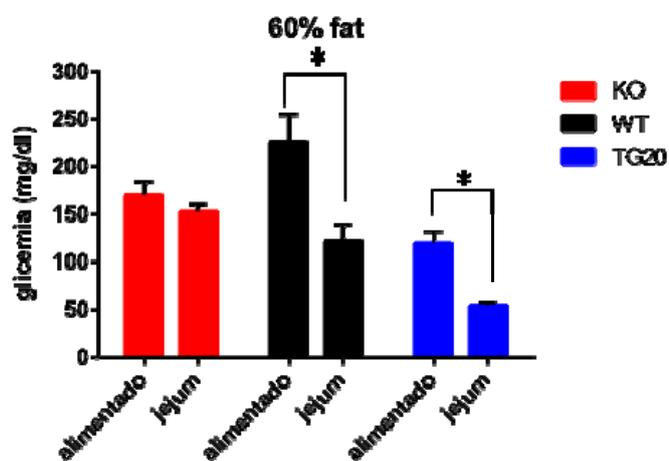
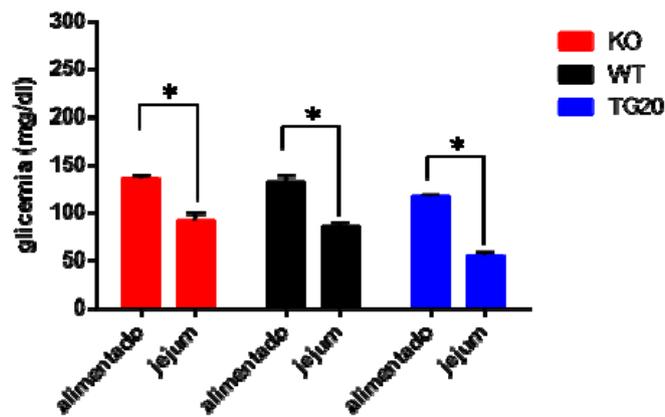


Figura 4 - Gráficos representando a glicemia no período pós-prandial e em jejum dos camundongos tipo-selvagem *ZPrnp+/+* (WT). n=6, deficientes para *PrPc Zprnp0/0* (KO), n=6 e TG20, n=6 aos 2 meses de idade alimentados com a ração contendo 10% (A), 60% (B) de gordura. (* $p < 0,05$ Teste T de student – média com desvio padrão).

A



B

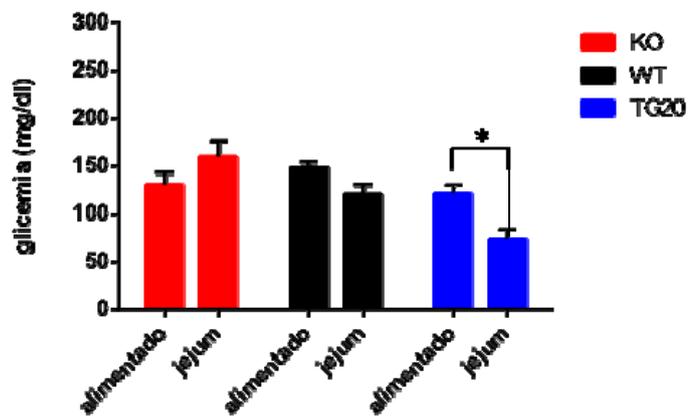
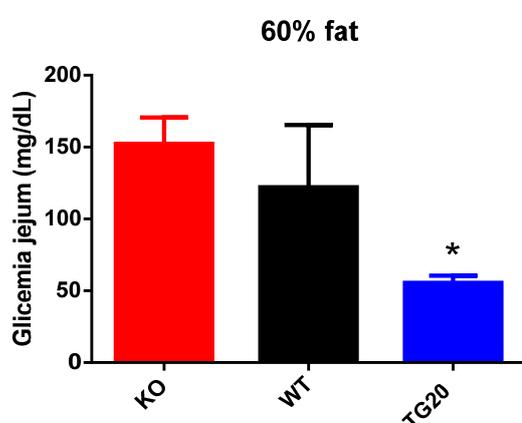


Figura 5 - Gráficos representando a glicemia no período pós-prandial e em jejum dos camundongos tipo-selvagem *ZPrnp*^{+/+} (WT). n=6, deficientes para PrPc *Zprnp*^{0/0} (KO), n=6 e TG20, n=6 aos 3 meses de idade alimentados com a ração contendo 10% (A) e 60% (B) de gordura. (* p<0,05 Teste T de student – média com desvio padrão).

Comparando-se somente as glicemias de jejum podemos observar que os animais TG20 possuem glicemia de jejum significativamente menor do que os animais WT e KO (Figura 6). Este resultado indica que na ausência de PrPc existe um risco aumentado para um quadro de diabetes, enquanto a presença de altos níveis de PrPc confere uma resistência a esse quadro.

A



B

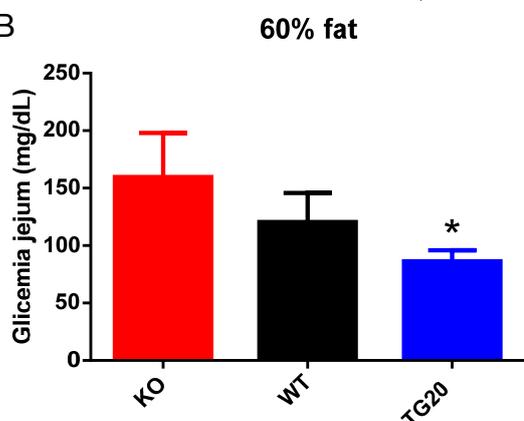


Figura 6 - Gráficos representando a comparação das glicemias de jejum dos camundongos deficientes para PrPc *Zprnp0/0* (KO), n=6, do tipo-selvagem *ZPrnp+/+* (WT), n=6 e TG20, n=6, da ração 60% de gordura aos 2 meses de idade (A) e aos 3 meses de idade (B) (* p<0,05; One way ANOVA – média com desvio padrão).

4.1.2 Medidas de Glicemia dos Animais Edinburgh I

Os camundongos Edbgl também foram divididos por genótipo e alimentados com rações de diferentes porcentagens de gordura. Aos dois meses de idade, podemos observar que os camundongos alimentados com a ração contendo 10% de gordura de ambos os genótipos, apresentaram boa regulação da glicemia sérica, sendo o nível glicêmico pós-prandial significativamente maior que o nível glicêmico em jejum (Figura 7). No entanto, esta cepa de camundongos parece apresentar maior sensibilidade a dieta de alta gordura, pois os animais alimentados com a ração 60% de gordura perderam a regulação da glicemia já aos 2 meses de idade, independentemente do genótipo. Portanto animais deste grupo passaram a ser acompanhados apenas nas medidas de peso e não mais nas medições de glicemia.

Foi feito um novo grupo de animais Edbgl, que foram alimentados com outra ração contendo 45% das calorias provenientes de gordura. Os animais alimentados com a ração contendo 45% de gordura de ambos os genótipos, apresentaram boa regulação da glicemia sérica, sendo o nível glicêmico pós-prandial significativamente maior que o nível glicêmico em jejum (Figura 7).

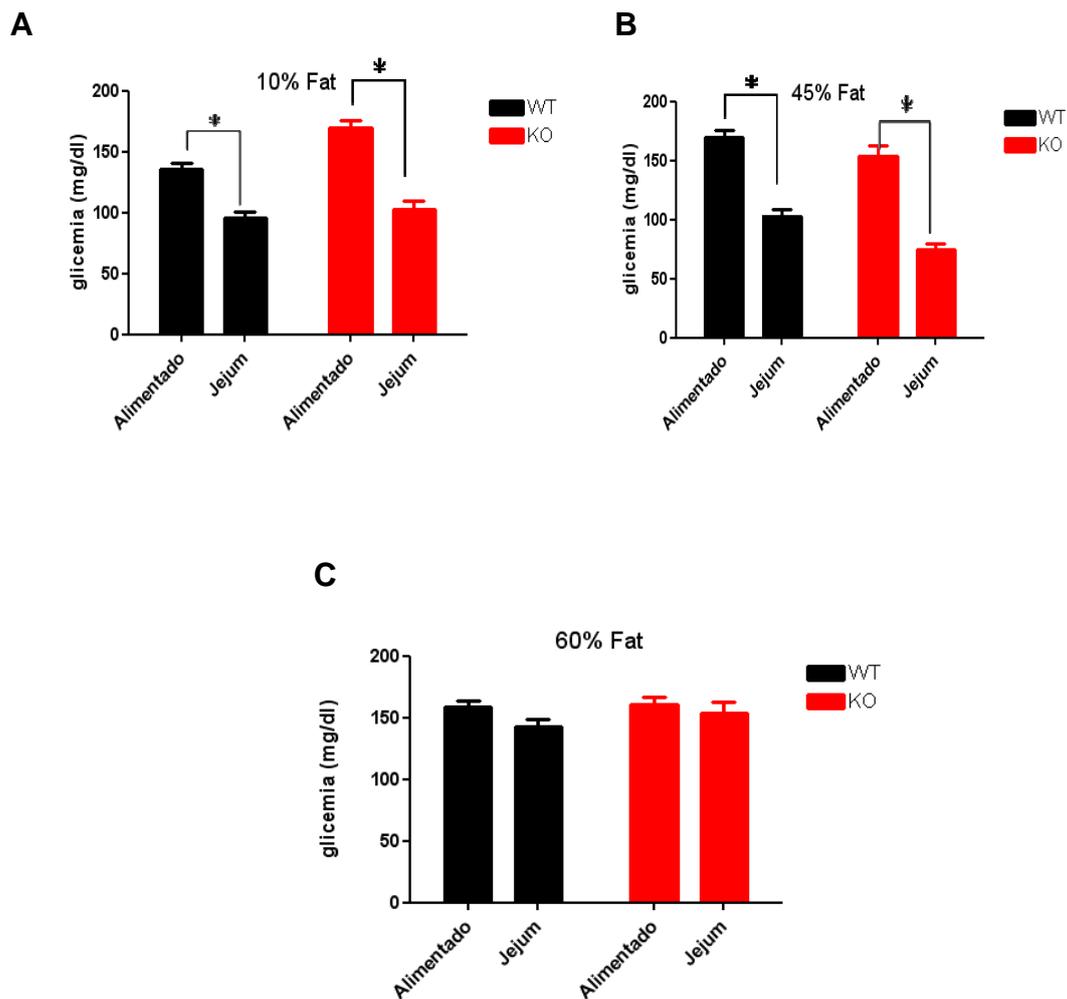


Figura 7 - Gráficos representando a glicemia no período pós-prandial e em jejum com os camundongos aos 2 meses de idade do tipo-selvagem *EPrnp*^{+/+} (WT), n=6 e deficientes para PrPc *EPrnp*^{-/-} (KO), n=6, alimentados com a ração contendo 10% (A), 45% (B) ou 60% (C) de gordura. (* p<0,05 Teste T de student - média com desvio padrão).

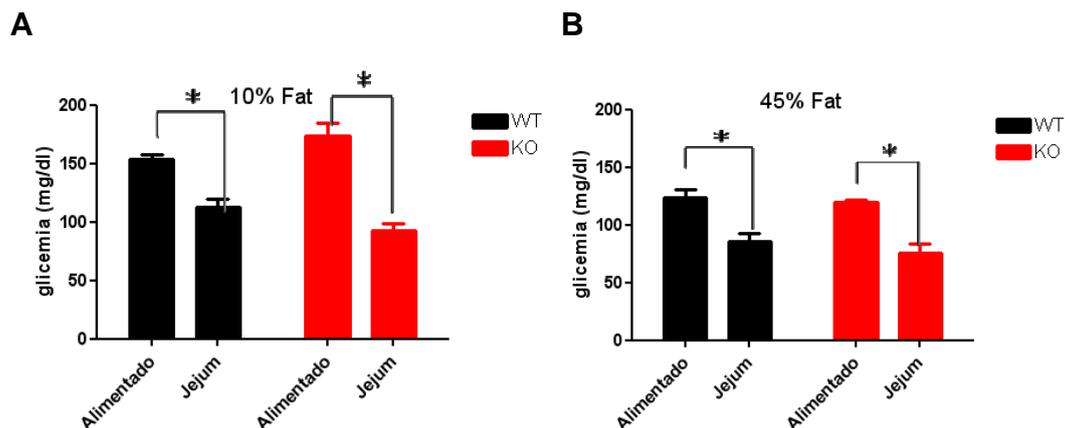


Figura 8 - Gráficos representando a glicemia no período pós-prandial e em jejum com os camundongos aos 3 meses de idade do tipo-selvagem *EPrnp*^{+/+} (WT), n=6 e deficientes para PrPc *EPrnp*^{-/-} (KO), n=6 alimentados com a ração contendo 10% (A), 45% (B) de gordura. (* p<0,05 Teste T de student – média com desvio padrão).

Aos três meses de idade, os camundongos alimentados com a ração contendo 10% de gordura de ambos os genótipos, apresentaram boa regulação da glicemia sérica, sendo o nível glicêmico pós-prandial maior que o nível glicêmico em jejum (Figura 8). Os animais alimentados com a ração contendo 45% de gordura de ambos os genótipos também apresentaram boa regulação da glicemia sérica, sendo o nível glicêmico pós-prandial maior que o nível glicêmico em jejum (Figura 8).

Já aos quatro meses de idade, podemos observar que enquanto os camundongos alimentados com a ração contendo 10% de gordura de ambos os genótipos, apresentaram boa regulação da glicemia sérica, os animais alimentados com a ração contendo 45% de gordura apresentaram diferenças na regulação da glicose sérica: os animais tipo-selvagem apresentaram boa regulação da glicemia sérica, sendo o nível glicêmico pós-prandial bem maior que o nível glicêmico em jejum enquanto os animais

deficientes para PrPc não apresentaram mais esta regulação, e os níveis de glicemia sérica ficaram iguais no jejum e no período pós-prandial (Figura 9).

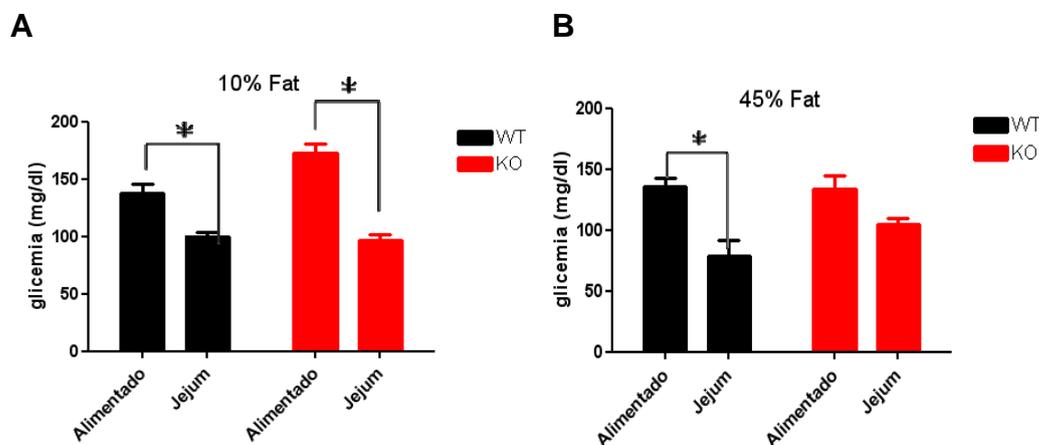


Figura 9 - Gráficos representando a glicemia no período pós-prandial e em jejum com os camundongos aos 4 meses de idade do tipo selvagem *EPnp*^{+/+} (WT), n=6 e deficientes para PrPc *EPnp*^{-/-} (KO), n=6 alimentados com a ração contendo 10% (A), 45% (B) de gordura. (* p<0,05 Teste T de student – média com desvio padrão).

4.1.3 Medidas de Insulina Zrchl e TG20

Para verificar se a regulação alterada da glicemia, observada nos resultados demonstrados anteriormente, era devida a uma alteração na secreção de insulina ou a uma alteração na resposta sistêmica a insulina, realizamos medidas de insulina sérica após jejum nos camundongos aos 5 meses de idade, que foi a idade do término do experimento.

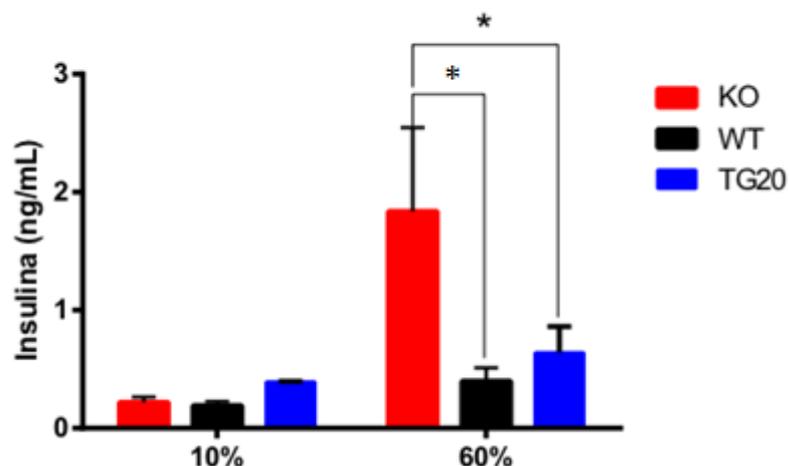


Figura 10 - Gráfico representando os níveis de insulina presentes no plasma dos animais tipo-selvagem *ZPrnp+/+* (WT), deficientes para PrPc *Zprnp0/0* (KO) e TG20, divididos por porcentagem de gordura na ração. (* $p < 0,05$ – One way ANOVA – média com desvio padrão).

Na figura 10 podemos verificar que os animais deficientes para PrPc *Zprnp0/0* (KO) que fizeram a ingestão da ração de 60% de gordura apresentam níveis dramaticamente altos de insulina plasmática, indicando um quadro de hiperinsulinemia. Os animais de todos os genótipos alimentados com as rações contendo 10% de gordura não apresentaram alteração na insulina sérica. Os animais tipo-selvagem e TG20 alimentados com as rações de 60% de gordura também não apresentaram essa alteração.

O “homeostasis model assessment-estimated insulin resistance” (HOMA-IR), foi desenvolvido por MATTHEWS et al. (1985) e vêm sendo largamente utilizado para estimar a resistência à insulina. Ele pode ser comparado ao clamp euglicêmico que é o método “gold standart” para a

quantificação da resistência a insulina. Para este cálculo utiliza-se a seguinte fórmula: insulina em jejum ($\mu\text{U/L}$) x glicose em jejum (nmol/L)/22.5

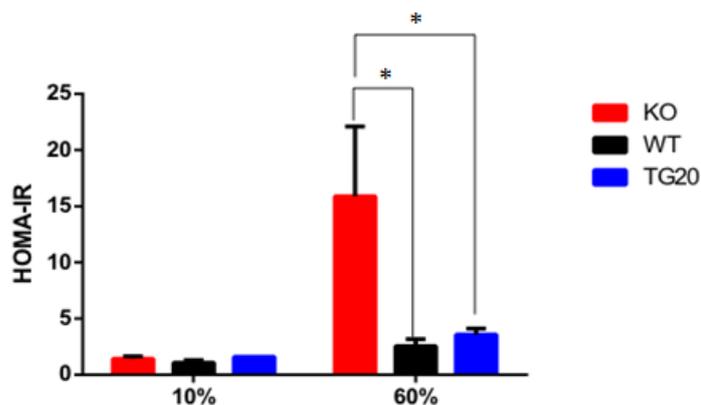


Figura 11 – Gráfico representativo dos valores de HOMA-IR dos animais Zrch I e TG20. n= 6 camundongos por genótipo (One way ANOVA, * $p < 0,05$ – média com desvio padrão).

Quanto maior o valor do HOMA-IR, maior a resistência à insulina. Como podemos observar no gráfico da figura 6 o valor do HOMA-IR dos animais deficientes para PrPc *Zprnp0/0* é significativamente maior do que o valor apresentado nos animais do tipo selvagem (*ZPrnp+/+*) e TG20, caracterizando-se então a maior resistência à insulina nos animais deficientes para PrPc (*Zprnp0/0*).

Abaixo podemos verificar os valores de referência para o HOMA-IR e verificar que os camundongos deficientes para PrPc alimentados com a ração de 60% de gordura, possuem resistência severa à insulina.

Quadro 1 – Valores de referência HOMA-IR para humanos.

Categoria	HOMA
Resistência à insulina normal	< 3
Resistência à insulina moderada	Entre 3 e 5
Resistência à insulina severa	>5

4.1.4 Medidas de Insulina Edinburgh I

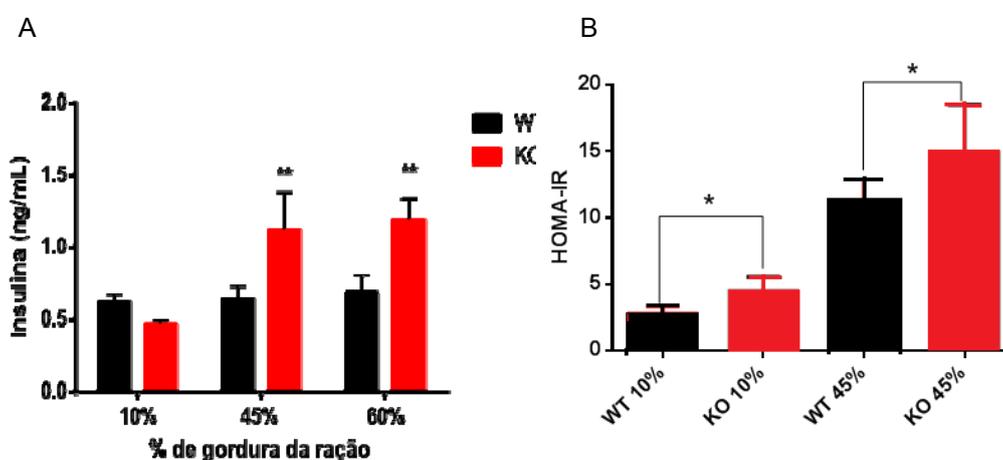


Figura 12 – A- Gráfico representando os níveis de insulina presentes no plasma dos animais *EPrnp*^{+/+} (WT) e deficientes para PrPc *EPrnp*^{-/-} (KO) aos 6 meses de idade, divididos por porcentagem de gordura da ração. (** $p < 0,05$ One way ANOVA –média com desvio padrão). B – Gráfico representando os valores de HOMA-IR dos animais *EPrnp*^{+/+} (WT) e deficientes para PrPc *EPrnp*^{-/-} (KO) aos 6 meses de idade, divididos por porcentagem de gordura da ração (* $p < 0,05$ One way ANOVA –média com desvio padrão).

Podemos verificar que, assim como ocorreu nos animais ZurichI, a insulina dos animais *EPrnp*^{-/-} (KO) alimentados com a ração de 60% e 45% de gordura também são significativamente maiores do que a insulina dos animais *EPrnp*^{+/+} (WT). Demonstramos mais uma vez, agora em animais de background distinto, a influência de PrPc na regulação da resposta a insulina (Figura 12).

4.1.5 Curvas de Tolerância à Insulina e Glicose

Para determinar a real sensibilidade sistêmica a insulina, ensaios de curvas de tolerância à insulina foram realizados. Nesse momento, ficaram disponíveis no laboratório os camundongos *backcross* (Acasalamento de ZurichI com C57/BL6). Como estes animais possuem menor variabilidade genética, optamos por utilizá-los para este experimento. Utilizamos animais de 3 meses de idade, que já apresentam resposta diferencial à dieta de alta gordura.

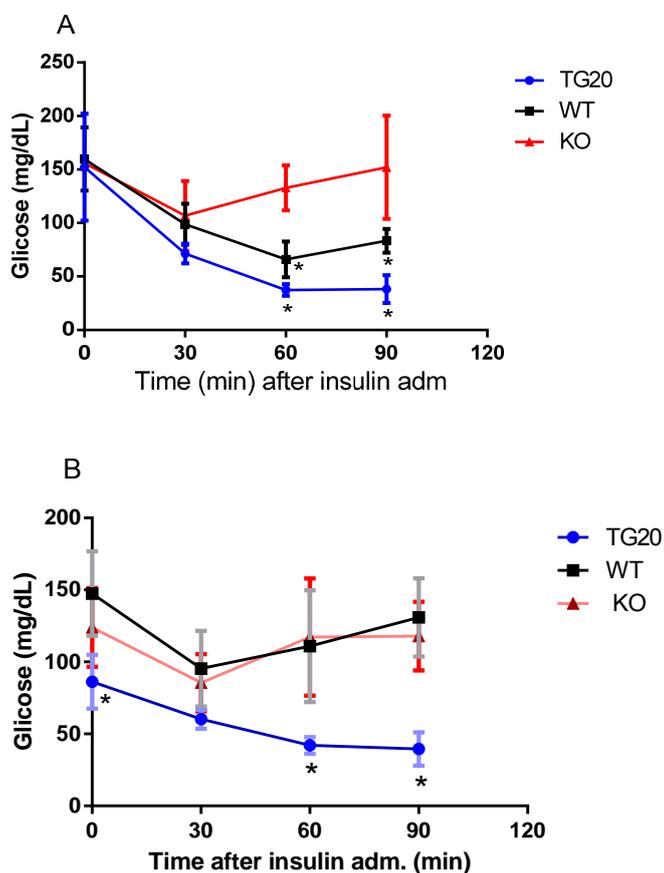
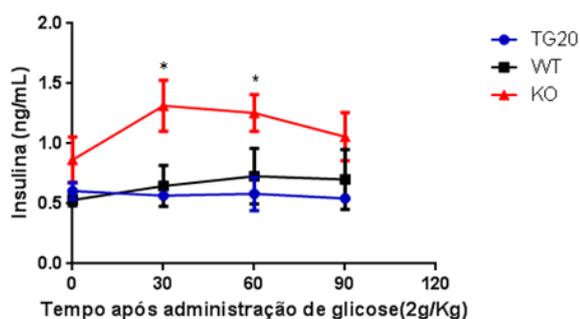


Figura 13 – Gráficos representando as curvas de tolerância a insulina dos animais Backcross do tipo selvagem para PrPc (WT), n=6, deficientes para PrPc (KO), n=6 e TG20, n=6 após administração de insulina nos tempos 30, 60 e 90 minutos. A – Curva dos animais da ração 60% de gordura (Two way ANOVA, * p<0,05; n=6 animais por

genótipo). B – Curva dos animais da ração 10% de gordura (Two way ANOVA; * $p < 0,05$ média com desvio padrão - $n=6$ animais por genótipo).

Podemos observar que há uma maior resposta dos animais TG20 após a administração de insulina, com uma maior diminuição da glicemia, o que demonstra uma sensibilidade sistêmica a insulina aumentada (Figura 13A e B). Esta diferença se nota em todos os tipos de alimentação, ressaltando a dependência de PrPc para a resposta a insulina. Nos animais da ração 60% de gordura também podemos observar que os animais deficientes para PrPc possuem uma menor diminuição da glicemia após a administração de insulina do que os animais do tipo selvagem e TG20 (Figura 13A), demonstrando uma menor sensibilidade a insulina nos animais KO.

A



B

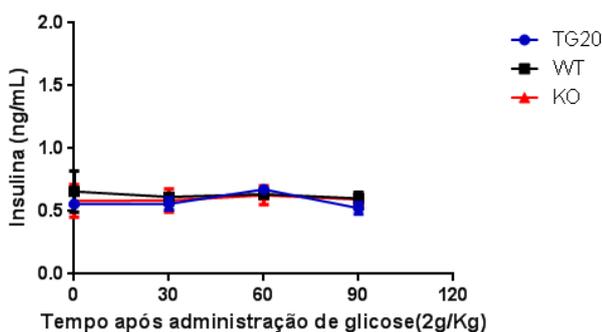


Figura 14 - Gráficos representando as curvas de tolerância a glicose dos animais Backcross do tipo selvagem para PrPc (WT), $n=6$, deficientes para PrPc (KO), $n=6$ e TG20, $n=6$ após administração de insulina nos tempos 30, 60 e 90 minutos. A – Curva dos animais da ração 60% de gordura (Two way ANOVA, * $p < 0,05$; $n=6$ animais por

genótipo). B – Curva dos animais da ração 10% de gordura (Two way ANOVA – não há diferenças significativas).

Na Figura 14 podemos verificar que os animais deficientes para PrPc da ração de 60% de gordura liberam mais insulina após a administração de glicose do que os animais TG20 e do tipo selvagem, demonstrando assim que estes animais são menos tolerantes a glicose do que os deficientes para PrPc. Podemos concluir então que os animais deficientes para PrPc apresentam a Diabetes Mellitus do tipo 2, uma vez que apresentam uma menor diminuição da glicemia após a administração de insulina e apresentando produção elevada da mesma, porém não a utilizam adequadamente. Em relação aos camundongos da ração 10%, a quantidade de glicose utilizada não foi capaz de aumentar os níveis de insulina no sangue.

4.2 MEDIDAS DE PESO E TRIGLICÉRIDES

4.2.1 Medidas de Peso dos Animais Zurichl

Para acompanhar as medidas de glicemia e insulina séricas, foram realizadas também medidas de peso dos animais de cada ração. Podemos observar que os animais deficientes para PrPc possuem maior ganho de peso do que os animais tipo-selvagem e TG20 (Figura 15). Para controlar se o ganho de peso não estaria sendo devido à ingestão excessiva de alimento, a quantidade de alimento dos animais de cada genótipo foi mensurada (Figura16), não tendo sido observadas diferenças significativas. Em conjunto nossos dados indicam uma participação de PrPc no controle da resposta

sistêmica a insulina, com implicações diretas em diabetes tipo II e síndrome metabólica.

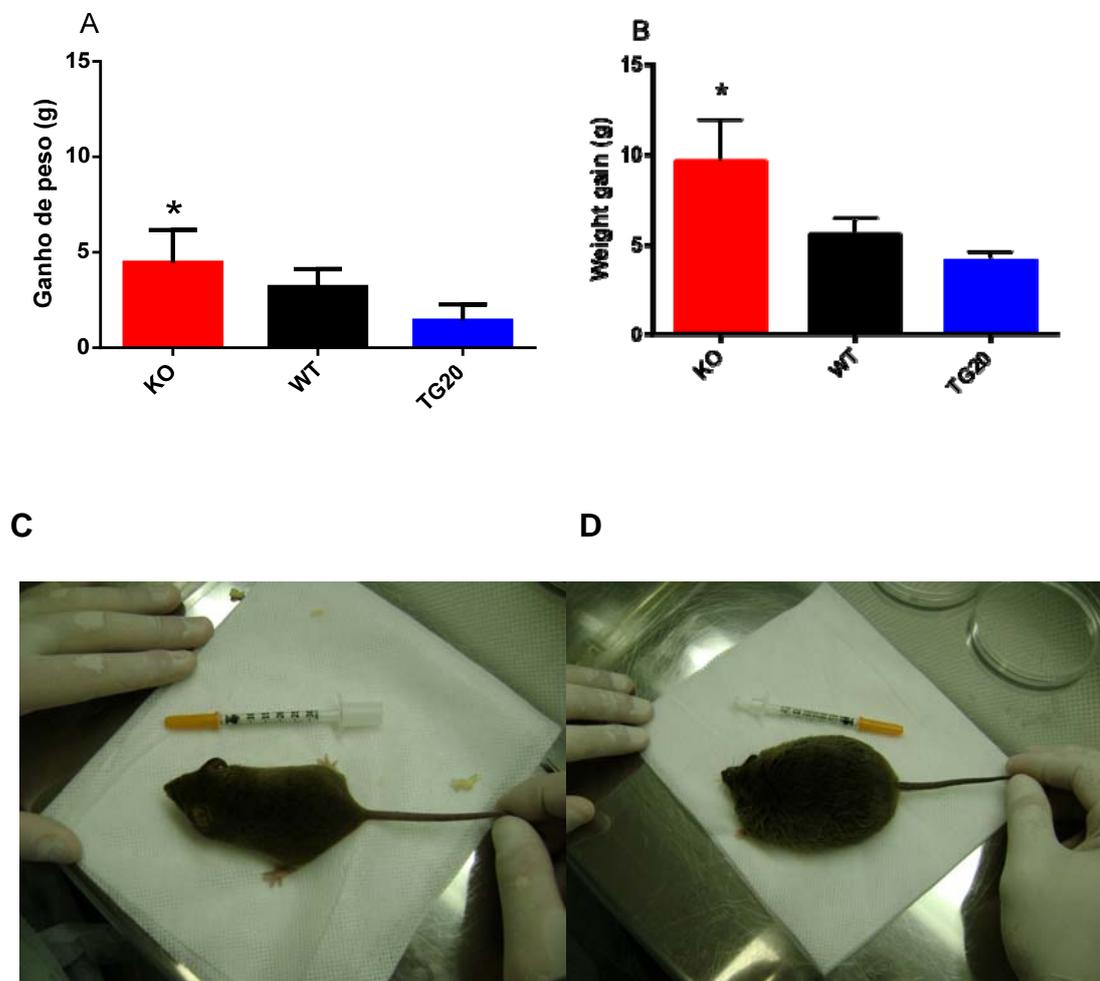


Figura 15 - Gráfico representando o ganho de peso (peso final - peso inicial) dos animais tipo-selvagem *ZPrnp*^{+/+} (WT), n=6; deficientes para PrPc *ZPrnp*^{0/0} (KO), n=6; e TG20, n=6; separados por porcentagem de gordura da ração. A - 10% de gordura (One way ANOVA, *p<0,05 – média com desvio padrão). B – 60% de gordura (One Way ANOVA *p<0,05 – média com desvio padrão) C – Foto de um camundongo do tipo selvagem alimentado com ração 60% de gordura. D – Foto de um camundongo deficiente para PrPc alimentado com ração 60% de gordura.

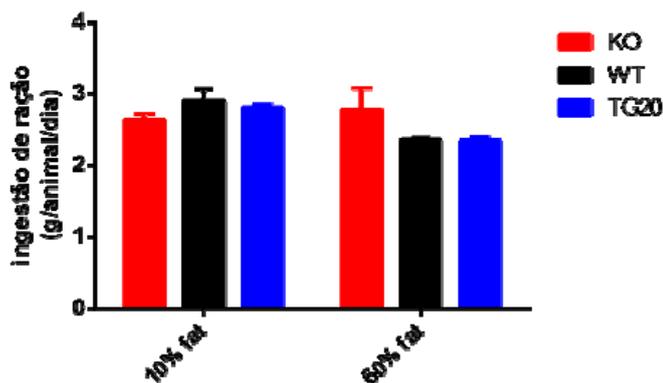


Figura 16 - Peso de ração consumida pelos camundongos tipo-selvagem *ZPrnp+/+* (WT), deficientes para PrPc *ZPrnp0/0* (KO) e TG20, separados por porcentagem de gordura da ração (não existem diferenças significativas entre os genótipos, Two-Way ANOVA).

4.2.2 Medidas de Peso nos Animais Edinburgh I

Podemos verificar que os animais Edinburgh I deficientes para PrPc alimentados com a ração 60% de gordura também possuem peso mais elevado do que os animais tipo-selvagem alimentados com a mesma ração (Figura17), demonstrando assim em dois modelos independentes a influência da presença de PrPc na regulação do peso destes animais. Mais uma vez o ganho de peso não foi influenciado pela maior ingestão de ração, como pode ser visto na Figura 18.

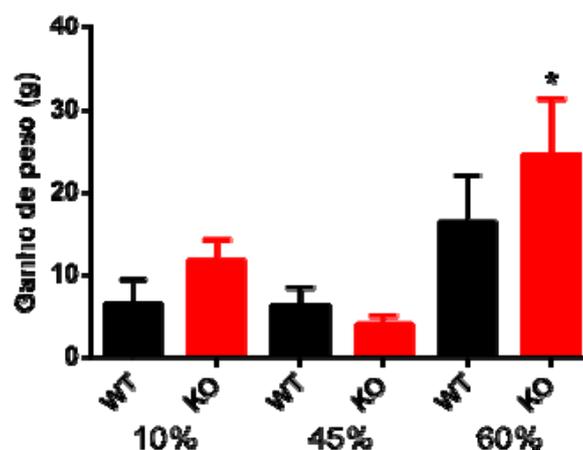


Figura 17 – Gráficos representando o ganho de peso (peso final - peso inicial) dos animais *EPrnp*^{+/+} (WT), n=6 e deficientes para PrPc *EPrnp*^{-/-} (KO), n=6 alimentados com as rações contendo 10%, 45% e 60% (*p<0,05 Two way ANOVA – média com desvio padrão).

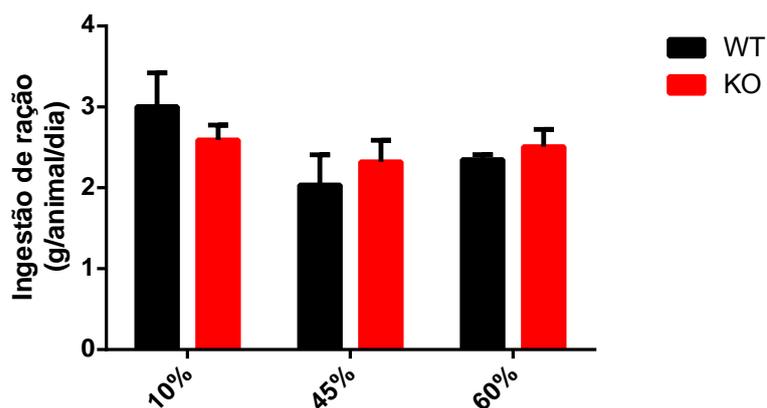


Figura 18 - Peso de ração consumida pelos camundongos tipo-selvagem *EPrnp*^{+/+} (WT), deficientes para PrPc *Eprnp*^{0/0} (KO) e TG20, separados por porcentagem de gordura da ração (não existem diferenças significativas entre os genótipos, Two-Way ANOVA).

4.2.3 Medida de Triglicérides nos camundongos Zurich I e Tg20

Para avaliar a relação da presença de PrPc com a síndrome metabólica e obesidade também foram avaliados os níveis de triacilglicerídeos (triglicérides) plasmáticos dos animais. Não foi possível observar diferença significativa entre os níveis de triglicérides nos diferentes genótipos. Deste modo, podemos concluir que PrPc não apresentou influência sobre o nível de triglicérides séricos dos animais.

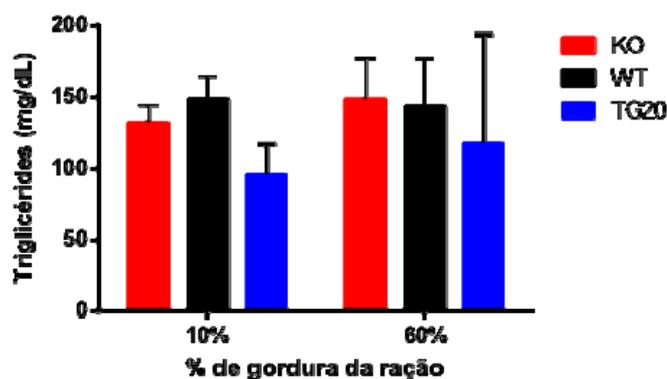


Figura 19 - Gráfico representativo dos níveis de triglicérides dos animais tipo-selvagem *ZPrnp+/+* (WT), n=6; deficientes para PrPc *Zprnp0/0* (KO), n=6; e TG20, n=6; separados pela porcentagem de gordura da ração (não existem diferenças significativas, Two-Way ANOVA).

4.2.4 Medida de Triglicérides nos camundongos Edinburgh I

Assim como nos animais ZrchI, não houve diferença significativa das medidas de triglicérides dos animais Edbg, não sendo possível estabelecer uma ligação entre PrPc e a síntese de triglicérides (Figura 20).

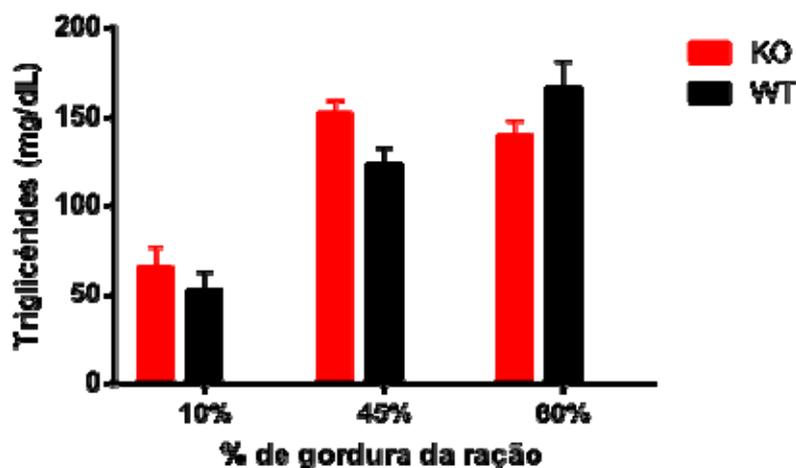


Figura 20 - Gráfico representativo dos níveis de triglicérides dos animais tipo selvagem *EPnp*^{+/+} (WT), n=6 e deficientes para PrPc *EPnp*^{-/-} (KO), n=6 separados pela porcentagem de gordura da ração (não existem diferenças significativas – Two way ANOVA).

4.3 PARÂMETROS HISTOLÓGICOS

Considerando a importância de PrPc para a resposta sistêmica a insulina e o surgimento de síndrome metabólica, analisamos histologicamente diversos tecidos dos animais Edbg alimentados com a ração contendo 45% de gordura.

Não foi encontrada nenhuma alteração histológica significativa no coração, cérebro ou músculo-esquelético dos animais avaliados, independentemente do genótipo (Figura 21). Por outro lado, fomos capazes de notar diferenças significativas no fígado e no tecido adiposo dos animais.

No tecido adiposo dos animais do tipo selvagem *EPnp*^{+/+} há a presença de adipócitos de menor tamanho, podendo demonstrar a hiperplasia de adipócitos, diferentemente do que ocorre no tecido adiposo

dos animais deficientes para PrPc *EPrnp*^{-/-} que possuem adipócitos de maior volume, o que pode caracterizar a hipertrofia de adipócitos, com a ausência da diferenciação de novos adipócitos, que são de menor tamanho. Estes resultados são compatíveis com o maior peso corporal dos animais deficientes para PrPc (Figura 22).

Já nos cortes histológicos do fígado, podemos verificar a maior presença de esteatose hepática nos animais deficientes para PrPc *EPrnp*^{-/-}. A esteatose hepática está fortemente associada com a obesidade, resistência à insulina e com a dislipidemia, podendo ser considerada como a manifestação hepática da síndrome metabólica (MARCHESINI et al. 2001; ADAMS et al. 2005). Deste modo, a análise histológica dos tecidos evidencia a presença da síndrome metabólica nos animais deficientes para PrPc *EPrnp*^{-/-} (Figura 22).

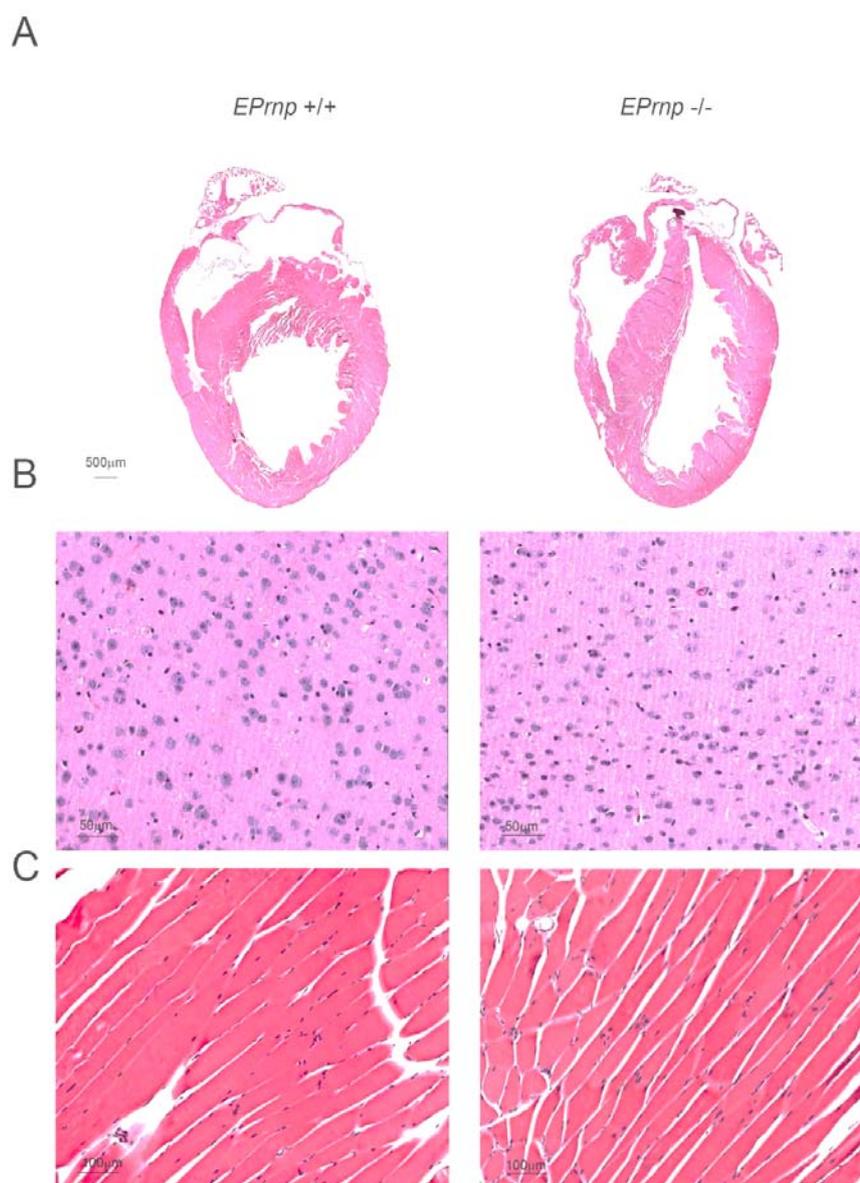


Figura 21 – Cortes histológicos dos seguintes tecidos: A – Coração, tipo selvagem *EPnp*+/+ (esquerda) e deficiente para PrPc *EPnp*-/- (direita) B – Cérebro, tipo selvagem *EPnp*+/+ (esquerda) e deficiente para PrPc *EPnp*-/- (direita). C – Músculo, tipo selvagem *EPnp*+/+ (esquerda) e deficiente para PrPc *EPnp*-/- (direita).

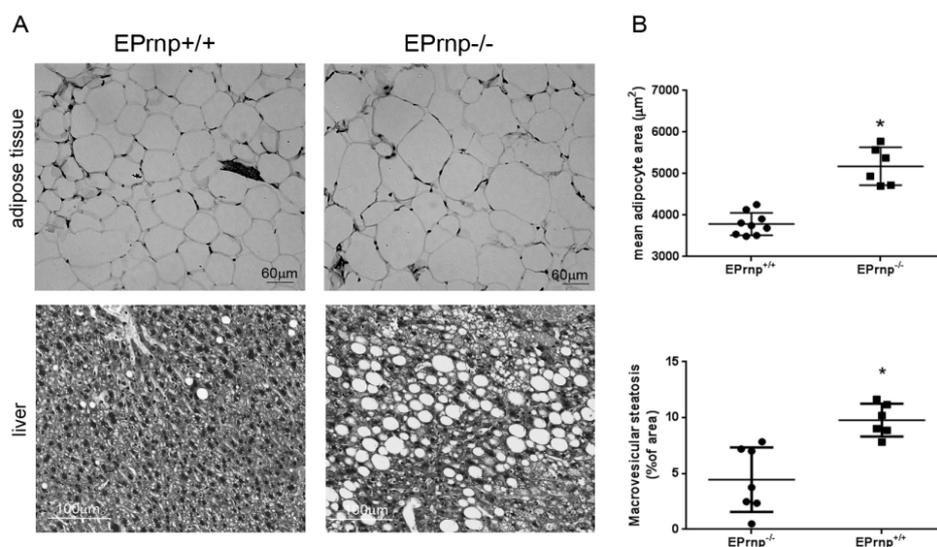


Figura 22 - A- Cortes histológicas de tecido adiposo e de fígado dos animais Edbg do tipo selvagem *EPPrnp*^{+/+} e deficientes para PrPc *EPPrnp*^{-/-}. B - Em cima - Medida de área dos adipócitos dos animais do tipo e selvagem *EPPrnp*^{+/+} e deficientes para PrPc *EPPrnp*^{-/-} (* $p < 0,05$ - Teste T de student). Abaixo - Porcentagem de área do fígado com a presença de esteatose macrovesicular nos animais do tipo selvagem *EPPrnp*^{+/+} e deficientes para PrPc *EPPrnp*^{-/-} (* $p < 0,05$ – Teste T de student).

4.4 WESTERN BLOT PARA AVALIAÇÃO DE VIAS DE SINALIZAÇÃO

Para tentar estabelecer os mecanismos que estariam associados a uma melhor resposta sistêmica a insulina com a presença de PrPc, verificamos a presença e estado de fosforilação de proteínas envolvidas na via de resposta a insulina em diversos tecidos. Utilizamos cérebro, fígado, músculo e tecido adiposo, extraídos dos animais após 6 meses de alimentação com as rações de diferentes porcentagens de gordura. Os tecidos dos animais foram retirados após jejum de 18 horas e foram

realizados os western blots para diversas proteínas da via de sinalização de insulina (IR, P-IR, IRS-1, P-IRS-1, AKT, P-AKT, Glut4 e Glut1). Em alguns western blots foi utilizado um controle positivo, representado pelo sinal + nas figuras. O controle foi feito utilizando-se um camundongo ZurichI do tipo selvagem que foi sacrificado 15 minutos após receber 0,012UI de insulina, os órgãos foram retirados e foi feito o extrato imediatamente.

Há 6 ou 5 animais por genótipo, porém foram utilizados apenas 3 ou 2 animais por genótipo para as figuras representativas dos WB, que foram selecionados de acordo com a qualidade da imagem.

4.4.1 Extrato de Fígado

No fígado dos animais alimentados com a ração contendo 10% de gordura, houve um aumento significativo da quantidade de AKT total nos animais TG20, no entanto esta diferença não foi vista no fígado dos animais alimentados com a ração 60% (Figura 23). Não houve diferença no estado de ativação de AKT medido através de sua fosforilação no resíduo Ser473. Não pudemos observar a fosforilação de AKT no resíduo T308, provavelmente devido ao animal ter sido sacrificado após jejum.

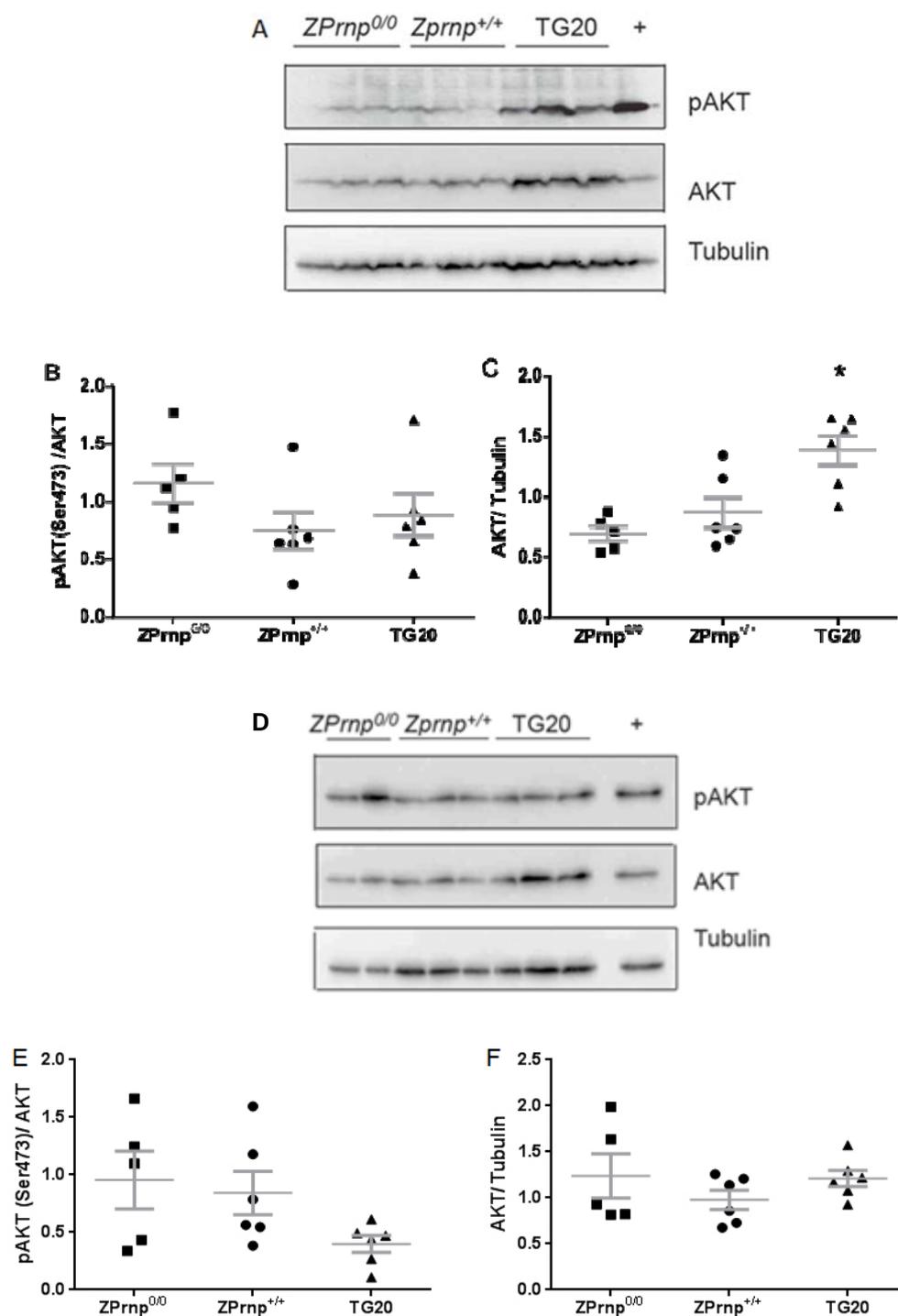


Figura 23 - Western Blots de extrato de fígado dos animais Zrch I e TG20. A- Western Blot para as proteínas P-AKT (Ser 473), AKT total e α -tubulina dos animais da ração 10% de gordura. B- Quantificação de P-AKT(Ser 473)/AKT total. C – Quantificação de AKT total/ α -tubulina (* $p < 0,05$, teste de Kruskal Wallis). D - Proteínas P-AKT (Ser 473), AKT total e α -tubulina dos animais da ração 60% de gordura. E - Quantificação de P-AKT(Ser 473)/AKT total. F- Quantificação de AKT total/ α -tubulina.

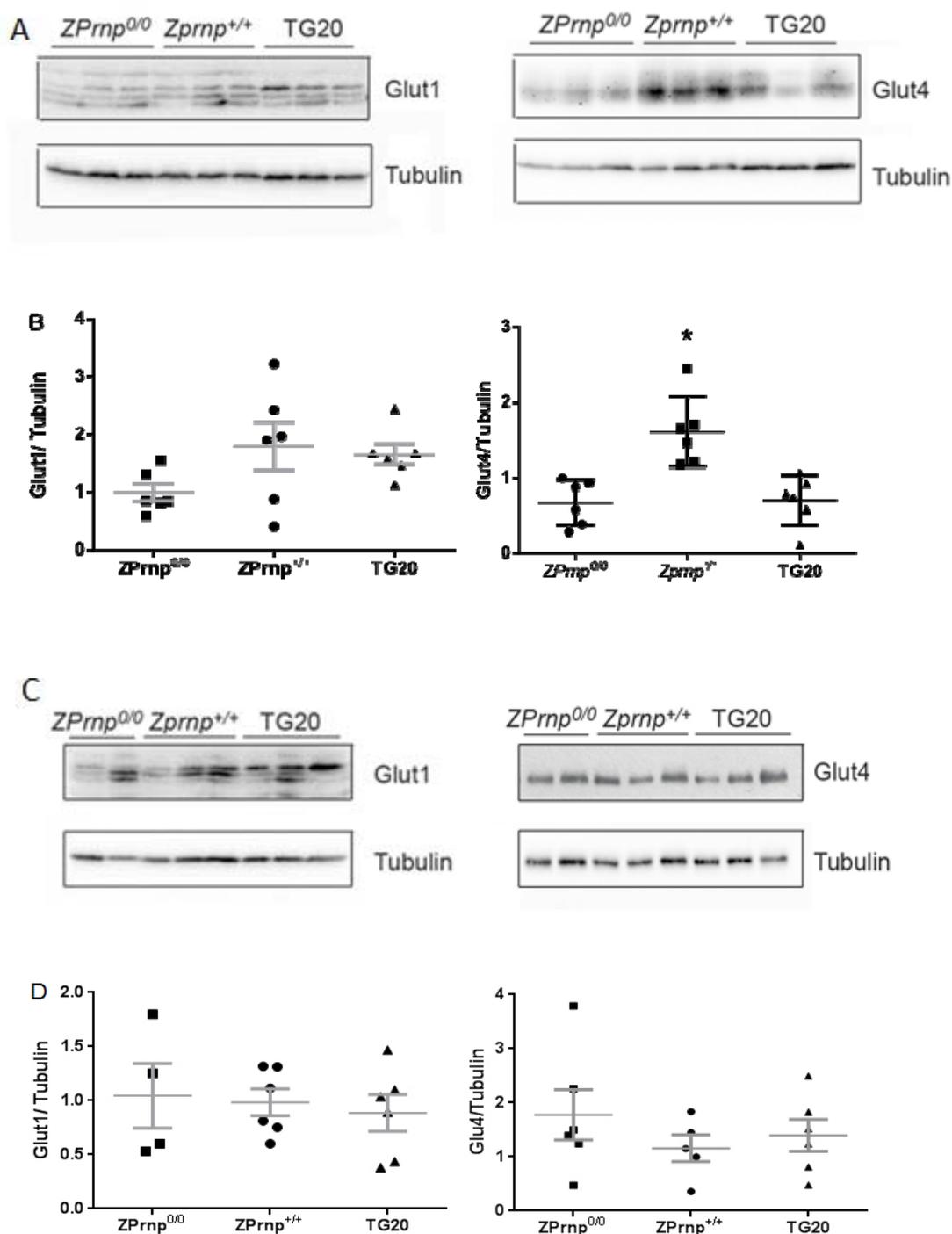
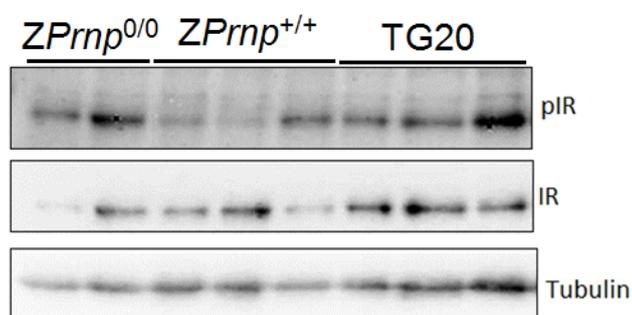


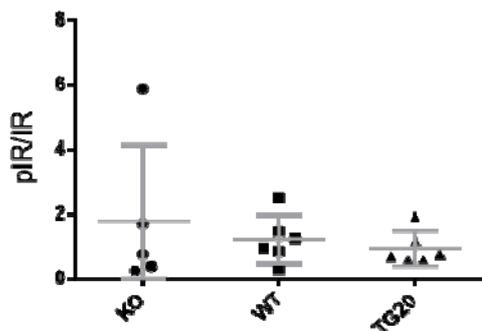
Figura 24 - Western Blots de extrato de fígado dos animais Zrch I e TG20. A – Glut1 e tubulina (esquerda), Glut4 e tubulina (direita) animais ração 10% de gordura. B – Quantificação de Glut1/Tubulina (esquerda), Glut4/Tubulina (direita) animais ração 10% de gordura (* $p < 0,05$ teste de Kruskal Wallis). C - Glut1 e tubulina (esquerda), Glut4 e tubulina (direita) animais ração 60% de gordura. D - Quantificação de Glut1/Tubulina (esquerda), Glut4/Tubulina (direita) animais 60% de gordura.

No fígado dos animais alimentados com a ração contendo 10% de gordura, houve aumento de expressão do transportador de glicose Glut 4 nos animais tipo-selvagem, o que não foi reproduzido nos animais alimentados com a ração contendo 60% de gordura. Não houve alteração nos níveis do transportador de glicose Glut 1 (Figura 24).

A



B



C

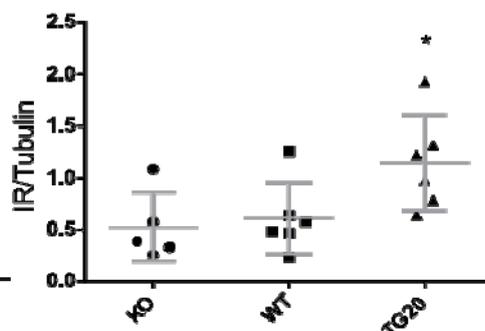


Figura 25 - Western Blots de extrato de fígado dos animais Zrch I e TG20. A- Proteínas P-Insulin Receptor (P-IR), Insulin receptor (IR) e α -tubulina dos animais da ração 60% de gordura. B- Quantificação de P-IR/IR. C – Quantificação de IR total/ α -tubulina (* $p < 0,05$ teste de Kruskal Wallis).

No fígado dos animais ração 60% de gordura houve aumento significativo da expressão do receptor de insulina total nos animais TG20. Não houve diferença no estado de ativação do receptor de insulina medido através de sua fosforilação (Figura 25). Não foi possível visualizar estas proteínas nos western blots dos extratos de fígado dos animais da ração 10% de gordura, talvez devido a problemas de extração dos tecidos. Foram tentados diversos protocolos, porém sem sucesso.

Estes resultados parecem indicar que o mecanismo pelo qual a presença de PrPc possa afetar a resposta sistêmica a insulina não seria mediado por respostas do fígado, já que não foram encontradas até o momento vias alteradas nesse órgão. Estes resultados parecem ainda concordar com o fato de que no fígado existe expressão muito baixa de PrPc (FORD et al. 2002), assim este órgão apresentaria pouca modulação por PrPc nos diferentes genótipos.

4.4.2 Extrato de cérebro

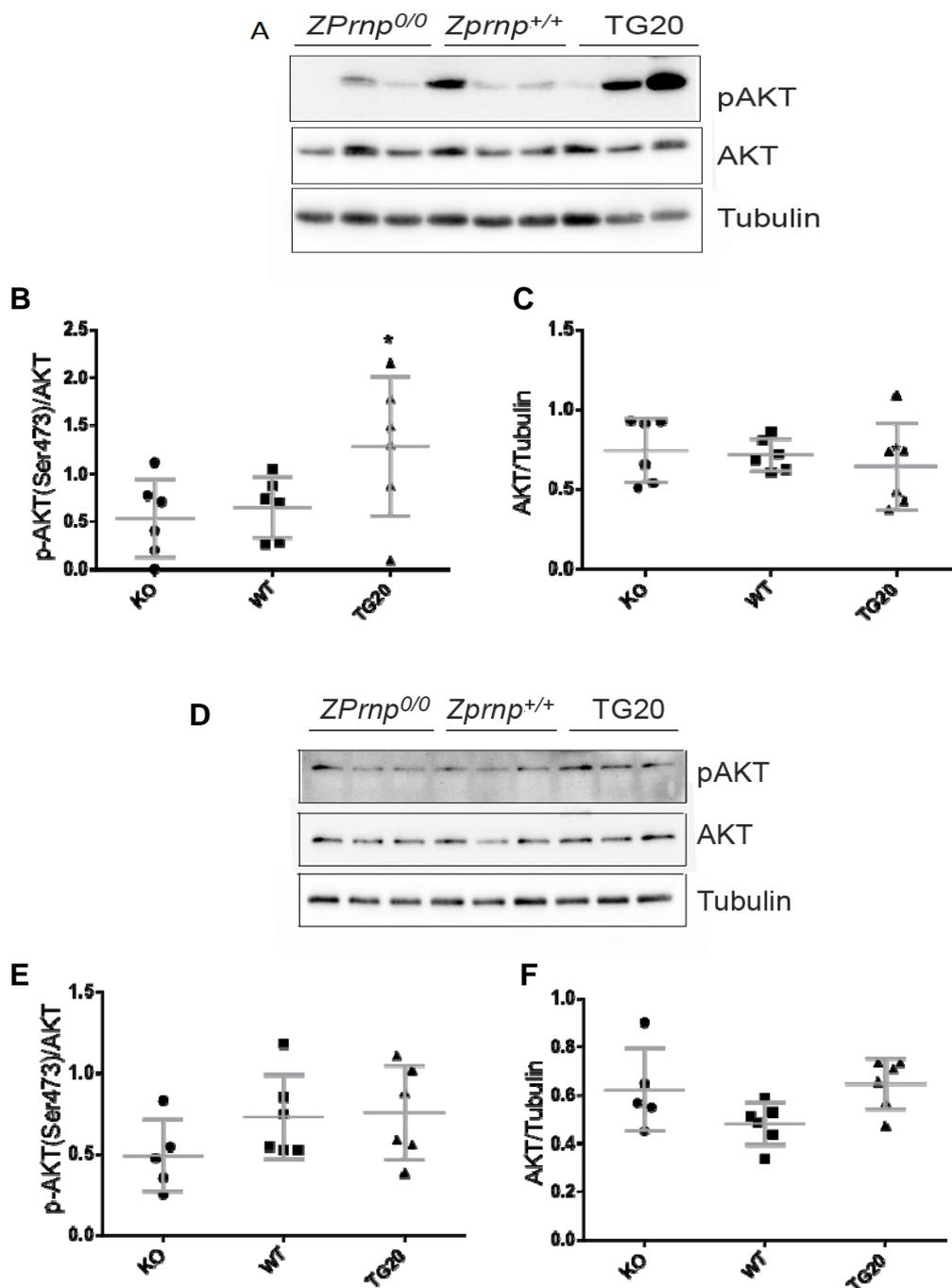


Figura 26 - Western Blots de extrato de cérebro dos animais Zrch I e TG20.

A- Proteínas P-AKT (Ser 473), AKT total e tubulina dos animais da ração 10% de gordura.

B- Quantificação de P-AKT(Ser 473)/AKT total (* $p < 0,05$ teste de Kruskal Wallis).

C – Quantificação de AKT total/tubulina.

D - Proteínas P-AKT (Ser 473), AKT total e tubulina dos animais da ração 60% de gordura.

E - Quantificação de P-AKT(Ser 473)/AKT total.

F- Quantificação de AKT total/tubulina.

No cérebro dos animais alimentados tanto com a ração contendo 10% de gordura quanto com a ração contendo 60% de gordura, não houve um aumento significativo da quantidade de AKT total. Houve aumento de fosforilação de AKT nos animais TG20 alimentados com ração 10% de gordura, o que não foi reproduzido nas rações de 60% de gordura (Figura 26).

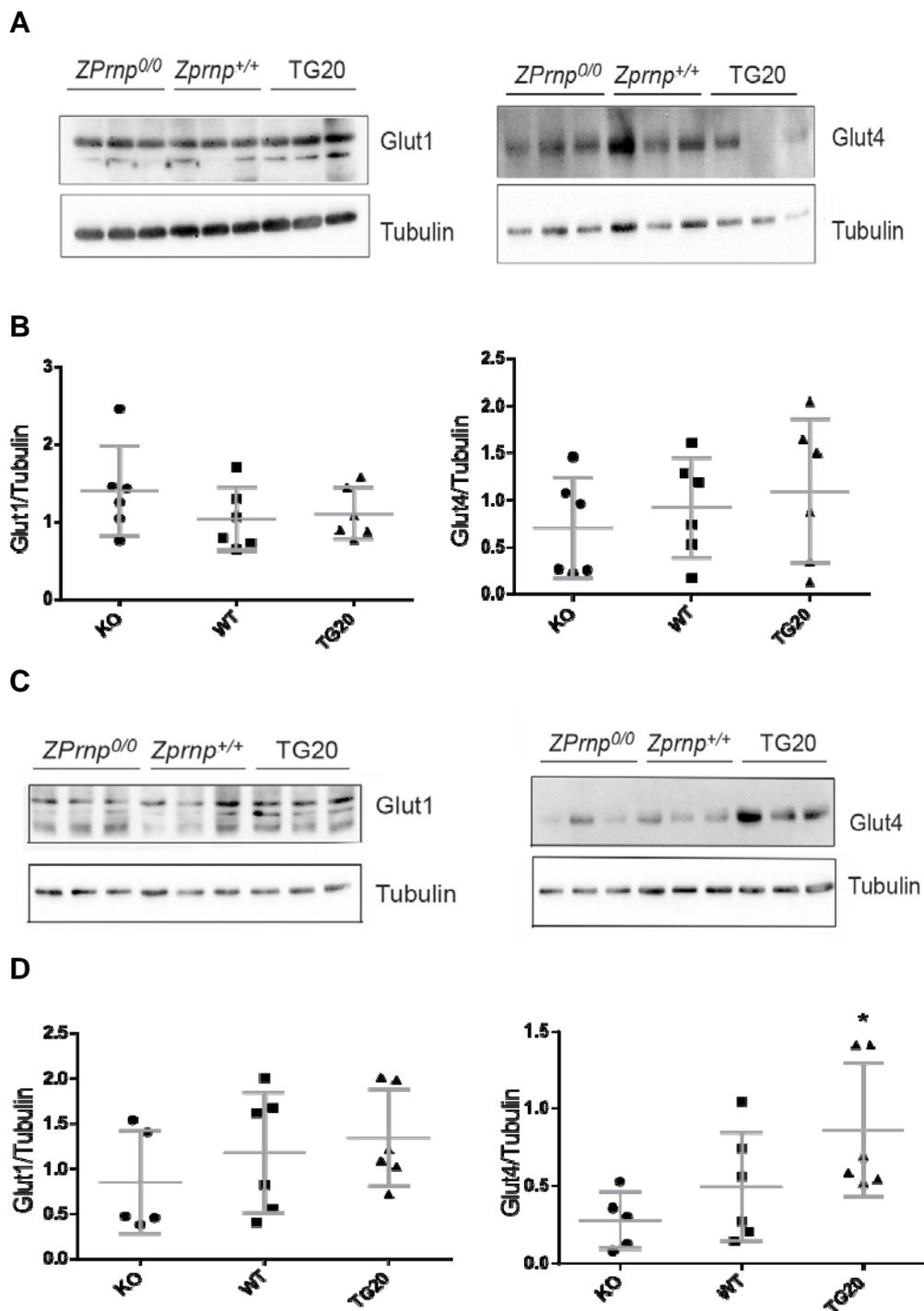


Figura 27 - Western Blots de extrato de cérebro dos animais Zrch I e TG20.

A – Glut1 e tubulina (esquerda), Glut4 e tubulina (direita) animais ração 10% de gordura. B – Quantificação de Glut1/Tubulina (esquerda), Glut4/Tubulina (direita) animais ração 10% de gordura. C - Glut1 e tubulina (esquerda), Glut4 e tubulina (direita) animais ração 60% de gordura. D - Quantificação de Glut1/Tubulina (esquerda), Glut4/Tubulina (direita) animais 60% de gordura (* $p < 0,05$ teste de Kruskal Wallis).

No cérebro dos animais alimentados com a ração contendo 10% de gordura, não houve alteração de expressão do transportador de glicose Glut 4, no entanto nos animais alimentados com a ração contendo 60% de gordura houve aumento de Glut 4 nos animais TG20. Não houve alteração nos níveis do transportador de glicose Glut 1 (Figura 27). Neste tecido também não fomos capazes de observar o receptor de insulina provavelmente por problemas de extração.

4.4.3 Extrato de tecido adiposo

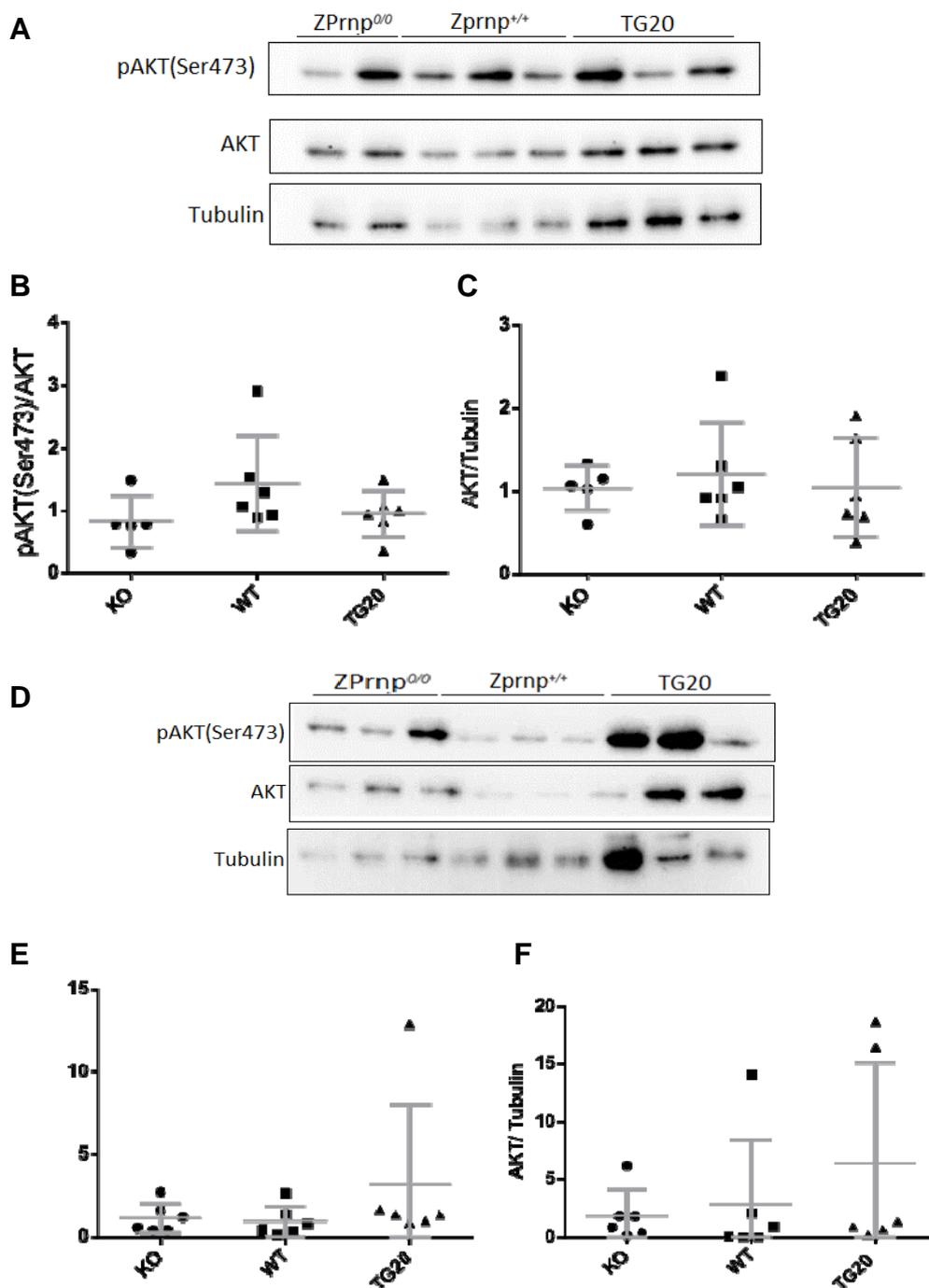


Figura 28 - Western Blots de extrato de tecido adiposo dos animais Zrch I e TG20. A- Proteínas P-AKT (Ser 473), AKT total e tubulina dos animais da ração 10% de gordura. B- Quantificação de P-AKT(Ser 473)/AKT total. C – Quantificação de AKT total/tubulina. D - Proteínas P-AKT (Ser 473), AKT total e α -tubulina dos animais da ração 60% de gordura. E - Quantificação de P-AKT(Ser 473)/AKT total. F- Quantificação de AKT total/tubulina (não há diferenças significativas teste de Kruskal Wallis).

No tecido adiposo dos animais alimentados tanto com a ração contendo 10% de gordura quanto com a ração contendo 60% de gordura, não houve um aumento significativo da quantidade de AKT total e nem de sua forma fosforilada (Figura 28).

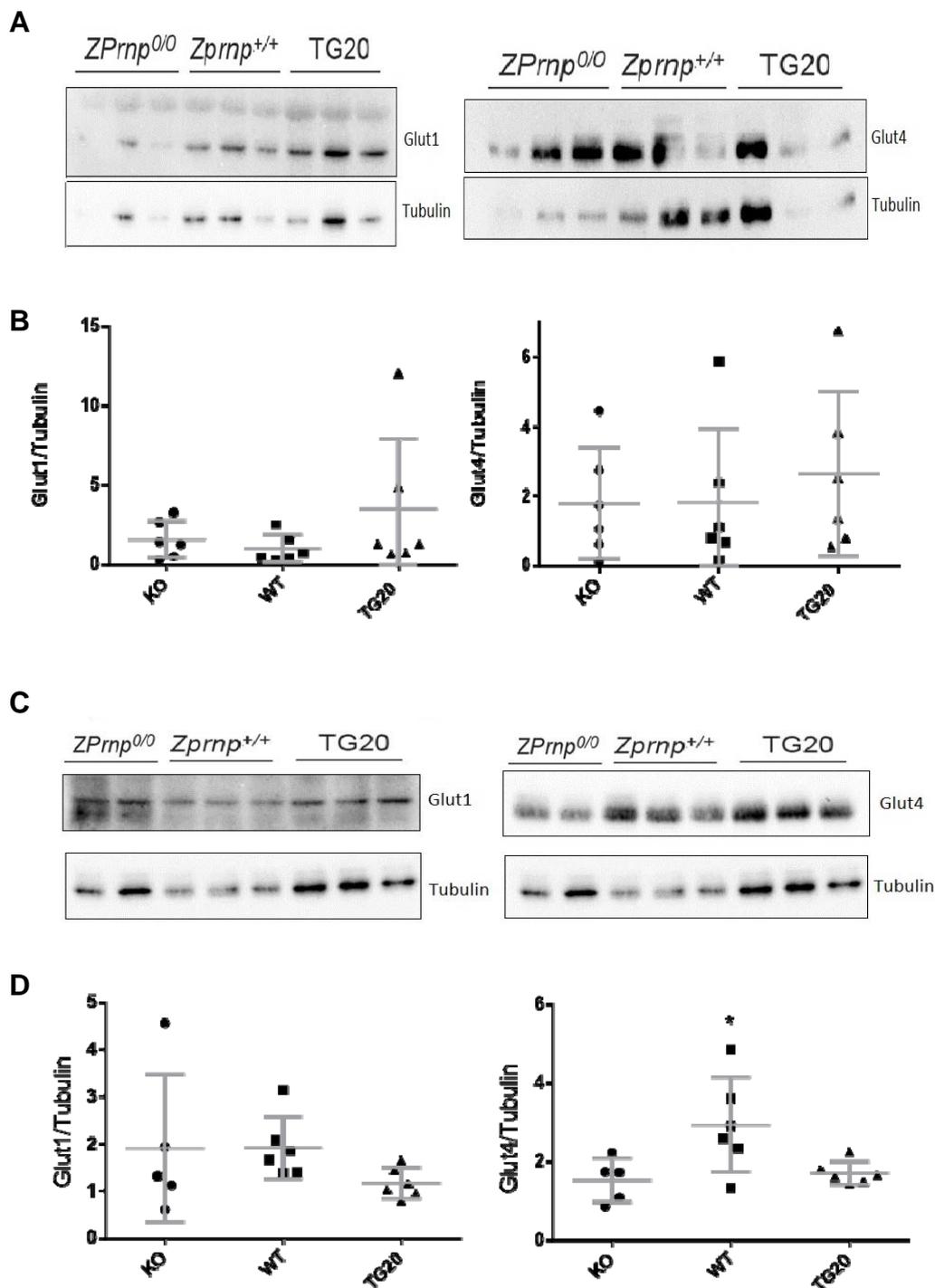


Figura 29 - Western Blots de extrato de tecido adiposo dos animais Zrch I e TG20. A – Glut1 e tubulina (esquerda), Glut4 e tubulina (direita) animais ração 10% de gordura. B – Quantificação de Glut1/Tubulina (esquerda), Glut4/Tubulina (direita) animais ração 10% de gordura. C - Glut1 e tubulina (esquerda), Glut4 e tubulina (direita) animais ração 60% de gordura. D - Quantificação de Glut1/Tubulina (esquerda), Glut4/Tubulina (direita) animais 60% de gordura (* $p < 0,05$ teste de Kruskal Wallis).

No tecido adiposo dos animais alimentados com a ração contendo 10% de gordura, não houve alteração de expressão do transportador de glicose Glut 4, no entanto nos animais alimentados com a ração contendo 60% de gordura houve aumento de Glut 4 nos animais WT. Não houve alteração nos níveis do transportador de glicose Glut 1 (Figura 29). Neste tecido também não fomos capazes de observar o receptor de insulina provavelmente por problemas de extração.

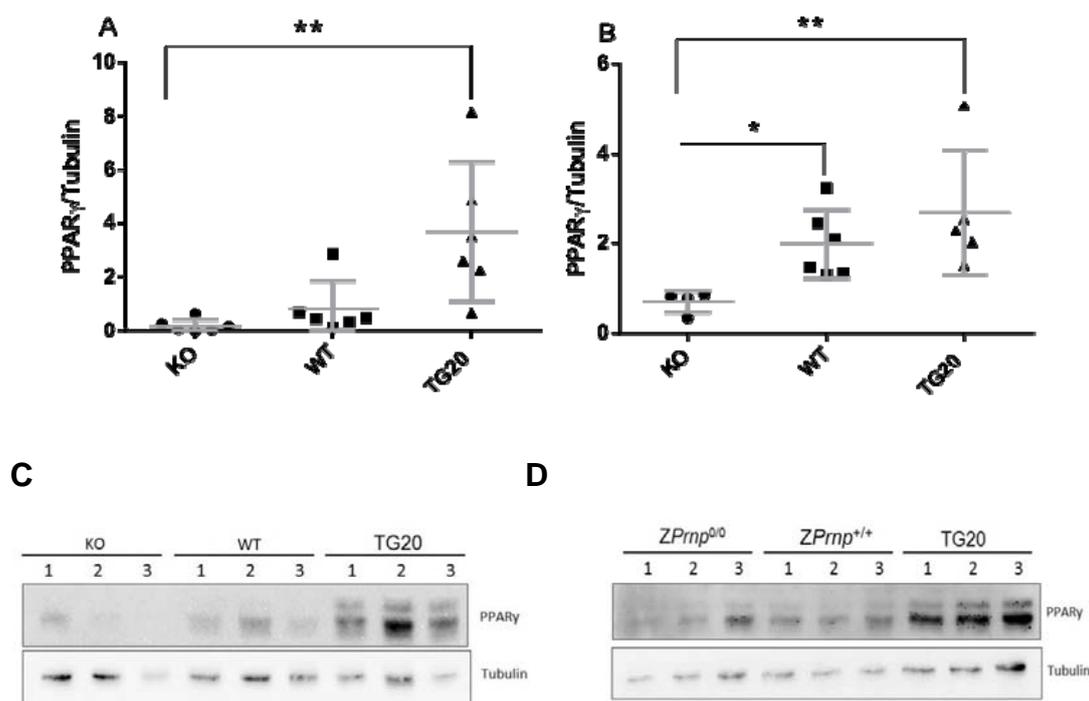


Figura 30 - Western Blots de extrato de tecido adiposo dos animais Zrch I e TG20. A – Gráfico representativo da quantificação de PPAR- γ e tubulina dos animais da ração 10% de gordura (** $p < 0,005$ – teste de Kruskal Wallis). B – Gráfico representativo da quantificação de PPAR- γ e tubulina dos animais da ração 60% de gordura (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$ - teste de Kruskal Wallis). C – PPAR- γ e tubulina animais da ração 10% de gordura. D – PPAR- γ e tubulina animais ração 60% de gordura.

No tecido adiposo, observamos também a expressão do fator de transcrição PPAR γ . Como esta proteína é especificamente expressa no tecido adiposo, foi observada somente neste tecido. Podemos observar que nos animais deficientes para PrPc (KO) da ração 10% de gordura, há uma menor quantidade de PPAR- γ do que os animais TG20. Já nos animais alimentados com a ração 60%, os animais KO possuem menor quantidade de PPAR- γ do que os animais do tipo selvagem para PrPc e TG20.

4.4.4 Extrato de músculo estriado esquelético

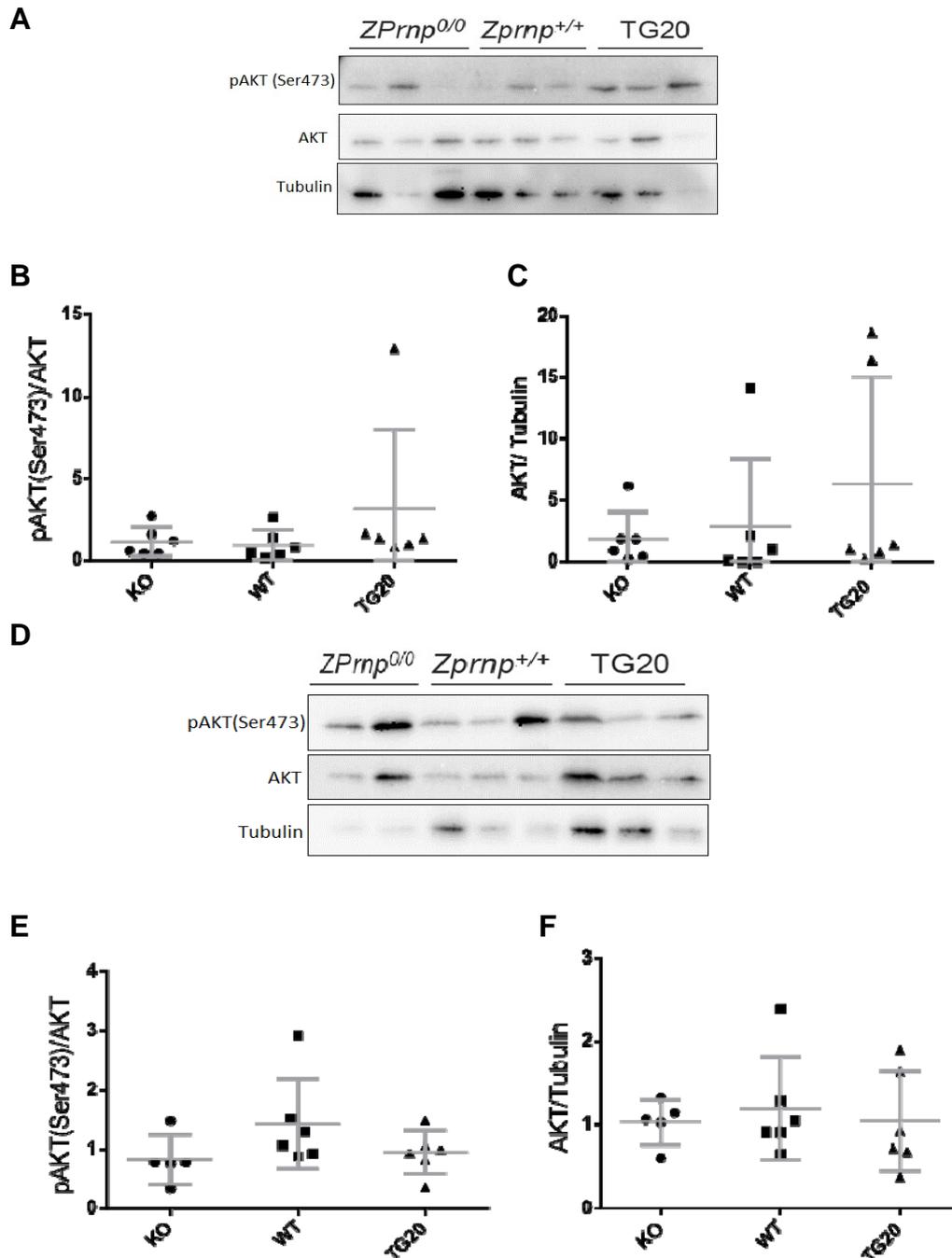


Figura 31 - Western Blots de extrato de músculo estriado esquelético dos animais Zrch I e TG20. A- Proteínas P-AKT (Ser 473), AKT total e α -tubulina dos animais da ração 10% de gordura. B- Quantificação de P-AKT (Ser 473) /AKT total. C – Quantificação de AKT total/tubulina. D - Proteínas P-AKT (Ser 473), AKT total e α -tubulina dos animais da ração 60% de gordura. E - Quantificação de P-AKT (Ser 473)/AKT total. F- Quantificação de AKT total/tubulina (não há diferenças significativas – teste de Kruskal Wallis).

No músculo estriado esquelético dos animais alimentados tanto com a ração contendo 10% de gordura quanto com a ração contendo 60% de gordura, não houve um aumento significativo da quantidade de AKT total e nem de sua forma fosforilada (Figura 31).

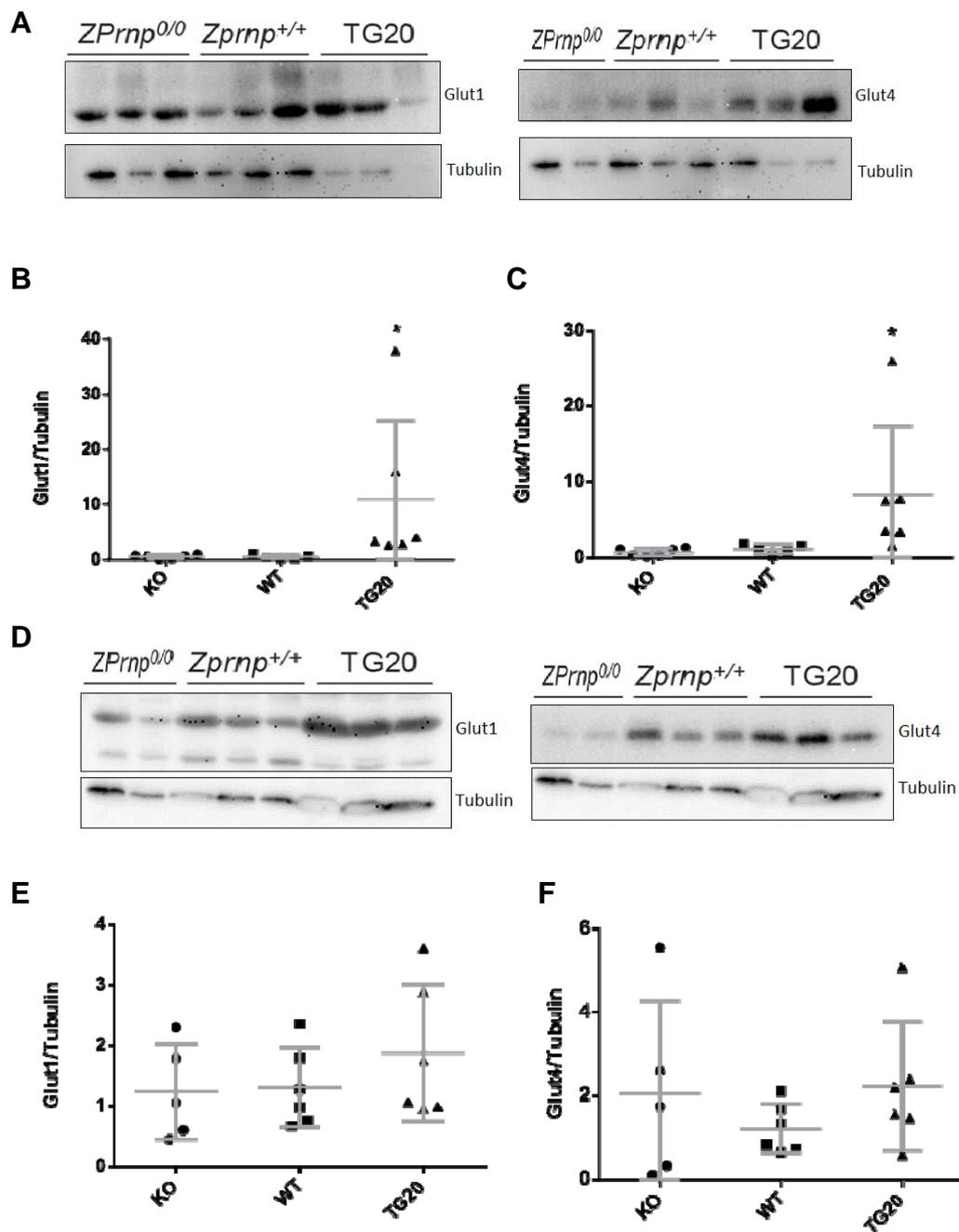


Figura 32 - Western Blots de extrato de músculo estriado esquelético dos animais Zrch I e TG20. A – Glut1 e tubulina (esquerda), Glut4 e tubulina (direita) animais ração 10% de gordura. B – Quantificação de Glut1/Tubulina (esquerda), Glut4/Tubulina (direita) animais ração 10% de gordura (* $p < 0,05$ teste Kruskal Wallis). C – Glut1 e tubulina (esquerda), Glut4 e tubulina (direita) animais ração 60% de gordura. D – Quantificação de Glut1/Tubulina (esquerda), Glut4/Tubulina (direita) animais ração 60% de gordura.

No músculo estriado esquelético dos animais alimentados com a ração contendo 10% de gordura, houve alteração de expressão dos transportadores de glicose Glut1 e Glut4 nos animais TG20, no entanto, nos animais alimentados com a ração contendo 60% de gordura essa alteração não foi observada (Figura 32).

De um modo geral, tivemos bastante dificuldade na extração das proteínas IR e IRS dos tecidos e em muitos casos, mesmo testando diversos protocolos não fomos capazes de visualizar estas proteínas nos extratos. Dentre os extratos que fomos capazes de realizar, observamos uma grande variabilidade intrínseca que na maioria das vezes impossibilitava uma conclusão definitiva. Outro problema observado foi que mesmo nos casos onde se observava uma diferença significativa de expressão de uma proteína, essa diferença não se reproduzia em outros órgãos ou entre os diferentes tipos de alimentação, o que dificulta uma conclusão mais sólida a respeito destas vias de sinalização.

Deste modo, acreditamos que o único resultado conclusivo que pode ser observado com os ensaios de Western Blot dos tecidos foram os de PPAR γ .

Desta maneira, decidimos por mudar nossa abordagem inicial e realizar ensaios com células em cultura apresentando diferentes níveis de PrPc.

4.5 CAPTAÇÃO DE GLICOSE P-MEF

Para verificar se o sistema celular de fibroblastos embrionários respondia a insulina da mesma maneira que os camundongos, foram feitos experimentos para comparar a captação de glicose das células P-MEF KO, WT e TG20.

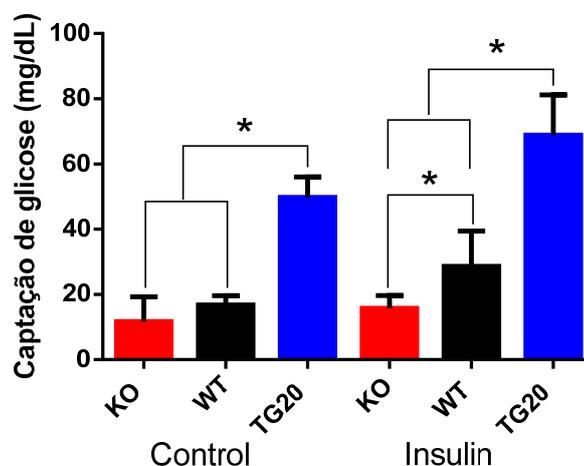


Figura 33 - Gráfico representativo da quantificação da captação de glicose Inicial-Final, sem tratamento e após o tratamento com insulina (100nM) do meio de cultura das células P-MEF KO, WT e TG20 (* $p < 0,05$ – One way ANOVA - média com desvio padrão).

Na figura 33, podemos observar que as células P-MEF TG20 são capazes de captar mais glicose do meio do que as células P-MEF KO e WT mesmo na ausência de tratamento com insulina. Após o tratamento com insulina, pudemos verificar que as células P-MEF KO captaram menos glicose do que as P-MEF WT e TG20, demonstrando uma menor sensibilidade à insulina. Este ensaio demonstra também de o sistema celular de P-MEFs se comporta de maneira semelhante aos animais no que

concerne à captação de glicose e resposta a insulina. Este fato possibilitou então o estudo das vias de sinalização de insulina neste modelo celular.

4.6 CAPTAÇÃO DE GLICOSE P-MEF COM TRATAMENTO DE METFORMINA

A metformina é um medicamento oral anti-diabético da classe das biguanidas. Possui diversos efeitos na sensibilidade a insulina no músculo e no fígado, incluindo uma diminuição na produção de glicose hepática, aumento na utilização da glicose periférica e efeitos positivos na expressão do receptor de insulina. Melhora a resistência a insulina através da indução da translocação de Glut4. A metformina ativa a via de AMPK, que por sua vez medeia a translocação de Glut4 (LEE et al. 2012).

A via de sinalização de PI3K possui papel importante na translocação de Glut4 para a membrana, a via de captação de glicose Cbl-CAP (Cbl – CAP – CrkII - C3G - TC10) é responsável pela translocação de Glut4. Estudos recentes demonstram que a metformina induz a fosforilação de Cbl, induzindo cronicamente a expressão de CAP via AMPK e modula a translocação de Glut4 através da regulação da formação do multicomplexo Cbl/CAP (LEE et al. 2012).

A proteína mTOR é um alvo “downstream” das funções de AMPK que funciona como um sensor intracelular de nutrientes controlando a síntese de proteínas, crescimento celular e metabolismo. Estudos recentes demonstraram a possível interação entre as vias de sinalização de mTOR e

AMPK (XU et al. 2012). Como citado na introdução teórica deste relatório, PrPc é um ativador de mTOR, portanto, como há conexão entre as vias de mTOR e AMPK, decidimos utilizar a metformina em nossos estudos, começando pela captação de glicose nas células P-MEF após o tratamento com metformina, como está demonstrado na Figura 34.

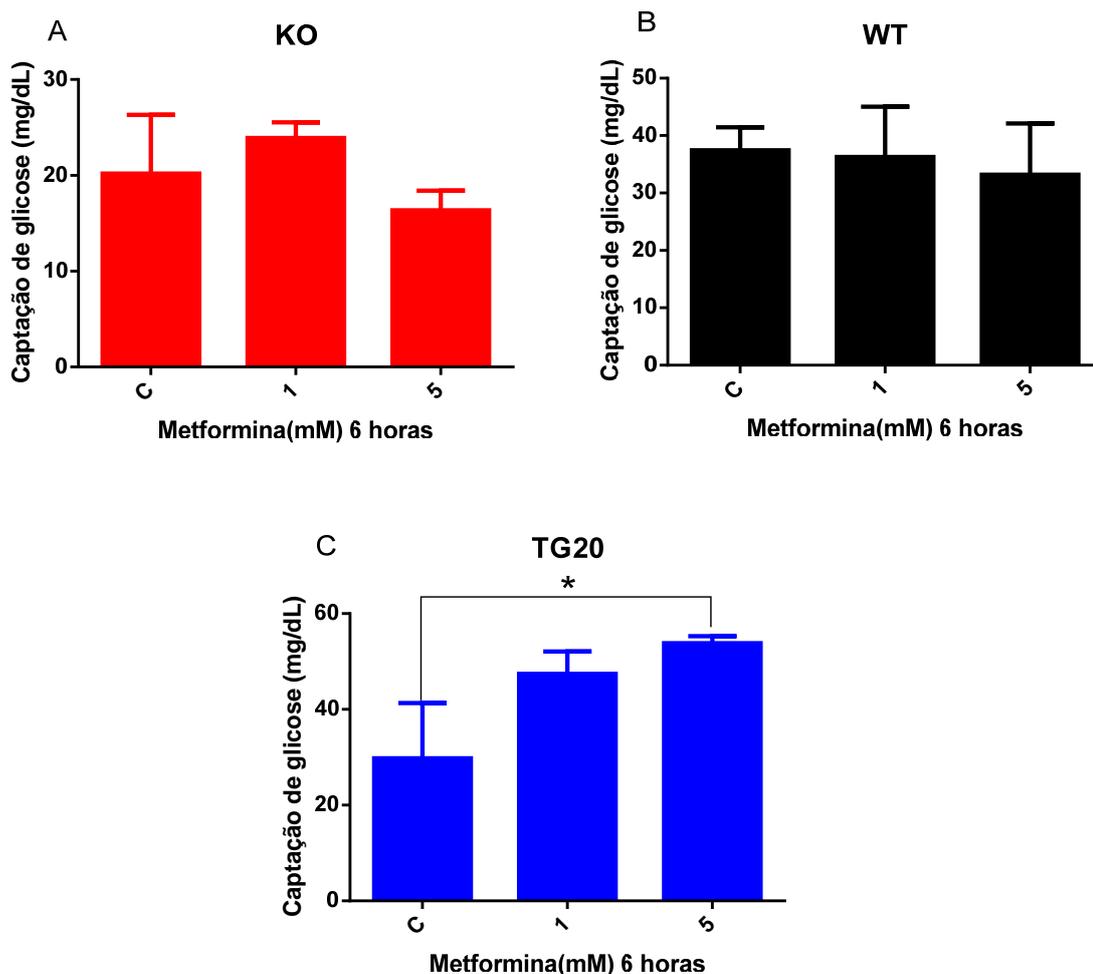


Figura 34 – Gráficos representativos da quantificação da captação de glicose Inicial-Final, sem tratamento e após o tratamento com metformina (100nM) do meio de cultura das células P-MEF KO (A), WT (B) e TG20 (C) (* $p < 0,05$ – One way ANOVA - média com desvio padrão).

Na Figura 34, podemos observar que após o tratamento com metformina, as células P-MEF TG20 captaram mais glicose quando comparadas com as células que não receberam tratamento. A adição de metformina 1mM ou 5mM ao tratamento com insulina não foi capaz de aumentar a captação de glicose das células KO. Estes resultados demonstram que a alteração metabólica que faz com que as células respondam diferencialmente à insulina de acordo com a presença de PrPc não está em AMPK e nem em mecanismos *upstream* a esta proteína.

4.7 WESTERN BLOTS DO TRATAMENTO DAS CÉLULAS P-MEF COM INSULINA

Foram feitas culturas primárias de fibroblastos embrionários (MEFs) provenientes dos animais KO, WT e TG20. Estas células foram tratadas com insulina e foram realizados ensaios de western blot para as proteínas da via de sinalização de insulina como AKT, IRS-1 e IR. Os experimentos foram repetidos 6 vezes e as figuras demonstram apenas 2 experimentos que foram escolhidos de acordo com a qualidade da imagem.

A seguir podemos observar um WB que realizamos nas células P-MEF, demonstrando que há a expressão de cerca de 6 vezes mais PrPc nas células P-MEF TG20 quando comparadas às células P-MEF WT.

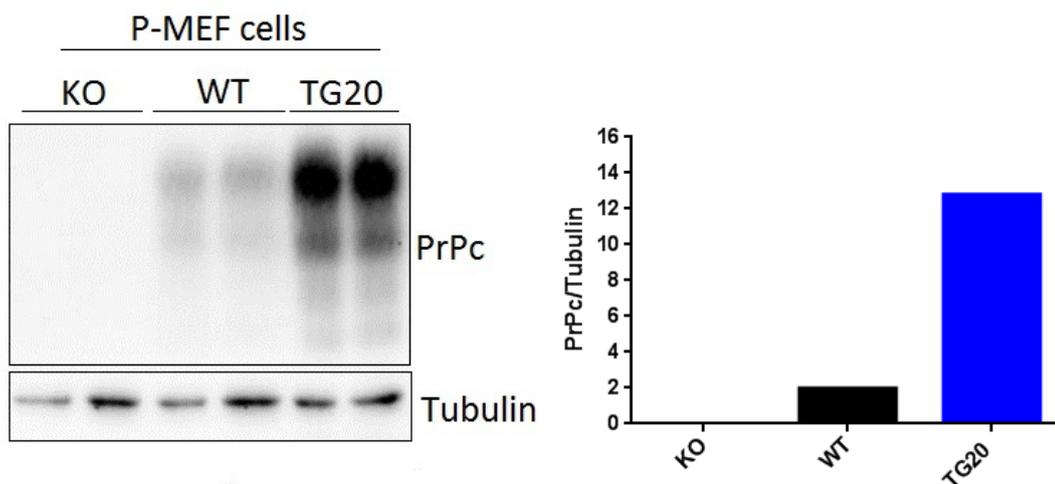
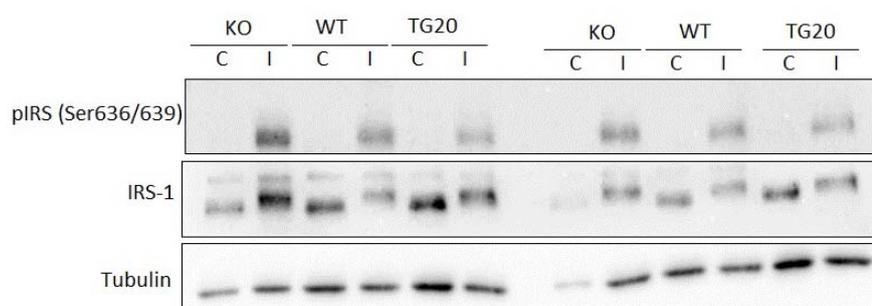


Figura 35 – Western Blot de extrato de células P-MEF para demonstrar a quantidade de PrPc (Média).



B

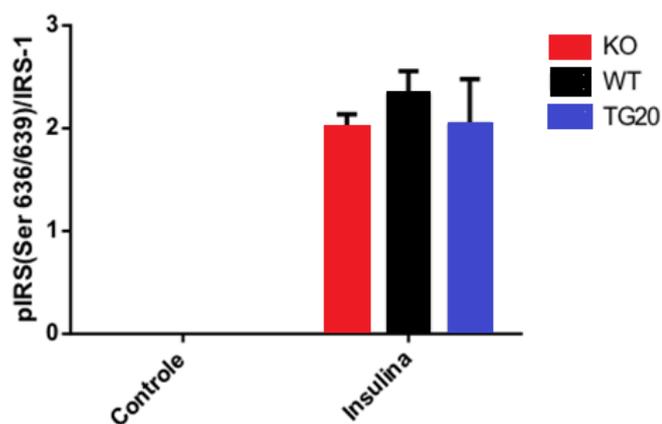


Figura 36 – WB células P-MEF. A – Western Blots dos extratos das células P-MEF KO, WT e TG20 para as seguintes proteínas: pIRS-1(Ser636/639), IRS-1 e α -tubulina. B- Quantificação das proteínas pIRS-1 (Ser636/639) e IRS-1 (não houve diferença significativa- two way ANOVA - média com desvio padrão).

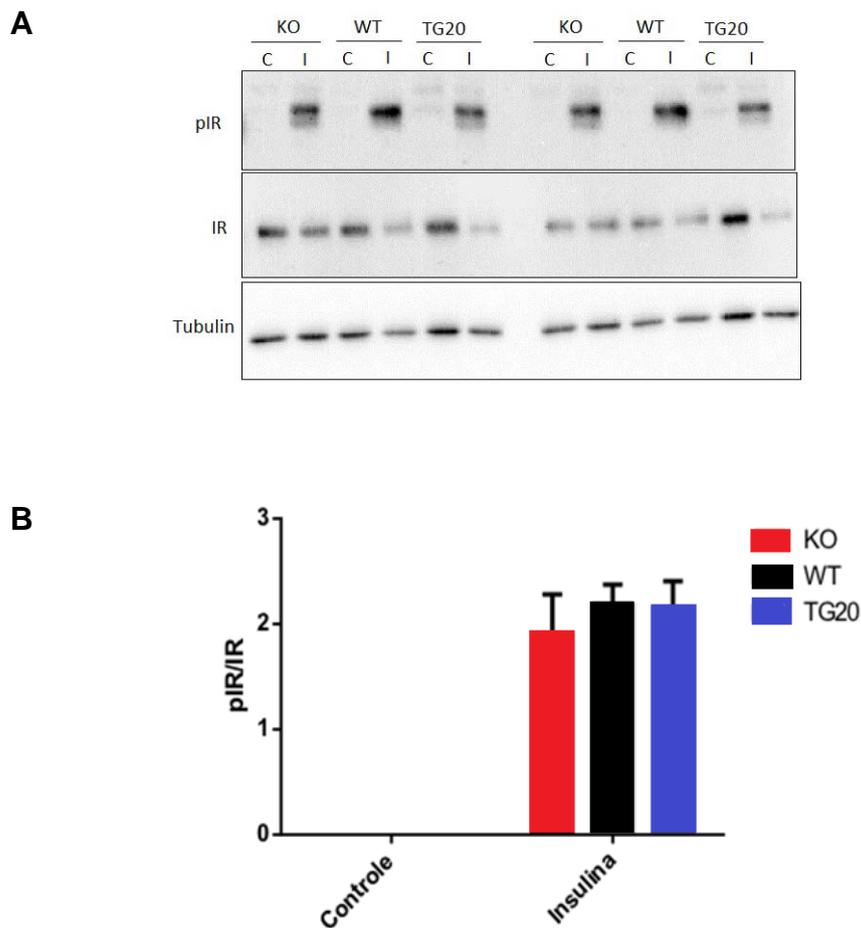
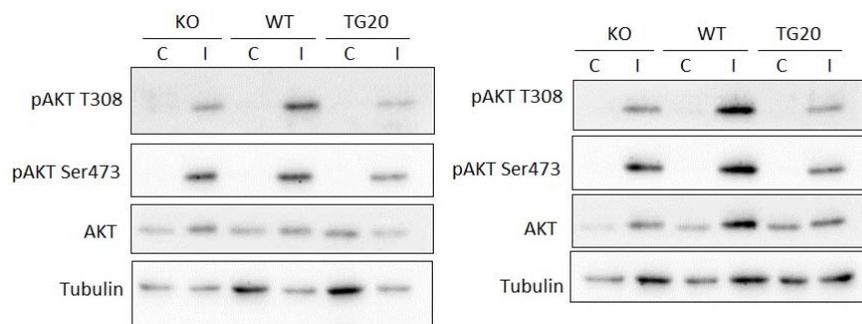


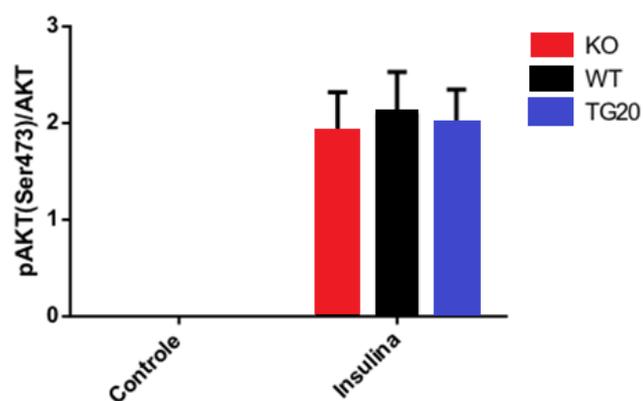
Figura 37 - WB células P-MEF. A – Western Blots realizados com os extratos das células P-MEF KO, WT e TG20 para as seguintes proteínas: pIR, IR (insulin receptor) e α -tubulina. B- Quantificação das proteínas pIR e IR (não houve diferença significativa-two way ANOVA- média com desvio padrão).

Nas Figuras 36 e 37 podemos observar que as células dos três genótipos diferentes possuem uma ativação basal igual de IR e IRS, que é praticamente nula. Após o tratamento com insulina, todas as células respondem de maneira semelhante, ativando IR e IRS nos mesmos níveis.

A



B



C

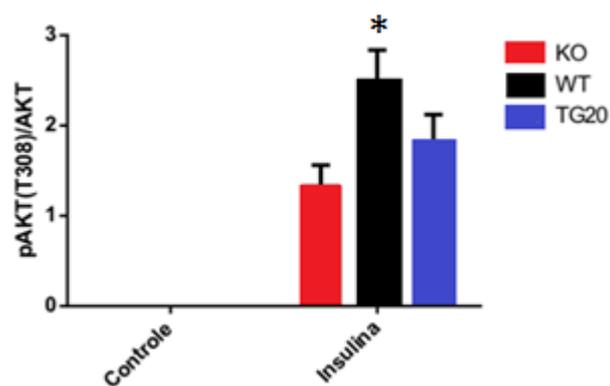


Figura 38 - WB células P-MEF. A – Western Blots realizados com os extratos das células P-MEF KO, WT e TG20 para as seguintes proteínas: pAKT (Ser473), pAKT (Thr308), AKT e α -tubulina. B- Quantificação das proteínas pAKT (Ser473) e AKT (não houve diferença significativa- two way ANOVA). C- Quantificação das proteínas pAKT (Thr308) e AKT (* $p < 0,05$ - two way ANOVA- média com desvio padrão).

AKT também possui estado basal de ativação muito baixo nos três tipos celulares, considerando tanto a fosforilação do resíduo T308 quanto do resíduo S473. Após o estímulo com insulina, não foi observada diferença na fosforilação do resíduo S473 entre as linhagens. Considerando a fosforilação do resíduo Thr308 (Figura 38), foi observado aumento somente nas células WT, mas esta diferença não é motivada por uma ativação diferencial do receptor de insulina ou de seu substrato.

Deste modo, confirmamos que não há diferenças na fosforilação de IR nem de seu substrato de modo dependente de PrPc. Estes resultados então nos fizeram buscar por mecanismos *downstream* de IR e AMPK.

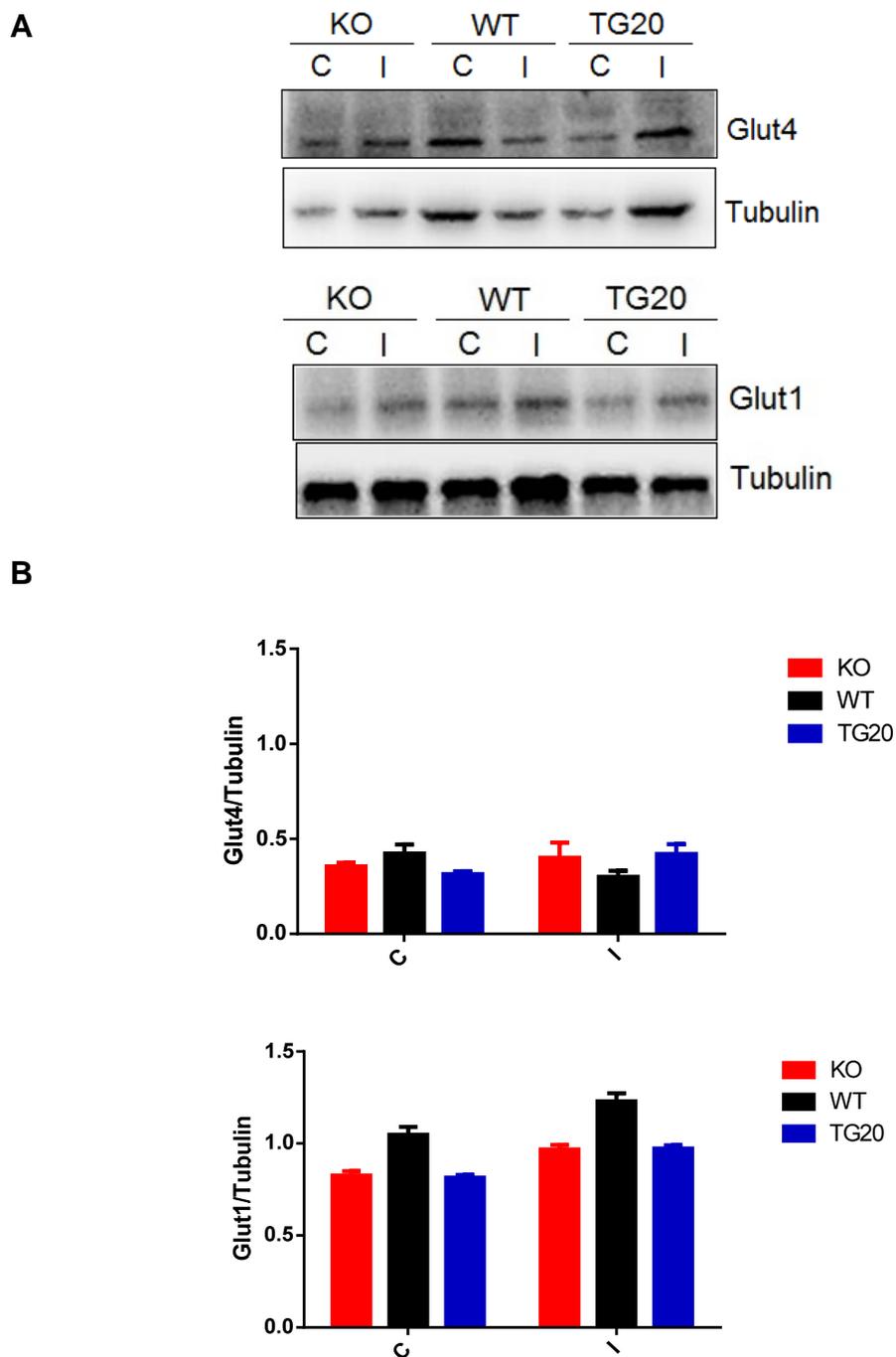


Figura 39 - WB células P-MEF. A - Western Blots realizados com os extratos das células P-MEF KO, WT e TG20 para as proteínas Glut4 (acima) e Glut1 (abaixo). B - Quantificação das proteínas Glut4 e α -tubulina (acima); Glut1 e α -tubulina (abaixo). Não houve diferença significativa - Two Way ANOVA - média com desvio padrão.

Como visto na Figura 39 também não há diferença significativa na quantidade de Glut4 e Glut1 nas células P-MEF de diferentes genótipos.

4.8 CITOMETRIA DE FLUXO

Um dos possíveis mecanismos para explicar uma redução da captação de glicose é uma diminuição dos transportadores de glicose. Como descrito anteriormente (Figura 38) não foi possível observar uma diferença significativa na expressão de glut1 ou glut4. No entanto, a regulação de glut4 se dá também através da localização subcelular desta proteína. Em células não estimuladas, glut4 se localiza em vesículas endocíticas que, após o estímulo com insulina, se translocam para a membrana. Assim, realizamos experimentos de citometria de fluxo nas células P-MEF KO, WT e TG20 para avaliar a translocação de Glut4 para a membrana após o estímulo com insulina (100nM) por 30 minutos.

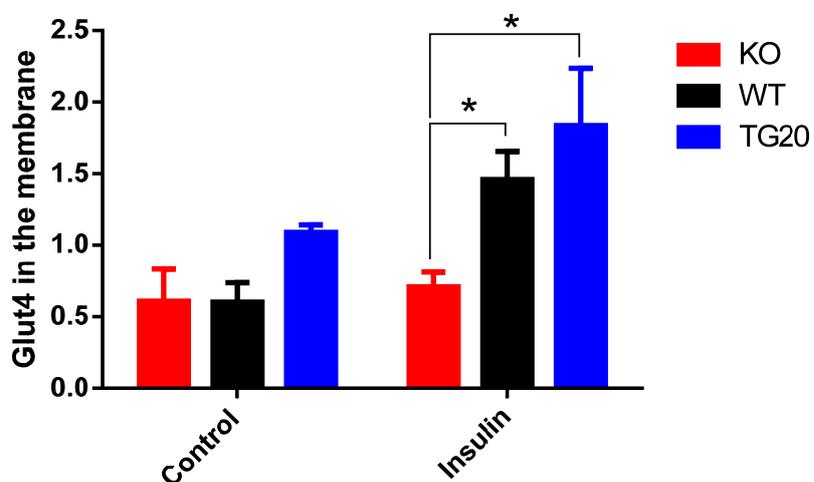


Figura 40 – Citometria de fluxo para quantificar a translocação de Glut4 para a membrana após o estímulo com insulina (Two way ANOVA - * $p < 0,05$ - média com desvio padrão).

Na Figura 40 podemos observar que após o estímulo com insulina houve uma menor translocação de Glut4 para a membrana nas células deficientes para PrPc em comparação as células WT e TG20. Adicionalmente, as células TG20 são as que demonstram a maior translocação para a membrana.

Este resultado indica que a menor captação de glicose nas células P-MEF KO, assim como a pior regulação da glicemia dos camundongos deficientes para PrPc podem estar relacionados a menor translocação de Glut4 para a membrana, diminuindo assim a entrada da glicose nas células.

Podemos concluir então que a ausência de PrPc é prejudicial para a translocação de Glut4 para a membrana após o estímulo por insulina.

5 DISCUSSÃO

PrPc pode atuar como um organizador de plataformas lipídicas na membrana celular (MAYOR e RAO 2004), possuindo habilidade de ligar-se em diversos receptores de membrana (LINDEN et al. 2008). De fato, as plataformas lipídicas têm se demonstrado importantes no que diz respeito a doenças neurodegenerativas, como as doenças de Prion. A desregulação do metabolismo de esfingolipídios com a consequente desorganização da membrana celular tem sido descrita em diversas doenças neurodegenerativas, realçando-se a importância da homeostase lipídica para a fisiologia da membrana plasmática e, conseqüentemente, de toda a célula (AGOSTINI et al. 2013).

Como o receptor de insulina é uma proteína transmembrana também presente nas plataformas lipídicas, (GUSTAVSSON et al. 1999), nossa hipótese inicial era a de que uma desregulação de plataformas lipídicas na ausência de PrPc poderia levar a uma alteração na resposta a insulina através da interação com o receptor de insulina e sua posterior sinalização.

De fato, com os experimentos que realizamos, vimos que a ausência de PrPc nos camundongos alimentados com rações de alto teor de gordura faz com que estes animais desenvolvam resistência a insulina, pois não possuem controle adequado da glicemia mesmo com grandes quantidades de insulina circulante. Do mesmo modo, animais que superexpressam PrPc apresentam uma maior sensibilidade a insulina e apresentam menor

desenvolvimento de síndrome metabólica e resistência a insulina em condições de alimentação com altas taxas de gordura.

Existem alguns relatos na literatura envolvendo PrPc e glicemia. Um estudo demonstrou que PrPc presente nas células β -pancreáticas está envolvido na regulação da glicemia (STROM et al. 2011). Porém nenhum estudo demonstrou que PrPc possa atuar como fator genético de predisposição a diabetes tipo II e síndrome metabólica, quando aliado a fatores ambientais como a alimentação rica em gordura. Os estudos também não abordam os mecanismos que possam estar envolvidos nesta regulação.

Alguns outros estudos que também se aproximaram deste tema tratam da regulação da glicemia durante a infecção por príons. Por exemplo, foi demonstrado que animais infectados com PrPsc se tornam hiperglicêmicos antes mesmo de apresentarem sinais clínicos da doença (CARP et al. 1989). Adicionalmente, outro artigo demonstrou que há prejuízo na sinalização de insulina em células devido a redução de IR α na membrana por causa do comprometimento do tráfego de vesículas pós-Golgi, causado pela infecção por PrPsc (UCHIYAMA et al. 2013). Outros que também trabalharam com animais infectados por PrPsc demonstraram que há menores níveis de Glut3, que é um dos transportadores de glicose no cérebro, após a infecção por TSEs, também antes de apresentarem sinais clínicos (YAN et al. 2014).

No entanto, a grande maioria dos autores atualmente afirma que o efeito na regulação da glicemia após a infecção por prion faz parte da patogênese da doença, sugerindo que a modulação da regulação da

glicemia, por exemplo, com agentes hipoglicemiantes poderia ser benéfico para pacientes portadores de doenças priônicas. Nossos achados, no entanto, mostram que a presença de PrPc é um fator essencial para o correto posicionamento das vesículas transportadoras de Glut4, sendo um sinal de que durante a patogênese das doenças de prion este mecanismo pode estar deficiente.

De fato, é conhecida uma relação entre a sinalização por insulina e doenças neurodegenerativas, como por exemplo, a doença de Alzheimer. A doença de Alzheimer é causada pelo acúmulo do peptídeo beta-amilóide ($A\beta$) no cérebro causando neurotoxicidade, disfunção sináptica e problemas de memória. PrPc recentemente foi identificado como um receptor neuronal de alta afinidade para o oligômero $A\beta$. Demonstrou-se também que a ligação dos oligômeros $A\beta$ a PrPc da superfície celular é dependente da integridade das plataformas lipídicas e que oligômeros $A\beta$ co-internalizam com PrPc e acumulam-se em endossomos (RUSHWORTH et al. 2013).

Estudos epidemiológicos demonstram que pacientes com diabetes mellitus do tipo 2 (DM2) possuem risco aumentado para desenvolver a doença de Alzheimer, porém esta relação ainda não está completamente esclarecida. As duas doenças exibem anormalidades metabólicas semelhantes: desordens no metabolismo da glicose, deficiência na sinalização do receptor de insulina, resistência a insulina, estresse oxidativo, anormalidades estruturais de proteínas e deposição de peptídeos beta-amilóide. Uma das hipóteses relaciona o dano microvascular causado pela diabetes com as mudanças do SNC causadas pela doença de Alzheimer.

Outra hipótese associa o impedimento cognitivo tanto na diabetes quanto na doença de Alzheimer ao estresse oxidativo sistêmico. Portanto drogas anti-diabéticas podem possuir efeitos benéficos no tratamento de ambas as doenças (DOMÍNGUEZ et al. 2013).

Entendemos que, como a doença de Alzheimer e a DM2 estão relacionadas, PrPc possui relação com a doença de Alzheimer e, como estamos demonstrando sua relação com a diabetes do tipo 2, a compreensão desta ligação com a descoberta de um mecanismo, pode nos levar a importantes alvos terapêuticos para as três patologias: doenças de Prion, de Alzheimer e diabetes mellitus do tipo 2.

Além disto, sabemos atualmente que o receptor de insulina está presente no cérebro e que há a translocação de Glut4 após o estímulo por insulina no hipocampo. Enquanto os transportadores Glut1 e Glut3, que são independentes de insulina, são suficientes para as necessidades de descanso, a energia utilizada durante a atividade cognitiva requer o transportador de glicose Glut4 (EMMANUEL et al. 2013). Estudos realizados em humanos demonstraram que indivíduos com resistência a insulina possuem redução do metabolismo da glicose no cérebro (EMMANUEL et al. 2013).

O hipocampo é uma estrutura vital para o aprendizado e para a memória, existindo grande densidade de receptores de insulina nesta região. Atualmente existem evidências crescentes que suportam a ligação entre a sinalização de insulina neuronal e a função cognitiva, particularmente a função hipocampal (EMMANUEL et al. 2013). Todas estas afirmações a

respeito da importância da boa regulação da glicemia não só em tecidos periféricos, mas também no sistema nervoso central (SNC), reforçam a importância de nossos resultados. Como PrPc está altamente expresso no SNC, pode possuir papel importante na manutenção da homeostase de glicose no cérebro, que está associada a memória e ao aprendizado.

Outro ponto interessante é a associação de PrPc com o câncer. Atualmente diversas evidências vêm surgindo indicando que PrPc está implicado na biologia de células tumorais. A superexpressão de PrPc está correlacionada com a aquisição de fenótipos de resistência das células tumorais a drogas anti-tumorais e pelo TNF- α . PrPc também pode possuir papel fundamental na proliferação e metástase de células tumorais em humanos (LI et al. 2011). Um estudo afirma que a expressão de PrPc está associada com o potencial maligno das células de câncer coloretal porque medeia o efeito Warburg através da regulação do transporte de glicose regulando positivamente a expressão de Glut1. Portanto a depleção de PrPc em células de câncer coloretal inibiu o crescimento do tumor tanto *in vivo* quanto *in vitro* (LI et al. 2011). Podemos sugerir que PrPc, assim como a regulação do transporte de glicose em tumores, podem servir como alvos-terapêutico promissores para futuras terapias contra o câncer.

Ao longo de nossos estudos, também pudemos estabelecer uma possível relação de PrPc com a obesidade, pois os animais deficientes para PrPc possuem peso mais elevado do que os animais do tipo selvagem que fizeram ingestão das mesmas rações pela mesma quantidade de tempo. Nossos dados iniciais com os camundongos foram todos confirmados em

outro modelo de animais deficientes para PrPc com *background* distinto. Nestes animais, a ausência de PrPc leva a esteatose hepática e hipertrofia de adipócitos, característicos da obesidade. Alguns estudos demonstraram que a infecção por PrPsc também causa a obesidade (CARP et al. 1998; STROM et al. 2013) reafirmando a importância de PrPc para a regulação do peso.

No entanto, apesar de resultados muito impressionantes da presença de PrPc sobre a glicemia e obesidade, fomos inicialmente frustrados em nossas buscas pelos mecanismos através dos quais PrPc realiza estes efeitos. Nossa hipótese inicial de regulação da atividade do receptor de insulina se mostrou equivocada e células dos três genótipos apresentam ativação igual do receptor de insulina e seu substrato. Estes resultados nos levaram a buscar outras vias que estariam envolvidas na regulação do controle glicêmico, como a via de AMPK e de PPAR- γ .

Para avaliar a importância de AMPK utilizamos a droga metformina em ensaios *in vitro* de captação de glicose. Observamos que a menor captação de glicose do meio das células P-MEF que não possuem PrPc em comparação com os outros dois genótipos que expressam PrPc, não se alterou após o tratamento com metformina.

Por outro lado, observamos que a expressão de PPAR γ assim como o transporte de Glut4 para a membrana estavam alterados em adipócitos conforme a presença ou ausência de PrPc. As TZDs (agonistas de PPAR- γ) possuem efeitos no transporte da glicose no tecido adiposo, aumentando a expressão de Glut4 após o tratamento com estas drogas. (LIAO et al. 2007).

Interessantemente, LIAO et al. (2007) demonstraram que a ausência de PPAR- γ em células 3T3-L1 diminuiu a quantidade de Glut4 e por consequência diminuiu a captação de glicose nestas células. Assim como nossos experimentos com células que não expressam PrPc, este estudo afirma que a depleção de PPAR- γ em adipócitos diferenciados não afetou os primeiros passos da fosforilação induzida por insulina: IR, IRS1, AKT ou ERK. Outros autores afirmam que há ação direta de PPAR- γ no metabolismo da glicose, demonstrando que Glut2 é diretamente ativado por PPAR- γ , demonstrando ainda que as TZDs aumentam a captação de glicose em culturas de células de músculo-esquelético humano (KIM e AHN 2004).

Fazendo-se a conexão de todas estas afirmações com nossos resultados podemos reforçar a importância de PrPc na regulação da resposta a insulina, para futuramente compreender melhor os mecanismos não somente da DM2 e da resistência a insulina, mas também de outras doenças neurodegenerativas, da obesidade e até mesmo do câncer.

6 CONCLUSÃO

Ao longo do nosso estudo pudemos concluir que:

- A proteína príon celular é importante para a regulação dos níveis de glicemia em camundongos;
- Camundongos que superexpressam PrPc mantêm o controle da glicemia por mais tempo mesmo após serem expostos a alimentação de alto conteúdo de gordura;
- Camundongos que superexpressam PrPc são mais sensíveis a insulina, apresentando diminuição acentuada da glicemia após receberem a mesma concentração de insulina que os camundongos deficientes e do tipo selvagem para PrPc;
- Camundongos deficientes para PrPc apresentam características de resistência a insulina, pois mesmo com grandes quantidades de insulina circulante não apresentam diferenças entre a glicemia pós-prandial e de jejum;
- PrPc é importante para a regulação do peso, pois camundongos deficientes para PrPc ganharam mais peso ao longo dos experimentos quando alimentados com rações de alto conteúdo de gordura;
- Camundongos deficientes para PrPc apresentam características de obesidade, como esteatose hepatocelular e hipertrofia dos adipócitos;
- O tecido adiposo de camundongos deficientes para PrPc apresenta

menor quantidade de PPAR- γ ;

- Células P-MEF derivadas de camundongos que superexpressam, deficientes e do tipo selvagem para PrPc não apresentam diferenças de ativação do receptor de insulina após o tratamento com insulina;
- As células P-MEF deficientes para PrPc captam menos glicose após o tratamento com insulina ou metformina do que as células que possuem PrPc;
- As células P-MEF deficientes para PrPc apresentam menor translocação de Glut4 para a membrana após o tratamento com insulina em experimentos de citometria de fluxo.

Coletivamente, nossos dados apontam que PrPc é essencial para o metabolismo de glicose atuando sobre a captação desta, modulando o transporte dos receptores Glut4. Deste modo, PrPc possui implicação em mecanismos de DM2 e síndrome metabólica.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams LA, Lymp JF, St Sauver J, et al. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. **Gastroenterology** 2005; 129:113-21.

Agostini F, Dotti CG, Pérez-Cañamás A, Ledesma MD, Benetti F, Legname G. Prion protein accumulation in lipid rafts of mouse aging brain. **PLoS One** 2013; 8:e74244.

Bailey JD, Berardinelli JG, Rocke TE, Bessen RA. Prominent pancreatic endocrinopathy and altered control of food intake disrupt energy homeostasis in prion diseases. **J Endocrinol** 2008; 197:251-63.

Bate C, Williams A. Monoacylated cellular prion protein modifies cell membranes, inhibits cell signaling, and reduces prion formation. **J Biol Chem** 2011; 286:8752-8.

Biasini E, Turnbaugh JA, Unterberger U, Harris DA. Prion protein at the crossroads of physiology and disease. **Trends Neurosci** 2012; 35:92-103.

Boura-Halfon S, Zick Y. Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 2009; 296:E581-91.

Büeler H, Fischer M, Lang Y, et al. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. **Nature** 1992; 356:577-82.

Capozza F, Combs TP, Cohen AW, et al. Caveolin-3 knockout mice show increased adiposity and whole body insulin resistance, with ligand-induced insulin receptor instability in skeletal muscle. **Am J Physiol Cell Physiol** 2005; 288:C1317-31.

Carlson CJ, White MF, Rondinone CM. Mammalian target of rapamycin regulates IRS-1 serine 307 phosphorylation. **Biochem Biophys Res Commun** 2004; 316:533-9.

Carp RI, Meeker H, Sersen E, Kozlowski P. Analysis of the incubation periods, induction of obesity and histopathological changes in senescence-prone and senescence-resistant mice infected with various scrapie strains. **J Gen Virol** 1998; 79:2863-9.

Carp RI, Kim YS, Callahan SM. Scrapie-induced alterations in glucose tolerance in mice. **J Gen Virol** 1989; 70:827-35.

Cohen AW, Combs TP, Scherer PE, Lisanti MP. Role of caveolin and caveolae in insulin signaling and diabetes. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 2003; 285:E1151-60.

Correia ML, Haynes WG, Rahmouni K, Morgan DA, Sivitz WI, Mark AL. The concept of selective leptin resistance: evidence from agouti yellow obese mice. **Diabetes** 2002; 51:439-42.

de Luca C, Olefsky JM. Inflammation and insulin resistance. **FEBS Lett.** 2008; 582(1):97-105.

Domínguez RO, Pagano MA, Marschoff ER, González SE, Repetto MG, Serra JA. Alzheimer disease and cognitive impairment associated with diabetes mellitus type 2: associations and a hypothesis. **Neurologia** 2013 Oct 17. [Epub ahead of print]

Emmanuel Y, Cochlin LE, Tyler DJ, de Jager CA, Smith AD, Clarke K. Human hippocampal energy metabolism is impaired during cognitive activity in a lipid infusion model of insulin resistance. **Brain Behav** 2013; 3:134-44.

Fischer M, Rüllicke T, Raeber A, et al. Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. **EMBO J** 1996; 15:1255-64.

Ford MJ, Burton LJ, Morris RJ, Hall SM. Selective expression of prion protein in peripheral tissues of the adult mouse. **Neuroscience** 2002; 113:177-92.

Galvan C, Camoletto PG, Dotti CG, Aguzzi A, Ledesma MD. Proper axonal distribution of PrP(C) depends on cholesterol-sphingomyelin-enriched membrane domains and is developmentally regulated in hippocampal neurons. **Mol Cell Neurosci** 2005; 30:304-15.

Gual P, Le Marchand-Brustel Y, Tanti J. Positive and negative regulation of glucose uptake by hyperosmotic stress. **Diabetes Metab** 2003; 29:566-75.

Gustavsson J, Parpal S, Karlsson M, et al. Localization of the insulin receptor in caveolae of adipocyte plasma membrane. **FASEB J** 1999; 13:1961-71.

Karnieli E, Armoni M. Transcriptional regulation of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 gene: from physiology to pathology. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 2008; 295:E38-45.

Kim HI, Ahn YH. Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in the glucose-sensing apparatus of liver and beta-cells. **Diabetes** 2004; 53 Suppl 1:S60-5.

Knight RS, Will RG. Prion diseases. **J Neurol Neurosurg Psychiatry** 2004; 75 Suppl 1:i36-42.

Lee JO, Lee SK, Kim JH, et al. Metformin regulates glucose transporter 4 (GLUT4) translocation through AMP-activated protein kinase (AMPK)-mediated Cbl/CAP signaling in 3T3-L1 preadipocyte cells. **J Biol Chem** 2012; 287:44121-9.

Leto D, Saltiel AR. Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2012; 13:383-96.

Li QQ, Sun YP, Ruan CP, et al. Cellular prion protein promotes glucose uptake through the Fyn-HIF-2 α -Glut1 pathway to support colorectal cancer cell survival. **Cancer Sci** 2011; 102:400-6.

Li Y, Wang P, Xu J, Gorelick F, Yamazaki H, Andrews N, Desir GV. Regulation of insulin secretion and GLUT4 trafficking by the calcium sensor synaptotagmin VII. **Biochem Biophys Res Commun** 2007; 362:658-64.

Liao W, Nguyen MT, Yoshizaki T, et al. Suppression of PPAR-gamma attenuates insulin-stimulated glucose uptake by affecting both GLUT1 and GLUT4 in 3T3-L1 adipocytes. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 2007; 293:E219-27.

Linden R, Martins VR, Prado MA, Cammarota M, Izquierdo I, Brentani RR. Physiology of the prion protein. **Physiol Rev** 2008; 88:673-728.

Manson JC, Clarke AR, Hooper ML, Aitchison L, McConnell I, Hope J. 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. **Mol Neurobiol** 1994; 8:121-7.

Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. **Diabetes** 2001; 50:1844-50.

Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia** 1985; 28:412-9.

Mayor S, Rao M. Rafts: scale-dependent, active lipid organization at the cell surface. **Traffic** 2004; 5:231-40.

Patti ME, Kahn CR. The insulin receptor-a critical link in glucose homeostasis and insulin action. **J Basic Clin Physiol Pharmacol** 1998; 9:89-109.

Pauli JR, Cintra DE, Souza CT, Ropelle ER. Novos mecanismos pelos quais o exercício físico melhora a resistência à insulina no músculo esquelético. **Arq Bras Endocrinol Metab** 2009; 4:399-408.

Pende M, Kozma SC, Jaquet M, et al. Glucose intolerance and diminished beta-cell size in S6K1-deficient mice. **Nature** 2000; 408:994-7.

Pessin JE, Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. **J Clin Invest** 2000; 106:165-9.

Peters PJ, Mironov A Jr, Peretz D, et al. Trafficking of prion proteins through a caveolae-mediated endosomal pathway. **J Cell Biol** 2003; 162:703-17.

Pike LJ. Rafts defined: a report on the keystone symposium on lipid rafts and cell function. **J Lipid Res** 2006; 47:1597-8.

Poggiolini I, Saverioni D, Parchi P. Prion protein misfolding, strains, and neurotoxicity: an update from studies on mammalian prions. **Int J Cell Biol** 2013; 2013:910314.

Roffé M, Beraldo FH, Bester R, et al. Prion protein interaction with stress-inducible protein 1 enhances neuronal protein synthesis via mTOR. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2010; 107:13147-52.

Rushworth JV, Griffiths HH, Watt NT, Hooper NM. Prion protein-mediated toxicity of amyloid- β oligomers requires lipid rafts and the transmembrane LRP1. **J Biol Chem** 2013; 288:8935-51.

Shaw LM. The insulin receptor substrate (IRS) proteins: at the intersection of metabolism and cancer. **Cell Cycle** 2011; 10:1750-6.

Siersbaek R, Nielsen R, Mandrup S. PPAR γ in adipocyte differentiation and metabolism--novel insights from genome-wide studies. **FEBS Lett** 2010; 584:3242-9.

Strom A, Wang GS, Scott FW. Impaired glucose tolerance in mice lacking cellular prion protein. **Pancreas** 2011; 40:229-32.

Strom A, Yutzy B, Kruip C, et al. Spontaneous obesity-linked type 2 diabetes in the absence of islet amyloid in a cynomolgus monkey infected with bovine spongiform encephalopathy. **Vet Pathol** 2013; 50:909-13.

Taylor DR, Hooper NM. The prion protein and lipid rafts. **Mol Membr Biol** 2006; 23:89-99.

Uchiyama K, Muramatsu N, Yano M, Usui T, Miyata H, Sakaguchi S. Prions disturb post-Golgi trafficking of membrane proteins. **Nat Commun** 2013; 4:1846.

Um SH, Frigerio F, Watanabe M, et al. Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. **Nature** 2004; 431:200-5.

Xu J, Ji J, Yan XH. Cross-talk between AMPK and mTOR in regulating energy balance. **Crit Rev Food Sci Nutr** 2012; 52:373-81.

Yan YE, Zhang J, Wang K, et al. Significant reduction of the GLUT3 level, but not GLUT1 level, was observed in the brain tissues of several scrapie experimental animals and scrapie-infected cell lines. **Mol Neurobiol** 2014; 49:991-1004.

Yusa S, Oliveira-Martins JB, Sugita-Konishi Y, Kikuchi Y. Cellular prion protein: from physiology to pathology. **Viruses** 2012; 4:3109-31.

Zaid H, Antonescu CN, Randhawa VK, Klip A. Insulin action on glucose transporters through molecular switches, tracks and tethers. **Biochem J** 2008; 413:201-15.

Zick Y. Ser/Thr phosphorylation of IRS proteins: a molecular basis for insulin resistance. **Sci STKE** 2005; 2005:pe4.

Zomosa-Signoret V, Arnaud JD, Fontes P, Alvarez-Martinez MT, Liautard JP. Physiological role of the cellular prion protein. **Vet Res** 2008; 39:9.

Anexo 1 – Carta de aprovação do Comitê de Ética no uso de Animais



CEUA/FAP COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA FUNDAÇÃO ANTÔNIO PRUDENTE

São Paulo, 12 de Dezembro de 2010

À Gláucia Noeli Maroso Hajj

Ref. Projeto de Pesquisa nº 046/10

Título: O Papel da proteína prion celular na regulação da resposta a insulina em condições normais e na doença de Alzheimer

Prezado(a) Doutor(a):

O projeto de pesquisa acima mencionado, foi apreciado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fundação Antonio Prudente - Hospital A.C. Camargo, em sua reunião de 12 de Dezembro 2010 . Os membros desta comissão **aprovaram** a realização deste estudo nos moldes apresentados no formulário e projeto de pesquisa encaminhados para análise.

Atenciosamente,

Vice Coordenador (a) da Comissão de Ética no Uso de Animais
Fabio Alves