



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

Restrição de Glucose na Linha Celular do Plexo Coroide de Rato (Células Z310): Efeito na Remoção do Péptido β -amiloide

Flávio Ramos das Neves

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Biomédicas
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutora Helena Marcelino
Coorientador: Prof. Doutora Cecília Santos

Covilhã, outubro de 2014

**Restrição de Glucose na Linha Celular do Plexo Coroide de Rato (Células Z310):
Efeito na Remoção do Péptido β -amiloide**

Restrição de Glucose na Linha Celular do Plexo Coroide de Rato (Células Z310):
Efeito na Remoção do Péptido B-amiloide

O conteúdo desta Dissertação é da exclusiva responsabilidade do autor.

(Flávio Ramos das Neves)

**Restrição de Glucose na Linha Celular do Plexo Coroide de Rato (Células Z310):
Efeito na Remoção do Péptido β -amiloide**

Agradecimentos

Gostaria de manifestar os meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que, direta ou indiretamente, me ajudaram na concretização deste trabalho. Dos quais destaco:

A Professora Doutora Helena Marcelino pela orientação científica, pelos conhecimentos teóricos e práticos transmitidos e pelo espírito de motivação e persistência que me soube inculcar.

A Professora Doutora Cecília Santos pelos bons conselhos e ensinamentos transmitidos, e pelo apoio e disponibilidade.

A Professora Doutora Isabel Gonçalves pela disponibilidade e pelas valiosas dicas a nível laboratorial que me deu.

Um agradecimento muito especial à colega de laboratório Ana Costa, por me acompanhar na adaptação inicial ao CICS e pela estoica paciência que teve na fase final de revisão desta dissertação.

À colega de laboratório Joana Tomás, pela disponibilidade, conhecimentos e prontidão para esclarecer qualquer dúvida.

Aos colegas de laboratório Ana Catarina, Andreia Domingos, Nádja Morete, Sandra Caria, e Tânia Albuquerque que, com a enteadajuda e espírito de grupo tornaram o trabalho prático no laboratório mais eficiente e as horas de espera entre resultados menos fastidiosas; agradeço-lhes ainda a disponibilidade e a partilha de conhecimentos.

A colega Patrícia Pereira pelas dicas e pelo feedback que me foi dando de técnicas comuns que usámos.

A todos os meus amigos da Universidade da Beira Interior e da Universidade de Lisboa, pelo percurso que tive o prazer de fazer com todos eles e pelas amizades que construí; um obrigado especial à Pena pelo exemplo inspirador que é e que me motivou para dois anos de intensa aprendizagem como mestrando.

Agradeço também à minha família que sempre me apoiou e me soube dar sábios conselhos. Finalmente resta-me agradecer aos meus pais e irmã pelo apoio, pela confiança, pelo esforço e pela prioridade que sempre deram à educação na vida dos filhos.

A todos o meu bem-haja.

**Restrição de Glucose na Linha Celular do Plexo Coroide de Rato (Células Z310):
Efeito na Remoção do Péptido β -amiloide**

Resumo

O metabolismo anormal da glucose sistêmica é um dos fatores patológicos que influenciam o início e progressão da doença de Alzheimer. A formação de produtos de glicação avançada (AGE), o aumento do nível de espécies reativas de oxigênio (ROS), e consequentemente, do *stress* oxidativo provocam a disfunção mitocondrial, levando à acumulação do péptido B-amiloide (A β). O plexo coroide (CP) tem um papel fundamental na remoção do A β do líquido cefalorraquidiano (CSF), evitando a sua acumulação e consequente morte neuronal e declínio cognitivo. A restrição calórica (RC) tem sido apontada como um fator relevante de intervenção nesta patologia. A RC contribui para que haja uma reprogramação metabólica, nomeadamente aumentando a biogénese mitocondrial, reduzindo a produção de ROS promovendo o aumento da capacidade respiratória e, consequentemente, a capacidade de sobrevivência em condições adversas. No entanto, nenhum estudo avaliou até agora o efeito da RC em células de CP, de forma a perceber se esta condição tem um efeito positivo na remoção de A β . O objetivo deste trabalho foi avaliar de que forma alguns processos biológicos como a apoptose, a atividade mitocondrial e a produção de ROS na linha celular de CP - células Z310 - variam com a RC, e como esses processos podem interferir na remoção de A β . Começámos por caracterizar o perfil metabólico da linha celular Z310 através da análise da expressão dos genes dos transportadores de glucose, Glut1 e Glut4, dos intervenientes na via de sinalização da insulina, IGF1 e IRS1, por PCR, e a localização e presença das respetivas proteínas por imunocitoquímica (IC). De seguida definimos o perfil de restrição calórica ótimo, recorrendo à determinação da viabilidade celular com azul de tripano e análise da expressão diferencial dos genes biomarcadores de restrição PGC-1 α e Hsp105 por real time PCR, em que se verificou que o perfil ótimo foi de 1,5 gL-1 de glucose durante 48 horas. Posteriormente foram avaliados através de ensaios TUNEL e IC à Casp 3, parâmetros de apoptose celular, e, através da IC da Cox IV, sonda MitoSOX e DCFDA parâmetros de atividade mitocondrial e *stress* oxidativo com e sem estímulo com A β . A partir dessa análise concluiu-se que a RC ótima melhora a função mitocondrial, levando à redução da produção mitocondrial de espécies superóxido bem como à inibição da ativação da via apoptótica, sem que haja variação de atividade mitocondrial. Não obstante, a RC sinergicamente com o estímulo de A β potencia quer a atividade mitocondrial quer a produção de ROS. Finalmente a análise densitométrica às bandas de A β obtidas por western blot dos distintos meios em RC não revela diferença nas concentrações finais de A β remanescente no meio. Desta forma não ficou demonstrado que a RC aumenta a remoção do A β pelas células Z310.

Palavras-Chave

Plexo coroide; linha celular Z310; doença de Alzheimer; B-amiloide; restrição calórica; glucose; metabolismo.

Abstract

The abnormal systemic glucose metabolism is a pathological factor that influences the onset and progression of Alzheimer's disease. The formation of advanced glycation end products (AGE), the increase of reactive oxygen species (ROS) levels, and consequently, oxidative stress and mitochondrial dysfunction, lead to the accumulation of β -amyloid peptide (A β). The choroid plexus (CP) has a key role in the removal of A β from cerebrospinal fluid (CSF), preventing his accumulation and consequent neuronal death and cognitive decline. Caloric restriction (CR) has been implicated as a relevant intervention factor in this disease. RC contributes to a metabolic reprogramming, particularly, by increasing mitochondrial biogenesis, reducing ROS production, promoting increased respiratory capacity and hence survivability under adverse conditions. However, so far there are no studies that have evaluated the effect of RC in CP cells in order to understand if this condition has a positive effect on the removal of A β . The objective of this study was to assess how some biological processes such as apoptosis, mitochondrial activity and the production of ROS in the CP cell line - Z310 cells - vary with the RC, and how these processes can interfere with A β removal. We began by characterizing the metabolic profile of the cell line Z310 through the analysis of gene expression of glucose transporters, Glut1 and Glut4, those involved in the signaling pathway of insulin, IGF1 and IRS1, by PCR, and the location and presence of the respective proteins by immunocytochemistry (IC). Then, we defined the optimal profile of caloric restriction, by determining the cell viability with trypan blue and analyzing the differential expression of genetic biomarkers of restriction, Hsp105 and PGC-1 α by real time PCR, where it was found that the optimum profile was 1.5 gL⁻¹ of glucose for 48 hours. Subsequently, parameters of cellular apoptosis were assessed by TUNEL assays and IC of Casp 3, and parameters of mitochondrial activity and oxidative stress through Cox IV, MitoSOX probe and DCFDA, with and without stimulation with A β . From those analyses it was concluded that CR improves mitochondrial function, leading to reduced production of mitochondrial superoxide species and inhibition of activation of the apoptotic pathway, without changes in mitochondrial activity. However, the RC synergistically with the stimulation of A β enhances either the mitochondrial activity as the production of ROS. Finally, a densitometric analysis of the A β bands obtained by western blot of different media in RC shows no difference in final concentrations of A β remaining in the medium. Thus we couldn't proof that CR increases the removal of A β by Z310 cells.

Keywords

Choroid plexus; Z310 cell line; Alzheimer's disease; β -amyloid; caloric restriction; glucose; metabolism.

Índice

I. Introdução	1
1. Plexo Coroide	2
1.1. Morfologia e Estrutura Básica	3
1.2. Funções Biológicas	4
1.2.1. Função Secretora	4
1.2.2. Função Protetora	4
1.3. Plexo Coroide e Envelhecimento	5
1.3.1. Alterações Morfológicas	5
1.3.2. Alterações Funcionais	5
2. Linha Celular Z310	6
3. Doença de Alzheimer	6
3.1 Doença de Alzheimer e Metabolismo	8
3.1.1. Via de Sinalização da Insulina	10
4. Restrição calórica	10
4.1 Biomarcadores PGC1 α e HSP-105	11
5. Objetivo	13
II. Material e Métodos	14
1. Linha Celular Z310	15
1.1. Cultura Celular	15
1.2. Passagem Celular	15
1.3. Restrição de Glucose <i>in vitro</i>	15
1.4 Estímulo com B-amiloide	16
1.5. Contagem Celular	16
1.6 Viabilidade Celular	16
2. RNA Total	17
2.1. Extração de RNA Total	16
2.2. Tratamento com DNase I	17
2.3. Integridade do RNA Total	17
3. Síntese de cDNA	18
4. RT-PCR	18
5. <i>Real-Time</i> PCR	19

6. Western Blot	20
6.1. Preparação das Proteínas	20
6.2. Eletroforese	20
6.3. Eletrotransferência	21
6.4. Imunodeteção do péptido AB	21
7. Imunocitoquímica	22
8. Ensaio TUNEL	22
9. Produção de Espécies Reativas de Oxigénio	23
10. Produção Mitocondrial de Espécies Superóxido	23
11. Análise Estatística	24
III. Resultados	26
1. Restrição Calórica	27
1.1. Crescimento e Viabilidade Celulares em Restrição Calórica	27
2. Perfil Metabólico da Linha Celular Z310	29
2.1. Integridade do RNA Total	29
2.2. Expressão dos Genes do Perfil Metabólico na Linha Celular Z310	30
2.3. Expressão e Localização das Proteínas do Perfil Metabólico na Linha Celular Z310	31
2.4. Expressão e Localização do Péptido β -amiloide na Linha Celular Z310	33
3. Expressão dos Genes Biomarcadores de Restrição Calórica	34
3.1. Análise Empírica da Expressão dos Genes Biomarcadores de Restrição Calórica	34
3.2. Expressão Quantitativa dos Genes Biomarcadores de Restrição Calórica	35
4. Parâmetros de <i>Stress</i> Celular e Apoptose	37
4.1. Expressão da Caspase 3 em Restrição Calórica	37
4.2. Fragmentação do DNA Nuclear	39
4.3. Produção Mitocondrial de Espécies Superóxido	40
4.4. Expressão de Citocromo c Oxidase IV	41
4.5. Produção de Espécies Reativas de Oxigénio	43
5. Efeito da Restrição Calórica na Remoção do AB	44
IV. Discussão	46
V. Conclusão e Perspetivas Futuras	50
VI. Referências Bibliográficas	52

Lista de Figuras

- Figura 1** - Distribuição do Plexo coroide pelo sistema ventricular do cérebro
- Figura 2** - Barreira sangue - líquido cefalorraquidiano
- Figura 3** - Cascata amiloide
- Figura 4** - Mecanismos patológicos que relacionam as alterações metabólicas e a doença de Alzheimer
- Figura 5** - Crescimento celular
- Figura 6** - Viabilidade celular
- Figura 7** - RNA íntegro *versus* RNA degradado
- Figura 8** - Eletroforese em gel de agarose 1.5% dos produtos de PCR dos genes do metabolismo da glucose em células Z310
- Figura 9** - Localização celular, por imunocitoquímica, das proteínas Glut1, Glut4, IGF1, IRS1,10e IRS1p nas células Z310
- Figura 10** - Localização celular, por imunocitoquímica, de A β nas células Z310, após um estímulo de 24h com A β
- Figura 11** - Expressão dos genes biomarcadores PGC1 α e HSP105 após 48 horas de restrição calórica
- Figura 12** - Variação dos níveis de expressão do mRNA do gene biomarcador de restrição calórica PGC1 α
- Figura 13** - Variação dos níveis de expressão do mRNA do gene biomarcador de restrição calórica HSP105
- Figura 14** - Expressão do gene apoptótico caspase 3 durante a restrição calórica
- Figura 15** - Fragmentação do DNA nuclear das células Z310 em restrição calórica
- Figura 16** - Produção mitocondrial de espécies superóxido pelas células Z310 em restrição calórica
- Figura 17** - Expressão de citocromo c oxidase IV em células Z310 sujeitas a restrição calórica durante 48 horas, na presença ou ausência de A β durante 24 horas
- Figura 18** -Produção de espécies reativas de oxigênio pelas células Z310 em restrição calórica, na presença ou ausência do péptido B-amiloide
- Figura 19** - Detecção e quantificação, por Western Blot, do A β presente no meio celular após 48 horas de restrição calórica e estímulo de 24h com A β ¹⁻⁴²

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Influência dos fatores ambientais e estilo de vida na Doença de Alzheimer

Tabela 2 - Sequências dos *primers* dos genes do perfil metabólico e biomarcadores de restrição

Lista de Abreviaturas e Acrónimos

AB	B-Amiloide
AGE	Produtos de Glicação Avançada
ApoE	Apolipoproteína E
APP	Proteína Precursora Amiloide
ATP	Adenosina Trifosfato
BCSF	Barreira Sangue-Líquido Cefalorraquidiano
BDNF	<i>Brain-derived Neurotrophic Factor</i>
Casp3	Caspase 3
cDNA	DNA Complementar
Cox IV	Citocromo c Oxidase IV
CP	Plexo Coroide
CPEC	Células Primárias Epiteliais do Plexo Coroide
CSF	Líquido Cefalorraquidiano
CycA	Ciclofilina A
DA	Doença de Alzheimer
DEPC	<i>Diethylpyrocarbonate</i>
DCFH-DA	2',7' -Dicloro-dihidro-fluoresceína Diacetato
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNase	Desoxirribonuclease
dNTP	Desoxi-ribonucleótidotri-fosfato
DT2	Diabetes <i>Mellitus</i> tipo 2
ERK	<i>Extracellular signal-Regulated kKnase</i>
FBS	Soro Fetal Bovino
Glut	Transportador de Glucose
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HSP105	Heat Shock Protein 105 kDa
IGF	<i>Insulin-like Growth Factor</i>
IRS	Substrato do Recetor de Insulina
IRSp	Substrato Fosforilado do Recetor de Insulina
MAPK	Proteína Quinases Ativadas por Mitogénios
MHC	Complexo Maior de Histocompatibilidade
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
PFA	Paraformaldeído

Restrição de Glucose na Linha Celular do Plexo Coroide de Rato (Células Z310):
Efeito na Remoção do Péptido B-amiloide

PGC1 α	<i>Peroxisome Proliferator-activated Receptor Gamma Coactivator-1-alpha</i>
PI3K	Fosfatidilinositol-3 Quinase
PSA	Persulfato de Amónio
PVDF	<i>Polyvinylidene difluoride</i>
PKB	<i>Protein Kinase B</i>
RC	Restrição Calórica
rRNA	RNA Ribossomal
ROS	Espécies Reativas de Oxigénio
SEM	Erro Padrão da Média
SNC	Sistema Nervoso Central
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i>
TMED	Tetrametiletilenodiamina
TBS-T	Tris-Buffered Saline Tween
TNF α	<i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
TTR	Transtirretina
TUNEL	<i>Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick end Labeling</i>

I. Introdução

1. Plexo Coroide

A barreira sangue-líquido cefalorraquidiano (BCSFB) é constituída principalmente pelo plexo coroide (CP). Por se tratar de um tecido fulcral no desenvolvimento, homeostasia e reparação do sistema nervoso central (SNC), tem atraído recentemente a atenção da comunidade científica, pois está implicado no transporte de nutrientes, na regulação endócrina, nos processos de envelhecimento e na patogenicidade de alguns distúrbios neurodegenerativos (Monnot and Zheng, 2013).

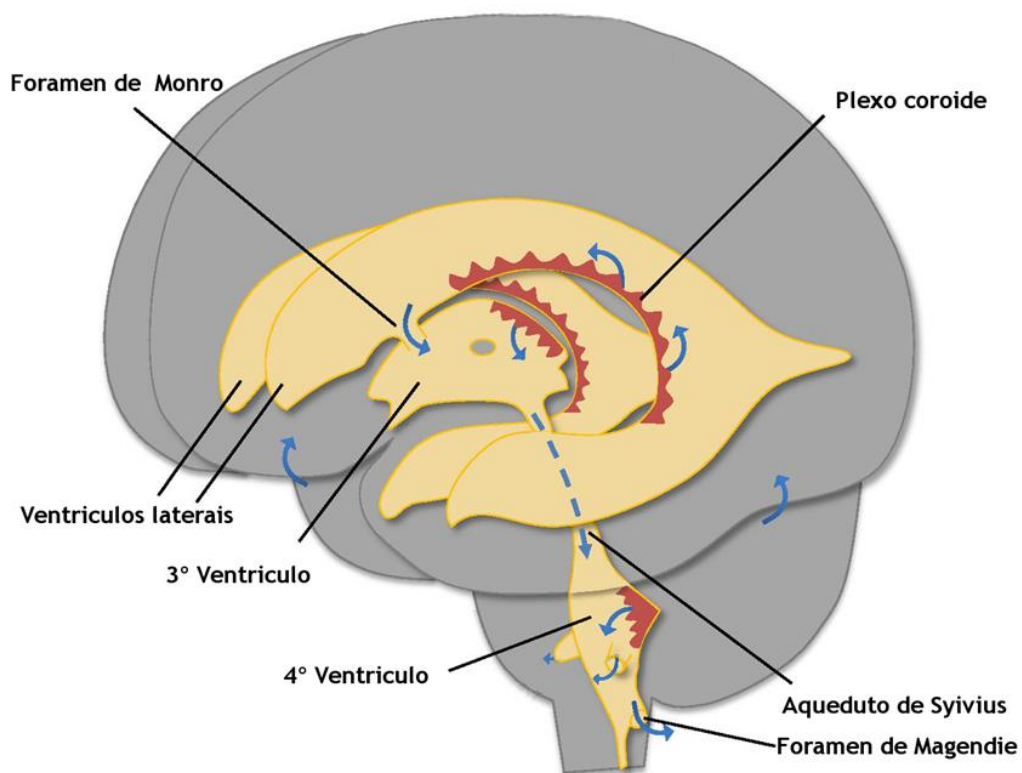


Figura 1 - Distribuição do plexo coroide pelo sistema ventricular do cérebro. O parênquima cerebral está representado a cinzento, os ventrículos e aquedutos a amarelo e o plexo coroide a vermelho. Adaptado de (Damkier et al., 2013).

1.1. Morfologia e Estrutura Básica

O CP é um tecido que se distribui em redor das paredes dos quatro ventrículos cerebrais (Figura 1), originado pelas pregas da pia-máter que formam camadas de tecido conjuntivo (Young et al., 2013), sendo a sua unidade funcional composta por capilares sanguíneos envoltos em células epiteliais endoteliais perfeitamente diferenciadas. Morfologicamente, o CP é composto por numerosas microvilosidades, e cada uma delas é composta por uma única camada de células cubóides assentes numa membrana basal lisa (face basolateral), que contacta com os capilares sanguíneos amplamente fenestrados. Por outro lado, a face apical deste epitélio está em contato com o CSF, ajudando a mantê-lo em permanente circulação. Na face lateral do epitélio, os desmossomas e *tight junctions* mantêm as células coesas e impedem o fluxo paracelular de moléculas, contribuindo para a manutenção característica de barreira do CP (Mortazavi et al., 2014) (Figura 2). Assim, o CP é a única estrutura que, no encéfalo, tem a capacidade de interface entre os dois tipos de fluidos circulantes: o CSF e o sangue periférico (Gherzi-Egea and Strazielle, 2001a).

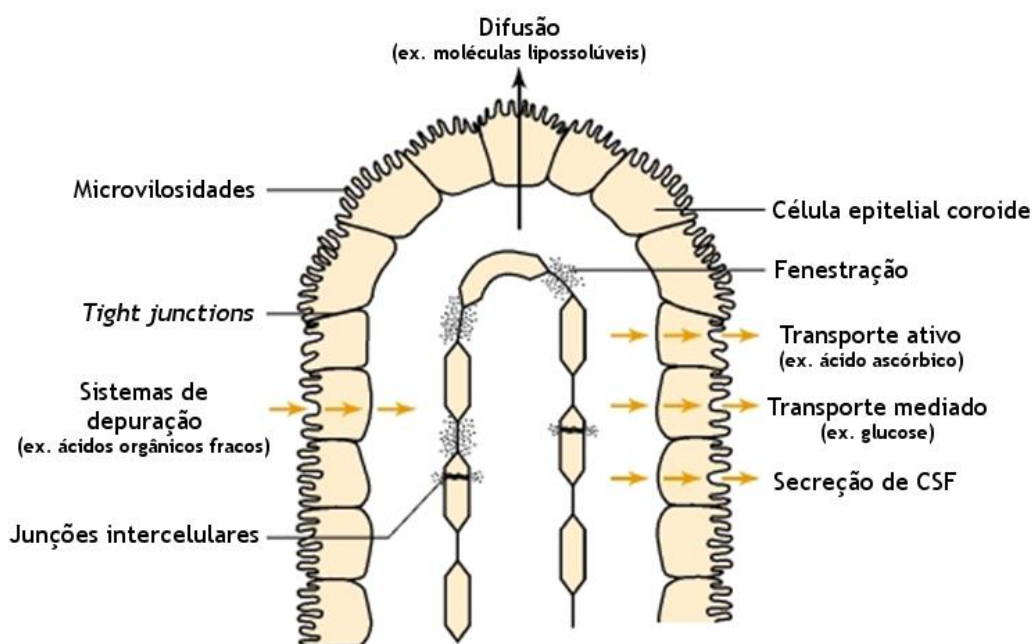


Figura 2 - Barreira sangue-líquido cefalorraquidiano (BCSFB). As células epiteliais do plexo coroide (CP) presentes barreira BCSFB são mantidas coesas por *tight junctions*. As microvilosidades presentes na face apical do CP permitem o aumento da área da membrana apical e auxiliam na do CSF. No CP foram ainda identificados processos de difusão passiva, facilitada, transporte ativo e transporte de metabolitos do CSF para o sangue. Adaptado de (John Laterra, Richard Keep, Lorris A Betz, 1999).

1.2. Funções Biológicas

1.2.1. Função Secretora

Das várias funções que o CP tem, uma das mais importantes é a função secretora. O CP é o responsável pela produção do CSF e secreção dos seus constituintes (essencialmente polipéptidos). As ATPases, os numerosos canais iônicos e as aquaporinas presentes nas membranas apicais e basolaterais promovem o processo de secreção contínua do CSF. O transporte de sódio, cloro e iões bicarbonato do sangue para os ventrículos através do CP, e o transporte do potássio no sentido inverso, originam um gradiente osmótico que promove a secreção de água na direção dos ventrículos cerebrais (Brown et al., 2004; Thanos et al., 2010). O CSF é produzido a uma taxa de 0.3-0.4 mL/min em humanos, cerca de um terço da taxa de formação da urina, sendo que um adulto possui cerca de 150 mL de CSF que pode ser totalmente renovado 3-4 vezes por dia (Oshio et al., 2003). O CP possui ainda a capacidade de produção e secreção de vários polipéptidos como as interleucinas -1 e -6 e o *tumor necrosis factor alpha* (TNF α), inúmeras hormonas como a leptina, prolactina e angiotensina, fatores de crescimento como o *insulin-like growth factor* (IGF) e o *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) (Chodobski and Szmydynger-Chodobska, 2001a). Para além da produção destes polipéptidos, o CP expressa ainda os recetores específicos dos mesmos, o que por um lado conduz a ações autócrinas e parácrinas, e por outro leva a que esses polipéptidos produzam efeitos endócrinos nas células-alvo no encéfalo, quando libertados e transportados no CSF (Emerich et al., 2005; Stopa et al., 2001). O CP produz ainda alguns polipéptidos característicos deste tecido, nomeadamente a transtirretina (TTR), e a transferrina. A TTR, exclusivamente sintetizada pelo epitélio do CP, representa mais de 20% das proteínas sintetizadas e 50% das proteínas secretadas por este tecido (Chodobski and Szmydynger-Chodobska, 2001b; Redzic and Segal, 2004), e é responsável pelo transporte e manutenção do nível fisiológico das hormonas tiroideias no SNC (Blay et al., 1993; Chodobski and Szmydynger-Chodobska, 2001b; Redzic et al., 2005; Schreiber et al., 1990). A TTR é ainda responsável pela formação de complexos com o péptido β -amiloide (A β), sequestrando-o e prevenindo a formação de agregados insolúveis que, quando se acumulam no cérebro, podem dar origem à doença de Alzheimer (DA).

1.2.2. Função Protetora

Para além da função secretora, o CP funciona como sistema de desintoxicação, controlando o efluxo, sequestro e metabolismo de toxinas. Possui enzimas de funcionalização, isto é, enzimas que catalisam reações de oxidação, redução ou hidrólise de grupos funcionais de fármacos com vista à sua eliminação (como o citocromo p-450), enzimas de conjugação que protegem contra o *stress* oxidativo (como a superóxido dismutase), metalotioneínas, cisteínas e glutationas que sequestram agentes tóxicos em circulação, sistemas de transporte de iões orgânicos, e enzimas de transporte de drogas que exportam compostos tóxicos do CSF (Emerich et al., 2005). O CP tem também a capacidade de absorver proteínas e resíduos metabólicos provenientes do CSF através de pinocitose ou por transporte ativo. As vesículas

pinocíticas são digeridas intracelularmente ou libertadas através da membrana basolateral das células epiteliais para o estroma de tecido conectivo e demais vasculatura sanguínea (Mortazavi et al., 2014). Recentemente, foi também descoberto que o CP possui a capacidade de mediar ações entre o sistema imune periférico e o cérebro, através da libertação coordenada de citocinas pró-inflamatórias (Lacroix et al., 1998) e expressão de proteínas do complexo maior de histocompatibilidade quando existe invasão do CSF por agentes patogénicos. O CP possui ainda capacidade de apresentação antigénica, o que lhe permite fazer parte de um sistema de imunovigilância contra agentes patogénicos e antigénios que possam circular no sangue periférico e no CSF (Emerich et al., 2005; Wang and Kaur, 2000)

1.3. Plexo Coroide e Envelhecimento

1.3.1. Alterações Morfológicas

O CP sofre diversas modificações morfológicas com o avanço da idade. Com o envelhecimento, a altura das células epiteliais do plexo diminui cerca de 10% a 15%, a membrana basal torna-se mais espessa e o estroma toma um aspeto fibroso e passa a conter fibras de colagénio, inclusões hialinas e calcificações (Emerich et al., 2005; Segal, 2001; Serot et al., 2003). As paredes das artérias coroídes engrossam, tornam-se gradualmente mais rígidas e há fragmentação das fibras do tecido elástico (Dohrmann, 1970; Serot et al., 2003), contribuindo para um fenótipo atrofiado do CP durante o envelhecimento. Também o interior do epitélio do CP sofre alterações fenotípicas: o núcleo fica com uma forma irregular e alongada e o citoplasma torna-se rico em inclusões fibrilares denominadas de Biong (Wen et al., 1999) e em depósitos de lipofucsina conferindo-lhe um aspeto fibroso (Emerich et al., 2005).

1.3.2. Alterações Funcionais

Com o envelhecimento, o CP não consegue manter a produção de CSF, cuja taxa de produção diminui cerca de 45%. Além disso, a renovação do CSF em organismos envelhecidos também se torna mais lenta, sendo que em idosos a renovação completa do CSF acontece apenas 2 vezes por dia (Preston, 2001; Redzic et al., 2005; Serot et al., 2003).

A produção de energia também se encontra alterada, pois existe uma diminuição de cerca de 20% na atividade de enzimas, como a lactato e succinato desidrogenases, e intermediários responsáveis pela produção de adenosina trifosfato (ATP), provocando alterações na disponibilidade dos metabolitos dependentes do catabolismo da glucose (Emerich et al., 2005; Serot et al., 2003). Outra alteração do metabolismo energético que se verifica em células epiteliais de CP senescentes é a redução significativa na quantidade de citocromo c oxidase, que leva a alterações da cadeia respiratória e, conseqüentemente, a uma diminuição da quantidade de ATP produzido (Cottrell et al., n.d.; Emerich et al., 2005; Serot et al., 2003).

2. Linha Celular Z310

A linha celular Z310, obtida a partir de células epiteliais do CP de rato imortalizadas através de transfecção com o *SV40 large T antigen*, que interage com os supressores de crescimento pRB e p53 (Jha et al., 1998), e mantém as características morfológicas originais de tipo epitelial poligonal durante todo o tempo de permanência em cultura.

Tal como as células epiteliais primárias de CP (CPEC), as células Z310 dispõem-se numa camada simples e uniforme com uma resistência elétrica transepitelial que varia entre 85 e 100 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ (Shi and Zheng, 2005; Zheng and Zhao, 2002), facilitando o seu uso em ensaios farmacológicos e toxicológicos que envolvem a circulação sanguínea sistémica e o CSF (Strazielle and Gherzi-Egea, 1999). Do ponto de vista funcional, as células Z310 caracterizam-se pela síntese de TTR, a proteína homotretamérica que representa cerca de 50% de todas as proteínas sintetizadas e excretadas pelo CP (Dickson et al., 1986), cuja dissociação dos tetrâmeros leva ao surgimento de monómeros que promovem a agregação e deposição de agregados e fibras amiloides envolvidas na DA (Reixach et al., 2008). Tanto a síntese de TTR como a síntese do recetor da transferrina são características únicas pertencentes à camada epitelial do CP (Zheng and Zhao, 2002). A autenticidade das características de barreira epitelial entre o sangue e o CSF foi também demonstrada na linha celular Z310, na qual se verifica a presença de *tight junctions*, a constituição de monocamadas compactas, a presença de transportadores de metais como o manganês, o cobre e o ferro, e a presença de compostos orgânicos, como os nucleósidos das hormonas, aniões orgânicos e péptidos de elevado peso molecular, característicos deste tipo de tecidos (Huang et al., 2013; Monnot and Zheng, 2013). Desta forma, a linha celular Z310 permite ultrapassar as limitações das CPEC: diferenciação limitada, curto tempo médio de vida, impossibilidade de múltiplas passagens em cultura, e necessidade de sacrificar animais para remoção do CP. Além disso, as células Z310 são menos exigentes relativamente à composição do meio de cultura, mantendo no entanto as características morfológicas e funcionais das CPEC e as características funcionais do CP (Monnot and Zheng, 2013; Zheng and Zhao, 2002).

3. Doença de Alzheimer

A DA é uma doença neurodegenerativa progressiva e debilitante caracterizada pela possibilidade de identificação de vários estádios da doença, mas cujo diagnóstico definitivo só é possível perante análise histopatológica *post mortem* do tecido cerebral. Caracteriza-se pela perda gradual de neurónios colinérgicos culminando na degradação das funções cognitivas motoras e comportamentais. Atualmente estima-se que 24 milhões de pessoas em todo o mundo sofram de demência, e prevê-se que esse número aumente para 42 milhões em 2020 e 81 milhões em 2040 (Ballard et al., 2011). Desse grupo de pessoas com demência, 60% com

mais de 65 anos sofre ou sofrerá de DA. Os dois principais sinais neuropatológicos desta patologia são: a deposição extracelular de placas amiloides constituídas por fibras peptídicas, e a acumulação intracelular de corpos celulares e dendrites proximais de filamentos da proteína *tau* hiperfosforilada (Cotman et al., 2005), causadores de degeneração neurofibrilar (Dickson, 2004; Sims-Robinson et al., 2010). Fatores ambientais e genéticos também contribuem para a manifestação da doença, embora os fatores genéticos estejam associados ao aparecimento precoce da doença - casos de padrões de hereditariedade autossômica dominante e mutações pontuais nos genes da proteína precursora amiloide (APP), e das presenilinas 1 e 2 - com exceção do alelo 4 da apolipoproteína E, que pode aumentar o risco de DA tardia (Kar et al., 2004; Rocchi et al., 2003) (Figura 3).

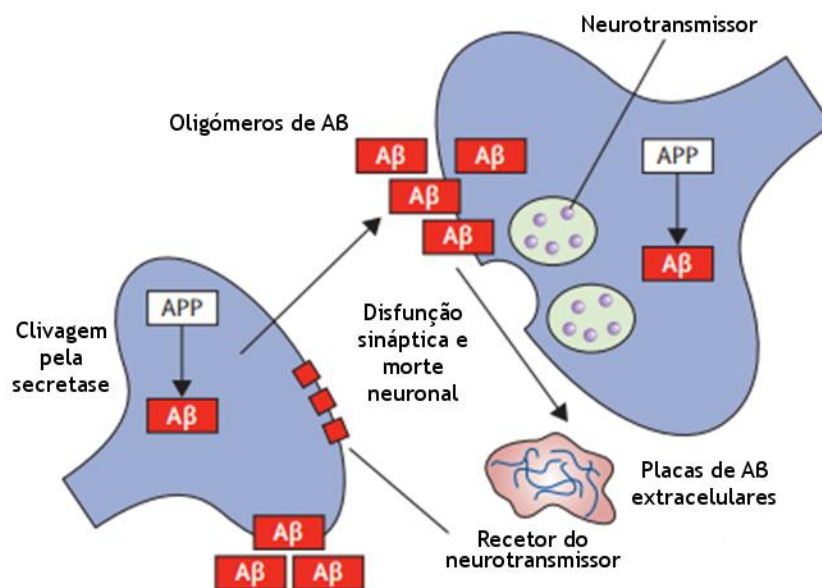


Figura 3 - Cascata amiloide. A proteína precursora amiloide (APP) é clivada pela secretase endógena em β-amiloide acumulando-se no interior das células neuronais e extracelularmente sob a forma de placas. Na cascata amiloide os depósitos de Aβ são tóxicos, provocando um feedback positivo de disfunção sináptica e morte neuronal. Adaptado de (Ballard et al., 2011).

O aparecimento da DA em idades mais avançadas parece estar menos dependente de fatores genéticos e ser influenciada predominantemente por fatores ambientais e de estilo de vida (Tabela 1) (Rocchi et al., 2003), de entre os quais a hipertensão, a aterosclerose, tabagismo, alcoolismo, atividade física e cognitiva, bem como condições patológicas ligadas ao metabolismo como a adiposidade, hiperinsulinemia, resistência à insulina e diabetes (Haan, 2006; Sims-Robinson et al., 2010).

Tabela 1 - Influência dos fatores ambientais e estilo de vida na Doença de Alzheimer. Adaptado de (Ballard et al., 2011).

	Descrição do estudo	Conclusões
Estilo de vida		
Obesidade	Meta-análise de 10 estudos, todos prospectivos, com pelo menos 2 anos de seguimento e com participantes acima dos 40 anos de idade.	A demência obteve 1,42 de RR e a doença de Alzheimer um RR de 1,80 (95% IC em ambos)
Atividade física	13 estudos prospectivos com foco na doença de Alzheimer demência ou ambos, com cerca de 150 000 participantes.	A demência apresentou um RR de 0,72 e a doença de Alzheimer um RR 0,55 (95% IC em ambos)
Estados clínicos		
Diabetes	15 estudos de coorte prospectivos	Demência com RR de 1,47 e a doença de Alzheimer 1,39 (95% IC em ambos)
Acidente vascular cerebral	16 estudos com mais de 25 000 participantes com idades superiores a 65 anos	12 dos 16 estudos demonstraram uma associação significativa entre AVC e possibilidade de duplicar a incidência de demência
Abreviaturas: RR - Risco Relativo. OR - Odds Ratio (razão de possibilidades) IC - Intervalo de confiança		

3.1. Doença de Alzheimer e Metabolismo

Em meados da década de 90, o primeiro estudo epidemiológico de larga escala revelou que pacientes com diabetes *mellitus* tipo 2 (DT2) apresentavam um risco duas vezes superior de contrair DA (Ott et al., 1996) e, em 2004, um estudo alargado da *Mayo Clinic Alzheimer Disease Patient Registry* permitiu observar que mais de 80% dos pacientes que sofriam de DA tinham níveis de glucose no sangue alterados ou sofriam de DT2 (Janson et al., 2004), tornando fortes as evidências da relação entre alterações no metabolismo da glucose e o surgimento da DA, e um possível mecanismo fisiopatológico comum a ambas as doenças (Correia et al., 2012).

Os neurónios são incapazes de armazenar ou sintetizar glucose e, por isso, estão dependentes do transporte de glucose mediado por transportadores de glucose (Glut) através da barreira hematoencefálica. As isoformas mais relevantes dos Glut no cérebro são: a isoforma 1 (Glut1), distribuída amplamente pelo cérebro, desde neurónios a células endoteliais, astrócitos e oligodendrócitos; a isoforma 3 (Glut3) expressa sobretudo nos neurónios (Vannucci et al., 1997); e a isoforma 4 (Glut4) cuja ativação e translocação para a membrana plasmática está dependente da sinalização pela insulina e cuja expressão é mais relevante no bolbo olfativo no *girus dentato* do hipocampo e cerebelo (Vannucci et al., 1998). Desta forma, o metabolismo da glucose no cérebro revela-se de grande importância para o normal funcionamento das funções neuronais. No CP, o Glut1, embora presente em toda a membrana do epitélio apresenta uma distribuição essencialmente basolateral e a sua expressão é constante ao longo da vida (Dwyer et al., 2002; Dwyer and Pardridge, 1993). Por outro lado, o Glut4 tem elevada expressão no CP durante a embriogénese, e posteriormente a sua expressão torna-se residual. No cérebro, inclusivamente no CP, a expressão do Glut4 coincide

com locais onde ocorre a produção de insulina, e onde existem recetores de insulina e fatores de crescimento, como o de tipo 1 (IGF1) (Dwyer et al., 2002; Vannucci et al., 2000, 1998). A hiperglicemia, caracterizada por um nível elevado de glucose no sangue, promove a formação de produtos de glicação avançada (AGE) altamente reativos capazes de reagir com resíduos de lisina, arginina, cisteína e grupos amino N-terminais (Ahmed and Thornalley, 2007), que resultam da auto-oxidação da própria glucose (Brownlee, 1995). Os AGE levam à glicação do A β e da proteína *tau*, tendo como consequência a acumulação de A β e a formação de placas senis, a hiperfosforilação da *tau* e a produção de emaranhados neurofibrilares (Ledesma et al., 1994; Takuma et al., 2009; Yan et al., 1996), e que finalmente exacerbam o stress oxidativo sofrido pelos tecidos cerebrais (Figura 4).

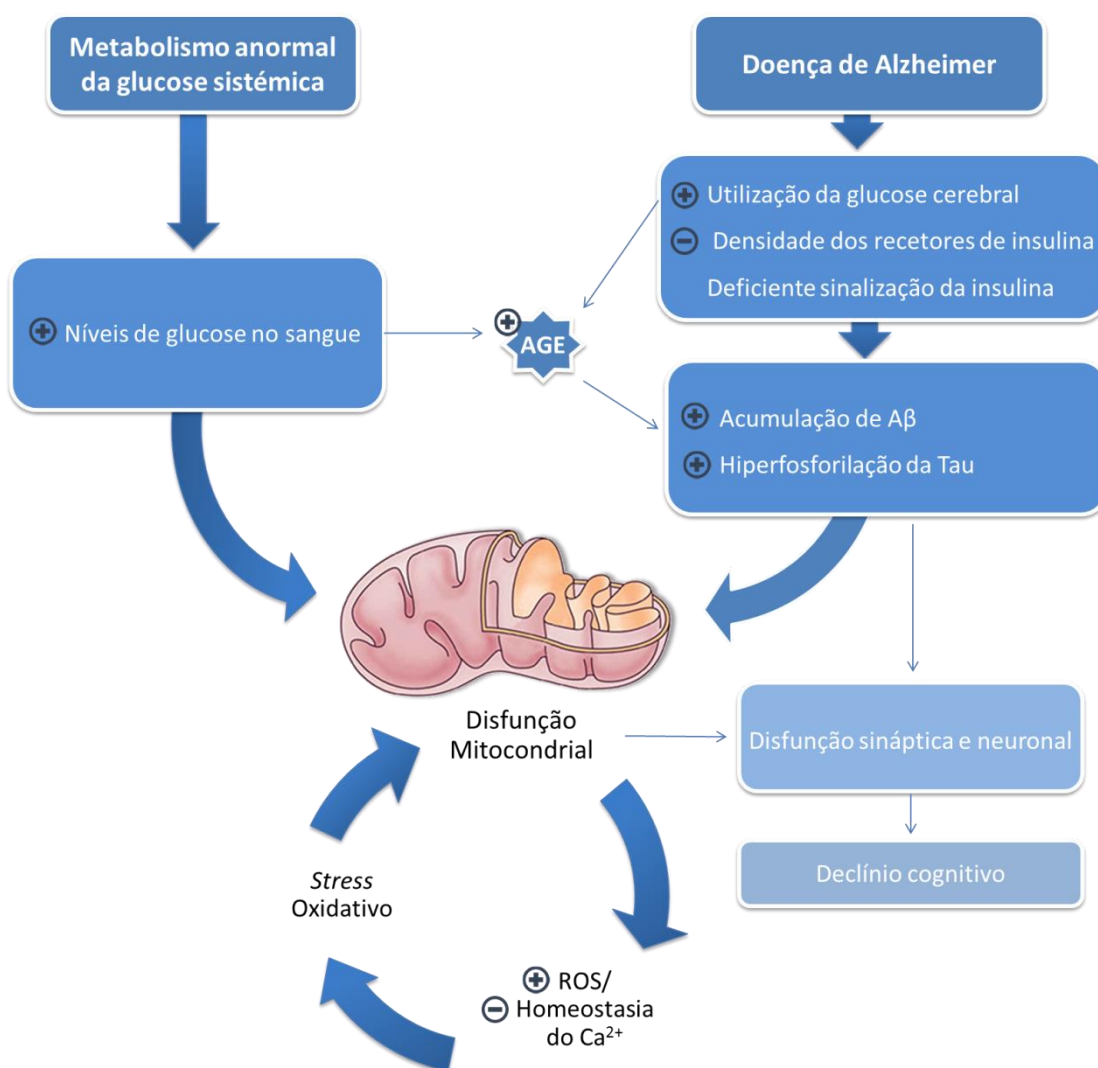


Figura 4 - Mecanismos patológicos que relacionam as alterações metabólicas e a doença de Alzheimer. O metabolismo sistêmico da glucose/insulina estão entre os fatores patológicos que influenciam o início e progressão da DA. A hiperinsulinemia e a resistência à insulina provocam um reduzido transporte da insulina para o cérebro e diminuição da atividade dos recetores da mesma,

comprometendo o metabolismo da glucose e a via de sinalização da insulina. Em simultâneo, provocam a auto-oxidação da glucose e formação de produtos de glicação avançada (AGE) que, por sua vez, reforçam a acumulação do A β , a hiperfosforilação da *tau*, bem como o aumento do nível de espécies reativas de oxigénio (ROS), e consequentemente, o *stress* oxidativo e disfunção mitocondrial, levando ao colapso neuronal e ao declínio cognitivo. Adaptado de (Correia et al., 2012).

3.1.1. Via de Sinalização da Insulina

O IGF1 é uma hormona fundamentalmente produzida no fígado e excretada para a circulação sistémica. Para além disso, o IGF1 é também expresso pelas células epiteliais do CP na idade adulta, contribuindo desta forma para a excreção e manutenção do mesmo no CSF (Falcão et al., 2012).

A ligação do IGF1 ao seu recetor leva a alterações na conformação do recetor, expondo regiões com resíduos de tirosina que são rapidamente reconhecidas pelos domínios fosfo-tirosina das proteínas do substrato do recetor de insulina, nomeadamente o de tipo 1 (IRS1). O IRS1 é posteriormente fosforilado (IRS1p), resultando na ativação da via de sinalização da fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K) (Lizcano and Alessi, 2002; Saltiel and Kahn, 2001; Van Obberghen et al., 2001).

Deste modo, o IGF1 é fundamental na ativação de duas grandes vias de sinalização: a via de sinalização metabólica através da via da PI3K, que está envolvida em todos os processos do metabolismo da glucose onde ocorre intervenção da insulina, e na ativação da via mitogénica através das proteínas quinases ativadas por mitogénios (MAPK), envolvidas na biogénese mitocondrial, proliferação e diferenciação celular e na apoptose celular. (Gallagher and LeRoith, 2013). A ativação da via da insulina através do IGF1 regula negativamente vários fatores de transcrição que promovem a transcrição de enzimas antioxidantes, levando ao aumento de ROS intracelulares (Kuang et al., 2014). Estudos anteriores demonstraram que, aquando do aparecimento dos primeiros sinais da DA, ocorre uma diminuição dos níveis de IRS1 e um aumento significativo do IRS1p (Moloney et al., 2010).

4. Restrição Calórica

O consumo excessivo de calorias associado a um estilo de vida sedentário, muitas vezes ligado também à resistência à insulina, são fatores de risco associados à DA (Kapogiannis and Mattson, 2011; Xu et al., 2011), bem como a outras patologias nomeadamente diabetes *mellitus* e obesidade. Modelos animais de DA sujeitos a dietas altamente calóricas, mostraram um défice cognitivo e um agravamento desta doença associada à acumulação excessiva de A β (Julien et al., 2010; Takeda et al., 2010). No entanto, quando sujeitos a restrição calórica (RC), os défices cognitivos associados a esta patologia melhoraram significativamente (Halagappa et al., 2007; Kashiwaya et al., 2013; Patel et al., 2005).

A RC é alcançada quando ocorre uma redução em cerca 30-60% do consumo de compostos calóricos, quando comparada com o aporte de calorias *ad libitum*, sem que ocorram fenómenos de desnutrição (Ortiz-Bautista et al., 2013).

Atualmente tem vindo a ser descrita uma estratégia em que, sem intervenção genética, é possível prolongar o tempo médio de vida de um organismo. Os efeitos da RC foram já testados num grande número de organismos, desde organismos unicelulares como as leveduras (Choi et al., 2013; Lin et al., 2002), a organismos como ratos e primatas (Holloszy and Fontana, 2007). Os efeitos benéficos desta condição têm impacto na redução de doenças associadas ao envelhecimento, tendo sido registados decréscimos no risco de cancro, doenças neurodegenerativas, doenças autoimunes, doenças cardiovasculares (Speakman and Mitchell, 2011) e diminuição geral da morbilidade de populações idosas (Fujimoto and Yamasoba, 2014). Embora não sejam conhecidas detalhadamente as formas de ação da RC (Koubova and Guarente, 2003), existem cinco mecanismos que tentam explicar de que forma a RC exerce o seu efeito (Weindruch et al., 2002): 1) consegue diminuir o *stress* oxidativo de forma significativa (Zainal et al., 2000); 2) reduz a glicação e glioxidação (Kayo et al., 2001); 3) reduz a temperatura corporal e os níveis da hormona da tiroide associada ao estado hipometabólico (Kenyon, 2001); 4) altera a expressão de determinados genes e provoca a degradação de proteínas (Lee et al., 2000) e 5) provoca mudanças neuroendócrinas (Weindruch et al., 2001).

4.1. Biomarcadores de Restrição Calórica: PGC1 α e HSP105

Embora sejam conhecidos os efeitos da RC em modelos animais, tem-se procurado cada vez mais o uso de modelos *in vitro*, essencialmente com recurso a culturas de linhas celulares, de forma a facilitar e agilizar o estudo dos mecanismos moleculares subjacentes aos efeitos benéficos da RC (Li et al., 2010). Esses modelos *in vitro* baseiam-se na redução da glucose, o principal recurso calórico presente no meio de cultura celular (Li and Tollefsbol, 2011). A cultura celular é um sistema homogéneo que permite monitorizar mudanças quer ao nível molecular quer ao nível do crescimento celular bem como a dinâmica populacional das próprias células, de uma forma consistente sem que se verifiquem as flutuações metabólicas que ocorrem nos organismos *in vivo* (Li and Tollefsbol, 2013).

No cérebro dos mamíferos, há muito que é conhecido o papel que a glucose desempenha como principal fonte de energia (Howarth et al., 2012). O cérebro contribui apenas com 2% para a totalidade do peso corporal, mas consome cerca de 20% da glucose em circulação, fazendo dela a sua principal fonte de energia (Geijselaers et al., 2014; Mergenthaler et al., 2013). De forma análoga, as formulações de meios para cultura celular *in vitro*, de entre os quais o *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM), contêm glucose como o principal constituinte energético na sua composição, facilmente manipulável, permitindo mimetizar a RC *in vivo*, modulando as concentrações de glucose *in vitro*.

Em muitos estudos verificou-se a existência de determinados genes que invariavelmente têm a sua expressão aumentada ou diminuída durante a RC (Lee, 1999a) e, por isso, são considerados como biomarcadores dessa condição fisiológica em culturas celulares (Li and Tollefsbol, 2013).

De entre esses genes estão o *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha* (PGC1 α), que é regulado positivamente, e o gene da *heat shock protein 105* (HSP105), regulado negativamente (Lee, 1999a; Schilling et al., 2006), durante a RC.

O PGC1 α é um gene da família dos coativadores transcricionais dos recetores esteroides e nucleares, que desempenha um papel fundamental na regulação do metabolismo energético (Liang and Ward, 2006). A sua principal função é difundir e integrar sinais fisiológicos que influenciam o metabolismo, a diferenciação e crescimento celulares, a maquinaria de transcrição, controlando a capacidade funcional da mitocôndria (Scarpulla et al., 2012). Desta forma, o PGC1 α tem a capacidade de estimular a biogénese mitocondrial (Wu et al., 1999) e remover ROS (Gerhart-Hines et al., 2007; Kim et al., 2010), de ativar mecanismos termogénicos em resposta ao frio (Cannon et al., 1998), e de promover o racionamento da glucose para uso do SNC durante privações nutricionais, aumentando a oxidação de ácidos gordos e diminuindo o consumo de glucose (Herzig et al., 2001; Wu et al., 1999). Um estudo recente reportou que poderá haver uma relação direta entre os níveis de PGC1 α e A β , tendo-se concluído que o aumento da expressão de PGC1 α está relacionado com a diminuição da transcrição da enzima β -secretase 1 que cliva a APP, diminuindo a possibilidade de desenvolvimento de DA decorrente dessa clivagem e a concomitante deposição de A β (Wang et al., 2013).

As proteínas HSP são um grupo de proteínas produzidas em resposta ao *stress* fisiológico e ambiental, que previnem ou reparam a desnaturação proteica (Saito et al., 2007). Estas proteínas são classificadas em famílias consoante o seu peso molecular e função: a HSP105 pertence à família HSP105/110 de proteínas de 105 a 110 kDa, e existe sob as isoformas α e β que, associadas à HSP70 formam complexos efetores (Hylander et al., 2000; Yamagishi et al., 2011). Para além da sua atividade protetora/reparadora, a HSP105 tem também a capacidade de desagregar proteínas termo-agregadas, efeito tanto mais marcado quanto mais baixos os níveis de ATP (Yamagishi et al., 2003). Desta forma, é possível que durante a restrição moderada exista um decréscimo do nível de expressão génica de HSP105, e que durante uma RC mais severa os elevados níveis de *stress* promovam a expressão de HSP105 que, após tradução, se ligam ao complexo HSP70 e tentam contrariar o forte *stress* induzido pela falta de nutrientes.

5. Objetivo

Mediante os vários estudos que reportam um efeito importante da restrição calórica na progressão de doenças neurodegenerativas, nomeadamente da doença de Alzheimer, o objetivo deste trabalho é avaliar se a restrição de glucose *in vitro* na linha celular Z310 é capaz de modular os níveis de *stress* oxidativo a biogénese mitocondrial, bem como a inibição da apoptose e, conseqüentemente, se estas alterações possam promover a capacidade de *clearance* do péptido B-amiloide.

II. Material e Métodos

1. Linha Celular Z310

De forma a poder estudar o CP e os seus processos fisiológicos, farmacológicos e toxicológicos, foram introduzidas metodologias que permitiram replicar este tipo de tecido *in vitro*: as culturas primárias de células epiteliais de plexo coroide (CPEC), e uma linha celular de CP imortalizada denominada Z310 (Monnot and Zheng, 2013), como referido anteriormente.

1.1. Cultura celular

Uma alíquota de células Z310 foi retirada do congelador a -80°C e descongelada em banho-maria a 37°C . De seguida, as células foram lavadas em meio DMEM (Sigma-Aldrich) contendo 10% de soro fetal bovino (FBS), 1% de penicilina-estreptomicina, e centrifugadas a 1300 rpm durante 3 minutos. As células foram ressuspensas em 1 mL de meio completo e adicionadas a um frasco de cultura de 25 cm^2 contendo 3 mL de meio completo, e deixadas a crescer numa estufa Air Jacketed Incubator (NuAire) a 37°C numa atmosfera de 5% CO_2 .

1.2. Passagem Celular

Sempre que a confluência celular atingiu cerca de 90% da área de crescimento do frasco de cultura, procedeu-se à passagem celular, processo que possibilita a diminuição da densidade celular, permitindo a manutenção e expansão da linha celular Z310. O processo iniciou-se com uma lavagem das células com tampão fosfato salino (PBS), de forma a remover restos celulares e meio de cultura. De seguida, aspirou-se o PBS e adicionou-se tripsina-EDTA 0,25% e colocou-se o frasco na estufa a 37°C . De forma a parar a ação da tripsina, foi adicionado igual volume de meio completo ao frasco, e as células foram centrifugadas durante 3 minutos a 1300 rpm. O sobrenadante foi descartado e ressuspendeu-se o precipitado em PBS, tendo-se centrifugado novamente. As células foram finalmente ressuspensas num volume adequado de meio de cultura completo para um novo frasco de cultura e colocadas na incubadora a 37°C numa atmosfera de 5% CO_2 .

1.3. Restrição de Glucose *in vitro*

Antes de induzir RC as células foram semeadas como descrito no ponto 1.1., em placas de cultura numa concentração aproximada de 2×10^5 células por mL de meio e deixadas a crescer numa estufa Air Jacketed Incubator (NuAire) a 37°C numa atmosfera de 5% CO_2 durante 48 horas. Posteriormente foram preparados meios de restrição com diferentes concentrações de glucose, adicionando 4.5, 3, 1.5, 0.7, 0.4, 0.2 e 0.1 g de glucose (Sigma-Aldrich) por litro de meio completo DMEM sem glucose e sem piruvato (Sigma-Aldrich). Findas as 48 horas, o meio das placas de cultura foi substituído pelos diferentes meios de restrição e as células

incubadas durante 24, 48, 72 ou 96 horas, na estufa, a 37°C numa atmosfera de 5% CO₂, sem renovação de meio de cultura, até que se procedeu à contagem e determinação da viabilidade celulares.

1.4. Estímulo com β -amiloide

Com o propósito de saber se a RC influenciava a remoção de A β , o estímulo das células Z310 com A β foi sempre induzido após a RC *in vitro*. Desta forma, as células foram semeadas como descrito no ponto 1.1, induziu-se a RC como descrito no ponto 1.3 e de seguida foram adicionados 3 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de A β_{1-42} (AnaSpec) ao meio de cultura durante 24 horas, recolhendo-se depois as células ou o meio para posterior análise.

1.5. Contagem Celular

As contagens celulares foram efetuadas sempre que o tempo de restrição desejado foi atingido, ou ainda quando a confluência das células no suporte de crescimento atingiu cerca de 90%. As células foram tripsinizadas e mantidas em suspensão em meio completo para inativar a tripsina. Retiraram-se depois 20 μL da ressuspensão, adicionou-se igual volume de azul tripano e homogeneizou-se. Do homogeneizado, 20 μL foram pipetados e colocados numa câmara de *Neubauer*. Contaram-se as células viáveis nos diferentes quadrantes e estimou-se o número de células por mL e o número total de células através das seguintes fórmulas:

$$n^{\circ} \text{ Células } \cdot \text{mL}^{-1} = \text{Média de células dos quadrantes} / 2 \times 10^4$$

$$n^{\circ} \text{ Total Células} = n^{\circ} \text{ Células } \cdot \text{mL}^{-1} \times \text{Volume da ressuspensão celular}$$

1.6. Viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada pelo método de exclusão do azul tripano. Resumidamente, contam-se as células viáveis de aspeto translúcido (como descrito no ponto 1.5.) e as células inviáveis de coloração azul, fazendo-se depois o rácio entre as viáveis e o total de células contadas. Após cada tempo de restrição (24, 48, 76 e 92 horas), as células viáveis e inviáveis em cada meio de restrição de glucose (4.5, 3, 1.5, 0.7, 0.4, 0.2, 0.1 e 0 g de glucose) foram contabilizadas e a viabilidade calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{n^{\circ} \text{ células vivas}}{n^{\circ} \text{ células vivas} + n^{\circ} \text{ células mortas}} \times 100$$

2. RNA Total

2.1. Extração de RNA Total

O RNA total foi obtido da linha celular Z310. Após descartar o meio de cultura, adicionou-se TRIzol[®] Reagent (NZYTech) de acordo com as instruções do fabricante (1 mL TRIzol/10 cm²) e, com a ajuda de um raspador de células, recolheram-se as células, homogeneizando com o TRIzol. O conteúdo do frasco de cultura foi recolhido para um tubo *ependorf* e incubou-se 5 minutos à temperatura ambiente. De seguida, adicionaram-se 200 µL/mL de clorofórmio, homogeneizou-se por inversão e incubou-se à temperatura ambiente por 10 minutos. Procedeu-se a uma centrifugação a 4°C durante 15 minutos a 12000 g, tendo-se obtido três fases distintas. Recolheu-se a fase aquosa transparente para um novo *ependorf* e precipitou-se o RNA usando 500 µL de isopropanol/mL TRIzol, seguido de incubação durante 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugação por 10 minutos a 4°C e 12000 g. O sobrenadante foi rejeitado e o RNA recolhido sob forma de precipitado branco, sendo lavado duas vezes com 500 µL de etanol 75% em água DEPC (*Diethylpyrocarbonate*), seguido de centrifugação a 4°C durante 5 minutos a 7500 g, rejeitando-se o sobrenadante. Sem deixar secar o precipitado, retirou-se o excedente de etanol e hidratou-se o precipitado de RNA em 10 µL de água DEPC. Sempre que o RNA total não foi usado de imediato, armazenou-se a -80°C.

2.2. Tratamento com DNase I

O *real-time* PCR é uma técnica quantitativa bastante sensível na qual contaminações podem interferir com as eficiências das reações e resultar em dados erróneos. Assim, de forma a evitar qualquer tipo de contaminações com DNA genómico, o RNA extraído da linha celular Z310 foi submetido a tratamento com DNase I (Sigma). Resumidamente, adicionaram-se 1000 ng de RNA a um tubo de PCR, 1 µL de *buffer* 10x e 2 µL de DNase I. De seguida, perpez-se o restante volume até 10 µL e incubou-se 30 minutos a 37°C, e adicionou-se 1 µL de *stop solution* para ligar os iões de cálcio e magnésio e inativar a DNase I. Finalmente, os tubos foram incubados 10 minutos a 70°C para desnaturar a enzima e o RNA, e arrefecidos em gelo para uso imediato ou armazenados a -80°C para posterior utilização.

2.3. Integridade do RNA Total

Após a extração e tratamento do RNA total com DNase I (Thermo Scientific), procedeu-se à determinação da integridade do RNA recorrendo à eletroforese das amostras em gel de agarose 1.5% em tampão TAE 1x diluído em água DEPC e corado com *GreenSafe* (NZYTech). A integridade foi avaliada pela observação das bandas num transiluminador (UVITEC).

3. Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA recorreu-se à transcrição reversa do RNA em cDNA efetuada pela enzima transcriptase reversa M-MuLV (NZYTech), e para isso prepararam-se duas “mixes”. A primeira *mix* foi constituída por 2 μ L de *random primers* e 1 μ L de dNTPs (volumes para n+1 reações). Adicionaram-se 500 ng de RNA total a 3 μ L da *mix1* a cada tubo PCR e perpez-se com água estéril até um volume total de 17 μ L. Visto que a concentração de RNA varia entre cada amostra, a quantidade de água a adicionar deve ser sempre calculada tendo em conta um volume total de água + RNA = 14 μ L. De seguida, os tubos foram colocados num termociclador (Labnet MultiGene Optimax) a 65°C durante 5 minutos, seguido de arrefecimento em gelo durante 1 minuto. Procedeu-se então à preparação da *mix2*, juntando 2 μ L de *buffer* 10x num *eppendorf*, 1 μ L (200U) de M-MuLV (volumes para n+1 reações). Da *mix2* foram retirados 3 μ L e adicionados a cada tubo PCR contendo a *mix1*, homogeneizando suavemente e levando a incubar no termociclador numa sequência de 10 minutos a 25°C, 50 minutos a 37°C e por fim parou-se a reação colocando os tubos PCR a 70°C durante 15 minutos. Sempre que o cDNA não foi usado de imediato armazenou-se a -20°C.

4. RT-PCR

Para confirmar a expressão dos genes dos transportadores de glucose 1 e 4 (Glut1 e Glut4), substrato do recetor de insulina 1 (IRS1), *insulin-like growth factor type 1* (IGF1), *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha* (PGC1 α) e *heat shock protein 105* (HSP105) na linha celular Z310, recorreu-se à amplificação enzimática de cDNA com *primers* específicos para cada um dos genes de interesse através da técnica *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR). Os *primers* para cada gene foram desenhados no programa *Primer-Blast-NCBI-NIH* (Tabela 2). Para proceder à amplificação usou-se a enzima Taq DNA polimerase (NZYTech), segundo as recomendações do fabricante. Resumidamente, por cada reação fez-se uma *mix* contendo 2,5 μ L de *buffer* 10x, 2 μ L de MgCl₂ (50 mM), 1 μ L de dNTPs (10 mM), 0.2 μ L de Taq polimerase, 0.3 μ L de *forward primer*, 0.3 μ L de *reverse primer* relativos a cada gene, e água estéril até perfazer um volume final de 23.5 μ L para a *mix* do gene IRS1 e 23 μ L para as *mixes* dos genes Glut1, Glut4, PGC1 α , IGF1 e HSP105. Finalmente, à *mix* do IRS1 foram adicionados 1.5 μ L de cDNA e 2 μ L às *mixes* do Glut1, PGC1 α , HSP105, Glut4 e IGF1. No controlo negativo foi adicionado igual volume de água estéril em vez do cDNA. Os tubos PCR foram colocados no termociclador e os ciclos de amplificação programados. Primeiramente, as amostras foram desnaturadas a 95°C durante 5 minutos, seguiram-se 40 ciclos nos quais foram expostas a 95°C durante 30 segundos de forma a desnaturar o DNA, seguidas da temperatura ótima de emparelhamento de cada *primer* durante 45 segundos de forma a ocorrer a ligação do *primer* ao DNA, 72°C durante 30 segundos para que ocorra polimerização, e finalmente foram expostas a 72°C durante 5

minutos. A separação dos produtos de PCR foi efetuada por eletroforese em gel de agarose 1.5% em TAE na presença de *GreenSafe*. Para que se tornasse mais fácil a deposição dos produtos nos poços do gel, 8 µL dos produtos de amplificação foram homogeneizados com 1.5 µL de *loading buffer* 10x e a totalidade do volume foi depositada no poço. Os produtos foram depois visualizados no transiluminador. Para confirmar a especificidade do produto obtido, uma alíquota dos produtos amplificados foram sequenciados pela empresa StabVida e posteriormente alinhados na base de dados NCBI-BLAST (<http://blast.st-va.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), tendo sido aceites como produtos de amplificação específicos todos aqueles em que o nível de homologia entre as sequências estudadas foi superior a 97%.

Tabela 2 - Sequências dos *primers* dos genes do perfil metabólico e biomarcadores de restrição.

Genes	Sequência dos <i>primers</i>	Tamanho do fragmento (pb)	Temperatura ótima de emparelhamento (°C)
Glut1	FW 5- GATGATGAACCTGTTGGCCT -3	233	56
	RV 5- CGAACACCTGGGCAATAAGG -3		
IRS1	FW 5- GGTGGCAGTGAGGATGTGAA -3	242	57
	RV 5- CTGCCTAAGGGTTGGTGAGG -3		
PGC-1α	FW 5- CAGTCAAGCTGTTTTGACGAC -3	232	58
	RV 5- CGGAGAGTTAAAGGAAGAGCAA -3		
HSP 105	FW 5- GTGTCTGCCTGTGCTTTTAAACAA -3	101	55
	RV 5- TGCTCTACGAGCTTCTCGTCAA -3		
IGF1	FW 5- GCATTGTGGATGAGTGTTGC -3	202	54
	RV 5- GGCTCCTCTACATTCTGTA -3		
Glut4	FW 5- TTTCCAGTATGTTGCGGATG -3	220	54
	RV 5- TCAGTCATTCTCATCTGGCC -3		

5. Real-Time PCR

O *real-time* PCR permitiu quantificar a expressão relativa de dois genes considerados biomarcadores de RC: os transcritos do PGC1α, regulados positivamente com estabelecimento da RC, e os transcritos da HSP105, regulados negativamente com a diminuição do impacto da RC no meio de cultura.

Para cada um dos genes foi verificada a eficiência dos *primers* através de uma curva de eficiência usando 4 diluições de cDNA - *stock*, 1:2, 1:4 e 1:8 - e água estéril como controlo negativo. Cada ensaio foi efetuado em duplicado. No final do *real-time* PCR, analisaram-se as curvas de *melting* relativamente aos produtos amplificados bem como a possibilidade de formação de dímeros. O gene da ciclofilina A (*CycA*) foi utilizado como controlo endógeno para normalizar os níveis de expressão dos genes biomarcadores de RC. De forma a ser

exequível a análise da quantidade relativa dos transcritos para cada um dos genes durante a RC das células Z310, o cDNA foi diluído 1:3, permitindo que a quantidade de mRNA se encontre entre as quantidades de mRNA determinadas na eficiência da reação.

Para cada reação da CycA e HSP105 adicionaram-se 10 μ L de SYBR[®]Green (Fermentas) e 9 μ L (no caso de PGC1 α), 0.8 μ L de *forward primer* e 0.8 μ L de *reverse primer* diluídos 1:20, e perpez-se com água estéril para um volume total de 19 μ L. Finalmente adicionou-se 1 μ L de cDNA para CycA e HSP105 e 2 μ L de cDNA para PGC1 α nas concentrações acima mencionadas. O termociclador IQ[™]5 (Biorad) foi programado para usar as seguintes condições de amplificação: 95°C durante 3 minutos, 40 ciclos de 95°C durante 10 segundos, 58°C de temperatura de emparelhamento para a CycA e PGC1 α e 60°C para o HSP105 durante 45 segundos, e 72°C durante 10 segundos. A análise e tratamento dos dados foram feitos segundo o método de Pfaffl (Pfaffl, 2001) tendo em conta as eficiências dos *primers*. Este método permite que a expressão relativa de cada um dos genes em estudo seja calculada com base na razão entre a eficiência de amplificação e o desvio do ponto de cruzamento das amostras em análise e das amostras controlo, e normalizadas em relação ao gene de referência: o gene da CycA.

6. Western Blot

O *Western Blot* permitiu separar, por peso molecular, proteínas desnaturadas e detetar a expressão do péptido AB₁₋₄₂.

6.1. Preparação das proteínas

Depois das células serem semeadas, induzidas a RC nas concentrações de 4.5, 1.5, e 0.7 gL⁻¹ de glucose, e estimuladas com AB₁₋₄₂ (metodologia descrita em 1.1, 1.3 e 1.4 respetivamente), recolheu-se o meio, fez-se um *vortex* e pipetou-se 30 μ L desse meio e incubou-se durante 60 minutos a 37°C com 10 μ L de *loading buffer* contendo 10% de SDS, 6 % de mercaptoetanol, 30% de glicerol, 0.05% de *Coomassie Blue* e 150 mM de Tris-HCl.

6.2. Eletroforese

Para a deteção do péptido AB₁₋₄₂, polimerizou-se um gel constituído por três fases: um gel de 16% de acrilamida, seguido de um gel intermédio de 10% de acrilamida e sobre estes, um gel de deposição com 4% de acrilamida, usando o sistema OmniPAGE mini (Cleaver).

O gel de 16% de acrilamida foi composto por 10 ml de acrilamida (Biorad), 10 ml de tampão de gel (3 M de tris 1M de HCl 0.3% de SDS pH 8.45), 3 g de glicerol, 100 μ L de persulfato de amónio a 10 % (PSA), 10 μ L de tetrametiletlenodiamina (TMED) e perpez-se com água destilada para um volume final de 30 mL. O gel de 10% de acrilamida foi elaborado com 6 ml de acrilamida (Biorad), 10 ml de tampão de gel (3 M de Tris 1M de HCl 0.3% de SDS pH 8.45), 100 μ L de PSA (10%), 10 μ L de TMED e perpez-se com água destilada para um volume final de

30 mL. Finalmente o gel de 4% de acrilamida foi constituído por 1 ml de acrilamida (Biorad), 3 ml de tampão de gel, 90 µL de PSA (10%), 9 µL de TMED e perpez-se com água destilada para um volume final de 12 mL.

Para uma separação adequada da amostra proteica no gel de eletroforese, foram necessários dois tipos de tampões de eletroforese: o tampão do ânodo constituído por 0.1 M de Tris, 0.023 M de HCl (pH 8.9) e o tampão do cátodo constituído por 0.1 M de Tris, 0.1 M de Tricina 1% de SDS sem correção de pH.

Os 40 µL de proteína incubada com *loading buffer* foram depositados nos poços do gel de eletroforese. Inicialmente aplicou-se uma voltagem de 30 volts durante 1 hora permitindo que as proteínas percorressem o gel de deposição e se encontrassem todas ao mesmo nível quando chegassem ao gel intermédio, nessa altura aumentou-se a voltagem para 200 volts durante 50 minutos até a frente de corrida se aproximar do fim do gel.

6.3. Eletrotransferência

Antes de iniciar o processo de eletrotransferência, as membranas PVDF foram ativadas em metanol 100%, posteriormente hidratadas em água destilada e equilibradas em tampão de transferência. A “sandwich” de papel absorvente, gel de eletroforese, membrana de PDVF papel absorvente, foi montada e colocada na tina de eletrotransferência (Biorad) contendo tampão de transferência durante 2 horas a uma amperagem constante de 0.75 amperes.

6.4. Imunodeteção do péptido Aβ1-42

Depois da eletrotransferência, as membranas de PDVF foram bloqueadas em solução de bloqueio (5% de leite magro em pó em TBS) durante 2 horas, seguiu-se uma lavagem com TBS-T 0.1%. Posteriormente a membrana foi incubada com o anticorpo primário anti Aβ (Sigma-Aldrich) diluído em TBS-T 0.1% na proporção 1:700, *overnight* a 4°C. Foram efetuadas 3 lavagens das membranas 15 minutos cada com TBS-T 0.1%, e incubadas com o anticorpo secundário *anti-mouse* diluído 1:20000 em TBS-T 0.1%. Foram efetuadas 3 novas lavagens das membranas 15 minutos cada com TBS-T 0.1%. De seguida, com o auxílio de uma pipeta, gotejou-se sobre uma superfície lisa 200 µL de ECF e sobre este colocou-se a membrana durante 3 minutos. Finalmente a membrana foi revelada usando o sistema de deteção de fluorescência (Biorad Molecular Imager FX). As imagens foram posteriormente tratadas usando a ferramenta de medição da intensidade de bandas do programa ImageJ.

7. Imunocitoquímica

As células Z310 foram semeadas em lamelas de vidro e colocadas em placas de 12 poços contendo aproximadamente 20000 células/poço. O crescimento realizou-se durante 48 horas numa estufa a 37°C em atmosfera de 5% CO₂. De seguida, as lamelas foram lavadas com PBS e procedeu-se à permeabilização com paraformaldeído (PFA) 4% durante 10 minutos à temperatura ambiente. Efetuaram-se novas lavagens com PBS e incubaram-se com Triton X-100 0.1% em PBS durante 5 minutos à temperatura ambiente, lavaram-se com PBS e incubaram-se com solução de bloqueio (PBS-Tween 0.1% e 20% FBS) durante 1 hora e 30 minutos à temperatura ambiente. As lamelas foram lavadas novamente com PBS-Tween 0.1% (PBS-T) e de seguida foram retiradas dos poços e colocadas sob a tampa da placa, com o lado das células virado para cima. Procedeu-se então à incubação *overnight* a 4°C com os anticorpos primários diluídos em solução de diluição de anticorpos: Glut1 (Santa Cruz) e Glut4 (Santa Cruz) diluídos 1:75; IRS1 (Santa Cruz), IRS1p (Santa Cruz) e IGF1 (Santa Cruz) diluídos 1:125; caspase 3 (Santa Cruz) diluído 1:250; citocromo c oxidase IV (Santa Cruz) diluído 1:50; e AB (Sigma) diluído 1:1000. Seguiu-se uma lavagem prolongada de 6 vezes com PBS-T 0,1%. Posteriormente procedeu-se à incubação com anticorpo secundário Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit (Invitrogen) diluído 1:1000 na solução de anticorpos durante 1 hora no escuro, e com SantaCruz Fluor 488 donkey anti-goat numa diluição 1:200 durante 1 hora no escuro para o anticorpo primário IRS1p. Finalmente as lamelas foram lavadas em PBS-T 0.1% e incubadas durante 10 minutos à temperatura ambiente e ao escuro com Hoechst 33342 diluído 1:1000. As lamelas foram depois montadas em lâminas sobre o meio de montagem *Entellan*. Após secagem, as lamelas foram seladas com verniz e armazenadas a -20°C protegidas da luz, até posterior observação no microscópio confocal LSM70 (Zeiss).

8. Ensaio TUNEL

O ensaio *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling* (TUNEL) permitiu avaliar o nível de fragmentação de DNA nuclear resultante da ação da cascata apoptótica. Durante a apoptose, a cromatina é clivada em múltiplos oligonucleossomas expondo terminações 3'-hidroxil do DNA, onde se vão ligar as moléculas de dUTP (marcadoras) corando os núcleos onde existe a presença de DNA fragmentado (Loo, 2011).

Sucintamente, as células Z310 que estiveram em restrição durante 48 horas, com diferentes concentrações de glucose de 4.5, 1.5 e 0.7 gL⁻¹ foram fixadas em PFA 4% durante 1 hora, foram lavadas com PBS e incubadas com solução de permeabilização durante 2 minutos e depois lavou-se com PBS. Posteriormente as células foram incubadas 1 hora com uma *label solution* para marcar o DNA fragmentado, e reveladas durante 1 hora usando uma *reaction mixture* contendo um marcador que emite fluorescência verde na presença de DNA fragmentado. O controlo positivo foi obtido incubando as células com DNase I logo após a

permeabilização. Finalmente, as lamelas foram montadas em meio de montagem *Entellan* e observadas no microscópio confocal LSM70 (Zeiss).

9. Produção de Espécies Reativas de Oxigênio

A técnica de detecção de produção de ROS, através da utilização do composto 2',7'-diclorodihidro-fluoresceína diacetato (DCFH-DA), permitiu avaliar de forma quantitativa a produção de ROS pelas células Z310 em restrição calórica, na presença ou ausência de AB.

As células Z310 foram submetidas a dois tipos de estímulos: o primeiro, a restrição durante 48 horas, com diferentes concentrações de glucose de 4.5, 1.5 e 0.7 gL⁻¹; o segundo, a incubação das células Z310 durante 24 horas com 3 µg.ml⁻¹ de AB. Em paralelo, células foram sujeitas apenas ao primeiro estímulo - de RC - e que serviram como controlo negativo do ensaio. Os dois grupos de células foram depois incubados 10 minutos com o DCFH-DA, que entra livremente nas células e é posteriormente oxidado pela produção de ROS, emitindo fluorescência verde. Os núcleos foram marcados com Hoechst 33342, emitindo fluorescência azul. As células foram posteriormente observadas num microscópio confocal LSM70 e a quantificação da produção de ROS foi feita recorrendo ao *software ZEN Blue edition* (Zeiss).

10. Produção Mitocondrial de Espécies Superóxido

O MitoSOX™ (Invitrogen) é um reagente que permeia células vivas, e que é altamente seletivo para iões superóxido produzidos pelas mitocôndrias. Uma vez na mitocôndria, o MitoSOX™ é oxidado pelos iões superóxido mitocondriais, emitindo fluorescência vermelha.

Para se efetuar a marcação com MitoSOX™ procedeu-se como recomendado pelo fabricante. Resumidamente, diluiu-se 5 mM de MitoSOX™ em tampão *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS). As células, que foram mantidas durante 48 horas com diferentes concentrações de glucose de 4.5, 1.5 e 0.7 gL⁻¹ em *µ-Slide 4 well* (Ibidi), foram de seguida cobertas com o MitoSOX™, e incubadas durante 10 minutos. Depois foram lavadas com tampão HBSS, coradas com Hoechst 33342 e novamente lavadas. As células vivas (*live imaging*) foram posteriormente observadas no microscópio confocal LSM70 com incubadora (de modo a manter a temperatura a 37°C e 5% CO₂). A quantificação da respetiva fluorescência emitida foi realizada recorrendo ao *software ZEN Blue edition*.

11. Análise Estatística

Todos os dados alvo de tratamento estatístico estão representados como média \pm erro padrão da média (S.E.M.) e com um $n \geq 3$, de forma a que pudessem ser considerados estatisticamente significativos. Na análise estatística foi usado o método *student t-test* simples desemparelhado. Foram considerados resultados estatisticamente significativos sempre que o *p-value* < 0.05 . A análise estatística foi realizada usando o *software* Prism6 (GraphPad).

**Restrição de Glucose na Linha Celular do Plexo Coroide de Rato (Células Z310):
Efeito na Remoção do Péptido B-amiloide**

III. Resultados

1. Restrição Calórica

A determinação da concentração de glucose ótima para estabelecimento da RC e subsequentes estímulos foi um dos pontos cruciais para determinar a criação das condições de cultura adequadas ao crescimento das células, de tal modo que o crescimento e viabilidade celulares não estivessem comprometidos, nem que a RC fosse tão pouco pronunciada que não conduzisse à ativação dos mecanismos moleculares de proteção contra a própria falta de glucose. Por outro lado, o nível de RC devia aproximar-se o mais possível dos níveis fisiológicos de glucose, e níveis abaixo de 400 mgL^{-1} são considerados como hipoglicemia grave (Cryer et al., 2009). Embora seja possível a manutenção de células neste baixo nível de glucose, a mesma não é desejada, e quaisquer conclusões tiradas a partir daí não seriam ajustadas à realidade fisiológica do organismo.

1.1. Crescimento e Viabilidade Celulares em Restrição Calórica

De forma a atingir as condições ideais de RC, foi importante definir a dinâmica do crescimento e viabilidade celulares, encontrando um ponto em que haja um compromisso entre a manutenção de um número constante de células em cultura ao longo do tempo e o início mais pronunciado da perda de viabilidade celular. O número de células mantidas em níveis de glucose relativamente elevados de 4.5 e 3 gL^{-1} aumenta exponencialmente até às 72 horas, momento a partir do qual ocorre um decréscimo. No entanto, para as concentrações intermédias de glucose - 1.5 e 0.7 gL^{-1} - o número de células contadas manteve-se relativamente estável até às 72 horas, sendo que as células mantidas a 0.7 gL^{-1} de glucose mantiveram o seu número relativamente estável até mesmo depois de 96 horas de RC. As concentrações mais baixas de glucose - 0.4 , 0.2 , 0.1 e 0 gL^{-1} - apenas permitiram um crescimento celular muito residual, cujo número de células diminuiu depois de 48 horas de RC (Figuras 5 e 6).

**Restrição de Glucose na Linha Celular do Plexo Coroide de Rato (Células Z310):
Efeito na Remoção do Péptido β -amiloide**

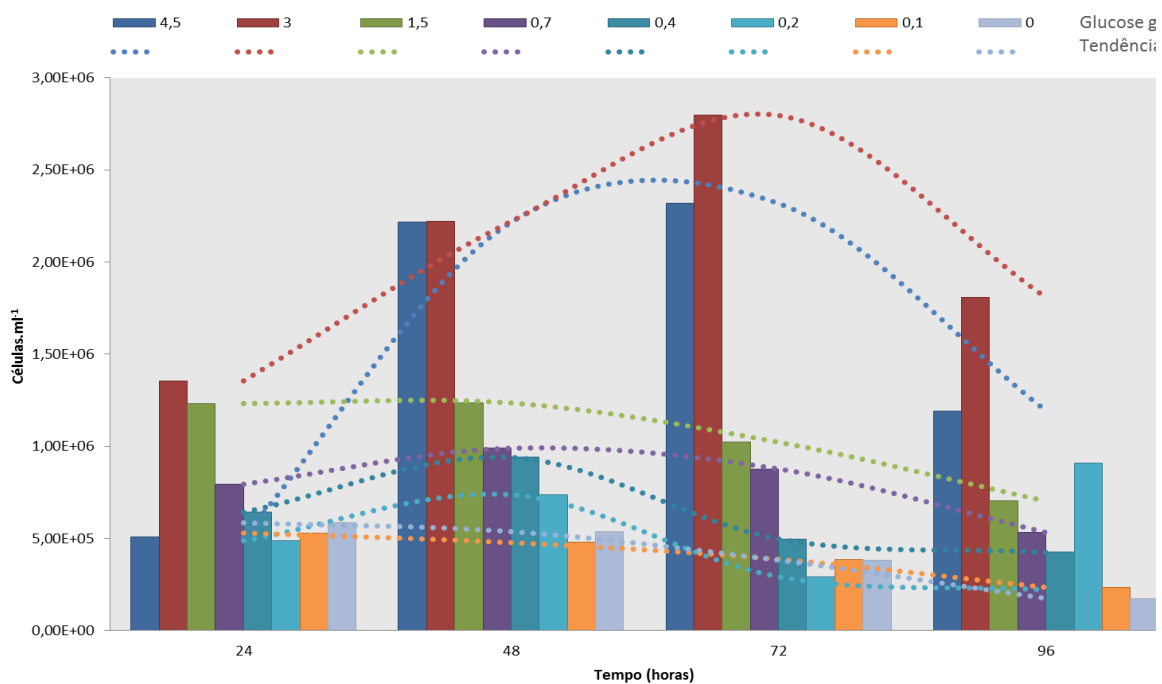


Figura 5- Crescimento celular. Variação do número de células em função da concentração de glucose no meio (4.5, 3, 1.5, 0.7, 0.4, 0.2, 0.1 ou 0 gL⁻¹), e o tempo de restrição de 24, 48, 72 ou 96 horas.

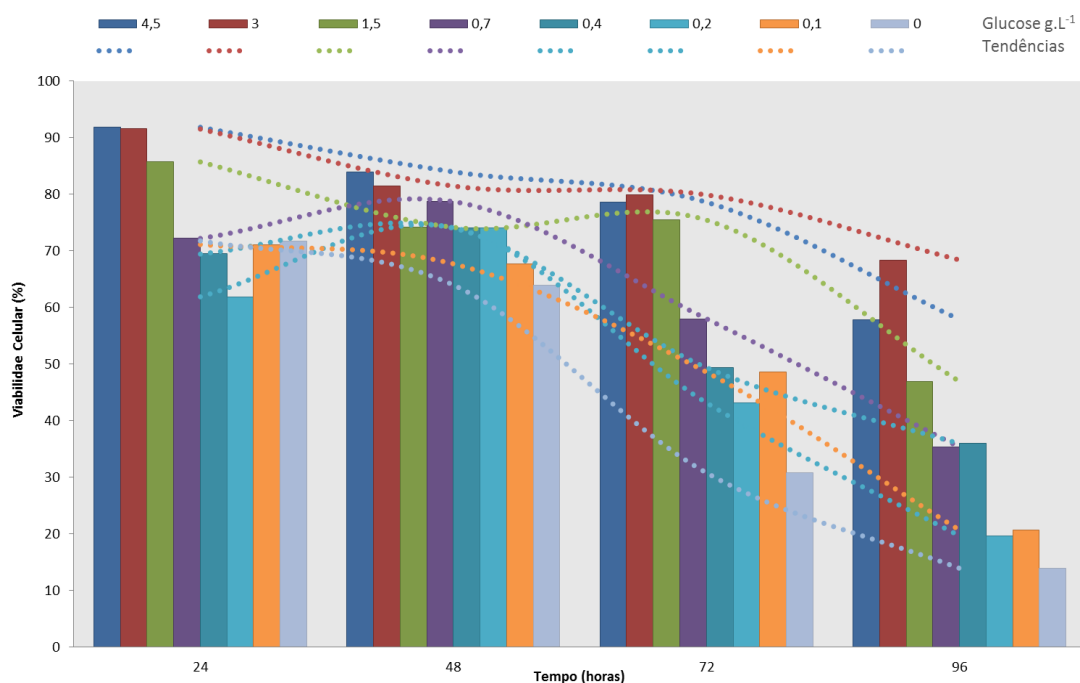


Figura 6 - Viabilidade celular. O gráfico representa a percentagem resultante da contagem do número de células vivas pelo número total de células após 24, 48, 72 ou 96 horas em cada concentração de glucose no meio de cultura: 4.5, 3, 1.5, 0.7, 0.4, 0.2, 0.1 ou 0 gL⁻¹.

2. Perfil Metabólico da Linha Celular Z310

A avaliação do perfil metabólico das células Z310 permitiu validar a existência de mecanismos moleculares inerentes ao metabolismo da glucose. Para tal, recorreu-se à análise de vários genes, de entre os quais os genes associados ao transporte facilitado de glucose, Glut1 e Glut4, os genes ligados à via de sinalização da insulina, IGF1 e IRS1, e dois outros genes biomarcadores de restrição calórica, PGC1 α e HSP105, cujos níveis de expressão se encontram alterados quando as células estão privadas de nutrientes, nomeadamente da glucose.

2.1. Integridade do RNA Total

A integridade foi avaliada pela presença de duas bandas de RNA ribossomal (rRNA): 18s e 28s em que a intensidade da banda de 28s deve ser duas vezes mais intensa que a de 18s (Figura 7A). Quando a banda de 28s é mais intensa que a de 18s (Figura 7B), o RNA poderá não estar completamente degradado mas a sua qualidade poderá estar afetada devido a uma possível contaminação ou formação de estruturas terciárias indesejáveis. Quando não é perceptível a proporção 28s:18s e ocorre arrastamento (Figura 7C), o RNA encontra-se degradado, muito possivelmente por contaminação com RNase, não sendo utilizado posteriormente.

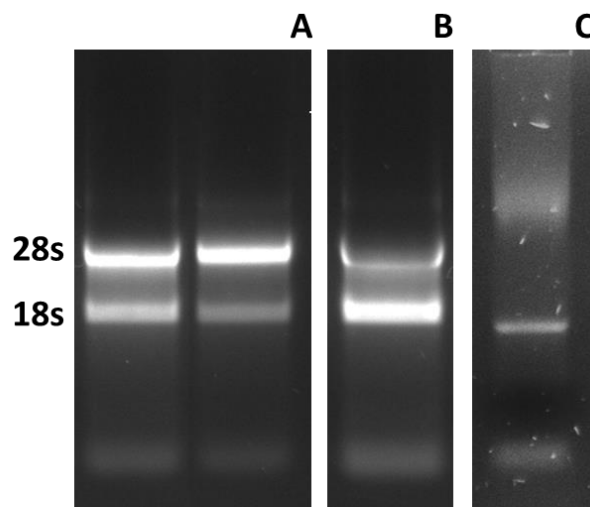


Figura 7 - RNA íntegro versus RNA degradado. O RNA total foi corrido num gel de agarose 1.5% em TAE 1x diluído em água DEPC. (A) O dobro da intensidade das bandas 28s face às bandas 18s é claramente visível, sinal de RNA íntegro. (B) A alteração da proporção 28s:18s indica RNA de fraca qualidade. (C) Eletroforese com arrastamento representativa de degradação do RNA.

2.2. Expressão dos Genes do Perfil Metabólico da Linha Celular Z310

O RT-PCR permitiu confirmar quais dos genes em estudo ligados ao metabolismo da glucose são expressos na linha celular Z310 em DMEM contendo 4.5 gL^{-1} glucose. Os genes relacionados com o metabolismo da glucose Glut1, Glut4, IGF1, IRS, HSP105, e PGC1 α foram amplificados com *primers* específicos que emparelham em sequências específicas do cDNA, amplificando em progressão geométrica a sequência nucleotídica característica desse mesmo gene que, no final da reação, se encontrará em concentração suficiente para ser visto, corrido num gel de agarose e visualizado num transiluminador.

Desta forma, os produtos amplificados por PCR foram depositados e separados num gel de agarose e, quando comparadas as bandas amplificadas dos produtos de PCR, com o marcador de peso molecular HyperLadder II (Bioline), confirmou-se que cada um dos fragmentos obtidos tinha o tamanho esperado. A figura 8A representa o produto de amplificação do gene Glut1 com um tamanho de 233 pb; a figura 8B representa o produto de amplificação do gene Glut4 com um tamanho de 220 pb; a figura 8C representa o produto de amplificação do gene IGF1 com um tamanho de 202 pb; a figura 8D representa o produto de amplificação do gene HSP105 com um tamanho de 101 pb; o fragmento da figura 8E é caracterizado pelos 232 pb e corresponde ao PGC1 α ; e finalmente com um tamanho de 242 pb o fragmento da figura 8F diz respeito ao gene IRS1.

Após sequenciação pela StabVida dos produtos amplificados, as sequências foram alinhadas através do programa NCBI-BLAST. Após o alinhamento, o mínimo de homologia que se obteve entre a sequência estudada e a base de dados foi de 97%.

Restrição de Glucose na Linha Celular do Plexo Coroide de Rato (Células Z310):
Efeito na Remoção do Péptido B-amiloide

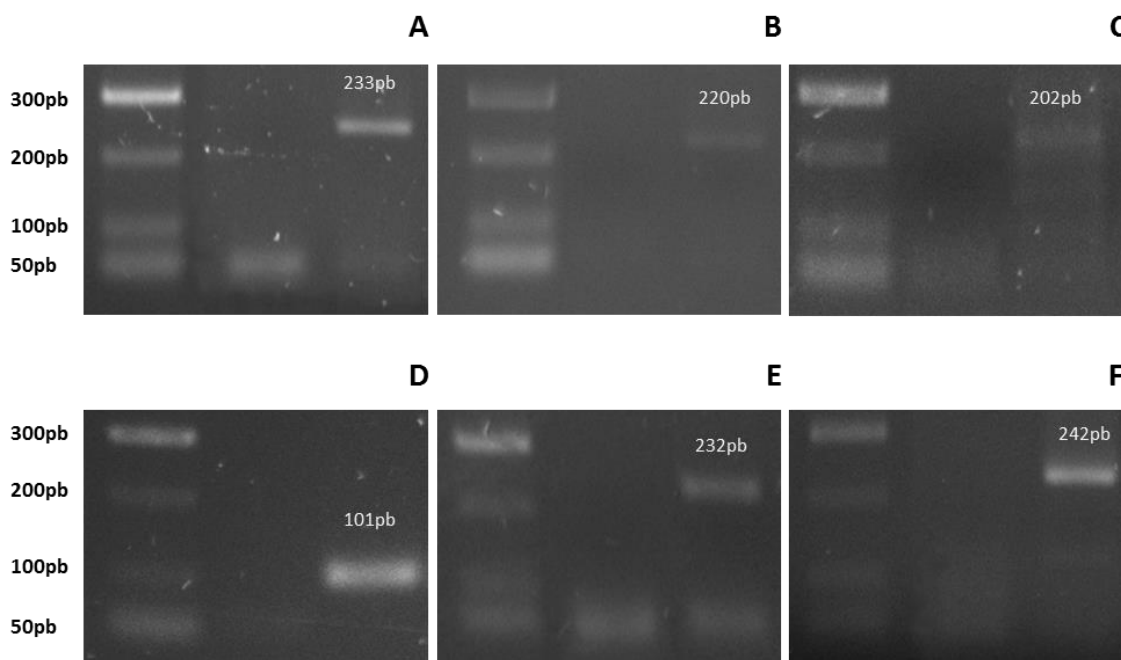
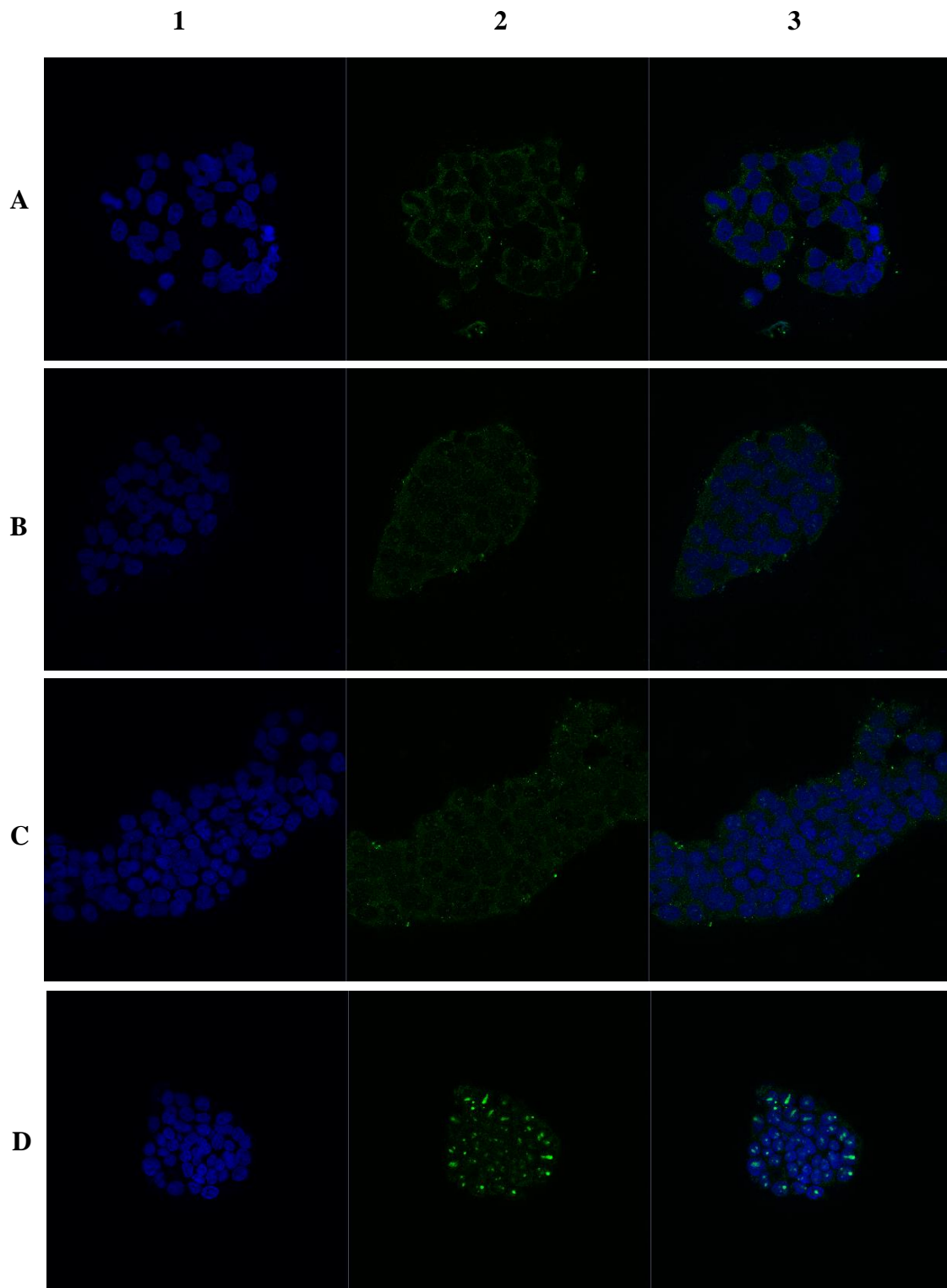


Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose 1.5% dos produtos de PCR dos genes do metabolismo da glucose em células Z310. Em cada imagem está representado, da esquerda para a direita, o marcador de peso molecular, o controlo negativo e o fragmento correspondente a cada gene: (A) Glut1; (B) GLut4; (C) IGF1; (D) HSP105; (E) PGC1 α e (F) IRS1.

2.3. Expressão e Localização das Proteínas do Perfil Metabólico na Linha Celular Z310

A técnica de imunocitoquímica permitiu avaliar, em células da linha celular Z310, a presença e localização dos transportadores de glucose Glut1 e Glut4, e de três proteínas intervenientes na via de sinalização da insulina, IGF1, IRS1 e IRS1p. As células foram incubadas com o respetivo anticorpo primário para cada uma das proteínas e de seguida incubadas com um anticorpo secundário específico, emitindo fluorescência verde. Os núcleos foram ainda marcados com Hoechst 33342, que emite fluorescência azul. A fluorescência foi posteriormente visualizada no microscópio confocal LSM70, tendo-se verificado que tanto o Glut1 (Figura 9A) como o Glut4 (Figura 9B), o IGF1 (Figura 9C) e o IRS1p (Figura 9E) apresentam uma distribuição generalizada pelas células, embora a sua localização seja mais visível no citoplasma. O Glut4 apresenta ainda um aspeto mais granular face ao Glut1. O IRS1 (Figura 9D) apresenta uma localização preferencialmente nuclear. Tal como era esperado, nos controlos negativos não se verificou qualquer emissão de fluorescência verde.

Restrição de Glucose na Linha Celular do Plexo Coroide de Rato (Células Z310):
Efeito na Remoção do Péptido β -amiloide



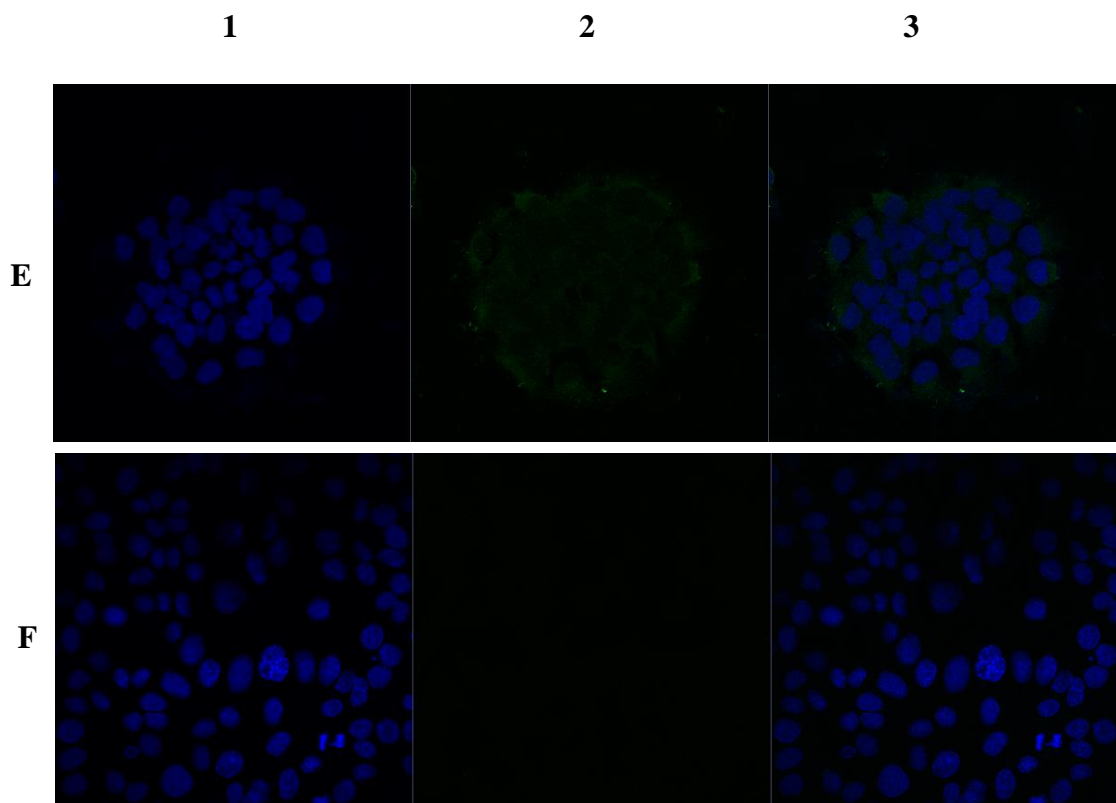


Figura 9 - Localização celular, por imunocitoquímica, das proteínas (A) Glut1, (B) Glut4, (C) IGF1, (D) IRS1, e (E) IRS1p nas células Z310. A coluna 1 representa a marcação nuclear com Hoechst 33342, a coluna 2 representa a expressão das proteínas acima referidas (fluorescência verde), e a coluna 3 resulta da sobreposição das figuras da coluna 1 com a coluna 2. A figura F representa o controle negativo. Ampliação original: 63x.

2.4. Expressão e Localização do Péptido β - amiloide na Linha Celular Z310

Para além de ter permitido confirmar a expressão e localização celular das proteínas do perfil metabólico na linha celular Z310, a técnica de imunocitoquímica também permitiu avaliar a presença e distribuição do péptido β nessas mesmas células. Após um estímulo de 24 horas com $3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de β , as células foram incubadas com o anticorpo primário anti- β e com o anticorpo secundário Alexa Fluor 488, que emite fluorescência verde (Figura 10A2). Os núcleos foram marcados com Hoechst 33342, que emite fluorescência azul (Figura 10A1). A fluorescência foi posteriormente avaliada num microscópio confocal onde se verificou que o β se distribuiu extracelularmente, sob forma de agregados, formando aglomerados e estruturas em “halo”.

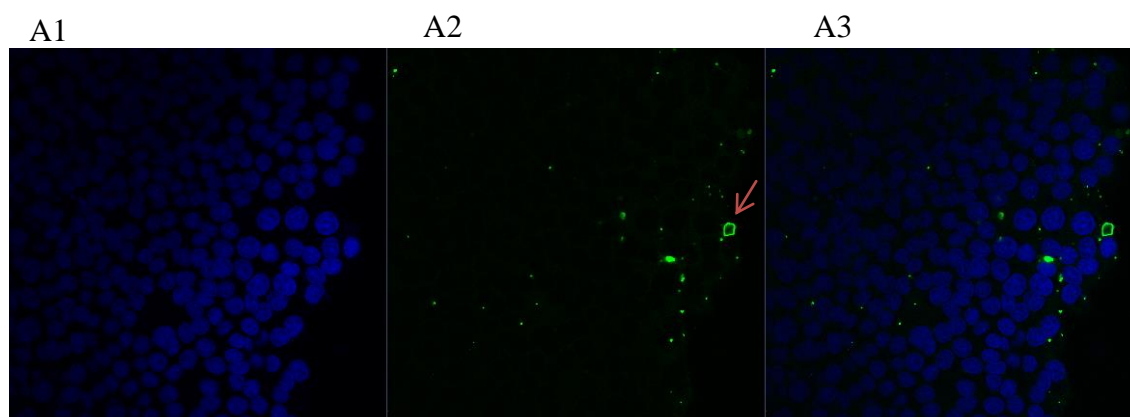


Figura 10 - Localização celular, por imunocitoquímica, de AB nas células Z310, após um estímulo de 24h com AB 1-42 (AnaSpec). A figura A1 representa a marcação nuclear das células Z310, a figura A2 representa as células marcadas com anticorpo anti-AB, e a figura A3 resulta da sobreposição de A1 com A2. A seta vermelha indica a marcação em *halo* dos agregados de AB. Ampliação original:63x.

3. Expressão dos Genes Biomarcadores de Restrição Calórica

3.1. Análise Empírica da Expressão dos Genes Biomarcadores de Restrição Calórica

A análise por RT-PCR dos biomarcadores de RC PGC1 α e HSP105, após extração do mRNA de células mantidas durante 48 horas em restrição de glucose de 4.5 (condições normais), 2.25, 1.5, 0.7 ou 0 gL⁻¹ permitiu avaliar de forma empírica os níveis de expressão destes dois genes. Usando a ferramenta de medição da intensidade de bandas do programa ImageJ, foi possível determinar a expressão dos genes amplificados para as diferentes concentrações de glucose a que foram sujeitos. Tal como já havia sido demonstrado por (Li and Tollefsbol, 2013), (Schilling et al., 2006) e (Lee, 1999b), o HSP105 é regulado negativamente pois ocorre um decréscimo na intensidade da banda de cerca de 36% quando a glucose no meio é de 0.7 gL⁻¹ (Figura 11B). De forma inversa, o PGC1 α é regulado positivamente, pois ocorre um aumento de 56% face ao meio contendo 4.5 gL⁻¹ de glucose (Figura 11A). Estes resultados permitiram avançar para o real-time PCR, como método mais preciso e fiável para avaliar esta diferença de expressão dos dois biomarcadores em células Z310 em RC.

Restrição de Glucose na Linha Celular do Plexo Coroide de Rato (Células Z310):
Efeito na Remoção do Péptido B-amiloide

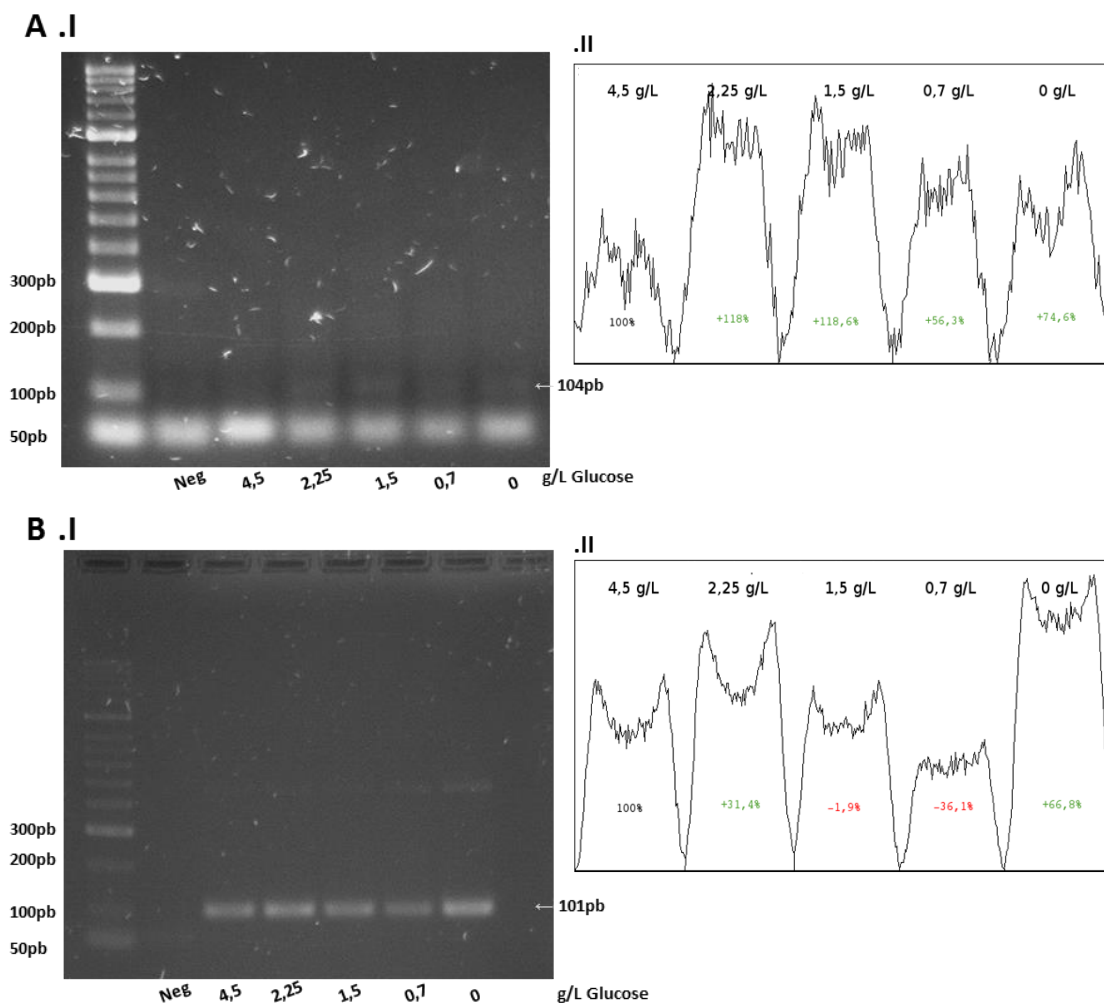


Figura 11 - Expressão dos genes biomarcadores PGC1 α e HSP105 após 48 horas de restrição calórica. (I) Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR dos biomarcadores de restrição calórica (A) PGC1 α com 104 pb, e (B) HSP105 com 101 pb. Em cada imagem está representado, da esquerda para a direita, o marcador de peso molecular, o controlo negativo e o produto de PCR para cada concentração de glucose. (II) Histograma da intensidade de expressão dos fragmentos amplificados de (A) PGC1 α e (B) HSP105. Cada pico corresponde a cada uma das bandas representadas em (I). Todas as intensidades das bandas foram calculadas relativamente à intensidade da banda da concentração 4.5 gL⁻¹ de glucose, aqui considerada como sendo 100%.

3.2. Expressão Quantitativa dos Genes Biomarcadores de Restrição Calórica

O uso da técnica de real-time PCR permitiu analisar, de forma quantitativa, as diferenças nos níveis de expressão do mRNA dos genes PGC1 α e HSP105 em células Z310 submetidas a dois tipos de condições experimentais: o impacto e o tempo de duração da RC. De forma a analisar esse impacto, foram usadas três concentrações de glucose distintas de 4.5, 1.5 e 0.7 gL⁻¹. Em relação à duração da restrição, foi efetuada durante um período de 48 ou 72 horas. O gene da

ciclofilina A (CycA) foi utilizado como controlo endógeno para normalizar os níveis de expressão dos genes biomarcadores de RC. Os gráficos de barras representam a razão entre a expressão do gene e a CycA para cada condição. O gráfico da figura 12 diz respeito ao PGC1 α , cuja expressão duplicou de forma significativa ($p < 0.05$) após 48 horas de restrição na concentração de 1.5 gL⁻¹ de glucose, mas diminuiu para níveis idênticos à condição normal (4.5 gL⁻¹ de glucose) quando a restrição foi de 0.7 gL⁻¹ de glucose durante 48 horas. Independentemente do nível inicial de glucose fornecido às células, após 72 horas de restrição, a expressão de PGC1 α manteve-se praticamente inalterada, caindo para metade o nível de transcritos de PGC1 α na concentração de 1.5 gL⁻¹ de glucose quando se passou de 48 para 72 horas de restrição ($p < 0.05$). A figura 13 corresponde ao gene HSP105, cuja expressão ao fim de 48 horas de restrição se manteve constante independentemente das concentrações de glucose, mas aumentou após 72 horas de restrição para as concentrações de glucose de 1.5 e 0.7 gL⁻¹, embora sem significado estatístico.

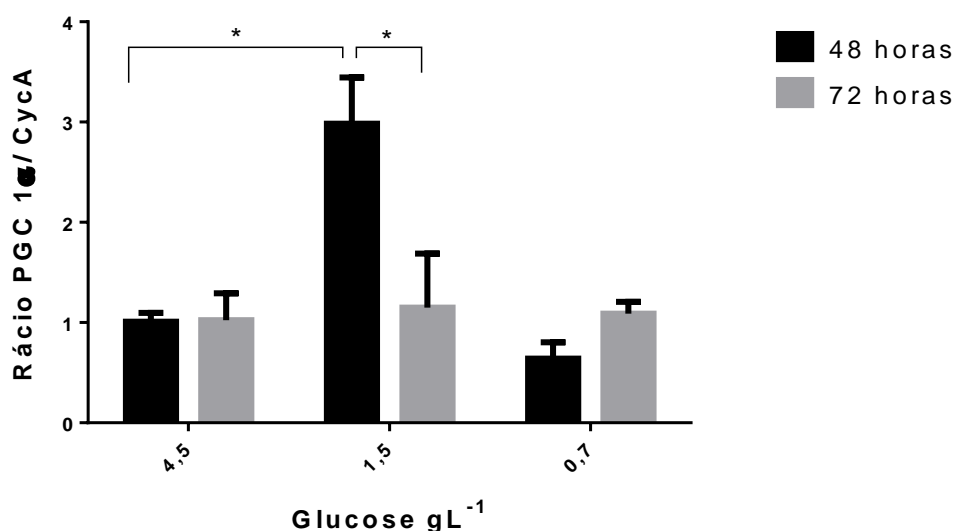


Figura 12 - Variação dos níveis de expressão do mRNA do gene biomarcador de RC PGC1 α . A expressão do gene PGC1 α após 48 horas aumentou para aproximadamente o dobro em restrição calórica de 1.5 gL⁻¹ de glucose ($p < 0.05$) e baixou para níveis idênticos aos da condição fisiológica normal (4.5 gL⁻¹ de glucose) quando em restrição de 0.7 gL⁻¹ de glucose. Após 72 horas de restrição, os níveis de expressão de PGC1 α desceram para metade de forma significativa ($p < 0.05$) nas células mantidas com 1.5 gL⁻¹ de glucose, níveis de expressão idênticos aos registados nas restantes concentrações de glucose.

Restrição de Glucose na Linha Celular do Plexo Coroide de Rato (Células Z310):
Efeito na Remoção do Péptido B-amiloide

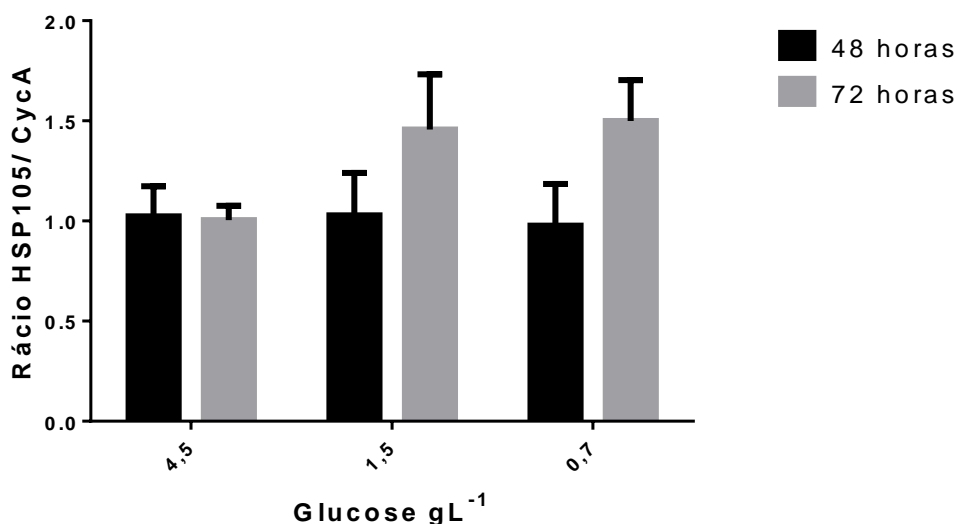


Figura 13 - Variação dos níveis de expressão do mRNA do gene biomarcador de RC, HSP105. A expressão do gene HSP105 após 48 horas de restrição manteve-se constante independentemente das concentrações de glucose no meio. Após 72 horas de restrição verificou-se um aumento dos transcritos de HSP105 nas células mantidas em concentrações contendo 1.5 e 0.7 gL⁻¹ de glucose, embora sem significado estatístico.

4. Parâmetros de *Stress* Celular e Apoptose

Uma das etapas essenciais para compreender os mecanismos subjacentes à capacidade das células Z310 removerem o AB, é saber quais os efeitos que os diferentes graus de RC exercem ao nível de *stress* celular e apoptose. Desta forma, foram avaliados 3 parâmetros fundamentais: a detecção e quantificação da apoptose, a detecção de produção de ROS, e a avaliação da capacidade mitocondrial.

4.1. Expressão da Caspase 3 em Restrição Calórica

A técnica de imunocitoquímica permitiu avaliar de forma qualitativa e quantitativa a presença da caspase 3 (Casp3). As células foram incubadas com o anticorpo primário antiCasp3 e marcados com o anticorpo secundário Alexa Fluor 488, que emite fluorescência verde. Os núcleos foram marcados com Hoechst 33342, que emite fluorescência azul. As células foram posteriormente observadas no microscópio confocal LSM70 e quantificada recorrendo ao *software* ZEN *Blue edition*. Verificou-se que com 1.5 gL⁻¹ de glucose, os níveis de Casp3 são mantidos, e que na presença de 0.7 gL⁻¹ de glucose ocorre um aumento significativo dos níveis de Casp3 ($p < 0.05$, $n=3$) quando comparados com a condição normal de 4.5 gL⁻¹ de glucose (Figura 14).

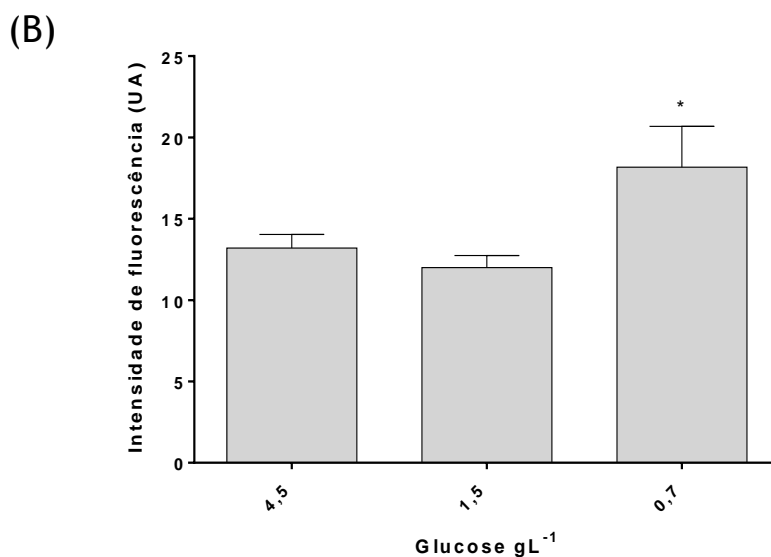
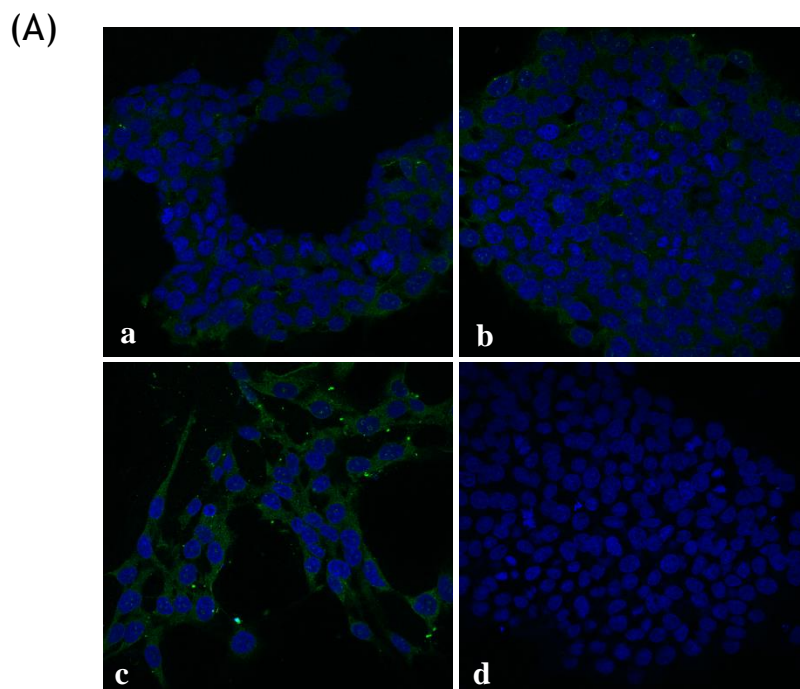


Figura 14 - Expressão do gene apoptótico caspase 3 durante a RC. (A) Imunocitoquímica das células Z310 com o anticorpo da Casp3. As figuras a, b e c representam células Z310 após 48 horas de restrição com 4.5, 1.5, e 0.7 gL⁻¹ de glucose, respectivamente, e posteriormente incubadas com anticorpo da Casp3. A imagem d representa o controlo negativo. Ampliação original: 63x. (B) Intensidade de fluorescência da Casp3 após restrição de glucose durante 48 horas. Os níveis da proteína Casp3 permaneceram inalterados durante a restrição de 1.5 gL⁻¹ de glucose, mas aumentaram de forma significativa durante a restrição de 0.7 gL⁻¹ de glucose. Os valores estão representados na forma média \pm SEM, depois de estatisticamente tratados com o *t*-test com **p*<0.05 e *n*=3.

4.2. Fragmentação do DNA Nuclear

O ensaio TUNEL permitiu, através da emissão de fluorescência, avaliar o nível de fragmentação de DNA nuclear resultante da ação da cascata apoptótica. A fluorescência foi avaliada de forma qualitativa pela análise de imagens obtidas num microscópio confocal, tendo-se verificado que tanto na condição normal de 4.5 gL^{-1} de glucose (Figura 15A) como na restrição com 1.5 gL^{-1} de glucose (Figura 15B), a fluorescência emitida foi apenas residual. No entanto, na restrição com 0.7 gL^{-1} de glucose (Figura 15C) houve emissão de fluorescência. A figura 15D representa um controlo positivo mantido em condições normais, incubado com DNase I (controlo positivo recomendado), tendo-se observado a marcação da totalidade dos núcleos das células.

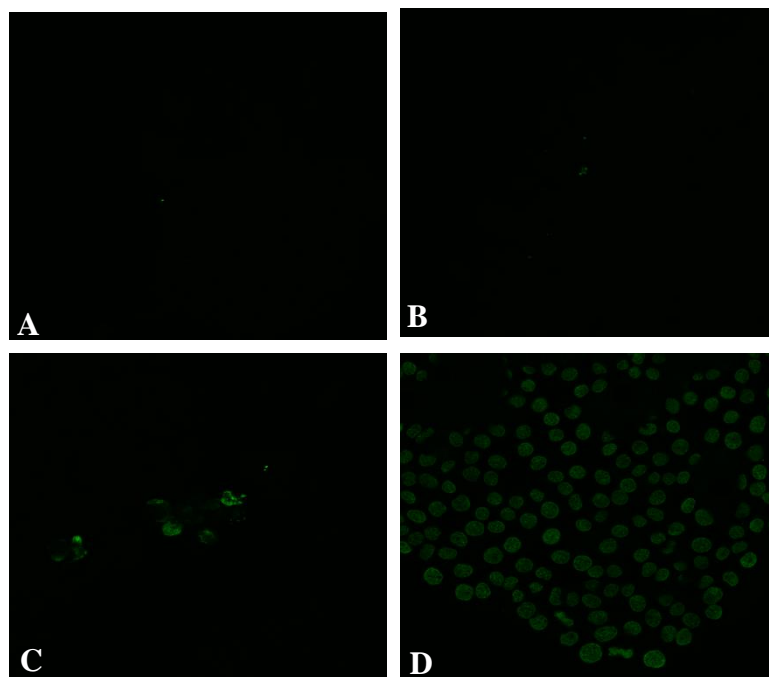
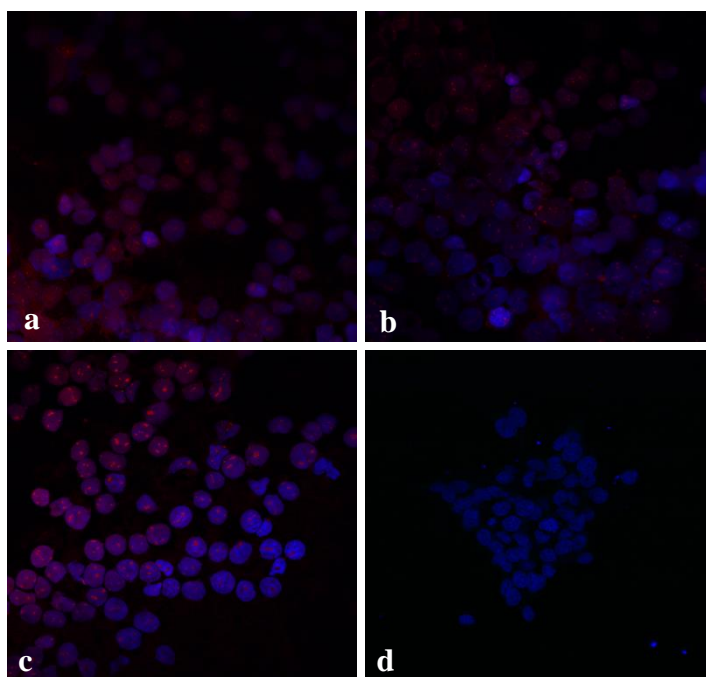


Figura 15- Fragmentação do DNA nuclear das células Z310 em restrição calórica. As imagens A, B e C representam células Z310 mantidas em cultura em meios com diferentes concentrações de glucose, respetivamente 4.5 , 1.5 e 0.7 gL^{-1} de glucose. Apenas durante a restrição de 0.7 gL^{-1} de glucose houve emissão de fluorescência nos núcleos das células Z310. A imagem D representa o controlo positivo tratado (Z310 tratadas com DNase I). Ampliação original: 63x.

4.3. Produção Mitocondrial de Espécies Superóxido

O ensaio da produção mitocondrial de espécies superóxido (MitoSOX) permitiu avaliar a quantidade de espécies reativas de oxigênio provenientes especificamente do processo mitocondrial, durante a restrição calórica (RC). O reagente fluorogénico MitoSOX penetra nas células vivas e tem como alvo as mitocôndrias e, em contato com espécies superóxido sofre oxidação e emite fluorescência vermelha. As células Z310 foram mantidas durante 48h com diferentes concentrações de glucose de 4.5 (Figura 16Aa), 1.5 (Figura 16Ab) e 0.7 gL⁻¹ de glucose (Figura 16Ac). A figura 16Ad representa o controlo negativo. A intensidade de fluorescência foi posteriormente quantificada recorrendo ao *software* ZEN *Blue edition*. Observou-se que ocorreu um ligeiro decréscimo na fluorescência do MitoSOX durante a restrição calórica de 1.5 gL⁻¹ de glucose e um aumento pronunciado quando a restrição calórica aumentou para 0.7 gL⁻¹ (Figura 16B), apesar de não haver significado estatístico entre a intensidade de fluorescência da condição normal e as restrições de glucose.

(A)



Restrição de Glucose na Linha Celular do Plexo Coroide de Rato (Células Z310):
Efeito na Remoção do Péptido B-amiloide

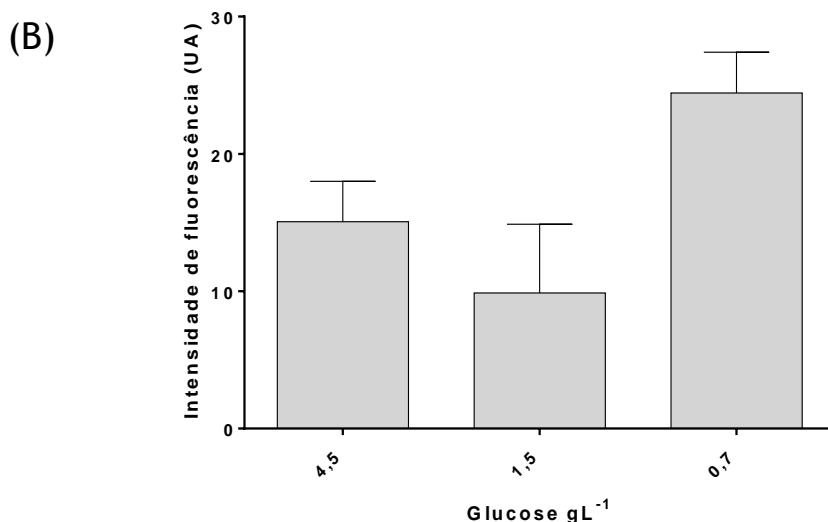


Figura 16 - Produção mitocondrial de espécies superóxido pelas células Z310 em restrição calórica. (A) Células Z310 marcadas com MitoSOX™. As imagens a, b e c representam as células após 48 horas de restrição em meio de cultura contendo 4.5, 1.5 e 0.7 gL⁻¹ de glucose, respetivamente, e posteriormente incubadas com MitoSOX™. A imagem d representa o controlo negativo. Ampliação original: 63x. (B) Intensidade de fluorescência do MitoSOX™ após restrição de glucose durante 48 horas. Os níveis de oxidação do MitoSOX™ diminuiram ligeiramente durante a restrição de 1.5 gL⁻¹ de glucose, mas aumentaram de forma abrupta durante a restrição de 0.7 gL⁻¹ de glucose.

4.4. Expressão da Citocromo c Oxidase IV

A técnica de imunocitoquímica permitiu avaliar, de forma qualitativa e quantitativa, a presença da enzima citocromo c oxidase IV (Cox IV) em células Z310 sob RC, na presença ou ausência de um estímulo de AB. As células foram divididas em dois grupos. No primeiro grupo as células foram submetidas a dois tipos de estímulos: o primeiro, consistiu em manter as células em restrição durante 48 horas, com diferentes concentrações de glucose de 4.5, 1.5 e 0.7 gL⁻¹; o segundo, consistiu na incubação das células Z310 durante 24 horas com 3 µg.mL⁻¹ de AB. O outro grupo de células serviu como controlo negativo do ensaio e as células foram sujeitas apenas RC.

As células foram posteriormente incubadas com anticorpo primário anti-CoxIV e com um anticorpo secundário Alexa Fluor 488, que emite fluorescência verde. Os núcleos foram marcados com Hoechst 33342. Após a observação das células no microscópio confocal LSM70 as suas fluorescências foram quantificadas recorrendo ao *software ZEN Blue edition*.

Verificou-se que, durante a RC, os níveis da proteína Cox IV mantêm-se constantes em todas as concentrações de glucose testadas. O mesmo acontece quando o AB é adicionado, sem ter ocorrido RC (Figura 17A - coluna 4.5 gL⁻¹ de glucose, com e sem AB).

Os níveis de Cox IV duplicaram relativamente à condição normal quando os dois estímulos - restrição calórica e AB - foram aplicados em simultâneo às células Z310. Desta forma, ao comparar as concentrações de glucose de 1.5 e 0.7 gL⁻¹ com 3 µg.mL⁻¹ AB relativamente à

Restrição de Glucose na Linha Celular do Plexo Coroide de Rato (Células Z310):
Efeito na Remoção do Péptido B-amiloide

condição normal de $4,5 \text{ gL}^{-1}$ de glucose, verificou-se que os níveis de Cox IV aumentam para mais do dobro, com significado estatístico (respetivamente $p < 0.01$ e $p < 0.05$). O mesmo aconteceu ao comparar células em restrição de 1.5 e 0.7 gL^{-1} de glucose com $3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ A β relativamente ao grupo de células em restrição mas sem incubação de A β , aumentando ainda mais o nível de significância estatística (respetivamente $p < 0.001$ e $p < 0.05$ com $n=4-6$) (Figura 17B).

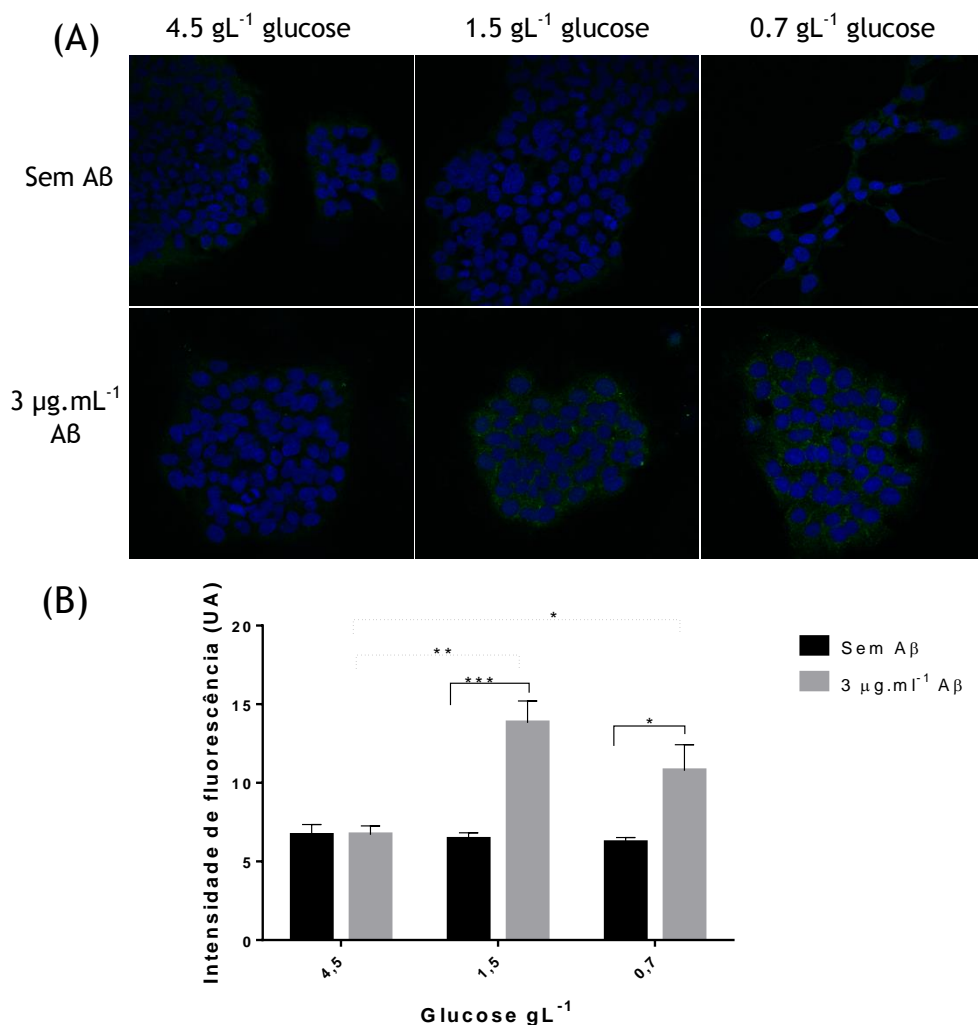


Figura 17- Expressão de citocromo c oxidase IV em células Z310 sujeitas a restrição calórica durante 48 horas, na presença ou ausência de A β durante 24 horas. (A) Imunocitoquímica das células Z310 com o anticorpo anti-Cox IV. As figuras da linha superior representam células Z310 após 48 horas de restrição com 4.5 , 1.5 e 0.7 gL^{-1} de glucose, sem incubação com A β . As figuras da linha inferior representam células Z310 após 48 horas de restrição com 4.5 , 1.5 e 0.7 gL^{-1} de glucose, incubadas durante 24 horas com $3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de A β . (B) Intensidade de fluorescência da Cox IV após restrição de glucose durante 48 horas, na presença (barras a cinzento) ou ausência (barras a preto) de A β . Os níveis da proteína Cox IV apenas aumentam significativamente quando a restrição calórica e o estímulo com A β ocorrem em simultâneo. Desta forma, apenas houve um aumento estatisticamente significativo da Cox IV ao comparar a restrição de 1.5 gL^{-1} de glucose com A β com a mesma restrição sem o estímulo de A β ($***p < 0.001$) e ao comparar a restrição de 1.5 gL^{-1} de glucose com A β com a condição fisiológica normal 4.5 gL^{-1} com A β ($**p < 0.01$).

4.5. Produção de Espécies Reativas de Oxigênio

Verificou-se que as células em RC de 1.5 gL^{-1} de glucose, independentemente de terem sido ou não incubadas com AB, foram as que apresentaram valores com maior produção de ROS relativamente às células sob condições normais (4.5 gL^{-1} de glucose), na presença ou ausência de AB ($p < 0.05$ e $p < 0.01$, respetivamente). Embora este fenómeno também tenha ocorrido nas células em restrição com 0.7 gL^{-1} de glucose, apenas apresenta significado estatístico entre 0.7 gL^{-1} de glucose sem AB relativamente às células em condições normais sem incubação com AB ($p < 0.05$). Observou-se ainda que, mesmo em condições normais, a simples incubação das células Z310 com $3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de AB fez aumentar significativamente os níveis de produção de ROS ($p < 0.05$) (Figura 18B), como esperado e como descrito anteriormente noutros estudos.

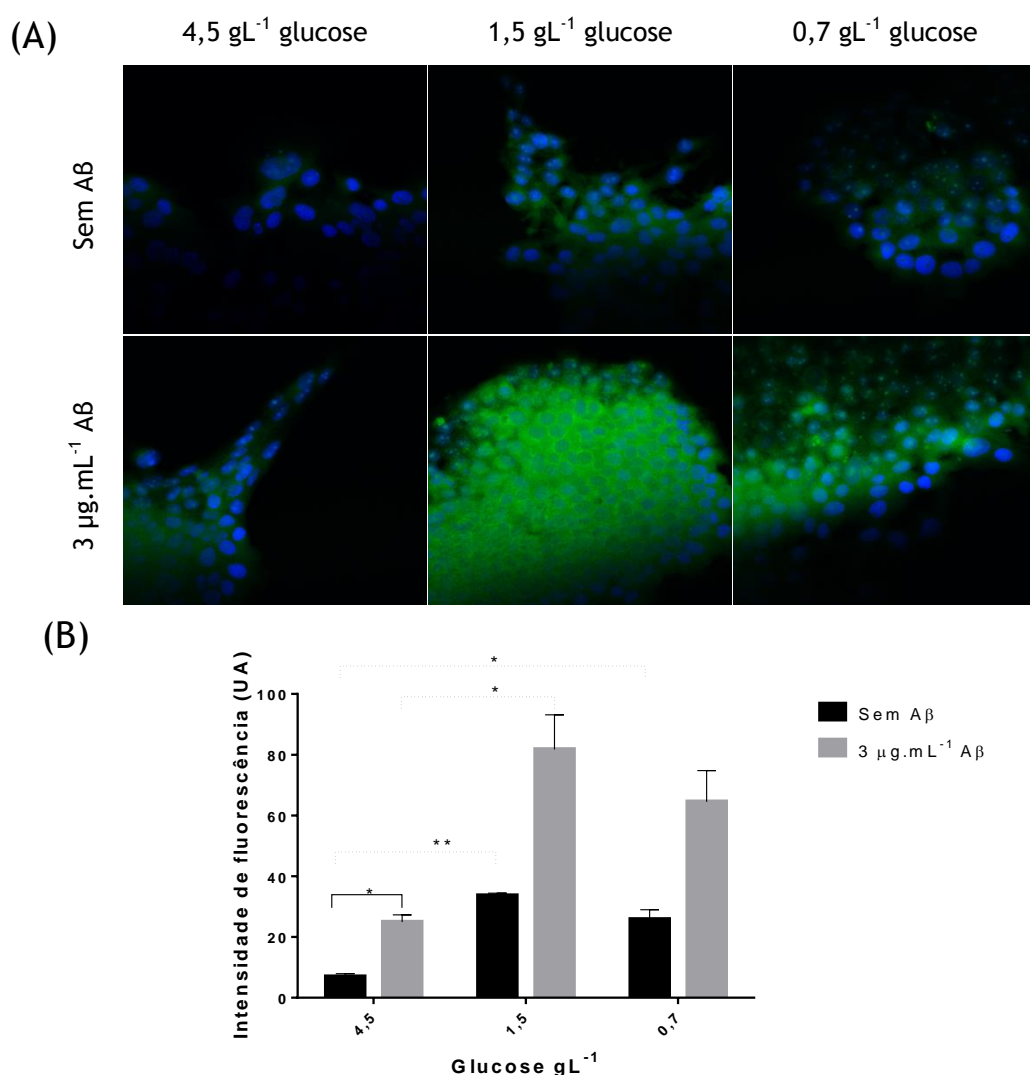


Figura 18 - Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelas células Z310 em RC, na presença ou ausência de AB. (A) As figuras da linha superior representam células Z310 após 48 horas de RC de 4.5 , 1.5 e 0.7 gL^{-1} de glucose, sem incubação com AB. As figuras da linha inferior representam células Z310 após restrição de 48 horas de 4.5 , 1.5 e 0.7 gL^{-1} de glucose, incubadas durante 24 horas com $3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de AB, e posteriormente marcadas com DCFH-DA. (B) Intensidade de fluorescência emitida pelas células Z310 após restrição de glucose durante 48 horas na ausência (barras pretas) ou presença do AB

(barras cinzentas). Os valores estão representados na forma média \pm SEM, depois de estatisticamente tratados com o *t*-test e com um $n=4-6$.

5. Efeito da Restrição Calórica na Remoção do A β

A técnica de Western Blot permitiu confirmar a presença do péptido A β no meio de cultura recolhido e determinar, de forma empírica, a sua quantidade no meio após 24 horas de estímulo e depois da cultura de células Z310 ter sido submetida a 48 horas de restrição de glucose (4,5, 1,5 e 0,7 g L^{-1}).

Usando o programa ImageJ como ferramenta de medição da intensidade das bandas conseguiu estimar-se a quantidade relativa de A β presente no meio celular após RC. Assim verificou-se que não existia uma tendência de diminuição do A β no meio celular (Figura 19), uma vez que não existe uma variação superior a 6% na quantidade de A β detetado entre diferentes concentrações de RC. O mesmo acontece entre cada repetição em que não existe uma clara tendência de aumento ou diminuição do A β no meio, como é bem patente em n1, n2 e n3.

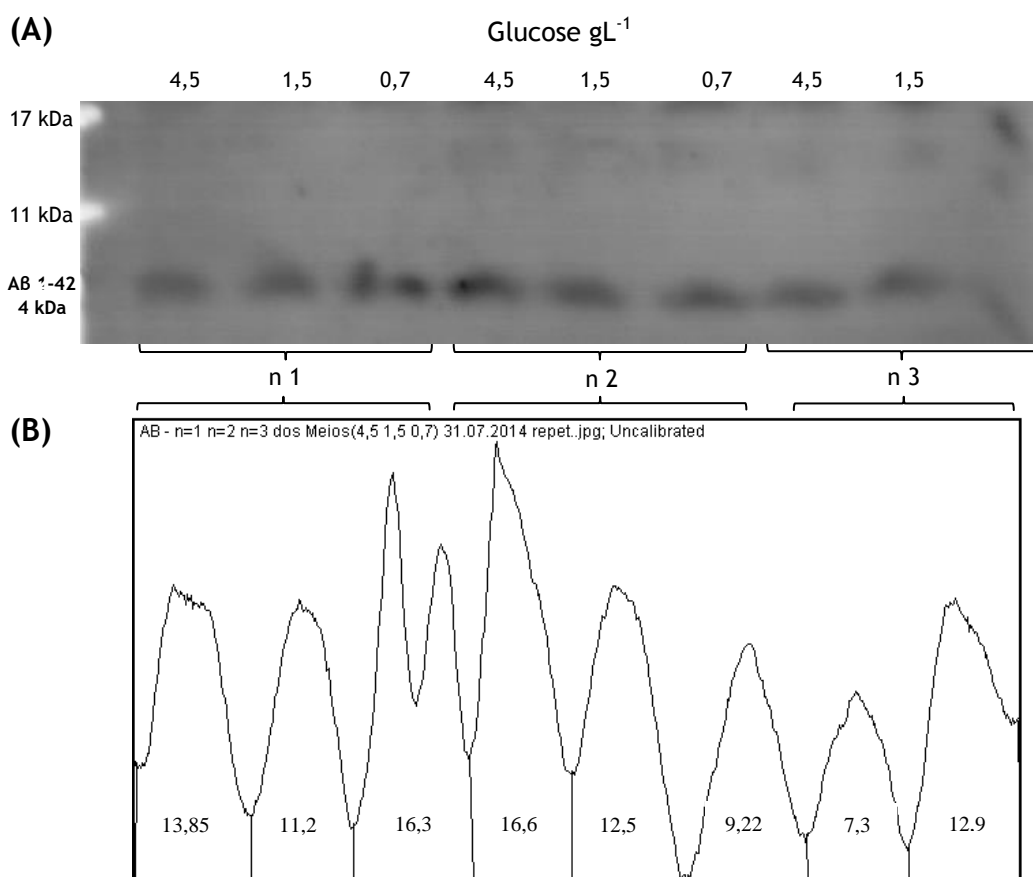


Figura 19 - Detecção e quantificação, por Western Blot, do A β presente no meio celular após 48 horas de restrição calórica e estímulo de 24h com AB 1-42 (AnaSpec). A figura (A) representa uma membrana de PVDF com triplicados de Western Blot feitos aos meios de cultura celulares após 48 horas de RC e 24 horas com A β e onde se observam coradas as bandas de 4 kDa correspondentes ao AB 1-42. A figura (B) representa a percentagem da intensidade com que cada banda contribui para a intensidade total.

**Restrição de Glucose na Linha Celular do Plexo Coroide de Rato (Células Z310):
Efeito na Remoção do Péptido B-amiloide**

IV. Discussão

O CP, estrutura que se distribui pelos quatro ventrículos cerebrais, desempenha um papel fundamental na produção e destoxificação de CSF (Kittisupamongkol, 2009), regulando o volume intracranial (Gherzi-Egea and Strazielle, 2001b), protegendo contra o *stress* induzido por ROS, e coordena processos imunológicos entre o cérebro e o sistema imunitário periférico (Thanos et al., 2010). De forma a manter a sua função secretora, o CP é constituído por retículo endoplasmático bem desenvolvido e um elevado número de mitocôndrias (Chodobski and Szmydynger-Chodobska, 2001b; Stopa et al., 2001). No entanto, flutuações nos níveis de glucose e a indução de *stress* oxidativo podem levar à disfunção mitocondrial e diminuir a capacidade de remoção do péptido AB pelo CP (Beal, 2005; Schapira, 2012). A acumulação de AB tem como consequência a formação de emaranhados neurofibrilares que potenciam a disfunção mitocondrial e *stress* oxidativo numa cascata patológica que eventualmente leva ao desenvolvimento da DA (Bubber et al., 2005). Por outro lado, a RC tem a capacidade de reduzir o *stress* oxidativo (Halagappa et al., 2007; Patel et al., 2005), promover o aumento da biogénese mitocondrial e, consequentemente, o aumento da capacidade respiratória, aumentando a capacidade de sobrevivência celular em condições adversas (Cerqueira et al., 2012), nomeadamente durante a privação de nutrientes.

O estudo da dinâmica do crescimento e viabilidade celulares permitiu encontrar uma concentração de glucose e um tempo ótimo de RC em que ocorreu um compromisso entre a manutenção do número de células em cultura e o início da perda de viabilidade. Essa avaliação permitiu estreitar as gamas de RC a 48 horas, e uma concentração de glucose entre 1.5 e 0.7 gL⁻¹. Estas condições demonstraram ser as mais indicadas no estabelecimento de RC na qual a viabilidade celular não ficava comprometida, ao mesmo tempo que foi possível manter estável o número de células em cultura, permitindo-nos desta forma aceitar essas condições como um primeiro requisito para determinar o ponto de restrição mais adequado.

Desta forma, para este trabalho foram selecionados alguns genes envolvidos no transporte de glucose - Glut1 e Glut4 - que estão diretamente ligados ao aporte de glucose para o interior celular. Foram também estudados alguns genes ligados à via de sinalização da insulina - IGF1 e IRS1 - de forma a confirmar a presença desta via de sinalização nas células Z310. O PGC1 α e HSP105, dois genes biomarcadores da restrição calórica, foram também analisados. O primeiro é regulado positivamente na restrição calórica e é responsável pela ativação da biogénese mitocondrial, e o segundo é responsável essencialmente por processos de proteção contra o choque térmico e *stress* e tende a ser sub-expresso durante a restrição calórica.

Começou-se por analisar a expressão dos genes ligados ao transporte de glucose, via de sinalização de insulina e biomarcadores de restrição na linha celular Z310 através de RT-PCR, de forma a confirmar se as células Z310 contém a “maquinaria” molecular similarmente ao que já foi descrito para CP, para responder a flutuações de glucose, se essa mesma resposta não se encontra adulterada pela presença ou ausência da via de sinalização da insulina, e se os genes biomarcadores da restrição estão presentes na linha celular. Após análise do mRNA dos genes em estudo, confirmou-se que todos eles estão expressos na linha celular Z310, pelo que estas células constituem um bom modelo para o estudo da RC.

As proteínas dos transportadores de glucose - Glut1 e Glut4 - e as proteínas da via de sinalização da insulina - IGF1, IRS1 e IRS1 fosforilado - foram também analisadas através de imunocitoquímica, de modo a observar a sua distribuição e localização celulares. O resultado de ambas as técnicas confirmou a presença destas proteínas maioritariamente no citoplasma das células Z310 e em menor quantidade no núcleo, tal como descrito por outros autores (Baskin et al., 1993; Candeias et al., 2012; Guillet-Deniau et al., 1994), à exceção do IRS1, cuja localização celular prevalece no núcleo, uma vez que em células jovens ou imortalizadas, como é o caso, o IRS1 pode ser translocado para o núcleo e funcionar como fator de transcrição (Lassak et al., 2002; Reiss et al., 2012; Sun et al., 2003; Wu et al., 2003). Posteriormente foram analisados, de forma preliminar, os níveis de expressão do mRNA dos genes biomarcadores de restrição calórica através de RT-PCR tendo-se constatado, como já descrito (Weindruch et al., 2002), que o mRNA do HSP105 diminui com o estabelecimento de RC (Lee et al., 1999). No sentido oposto, os níveis de PGC1 α aumentam ao estabelecer a RC (Lettieri Barbato et al., 2012; Ranhotra, 2010). Estes resultados preliminares da expressão diferencial dos genes biomarcadores da RC foram encorajadores para proceder à confirmação, através de *real-time* PCR, da verdadeira magnitude dessa expressão diferencial. Analisando os níveis de mRNA dos dois biomarcadores de RC de 4.5 gL⁻¹ (condição normal), 1.5 gL⁻¹ (restrição calórica moderada) e 0.7 gL⁻¹ (restrição calórica severa) na linha celular Z310 durante 48 ou 72 horas, verificou-se que o período de 72 horas de restrição não é adequado a estudos de RC em células Z310, uma vez que, independentemente da concentração de glucose no meio de cultura, a expressão de PGC1 α praticamente não se altera, e a expressão de HSP105 tende a aumentar, indicando que as células se encontram em *stress*, provocado não só pela própria restrição, como eventualmente, pela acumulação de subprodutos tóxicos do metabolismo celular no meio de cultura. O período de 48 horas de restrição com concentrações de 1.5 gL⁻¹ de glucose foi considerado ser o mais adequado, pois nestas condições ocorreu um evidente aumento na expressão de PGC1 α e, conseqüentemente, indicativo de aumento da biogénese mitocondrial, e a manutenção dos níveis de *stress* celular semelhantes aos da condição normal, níveis esses confirmados pela manutenção constante da expressão do HSP105.

Foi também analisado de que forma a RC afeta fenómenos de morte celular programada, tendo sido utilizada a técnica de imunocitoquímica para deteção e quantificação da caspase efetora, Casp3, e o ensaio por TUNEL, que permite detetar a fragmentação no DNA derivada de processos apoptóticos. Verificou-se que, mesmo não sendo um resultado estatisticamente significativo, a restrição calórica de 1.5 gL⁻¹ glucose durante 48 horas não conduz ao aumento da proteína executora da apoptose Casp3. De forma inversa, a proteína Casp3 aumenta de forma significativa quando a restrição é mais severa (0.7 gL⁻¹ de glucose), e estes resultados foram corroborados pela ausência de marcação TUNEL em restrição de 1.5 gL⁻¹ de glucose e pelo aparecimento de alguns núcleos celulares marcados durante a restrição de 0.7 gL⁻¹ de glucose. Deste modo, níveis de restrição moderada têm um efeito benéfico na diminuição da apoptose celular.

A produção de espécies superóxido foi analisada usando o marcador MitoSOX™, tendo-se

observado que existe uma tendência para que as espécies superóxido produzidas pelas mitocôndrias diminuam em restrição moderada (1.5 gL^{-1} glucose), reduzindo o dano no DNA mitocondrial e a probabilidade de ativação de cascatas apoptóticas (Ricci et al., 2008). Esta tendência, apesar de conservada ao longo dos vários campos analisados, necessitaria de um número maior de amostras de diferentes populações, de forma a ser possível obter resultado com significado estatístico ($n > 3$). Não obstante, o reduzido nível de espécies superóxido mitocondriais e de proteínas pró-apoptóticas parece estar diretamente relacionado com a RC em células Z310.

A forma como a RC sozinha, ou aliada à presença de AB, molda a atividade mitocondrial e o nível total de produção de ROS, foi avaliada utilizando a técnica de imunocitoquímica, para medir a intensidade de fluorescência emitida pela Cox IV, e a técnica de oxidação do DCFH-DA. A quantificação permitiu observar que a RC, independentemente das concentrações de glucose no meio de cultura, não interfere com os níveis de atividade mitocondrial, uma vez que a quantidade de Cox IV permanece constante. No entanto, na presença de um estímulo de AB, os níveis de Cox IV quase triplicam, permanecendo inalterados os valores da Cox IV em condições normais, independentemente de ter sido realizado um estímulo com AB. Relativamente à produção de ROS, ocorre um aumento moderado quando as células entram em restrição, que se acentua na presença de AB durante a RC. Tal como proposto anteriormente por outros autores, a variação do nível de produção de ROS com a restrição de glucose não estará, portanto, diretamente relacionada com a atividade mitocondrial, mas sim com o estímulo de AB (Caspersen et al., 2005; Cha et al., 2012; Manczak et al., 2006). Desta forma, estes resultados sugerem que, tal como acontece com outros processos ligados ao envelhecimento, as células em RC e na presença de AB, tendem a aumentar a atividade mitocondrial de forma a prevenir a acumulação de AB (Li et al., 2011) e eliminar esse metabolito tóxico (Hepple et al., 2006, 2005), ao mesmo tempo que aumenta a produção de ROS.

Finalmente, após o estímulo com AB, as células Z310 foram sujeitas a imunocitoquímica, de modo a observar a distribuição e localização celulares do péptido. Constatou-se que a quantidade de agregados de AB no espaço extracelular era bastante elevado, e que muitos desses agregados se depositaram na forma muito característica de halo, e que a intensidade de fluorescência no espaço intracelular era muito baixa, mostrando não haver acumulação de AB. Para além disso, verificou-se através de western blot que a quantidade de AB presente no meio se mantém praticamente constante, independentemente das condições de RC impostas às células. Embora estes resultados ainda sejam preliminares, uma explicação para que não ocorra a *clearance* do AB pode dever-se ao fato do AB necessitar de um transportador no lúmen para importar as placas amiloides para o interior da célula. Tendo em conta que as células Z310 são aderentes às placas de cultura, não contêm estroma, pelo que não existe destino final para o efluxo do AB, sendo natural que a sua *clearance* em placas *multiwell* seja bastante limitada.

V. Conclusão e Perspetivas Futuras

Este trabalho permitiu concluir que as células Z310, uma linha celular de CP, apresentam características que lhes permitem ser usadas como modelo, adequado a estudos de restrição, nomeadamente expressam transportadores de glucose e possuem a via de sinalização da insulina, de forma similar ao descrito em CP (Duarte et al., 2012; Zhao et al., 1999). Confirmamos que também possuem genes biomarcadores quando estas células estão sujeitas a RC, e que a sua expressão varia consoante o nível de restrição.

Confirmamos ainda que é a restrição moderada de $1,5\text{gL}^{-1}$ de glucose que mais contribui para a melhoria da função mitocondrial, uma vez que reduz a formação dos superóxidos mitocondriais, reduz a ativação da via apoptótica, nomeadamente a caspase 3, sem que haja variação nos níveis de atividade mitocondrial em relação a condições normais. Apesar disso, constatou-se que a RC em conjunto com o estímulo com AB potenciam quer a atividade mitocondrial quer a produção de ROS. Pelo que foi descrito recentemente (Correia et al., 2012; Luque-Contreras et al., 2014) ainda não se conseguiu mostrar se é o AB a causa do aumento dos ROS nas células ou se pelo contrário é consequência do metabolismo alterado. Finalmente analisando os valores da atividade da CoxIV com os resultados preliminares da remoção do AB pelas Z310, uma possível explicação é que há um aumento da atividade da CoxIV mas sem haver grandes diferenças na remoção do AB, o que poderá indicar que é a toxicidade do AB que leva ao aumento da Cox IV e produção de ROS e não as próprias células estarem a aumentar a sua taxa metabólica para eliminar o AB. De forma a comprovar essa hipótese a médio prazo, será necessário verificar se não existe *clearance* de AB por este induzir *stress* nas células ou se pelo contrário as células Z310 necessitam de um suporte de crescimento que mimetize o ambiente onde crescem e se desenvolve o CP, como o meio poroso provido pelas *Transwell* para que as células Z310 possam expressar convenientemente as proteínas de transporte de AB. E assim verificar-se se o AB é: 1) transportado através das células Z310 da câmara superior para a câmara inferior da *Transwell*, mimetizando o que acontece no CP com a passagem de péptidos do CSF para a circulação sanguínea; 2) sequestrado e/ou metabolizado durante o transporte e 3) mais facilmente eliminado quando em restrição, sabendo que a RC melhora a condição mitocondrial e previne a apoptose celular. Adicionalmente será importante verificar se, a sinalização de insulina, nomeadamente através das expressões de *protein kinase B* (Akt/PKB), PI3K e *extracellular signal-regulated kinases* (ERK1/2), se encontra comprometida quando as células Z310 são sujeitas a RC e estímulo de AB.

A longo prazo, poder-se-á também estudar qual o papel das hormonas sexuais nas células Z310, relativamente à remoção de AB quando em restrição de glucose, nomeadamente os estrogénios que desempenham um papel protetor na função mitocondrial e no metabolismo da glucose (Rettberg et al., 2014).

VI. Referências Bibliográficas

- Ahmed, N., Thornalley, P.J., 2007. Advanced glycation endproducts: what is their relevance to diabetic complications? *Diabetes. Obes. Metab.* 9, 233-245.
- Ballard, C., Gauthier, S., Corbett, A., Brayne, C., Aarsland, D., Jones, E., 2011. Alzheimer's disease. *Lancet* 377, 1019-1031.
- Baskin, D.G., Sipols, A.J., Schwartz, M.W., White, M.F., 1993. Immunocytochemical detection of insulin receptor substrate-1 (IRS-1) in rat brain: colocalization with phosphotyrosine. *Regul. Pept.* 48, 257-66.
- Beal, M.F., 2005. Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. *Ann. Neurol.* 58, 495-505.
- Blay, P., Nilsson, C., Owman, C., Aldred, A., Schreiber, G., 1993. Transthyretin expression in the rat brain: effect of thyroid functional state and role in thyroxine transport. *Brain Res.* 632, 114-20.
- Brown, P.D., Davies, S.L., Speake, T., Millar, I.D., 2004. Molecular mechanisms of cerebrospinal fluid production. *Neuroscience* 129, 957-70.
- Brownlee, M., 1995. Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annu. Rev. Med.* 46, 223-234.
- Bubber, P., Haroutunian, V., Fisch, G., Blass, J.P., Gibson, G.E., 2005. Mitochondrial abnormalities in Alzheimer brain: mechanistic implications. *Ann. Neurol.* 57, 695-703.
- Candeias, E., Duarte, A.I., Carvalho, C., Correia, S.C., Cardoso, S., Santos, R.X., Plácido, A.I., Perry, G., Moreira, P.I., 2012. The impairment of insulin signaling in Alzheimer's disease. *IUBMB Life* 64, 951-7.
- Cannon, B., Houstek, J., Nedergaard, J., 1998. Brown adipose tissue. More than an effector of thermogenesis? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 856, 171-87.
- Caspersen, C., Wang, N., Yao, J., Sosunov, A., Chen, X., Lustbader, J.W., Xu, H.W., Stern, D., McKhann, G., Yan, S. Du, 2005. Mitochondrial Aβeta: a potential focal point for neuronal metabolic dysfunction in Alzheimer's disease. *FASEB J.* 19, 2040-1.
- Cerqueira, F.M., Cunha, F.M., Laurindo, F.R.M., Kowaltowski, A.J., 2012. Calorie restriction increases cerebral mitochondrial respiratory capacity in a NO•-mediated mechanism: impact on neuronal survival. *Free Radic. Biol. Med.* 52, 1236-41.
- Cha, M.-Y., Han, S.-H., Son, S.M., Hong, H.-S., Choi, Y.-J., Byun, J., Mook-Jung, I., 2012. Mitochondria-specific accumulation of amyloid β induces mitochondrial dysfunction leading to apoptotic cell death. *PLoS One* 7, e34929.
- Chodobski, A., Szmydynger-Chodobska, J., 2001a. Choroid plexus: target for polypeptides and site of their synthesis. *Microsc. Res. Tech.* 52, 65-82.
- Chodobski, A., Szmydynger-Chodobska, J., 2001b. Choroid plexus: target for polypeptides and site of their synthesis. *Microsc. Res. Tech.* 52, 65-82.
- Choi, K.-M., Kwon, Y.-Y., Lee, C.-K., 2013. Characterization of global gene expression during assurance of lifespan extension by caloric restriction in budding yeast. *Exp. Gerontol.* 48, 1455-68.

- Correia, S.C., Santos, R.X., Carvalho, C., Cardoso, S., Candeias, E., Santos, M.S., Oliveira, C.R., Moreira, P.I., 2012. Insulin signaling, glucose metabolism and mitochondria: major players in Alzheimer's disease and diabetes interrelation. *Brain Res.* 1441, 64-78.
- Cotman, C.W., Poon, W.W., Rissman, R.A., Blurton-Jones, M., 2005. The role of caspase cleavage of tau in Alzheimer disease neuropathology. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 64, 104-112.
- Cottrell, D.A., Blakely, E.L., Johnson, M.A., Ince, P.G., Borthwick, G.M., Turnbull, D.M., n.d. Cytochrome c oxidase deficient cells accumulate in the hippocampus and choroid plexus with age. *Neurobiol. Aging* 22, 265-72.
- Cryer, P.E., Axelrod, L., Grossman, A.B., Heller, S.R., Montori, V.M., Seaquist, E.R., Service, F.J., 2009. Evaluation and management of adult hypoglycemic disorders: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94, 709-728.
- Damkier, H.H., Brown, P.D., Praetorius, J., 2013. Cerebrospinal fluid secretion by the choroid plexus. *Physiol. Rev.* 93, 1847-92. 3
- Dickson, D.W., 2004. Apoptotic mechanisms in Alzheimer neurofibrillary degeneration: cause or effect? *J. Clin. Invest.* 114, 23-27.
- Dickson, P.W., Aldred, A.R., Marley, P.D., Bannister, D., Schreiber, G., 1986. Rat choroid plexus specializes in the synthesis and the secretion of transthyretin (prealbumin). Regulation of transthyretin synthesis in choroid plexus is independent from that in liver. *J. Biol. Chem.* 261, 3475-3478.
- Dohrmann, G.J., 1970. The choroid plexus: a historical review. *Brain Res.* 18, 197-218.
- Duarte, A.I., Moreira, P.I., Oliveira, C.R., 2012. Insulin in central nervous system: more than just a peripheral hormone. *J. Aging Res.* 2012, 384017.
- Dwyer, D.S., Vannucci, S.J., Simpson, I. a, 2002. Expression, regulation, and functional role of glucose transporters (GLUTs) in brain. *Int. Rev. Neurobiol.* 51, 159-88.
- Dwyer, K.J., Pardridge, W.M., 1993. Developmental modulation of blood-brain barrier and choroid plexus GLUT1 glucose transporter messenger ribonucleic acid and immunoreactive protein in rabbits. *Endocrinology* 132, 558-65.
- Emerich, D.F., Skinner, S.J.M., Borlongan, C. V, Vasconcellos, A. V, Thanos, C.G., 2005. The choroid plexus in the rise, fall and repair of the brain. *Bioessays* 27, 262-274.
- Falcão, A.M., Marques, F., Novais, A., Sousa, N., Palha, J.A., Sousa, J.C., 2012. The path from the choroid plexus to the subventricular zone: go with the flow! *Front. Cell. Neurosci.* 6, 34.
- Fujimoto, C., Yamasoba, T., 2014. Oxidative Stresses and Mitochondrial Dysfunction in Age-Related Hearing Loss. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014, 582849.
- Gallagher, E.J., LeRoith, D., 2013. Insulin Mechanisms/Metabolic Actions, in: Lennarz, W.J., Lane, M.D.B.T.-E. of B.C. (Eds.), Academic Press, Waltham, pp. 602-607.
- Geijselaers, S.L.C., Sep, S.J.S., Stehouwer, C.D.A., Biessels, G.J., 2014. Glucose regulation, cognition, and brain MRI in type 2 diabetes: a systematic review. *lancet. Diabetes Endocrinol.*

- Gerhart-Hines, Z., Rodgers, J.T., Bare, O., Lerin, C., Kim, S.-H., Mostoslavsky, R., Alt, F.W., Wu, Z., Puigserver, P., 2007. Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1 α . *EMBO J.* 26, 1913-23.
- Gherzi-Egea, J.F., Strazielle, N., 2001a. Brain drug delivery, drug metabolism, and multidrug resistance at the choroid plexus. *Microsc. Res. Tech.* 52, 83-88.
- Gherzi-Egea, J.F., Strazielle, N., 2001b. Brain drug delivery, drug metabolism, and multidrug resistance at the choroid plexus. *Microsc. Res. Tech.* 52, 83-8.
- Guillet-Deniau, I., Leturque, A., Girard, J., 1994. Expression and cellular localization of glucose transporters (GLUT1, GLUT3, GLUT4) during differentiation of myogenic cells isolated from rat foetuses. *J. Cell Sci.* 107 Pt 3, 487-96.
- Haan, M.N., 2006. Therapy Insight: type 2 diabetes mellitus and the risk of late-onset Alzheimer's disease. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* 2, 159-166.
- Halagappa, V.K.M., Guo, Z., Pearson, M., Matsuoka, Y., Cutler, R.G., Laferla, F.M., Mattson, M.P., 2007. Intermittent fasting and caloric restriction ameliorate age-related behavioral deficits in the triple-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* 26, 212-20.
- Hepple, R.T., Baker, D.J., Kaczor, J.J., Krause, D.J., 2005. Long-term caloric restriction abrogates the age-related decline in skeletal muscle aerobic function. *FASEB J.* 19, 1320-2.
- Hepple, R.T., Baker, D.J., McConkey, M., Muryinka, T., Norris, R., 2006. Caloric restriction protects mitochondrial function with aging in skeletal and cardiac muscles. *Rejuvenation Res.* 9, 219-22.
- Herzig, S., Long, F., Jhala, U.S., Hedrick, S., Quinn, R., Bauer, A., Rudolph, D., Schutz, G., Yoon, C., Puigserver, P., Spiegelman, B., Montminy, M., 2001. CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature* 413, 179-83.
- Holloszy, J.O., Fontana, L., 2007. Caloric restriction in humans. *Exp. Gerontol.* 42, 709-12.
- Howarth, C., Gleeson, P., Attwell, D., 2012. Updated energy budgets for neural computation in the neocortex and cerebellum. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 32, 1222-32.
- Huang, S., He, X., Li, Z., Yao, L., Shi, W., 2013. A novel primary culture method for rat choroidal epithelial cells. *Neurosciences (Riyadh)*. 18, 27-32.
- Hylander, B.L., Chen, X., Graf, P.C., Subjeck, J.R., 2000. The distribution and localization of hsp110 in brain. *Brain Res.* 869, 49-55.
- Janson, J., Laedtke, T., Parisi, J.E., O'Brien, P., Petersen, R.C., Butler, P.C., 2004. Increased risk of type 2 diabetes in Alzheimer disease. *Diabetes* 53, 474-481.
- Jha, K.K., Banga, S., Palejwala, V., Ozer, H.L., 1998. SV40-Mediated immortalization. *Exp. Cell Res.* 245, 1-7.
- John Laterra, Richard Keep, Lorris A Betz, and G.W.G., 1999. Blood - Cerebrospinal Fluid Barrier, in: Siegel GJ, Agranoff BW, A.R. (Ed.), *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. Lippincott-Raven; Philadelphia.

- Julien, C., Tremblay, C., Phivilay, A., Berthiaume, L., Emond, V., Julien, P., Calon, F., 2010. High-fat diet aggravates amyloid-beta and tau pathologies in the 3xTg-AD mouse model. *Neurobiol. Aging* 31, 1516-31.
- Kapogiannis, D., Mattson, M.P., 2011. Disrupted energy metabolism and neuronal circuit dysfunction in cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Lancet. Neurol.* 10, 187-98.
- Kar, S., Slowikowski, S.P.M., Westaway, D., Mount, H.T.J., 2004. Interactions between beta-amyloid and central cholinergic neurons: implications for Alzheimer's disease. *J. Psychiatry Neurosci.* 29, 427-41.
- Kashiwaya, Y., Bergman, C., Lee, J.-H., Wan, R., King, M.T., Mughal, M.R., Okun, E., Clarke, K., Mattson, M.P., Veech, R.L., 2013. A ketone ester diet exhibits anxiolytic and cognition-sparing properties, and lessens amyloid and tau pathologies in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 34, 1530-9.
- Kayo, T., Allison, D.B., Weindruch, R., Prolla, T.A., 2001. Influences of aging and caloric restriction on the transcriptional profile of skeletal muscle from rhesus monkeys. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 5093-8.
- Kenyon, C., 2001. A conserved regulatory system for aging. *Cell* 105, 165-8.
- Kim, H.-S., Patel, K., Muldoon-Jacobs, K., Bisht, K.S., Aykin-Burns, N., Pennington, J.D., van der Meer, R., Nguyen, P., Savage, J., Owens, K.M., Vassilopoulos, A., Ozden, O., Park, S.-H., Singh, K.K., Abdulkadir, S.A., Spitz, D.R., Deng, C.-X., Gius, D., 2010. SIRT3 is a mitochondria-localized tumor suppressor required for maintenance of mitochondrial integrity and metabolism during stress. *Cancer Cell* 17, 41-52.
- Kittisupamongkol, W., 2009. Cerebrospinal fluid production rate. *Clin. Experiment. Ophthalmol.* 37, 827; author reply 827-8.
- Koubova, J., Guarente, L., 2003. How does calorie restriction work? *Genes Dev.* 17, 313-21.
- Kuang, X., Chen, Y.-S., Wang, L.-F., Li, Y.-J., Liu, K., Zhang, M.-X., Li, L.-J., Chen, C., He, Q., Wang, Y., Du, J.-R., 2014. Klotho upregulation contributes to the neuroprotection of ligustilide in an Alzheimer's disease mouse model. *Neurobiol. Aging* 35, 169-78.
- Lacroix, S., Feinstein, D., Rivest, S., 1998. The bacterial endotoxin lipopolysaccharide has the ability to target the brain in upregulating its membrane CD14 receptor within specific cellular populations. *Brain Pathol.* 8, 625-40.
- Lassak, A., Del Valle, L., Peruzzi, F., Wang, J.Y., Enam, S., Croul, S., Khalili, K., Reiss, K., 2002. Insulin receptor substrate 1 translocation to the nucleus by the human JC virus T-antigen. *J. Biol. Chem.* 277, 17231-8.
- Ledesma, M.D., Bonay, P., Colaço, C., Avila, J., 1994. Analysis of microtubule-associated protein tau glycation in paired helical filaments. *J. Biol. Chem.* 269, 21614-21619.
- Lee, C., 1999a. Gene Expression Profile of Aging and Its Retardation by Caloric Restriction. *Science* (80-). 285, 1390-1393.
- Lee, C., 1999b. Gene Expression Profile of Aging and Its Retardation by Caloric Restriction. *Science* (80-). 285, 1390-1393.
- Lee, C.K., Klopp, R.G., Weindruch, R., Prolla, T.A., 1999. Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction. *Science* 285, 1390-1393.

- Lee, C.K., Weindruch, R., Prolla, T.A., 2000. Gene-expression profile of the ageing brain in mice. *Nat. Genet.* 25, 294-7.
- Lettieri Barbato, D., Baldelli, S., Pagliei, B., Aquilano, K., Ciriolo, M.R., 2012. Caloric Restriction and the Nutrient-Sensing PGC-1 α in Mitochondrial Homeostasis: New Perspectives in Neurodegeneration. *Int. J. Cell Biol.* 2012, 759583.
- Li, B., Skinner, C., Castello, P.R., Kato, M., Easlon, E., Xie, L., Li, T., Lu, S.-P., Wang, C., Tsang, F., Poyton, R.O., Lin, S.-J., 2011. Identification of potential calorie restriction-mimicking yeast mutants with increased mitochondrial respiratory chain and nitric oxide levels. *J. Aging Res.* 2011, 673185.
- Li, Y., Liu, L., Tollefsbol, T.O., 2010. Glucose restriction can extend normal cell lifespan and impair precancerous cell growth through epigenetic control of hTERT and p16 expression. *FASEB J.* 24, 1442-53.
- Li, Y., Tollefsbol, T.O., 2011. p16(INK4a) suppression by glucose restriction contributes to human cellular lifespan extension through SIRT1-mediated epigenetic and genetic mechanisms. *PLoS One* 6, e17421.
- Li, Y., Tollefsbol, T.O., 2013. Biological Aging. *Methods in Molecular Biology* 1048, 19-29.
- Liang, H., Ward, W.F., 2006. PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism. *Adv. Physiol. Educ.* 30, 145-51.
- Lin, S.-J., Kaeberlein, M., Andalis, A.A., Sturtz, L.A., Defossez, P.-A., Culotta, V.C., Fink, G.R., Guarente, L., 2002. Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. *Nature* 418, 344-8.
- Lizcano, J.M., Alessi, D.R., 2002. The insulin signalling pathway. *Curr. Biol.* 12, R236-8.
- Loo, D.T., 2011. In situ detection of apoptosis by the TUNEL assay: an overview of techniques. *Methods Mol. Biol.* 682, 3-13.
- Luque-Contreras, D., Carvajal, K., Toral-Rios, D., Franco-Bocanegra, D., Campos-Peña, V., 2014. Oxidative stress and metabolic syndrome: cause or consequence of Alzheimer's disease? *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014, 497802.
- Manczak, M., Anekonda, T.S., Henson, E., Park, B.S., Quinn, J., Reddy, P.H., 2006. Mitochondria are a direct site of A beta accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. *Hum. Mol. Genet.* 15, 1437-49.
- Mergenthaler, P., Lindauer, U., Dienel, G.A., Meisel, A., 2013. Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends Neurosci.* 36, 587-97.
- Moloney, A.M., Griffin, R.J., Timmons, S., O'Connor, R., Ravid, R., O'Neill, C., 2010. Defects in IGF-1 receptor, insulin receptor and IRS-1/2 in Alzheimer's disease indicate possible resistance to IGF-1 and insulin signalling. *Neurobiol. Aging* 31, 224-43.
- Monnot, A.D., Zheng, W., 2013. Epithelial Cell Culture Protocols, in: Randell, S.H., Fulcher, M.L. (Eds.), *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ.
- Mortazavi, M.M., Griessenauer, C.J., Adeeb, N., Deep, A., Bavarsad Shahripour, R., Shahripour, R.B., Loukas, M., Tubbs, R.I., Tubbs, R.S., 2014. The choroid plexus: a comprehensive review of its history, anatomy, function, histology, embryology, and surgical considerations. *Childs. Nerv. Syst.* 30, 205-14.

- Ortiz-Bautista, R.J., Aguilar-Salinas, C.A., Monroy-Guzmán, A., 2013. Caloric restriction: about its positive metabolic effects and cellular impact. *Cir. Cir.* 81, 459-64.
- Oshio, K., Song, Y., Verkman, A.S., Manley, G.T., 2003. Aquaporin-1 deletion reduces osmotic water permeability and cerebrospinal fluid production. *Acta Neurochir. Suppl.* 86, 525-528.
- Ott, a, Stolk, R.P., Hofman, a, van Harskamp, F., Grobbee, D.E., Breteler, M.M., 1996. Association of diabetes mellitus and dementia: the Rotterdam Study. *Diabetologia* 39, 1392-7.
- Patel, N. V, Gordon, M.N., Connor, K.E., Good, R.A., Engelman, R.W., Mason, J., Morgan, D.G., Morgan, T.E., Finch, C.E., 2005. Caloric restriction attenuates Abeta-deposition in Alzheimer transgenic models. *Neurobiol. Aging* 26, 995-1000.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
- Preston, J.E., 2001. Ageing choroid plexus-cerebrospinal fluid system. *Microsc. Res. Tech.* 52, 31-7.
- Ranhotra, H.S., 2010. Long-term caloric restriction up-regulates PPAR gamma co-activator 1 alpha (PGC-1alpha) expression in mice. *Indian J. Biochem. Biophys.* 47, 272-7.
- Redzic, Z.B., Preston, J.E., Duncan, J.A., Chodobski, A., Szmydynger-Chodobska, J., 2005. The choroid plexus-cerebrospinal fluid system: from development to aging. *Curr. Top. Dev. Biol.* 71, 1-52.
- Redzic, Z.B., Segal, M.B., 2004. The structure of the choroid plexus and the physiology of the choroid plexus epithelium. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56, 1695-716.
- Reiss, K., Del Valle, L., Lassak, A., Trojaneck, J., 2012. Nuclear IRS-1 and cancer. *J. Cell. Physiol.* 227, 2992-3000.
- Reixach, N., Foss, T.R., Santelli, E., Pascual, J., Kelly, J.W., Buxbaum, J.N., 2008. Human-murine transthyretin heterotetramers are kinetically stable and non-amyloidogenic. A lesson in the generation of transgenic models of diseases involving oligomeric proteins. *J. Biol. Chem.* 283, 2098-2107.
- Rettberg, J.R., Yao, J., Brinton, R.D., 2014. Estrogen: a master regulator of bioenergetic systems in the brain and body. *Front. Neuroendocrinol.* 35, 8-30.
- Ricci, C., Pastukh, V., Leonard, J., Turrens, J., Wilson, G., Schaffer, D., Schaffer, S.W., 2008. Mitochondrial DNA damage triggers mitochondrial-superoxide generation and apoptosis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 294, C413-22.
- Rocchi, A., Pellegrini, S., Siciliano, G., Murri, L., 2003. Causative and susceptibility genes for Alzheimer's disease: A review. *Brain Res. Bull.*
- Saito, Y., Yamagishi, N., Hatayama, T., 2007. Different localization of Hsp105 family proteins in mammalian cells. *Exp. Cell Res.* 313, 3707-17.
- Saltiel, A.R., Kahn, C.R., 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414, 799-806.
- Scarpulla, R.C., Vega, R.B., Kelly, D.P., 2012. Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis. *Trends Endocrinol. Metab.* 23, 459-66.

- Schapira, A.H. V, 2012. Mitochondrial diseases. *Lancet* 379, 1825-34. doi:10.1016/S0140-6736(11)61305-6
- Schilling, M.M., Oeser, J.K., Boustead, J.N., Flemming, B.P., O'Brien, R.M., 2006. Gluconeogenesis: re-evaluating the FOXO1-PGC-1alpha connection. *Nature* 443, E10-E11.
- Schreiber, G., Aldred, A.R., Jaworowski, A., Nilsson, C., Achen, M.G., Segal, M.B., 1990. Thyroxine transport from blood to brain via transthyretin synthesis in choroid plexus. *Am. J. Physiol.* 258, R338-45.
- Segal, M.B., 2001. Transport of nutrients across the choroid plexus. *Microsc. Res. Tech.* 52, 38-48.
- Serot, J.-M., Béné, M.-C., Faure, G.C., 2003. Choroid plexus, aging of the brain, and Alzheimer's disease. *Front. Biosci.* 8, s515-21.
- Shi, L.Z., Zheng, W., 2005. Establishment of an in vitro brain barrier epithelial transport system for pharmacological and toxicological study. *Brain Res.* 1057, 37-48.
- Sims-Robinson, C., Kim, B., Rosko, A., Feldman, E.L., 2010. How does diabetes accelerate Alzheimer disease pathology? *Nat Rev Neurol* 6, 551-559.
- Speakman, J.R., Mitchell, S.E., 2011. Caloric restriction. *Mol. Aspects Med.* 32, 159-221.
- Stopa, E.G., Berzin, T.M., Kim, S., Song, P., Kuo-LeBlanc, V., Rodriguez-Wolf, M., Baird, A., Johanson, C.E., 2001. Human choroid plexus growth factors: What are the implications for CSF dynamics in Alzheimer's disease? *Exp. Neurol.* 167, 40-7.
- Strazielle, N., Gherzi-Egea, J.F., 1999. Demonstration of a coupled metabolism-efflux process at the choroid plexus as a mechanism of brain protection toward xenobiotics. *J. Neurosci.* 19, 6275-6289.
- Sun, H., Tu, X., Prisco, M., Wu, A., Casiburi, I., Baserga, R., 2003. Insulin-like growth factor I receptor signaling and nuclear translocation of insulin receptor substrates 1 and 2. *Mol. Endocrinol.* 17, 472-86.
- Takeda, S., Sato, N., Uchio-Yamada, K., Sawada, K., Kunieda, T., Takeuchi, D., Kurinami, H., Shinohara, M., Rakugi, H., Morishita, R., 2010. Diabetes-accelerated memory dysfunction via cerebrovascular inflammation and Abeta deposition in an Alzheimer mouse model with diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 7036-41.
- Takuma, K., Fang, F., Zhang, W., Yan, S., Fukuzaki, E., Du, H., Sosunov, A., McKhann, G., Funatsu, Y., Nakamichi, N., Nagai, T., Mizoguchi, H., Ibi, D., Hori, O., Ogawa, S., Stern, D.M., Yamada, K., Yan, S.S., 2009. RAGE-mediated signaling contributes to intraneuronal transport of amyloid-beta and neuronal dysfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 20021-20026.
- Thanos, C.G., Bintz, B., Emerich, D.F., 2010. Microencapsulated choroid plexus epithelial cell transplants for repair of the brain. *Adv. Exp. Med. Biol.* 670, 80-91.
- Van Obberghen, E., Baron, V., Delahaye, L., Emanuelli, B., Filippa, N., Giorgetti-Peraldi, S., Lebrun, P., Mothe-Satney, I., Peraldi, P., Rocchi, S., Sawka-Verhelle, D., Tartare-Deckert, S., Giudicelli, J., 2001. Surfing the insulin signaling web. *Eur. J. Clin. Invest.* 31, 966-77.

- Vannucci, S.J., Koehler-Stec, E.M., Li, K., Reynolds, T.H., Clark, R., Simpson, I.A., 1998. GLUT4 glucose transporter expression in rodent brain: effect of diabetes. *Brain Res.* 797, 1-11.
- Vannucci, S.J., Maher, F., Simpson, I.A., 1997. Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. *Glia* 21, 2-21.
- Vannucci, S.J., Rutherford, T., Wilkie, M.B., Simpson, I.A., Lauder, J.M., 2000. Prenatal expression of the GLUT4 glucose transporter in the mouse. *Dev. Neurosci.* 22, 274-82.
- Wang, D., Kaur, C., 2000. Response of epiplexus cells associated with the choroid plexus in the lateral ventricles of adult rats to high altitude exposure. *Neurosci. Lett.* 285, 197-200.
- Wang, R., Li, J.J., Diao, S., Kwak, Y.-D., Liu, L., Zhi, L., Büeler, H., Bhat, N.R., Williams, R.W., Park, E. a, Liao, F.-F., 2013. Metabolic stress modulates Alzheimer's β -secretase gene transcription via SIRT1-PPAR γ -PGC-1 in neurons. *Cell Metab.* 17, 685-94.
- Weindruch, R., Kayo, T., Lee, C.-K., Prolla, T. a, 2002. Effects of caloric restriction on gene expression. *Nestle Nutr. Workshop Ser. Clin. Perform. Programme* 6, 17-28; discussion 28-32.
- Weindruch, R., Keenan, K.P., Carney, J.M., Fernandes, G., Feuers, R.J., Floyd, R.A., Halter, J.B., Ramsey, J.J., Richardson, A., Roth, G.S., Spindler, S.R., 2001. Caloric restriction mimetics: metabolic interventions. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 56 Spec No, 20-33.
- Wen, G.Y., Wisniewski, H.M., Kascsak, R.J., 1999. Biondi ring tangles in the choroid plexus of Alzheimer's disease and normal aging brains: a quantitative study. *Brain Res.* 832, 40-6.
- Wu, A., Sciacca, L., Baserga, R., 2003. Nuclear translocation of insulin receptor substrate-1 by the insulin receptor in mouse embryo fibroblasts. *J. Cell. Physiol.* 195, 453-60.
- Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., Troy, A., Cinti, S., Lowell, B., Scarpulla, R.C., Spiegelman, B.M., 1999. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 98, 115-24.
- Xu, W.L., Atti, A.R., Gatz, M., Pedersen, N.L., Johansson, B., Fratiglioni, L., 2011. Midlife overweight and obesity increase late-life dementia risk: a population-based twin study. *Neurology* 76, 1568-74.
- Yamagishi, N., Ishihara, K., Saito, Y., Hatayama, T., 2003. Hsp105 but not Hsp70 family proteins suppress the aggregation of heat-denatured protein in the presence of ADP. *FEBS Lett.* 555, 390-396.
- Yamagishi, N., Yokota, M., Yasuda, K., Saito, Y., Nagata, K., Hatayama, T., 2011. Characterization of stress sensitivity and chaperone activity of Hsp105 in mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 409, 90-5.
- Yan, S.D., Chen, X., Fu, J., Chen, M., Zhu, H., Roher, A., Slattery, T., Zhao, L., Nagashima, M., Morser, J., Migheli, A., Nawroth, P., Stern, D., Schmidt, A.M., 1996. RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* 382, 685-691.
- Young, B., O'Dowd, G., Woodford, P., 2013. *Wheater's Functional Histology*, 6th ed. Churchill Livingstone.

Restrição de Glucose na Linha Celular do Plexo Coroide de Rato (Células Z310):
Efeito na Remoção do Péptido B-amiloide

- Zainal, T.A., Oberley, T.D., Allison, D.B., Szweda, L.I., Weindruch, R., 2000. Caloric restriction of rhesus monkeys lowers oxidative damage in skeletal muscle. *FASEB J.* 14, 1825-36.
- Zhao, W., Chen, H., Xu, H., Moore, E., Meiri, N., Quon, M.J., Alkon, D.L., 1999. Brain insulin receptors and spatial memory. Correlated changes in gene expression, tyrosine phosphorylation, and signaling molecules in the hippocampus of water maze trained rats. *J. Biol. Chem.* 274, 34893-902.
- Zheng, W., Zhao, Q., 2002. Establishment and characterization of an immortalized Z310 choroidal epithelial cell line from murine choroid plexus. *Brain Res.* 958, 371-380.