



Ana Cláudia Rodrigues Fonseca
Licenciada em Bioquímica

Efeito de um composto organometálico de Au(III) na actividade da aquagliceroporina-3

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica Estrutural e Funcional

Orientadora Prof. Doutora Graça Soveral, Professora
Associada com Agregação, Faculdade de
Farmácia, Universidade de Lisboa

Júri

Presidente Prof. Doutora Isabel Borges Coutinho Medeiros Dias
Arguente Prof. Doutora Maria Teresa Nunes Mangas Catarino
Vogal Prof. Doutora Maria da Graça Tavares Rebelo de
Soveral Rodrigues



Ana Cláudia Rodrigues Fonseca

Licenciada em Bioquímica

**Efeito de um composto organometálico de Au(III) na
actividade da aquagliceroporina-3**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica Estrutural e
Funcional

Orientadora Prof. Doutora Graça Soveral, Professora
Associada com Agregação, Faculdade de
Farmácia, Universidade de Lisboa

Júri

Presidente Prof. Doutora Isabel Borges Coutinho Medeiros Dias
Arguente Prof. Doutora Maria Teresa Nunes Mangas Catarino
Vogal Prof. Doutora Maria da Graça Tavares Rebelo de
Soveral Rodrigues

Efeito de um composto organometálico de Au(III) na actividade da aquagliceroporina-3

Os direitos de autor pertencem à Ana Cláudia Rodrigues Fonseca, à Faculdade de Ciências e Tecnologia e à Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Copyright belong to Ana Cláudia Rodrigues Fonseca and Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

The Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa has the perpetual and geographically unlimited right of archiving and publishing this thesis through printed or digital copies, or by any other means known or to be invented, and to divulgate its contents through scientific repositories and of admitting its copy and distribution with educational, research, noncommercial goals, as long as its author and editor are properly credited.

Os resultados obtidos durante este trabalho experimental deram origem à elaboração de um artigo científico submetido para publicação ao PLOS ONE, estando actualmente em revisão.

Functional inhibition of aquaporin-3 with a gold-based compound induces blockage of cell proliferation

Ana Serna¹, Ana Galán-Cobo^{1#}, Claudia Rodrigues^{2,3#}, Ismael Sánchez-Gomar¹, Juan José Toledo-Aral¹, Teresa F. Moura^{2,3}, Angela Casini⁴, Graça Soveral^{2,3*} and Miriam Echevarría^{1,5*}.

1 Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla (Departamento de Fisiología Médica y Biofísica), Seville, Spain.

2 Research Institute for Medicines and Pharmaceutical Sciences (iMed.UL) and Department of Biochemistry and Human Biology, Faculty of Pharmacy, University of Lisbon, Lisbon, Portugal

3 REQUIMTE, Dep. Química, FCT-UNL, 2829-516 Caparica, Portugal

4 Pharmacokinetics, Toxicology and Targeting, Research Institute of Pharmacy, University of Groningen, Antonius Deusinglaan 1, 9713 AV Groningen, The Netherlands.

5 Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Respiratorias (CIBERES).

These authors contributed equally to this work

Agradecimentos

Chegou novamente o momento em que termino mais um degrau na minha vida académica e não o poderia deixar passar sem agradecer a diferentes pessoas e instituições que contribuíram para o meu desenvolvimento, quer seja a nível profissional ou pessoal.

Em primeiro, quero agradecer à Professora Teresa Moura por me ter recebido no seu laboratório. Para além do seu contributo para o meu conhecimento sobre transportadores biológicos e cinética enzimática, obrigou-me a “intuir” e a pensar sem nunca me dar a resposta de mão beijada. Se acabo esta etapa da minha vida com uma visão diferente para a ciência a ela o devo. Quero também agradecer toda a sua disponibilidade e paciência não só para me esclarecer as inúmeras dúvidas que me surgiram ao longo do caminho mas também por me ensinar a encarar os factos de uma forma mais sábia.

De seguida, gostava de agradecer à Professora Graça Soveral por me ter recebido de braços abertos no seu laboratório. Para além do seu importante papel no meu trabalho experimental teve ainda um papel maior no meu crescimento enquanto pessoa. Ensinou-me e aconselhou-me da melhor forma sempre com um sorriso, acreditando sempre em mim e nas minhas competências. Quero também agradecer-lhe ter-me ajudado num período particular em que garantiu a minha continuidade na vida académica. Agradeço também todos os momentos dispensados para me esclarecer as dúvidas que surgiram ao longo do tempo.

À Joana Matos por me ter passado a grande maioria dos seus conhecimentos sobre microscopia de fluorescência e cultura de células. Sem ela não teria realizado o meu trabalho nesta área.

À Catarina Prista por me ter recebido no seu laboratório, no ISA, e me ter disponibilizado todas as condições para dar início ao meu trabalho experimental.

À Paula Martins e à Ana Madeira não só pela sua disponibilidade em ajudar-me a qualquer momento como também pelos momentos divertidos que se proporcionaram alegrando sempre o ambiente de trabalho.

Quero agradecer também à Melita Hribar pelos momentos divertidos passado no laboratório e também pelas suficientes palavras eslovenas que me ensinou para sobreviver no seu país. Agradeço também à Mariana Nave contagiando-me sempre com a sua boa disposição e ritmo acelerado que lhe é característico.

Não podia faltar um agradecimento especial à Andreia Mósca que já me acompanha há seis longos anos. Já partilhámos inúmeros momentos e peripécias e este último ano não foi excepção. A sua amizade e bom senso foram fundamentais não só para ultrapassar os momentos mais difíceis, como também para celebrar comigo momentos de felicidade. O facto de sermos o oposto uma da outra tornou esta “sociedade” num sucesso. Obrigada por nunca me deixares desanimar mesmo quando as adversidades eram muitas.

Aos meus amigos que de alguma forma contribuíram para me reconfortar e animar mesmo quando o meu tempo para estar com eles escasseava. Especialmente à Rita Lourenço, o meu pilar durante todos estes anos, que sempre acreditou em mim e me deu força para continuar a lutar pelos meus sonhos. “Tu nunca me falhas!”

Quero agradecer também a todos os meus colegas de licenciatura, professores e restantes FCTenses por contribuírem com momentos e experiências que me tornaram no que sou hoje. À grandiosa FCT como instituição de ensino, e como segunda casa, onde passei momentos que nunca esquecerei e onde pretendo retornar o mais breve possível.

Aos meus pais por acreditarem sempre em mim, apoiando todas as minhas decisões sem qualquer tipo de reservas e à minha irmã que me desligou o “complicómetro” inúmeras vezes fazendo-me ver quão simples são as coisas.

Por último, e de todo menos importante, aos meus avós que sempre me educaram, me ensinaram e me aconselharam da melhor forma. Desde sempre estiveram dispostos a ouvir os meus desabaços e a festejar comigo as alegrias que fui tendo ao longo da vida. Nunca esquecerei que “entre mortos e feridos alguém há-de escapar” mas a verdade é que sem eles eu não teria escapado. Obrigado do fundo do coração.

“Só se pode alcançar um grande êxito quando nos mantemos fiéis a nós mesmos”

Friedrich Wilhelm Nietzsche

Resumo

Este trabalho teve como objectivo principal caracterizar as cinéticas de transporte de água e de glicerol da aquagliceroporina-3 (AQP3) através da determinação das respectivas permeabilidades (P_f e P_{gly}), recorrendo à técnica de microscopia de fluorescência. Para além deste, estudou-se a ligação de um composto organometálico com base em Au(III) (Auphen) ao canal da AQP3 avaliando o seu efeito na actividade do canal. Para isso, escolheu-se a linha celular HEK 293T (*Human Embryonic Kidney*) que não apresenta transporte mensurável de glicerol. Esta linha foi transfectada de forma transiente com o gene AQP3 selvagem (AQP3 WT) ou com o gene AQP3 mutante, em que o resíduo Cys-40 foi substituído por um resíduo Ser-40 (AQP3 Mut), ambos de rato (*Rattus norvegicus*). Estas células foram incubadas com a sonda éster metílico da calceína (calceína-AM) que permite monitorizar a variação do volume celular após choques osmóticos, por auto-extinção da sua fluorescência. As experiências foram realizadas em triplicado e obtiveram-se os seguintes parâmetros para as células HEK 293T com AQP3: $P_{f(AQP3WT)} = (7,50 \pm 1,20) \times 10^{-4}$ cm/s (n=11) e $P_{f(AQP3Mut)} = (7,10 \pm 0,60) \times 10^{-4}$ cm/s (n=15); $P_{gly(AQP3WT)} = (3,19 \pm 0,40) \times 10^{-5}$ cm/s (n=11) e $P_{gly(AQP3Mut)} = (3,00 \pm 0,35) \times 10^{-5}$ cm/s (n=12). As células com AQP3 WT e com AQP3 Mut, quando incubadas com 5µM de Auphen, mantiveram a mesma permeabilidade à água contudo a sua permeabilidade ao glicerol foi inibida em 81,5% e em 36,7%, respectivamente.

Na segunda parte do trabalho, aplicou-se a mesma técnica à linha celular tumoral A-431 (carcinoma epidermóide humano) que apresenta sobre-expressão de AQP3 endógena. Nesta linha celular, os parâmetros estimados resultantes das experiências realizadas em triplicado foram: $P_f = (8,20 \pm 0,87) \times 10^{-4}$ cm/s (n=10) e $P_{gly} = (0,52 \pm 0,10) \times 10^{-5}$ cm/s (n=12). Na presença de 5µM de Auphen, as células mantiveram a sua permeabilidade à água enquanto o transporte de glicerol foi inibido em 51,9%, corroborando os resultados anteriores.

Palavras-chave: Aquagliceroporina-3, composto organometálico, microscopia de fluorescência, auto-extinção da fluorescência, transfecção transiente, linha celular HEK 293T, linha celular A-431

Abstract

The experimental work aimed to characterize the kinetics of water and glycerol transport of aquaporin-3 (AQP3) by determining the respective permeabilities (P_f and P_{gly}) using the fluorescence microscopy technique. This experimental work had also aim to study the mechanism of binding of a gold-based compound (Auphen) to the AQP3 channel, evaluating its effect on channel activity. For this, it was chosen HEK 293T cell line (*Human Embryonic Kidney*) that does not show measurable glycerol transport. This cell line was transiently transfected with wild-type AQP3 (WT) or with mutated AQP3 wherein the Cys-40 was replaced by Ser-40 (AQP3 Mut), both of mouse (*Rattus norvegicus*). These cells were incubated with calcein methylester (calcein-AM) that allows monitoring the variation of the cell volume after osmotic shock by fluorescence self-quenching. The experiments were performed in triplicate and were obtained the following parameters for HEK 293T cells transfected with AQP3: P_f (AQP3WT) = $(7,50 \pm 1,20) \times 10^{-4}$ cm/s (n= 11) and P_f (AQP3Mut) = $(7,10 \pm 0,60) \times 10^{-4}$ cm/s (n=15); P_{gly} (AQP3WT) = $(3,19 \pm 0,40) \times 10^{-5}$ cm/s (n=11) and P_{gly} (AQP3Mut) = $(3,00 \pm 0,35) \times 10^{-5}$ cm/s (n=12). HEK cells with AQP3 WT and with AQP3 Mut, when incubated with 5 μ M of Auphen, maintained the same water permeability but its glycerol permeability was inhibited by 81,5% and 36,7%, respectively.

In the second part of this work, was applied the same technique for tumor cell line A-431 (human epidermoid carcinoma) that exhibits an overexpression of endogenous AQP3. For this cell line, the estimated parameters resulting from the experiments performed in triplicate were: P_f = $(8,20 \pm 0,87) \times 10^{-4}$ cm/s (n=10) and P_{gly} = $(0,52 \pm 0,10) \times 10^{-5}$ cm/s (n=12). In the presence of 5 μ M Auphen, cells maintained their water permeability while the transport of glycerol was inhibited by 51,9%, confirming previous results.

Keywords: Aquaglyceroporin-3, organometallic compound, fluorescence microscopy, fluorescence self-quenching, transient transfection, cell line HEK 293T, cell line A-431

Índice

Agradecimentos	ix
Resumo	xi
Abstract	xiii
Índice de Figuras	xvii
Índice de Tabelas	xxi
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	xxiii
I. Introdução	1
1.1. Aquaporinas.....	2
1.1.1. Características funcionais.....	4
1.1.2. Características estruturais.....	5
1.1.3. Aquagliceroporina-3	7
1.2. Desenvolvimento de modeladores farmacológicos	9
1.3. Resposta osmótica das células.....	12
II. Objectivos	17
III. Materiais e Métodos	19
3.1. Células HEK 293T.....	20
3.1.1. Biologia Molecular	20
3.1.1.1. Construção dos plasmídeos.....	20
3.1.1.2. Preparação de células <i>E. coli</i> competentes.....	20
3.1.1.3. Transformação de células <i>E. coli</i> competentes.....	21
3.1.1.4. Armazenamento de células transformadas	21
3.1.1.5. Extracção de DNA.....	22
3.1.2. Microscopia de Fluorescência	23
3.1.2.1. Cultura de Células	23
3.1.2.2. Transfecção Transiente	24
3.1.2.3. Extracção de RNA e análise por RT-qPCR.....	25
3.1.1.1. Variação de fluorescência celular medida pelo método de auto-extinção (<i>self-quenching</i>).....	27
3.1.1.2. Conversão do sinal de fluorescência em volume relativo	29
3.1.1.3. Estimativa dos parâmetros de permeabilidade	30
3.1.1.4. Análise estatística	31
3.2. Células A-431.....	32
3.2.1. Microscopia de Fluorescência	32
3.2.1.1. Cultura de Células	32
3.2.1.2. Variação da fluorescência celular medida pelo método de auto-extinção (<i>self-quenching</i>).....	32
3.2.1.3. Estimativa dos parâmetros de permeabilidade	33
3.2.1.4. Análise estatística	33
IV. Resultados e Discussão	35
4.1. Transformação de células <i>E. coli</i> e extracção de DNA.....	36
4.2. Estudo funcional da AQP3.....	36
4.2.1. Sobre-expressão heteróloga da AQP3 em células HEK 293T.....	37

4.2.1.1.	<i>Avaliação do nível de expressão</i>	37
4.2.1.2.	Caracterização da cinética de transporte da AQP3	38
4.2.1.3.	Estudo do efeito inibidor do Auphen	47
4.2.2.	<i>Expressão homóloga de AQP3 em células A-431</i>	52
4.2.2.1.	Caracterização da cinética de transporte.....	52
4.2.2.2.	Estudo do efeito inibidor do Auphen	54
V.	Conclusões	57
VI.	Bibliografia	61
VII.	Anexos	67
	<i>Anexo I – Meios de Cultura e Antibiótico</i>	68
1.	Meio Luria-Bertani (LB) + Ampicilina (Amp)	68
2.	Ampicilina (Solução Stock 10mg/ml)	68
3.	Meio Super Optimal Broth (SOB)	68
4.	Solução de transformação e armazenamento (TSS)	69
	<i>Anexo II – Mapa do Vector</i>	69
	<i>Anexo III – Preparação de soluções tampão utilizadas nos estudos funcionais</i>	70
1.	Tampão fosfato-salino (PBS)	70
2.	Tampão HEPES	70
3.	Tampão HEPES com manitol	71
4.	Tampão HEPES com glicerol	71
	<i>Anexo IV – Protocolos Experimentais</i>	72
1.	Preparação de células competentes	72
2.	Transformação de células <i>E. coli</i>	72
3.	Kit de extração de DNA Plasmídico (<i>GenElute Plasmid Midiprep Kit</i> Sigma-Aldrich®)	73
3.1.	Preparação das soluções	73
3.2.	Procedimento	73
4.	Trasfecção de células eucarióticas (<i>Lipofectamina 2000</i>)	75
4.1.	Preparação das células	75
4.2.	Procedimento	75
5.	Isolamento de RNA de células eucarióticas (<i>TRizol</i>)	76
6.	Síntese de cDNA por transcrição reversa (<i>SuperScript II RT</i>)	76

Índice de Figuras

		Página
Figura I.1.	Representação esquemática das vias de transporte de água através dos epitélios. A via transcelular está associada ao movimento de água através das células epiteliais e a via paracelular está associada ao movimento de água no espaço inter-celular, regulado pelas junções apertadas. Imagem adaptada [4].	2
Figura I.2.	Estrutura tridimensional da bAQP1 (<i>Bos taurus</i>). Representação do homotetrâmero da AQP1 (<i>Bos taurus</i>) determinada, em 2001, por cristalografia de raios-x com uma alta resolução (2,2Å). (A) Vista lateral e (B) Vista de cima e de baixo, respectivamente. Imagem construída no <i>software UCSF Chimera</i> (código pdb: 1J4N).	5
Figura I.3.	Estrutura tridimensional do monómero da bAQP1 (<i>Bos taurus</i>). (A) Representação do monómero da bAQP1, com a respectiva numeração das hélices e <i>loops</i> . A malha vermelha indica a região do poro; (B) Representação detalhada do poro e dos resíduos, presentes na parede do canal, relevantes para a sua selectividade. Imagem adaptada [17].	6
Figura I.4.	Representação esquemática da pele humana. A pele é composta por três regiões: 1) a hipoderme que corresponde à região mais profunda e contém os adipócitos; 2) acima desta, está a derme que é uma matriz complexa de colagénio e elastina; 3) por último, encontra-se a epiderme composta maioritariamente (≈95%) por queratinócitos e que funciona, essencialmente, como uma barreira efectiva contra a evaporação da água. Imagem adaptada [30].	8
Figura I.5.	Representação esquemática da importância da AQP3 na proliferação celular. Mecanismo proposto na proliferação celular como resultado do aumento da quantidade de ATP produzida pela entrada de glicerol nas células através da AQP3. Imagem adaptada [34].	9
Figura I.6.	Representação da estrutura do Auphen. Imagem adaptada [35].	11
Figura I.7.	Acoplamento do composto Auphen à AQP1 e a AQP3. Representação das melhores posições do Auphen na cavidade periplasmática da AQP1 (direita) e da AQP3 (esquerda). Apresentação da distância do composto ao resíduo Cys, em ambas. Imagem adaptada [35].	11
Figura III.1.	Representação esquemática de um hemocitómetro (câmara de Neubauer). (A) Vista lateral, (B) Vista de topo e (C) Grelha vista ao microscópio. Imagem adaptada [45].	25

Figura III.2.	Representação esquemática da estrutura da calceína-AM. Esta sonda, na sua forma esterificada (direita) é capaz de atravessar a membrana celular. No citosol, e após clivagem por esterases, esta sonda torna-se impermeável e, quando excitada a 495nm, apresenta uma cor verde que se deve à emissão de fluorescência. Imagem adaptada [50].	27
Figura III.3.	Esquema de montagem do sistema de fluorescência. (A) Câmara de perfusão; (B) Microscópio de epifluorescência; (C) Sistema de seringas para introdução dos choques osmóticos; (D) Câmara de aquisição; (E) Computador.	29
Figura III.4.	Diagrama de fluxo. Representação esquemática da estratégia utilizada na estimativa dos parâmetros de permeabilidade obtidos por ajuste de curvas teóricas, geradas por simulação numérica do modelo matemático, aos dados experimentais.	31
Figura IV.1.	Nível de expressão relativo de mRNA AQP3, por RT-qPCR. Gráfico comparativo do nível de expressão da AQP3, selvagem e mutada, em células HEK 293T transfectadas. Utilizou-se a amplificação da ciclofilina como controlo.	38
Figura IV.2.	Células HEK 293T incubadas com calceína-AM.	38
Figura IV.3.	Registo dos dados obtidos durante um ensaio experimental, utilizando o software Metafluor. (A) Delimitação das células. (B) Sinal de fluorescência, ao longo do tempo, obtido para cada célula delimitada.	39
Figura IV.4.	Representação gráfica do sinal de fluorescência em função do tempo. A azul (●) apresenta-se o sinal de fluorescência com o factor <i>bleaching</i> . A estes pontos experimentais subtraiu-se a recta (▲) que resultou no sinal a laranja (■), isto é, no sinal de fluorescência sem o factor <i>bleaching</i> .	40
Figura IV.5.	Determinação do volume celular utilizando o software ImageJ. Delimitação das células (A) no instante da introdução do choque e (B) no novo equilíbrio osmótico.	41
Figura IV.6.	Representação gráfica da variação de volume celular relativo ao longo do tempo. Após a calibração dos sinais de fluorescência recolhidos e tratados, obteve-se os sinais em volume relativo ($0 < v_{rel} < 1$) que foram utilizados para estimar os parâmetros de permeabilidade.	42

Figura IV.7.	<p>Representação gráfica da variação de volume celular relativo ao longo do tempo, e respectivos assentamentos das curvas teóricas aos dados experimentais (—). A azul (◦), a laranja (◻) e a verde (△) correspondem os dados experimentais calibrados para as células com pSport1 (controlo), AQP3 selvagem e AQP3 mutada (Cys40Ser), respectivamente. Inicialmente, o ajuste das curvas teóricas foi realizado, aproximadamente, entre os 60s e 160s para estimar o parâmetro de permeabilidade à água (P_f). Durante este período as células estiveram incubadas com manitol. De seguida, o ajuste da curva teórica foi realizado, aproximadamente, entre os 265s e 400s para estimar o parâmetro de permeabilidade ao glicerol (P_{gly}). Durante este período as células estiveram incubadas com glicerol. Para os diferentes ajustes considerou-se a média do raio celular inicial (r_0) igual a 7,5μm.</p>	44
Figura IV.8.	<p>Estudo funcional do transporte de água em células HEK 293T com pSport1 (controlo) e em células HEK 293T com sobre-expressão do gene AQP3 selvagem e AQP3 mutada (Cys40Ser). Este gráfico representa os valores de permeabilidade à água estimados, com o respectivo desvio padrão calculado.</p>	45
Figura IV.9.	<p>Estudo funcional do transporte de glicerol em células HEK 293T com pSport1 (controlo) e em células HEK 293T com sobre-expressão do gene AQP3 selvagem e AQP3 mutada (Cys40Ser). Este gráfico representa os valores de permeabilidade à água estimados, com o respectivo desvio padrão calculado.</p>	46
Figura IV.10.	<p>Representação gráfica da variação de volume celular relativo ao longo do tempo, e respectivos assentamentos das curvas teóricas aos dados experimentais (—). (A) Dados experimentais calibrados para as células com AQP3 selvagem e (B) para células com AQP3 mutada (Cys40Ser) sem incubação de Auphen (◻) e com incubação de 5μM Auphen (◦). O ajuste da curva teórica foi realizado, aproximadamente, entre os 265s e 400s para estimar o parâmetro P_{gly}. Durante este período as células estiveram incubadas com glicerol. Para os diferentes ajustes considerou-se a média do raio celular inicial (r_0) igual a 7,5μm.</p>	48
Figura IV.11.	<p>Estudo funcional do transporte de água em células HEK 293T com pSport1 (controlo) e em células HEK 293T com sobre-expressão do gene AQP3 selvagem e AQP3 mutada (Cys40Ser). Este gráfico representa os valores de permeabilidade à água estimados, com o respectivo desvio padrão calculado, para as células sem incubação e com incubação de 5μM Auphen.</p>	49
Figura IV.12.	<p>Estudo funcional do transporte de glicerol em células HEK 293T com pSport1 (controlo) e em células HEK 293T com sobre-expressão do gene AQP3 selvagem e AQP3 mutada (Cys40Ser). Este gráfico representa os valores de permeabilidade à água estimados, com o respectivo desvio padrão calculado, para as células sem incubação e com incubação de 5μM Auphen.</p>	50

Figura IV.13.	Células A-431 incubadas com calceína-AM.	52
Figura IV.14.	Representação gráfica da variação de volume celular relativo ao longo do tempo, e respectivos assentamentos das curvas teóricas aos dados experimentais (—). A azul (□) e a laranja (○) correspondem os dados experimentais calibrados para as células após sofrerem um choque com manitol e glicerol, respectivamente. O ajuste das curvas teóricas aos dados experimentais foi realizado entre os 80s e 130s para estimar o parâmetro P_f e P_{gly} . Para os diferentes ajustes considerou-se a média do raio celular inicial (r_0) igual a 8,7 μ m.	53
Figura IV.15.	Representação gráfica da variação de volume celular relativo ao longo do tempo, e respectivos assentamentos das curvas teóricas aos dados experimentais (—). A azul (□) e a laranja (○) correspondem os dados experimentais calibrados para as células sem incubação e com incubação de 5 μ M Auphen, respectivamente. O ajuste das curvas teóricas aos dados experimentais foi realizado entre os 80s e 130s, período durante o qual as células sofreram um choque com glicerol. Para os diferentes ajustes considerou-se a média do raio celular inicial (r_0) igual a 8,7 μ m.	54
Figura IV.16.	Estudo funcional do transporte de água e glicerol em células A-431. Estes gráficos representam os valores de permeabilidade (A) à água e (B) ao glicerol estimados, com o respectivo desvio padrão calculado, para as células sem incubação e com incubação de 5 μ M Auphen.	55
Figura VII.1.	Mapa de restrição do vector pSport1-AQP3 (<i>Rattus norvegicus</i>). Vector de expressão construído no <i>software SnapGene</i> . A inserção do gene AQP3 (<i>Rattus norvegicus</i>) ocorreu nos locais específicos das enzimas de restrição <i>Mlu I</i> e <i>Not I</i> .	69

Índice de Tabelas

		Página
Tabela I.1.	Distribuição das aquaporinas de mamífero nos tecidos [19].	3
Tabela I.2.	Características funcionais das aquaporinas humanas [19].	4
Tabela III.1.	Sequência nucleotídica dos primers desenhados para a amplificação, por RT-qPCR, do gene ciclofilina e AQP3 de <i>Rattus norvegicus</i> .	26
Tabela IV.1.	Concentração, e respectiva razão de pureza, determinada para cada amostra de DNA extraído.	36
Tabela IV.2.	Determinação do volume, nos dois instantes de tempo analisados, através da relação pixel/área e consequente conversão em volume, considerando as células esféricas.	41
Tabela IV.3.	Parâmetros constantes utilizados no <i>software Berkeley Madonna</i> , para estimar os parâmetros de permeabilidade.	43
Tabela VII.1.	Composição do meio LB utilizado na cultura de <i>E. coli</i> . Após perfazer o volume, acertar o pH do meio para 7 e autoclavar durante 15 minutos a 1atm.	68
Tabela VII.2.	Composição do meio SOB utilizado na cultura de <i>E. coli</i> . Após perfazer o volume, acertar o pH do meio para 7 e autoclavar durante 15 minutos a 1atm.	68
Tabela VII.3.	Composição da solução 2x TSS (<i>transformation and storage solution</i>) utilizada na preparação de células <i>E. coli</i> competentes. Após perfazer o volume, autoclavar durante 15min a 1atm.	69
Tabela VII.4.	Composição da solução PBS utilizado para lavar as células humanas. Após perfazer o volume, acertar o pH do meio para 7,4 e autoclavar durante 50 minutos a 1atm.	70
Tabela VII.5.	Composição do tampão HEPES utilizado nos estudos funcionais para equilibrar as células. Após perfazer o volume, acertar o pH do meio para 7,4 e medir a osmolaridade final.	70
Tabela VII.6.	Composição do tampão HEPES com manitol utilizado nos estudos funcionais para induzir o choque osmótico. Após perfazer o volume, acertar o pH do meio para 7,4 e medir a osmolaridade final.	71
Tabela VII.7.	Composição do tampão HEPES com glicerol utilizado nos estudos funcionais para induzir o choque osmótico. Após perfazer o volume, acertar o pH do meio para 7,4 e medir a osmolaridade final.	71
Tabela VII.8.	Quantidade final da composição para realizar a reacção de transcrição reversa. Perfazer o volume até 12µl com água destilada e esterilizada.	76

Lista de Abreviaturas e Símbolos

		Unidades
A	Área	cm ²
[Au(phen)Cl₂]Cl	Auphen	
AQP(s)	Aquaporina(s)	
AQP3	Aquagliceroporina-3	
b	Volume não-osmótico relativo	
bAQP1	Aquaporina-1 de bovino	
c	Concentração molar	mol.dm ⁻³
Calceína-AM	Éster metílico da calceína	
Cys40Ser	Alteração do resíduo cisteína, localizada na posição 40 da sequência da AQP3, por uma serina	
DEPC	Dietilprocarbonato	
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco (<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>)	
DMSO	Dimetilsulfóxido	
DO_{600nm}	Densidade óptica medida a 600nm	
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	
FBS	Soro de bovino fetal (<i>Fetal Bovine Serum</i>)	
GlpF	Canal facilitador de glicerol (<i>glycerol facilitator protein</i>)	
HEK	Rim embrionário humano (<i>Human Embryonic Kidney</i>)	
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico	
in	Interno	
inf	Infinito	
J_s	Fluxo de soluto	mol.s ⁻¹

J_v	Fluxo de água	cm ³ .s ⁻¹
Mut	Mutada	
ND	Solutos não-difusíveis	
osm	Osmolaridade	mOsm
out	Externo	
P/S	Penicilina/Estreptomicina (<i>Penicillin/Streptomycin</i>)	
PBS	Tampão fosfato-salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)	
PCR	Reacção em cadeia de polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	
P_f	Coeficiente de permeabilidade à água	cm.s ⁻¹
P_{gly}	Coeficiente de permeabilidade ao glicerol	cm.s ⁻¹
phen	1,10-fenantrolina	
Q	Quantidade molar	mol
R	Constante dos gases perfeitos	J.mol ⁻¹ .K ⁻¹
RT	Transcriptase reversa (<i>Reverse transcriptase</i>)	
RT-qPCR	Reacção em cadeia da polimerase da transcrição reversa (<i>Reverse Transcription-quantitative PCR</i>)	
S	Soluto permeante	
SN	Sobrenadante	
T	Temperatura	K
T_m	Temperatura de fusão (<i>Melting temperature</i>)	
TSS	Solução de transformação e armazenamento (<i>Transformation and storage solution</i>)	
UV	Ultravioleta	
V	Volume celular total	cm ³
V_{osm}	Volume osmótico relativo	
V_{rel}	Volume relativo celular	
V_w	Volume parcial da água	cm ³ .mol ⁻¹
WT	Selvagem (<i>Wild-Type</i>)	
Δπ	Diferença de pressão osmótica	J.cm ⁻³
Λ	Tonicidade	

I. Introdução

1.1. Aquaporinas

A água é a molécula mais abundante na Natureza e está presente em todos os seres vivos [1]. A percentagem de água nos organismos varia de acordo com diferentes factores, tais como a espécie e a idade [1]. Nos humanos, e considerando um indivíduo adulto, a água representa 60% do peso total o que corresponde, aproximadamente, a 42L num indivíduo com 70kg em que 35% e 65% constituem o fluído extracelular e intracelular, respectivamente [2]. Esta molécula participa directamente em inúmeras reacções metabólicas, servindo como principal meio de transporte de compostos e substâncias entre as células e equilibrando a osmolaridade intracelular, por alteração do volume intracelular, para manter a homeostase [3]. Estas, entre outras funções, em conjunto com as suas características químicas tornaram-na num componente vital para a manutenção da viabilidade celular.

O movimento da água entre as células deve-se, na sua maioria, como resposta a gradientes osmóticos provocados por fluxos de iões [2, 3]. O movimento tanto pode dar-se entre as células (movimento via paracelular) como através das células (movimento via transcelular) (Figura I.1) [2].

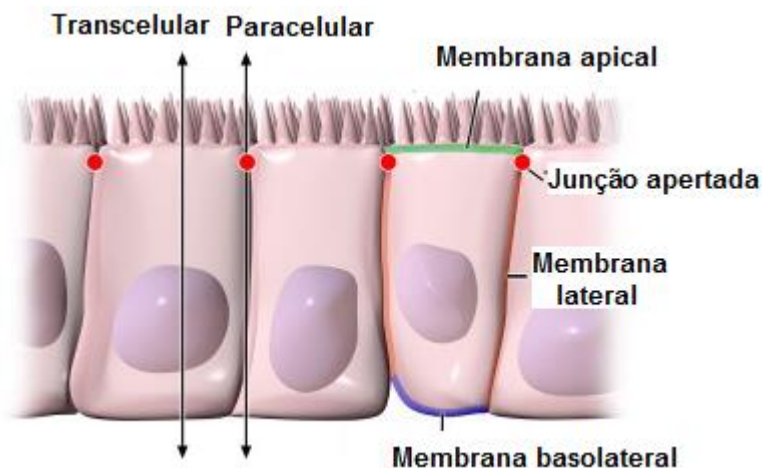


Figura I.1. Representação esquemática das vias de transporte de água através dos epitélios. A via transcelular está associada ao movimento de água através das células epiteliais e a via paracelular está associada ao movimento de água no espaço inter-celular, regulado pelas junções apertadas. Imagem adaptada [4].

Tendo em conta as duas formas de transporte de água entre as células, durante muito tempo se colocou a hipótese de como seria possível a água, uma molécula polar hidrofílica, atravessar a zona hidrofóbica da membrana celular. De facto, foram propostas três vias de transporte de água transmembranar: *i*) por difusão, em que a barreira energética é muito elevada sendo por isso a via mais lenta e menos regulada; *ii*) por co-transporte passivo, em que o movimento de água é feito acompanhando o movimento de outros solutos mesmo contra o gradiente osmótico; *iii*) por canais de água, em que proteínas transmembranares proporcionam um caminho através da membrana com uma pequena barreira energética permitindo um caminho rápido, regulado e selectivo [2]. Na

realidade, já em 1877, Pfeffer tinha colocado a hipótese de existir, na membrana celular, poros selectivos para a água [5]. Contudo só muitos anos mais tarde, entre a década de 60 e 80, e após o desenvolvimento pioneiro de um sistema capaz de medir a velocidade do movimento de água, é que esta hipótese foi corroborada [6–8]. Durante este período, Agre, Preston e os seus colegas reportaram a purificação da proteína CHIP28 de glóbulos vermelhos e caracterizaram-na, posteriormente, como um canal de água em *Xenopus oocytes*, identificando o fenómeno do transporte de água [5, 9]. Esta proteína foi posteriormente renomeada como aquaporina-1 (AQP1) [10]. Ao analisar a sequência genética verificou-se uma elevada homologia com uma antiga família de canais transmembranares conhecida como MIP ou *Major Intrinsic Proteins* [11].

A família de aquaporinas (AQPs) está presente em todos os reinos incluindo *archae, eubacteria, fungi, plantae e animalia* [12] e desde a década de 80 até a actualidade já foram identificadas mais de 450 AQPs individuais e continuam a ser estudadas funcional e estruturalmente inúmeras isoformas [13, 14], com uma elevada homologia entre as sequências das proteínas (25 a 60%) [15]. De acordo com a complexidade do organismo, o número de AQPs expressas e a sua localização varia [13]. Em microorganismos unicelulares, o número de genes codificantes para AQPs é muito reduzido, como por exemplo a *Escherichia coli* (*E. coli*) possui apenas dois, um codificante para um canal de água e outro para um transportador de glicerol [16]. Por outro lado, os humanos expressam 13 aquaporinas diferentes (AQP0-12) em órgãos, tecidos e localizações celulares específicas [13, 17]. Na Tabela I.1 apresenta-se a distribuição destas proteínas nos tecidos. Esta diversidade e distribuição no organismo sugerem que cada uma possui funções específicas em cada tecido [18].

Tabela I.1. Distribuição das aquaporinas de mamífero nos tecidos [19].

	AQP0	AQP1	AQP2	AQP3	AQP4	AQP5	AQP6	AQP7	AQP8	AQP9	AQP10	AQP11	AQP12
Cérebro	-	+	-	+	++	-	+	-	-	-	-	+	-
Olho	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Glândula salivar	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
Traqueia	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
Pulmão	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Coração	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-
Fígado	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-
Pâncreas	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Baço	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Tracto GI	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-
Rim	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-
Testículo	-	-	-	-	-	-	-	++	++	+	-	++	-
Ovário	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-
Musculo	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
Leucócito	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Eritrócito	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

1.1.1. Características funcionais

Funcionalmente, as AQPs podem ser agrupadas em três subclasses diferentes: *i*) aquaporinas clássicas ou ortodoxas, específicas no transporte de água; *ii*) aquagliceroporinas, que além do transporte de água conseguem permear pequenos solutos não-carregados como glicerol e ureia; 3) aquaporinas sub-celulares localizadas em organelos intracelulares [17]. As AQPs apresentam uma elevada selectividade e eficiência no transporte tanto de água como de glicerol e permitem o movimento livre e bidireccional, através da membrana celular, excluindo todos os iões, incluindo hidrónio e hidróxido, e protões [17]. A exclusão de protões por parte das AQPs é um fenómeno essencial para manter o potencial electrostático através da membrana celular [17].

Na Tabela I.2 são apresentadas algumas características das AQPs humanas onde se verifica que existem algumas mais permeáveis à água e que apenas a AQP3, AQP7, AQP9 e AQP10 são permeáveis ao glicerol. Estas são também permeáveis à ureia enquanto a AQP8 é permeável à ureia e à amónia [14, 20].

Tabela I.2. Características funcionais das aquaporinas humanas [19].

	AQP0	AQP1	AQP2	AQP3	AQP4	AQP5	AQP6	AQP7	AQP8	AQP9	AQP10	AQP11	AQP12
Transporte de água	+	+++	+++	++	++++	+++	++	++	++++	++	++	+++	?
Transporte de glicerol	-	-	-	++	-	-	-	++	-	++	++	?	?
Número de exões	4	4	4	6	4	4	4	6	6	6	6	3	3
Locus	12q13	7p14	12q13	9p13	18q22	12q13	12q13	9p13	16p12	15q22	1q21	11q13	2q27

A importância fisiológica destas proteínas foi profundamente estudada através da análise de fenótipos geneticamente modificados de diferentes espécies sem expressão das aquaporinas, ou com expressão de mutantes [5, 15, 21]. Estes estudos confirmaram o seu envolvimento, previamente sugerido, na manutenção da homeostase celular, no mecanismo de concentração urinário e na secreção do fluído glandular [22]. Contudo, os resultados obtidos permitiram descobrir novas funções desconhecidas das AQPs na excitabilidade neuronal, metabolismo de lípidos, no balanço de água no cérebro, na hidratação da pele, na transdução de sinal neuronal, na migração e proliferação celular [21–23]. Para além destas funções fisiológicas, nestes estudos observou-se a alteração da distribuição e da expressão das AQPs em diferentes situações patológicas tais como glaucoma, cancro, epilepsia e obesidade, entre muitas outras [22, 24]. A perda de função da AQP, devido a mutações pontuais, também pode causar doenças humanas, como na diabetes insipidus, contudo esta situação é muito rara [22].

1.1.2. Características estruturais

As aquaporinas são maioritariamente hidrofóbicas, aumentando a dificuldade da determinação de estruturas com alta resolução. Foi necessário recorrer a diferentes técnicas tais como microscopia electrónica, espectroscopia ou mutagénese [25] optimizando as condições de aquisição em cada um dos casos. A primeira estrutura de alta resolução obtida foi da AQP1 (Figura I.2), apenas em 2001, mas actualmente já são conhecidas pelo menos mais 10 estruturas de alta resolução [17]. Estas revelaram que as AQPs formam homotetrâmeros, em que cada monómero corresponde a um canal de água individualizado [13, 17]. O poro central do homotetrâmero, formado pela interacção de cada monómero com dois dos seus vizinhos, exclui as moléculas de água [26] mas tem sido sugerido que está associado ao transporte de gases e a funcionar como um canal catiónico [27, 28]. Na Figura I.2 apresenta-se a estrutura tridimensional (vista lateral e de topo) do tetrâmero das AQPs, exemplificado com a AQP1 de bovino (bAQP1).

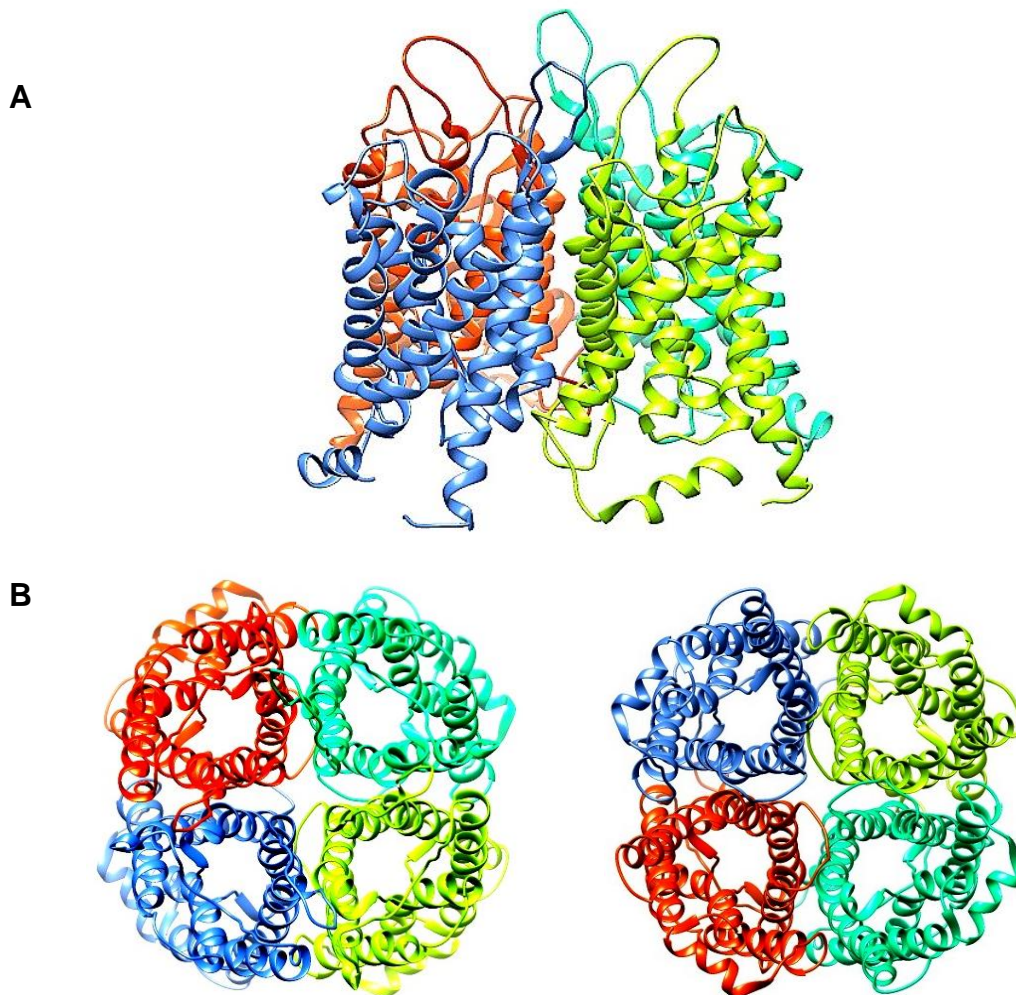


Figura I.2. Estrutura tridimensional da bAQP1 (*Bos taurus*). Representação do homotetrâmero da AQP1 (*Bos taurus*) determinada, em 2001, por cristalografia de raios-x com uma alta resolução (2,2Å). (A) Vista lateral e (B) Vista de cima e de baixo, respectivamente. Imagem construída no software UCSF Chimera (código pdb: 1J4N).

As aquaporinas são uma família de pequenas proteínas transmembranares, em que cada monómero é constituído por cerca de 300 resíduos, com 6 hélices transmembranares altamente hidrofóbicas (1 a 6) [17]. Cada monómero (Figura I.3 A) é constituído por uma repetição paralela interna [13], em que cada metade é composta pelas hélices 2-1-3 e 5-4-6, com o N- e o C-terminal orientados para o lado citoplasmático, unidos por 5 *loops* (A-E) [17]. Esta característica estrutural deve-se à duplicação do gene durante o processo evolutivo [5]. O *loop* B e E contêm a sequência NPA (Asn-Pro-Ala) altamente conservada nas AQPs e que constitui uma assinatura da superfamília MIP [17]. Estes dois *loops* têm a particularidade de se dobrarem sob a forma de uma pequena hélice- α para dentro da membrana (HB e HE), em que o *loop* B entra do lado citoplasmático e o *loop* E entra do lado exoplasmático [13, 17]. Juntas, estas duas pequenas meias hélices formam a sétima hélice transmembranar com a sequência NPA de cada uma orientada 180° com a outra [17]. Finalmente, tendo em conta a duplicação interna da sequência juntamente com a sobreposição dos *loops* NPA no centro do poro, estreitando esta zona do poro, propôs-se um modelo de ampulheta para a estrutura das AQPs, confirmado posteriormente pela estrutura tridimensional da AQP1 [12, 17].

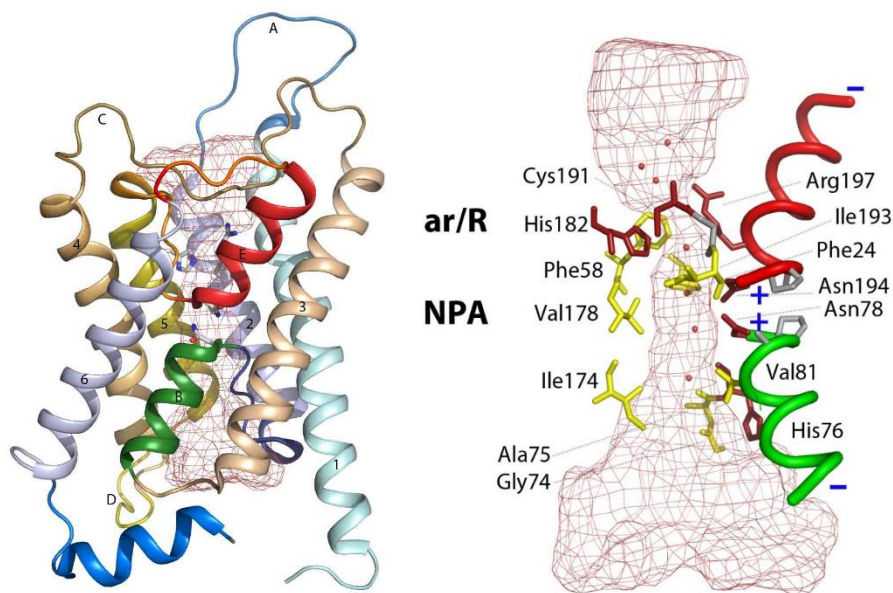


Figura I.3. Estrutura tridimensional do monómero da bAQP1 (*Bos taurus*). (A) Representação do monómero da bAQP1, com a respectiva numeração das hélices e *loops*. A malha vermelha indica a região do poro; (B) Representação detalhada do poro e dos resíduos, presentes na parede do canal, relevantes para a sua selectividade. Imagem adaptada [17].

Cada aquaporina possui dois filtros selectivos, um de exclusão de tamanho e outro de exclusão de cargas, na região central do poro [13, 17]. Estes filtros apresentam pequenas diferenças entre as AQPs ortodoxas e as aquagliceroporinas. Na Figura I.3 B está representado esquematicamente a região do poro de bAQP1 através da rede vermelha, indicando a localização dos resíduos que revestem a parede do poro e que são relevantes para a selectividade juntamente com as duas meias hélices que se comportam

como dipolos em que a carga positiva está orientada para o centro do poro [17]. A vermelho estão representados os resíduos hidrofílicos, que conseguem estabelecer ligações com as moléculas de água, e a amarelo estão representados os resíduos hidrofóbicos [17].

Na entrada do poro, tanto do lado periplasmático como citoplasmático, existem inúmeras interações entre as moléculas de água e os resíduos da parede da AQP, principalmente com grupos carbonilo [17]. Após estas interações, as moléculas encontram a zona mais estreita do poro constituída por resíduos aromáticos e argininas, altamente conservados nas AQPs e que formam o local de constrição ar/R. Na bAQP1 (AQP ortodoxa), este local de constrição é formado por 4 resíduos: Phe58, His180, Cys189 e Arg195 enquanto no canal facilitador de glicerol (GlpF¹), esta região é formada pelos seguintes resíduos: Trp48, Gly191, Phe200 e Arg205 [13, 17]. A diferença dos resíduos entre os dois grupos de AQPs faz variar o tamanho do diâmetro do poro. Nas AQPs ortodoxas esta região tem apenas 2,8Å, ou seja, o suficiente para permitir a passagem de moléculas de água e excluir moléculas de diâmetro superior, enquanto nas aquagliceroporinas esta região tem cerca de 3,4Å e permite a passagem de moléculas como o glicerol ou outros solutos de diâmetro inferior [13].

O segundo filtro encontra-se na zona central do poro, na região das duas meias hélices que possuem a sequência NPA. As moléculas de água são repelidas pela Val178, um resíduo hidrofóbico que se introduz no poro como se pode verificar na Figura I.3 B [17]. Esta repulsão obriga as moléculas de água a interagir fortemente com as Asn194 e Asn78 das sequências NPA [17]. Nesta região, as moléculas de água são obrigadas a reorientarem-se 180°, devido ao campo eléctrico local dominado pelos macrodipolos das meias hélices HB e HE, para que se quebrem as pontes de hidrogénio formadas [13, 17]. Este mecanismo previne a formação de um fio de protões através do poro e representa a maior barreira energética para a condutância de protões [13].

1.1.3. Aquagliceroporina-3

Especificamente, a AQP3 pertence ao grupo das aquagliceroporinas, isto é transporta água e glicerol através da membrana celular, e foi identificada em inúmeros tecidos de mamíferos como no cérebro, olho, coração, fígado, entre outros [19]. Complementarmente, em 2002, Sougrat e os seus colegas demonstraram que a AQP3 é abundantemente expressa na epiderme humana, especificamente na membrana plasmática dos queratinócitos do estrato basal e do estrato espinhoso [29]. Estas células constituem maioritariamente (≈95%) a epiderme, a camada mais superficial da pele (Figura I.4) [30].

¹GlpF (*Glycerol facilitator protein*) – é um canal de água expresso em *E. coli* pertence à família das AQPs e facilita a permeabilidade de água e glicerol através da membrana. Esta proteína, cuja estrutura de alta resolução (2,2Å) foi determinado em 2002, apresenta uma elevada homologia com as aquagliceroporinas de mamíferos pelo que serve com um bom modelo para estudar as diferenças entre estas e as AQPs ortodoxas [58, 59]

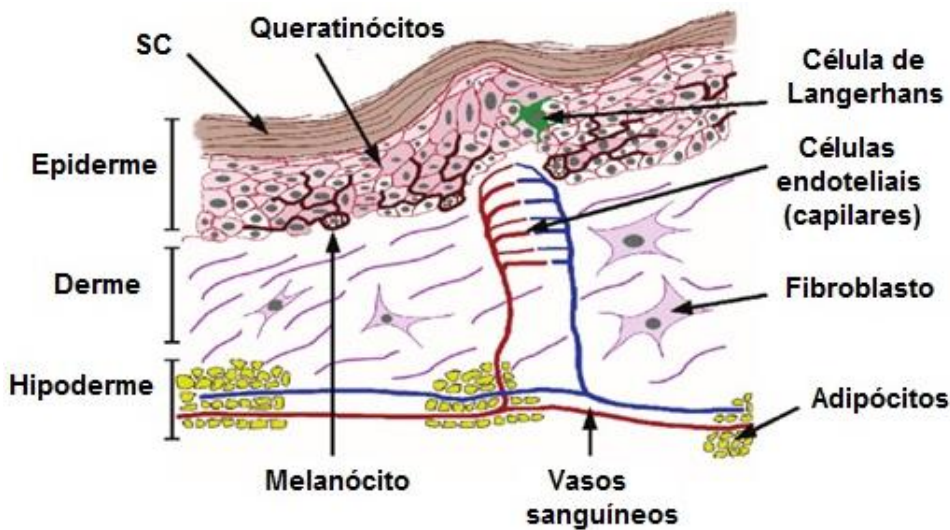


Figura I.4. Representação esquemática da pele humana. A pele é composta por três regiões: 1) a hipoderme que corresponde à região mais profunda e contém os adipócitos; 2) acima desta, está a derme que é uma matriz complexa de colagénio e elastina; 3) por último, encontra-se a epiderme composta maioritariamente ($\approx 95\%$) por queratinócitos e que funciona, essencialmente, como uma barreira efectiva contra a evaporação da água. Imagem adaptada [30].

Com o objectivo de estudar a importância fisiológica desta proteína na pele foram analisados fenótipos geneticamente modificados de pele de ratinho (sem expressão da AQP3). Os resultados obtidos por Hara e os seus colegas, em 2002, permitiram confirmar a importância fisiológica da AQP3 na hidratação (pele seca) e elasticidade da pele e na cicatrização de feridas [31]. Para além destes efeitos, verificou-se uma diminuição do conteúdo celular de água e glicerol, bem como a diminuição das suas permeabilidades respectivas, sem qualquer tipo de alteração morfológica epidermal [31].

Após verificar a importância fisiológica da AQP3 na pele, foram realizados mais ensaios, nas mesmas condições, para determinar qual o tipo de transporte de água e/ou de glicerol responsável pelas funções fisiológicas verificadas [30]. Os dados obtidos permitiram concluir que o transporte de glicerol, mais do que o da água, através da AQP3 é o principal factor na fisiologia da pele [30]. Estas conclusões tiveram como base diferentes resultados, entre os quais: *i)* a pele seca não é corrigida por oclusão nem por exposição a uma atmosfera húmida; *ii)* a substituição de glicerol corrige o fenótipo geneticamente modificado, com a consequente regulação da hidratação e elasticidade da pele [30, 32].

Para além da importância da AQP3 nestas funções fisiológicas, Hara e os seus colegas, em 2002, associaram esta proteína à cicatrização de feridas [31]. A re-epitelização é um passo crucial durante este processo que envolve a migração e a proliferação de queratinócitos [32], e cujo transporte de água e glicerol através da AQP3 é fundamental. Este fenómeno foi verificado recentemente, em que a redução do transporte de água e de glicerol testada em queratinócitos de fenótipos geneticamente modificados (sem expressão da AQP3) resultou numa diminuição da migração e de proliferação deste tipo de células [32]. Especificamente, a migração celular é acompanhada por alterações

da morfologia celular e do movimento da água, em que o papel das AQPs nesta função é atribuído à sua propriedade de transporte selectivo de água [33]. Por outro lado, a capacidade de proliferação celular deve-se em grande parte ao conteúdo de glicerol, glucose e conseqüentemente de ATP, presente nas células (Figura I.5) [33, 34]. A AQP3 facilita a entrada de glicerol que é, maioritariamente, metabolizado em glicerol-3-fosfato, um intermediário da glicólise que gera moléculas de ATP, necessárias para a proliferação celular [33].

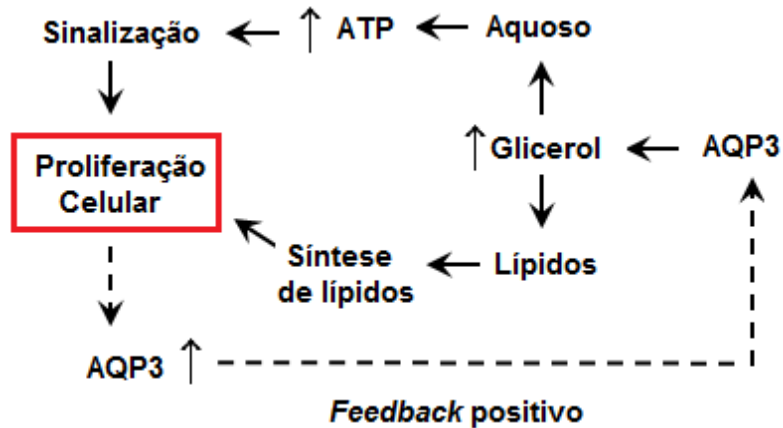


Figura I.5. Representação esquemática da importância da AQP3 na proliferação celular. Mecanismo proposto na proliferação celular como resultado do aumento da quantidade de ATP produzida pela entrada de glicerol nas células através da AQP3. Imagem adaptada [34].

Complementarmente, foi verificada uma sobre-expressão da AQP3 em células basais escamosas de carcinoma epidermal humano [32] e estudos de regulação da proliferação celular demonstraram que em ratos sem expressão da AQP3 não existia a formação de tumor de pele [33]. Este possível envolvimento da AQP3 na tumorigênese da pele abre uma nova perspectiva sobre esta proteína, aumentando o interesse no desenvolvimento de moduladores que possam regular a sua função para a prevenção e terapia do tumor de pele [35].

1.2. Desenvolvimento de modeladores farmacológicos

Desde a identificação da primeira AQP, há mais de 20 anos atrás, que o conhecimento a nível estrutural, funcional e fisiológico desta família de proteínas transmembranares foi aumentando consideravelmente, através de estudos de fenótipos geneticamente modificados. A conjugação destas áreas de conhecimento permitiram iniciar uma nova era em que o transporte de água e de solutos se tornou o principal alvo para uma intervenção farmacológica [24]. Compostos modeladores de aquaporinas apresentam, desta forma, um vasto potencial de utilidade no tratamento de diferentes doenças, principalmente na área oncológica, às quais estas proteínas foram recentemente associadas [24, 35].

Estão descritos na literatura diferentes compostos químicos que modulam o transporte de água através das AQPs, sendo que a sua grande maioria são metais pesados, sais quaternários de amónio e sais inorgânicos [24]. Por exemplo, várias AQPs são inibidas por compostos de mercúrio, como o HgCl_2 . No entanto, estas substâncias não são selectivas na sua acção e são extremamente tóxicas [36]. Compostos como a butanamida e a furosemida foram identificados como bloqueadores da AQP1 e da AQP4, contudo apresentaram níveis de inibição muito fracos quando introduzidos externamente através da incubação no meio [37]. Estudos complementares verificaram que a ligação destes compostos às AQPs era feita no domínio citoplasmático da proteína [37]. Estes modeladores, apesar de não serem substratos razoáveis para os esforços realizados na descoberta de fármacos, são muito importantes para obter informações relativamente ao efeito da modulação das AQPs a nível celular [24]. Recentemente, tem-se utilizado uma abordagem diferente para a farmacoterapia através da modulação indirecta das AQPs, em particular através das suas proteínas reguladoras. A regulação da expressão das AQPs pode permitir um bloqueio mais abrangente da sua função do que um simples inibidor, tornando esta estratégia terapêutica muito valiosa [24].

Especificamente para a AQP3, só muito recentemente foi identificado (pelo nosso grupo) um inibidor específico [35]. Esta proteína tem um alto potencial para a determinação de modeladores, num futuro desenvolvimento clínico, visto ser responsável pela proliferação de queratinócitos e ser sobre-expressa em células de carcinoma de pele. Estudos anteriores realizados por Zelanina e os seus colegas, em 2004, tinham demonstrado que a permeabilidade ao glicerol e à água, através da AQP3, é extremamente sensível ao cobre e ao níquel, respectivamente [38]. Foi verificado, pelos mesmos autores, que a inibição da AQP3 com cobre é extremamente rápida e reversível, uma vez que o cobre forma ligações coordenadas com a proteína enquanto outros compostos testados se ligam de forma covalente [38]. Em suma, o efeito inibidor do cobre e do zinco torna-os muito convenientes em estudos funcionais em células onde a AQP3 é co-expressa com outros transportadores de água e glicerol [38]. No entanto, estes inibidores metálicos carecem de selectividade. Mais recentemente, o nosso grupo de trabalho identificou um potente inibidor da AQP3, com base em Au(III) [35]. Diferentes complexos de ouro, previamente conhecidos por possuírem diferentes propriedades terapêuticas como anticancerígenas, anti-reumáticas e antibacterianas, foram testados em glóbulos vermelhos humanos, descritos na literatura por expressarem AQP1 e AQP3 [35]. De entre os compostos analisados, o complexo $[\text{Au}(\text{phen})\text{Cl}_2]\text{Cl}$ (phen = 1,10-fenantrolina, Auphen) (Figura I.6) demonstrou ser o inibidor mais potente e apresentou uma elevada selectividade para a AQP3 [35]. Os resultados foram confirmados na linha celular PC12 (células de feocromocitoma suprarrenal de rato) transfectadas, de forma transiente e individualmente, com AQP1 e AQP3 [35].

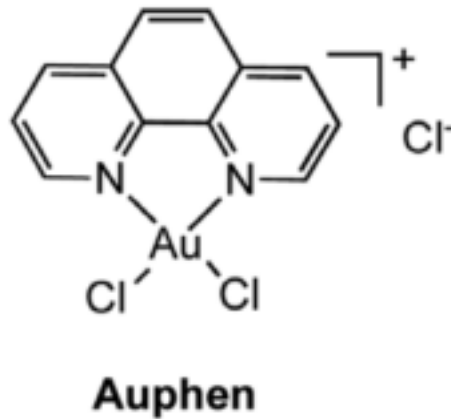


Figura I.6. Representação da estrutura do Auphen. Imagem adaptada [35].

Foram realizados cálculos adicionais de teoria funcional de densidade (DFT, *Density functional theory*) e estudos de acoplamento molecular (*Molecular Docking*) para analisar a ligação não-covalente do complexo Auphen tanto à estrutura da AQP1 como ao modelo homólogo da AQP3, permitindo uma descrição do mecanismo de inibição bem como explicar a selectividade do composto para a AQP3 [35]. Os resultados mostraram que o Auphen tem a capacidade de interagir com grupos sulfidrilos das proteínas, tais como os tiolatos das cisteínas. De facto, tanto a AQP1 como a AQP3 tem uma cisteína na cavidade de ligação mas com diferente acessibilidade [35]. No caso da AQP1, este resíduo encontra-se muito menos acessível ao complexo Auphen quando comparado com o mesmo resíduo da AQP3, que se encontra projectado para o lado periplasmático aproximando-se do poro do canal (Figura I.7) [35]. Estes resultados explicam o forte poder inibidor e a elevada selectividade do Auphen para a AQP3 [35].

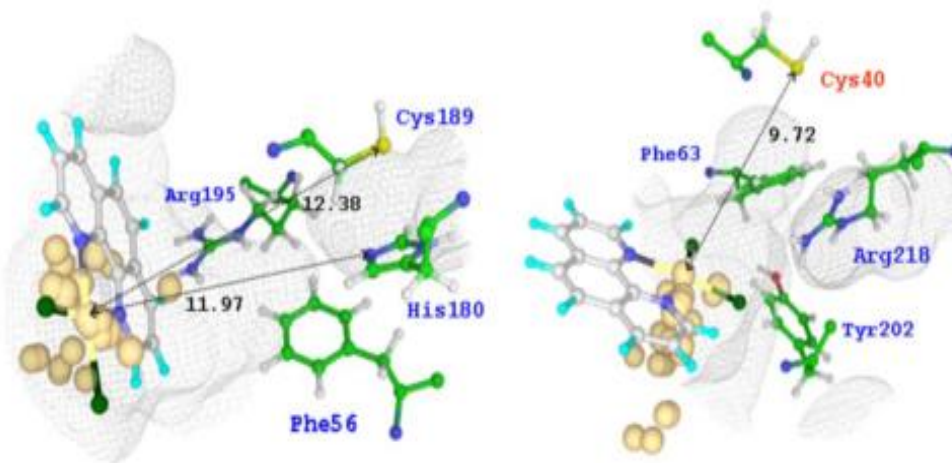


Figura I.7. Acoplamento do composto Auphen à AQP1 e a AQP3. Representação das melhores posições do Auphen na cavidade periplasmática da AQP1 (direita) e da AQP3 (esquerda). Apresentação da distância do composto ao resíduo Cys, em ambas. Imagem adaptada [35].

1.3. Resposta osmótica das células

A água tem tendência para se movimentar entre o meio extracelular e o meio intracelular quando as células são expostas a choques osmóticos. A rápida movimentação da água entre os compartimentos de menor pressão osmótica para o de maior pressão osmótica mantém a homeostase e garante a viabilidade celular [39]. O fluxo de água (J_v , em $\text{cm}^3 \text{s}^{-1}$) através da membrana celular é mais rápido que o fluxo de íões e de alguns solutos como é o caso do manitol. Desta forma, na escala de observação dos movimentos da água, estes solutos como o manitol, são considerados impermeantes ou não-difusíveis (ND). Quando as células são expostas a gradientes osmóticos devido à adição de solutos ND, estes geram fluxos de água que produzem alterações mensuráveis de volume celular (dV/dt , em $\text{cm}^3 \text{s}^{-1}$). A velocidade e a amplitude com que estas alterações ocorrem até atingir um novo equilíbrio osmótico dependem do número de AQPs presentes na membrana e dão informação quanto à permeabilidade osmótica desta (P_f , em cm s^{-1}).

Todavia, existem outros solutos fisiológicos, como o glicerol ou a ureia, que na escala de observação dos movimentos da água são considerados permeantes ou difusíveis. Neste caso, quando as células são sujeitas a um gradiente osmótico pela adição de um soluto permeante (S) observa-se um fluxo simultâneo de água (J_v , em $\text{cm}^3 \text{s}^{-1}$) e soluto (J_s , em mol s^{-1}) entre o meio externo e interno que dissipa o gradiente osmótico ($\Delta\Pi$) e o gradiente de soluto (ΔC_s) criado até se atingir o equilíbrio osmótico final [39].

1.3.1. Fluxos de água e soluto – Equações de Kedem Katchalsky

As células, na ausência de pressão hidrostática, encontram-se em que equilíbrio osmótico imediatamente antes e logo após o transiente de variação de volume. Durante este período a diferença de pressão osmótica entre o meio externo e interno é nula ($\Delta\Pi=0$) [39]. Além disto, considera-se que o volume extracelular é muito superior ao intracelular pelo que o fluxo de água registado em ambos os sentidos faz apenas variar o volume e as concentrações dos solutos intracelulares, mantendo-se sempre constante a osmolaridade² externa.

A adição de soluto ao meio externo pode ser feita com ou sem choque osmótico inicial. Na ausência de choque osmótico inicial, a osmolaridade externa (osm_{out}) permanece constante visto que o soluto adicionado substitui parte dos solutos presentes no meio externo ($(\text{osm}_{\text{out}})_0 = (\text{osm}_{\text{out}})_{\text{inf}}$). A substituição dos solutos garante que a tonicidade³ ($\Lambda = (\text{osm}_{\text{out}})_{\text{inf}} / (\text{osm}_{\text{out}})_0$) do choque osmótico seja igual a 1. Na presença do choque osmótico, a adição do soluto aumenta a osmolaridade externa final ($(\text{osm}_{\text{out}})_0 < (\text{osm}_{\text{out}})_i$) e consequentemente a tonicidade será maior que 1 ($\Lambda > 1$).

Neste caso específico, foram consideradas as equações simplificadas de Kedem e Katchalsky (KK) [40] para a análise de dados e para estimar os parâmetros de

²Osmolaridade [39] – número de partículas dissolvidas num solvente

³Tonicidade [39] – razão entre as osmolaridades externa final e inicial

permeabilidade. As diferenças de pressão hidrostática entre o meio externo e interno foram desprezados bem como os fluxos convectivos do soluto. Estes fluxos são descritos como um fluxo de solução em volume (eq. 1) e com um fluxo molar de soluto (eq. 2) [40].

$$\frac{in \rightarrow out}{J_v} = P_f \frac{V_w A}{RT} (-\Delta\Pi_s - \Delta\Pi_{ND}) \quad (\text{cm}^3 \cdot \text{s}^{-1}) \quad (\text{Equação 1})$$

$$\frac{in \rightarrow out}{J_s} = P_{gly} \Delta C_s A = P_{gly} A (C_{s_{in}} - C_{s_{out}}) \quad (\text{mol} \cdot \text{s}^{-1}) \quad (\text{Equação 2})$$

Em que V_w corresponde ao volume parcial molar da água ($18 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$), R é a constante dos gases perfeitos ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), T é a temperatura (298K) e A corresponde à área total da membrana (cm^2), $\Delta\Pi_{S,ND}$ correspondem aos gradientes de pressão osmótica devidos aos gradientes de concentração de S e ND . Os parâmetros P_f e P_{gly} correspondem aos coeficientes de permeabilidade à água e ao soluto, respectivamente, que serão os parâmetros a serem estimados.

1.3.2. Volume, quantidades e concentrações intracelulares

O fluxo de solução em volume, seja de saída ou de entrada, provoca uma variação de volume celular ao longo do tempo. A equação 3 está escrita para fazer corresponder a saída e entrada de água a valores de fluxo superiores ou inferiores a 0, respectivamente.

$$\frac{in \rightarrow out}{J_v} = -\frac{dV}{dt} \quad (\text{cm}^3 \cdot \text{s}^{-1}) \quad (\text{Equação 3})$$

Ao definir a variável adimensional do volume relativo celular (eq. 4) é possível normalizar o volume e determinar a sua variação, ao longo do tempo, quando as células são expostas a gradientes osmóticos (eq. 5).

$$v_{rel} = \frac{V}{V_0} \quad (\text{Equação 4})$$

$$\frac{dv_{rel}}{dt} = -\frac{in \rightarrow out}{J_v} \frac{1}{V_0} \quad (\text{s}^{-1}) \quad (\text{Equação 5})$$

Substituindo J_v na equação 5, obtém-se a variação de volume relativo dado pela equação 6.

$$\frac{dv_{rel}}{dt} = -P_f \frac{V_w A}{RT V_0} (-\Delta\Pi_s - \Delta\Pi_{ND}) \quad (\text{Equação 6})$$

Os termos de pressão osmótica devidos aos solutos impermeantes ($\Delta\Pi_{ND}$) e permeantes ($\Delta\Pi_s$) que aparecem na equação 6 são determinados através da equação 7 e 8, respectivamente [39].

$$\Delta\Pi_{ND} = RT(C_{ND_{in}} - C_{ND_{out}}) \quad (\text{J.cm}^{-3}) \quad (\text{Equação 7})$$

$$\Delta\Pi_s = RT(C_{s_{in}} - C_{s_{out}}) \quad (\text{J.cm}^{-3}) \quad (\text{Equação 8})$$

Tal como referido anteriormente, o fluxo tanto de água como de soluto influencia não apenas o volume intracelular como também as concentrações intracelulares dos solutos quer sejam impermeantes ou permeantes. Dessa forma, o cálculo destas concentrações tem em conta as respectivas quantidades intracelulares e o volume da célula (eq. 9 e 10) [40].

$$C_{ND_{in}} = \frac{Q_{ND_{in}}}{V} \quad (\text{mol.cm}^{-3}) \quad (\text{Equação 9})$$

$$C_{s_{in}} = \frac{Q_{s_{in}}}{V} \quad (\text{mol.cm}^{-3}) \quad (\text{Equação 10})$$

Quando as células são expostas a um gradiente osmótico com um soluto permeante, a quantidade varia, ao longo do tempo, de acordo com a entrada ou saída do mesmo através da membrana (eq. 11) [40].

$$\frac{dQ_{s_{in}}}{dt} = -J_s \quad (\text{mol.s}^{-1}) \quad (\text{Equação 11})$$

Por outro lado, a quantidade de soluto impermeante presente no interior da célula mantém-se constante e pode-se calcular a partir da sua concentração no instante inicial (eq. 12).

$$Q_{ND_{in}} = V_0(C_{ND_{in}})_0 \quad (\text{mol}) \quad (\text{Equação 12})$$

Como anteriormente referido, imediatamente antes e logo após o transiente de variação de volume, as células encontram-se em equilíbrio osmótico com $\Pi_{ND_0} = 0$. Desta forma, é possível chegar à conclusão que as concentrações dos solutos não-difusíveis, no instante inicial, no meio externo e no meio interno são iguais à osmolaridade externo no mesmo instante (eq. 13)

$$(C_{ND_{in}})_0 = (C_{ND_{out}})_0 = (osm_{out})_0 \quad (\text{Equação 13})$$

1.3.3. Volume osmótico e não-osmótico

O volume celular total (V) divide-se em duas parcelas correspondentes ao volume não-osmótico (V_{Nosm}) e ao volume osmótico (V_{osm}), visto que nem todo o volume da célula consegue ser trocado com o meio externo. A célula possui organelos, e outros conteúdos intracelulares, que não são compressíveis tornando o volume osmótico efectivo da célula inferior ao seu volume total (eq. 14). Nas equações 15 e 16 definiram-se as variáveis adimensionais v_{osm} e b que correspondem ao do volume osmótico e não-osmótico relativo, respectivamente.

$$V = V_{osm} + V_{Nosm} \quad (\text{cm}^3) \quad (\text{Equação 14})$$

$$v_{osm} = \frac{V_{osm}}{V_0} \quad (\text{Equação 15})$$

$$b = \frac{V_{Nosm}}{V_0} \quad (\text{Equação 16})$$

Sabendo que o volume total celular corresponde à soma das duas fracções pode-se calcular o volume osmótico relativo em função do volume relativo e do volume não-osmótico relativo (eq. 17).

$$v_{osm} = v_{rel} - b \quad (\text{Equação 17})$$

Se, do volume total celular, apenas o volume osmótico consegue atravessar a membrana celular, então o fluxo de solução só tem influência sobre este parâmetro permanecendo o volume não-osmótico constante (eq. 18).

$$\frac{dv_{rel}}{dt} = \frac{d(v_{osm} + b)}{dt} = \frac{dv_{osm}}{dt} \quad (\text{Equação 18})$$

Tendo em conta o mesmo raciocínio anterior, é necessário re-escrever as equações 9, 10 e 12 para que seja contabilizado o volume não-osmótico das células no cálculo das concentrações e quantidades dos solutos.

$$C_{NDin} = \frac{Q_{NDin}}{(V - V_{Nosm})} \quad (\text{Equação 19})$$

$$C_{sin} = \frac{Q_{sin}}{(V - V_{Nosm})} \quad (\text{Equação 20})$$

$$Q_{NDin} = (V_0 - V_{Nosm})(C_{NDin})_0 \quad (\text{Equação 21})$$

II. Objetivos

Objectivos

Inicialmente, este trabalho experimental teve como objectivo a caracterização da cinética de transporte de água e de glicerol da AQP3, recorrendo a células HEK 293T com AQP3 selvagem de rato (*Rattus norvegicus*) para a determinação dos parâmetros de permeabilidade osmótica da água (P_f) e permeabilidade ao glicerol (P_{gly}) por microscopia de fluorescência. Numa segunda fase, estes parâmetros foram também determinados, utilizando a mesma linha celular transfectada com um mutante da AQP3 de rato (*Rattus norvegicus*), em que substituiu a cisteína localizada na posição 40 por um resíduo de serina, com o objectivo de estudar a importância deste resíduo na actividade da proteína.

De seguida, foi testado um complexo metálico com base em Au(III) (Auphen), que mostrou ser selectivo para a AQP3. Para este efeito, foram determinados os parâmetros de permeabilidade P_f e P_{gly} , utilizando as células HEK 293T com AQP3 selvagem, na presença de Auphen. Neste trabalho experimental foi também determinado o efeito do composto Auphen em células HEK 293T com o mutante da AQP3 acima descrito, para comprovar o mecanismo de ligação selectivo à AQP3, postulado anteriormente por modelação molecular.

Uma vez que a AQP3 foi recentemente relacionada com mecanismos de proliferação celular em células tumorais, em especial tumores da pele, utilizou-se a mesma abordagem aplicando-a a células A-431 (carcinoma epidermóide humano), conhecidas por possuírem uma elevada expressão endógena da AQP3 assim como uma elevada capacidade de proliferação. Inicialmente foi caracterizada a cinética de transporte de água e de glicerol destas células e em seguida foi avaliado o efeito do Auphen na permeabilidade desta linha tumoral. A identificação de um composto com acção inibidora da AQP3 em células humanas pode contribuir para o desenvolvimento de fármacos com potencial acção terapêutica no tratamento de várias doenças associadas a aquaporinas, especificamente em carcinoma epidermóide.

III. Materiais e

Métodos

3.1. Células HEK 293T

3.1.1. Biologia Molecular

3.1.1.1. Construção dos plasmídeos

Foram construídos três plasmídeos diferentes, utilizando o vector de expressão pSport1, com resistência à ampicilina. Para a clonagem do gene utilizou-se os locais específicos das enzimas de restrição *Mlu I* e *Not I*. Além do plasmídeo controlo (pSport1), sem a sequência de DNA da AQP3, foi construído o plasmídeo pSport1-AQP3 WT, contendo a sequência selvagem da AQP3 de *Rattus norvegicus* e o seu mutante, pSport1-AQP3 Mut, em que substituiu a cisteína, localizada na posição 40 da sequência da proteína, por uma serina (Cys40Ser). Estes plasmídeos foram armazenados em papel de filtro e fornecidos pelo Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS). Para eluir o DNA armazenado, foi necessário cortar os pedaços de papel de cada plasmídeo colocando-os, cuidadosamente, em tubos *ependorf* e adicionar-se 50µl de água destilada.

3.1.1.2. Preparação de células *E. coli* competentes

As células têm a capacidade de receber DNA exógeno, conhecida por competência. Estas tanto podem ser naturalmente competentes como podem ser transformadas, por processos químicos, que envolvem um tratamento com catiões polivalentes e incubações a baixas temperaturas [41].

No caso das células *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5α seguiu-se um processo químico otimizado [41], descrito no anexo IV em que todos os passos foram realizados numa câmara de fluxo laminar (*Microflow Laminar Flow Workstation*), em condições de assepsia. Descongelou-se uma alíquota de células *E. coli* DH5α, guardadas a -80°C e plaqueou-se em meio LB, deixando a incubar durante a noite, a 37°C. No dia seguinte, foi preparado um pré-inóculo a partir de uma colónia isolada, em 3ml de meio LB, e incubado durante 12h, a 37°C, com agitação suave (*Grant OLS200*). Após o período de incubação, transferiu-se o meio de cultura para 250ml de meio LB e incubou-se a 37°C até que a densidade óptica medida a 600nm (DO_{600nm}) fosse aproximadamente igual a 0,3-0,4. Durante o período de incubação, preparou-se uma diluição 1:1 da solução 2x TSS (anexo I) em meio LB e colocou-se em gelo. Também se marcou os *ependorfs* utilizados para as alíquotas.

Quando se atingiu a DO_{600nm} óptima, distribuiu-se o meio de cultura por tubos *falcon* previamente arrefecidos em gelo. Os tubos foram centrifugados durante 10min, a 1811 x g e a 4°C (*Centrifuge 5810R*). Após desprezar o sobrenadante (SN), o *pellet* foi rapidamente ressuspendido em 5ml da solução TSS diluída, previamente arrefecida. A cada *ependorf* foi adicionado 100µl de células competentes passando de imediato para azoto líquido. As alíquotas foram posteriormente armazenadas a -80°C.

3.1.1.3. Transformação de células *E. coli* competentes

Com o objectivo de sobre-expressar, e purificar os genes de interesse, foi seguido um protocolo de transformação otimizado [41], descrito no Anexo IV. Todos os passos foram realizados numa câmara de fluxo laminar (*Microflow Laminar Flow Workstation*), em condições de assepsia. Assim, transformou-se 100µl células *E. coli* DH5α quimicamente competentes com, aproximadamente, 2,5µg de pSport1, pSport1-AQP3 WT e pSport1-AQP3 Mut, em três *eppendorfs* diferentes. Durante 30 minutos, os *eppendorfs* foram mantidos em gelo, induzindo a entrada dos plasmídeos nas células. Seguidamente, as células foram incubadas durante 45s a 42°C, e colocadas rapidamente em gelo novamente. É muito importante cumprir, exactamente, os tempos de incubação para evitar o crescimento de colónias satélite⁴. Às células foi adicionado 900µl de SOC (Meio SOB + Glucose 2%), deixando a incubar durante 1 hora a 37°C, com agitação suave. Após o período de incubação, as células foram centrifugadas durante 5 minutos a 1811 x g, desprezando a maioria do SN. O *pellet* foi ressuspendido em 200µl de SN, que restou nos *eppendorfs*, e plaqueado em meio LB suplementado com ampicilina 100µg/ml (*Sigma-Aldrich*®), incubando durante a noite, a 37°C. Juntamente com estas placas foram incluídos dois controlos, um positivo e um negativo. No controlo positivo, seguiu-se o mesmo protocolo transformando as células *E. coli* DH5α, quimicamente competentes, com um plasmídeo diferente (pUG-35). Este controlo garante-nos que o protocolo de transformação seguido foi eficaz. Por outro lado, o controlo negativo garante-nos que todas as colónias existentes nas outras placas apresentam resistência à ampicilina. Nesta placa, são incubadas células *E. coli* DH5α sem sofrerem o protocolo de transformação, logo não apresentam resistência ao antibiótico.

Apesar de se ter cumprido, exactamente, os tempos de incubação descritos, existia uma forte probabilidade de crescerem colónias satélite em placas muito confluentes. Assim, para garantir que se tinham colónias resistentes à ampicilina, ou seja, que estavam transformadas com o vector de expressão pSport1, foram repicadas 10 colónias isoladas para novas placas com meio LB suplementado com ampicilina 100µg/ml, incubando durante a noite, a 37°C.

3.1.1.4. Armazenamento de células transformadas

Para garantir que existem células transformadas viáveis para novos crescimentos, durante um longo período de tempo, é necessário preparar *stocks* de glicerol 15%. Este composto é um crioprotector que permite guardar as células a -80°C, mantendo a sua viabilidade, e utilizá-las sempre que necessário. Este passo é muito importante, uma vez que permite rapidamente fazer novos crescimentos de cultura de células recombinadas

⁴Colónias Satélite – colónias de bactérias que não possuem resistência ao antibiótico mas que são capazes de crescer nas zonas circundantes a colónias resistentes, visto que estas segregam β-lactamase que degrada a ampicilina à sua volta, permitindo o crescimento de colónias sem resistência nessa zona.

com o plasmídeo de interesse, em meio líquido, sem ter de repetir todos os passos de transformação.

Desta forma, inocularam-se 5ml de meio LB suplementado com ampicilina 100µg/ml, em duplicado, com colónias isoladas transformadas com os respectivos plasmídeos construídos e incubou-se durante a noite, a 37°C com agitação suave. Após o período de incubação, os meios de cultura foram homogeneizados num vortex transferindo-se 500µl de cada meio de cultura para os *eppendorfs*, previamente identificados. A cada um foi adicionado 500µl de glicerol 30% (*Sigma-Aldrich*[®]) e armazenados a -80°C [42].

3.1.1.5. Extracção de DNA

Existem diferentes protocolos para a extracção de DNA, alguns deles comercializados, que apresentam vantagens e desvantagens quando comparados. A escolha do protocolo mais adequado depende de diferentes aspectos tais como a quantidade de DNA desejado assim como a pureza final. Para este trabalho experimental, a quantidade de DNA e a pureza necessária era relativamente elevada, pelo que se recorreu a um kit de extracção comercial (*GenElute Plasmid Midiprep Kit Sigma-Aldrich*[®]).

Inoculou-se 50ml de meio LB suplementado com ampicilina 100µg/ml, em três *erlenmeyers* diferentes, com colónias isoladas transformadas com os respectivos plasmídeos construídos. Os meios foram incubados durante a noite, a 37°C com agitação suave. O volume de meio de cultura utilizado para o inóculo foi o recomendado no protocolo (Anexo IV). Durante o período de incubação, as soluções Ressuspensão/RNase A e Lavagem 2 foram preparadas como descrito. A solução de Ressuspensão/RNase A e a de Neutralização foram guardadas a 4°C.

Após o período de incubação, os meios de cultura foram transferidos para tubos *falcon* para serem centrifugados a 5000 x g, durante 10 minutos. Após desprezar o SN, adicionou-se 4ml de solução Ressuspensão/RNase A ressuspendendo completamente os *pellets*. Foram adicionados 4ml de solução Lise invertendo 6 vezes, imediatamente, de forma suave. Enquanto a mistura repousou durante 5 minutos, preparou-se as seringas, por remoção do pistão e colocando-as na vertical. Ao final deste período, adicionou-se 4ml de solução Neutralização invertendo 5 vezes, de forma suave. De seguida, adicionou-se 3ml de solução Ligação e inverteu-se 2 vezes, colocando de imediato na seringa. Uma vez que a mistura apresentou um agregado branco, foi necessário deixar repousar por 5 minutos para que este flutuasse até ao topo. Durante o período de repouso, as colunas de ligação foram colocadas nos tubos de colecção às quais se adicionou 4ml de solução Preparação da Coluna. Para que o processo de eluição fosse o mais rápido possível, colocou-se os tubos de colecção na centrífuga a 3000 x g durante 2 minutos e descartou-se o eluído. Depois das colunas de ligação estarem preparadas, as seringas foram colocadas por cima destas, que se mantiveram dentro dos tubos de colecção. Ao aplicar, gentilmente, pressão no pistão, fez-se atravessar metade do lisado translúcido para as

colunas que foram, posteriormente, centrifugadas a 3000 x g durante 2 minutos. Após descartar o eluído, adicionou-se o resto do lisado translúcido, repetindo o passo de centrifugação. Voltou-se a desprezar o eluído e adicionou-se 4ml de solução de Lavagem 1 às colunas e repetiu-se a centrifugação nas mesmas condições. Novamente, descartou-se o eluído e adicionou-se 4ml de solução Lavagem 2 às colunas repetindo o passo de centrifugação, a 3000 x g durante 2 minutos. Após este passo, as colunas de ligação foram transferidas para novos tubos de colecção. Adicionou-se 1ml de solução Eluição centrifugando a 2000 x g, durante 5 minutos. Os eluídos finais que continham o DNA extraído foram de seguida quantificados.

A quantificação do DNA foi feita utilizando o NanoDrop-2000 (*Thermo Scientific*) [43]. Este aparelho é capaz de medir a absorvância a diferentes comprimentos de onda, reportando-nos a concentração da amostra e as razões de pureza (Abs260/Abs280 e Abs260/Abs230). Este aparelho apresenta uma enorme vantagem por quantificar, de forma viável, uma pequena quantidade de amostra utilizando, cerca de 0,5µl. O NanoDrop-2000 também é capaz de quantificar as diferentes estruturas de DNA (ssDNA e dsDNA), bem como RNA. Inicialmente traçou-se o branco utilizando o tampão de eluição da *GenElute Plasmid Midiprep Kit*. De seguida, as amostras foram analisadas, seleccionando a opção “dsDNA”. Todos os dados de concentração e pureza, das amostras analisadas, foram registados.

3.1.2. Microscopia de Fluorescência

3.1.2.1. Cultura de Células

A cultura de células possui algumas directrizes principais que devem ser tidas em conta durante todo o procedimento como as condições de esterilidade, os meios de cultura e os antibióticos a utilizar assim como a manutenção das células, entre muitos outros aspectos [42]. Contudo as linhas celulares apresentam características específicas pelo que todos os passos são optimizados para a linha celular em questão.

A linha celular de rim embrionária humana (HEK 293T) foi descongelada num banho aquecido a 37°C, à qual foi adicionada, imediatamente, 5ml de meio de eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (*Lonza Biowhittaker*®), suplementado com 10% (v/v) soro de bovino fetal (FBS) (*Gibco*® *Invitrogen*) e 1% (v/v) penicilina/estreptomicina (P/S) (*Lonza Biowhittaker*®), previamente aquecido a 37°C. As células em suspensão foram centrifugadas (*Heracus Sepatech Labofuge Ae*) a 571 x g, durante 5 minutos com o objectivo de limitar o tempo de exposição das células ao crioprotector dimetilsulfóxido (DMSO) (*AppliChem*) que, à temperatura ambiente, é tóxico. Após a centrifugação, o *pellet* foi ressuspendido em 10ml de meio DMEM, previamente aquecido a 37°C, suplementado com 10% (v/v) FBS e 1% (v/v) P/S e transferido para uma placa 100mm (*Sigma-Aldrich*®*Corning*). As células foram mantidas numa incubadora (*Sanyo CO₂ Incubator*) a 37°C e 5% CO₂.

A rapidez de crescimento da cultura de células depende do tipo de linha celular assim como o número de células por placa, sendo por isso muito importante acompanhar o seu desenvolvimento e dividir as células para novas placas sempre no mesmo ponto de confluência, que neste caso correspondeu a 80%. No momento em que as placas atingiram esta confluência, retirou-se o meio de cultura através de uma bomba e adicionou-se 5ml de tampão fosfato-salino (PBS). Este tampão serve para lavar as células e garantir que não existe meio DMEM suplementado com soro e antibiótico, uma vez que o soro é inibidor da tripsina. Removeu-se o PBS através de uma bomba e adicionou-se 750µl de tripsina/EDTA 0,05% (v/v) (170 000U/L - Lonza Biowhittaker®), uniformemente pela placa. A placa foi colocada na incubadora e ao final de 1 minuto todas as células se encontravam em suspensão. Neste ponto, adicionou-se 5ml de meio DMEM, suplementado com 10% (v/v) FBS e 1% (v/v) P/S, ressuspensando muito bem as células na placa. O meio de ressuspensão foi transferido para novas placas 100mm, perfazendo o volume com meio DMEM, suplementado com 10% (v/v) FBS e 1% (v/v) P/S.

Todos os passos realizados no crescimento e manutenção da linha celular HEK 293T foram efectuados em condições de assepsia, numa câmara de fluxo laminar (*Sanyo Clean Bench*) incorporada com uma luz ultravioleta, capaz de esterilizar o interior da câmara após um período de 30 minutos [42]. Todos os materiais descartáveis utilizados, assim como o meio DMEM, o FBS e o antibiótico P/S, foram fornecidos em condições de esterilização. A solução de PBS foi esterilizada por autoclavagem (*Melag Autoklav 23*) a 1bar durante 50 minutos.

3.1.2.2. Transfecção Transiente

Para obter uma sobre-expressão da proteína AQP3 WT e AQP3 Mut utilizou-se o processo de transfecção [44], descrito no anexo IV, onde se recorreu a um lípido catiónico, lipofectamina 2000 (*Invitrogen*), que facilita a entrada de ácidos nucleicos, tanto DNA como RNA, em células eucarióticas. Existem dois tipos de transfecção: i) transiente em que o plasmídeo recombinante permanece em estado extracromossal, por um período até 48h durante qual é feita a análise, produzindo uma grande quantidade de proteína alvo e ii) estável em que o plasmídeo recombinante é integrado no genoma celular sendo a expressão de proteína alvo feita em quantidades muito inferiores quando comparado com o tipo de transfecção anterior. De acordo com o tipo de estudo que se deseja fazer, é preciso comparar as vantagens e desvantagens que cada tipo de transfecção apresenta e escolher aquele que se adequa melhor. Dessa forma, e analisando os objectivos do trabalho experimental em curso, decidiu-se optar pela transfecção transiente.

Após a optimização das condições, a transfecção foi realizada em placas de 35mm (*Sigma-Aldrich® Corning*), com três lamelas redondas de 15mm de diâmetro (*Heinz Herenz Hamburg*) esterilizadas. Cada placa foi inoculada com $1,5 \times 10^5$ células, no dia anterior, e incubada a 37°C e 5% CO₂, utilizando-se 4µg de DNA para cada transfecção. A esterilidade das lamelas foi obtida por exposição prolongada (cerca de 45 minutos) sob

raios ultravioleta (UV). A contagem de células foi feita utilizando um hemocitómetro (câmara de Neubauer *BLAUBRAND*[®]) [45], que apresenta um aspecto semelhante ao da Figura III.1. Esta câmara permite contar células em suspensão sendo que, geralmente, é feita uma média do número de células em cada quadrante que corresponde ao número de células/0,1µl.

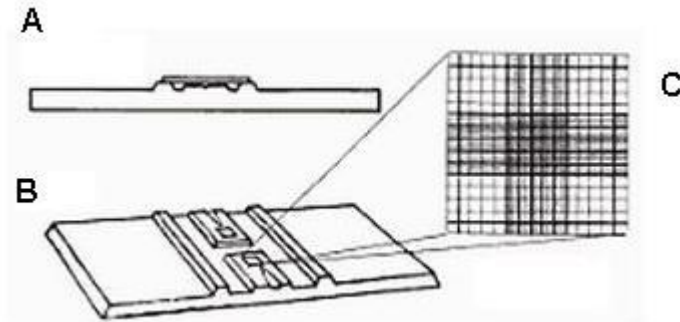


Figura III.1. Representação esquemática de um hemocitómetro (câmara de Neubauer). (A) Vista lateral, (B) Vista de topo e (C) Grelha vista ao microscópio. Imagem adaptada [45].

Tal como descrito no protocolo o meio de cultura foi substituído por meio DMEM, sem suplementos. Para cada transfecção, diluiu-se o DNA em 250µl de meio DMEM, sem suplementos, incubando à temperatura ambiente durante 5 minutos. Durante o período de incubação, a lipofectamina foi diluída em 250µl de meio DMEM, sem suplementos. Em novos *ependorfs*, devidamente identificados, adicionou-se o agente químico ao DNA diluído, num volume total de 500µl. Os *ependorfs* foram invertidos cuidadosamente e deixados a incubar durante 20 minutos à temperatura ambiente, período durante o qual se formaram os complexos. Após este período, o volume da mistura foi adicionado à placa de 35mm, inoculada no dia anterior, mantendo-a na incubadora por 48 horas, a 37°C e 5% CO₂.

3.1.2.3. Extração de RNA e análise por RT-qPCR

Para analisar a expressão genética da AQP3 WT e da proteína AQP3 Mut recorreu-se à técnica RT-qPCR (Reacção em cadeia da polimerase da transcrição reversa) que nos permite quantificar o DNA, a cada ciclo de amplificação, em tempo real. Esta técnica apresenta actualmente imensas vantagens quando comparada com o método de PCR convencional, tais como maior simplicidade, maior rapidez e menor probabilidade de contaminação após a amplificação [46].

De entre os muitos processos conhecidos para a extração de RNA das células, recorreu-se ao TRIzol (*Invitrogen*) [47], descrito no anexo IV. Inicialmente, as células (10⁶) foram lavadas com PBS e lisadas por incubação com 1ml de TRIzol à temperatura ambiente, durante 5 minutos. Após este período, adicionou-se 200µl de clorofórmio seguida de uma centrifugação a 12000 x g, durante 15 minutos a 4°C. O *pellet* foi

precipitado e lavado com etanol 70%, visto que o passo anterior permitiu separar o RNA da fase aquosa. Após a lavagem com etanol, deixou-se secar ao ar antes de ressuspender em água dietilpirocarbonato (DEPC).

A reacção de transcrição reversa foi realizada imediatamente após o isolamento do mRNA, seguindo o protocolo previamente apresentado [47] e descrito no anexo IV. Para este método utilizou-se a SuperScript II RNase Transcriptase Reversa (RT) (*Invitrogen*). A análise de PCR em tempo real foi realizada num sistema de detecção de sequência ABI Prism 7500 (*Applied-Biosystems, Warrington, UK*), usando a master mix SYBR Green PCR (*Applied-Biosystems*) e as condições recomendadas pelo fabricante do termociclador (*Applied-Biosystems*) [48]. A normalização das quantidades de RNA foi feita com a amplificação da ciclofilina.

Para o desenho dos primers (Tabela III.1) utilizou-se o *software* Primer Express (*Applied-Biosystems*), em que a curva de fusão apresentou um único pico com a temperatura de fusão (T_m) esperada para todas as amostras.

Tabela III.1. Sequência nucleotídica dos primers desenhados para a amplificação, por RT-qPCR, do gene ciclofilina e AQP3 de *Rattus norvegicus*.

Gene	Designação	Sequência nucleotídica (5' → 3')
Ciclofilina	Cyclo_Fw	ATGGCAAATGCTGGACCAAA
	Cyclo_Rev	ATGTCGTCCCAGTTGGTAACA
AQP3	AQP3_Fw	TCTGGACACTTGGATATGGTCAA
	AQP3_Rev	CAACAATGGCCAGCACACA

3.1.1.1. Variação de fluorescência celular medida pelo método de auto-extinção (*self-quenching*)

Para avaliar a permeabilidade das células à água e ao glicerol recorreu-se a uma técnica não-invasiva, em que a variação do volume foi reportada pela variação da fluorescência da sonda calceína, que resulta da hidrólise intracelular da sua forma esterificada (éster metílico da calceína, calceína-AM) [49]. A membrana celular é permeável a esta forma éster que, após a sua clivagem por esterases, se torna impermeável e fluorescente (Figura III.2).

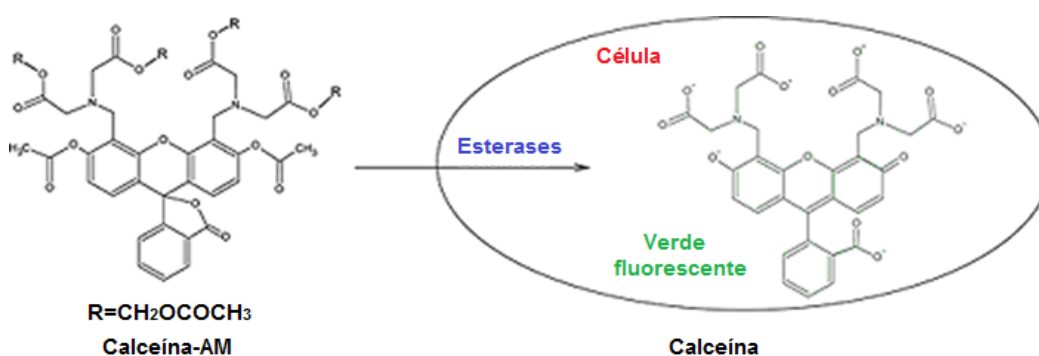


Figura III.2. Representação esquemática da estrutura da calceína-AM. Esta sonda, na sua forma esterificada (direita) é capaz de atravessar a membrana celular. No citosol, e após clivagem por esterases, esta sonda torna-se impermeável e, quando excitada a 495nm, apresenta uma cor verde que se deve à emissão de fluorescência. Imagem adaptada [50].

A fluorescência é a capacidade de emissão de luz a partir de qualquer substância e ocorre a partir de estados electrónicos excitados. Neste caso, o electrão presente no estado fundamental é excitado para níveis de energia mais elevados, com um spin oposto ao electrão ao que fica no estado fundamental, permitindo o regresso ao estado fundamental muito rapidamente com libertação de energia, sob a forma de luz [51].

Actualmente são conhecidos inúmeros fluoróforos, incluindo a calceína-AM, capazes de relacionar estes dois parâmetros pelo método de auto-extinção, ou *self-quenching*, em que a variação de volume é proporcional à variação da fluorescência. O volume das células diminui, após sofrerem um choque hiperosmótico ($\Delta \geq 1$), concentrando a sonda. Como consequência dessa concentração, a intensidade da fluorescência aumenta. No entanto, verifica-se que em células incubadas com elevadas concentrações de calceína-AM (>5 μ M) [49], a diminuição de volume por introdução de um choque hiperosmótico reflecte-se numa diminuição de fluorescência, correlacionando estes dois parâmetros directamente. Este mecanismo ainda não está totalmente percebido, no entanto, crê-se que o aumento da concentração da sonda leva a formação de agregados, capazes de absorver a fluorescência das moléculas vizinhas (*self-quenching*) em que a fluorescência detectada deriva apenas dos monómeros [49].

As sondas fluorescentes são compostos muito sensíveis e perdem a sua capacidade de emitir fluorescência quando expostas à luz (*bleaching*). Este facto tem de ser tomado em conta nos dados adquiridos, uma vez que a sonda é consecutivamente excitada o que leva a um decaimento da capacidade de emissão de fluorescência, ao longo do período experimental. Desta maneira, os dados obtidos, antes de ser convertidos em volume relativo, têm de ser tratados onde o factor *bleaching* é descontado. Para este efeito, é determinado o declive da recta do sinal de fluorescência durante o período em que as células estão equilibradas numa solução isotónica, não havendo variação de volume.

Experimentalmente, as células foram incubadas com 5 μ M de calceína-AM (*Sigma-Aldrich*[®]) durante 90 minutos a 37°C e 5% CO₂. Apesar de a sonda ser permeável à membrana celular, existe uma pequena percentagem que não é incorporada pelo que se deve lavar as células substituindo o meio de cultura DMEM por tampão HEPES (Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfónico) ($\Lambda=1$) para remover o excesso de sonda. Em alguns ensaios testou-se o Auphen, com uma concentração igual a 5 μ M, incubado durante 30 minutos, a 37°C e a 5% CO₂.

Numa câmara de perfusão (Figura III.3 A), montou-se a lamela com as células aderentes selando-a com uma lamela nova e um O-ring. É muito importante que esta câmara se mantenha perfeitamente hermética durante o procedimento experimental para não introduzir nenhuma variante aleatória, permitindo a perfusão das células com as diferentes soluções, de acordo com o ensaio. Esta perfusão é iniciada ainda antes de se selar o sistema para evitar a formação de bolhas e é feita através de uma bomba peristáltica (*Harvard Apparatus Mini-Peristaltic Pump II*) e a solução é recolhida por aspiração.

De seguida, montou-se a câmara de perfusão num microscópio de epifluorescência invertido (*Axiovert 200 Zeiss*) (Figura III.3 B), equipado com uma câmara digital CCD (*Cool SnapTM EZ Photometrics*) (Figura III.3 D). Utilizou-se a objectiva de imersão em óleo 40x e uma ampliação de 1,6 (Módulo Optovar). As células foram excitadas a 495/10nm, com uma lâmpada de Xenon, com um intervalo entre os pulsos de 1s a uma frequência de 1Hz. A emissão de fluorescência foi detectada a 515/10nm, através de um filtro dicróico. Todos os sinais obtidos foram guardados num computador externo (Figura III.3 E) e analisados através do *software Metafluor*. Este *software* é uma poderosa ferramenta na recolha de dados de fluorescência visto que nos permite escolher os filtros de excitação e emissão, bem como o intervalo entre os pulsos de radiação, a sua frequência, entre outros parâmetros configuráveis de modo a otimizar os sinais recolhidos. Este *software* possui ainda a vantagem de fazer corresponder a cor da série de dados de fluorescência adquiridos ao longo da experiência à cor da célula delimitada.

As soluções tampão foram, previamente, colocadas nos reservatórios do sistema de seringas (Figura III.3 C) retirando, com a ajuda de um pistão de seringa, as bolhas de ar existentes nas manguieiras. Inicialmente, as células foram equilibradas em tampão

HEPES. Durante este período, as células mantêm o seu volume normal quando equilibradas nesta solução porque a osmolaridade interna é muito próxima à osmolaridade externa, em que $(osm_{out})_0 = (osm_{in})_0 = 300\text{mOsm}$. De seguida, esta solução foi substituída por tampão HEPES com manitol, com uma tonicidade equivalente a 2 ($(osm_{out})_{inf} = 600\text{mOsm}$ e $(osm_{out})_0 = 300\text{mOsm}$). Em consequência, as células tiveram de reajustar o seu volume, por saída de água, para manter a homeostase. Após atingir o novo equilíbrio osmótico, substituiu-se a solução por tampão HEPES para que as células readquirissem o volume inicial. Por último, substituiu-se a solução por tampão HEPES com glicerol, com $\Lambda = 2$, em que $(osm_{out})_{inf} = 600\text{mOsm}$. A osmolaridade destas soluções foi medida através do ponto de depressão crioscópica num osmómetro (*Knauer Semi-Micro Osmometer*).

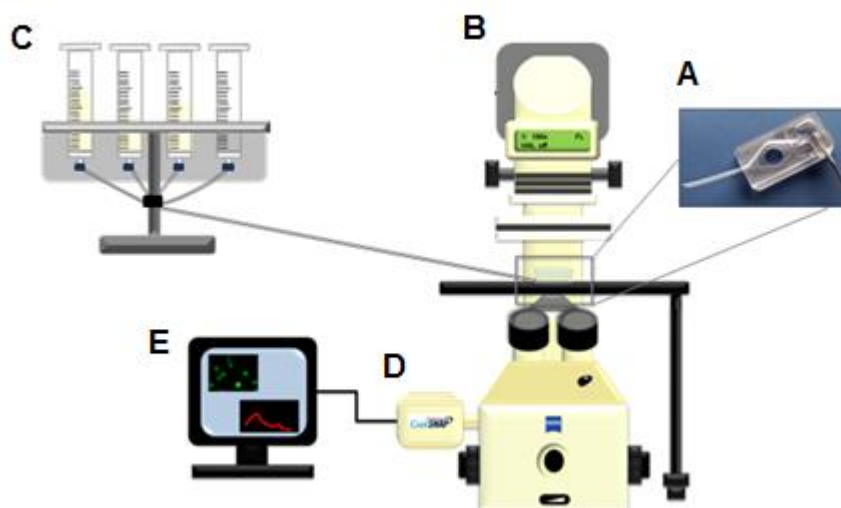


Figura III.3. Esquema de montagem do sistema de fluorescência. (A) Câmara de perfusão; (B) Microscópio de epifluorescência; (C) Sistema de seringas para introdução dos choques osmóticos; (D) Câmara de aquisição; (E) Computador.

3.1.1.2. Conversão do sinal de fluorescência em volume relativo

Os dados de fluorescência assim recolhidos reflectem dois fenómenos físicos: *i*) decaimento da emissão de fluorescência e *ii*) variação de volume das células quando expostas a uma solução hiperosmótica. Todavia, é necessário tratar os dados de fluorescência, por subtração do factor *bleaching*, para que estes possam ser calibrados para variação de volumes relativos e posteriormente analisados, estimando os parâmetros de permeabilidade. Cada sinal de fluorescência foi tratado individualmente, por subtração da recta respectiva a um conjunto de pontos escolhidos num intervalo de tempo onde não se verificou nenhuma variação de volume. Os sinais de fluorescência (F) assim obtidos foram rearranjados de modo a obter-se a variação relativa de F/F_0 em que F_0 foi

determinado para cada sinal como uma média de valores de F obtidos imediatamente antes da introdução do choque osmótico. Está descrita na literatura [49] uma relação directa entre a variação do volume celular relativo (V/V_0) e a variação dos sinais de fluorescência (F/F_0) (equação 22) em que (a) é o declive e (b) a ordenada na origem.

$$\frac{V}{V_0} = a \times \frac{F}{F_0} + b \quad (\text{Equação 22})$$

Para determinar os parâmetros da recta de calibração, mediram-se em cada experiência realizada o volume de 10 células, utilizando o *ImageJ*, que permite determinar a área das células (μm^2) a partir de pixéis, através da relação área = pixel x $0,1609^2$. Sabe-se que estas células aderentes têm uma forma discóide, mas para efeitos de calibração dos sinais de fluorescência assumiu-se uma forma esférica, tendo sido assim feito o cálculo do respectivo raio e do volume em μm^3 . Nas células cuja perturbação foi feita utilizando o manitol, mediu-se o volume no instante correspondente à introdução da perturbação osmótica (V_0) e no instante final (V_{inf}). Com estes volumes e com os respectivos valores iniciais F_0 e finais de fluorescência F_{inf} calcularam-se os valores de a e b da equação 22 que foram depois utilizados para a calibração dos sinais de fluorescência obtidos.

3.1.1.3. Estimativa dos parâmetros de permeabilidade

Para a análise dos resultados obtidos utilizou-se o modelo matemático implementado no *software Berkeley Madonna*. Este *software* permite não só construir modelos matemáticos capazes de simular o comportamento dinâmico das células quando expostas a choques osmóticos, como também estimar parâmetros de permeabilidade a partir dos dados experimentais de variação de volume relativo celular, através do assentamento de curvas teóricas com as experimentais da variação de volume celular.

O modelo construído para simular o comportamento de células permeantes a um soluto (S) teve como base as equações simplificadas de Kedem Katchalsky apresentadas anteriormente e seguiu o diagrama de fluxo apresentado na Figura III.4 para otimizar os parâmetros. As equações tiveram de ser re-escritas para serem introduzidas no *software*. Neste modelo forneceu-se os valores constantes, tais como a média do raio das células (r_0), a osmolaridade do meio externo ($\text{osm}_{\text{out}0}$), a temperatura (T), a constante dos gases perfeitos (R), volume parcial da água (V_w), osmolaridade adicionada e a tonicidade (Λ). A estimativa das permeabilidades foi feita por ajustamento da curva teórica da variação de volume relativo aos dados experimentais.

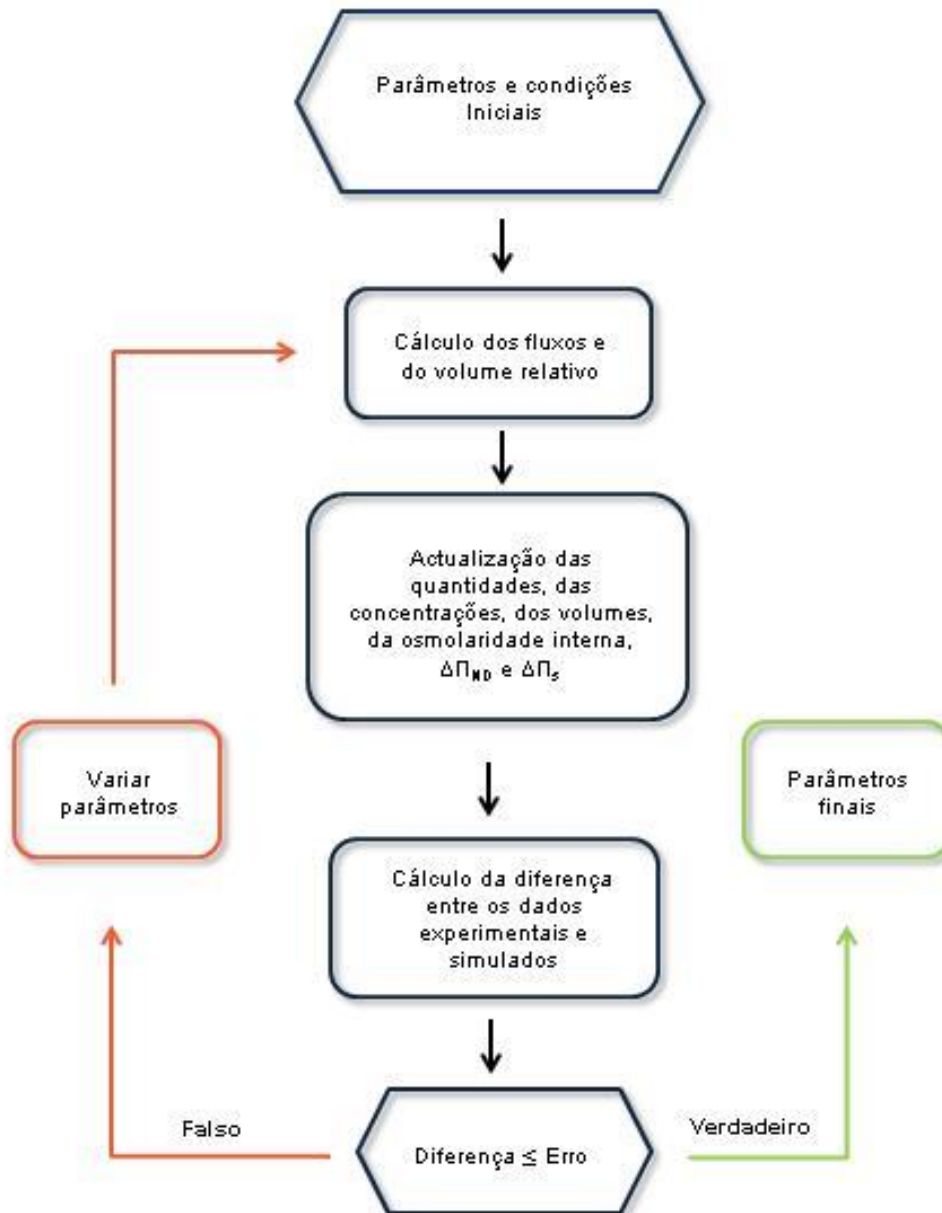


Figura III.4. Diagrama de fluxo. Representação esquemática da estratégia utilizada na estimativa dos parâmetros de permeabilidade obtidos por ajuste de curvas teóricas, geradas por simulação numérica do modelo matemático, aos dados experimentais.

3.1.1.4. Análise estatística

Os resultados obtidos foram apresentados como a média \pm desvio padrão da média, utilizando o pacote estatístico Social Sciences (SPSS Inc., Chicago, Illinois), versão 18,0 com testes paramétricos ou não-paramétricos, dependendo do tipo de distribuição dos dados.

3.2. Células A-431

3.2.1. Microscopia de Fluorescência

3.2.1.1. Cultura de Células

O processo de descongelamento da linha celular A-431 corresponde ao descrito para a linha celular HEK 293T. Isto é, as células foram descongeladas a 37°C, à qual foi adicionado 9ml de meio DMEM, suplementado com 10% (v/v) FBS e 1% (v/v) P/S. As células em suspensão foram centrifugadas a 571 x g durante 5 minutos. O *pellet* foi ressuspenso em 10ml de meio DMEM, suplementado com 10% FBS e 1% P/S e transferido para uma placa 100mm. As células foram mantidas numa incubadora, com a temperatura e humidade controlada, respectivamente, 37°C e 5% CO₂.

Apesar do meio de crescimento, e da temperatura de incubação, se manter entre as linhas celulares utilizadas, não foi possível prever a velocidade de crescimento desta linha celular, por comparação com as HEK 293T, pelo que se acompanhou o desenvolvimento e dividiu as células para novas placas sempre no mesmo ponto de confluência, que neste caso correspondeu a 60%. Para isso, retirou-se o meio de cultura e adicionou-se 5 ml de PBS. O tampão foi retirado e adicionou-se 750µl de tripsina /EDTA 0,25% (v/v) uniformemente pela placa. A placa, incubada a 37°C e 5% de CO₂, foi verificada várias vezes, durante um período nunca superior a 5 minutos, num microscópio de epifluorescência invertido (*Nikon 105317*) até garantir que todas as células estavam em suspensão. Neste ponto, adicionou-se 5ml de meio DMEM, suplementado com 10% (v/v) FBS e 1% (v/v) P/S, ressuspendendo muito bem as células na placa. O meio de ressuspenção foi transferido para novas placas 100mm, perfazendo o volume com meio DMEM, suplementado com 10% (v/v) FBS e 1% (v/v) P/S.

Os passos realizados no crescimento e manutenção da linha celular A-431, à semelhança do que tinha acontecido anteriormente, foram efectuados em condições de assepsia, numa câmara de fluxo laminar incorporada com uma luz ultravioleta. Todos os materiais descartáveis utilizados, assim como o meio DMEM, o FBS e o antibiótico P/S, foram fornecidos em condições de esterilização. A solução de PBS foi esterilizada por autoclavagem a 1bar durante 50 minutos.

3.2.1.2. Variação da fluorescência celular medida pelo método de auto-extinção (*self-quenching*)

Tal como nas células HEK 293T, a permeabilidade das células A-431 à água e ao glicerol foi avaliada recorrendo à sonda calceína-AM. Experimentalmente, as células foram incubadas com 5µM de calceína-AM durante 90 minutos a 37°C e 5% CO₂. Foram também realizados ensaios na presença do inibidor Auphen, com uma concentração igual a 5µM e incubado durante 30 minutos a 37°C e 5% CO₂.

Todo o processo de montagem da câmara de perfusão, assim como o tipo de microscópio e as condições de aquisição foi o mesmo utilizado anteriormente. Nestes ensaios também se introduziu os choques osmóticos por substituição do tampão HEPES ($\Lambda=1$) por tampão HEPES com manitol ou glicerol ($\Lambda=2$), registrando a variação da fluorescência com a variação da tonicidade das soluções.

O *bleaching* de cada sinal de fluorescência foi descontado e os sinais de variação de fluorescência obtidos foram calibrados para volumes relativos, seguindo a mesma metodologia descrita para as células HEK 93T.

3.2.1.3. Estimativa dos parâmetros de permeabilidade

A análise dos resultados obtidos foi feita utilizando o mesmo *software Berkeley Madonna*. Tal como na linha celular anterior, esta também é permeante a um soluto pelo que o modelo matemático construído anteriormente foi adoptado para estimar os parâmetros de permeabilidade das células A-431.

3.2.1.4. Análise estatística

Os resultados obtidos foram apresentados como a média \pm desvio padrão da média, utilizando o pacote estatístico Social Sciences (SPSS Inc., Chicago Illinois), versão 18,0 com testes paramétricos ou não-paramétricos, dependendo do tipo de distribuição dos dados.

IV. Resultados e

Discussão

4.1. Transformação de células *E. coli* e extracção de DNA

Células *E. coli*, quimicamente competentes, foram transformadas com os plasmídeos construídos com o gene da AQP3 selvagem de *Rattus norvegicus* e com o gene da AQP3 mutada de *Rattus norvegicus*, por substituição da cisteína, localizada na posição 40 da sequência da proteína, por uma serina. Para além das placas inoculadas com as células transformadas, fez-se controlos positivos e negativos, dos quais não se verificou qualquer problema. Das placas inoculadas observaram-se transformantes e recolheu-se várias colónias isoladas para fazer crescimento em meio líquido. Após a incubação durante a noite, extraiu-se o DNA utilizando um kit comercial. A sua concentração e as razões de pureza foram determinados utilizando o NanoDrop-2000 e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela IV.1.

Tabela IV.1. Concentração, e respectiva razão de pureza, determinada para cada amostra de DNA extraído.

Amostra	Concentração (ng/μl)	Abs260/Abs280	Abs260/230
pSport1	29,8	1,87	2,13
pSport1-AQP3 WT	76,0	1,92	2,18
pSport1-AQP3 Mut	35,2	1,91	2,19

Para analisar a pureza do DNA extraído, fez-se a razão entre absorvância a diferentes comprimentos de onda. O DNA presente na amostra, absorve luz a 260nm, enquanto as proteínas absorvem a 280nm e o RNA a 230nm. A relação óptima entre a quantidade de DNA e a quantidade de proteínas, e entre a quantidade de DNA e quantidade de RNA, é respectivamente $1,8 < \text{Abs}260/\text{Abs}280 < 2,0$ e $\text{Abs}260/\text{Abs}230 > 1,8$. Ao analisar as razões determinadas verifica-se que o DNA extraído nas três amostras apresentava um elevado grau de pureza.

4.2. Estudo funcional da AQP3

O trabalho prático desenvolvido dividiu-se em duas partes distintas, mas cuja informação obtida em cada uma delas se complementa. Numa fase inicial do trabalho, utilizou-se a linha celular HEK 293T transfectada com duas formas da AQP3 de *Rattus norvegicus* (selvagem e o mutante Cys40Ser) para caracterizar o seu transporte de água e de glicerol. A homologia obtida entre as sequências da AQP3 em *Rattus norvegicus* e *Homo sapiens* é de aproximadamente 87,7% [52] pelo que os resultados obtidos na caracterização da AQP3 de ratinho podem ser extrapolados para a AQP3 humana. Esta linha celular, extensamente utilizada na ciência, há cerca de 25 anos, como uma

ferramenta para a expressão de proteínas recombinantes, apresenta inúmeras vantagens, entre elas a sua reprodução, e manutenção, rápida e fácil bem como a sua alta taxa de transfecção, entre outras [53].

De seguida, testou-se o Auphen, que mostrou ser um inibidor específico para a AQP3 em eritrócitos humanos [35], avaliando o seu efeito inibidor no transporte de água e de glicerol, por comparação com os parâmetros anteriormente estimados.

Na segunda parte do trabalho, e após verificada a acção do Auphen em células HEK 293T, utilizou-se a linha celular tumoral A-431. Ao contrário das HEK 293T, estas células de carcinoma epidermóide humano possuem uma sobre-expressão endógena da AQP3 [32] cuja expressão anormalmente elevada foi recentemente relacionada com o aumento da capacidade da proliferação celular [54–56]. Tal como anteriormente, também foi caracterizado a cinética de transporte de água e de glicerol, assim como avaliado o respectivo efeito inibidor do Auphen no transporte.

Tanto num caso como no outro, cada condição foi testada em triplicado, recolhendo múltiplas imagens de cada experiência realizada. Na apresentação dos resultados foi seleccionada apenas uma imagem representativa de todas as células analisadas em cada situação experimental, assim como o seu respectivo gráfico de fluorescência e a sua calibração e conversão em volume celular relativo. A análise apresentada, de forma singular, deve ser tida em conta como exemplo, visto que todas as experiências foram analisadas da mesma forma. Para o cálculo dos parâmetros de permeabilidade, são apresentados as curvas ajustadas aos dados experimentais obtidos em cada condição experimental, assim como os coeficientes de permeabilidade obtidos na forma de gráfico de barras.

4.2.1. Sobre-expressão heteróloga da AQP3 em células HEK 293T

4.2.1.1. Avaliação do nível de expressão

Antes de se dar início aos estudos funcionais nas células HEK 293T foi necessário avaliar a eficiência da transfecção do gene da AQP3 selvagem e da mutante analisando o nível de expressão destes genes nas células. Após a extracção de mRNA das células e a sua amplificação, em tempo real, por PCR obtiveram-se diferentes níveis de expressão apresentados na Figura IV.1. Ao analisar os resultados verifica-se que a expressão genética da AQP3 selvagem e da mutada, nas células trasfectadas, aumentou 1000 vezes quando comparado com as células não transfectadas. Também se verifica que a expressão genética desta proteína nas células trasfectadas com o vector vazio é muito semelhante ao valor obtido para as células controlo.

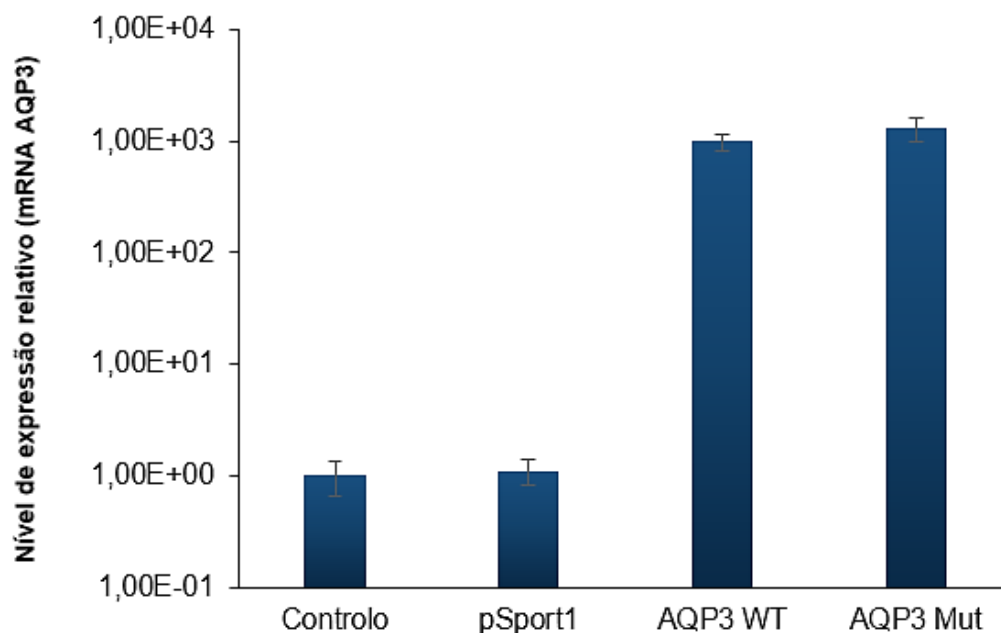


Figura IV.1. Nível de expressão relativo de mRNA AQP3, por RT-qPCR. Gráfico comparativo do nível de expressão da AQP3, selvagem e mutada, em células HEK 293T transfectadas. Utilizou-se a amplificação da ciclofilina como controlo.

4.2.1.2. Caracterização da cinética de transporte da AQP3

Para o estudo da caracterização cinética, as células foram incubadas com calceína-AM, nas condições descritas. A câmara foi montada no microscópio e, de seguida, fez-se incidir um feixe de luz a 495nm para excitar as células e conseguir focar um plano. Estas, quando excitadas a este comprimento de onda, apresentam uma cor verde forte (Figura IV.2), que se deve à emissão de fluorescência da calceína livre no citosol.

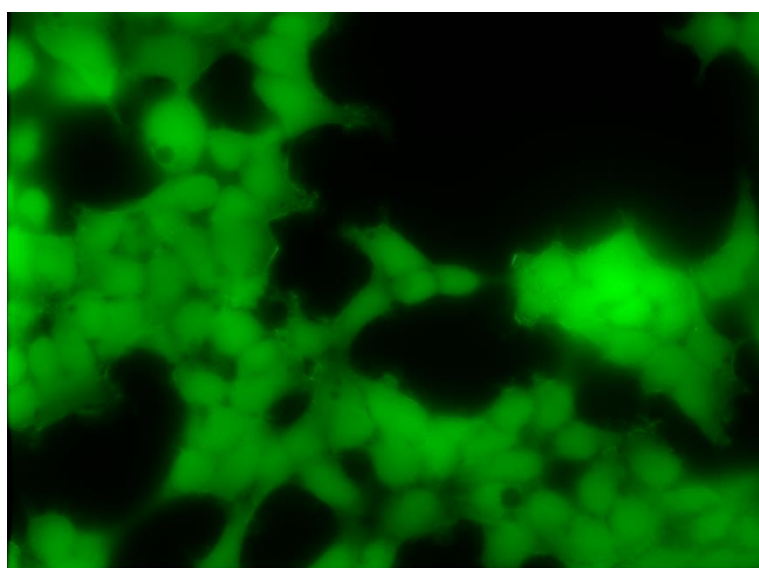


Figura IV.2. Células HEK 293T incubadas com calceína-AM.

Seguidamente foi delimitado o perímetro das células, através do *software Metafluor* para registar a variação de fluorescência ao longo do tempo Figura IV.3 (A). Desta forma, é possível acompanhar visualmente a variação de volume das células ao longo da experiência e correlacionar directamente com a sua variação de fluorescência adquirida e apresentada na Figura IV.3 (B).

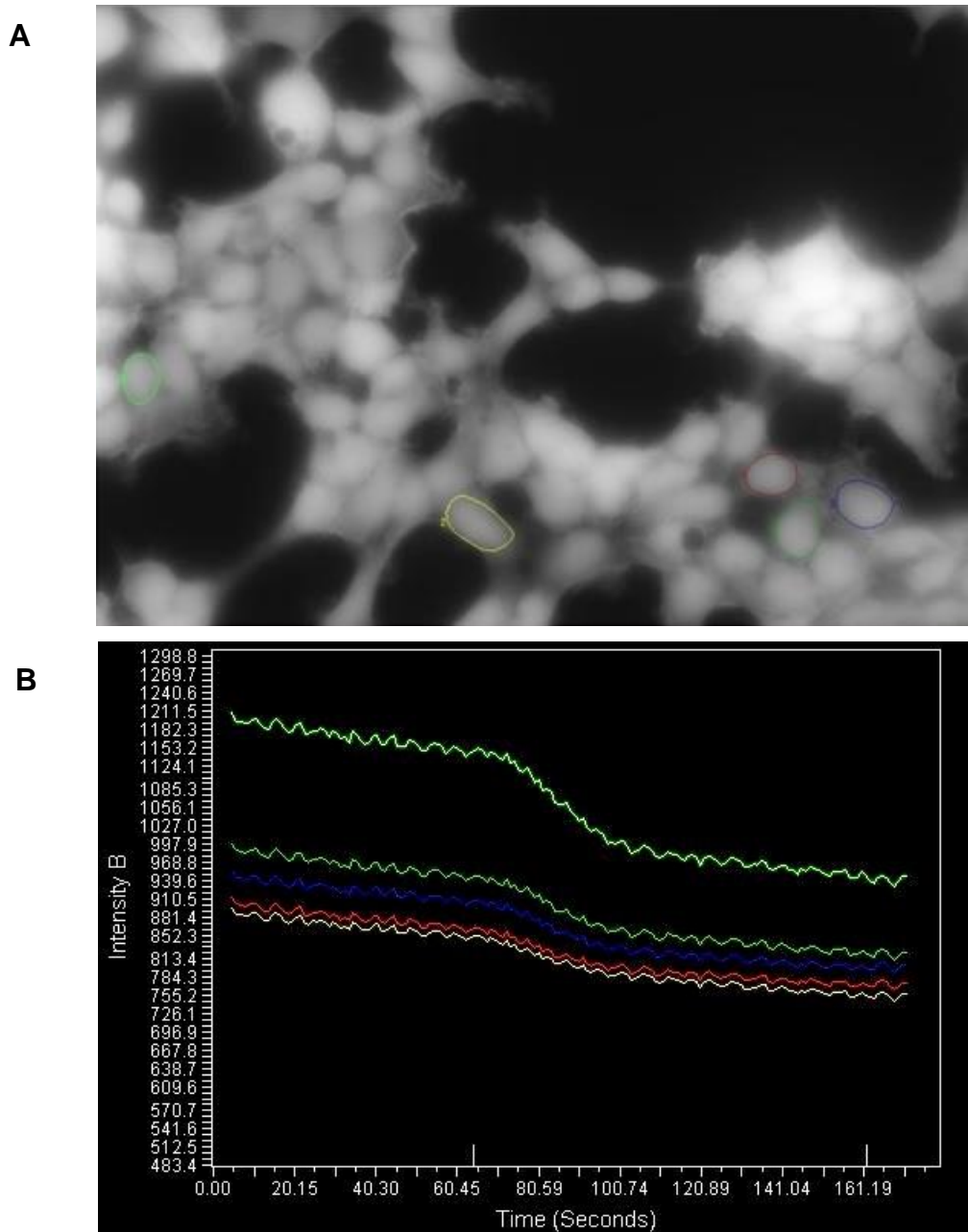


Figura IV.3. Registo dos dados obtidos durante um ensaio experimental, utilizando o *software Metafluor*. (A) Delimitação das células. (B) Sinal de fluorescência, ao longo do tempo, obtido para cada célula delimitada.

As células foram equilibradas em tampão HEPES, com osmolaridade igual a 300mOsm, durante 60s, período durante o qual não é esperada qualquer variação de volume. De seguida, foi trocada a solução inicial por uma solução hiperosmótica, com uma tonicidade equivalente a 2, isto é, as células passaram a estar numa solução com o dobro da osmolaridade e, conseqüentemente tiveram de reajustar o seu volume, através da saída de água, para manter a homeostase. Os sinais de fluorescência adquiridos Figura IV.3 (B) mostram que mesmo antes da introdução da nova solução, há uma diminuição constante da fluorescência devida à degradação da sonda o que se reflecte num decaimento da capacidade de emitir fluorescência (*bleaching*). Após a introdução do choque, a fluorescência diminui de forma brusca em consequência da diminuição de volume.

O gráfico da Figura IV.4 apresenta um sinal da variação de fluorescência (a azul) após aplicação: *i*) um choque osmótico com manitol (MANITOL), *ii*) recuperação de volume celular após re-introdução da solução isotónica inicial (HEPES), e *iii*) choque osmótico com glicerol (GLICEROL). A recta a verde mostra o factor *bleaching* e a curva a laranja mostra o sinal de fluorescência obtido após subtracção do factor *bleaching*.

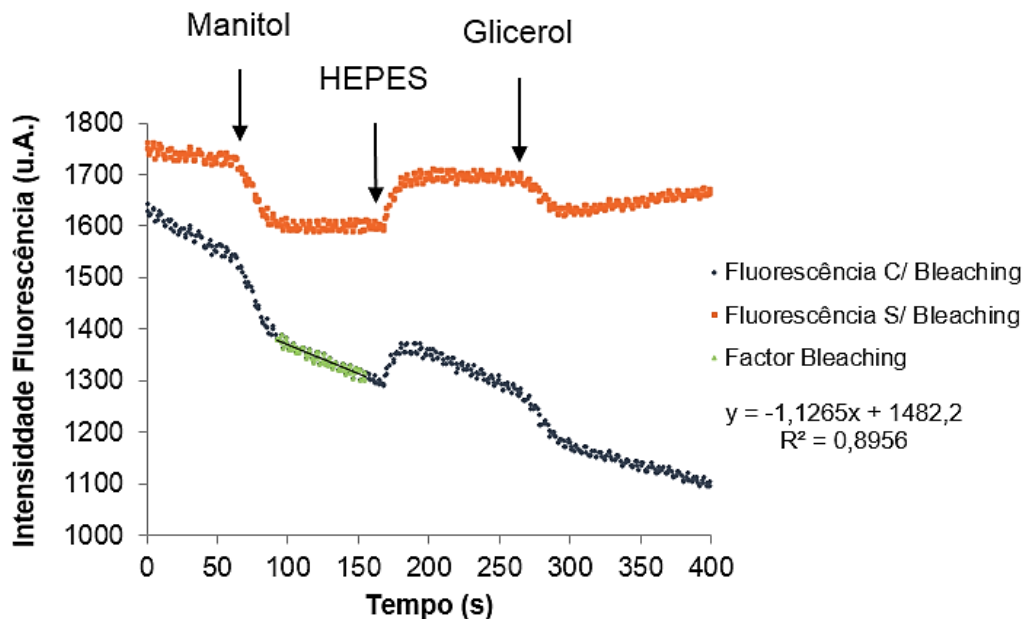


Figura IV.4. Representação gráfica do sinal de fluorescência em função do tempo. A azul (●) apresenta-se o sinal de fluorescência com o factor *bleaching*. A estes pontos experimentais subtraiu-se a recta (▲) que resultou no sinal a laranja (■), isto é, no sinal de fluorescência sem o factor *bleaching*.

Como se verifica através do gráfico, os dados de fluorescência recolhidos apresentam um declive bastante acentuado em certos períodos de tempo (*bleaching*) durante o qual não existe nenhuma variação da osmolaridade externa. Após a subtracção do *bleaching* a variação de fluorescência F reflecte apenas a variação de volume (a laranja). Os sinais de F foram convertidos em F/F_0 e após calibração em V/V_0 a partir da

respectiva relação linear [49] medindo para isso os volumes iniciais ($t=0$) e finais ($t=\infty$) do choque de manitol.

Em cada ensaio foi determinado, por recurso ao *software ImageJ*, o volume médio celular ($n=10$) imediatamente antes da introdução do choque com manitol ($t=0, V_0$) e após se ter atingido o novo equilíbrio osmótico ($t=\infty, V_{inf}$) (Figura IV.5). Apresentam-se as correspondentes tabelas de conversão dos pixéis em área, raio e volume das células (devidamente numeradas de cada imagem) e calcularam-se assim os valores médios dos volumes iniciais e finais (Tabela IV.2). Para cada ficheiro e a partir da relação linear entre V/V_0 e F/F_0 e dos respectivos pares de valores de F_{inf}/F_0 e V_{inf}/V_0 , determinou-se o declive (a) e ordenada na origem (b) de cada recta de calibração.

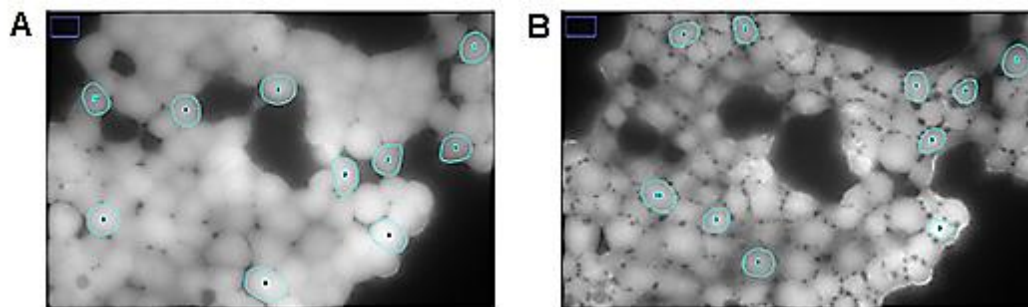


Figura IV.5. Determinação do volume celular utilizando o *software ImageJ*. Delimitação das células (A) no instante da introdução do choque e (B) no novo equilíbrio osmótico.

Tabela IV.2. Determinação do volume, nos dois instantes de tempo analisados, através da relação pixel/área e conseqüente conversão em volume, considerando as células esféricas.

Célula	Pixéis	Área (μm^2)	Raio (μm)	Volume (μm^3)	Célula	Pixéis	Área (μm^2)	Raio (μm)	Volume (μm^3)
1	6129	158,67	7,11	1.503,54	1	4875	126,21	6,34	1.066,58
2	6573	170,17	7,36	1.669,85	2	4127	106,84	5,83	830,78
3	7547	195,38	7,89	2.054,44	3	4199	108,71	5,88	852,61
4	7883	204,08	8,06	2.193,15	4	3060	79,22	5,02	530,41
5	9881	255,81	9,02	3.077,75	5	3884	100,55	5,66	758,49
6	6197	160,43	7,15	1.528,64	6	4703	121,76	6,23	1.010,64
7	6534	169,16	7,34	1.655,01	7	6047	156,55	7,06	1.473,47
8	6502	168,33	7,32	1.642,87	8	6047	156,55	7,06	1.473,47
9	6919	179,12	7,55	1.803,42	9	3580	92,68	5,43	671,21
10	5818	150,62	6,92	1.390,57	10	7117	184,25	7,66	1.881,38
Média			7,57	1.851,92	Média			6,22	1.054,90

A Figura IV.6 representa o resultado final da conversão de um sinal de fluorescência em volume relativo.

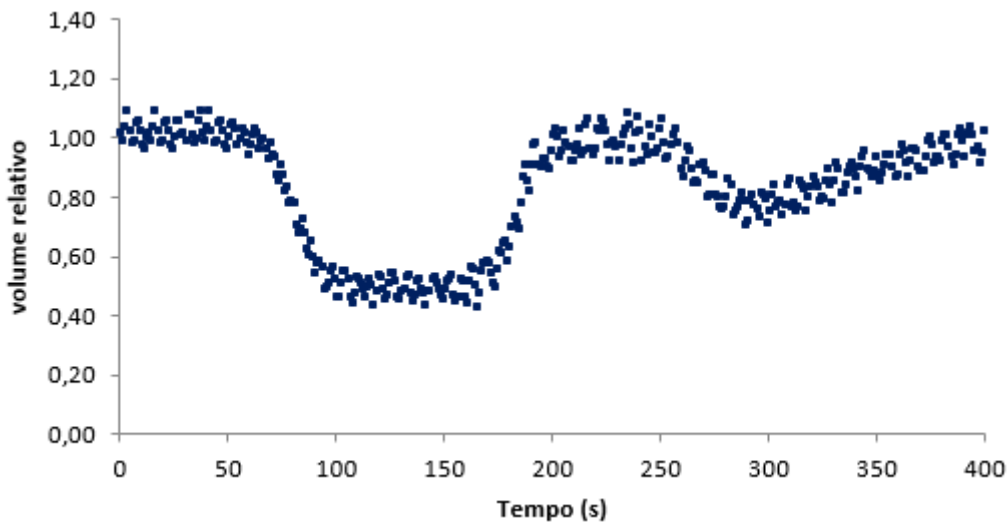


Figura IV.6. Representação gráfica da variação de volume celular relativo ao longo do tempo. Após a calibração dos sinais de fluorescência recolhidos e tratados, obteve-se os sinais em volume relativo ($0 < v_{rel} < 1$) que foram utilizados para estimar os parâmetros de permeabilidade.

Após todos os passos apresentados, os dados da variação de V/V_0 foram então analisados através do modelo matemático implementado no software *Berkeley Madonna* que permite estimar as permeabilidades (P_f e P_{gly}) por ajustamento da curva teórica às curvas experimentais obtidas. O modelo construído e utilizado para estimar os parâmetros de permeabilidade teve por base as equações simplificadas de Kedem Katchalsky. Os dados calibrados e previamente guardados num documento de texto, foram importados para o *software* ao qual foi fornecido os valores das constantes e os valores iniciais dos parâmetros (permeabilidades e volume não-osmótico) apresentados na Tabela IV.3. Estes valores constantes foram utilizados para todos os ajustes realizados sendo que não voltará a ser feito referência aos mesmos daqui em diante. Também foi necessário fornecer o valor médio, em cm, do raio das células (r_0) deduzido aquando da determinação do volume, no instante $t=0$, através do *ImageJ*. O volume não-osmótico foi estimado várias vezes, utilizando diferentes séries de dados, e verificou-se que o seu valor era, em média, inferior a 0,1 concluindo que o seu valor era negligenciável. Assim, os ajustes aos dados experimentais das diferentes transfecções foram realizados considerando o volume não-osmótico constante e igual a zero.

Tabela IV.3. Parâmetros constantes utilizados no *software Berkeley Madonna*, para estimar os parâmetros de permeabilidade.

Parâmetros	
T	298 K
R	8,3144 J mol ⁻¹ K ⁻¹
V _w	18 m ³ mol ⁻¹
Osmolaridade externa	300 mOsm
Soluto adicionado	300 mOsm
Tonicidade	2

Seguindo os objectivos a que se propôs a realização deste trabalho experimental, foi caracterizada a cinética de transporte de água e glicerol das diferentes células transfectadas, analisando os respectivos sinais desde *i*) a introdução do choque de manitol $t \approx 60$ s até à re-introdução da solução isotónica de HEPES ($t \approx 160$ s) para a estimativa do P_f e, *ii*) a introdução do choque de glicerol $t \approx 250$ s até cerca de 400s para estimativa do P_{gly} .

Durante os 60s iniciais as células estiveram equilibradas em tampão HEPES, em que $(osm_{out})_0 = (osm_{in})_0 = 300$ mOsm, substituído, ao final de 60s, pelo tampão HEPES com manitol, em que $(osm_{out})_0 = 600$ mOsm. O choque osmótico foi introduzido recorrendo a um soluto impermeante (manitol) para avaliar alterações mensuráveis de volume estando as células em novo equilíbrio osmótico entre os 120s 150s. O gráfico da variação de volume relativo das diferentes células transfectadas, assim como o ajuste do modelo aos dados experimentais do pSport1 (Figura IV.7). Não se apresentam aqui os outros dois ajustes pois são quase sobreponíveis.

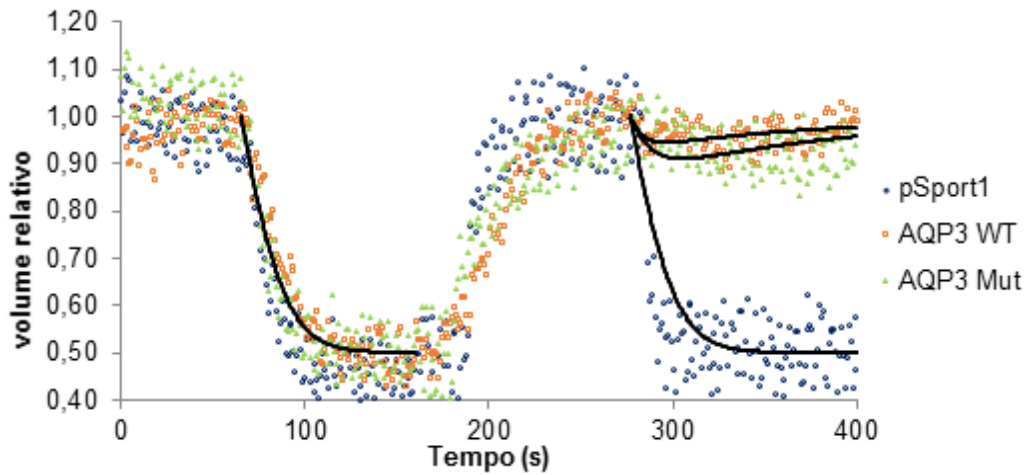


Figura IV.7. Representação gráfica da variação de volume celular relativo ao longo do tempo, e respectivos assentamentos das curvas teóricas aos dados experimentais (—). A azul (○), a laranja (□) e a verde (△) correspondem os dados experimentais calibrados para as células com pSport1 (controlo), AQP3 selvagem e AQP3 mutada (Cys40Ser), respectivamente. Inicialmente, o ajuste das curvas teóricas foi realizado, aproximadamente, entre os 60s e 160s para estimar o parâmetro de permeabilidade à água (P_f). Durante este período as células estiveram incubadas com manitol. De seguida, o ajuste da curva teórica foi realizado, aproximadamente, entre os 265s e 400s para estimar o parâmetro de permeabilidade ao glicerol (P_{gly}). Durante este período as células estiveram incubadas com glicerol. Para os diferentes ajustes considerou-se a média do raio celular inicial (r_0) igual a $7,5\mu\text{m}$.

Ao analisar os diferentes sinais verifica-se que a resposta das células à introdução deste choque osmótico com manitol é muito semelhante, relativamente à velocidade em que se atinge o volume final. O volume relativo manteve-se constante, e igual a 1, durante os primeiros 60s. Após a substituição da solução isotónica por uma solução com o dobro da osmolaridade, as células diminuíram o seu volume, de forma rápida, para metade para reajustar a osmolaridade interna e manter a homeostase. Após a optimização do assentamento das curvas teóricas aos dados experimentais obteve-se os seguintes parâmetros de permeabilidade à água: $P_{f(pSport1)} = (5,93 \pm 0,001) \times 10^{-4} \text{ cm/s}$ ($n=10$); $P_{f(AQP3_{WT})} = (7,50 \pm 1,20) \times 10^{-4} \text{ cm/s}$ ($n=11$) e $P_{f(AQP3_{Mut})} = (7,10 \pm 0,60) \times 10^{-4} \text{ cm/s}$ ($n=15$). Apresenta-se, de seguida, os valores de permeabilidade estimados, sob a forma de gráfico de barras (Figura IV.8).

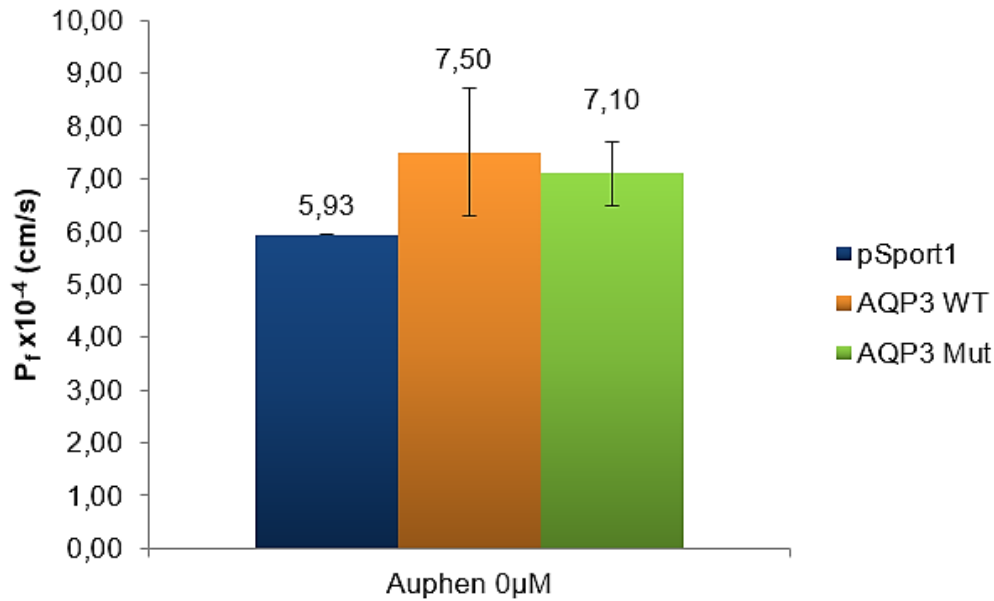


Figura IV.8. Estudo funcional do transporte de água em células HEK 293T com pSport1 (controlo) e em células HEK 293T com sobre-expressão do gene AQP3 selvagem e AQP3 mutada (Cys40Ser). Este gráfico representa os valores de permeabilidade à água estimados, com o respectivo desvio padrão calculado.

As células com o vector vazio (pSport1) serviram como controlo para que fosse possível saber qual a permeabilidade intrínseca das células HEK 293T à água. Pelo valor estimado, comprova-se que estas células já possuem uma alta permeabilidade. Por comparação com as células controlo, verifica-se que as células com a AQP3 selvagem não apresentam um aumento considerável de permeabilidade à água sendo que valor se encontra muito próximo do descrito na literatura [57] onde se recorreu à micro-injecção de cRNA codificante para a AQP3 em células *Xenopus oocytes*.

Tal como referido anteriormente, um dos objectivos deste trabalho era avaliar a importância deste resíduo no transporte de água, e por comparação dos parâmetros entre a AQP3 selvagem e a AQP3 mutante constata-se que, apesar da substituição do resíduo não se verificou nenhuma alteração da permeabilidade de água pois os parâmetros são muito semelhantes. Desta forma, não foi possível determinar o mecanismo de transporte de água contudo fica provado que os resíduos presentes na vizinhança da Cys40 asseguram o transporte de água quando este é substituído.

Após a caracterização da cinética de transporte de água, o mesmo método foi aplicado para estimar a permeabilidade ao glicerol. Entre os 200s e os 250s as células estiveram equilibradas em HEPES em que $(osm_{out})_0 = (osm_{in})_0 = 300\text{mOsm}$ e readquiriram o seu volume inicial $v_{rel}=1$. Ao final deste período substituiu-se a solução por tampão HEPES com glicerol, em que $(osm_{out})_{inf}=600\text{mOsm}$. Para a obtenção do P_{gly} utilizaram-se os dados experimentais, aproximadamente, entre os 265s e os 400s, período durante o qual as células estiveram imersas em tampão HEPES com glicerol. O choque osmótico foi pois introduzido recorrendo ao soluto permeante glicerol. Na Figura IV.7 mostra-se o sinal

gráfico relativo às diferentes células transfectadas desde os 265s aos 400s, com o respectivo ajuste das curvas teóricas aos respectivos dados experimentais.

Desta vez, e contrariamente ao que aconteceu no choque de manitol, os sinais não se comportaram todos da mesma forma. Ao analisar o sinal correspondente às células controlo constata-se que o seu comportamento se assemelha ao apresentado quando se introduziu o choque de manitol. De forma totalmente oposta, foi o comportamento das células com a AQP3 selvagem assim como as com AQP3 mutada. Estas células, mantiveram o seu volume constante quando equilibradas com a solução isotónica, diminuindo ligeiramente e recuperando o volume inicial, após a introdução do choque com glicerol. Estas células, por possuírem uma sobre-expressão de AQP3 recuperaram o seu volume normal rapidamente através da entrada de glicerol que arrasta consigo moléculas de água.

Posteriormente ao ajuste da curva teórica aos dados experimentais, obteve-se os seguintes parâmetros de permeabilidade ao glicerol: $P_{gly} (pSport1) = (0,00 \pm 0,001) \times 10^{-5} \text{ cm/s}$ (n=6); $P_{gly} (AQP3 \text{ WT}) = (3,19 \pm 0,40) \times 10^{-5} \text{ cm/s}$ (n=11) e $P_{gly} (AQP3 \text{ Mut}) = (3,00 \pm 0,35) \times 10^{-5} \text{ cm/s}$ (n=12). Apresenta-se, de seguida, os valores de permeabilidade estimados, sob a forma de gráfico de barras (Figura IV.9).

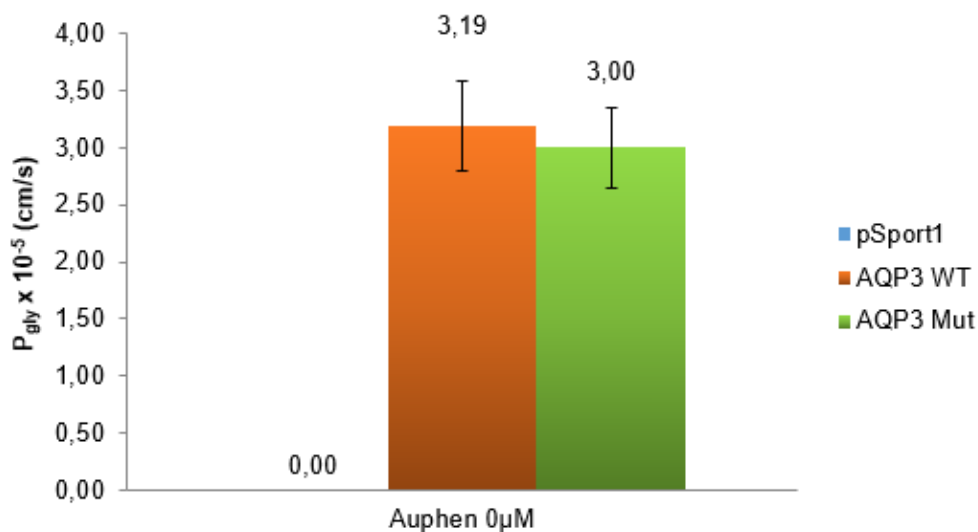


Figura IV.9. Estudo funcional do transporte de glicerol em células HEK 293T com pSport1 (controlo) e em células HEK 293T com sobre-expressão do gene AQP3 selvagem e AQP3 mutada (Cys40Ser). Este gráfico representa os valores de permeabilidade à água estimados, com o respectivo desvio padrão calculado.

Inicialmente, foi estimado o parâmetro P_{gly} nas células controlo para avaliar a expressão homóloga de transportadores de glicerol. Por se aproximar de zero, o transporte de glicerol não foi mensurável nas células controlo, e conseqüentemente, tornou-se impossível verificar a presença de transportadores de glicerol através desta técnica. A quantificação de transportadores de glicerol nas células HEK 293T requer uma técnica mais selectiva e com maior precisão dada a sua expressão tão residual. No entanto, o nosso interesse é caracterizar a cinética de transporte de glicerol da AQP3, em que se estimou o parâmetro P_{gly} tanto em células com a AQP3 selvagem como a AQP3 mutada.

Tanto num caso como no outro observou-se um aumento substancial da permeabilidade ao glicerol em comparação com as células controlo, confirmando a localização da AQP3 na membrana plasmática. Tal como já tinha acontecido na caracterização cinética do transporte de água, neste caso, o parâmetro de permeabilidade ao glicerol da AQP3 WT encontra-se muito próximo ao descrito na literatura [57].

Tal como anteriormente, também se analisou a importância da Cys40, desta vez, no mecanismo de transporte glicerol através AQP3. Ao comparar o parâmetro P_{gly} estimado para as células com a AQP3 mutada com o estimado para as células com a AQP3 selvagem verifica-se que não existe uma alteração significativa pelo que fica provado que existem outros resíduos na vizinhança do resíduo Cys40 que asseguram o transporte de glicerol quando este é substituído por uma serina, tal como aconteceu com no transporte de água.

4.2.1.3. Estudo do efeito inibidor do Auphen

As condições de análise utilizadas para este estudo (condições de incubação da sonda, osmolaridade das soluções utilizadas para introdução do choque, condições de aquisição, tratamento e calibração de sinal) foram muito semelhantes às anteriores. Para além da sonda, também se incubou 5 μ M Auphen durante 30min, a 37°C e 5% CO₂, antes de se iniciar a experiência. Assim, só serão apresentados os ajustes obtidos bem como os parâmetros de permeabilidade estimados sob a forma de gráfico de barras. Tal como anteriormente, o volume não-osmótico foi estimado várias vezes e obteve-se o mesmo resultado ($b < 0,1$). Dessa forma, este parâmetro foi considerado constante, e igual a zero, para os ajustes realizados aos dados experimentais das diferentes transfecções.

Numa primeira fase, a análise dos dados foi feita, aproximadamente, entre os 0 e os 160s com o objectivo de estimar o parâmetro de permeabilidade da água. Durante este período, e como aconteceu anteriormente, as células estiveram equilibradas em tampão HEPES e ao fim de 60s substituiu-se pelo tampão HEPES com manitol. De seguida, apresenta-se um gráfico significativo relativo às células com AQP3 selvagem e outro com a AQP3 mutada (Figura IV.10). Não são apresentados os ajustes da curva teórica aos dados experimentais no intervalo de tempo durante o qual as células estiveram equilibradas com manitol, visto que os dados experimentais são muito semelhantes aos obtidos anteriormente, na caracterização da AQP3. Da mesma forma, não se apresenta os dados experimentais obtidos para as células controlo, uma vez que não se verificou alteração do comportamento quando estas foram incubadas com Auphen.

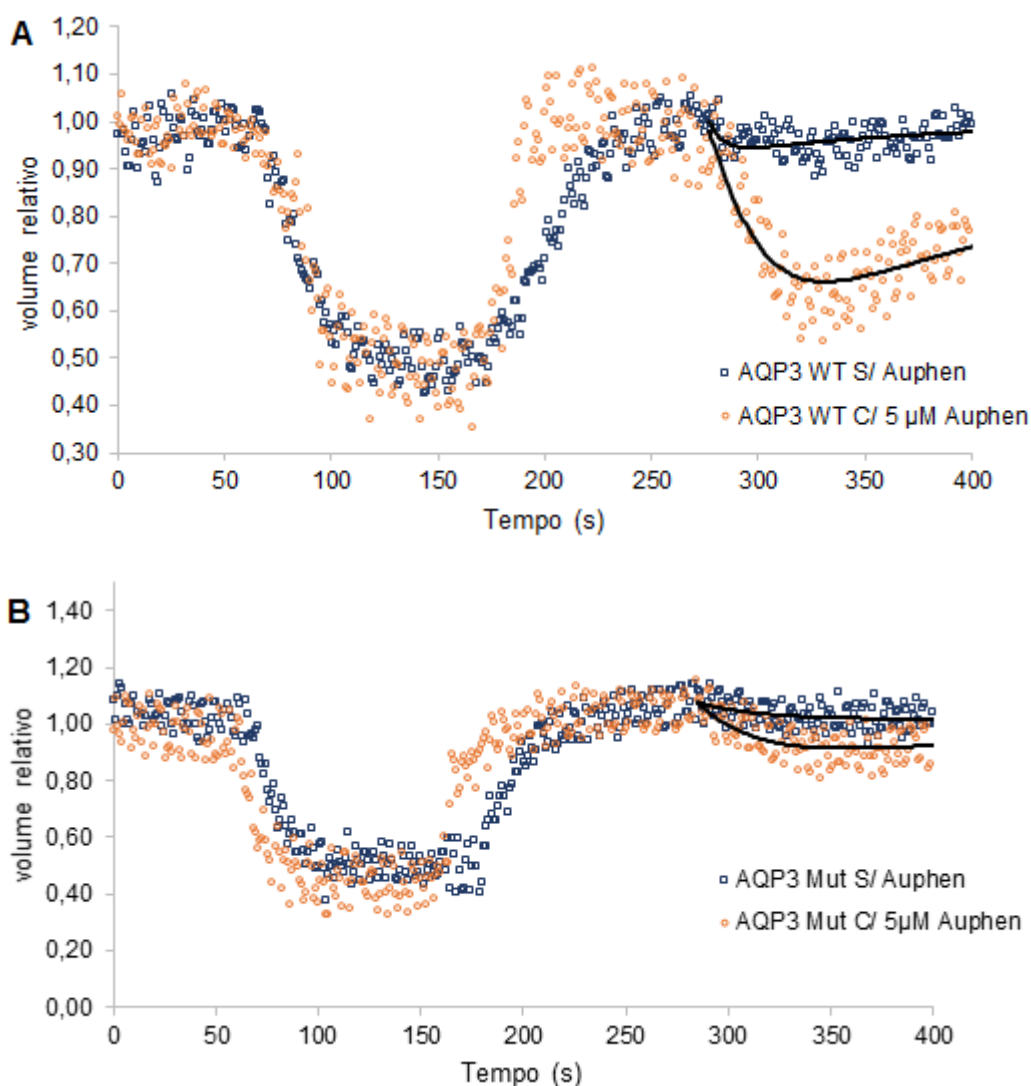


Figura IV.10. Representação gráfica da variação de volume celular relativo ao longo do tempo, e respectivos assentamentos das curvas teóricas aos dados experimentais (—). (A) Dados experimentais calibrados para as células com AQP3 selvagem e (B) para células com AQP3 mutada (Cys40Ser) sem incubação de Auphen (□) e com incubação de 5µM Auphen (○). O ajuste da curva teórica foi realizado, aproximadamente, entre os 265s e 400s para estimar o parâmetro P_{gly} . Durante este período as células estiveram incubadas com glicerol. Para os diferentes ajustes considerou-se a média do raio celular inicial (r_0) igual a 7,5µm.

Ao comparar os dois sinais de cada transfecção (com e sem Auphen), verifica-se que o seu comportamento é muito semelhante entre si, não se tendo encontrado alterações significativas à permeabilidade à água devidas ao Auphen, quer na AQP3 selvagem quer na mutada assim como nas células controlo. Após o ajuste das curvas teóricas aos dados experimentais obtiveram-se os seguintes parâmetros de permeabilidade à água para as células incubadas com Auphen: $P_f (pSport1) = (6,10 \pm 0,001) \times 10^{-4}$ cm/s (n=12); $P_f (AQP3 WT) = (5,38 \pm 1,70) \times 10^{-4}$ cm/s (n=27) e $P_f (AQP3 Mut) = (5,37 \pm 0,87) \times 10^{-4}$ cm/s (n=14). Na Figura IV.11 são apresentados, em conjunto, os parâmetros P_f estimados na ausência e na presença de Auphen, por forma a comparar e discutir o efeito inibidor do composto em estudo.

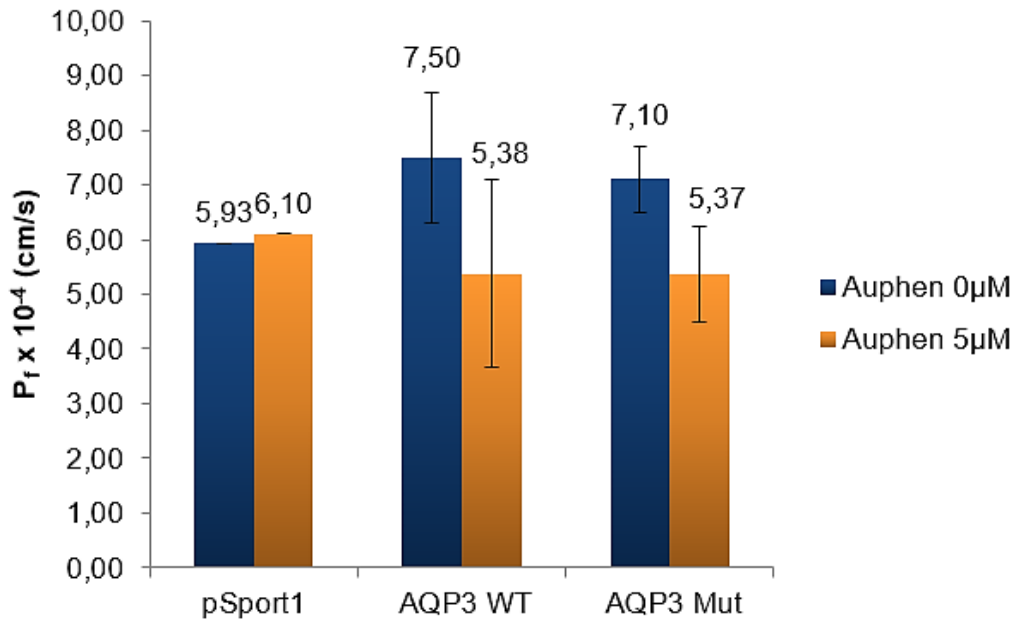


Figura IV.11. Estudo funcional do transporte de água em células HEK 293T com pSport1 (controlo) e em células HEK 293T com sobre-expressão do gene AQP3 selvagem e AQP3 mutada (Cys40Ser). Este gráfico representa os valores de permeabilidade à água estimados, com o respectivo desvio padrão calculado, para as células sem incubação e com incubação de 5µM Auphen.

Primeiramente, foi estimado o parâmetro de permeabilidade à água nas células controlo. Estas células já tinham apresentado uma alta permeabilidade intrínseca anteriormente e, ao analisar o gráfico, verifica-se que o inibidor não tem qualquer efeito sobre o mecanismo de transporte de água visto que os parâmetros estimados em ambos os casos se aproximam, provando que o Auphen não tem qualquer afinidade para nenhum transportador de água das células controlo.

De seguida, foram analisadas as células com a AQP3 selvagem e com a AQP3 mutada para avaliar a acção do Auphen no transporte de água. Já tinha sido determinado, anteriormente, que este composto era selectivo para a AQP3 contudo, e analisando os dados obtidos, não se verifica qualquer efeito inibidor do composto no transporte de água, tanto num caso como no outro, visto que o P_f estimado se assemelha ao valor determinado na caracterização da cinética de transporte de água. Em ambos os casos, prova-se que a incubação das células com 5µM de Auphen não teve qualquer efeito no transporte de água que se pode dever à incapacidade de bloquear o canal à passagem da água ou à incapacidade de ligação do composto à AQP3.

Após estudar o efeito do Auphen no transporte de água, aplicou-se o mesmo método para avaliar o efeito deste composto no transporte de glicerol. Aos dados experimentais, previamente tratados e importados para o *software*, fez-se ajustar a curva teórica, por optimização do P_{gly} , mantendo constante o valor de P_f estimado para cada série de dados. O ajuste realizou-se, aproximadamente, entre os 265s e os 400s, período durante o qual as células estiveram equilibradas em tampão HEPES com glicerol (Figura IV.10).

Ao analisar os diferentes sinais verifica-se que o seu comportamento varia bastante. Numa fase inicial, as células mantiveram o seu volume relativo constante, e igual a 1. Após a introdução do choque, as células reagiram de forma muito distinta. As células controlo apresentaram um comportamento muito semelhante aquando da introdução do choque com manitol, isto é, diminuíram o seu volume para metade sem nenhuma recuperação posterior (curvas não apresentadas). Os sinais correspondentes à AQP3 selvagem mostram um comportamento distinto na presença e ausência de Auphen, sendo o decréscimo inicial de volume mais significativo nas células tratadas com Auphen. Os volumes recuperam o seu valor inicial no final dos 400s. Para as AQP3 mutada a diferença dos sinais com e sem Auphen, não é tão significativa.

Após o ajuste da curva teórica, obtiveram-se os seguintes parâmetros de permeabilidade ao glicerol para as células tratadas com Auphen: $P_{gly(pSport1)} = (0,00 \pm 0,001) \times 10^{-5} \text{ cm/s}$ ($n=8$); $P_{gly(AQP3 WT)} = (0,59 \pm 0,07) \times 10^{-5} \text{ cm/s}$ ($n=27$) e $P_{gly(AQP3 Mut)} = (1,90 \pm 0,05) \times 10^{-5} \text{ cm/s}$ ($n=14$). Apresenta-se, de seguida, um gráfico de barras com estes valores de permeabilidade, em conjunto com os parâmetros estimados na caracterização da cinética de transporte, por forma a comparar e discutir o efeito do Auphen no transporte (Figura IV.12).

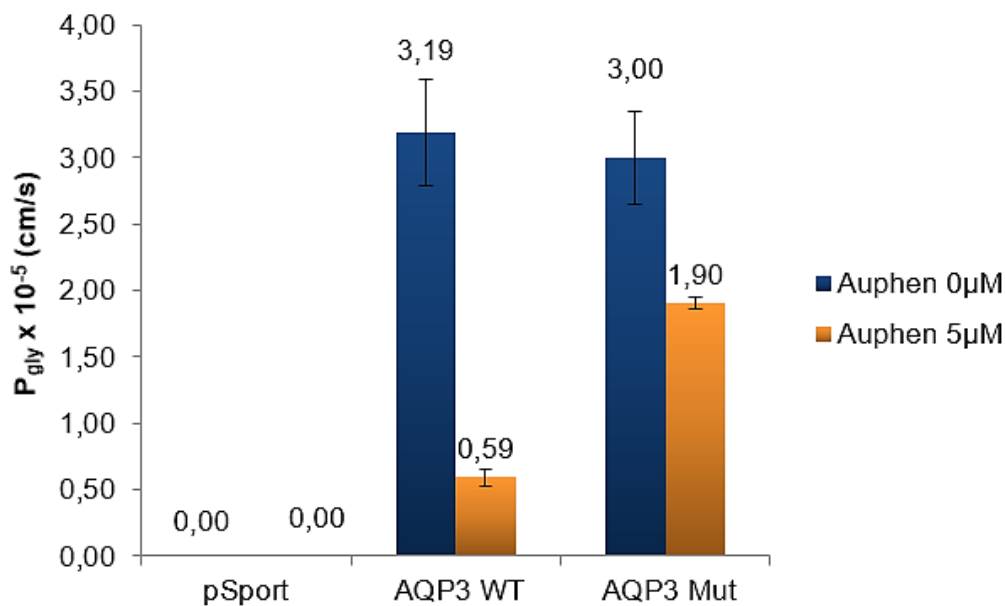


Figura IV.12. Estudo funcional do transporte de glicerol em células HEK 293T com pSport1 (controlo) e em células HEK 293T com sobre-expressão do gene AQP3 selvagem e AQP3 mutada (Cys40Ser). Este gráfico representa os valores de permeabilidade à água estimados, com o respectivo desvio padrão calculado, para as células sem incubação e com incubação de 5µM Auphen.

Já anteriormente se tinha provado que o transporte de glicerol não era mensurável nas células HEK 293T, com P_{gly} muito próximo de zero. Em células HEK 293T incubadas com o Auphen, voltou-se a verificar o mesmo não obtendo qualquer informação sobre uma possível ligação com algum transportador de glicerol presente na membrana celular visto que o seu transporte, e consequentemente, a sua possível inibição, não são mensuráveis.

Numa segunda fase, analisou-se o sinal relativo às células com a AQP3 selvagem. Anteriormente, ficou provado que estas células diminuíam ligeiramente o seu volume, quando expostas a um choque osmótico com glicerol, mas rapidamente havia a recuperação total por entrada de água e glicerol. No entanto, quando as células são incubadas com 5 μ M Auphen reagem, de forma distinta, isto é com uma diminuição de volume mais acentuada após a introdução do choque com a posterior recuperação ao volume inicial. Por comparação com parâmetros estimados em ambos os casos, verifica-se que este composto inibe em 81,5% o transporte de glicerol. Tal como referido anteriormente, a AQP3 está associada ao aumento da capacidade de proliferação de células de carcinoma epidermóide, uma vez que a sua sobre-expressão aumenta a entrada de glicerol nas células com a sua consequente utilização no metabolismo e formação de uma quantidade de ATP muito superior. O alto poder inibidor deste composto assim como a sua selectividade para o transporte de glicerol, são poderosas vantagens apresentadas pelo Auphen tornando-o num forte candidato para futuro desenvolvimento de fármacos. Na segunda parte deste trabalho foram ainda efectuados estudos complementares em que este inibidor foi testado em células de carcinoma epidermóide. Adicionalmente, em colaboração com outro laboratório, realizaram-se estudos de citotoxicidade e de proliferação celular de modo a correlacionar a inibição da função da AQP3 com a diminuição da proliferação celular de células tumorais.

Por último, estudou-se a importância do resíduo Cys40 no mecanismo de ligação, visto que este resíduo foi descrito como sendo o principal sítio de ligação do Auphen [35]. O que se verifica é que as células com a AQP3 mutada não apresentam uma inibição tão marcada do transporte de glicerol, em comparação com as células com a AQP3 selvagem. Para a AQP3 mutada, a percentagem de inibição obtida foi somente de 36,7%, provando que o que anteriormente apenas era conhecido por modelação molecular. O resíduo Cys40 é de facto o principal sítio de ligação do composto à proteína, apresentando uma alta eficiência quando se liga a este resíduo. Contudo quando este é substituído por uma serina, possivelmente o Auphen encontra um segundo local de ligação que leva a uma inibição parcial, com uma inibição menos eficaz.

4.2.2. Expressão homóloga de AQP3 em células A-431

4.2.2.1. Caracterização da cinética de transporte

Nesta segunda parte do trabalho experimental, o processo de incubação da sonda, a montagem da lamela, a osmolaridade das soluções utilizadas para introdução do choque osmótico, bem as condições de aquisição dos sinais de fluorescência, o seu tratamento e calibração foram feitos de forma semelhante à descrita para as HEK 293T. Assim a demonstração representativa apresentada anteriormente deve ser tida como exemplo também para os ensaios realizados com esta linha celular. Apresenta-se, de seguida, uma imagem representativa das células de carcinoma epidermóide humano (Figura IV.13).

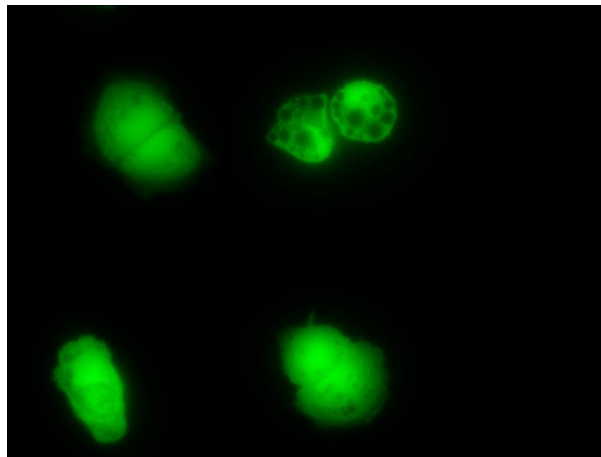


Figura IV.13. Células A-431 incubadas com calceína-AM.

Para esta linha celular, foi estimado o volume não-osmótico celular (b) para cada ensaio e verificou-se que este parâmetro se aproximou, em média, de 0,4. Assim, decidiu-se ter em conta este valor como constante para a estimativa dos parâmetros P_f e P_{gly} .

Para caracterizar a cinética de transporte de água e glicerol, as células foram equilibradas em tampão HEPES, substituído ao final de 80s por tampão HEPES com manitol ou com glicerol, respectivamente. De seguida, apresenta-se os dois gráficos, assim como os ajustes obtidos aos dados experimentais, relativos aos ensaios com manitol e com glicerol (Figura IV.14).

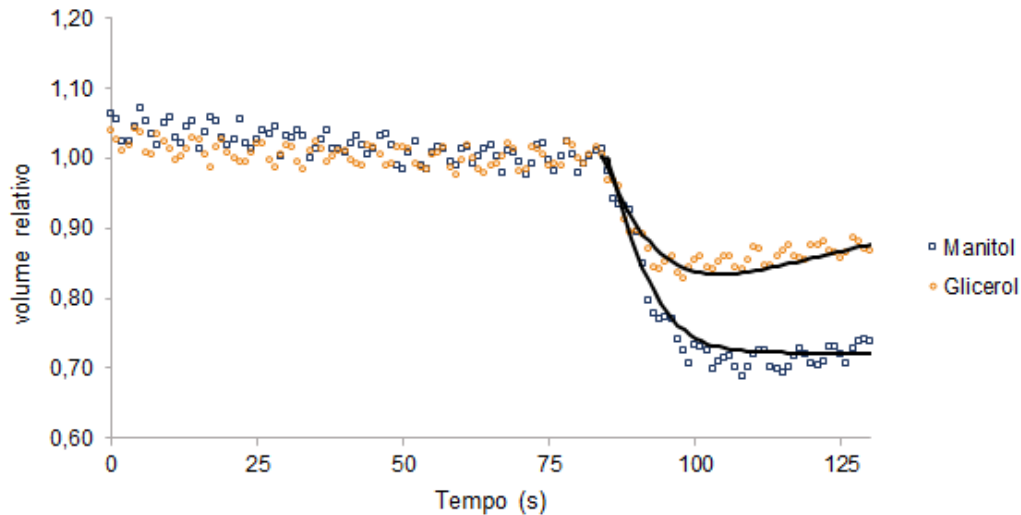


Figura IV.14. Representação gráfica da variação de volume celular relativo ao longo do tempo, e respectivos assentamentos das curvas teóricas aos dados experimentais (—). A azul (□) e a laranja (○) correspondem os dados experimentais calibrados para as células após sofrerem um choque com manitol e glicerol, respectivamente. O ajuste das curvas teóricas aos dados experimentais foi realizado entre os 80s e 130s para estimar o parâmetro P_f e P_{gly} . Para os diferentes ajustes considerou-se a média do raio celular inicial (r_0) igual a $8,7\mu\text{m}$.

Em ambos os casos, as células mantiveram o seu volume relativo constante, e igual a 1, durante o intervalo de tempo em que estiveram equilibradas com a solução isotónica. A reacção das células à introdução do choque osmótico variou de acordo com o tipo de soluto utilizado. No primeiro caso, as células diminuíram rapidamente o seu volume para 0,7, em resposta à introdução do choque com o dobro da tonicidade equilibrando a osmolaridade interna e mantendo a homeostase. No segundo caso, a reacção das células foi ligeiramente diferente aquando da introdução do choque. Verifica-se que as células diminuem ligeiramente o seu volume, logo após a introdução do choque osmótico, com a conseqüente recuperação rápida do volume que se deve à sobre-expressão endógena da AQP3.

Ao ajustar a curva teórica aos dados experimentais, obteve-se os seguintes parâmetros: $P_f = (8,20 \pm 0,87) \times 10^{-4}$ cm/s ($n=10$) e $P_{gly} = (0,52 \pm 0,09) \times 10^{-5}$ cm/s ($n=12$). A permeabilidade à água destas células é muito semelhante à determinada previamente para as células HEK com a AQP3 selvagem. Contudo, verifica-se que a permeabilidade ao glicerol diminuiu consideravelmente quando comparada com a determinada para as células HEK com a AQP3 selvagem (83,7%) o que significa que existe uma menor expressão desta proteína, ainda que suficiente para transportar glicerol através da membrana, quando comparado com as células transfectadas.

4.2.2.2. Estudo do efeito inibidor do Auphen

Todo o processo de incubação, tanto da calceína-AM como do Auphen, a montagem da lamela na câmara, aquisição dos sinais de fluorescências e, conseqüentemente, tratamento e calibração dos dados experimentais foi feito de forma semelhante à descrita para as células HEK 293T. Neste caso, também se considerou constante o volume não-osmótico ($b=0,4$) na estimativa dos parâmetros de permeabilidade.

As células foram equilibradas em tampão HEPES substituído, ao final de, aproximadamente, 80s por tampão HEPES com manitol ou com glicerol. Uma vez que não se verificou uma alteração significativa dos sinais de volume relativo para as células que sofreram o choque com manitol, são apresentados exclusivamente os sinais de volume relativo, e os respectivos assentamentos da curva teórica, obtidos para as células que sofreram um choque com glicerol (Figura IV.15).

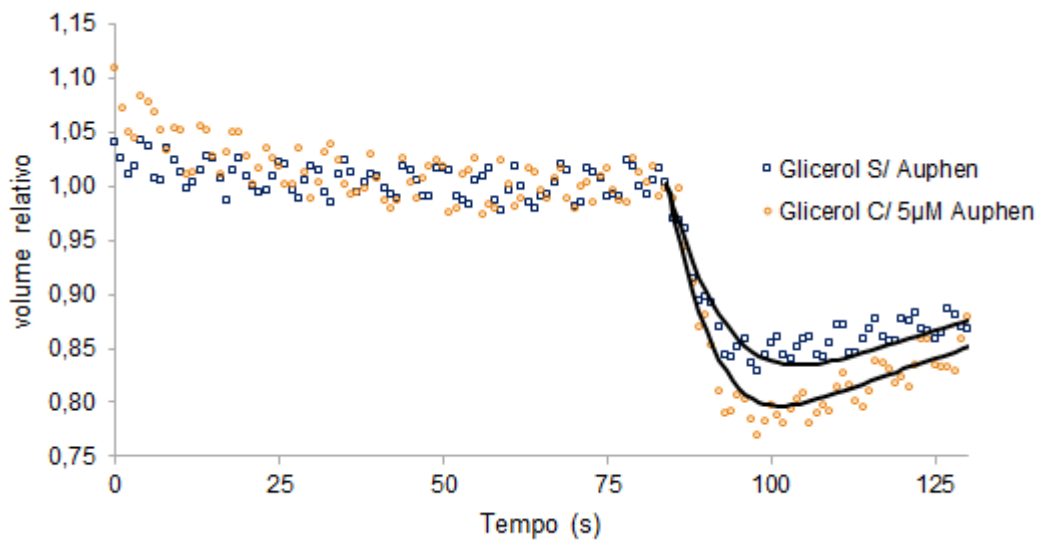


Figura IV.15. Representação gráfica da variação de volume celular relativo ao longo do tempo, e respectivos assentamentos das curvas teóricas aos dados experimentais (—). A azul (□) e a laranja (○) correspondem os dados experimentais calibrados para as células sem incubação e com incubação de 5µM Auphen, respectivamente. O ajuste das curvas teóricas aos dados experimentais foi realizado entre os 80s e 130s, período durante o qual as células sofreram um choque com glicerol. Para os diferentes ajustes considerou-se a média do raio celular inicial (r_0) igual a 8,7µm.

Tanto num caso como no outro, o volume celular relativo manteve-se constante, e igual a 1, durante o intervalo de tempo em que as células estiveram equilibradas com a solução isotônica. Tal como anteriormente se verificou, a reacção das células, após a introdução do choque hiperosmótico ($\Delta=2$), variou de acordo com o tipo de soluto utilizado. Quando se introduziu um choque osmótico com manitol, o volume relativo celular diminuiu significativamente, mantendo-se constante após atingir o equilíbrio osmótico (curva não apresentada). Quando se introduziu o choque com glicerol, o volume celular diminuiu ligeiramente para 0,8 com a conseqüente recuperação rápida do volume. Após a

otimização do assentamento da curva teórica aos dados experimentais obteve-se os seguintes parâmetros de permeabilidade à água e ao glicerol das células tratadas com Auphen: $P_f = (6,37 \pm 1,97) \times 10^{-4}$ cm/s (n=11) e $P_{gly} = (0,25 \pm 0,05) \times 10^{-5}$ cm/s (n=14). De seguida, apresenta-se dois gráficos de barras com os parâmetros P_f e P_{gly} estimados tanto na ausência como na presença de 5 μ M Auphen (Figura IV.16).

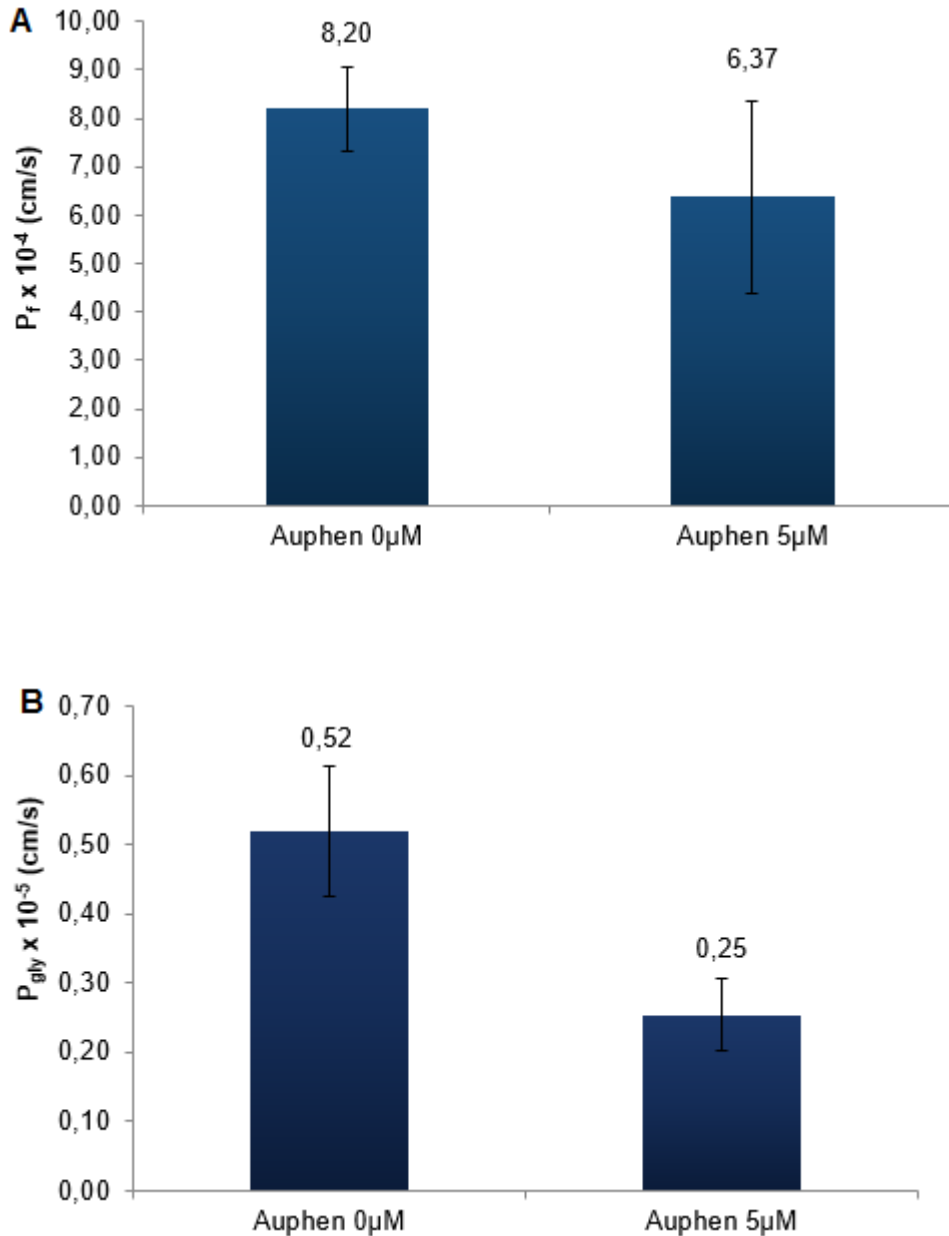


Figura IV.16. Estudo funcional do transporte de água e glicerol em células A-431. Estes gráficos representam os valores de permeabilidade (A) à água e (B) ao glicerol estimados, com o respectivo desvio padrão calculado, para as células sem incubação e com incubação de 5 μ M Auphen.

Ao comparar os parâmetros estimados verifica-se que as células incubadas com o Auphen durante 30min conseguem transportar água à mesma velocidade, ou seja, não se observa qualquer efeito deste composto no transporte em causa. Contudo, o transporte de glicerol destas células após a incubação com 5 μ M Auphen diminuiu cerca de 51,9%. A percentagem de inibição não é tão elevada como a obtida anteriormente, mas a

permeabilidade ao glicerol desta linha celular também é muito menor quando comparada com a estimada para as células HEK 293T com a AQP3 selvagem. Estes resultados corroboram as conclusões obtidas anteriormente, em que o Auphen apresenta um alto poder inibidor e selectividade para o transporte de glicerol através da AQP3.

V. Conclusões

Ao longo dos últimos anos, a AQP3 despertou o interesse dos investigadores científicos não só devido ao seu influente papel na hidratação da pele e cicatrização de feridas mas principalmente por estar implicada na proliferação epidermal e na formação de carcinoma epidermóide. Esta proteína transportadora de água tem também a capacidade de permear glicerol através da membrana celular. Este composto orgânico é transformado em glicerol-3-fosfato e conseqüentemente metabolizado gerando uma grande quantidade de ATP, que serve de energia para as diferentes funções celulares. Actualmente, já foi verificada uma correlação directa entre a proliferação celular e o conteúdo celular em ATP e glicerol [23] assim como também se realizaram estudos em células com supressão da AQP3 onde se verificou uma resistência à formação de tumor [32]. Após estes estudos, a AQP3 tornou-se um alvo para o desenvolvimento de drogas, principalmente inibidores com base em mercúrio e em platina. Enquanto os compostos com base em mercúrio são pouco selectivos e bastante tóxicos, os compostos com base em platina apresentam uma alta selectividade e chegaram a ser utilizados na terapia de cancro, com uma alta taxa de cura. Contudo, este composto também apresenta efeitos secundários significativos, pelo que houve de novo um enorme interesse em desenvolver novos complexos organometálicos que apresentassem uma melhor relação cura/efeitos secundários.

Este trabalho experimental dividiu-se em duas partes em que na primeira teve-se como objectivo principal estudar e caracterizar a função da AQP3 e na segunda analisar o efeito do Auphen no transporte de água e glicerol. Os objectivos deste trabalho foram concretizados por recurso à técnica de microscopia de fluorescência, em que se utilizou a calceína para reportar a variação de volume através da variação da intensidade de fluorescência. Após a calibração dos dados experimentais obtidos, assentaram-se curvas teóricas geradas por simulação numérica do modelo matemático, que permitiu estimar os parâmetros de permeabilidade.

Inicialmente, a caracterização da função da AQP3 foi feita em células HEK 293T com sobre-expressão da AQP3 selvagem de rato (*Rattus norvegicus*) em que os parâmetros de permeabilidade à água e ao glicerol estimados se aproximam dos descritos na literatura. Apesar de se conhecer as diferentes funções desta proteína na pele ainda se desconhece a sua estrutura e o seu mecanismo de transporte. Dessa forma foi produzido um mutante da AQP3, em que substituiu a cisteína localizada na posição 40 por uma serina, para avaliar a influência deste resíduo no mecanismo. Após analisar os resultados por comparação com os obtidos para as células com a AQP3 selvagem, verifica-se que não existe alteração de permeabilidade, quer de água ou de glicerol, quando o resíduo está mutado, concluindo-se que os resíduos localizados na vizinhança da Cys40 asseguram o transporte quando este resíduo está substituído.

De seguida, tanto as células com sobre-expressão de AQP3 selvagem como de AQP3 mutada foram incubadas com Auphen. Este complexo organometálico com base em Au(III) já tinha demonstrado uma alta selectividade para a AQP3; contudo, o seu

mecanismo de ligação à proteína apenas tinha sido verificado por simulação molecular. Neste trabalho propôs-se determinar experimentalmente o mecanismo de ligação, através da mesma técnica. Após analisar os resultados obtidos, verifica-se que não existe uma variação significativa do parâmetro de permeabilidade à água quando as células, tanto com AQP3 selvagem ou mutada, são incubadas com o Auphen, o que leva a concluir que o composto não inibe o transporte de moléculas de água através do poro. Contudo, e após incubação das células nas mesmas condições, os parâmetros de permeabilidade ao glicerol apresentaram uma variação significativa de comportamento. Nas células com sobre-expressão de AQP3 selvagem verifica-se uma inibição do transporte de glicerol de aproximadamente 81,5%, enquanto para as células com sobre-expressão de AQP3 mutada esta inibição é cerca de 36,7%. A diferença do poder de inibição entre as duas formas da AQP3 deve-se ao facto do resíduo Cys40 ser o sítio de ligação preferencial do composto à proteína, tal como verificado anteriormente por simulação molecular [35]. No entanto, estes resultados sugerem que o Auphen tem um segundo local de ligação à proteína quando o resíduo Cys40 está ausente.

Numa segunda fase, utilizou-se células de carcinoma epidermóide, com uma alta expressão endógena de AQP3, para corroborar os resultados obtidos anteriormente. Inicialmente, caracterizou-se a cinética de transporte tanto de água e de glicerol destas células. Após avaliar os parâmetros estimados, verifica-se que a permeabilidade destas células à água é muito semelhante à obtida anteriormente; contudo a permeabilidade ao glicerol diminuiu consideravelmente, o que significa uma menor expressão desta proteína quando comparada com as células HEK 293T. Seguidamente, as células foram incubadas com Auphen nas mesmas condições para que os dados fossem comparáveis. Tal como anteriormente, não se verificou influência do composto no transporte de água enquanto o transporte de glicerol foi inibido em cerca de 51,9%. A diminuição da percentagem de inibição, quando comparada com a obtida nas células HEK 293T com AQP3 selvagem, é um reflexo da diminuição do nível de expressão verificada nas células A-431. No entanto, a inibição do transporte de glicerol é significativo pelo que os resultados corroboram os obtidos.

Em suma, podemos concluir que este composto organometálico apresenta uma elevada selectividade para o transporte de glicerol e um alto poder inibidor. Juntamente com os resultados obtidos sobre o seu efeito inibidor da proliferação de células com sobre-expressão de AQP3 (resultados obtidos noutra laboratório que são conjuntamente incluídos num artigo científico submetido para publicação), as características do composto Auphen determinadas neste trabalho experimental apoiam-no como um forte candidato para futuro de desenvolvimento de fármacos, em particular para terapêuticas direccionadas a cancro de pele.

VI. Bibliografia

1. Robinson, G.W., Zhu, S., Singh, S., Evans, M.W.: *Water in Biology, Chemistry and Physics*. World Scientific (1996).
2. Krane, C.M., Kishore, B.K.: Aquaporins : the membrane water channels of the biological world. *Biologist*. 50, 81–86 (2003).
3. Lehninger, A., Nelson, D.L., Cox, M.M.: *Principles of Biochemistry*. W. H. Freeman (2009).
4. Groschwitz, K., Hogan, S.: Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 124, 3–20 (2009).
5. Gomes, D., Agasse, a, Thiébaud, P., Delrot, S., Gerós, H., Chaumont, F.: Aquaporins are multifunctional water and solute transporters highly divergent in living organisms. *Biochimica et biophysica acta*. 1788, 1213–28 (2009).
6. Whitembury, G.: Ion and water transport in the proximal tubules of the kidney of *Necturus maculosus*. *The Journal of general physiology*. 43, 43–56 (1960).
7. Christofk, H.R., Vander Heiden, M.G., Harris, M.H., Ramanathan, A., Gerszten, R.E., Wei, R., Fleming, M.D., Schreiber, S.L., Cantley, L.C.: The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature*. 452, 230–3 (2008).
8. Sidel, V.W., Solomon, A.K.: Entrance of water into human red cells under an osmotic pressure gradient. *The Journal of general physiology*. 41, 243–57 (1957).
9. Agre, P., Saboori, A., Asimos, A., Smith, B.: Purification and partial characterization of the Mr 30,000 integral membrane protein associated with the erythrocyte Rh (D) antigen. *Journal of Biological Chemistry*. (1987).
10. Agre, P.: Molecular physiology of water transport: aquaporin nomenclature workshop. *Mammalian aquaporins. Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*. 89, 255–7 (1997).
11. Preston, G.M., Agre, P.: Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88, 11110–4 (1991).
12. Kruse, E., Uehlein, N., Kaldenhoff, R.: The aquaporins. *Genome biology*. 7, 206 (2006).
13. Wu, B., Beitz, E.: Aquaporins with selectivity for unconventional permeants. *Cellular and molecular life sciences*. 64, 2413–21 (2007).
14. Wspalz, T., Fujiyoshi, Y., Engel, A.: The AQP structure and functional implications. (2009).
15. Wang, F., Feng, X.-C., Li, Y.-M., Yang, H., Ma, T.-H.: Aquaporins as potential drug targets. *Acta pharmacologica Sinica*. 27, 395–401 (2006).
16. Borgnia, M.J.: Reconstitution and functional comparison of purified GlpF and AqpZ, the glycerol and water channels from *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 98, 2888–2893 (2001).

17. Soveral, G., Trincão, J., Moura, T.: Aquaporin: membrane channels for water transport. *Canal BQ - Revista da Sociedade Portuguesa de Bioquímica*. 36–43 (2011).
18. Takata, K., Matsuzaki, T., Tajika, Y.: Aquaporins: water channel proteins of the cell membrane. *Progress in histochemistry and cytochemistry*. 1–83 (2004).
19. Ishibashi, K., Hara, S., Kondo, S.: Aquaporin water channels in mammals. *Clinical and experimental nephrology*. 13, 107–17 (2009).
20. Saparov, S.M., Liu, K., Agre, P., Pohl, P.: Fast and selective ammonia transport by aquaporin-8. *The Journal of biological chemistry*. 282, 5296–301 (2007).
21. Verkman, A.S.: More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. *Journal of cell science*. 118, 3225–32 (2005).
22. Verkman, a S.: Aquaporins in clinical medicine. *Annual review of medicine*. 63, 303–16 (2012).
23. Verkman, A.S., Hara-Chikuma, M., Papadopoulos, M.C.: Aquaporins - new players in cancer biology. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 86, 523–9 (2008).
24. Huber, V.J., Tsujita, M., Nakada, T.: Aquaporins in drug discovery and pharmacotherapy. *Molecular aspects of medicine*. 33, 691–703 (2012).
25. Verkman, A.S., Mitra, A.K.: Structure and function of aquaporin water channels. *American journal of physiology. Renal physiology*. 278, F13–28 (2000).
26. Murata, K., Mitsuoka, K., Hirai, T., Walz, T., Agre, P., Heymann, J.B., Engel, A., Fujiyoshi, Y.: Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature*. 407, 599–605 (2000).
27. Wang, Y., Cohen, J., Boron, W.F., Schulten, K., Tajkhorshid, E.: Exploring gas permeability of cellular membranes and membrane channels with molecular dynamics. *Journal of structural biology*. 157, 534–44 (2007).
28. Wang, Y., Tajkhorshid, E.: Nitric oxide conduction by the brain aquaporin AQP4. *Proteins*. 78, 661–670 (2010).
29. Sougrat, R., Morand, M., Gondran, C., Barré, P., Gobin, R., Bonté, F., Dumas, M., Verbavatz, J.-M.: Functional expression of AQP3 in human skin epidermis and reconstructed epidermis. *The Journal of investigative dermatology*. 118, 678–85 (2002).
30. Boury-Jamot, M., Sougrat, R., Tailhardat, M., Varlet, B. Le, Bonté, F., Dumas, M., Verbavatz, J.-M.: Expression and function of aquaporins in human skin: Is aquaporin-3 just a glycerol transporter? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 1758, 1034–1042 (2006).
31. Hara, M., Ma, T., Verkman, A.S.: Selectively reduced glycerol in skin of aquaporin-3-deficient mice may account for impaired skin hydration, elasticity, and barrier recovery. *The Journal of biological chemistry*. 277, 46616–21 (2002).
32. Hara-Chikuma, M., Verkman, A.S.: Roles of aquaporin-3 in the epidermis. *The Journal of investigative dermatology*. 128, 2145–51 (2008).

33. Boury-Jamot, M., Daraspe, J., Bonté, F., Perrier, E., Schnebert, S., Dumas, M., Verbavatz, J.-M.: Skin aquaporins: function in hydration, wound healing, and skin epidermis homeostasis. *Handbook of experimental pharmacology*. 205–17 (2009).
34. Verkman, A.S.: Aquaporins: translating bench research to human disease. *The Journal of experimental biology*. 212, 1707–15 (2009).
35. Martins, A.P., Marrone, A., Ciancetta, A., Galán Cobo, A., Echevarría, M., Moura, T.F., Re, N., Casini, A., Soveral, G.: Targeting aquaporin function: potent inhibition of aquaglyceroporin-3 by a gold-based compound. *PloS one*. 7, e37435 (2012).
36. Preston, G., Jung, J., Guggino, W., Agre, P.: The mercury-sensitive residue at cysteine 189 in the CHIP28 water channel. *Journal of Biological Chemistry*. 268, 17–20 (1993).
37. Migliati, E., Meurice, N., DuBois, P., Fang, J.S., Somasekharan, S., Beckett, E., Flynn, G., Yool, A.J.: Inhibition of aquaporin-1 and aquaporin-4 water permeability by a derivative of the loop diuretic bumetanide acting at an internal pore-occluding binding site. *Molecular pharmacology*. 76, 105–12 (2009).
38. Zelenina, M., Tritto, S., Bondar, A. a, Zelenin, S., Aperia, A.: Copper inhibits the water and glycerol permeability of aquaporin-3. *The Journal of biological chemistry*. 279, 51939–43 (2004).
39. Blaustein, M., Kao, J., Matteson, D.: *Cellular physiology and neurophysiology*. Elsevier, United States (2012).
40. Katzir-Katchalsky, A., Curran, P.F.: *Nonequilibrium thermodynamics in biophysics*. Harvard University Press (1965).
41. Casali, N., Preston, A.: *E. coli plasmid vectors: Methods and applications*. *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ (2003).
42. Barker, K.: *At the Bench: A Laboratory Navigator*. CSHL Press, New York (2005).
43. Desjardins, P.R., Conklin, D.S.: Microvolume quantitation of nucleic acids. *Current protocols in molecular biology*. Appendix 3, 3J (2011).
44. Dalby, B., Cates, S., Harris, A., Ohki, E.C., Tilkins, M.L., Price, P.J., Ciccarone, V.C.: Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods*. 33, 95–103 (2004).
45. Mundt, L.A., Shanahan, K.: *Graff's Textbook of Routine of Urinalysis and Body Fluids*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (2011).
46. VanGuilder, H.: Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques*. 44, 619–626 (2008).
47. Abreu-Rodríguez, I., Silva, R., Martins, A.: Functional and Transcriptional Induction of Aquaporin-1 Gene by Hypoxia; Analysis of Promoter and Role of Hif-1 α . *PloS one*. (2011).
48. *Thermal Cycler: Absolute Quantification Getting Started Guide*, (2005).
49. Hamann, S., Kiilgaard, J.F., Litman, T., Alvarez-Leefmans, F.J., Winther, B.R., Zeuthen, T.: Measurement of cell volume changes by fluorescence self-quenching. *Journal of Fluorescence*. 12, (2002).

50. AnaSpec: Promotions from AnaSpec, <http://www.anaspec.com/products/promotions.asp?id=50&col=2&row=2>.
51. Lakowicz, J.: Principles of fluorescence spectroscopy. Springer, Baltimore (2006).
52. Pearson, W.R., Wood, T., Zhang, Z., and Miller, W.: Comparison of DNA sequences with protein sequences. *Genomics*. 46, 24–36 (1997).
53. Thomas, P., Smart, T.G.: HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *Journal of pharmacological and toxicological methods*. 51, 187–200 (2005).
54. Hara-Chikuma, M., Verkman, A.S.: Aquaporin-3 facilitates epidermal cell migration and proliferation during wound healing. *Journal of Molecular Medicine*. 86, 221–231 (2007).
55. Hara-chikuma, M., Verkman, A.S.: Prevention of Skin Tumorigenesis and Impairment of Epidermal Cell Proliferation by Targeted Aquaporin-3 Gene Disruption. 28, 326–332 (2008).
56. Huang, Y., Zhu, Z., Sun, M., Wang, J., Guo, R., Shen, L., Wu, W.: Critical role of aquaporin-3 in the human epidermal growth factor-induced migration and proliferation in the human gastric adenocarcinoma cells. *Cancer Biology & Therapy*. 9, 1000–1007 (2010).
57. Echevarría, M., Windhager, E.E., Frindt, G.: Selectivity of the renal collecting duct water channel aquaporin-3. *The Journal of Biological Chemistry*. 271, 25079–82 (1996).
58. Nollert, P., Harries, W.E., Fu, D., Miercke, L.J., Stroud, R.M.: Atomic structure of a glycerol channel and implications for substrate permeation in aqua(glycero)porins. *FEBS letters*. 504, 112–7 (2001).
59. Fu, D., Libson, A., Stroud, R.: The structure of GlpF, a glycerol conducting channel. *Novartis Foundation Symposium*. 245, 51–65 (2002).

VII. Anexos

Anexo I – Meios de Cultura e Antibiótico

1. Meio Luria-Bertani (LB) + Ampicilina (Amp)

Tabela VII.1. Composição do meio LB utilizado na cultura de *E. coli*. Após perfazer o volume, acertar o pH do meio para 7 e autoclavar durante 15 minutos a 1atm.

Composto	Concentração final
Triptona (<i>BD Bacto</i> ™)	10 g/L
Extracto de Levedura (<i>BD Bacto</i> ™)	5 g/L
NaCl (Merck)	10 g/L
Ampicilina (<i>Sigma-Aldrich</i> ®)	0,1 g/L
Agar (<i>BD Bacto</i> ™)	1,5%
H ₂ O destilada	1000 ml

Nota: Para se fazer meio de cultura líquido não se adiciona agar

2. Ampicilina (Solução Stock 10mg/ml)

1. Pesar 1g e preparar 100 ml de solução com H₂O destilada
2. Adicionar NaOH até que se dissolva completamente
3. Esterilizar por filtração (filtros 0,45µm)

3. Meio Super Optimal Broth (SOB)

Tabela VII.2. Composição do meio SOB utilizado na cultura de *E. coli*. Após perfazer o volume, acertar o pH do meio para 7 e autoclavar durante 15 minutos a 1atm.

Composto	Concentração final
Triptona (<i>BD Bacto</i> ™)	2% (p/v)
Extracto de Levedura (<i>BD Bacto</i> ™)	0,5%
NaCl (Merck)	10mM
KCl (<i>Riedel-de Haën</i>)	2,5mM
MgCl ₂ (<i>Sigma-Aldrich</i> ®)	10mM
MgSO ₄ (<i>Sigma-Aldrich</i> ®)	10mM

4. Solução de transformação e armazenamento (TSS)

Tabela VII.3. Composição da solução 2x TSS (*transformation and storage solution*) utilizada na preparação de células *E. coli* competentes. Após perfazer o volume, autoclavar durante 15min a 1atm.

Composto	Concentração final
PEG 3350 (<i>Sigma-Aldrich</i> ®)	20% (p/v)
DMSO (<i>Merck</i>)	10% (p/v)
MgCl ₂ (<i>Sigma-Aldrich</i> ®)	50mM
Meio LB	0,5x

Anexo II – Mapa do Vector

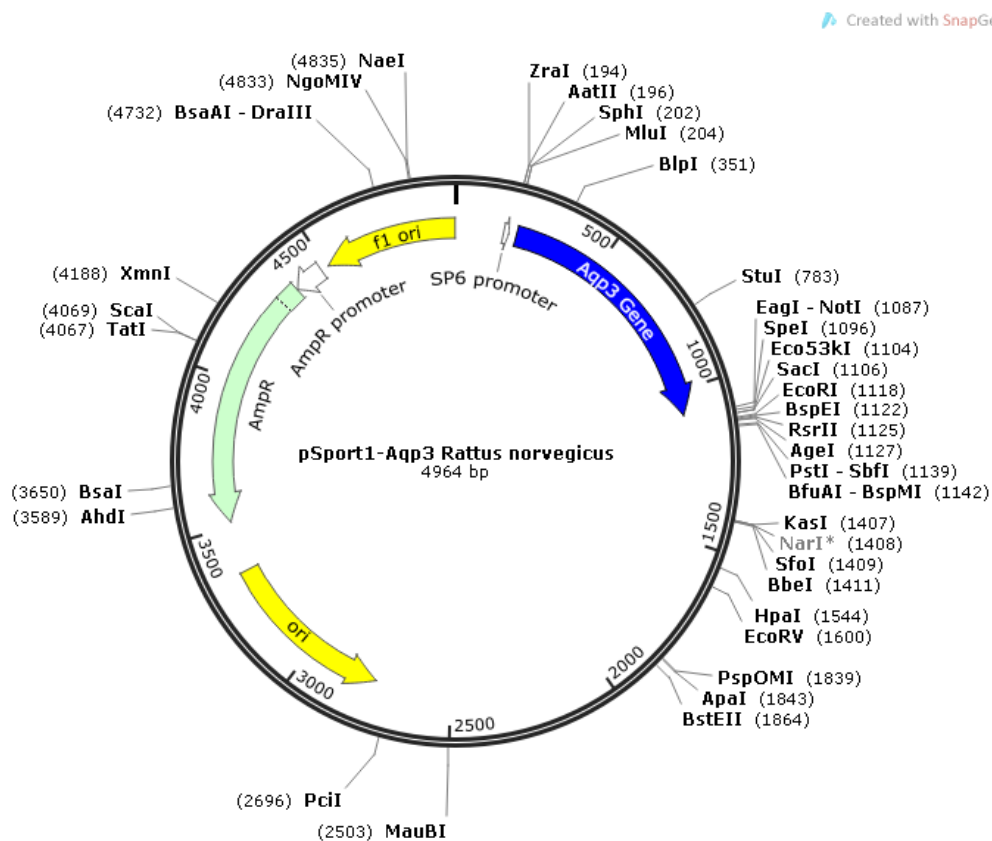


Figura VII.1. Mapa de restrição do vector pSport1-AQP3 (*Rattus norvegicus*). Vector de expressão construído no *software SnapGene*. A inserção do gene AQP3 (*Rattus norvegicus*) ocorreu nos locais específicos das enzimas de restrição *Mlu I* e *Not I*.

Anexo III – Preparação de soluções tampão utilizadas nos estudos funcionais

1. Tampão fosfato-salino (PBS)

Tabela VII.4. Composição da solução PBS utilizado para lavar as células humanas. Após perfazer o volume, acertar o pH do meio para 7,4 e autoclavar durante 50 minutos a 1atm.

Composto	Concentração final (mM)
NaCl (<i>Merck</i>)	136
KCl (<i>Riedel-de Haën</i>)	2,7
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O (<i>Riedel-de Haën</i>)	8
KH ₂ PO ₄ (<i>Merck</i>)	1,5

2. Tampão HEPES

Tabela VII.5. Composição do tampão HEPES utilizado nos estudos funcionais para equilibrar as células. Após perfazer o volume, acertar o pH do meio para 7,4 e medir a osmolaridade final.

Composto	Concentração final (mM)
NaCl (<i>Merck</i>)	135
KCl (<i>Riedel-de Haën</i>)	5
CaCl ₂ .2H ₂ O(<i>Merck</i>)	2,5
MgSO ₄ .7H ₂ O (<i>Merck</i>)	1,2
D-Glucose (<i>Pronalys AR</i>)	10
Hepes (<i>BDH</i>)	5
Osmolaridade Final	
300mOsm	

3. Tampão HEPES com manitol

Tabela VII.6. Composição do tampão HEPES com manitol utilizado nos estudos funcionais para induzir o choque osmótico. Após perfazer o volume, acertar o pH do meio para 7,4 e medir a osmolaridade final.

Composto	Concentração final (mM)
NaCl (<i>Merck</i>)	135
KCl (<i>Riedel-de Haën</i>)	5
CaCl ₂ .2H ₂ O(<i>Merck</i>)	2,5
MgSO ₄ .7H ₂ O (<i>Merck</i>)	1,2
D-Glucose (<i>Pronalys AR</i>)	10
Hepes (<i>BDH</i>)	5
Manitol(<i>Merck</i>)	300
Osmolaridade Final	
600mOsm	

4. Tampão HEPES com glicerol

Tabela VII.7. Composição do tampão HEPES com glicerol utilizado nos estudos funcionais para induzir o choque osmótico. Após perfazer o volume, acertar o pH do meio para 7,4 e medir a osmolaridade final.

Composto	Concentração final (mM)
NaCl (<i>Merck</i>)	135
KCl (<i>Riedel-de Haën</i>)	5
CaCl ₂ .2H ₂ O(<i>Merck</i>)	2,5
MgSO ₄ .7H ₂ O(<i>Merck</i>)	1,2
D-Glucose (<i>Pronalys AR</i>)	10
Hepes (<i>BDH</i>)	5
Glicerol (<i>Sigma-Aldrich</i> [®])	300
Osmolaridade Final	
600mOsm	

Anexo IV – Protocolos Experimentais

1. Preparação de células competentes

- 1.1. Descongelar em gelo, uma alíquota de células *E. coli* DH5 α
- 1.2. Plaquear as células em meio LB e incubar durante a noite, a 37°C
- 1.3. Inocular uma colónia isolada em 3ml de meio LB e incubar durante 12h, a 37°C
- 1.4. Transferir o meio de cultura para 250ml de meio LB. Incubar a 37°C até que a DO_{600nm} seja aproximadamente 0,3-0,4
- 1.5. Durante o período de incubação, diluir (1:1) a solução 2x TSS em meio LB e colocar em gelo e marcar os *ependorfs* necessários para armazenar as células
- 1.6. Dividir 50ml de meio de cultura, do ponto 1.4, para tubos *falcon* e colocar em gelo
- 1.7. Centrifugar durante 10 minutos a 1811 x g
- 1.8. Desprezar o SN
- 1.9. Adicionar 5ml de solução TSS diluída, previamente arrefecida em gelo, a cada tubo *falcon* e ressuspender o *pellet*
- 1.10. Preparar alíquotas de 100 μ l nos *ependorfs*, previamente marcados e arrefecidos em gelo
- 1.11. Colocar imediatamente em azoto líquido e armazenar a -80°C

Nota: A partir do ponto 1.7 todos os passos são realizados em gelo. É necessário aguardar um período de 12h antes de se descongelar uma alíquota de células competentes, sendo sempre necessário testar a sua competência

2. Transformação de células *E. coli*

- 2.1. Descongelar em gelo, uma alíquota de células *E. coli* DH5 α competentes
- 2.2. Colocar os tubos *falcon* em gelo
- 2.3. Adicionar 100 μ l de células competentes a cada tubo
- 2.4. Adicionar 10 μ l de DNA plasmídico aos respectivos tubos
- 2.5. Incubar durante 30 minutos a 0°C (gelo)
- 2.6. Colocar 45s a 42°C. Passar imediatamente para o gelo
- 2.7. Adicionar às células 0,9ml de meio SOC (Meio SOB + Glucose 2% (BDH))
- 2.8. Incubar durante 1 hora a 37°C, com agitação suave

- 2.9. Mudar o meio de cultura para *eppendorfs* e centrifugar durante 5 minutos a 1811 x g
- 2.10. Desprezar a maioria do sobrenadante (SN)
- 2.11. Ressuspender o pellet em 100 ou 200µl que sobra do SN
- 2.12. Plaquear em meio LB suplementado com ampicilina
- 2.13. Incubar durante a noite, a 37°C

Nota: É muito importante cumprir rigorosamente os passos 5 e 6 para evitar o crescimento de colónias satélite

3. Kit de extracção de DNA Plasmídico (*GenElute Plasmid Midiprep Kit Sigma-Aldrich*[®])

3.1. Preparação das soluções

- Preparar a solução Ressuspensão/RNase A e a solução de Lavagem 2 antes da utilização inicial
- Guardar a solução Ressuspensão/RNase A e a solução de Neutralização a 2-8°C antes da utilização inicial

3.1.1. Ressuspensão/RNase A

- 3.1.1.1. Agitar o tubo da solução RNase A brevemente
- 3.1.1.2. Adicionar 750µl da solução RNase A à solução de Ressuspensão
- 3.1.1.3. Guardar a 2-8°C

3.1.2. Solução de Lavagem 2

- 3.1.2.1. Adicionar 120ml de etanol 95%-100% ao frasco de solução de Lavagem 2
- 3.1.2.2. Após cada utilização, fechar muito bem o frasco da solução de Lavagem 2 diluída

3.2. Procedimento

- 3.2.1. Recolher 50ml de cultura de células incubadas durante a noite por centrifugação a 5000 x g durante 10 minutos
- 3.2.2. Desprezar o SN
- 3.2.3. Adicionar 4ml de solução de Ressuspensão/RNase A ao *pellet* bacteriano
- 3.2.4. Ressuspender o *pellet*, completamente, pipetando para cima e para baixo ou colocando no vortex

- 3.2.5. Adicionar 4ml de Solução de Lise e misturar imediatamente, invertendo gentilmente 6 a 8 vezes. Não se deve agitar nem colocar no vortex!
- 3.2.6. Deixar a mistura repousar durante 3 a 5 minutos até se tornar clara e viscosa. Não permitir que a lise continue por mais do que 5 minutos!
- 3.2.7. Remover o pistão e colocar o tubo da seringa num suporte para manter na posição vertical
- 3.2.8. Adicionar 4ml da solução de Neutralização gelada à mistura e inverter gentilmente 4 a 6 vezes. Formar-se-á um agregado branco
- 3.2.9. Adicionar 3ml de solução de Ligação ao lisado neutralizado e inverter 1 a 2 vezes
- 3.2.10. Colocar, imediatamente, a solução dentro do tubo da seringa. O lisado celular não deverá passar através do filtro até que se coloque o pistão
- 3.2.11. Deixar o lisado repousar durante 5 minutos. O agregado branco deverá flutuar até ao topo
- 3.2.12. Colocar uma coluna de ligação GenElute HP Midripep dentro de um tubo de microcentrifuga
- 3.2.13. Adicionar 4ml de solução de Preparação da Coluna à coluna
- 3.2.14. Centrifugar num rotor basculante a 3000 x g durante dois minutos
- 3.2.15. Descartar o eluído
- 3.2.16. Segurar o tubo da seringa por cima da coluna de ligação
- 3.2.17. Gentilmente, aplicar pressão no pistão até sair metade da solução límpida para a coluna de ligação
- 3.2.18. Puxar o pistão para travar o fluxo. Cuidado para não sobrecarregar a coluna
- 3.2.19. Centrifugar num rotor basculante a 3000 x g durante dois minutos
- 3.2.20. Descartar o eluído
- 3.2.21. Adicionar o resto da solução límpida à coluna e repetir a centrifugação
- 3.2.22. Descartar o eluído
- 3.2.23. Adicionar 4ml de solução de Lavagem 1 à coluna e centrifugar num rotor basculante a 3000 x g durante 2 minutos
- 3.2.24. Descartar o eluído
- 3.2.25. Adicionar 4ml de solução de Lavagem 2 à coluna e centrifugar num rotor basculante a 3000 x g durante 2 minutos
- 3.2.26. Transferir a coluna de ligação para um novo tubo de recolha
- 3.2.27. Adicionar 1ml de solução de Eluição
- 3.2.28. Centrifugar num rotor basculante a 2000 x g durante 5 minutos

- 3.2.29. O DNA plasmídico está presente no eluído e está pronto para ser utilizado imediatamente. Também pode ser concentrado por precipitação, ou guardado a curto prazo a 2-8°C ou a longo prazo a -20°C

Nota: O protocolo pode ser consultado em

<http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Bulletin/pln10bul.Par.0001.File.tmp/pln10bul.pdf>

4. Transfecção de células eucarióticas (Lipofectamina 2000)

4.1. Preparação das células

- 4.1.1. Plaçar $1,5 \times 10^5$ células em placas 35mm com 2ml de meio DMEM suplementado com 10% FBS (v/v) e 1% P/S (v/v) e incubar a 37°C e 5% CO₂, 24h antes da transfecção
- 4.1.2. No dia da transfecção, manter o meio DMEM sem soro e sem antibiótico à temperatura ambiente e substituir o meio das placas por este

4.2. Procedimento

- 4.2.1. Diluir 4µg DNA em 250µl de meio DMEM sem soro e sem antibiótico
- 4.2.2. Incubar à temperatura ambiente durante 5 minutos, sem nunca exceder 25 minutos
- 4.2.3. Diluir 10µl de lipofectamina em 250µl de meio DMEM sem soro e sem antibiótico. **Nota:** misturar cuidadosamente a lipofectamina antes de usar
- 4.2.4. Num novo *eppendorf*, juntar o DNA com a lipofectamina diluída num volume total igual a 500µl
- 4.2.5. Misturar cuidadosamente e incubar 20 minutos à temperatura ambiente
- 4.2.6. Adicionar o volume total, espalhando-o gota a gota pela placa. No final rodar cuidadosamente para misturar com o meio
- 4.2.7. Incubar as células a 37°C e 5% CO₂ e trocar o meio 4 a 6h após o procedimento, por meio DMEM suplementado com 10% FBS (v/v) e 1% P/S (v/v)

Nota: No protocolo especificado pela Invitrogen, aconselha-se o uso de meio Opti-MEM I Reduced Serum Medium. Contudo, neste protocolo foi sempre utilizado o meio DMEM. O protocolo pode ser consultado em

http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/lipofectamine2000_man.pdf

5. Isolamento de RNA de células eucarióticas (TRizol)

- 5.1. Lavar as células com PBS e adicionar 1m de TRizol incubando à temperatura ambiente durante 5 minutos
- 5.2. Adicionar 200µl de clorofórmio e fechar o tubo
- 5.3. Agitar fortemente, à mão, durante 15s
- 5.4. Incubar à temperatura ambiente, durante 2 a 3 minutos
- 5.5. Centrifugar a amostra a 12000 x g, durante 15 minutos a 4°C. Esta mistura irá ser separada em três fases diferentes: 1) fase inferior (fenol-clorofórmio), 2) interfase e 3) fase superior (aquosa) que representa ≈50% do volume total
- 5.6. Remover a fase aquosa da amostra com uma pipeta. E aconselhável inclinar o tubo (45°) durante este processo para evitar a extracção simultânea da interfase ou da fase orgânica.
- 5.7. Colocar a fase aquosa num novo tubo e adicionar 500µl de isopropanol 100%
- 5.8. Incubar à temperatura ambiente, durante 10 minutos
- 5.9. Centrifugar a amostra a 12000 x g, durante 10 minutos a 4°C
- 5.10. Desprezar o SN e lavar o *pellet* com 1ml de etanol 70%
- 5.11. Misturar a amostra rapidamente num vortex e centrifugar a 7500 x g, durante 5 minutos a 4°C.
- 5.12. Secar a amostra ao ar e ressuspender em água DEPC.

6. Síntese de cDNA por transcrição reversa (SuperScript II RT)

- 6.1. Adicionar os seguintes compostos (Tabela VII.8) a um tubo de microcentrífuga sem nuclease e perfazer com água destilada e esterilizada até 12µl

Tabela VII.8. Quantidade final da composição para realizar a reacção de transcrição reversa. Perfazer o volume até 12µl com água destilada e esterilizada.

Composto	Quantidade final
Primers	2pmol
mRNA	300ng
dNTP Mix (10mM cada)	0,01µmol

- 6.2. Aquecer a mistura até 65°C durante 5 minutos. Arrefecer rapidamente em gelo e recolher o conteúdo do tubo por centrifugação rápida
- 6.3. De seguida, adicionar 4µl de 5X Tampão Primeira Cadeia (*First-Strand Buffer*) e 2µl da solução 0,1M DTT
- 6.4. Misturar suavemente e incubar a 25°C durante 2 minutos

- 6.5. Adicionar 1µl de SuperScript II RT e misturar suavemente para cima e para baixo com a pipeta
- 6.6. Incubar a 42°C durante 50 minutos
- 6.7. Inactivar a reacção, por aquecimento a 70°C durante 15 minutos.

Nota: O protocolo pode ser consultado em

http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/superscriptII_pps.pdf