



ESCOLA SUPERIOR DE  
TECNOLOGIA DA SAÚDE  
DE LISBOA



INSTITUTO  
POLITÉCNICO  
DE LISBOA

**INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA**

**ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA**

**ESTÁGIO EM NEUROFISIOLOGIA E MICROBIOLOGIA**

**IMPLEMENTAÇÃO DA LINHA CELULAR IMORTALIZADA F-11 EM  
ESTUDOS DA DOR**

**AUTORA: ANA FÁTIMA ALHINHO BERNARDO**

**ORIENTADORES:**

**DOUTOR ANDRÉ BASTOS (Sea4Us)**

**DOUTORA ANA RAMOS (Escola Superior Tecnologias da Saúde de Lisboa)**

Mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais

Lisboa, 2023

**INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA**  
**ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA**

**ESTÁGIO EM NEUROFISIOLOGIA E MICROBIOLOGIA**  
**IMPLEMENTAÇÃO DA LINHA CELULAR IMORTALIZADA F-11 EM**  
**ESTUDOS DA DOR**

**AUTORA: ANA FÁTIMA ALHINHO BERNARDO**

**ORIENTADORES:**

**DOUTOR ANDRÉ BASTOS (Sea4Us)**

**DOUTORA ANA RAMOS (Escola Superior Tecnologias da Saúde de Lisboa)**

**PRESIDENTE JÚRI:**

**DOUTORA EDNA RIBEIRO (Escola Superior Tecnologias da Saúde de Lisboa)**

**ARGUENTE:**

**DOUTOR NICOLAS MORGENSTEM (Instituto de Medicina Molecular)**

Mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais

Lisboa, 2023

## **Direitos de cópia**

Autorizo a Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa e o Instituto Politécnico de Lisboa o direito de arquivar e publicar o presente relatório de estágio e de o divulgar em repositórios científicos para fins educacionais ou de pesquisa não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao autor e ao editor.

Copyright© 2023 – Ana Fátima Alinho Bernardo

# Agradecimentos

Obrigado. Obrigado a todos os que de uma forma ou de outra tornaram esta tese possível. Obrigada à instituição que me acolheu e desafiou a realizar o trabalho que deu origem a esta tese.

Aos meus orientadores, Doutora. Ana Ramos que foi a ponte de ligação à faculdade e esteve sempre disponível a qualquer questão e dúvida, muito obrigada. Ao Doutor. André Bastos, que me acompanhou sempre dentro da empresa com a melhor disposição de sempre e não deixou que a otimização me fizesse perder no caminho.

Aos meus colegas Diego, Rosa, Catarina, Sílvia, Beatriz e Tomás foram um grande apoio, agradeço também a vossa orientação e paciência. E para além da ciência, a vossa simpatia, acolhimento e amizade.

Ao Rodrigo que me apoiava em todas as decisões e teve a maior paciência de todas comigo para me continuar a ouvir, mesmo quando eu já não o podia ouvir a ele e até aperfeiçoou os seus talentos culinários e contribuiu para as minhas elevadas doses de gelado, obrigado.

Aos meus pais e ao meu irmão por saberem sempre o que precisava e nunca deixarem de estar presentes para me dar força e carregar as energias, muito obrigada.

Aos meus amigos por não me deixarem descansar convencerem-me a sair de casa mesmo quando estava quase a dormir. Em especial à Joana e à Coelho que foram um grande apoio. Obrigada Coelho, pelos grandes desabafos sobre eletrofisiologia “tamo junto”- *Science I love you for all your round corners* (Bernardo, Coelho 2023). À Joana que se perdia sempre a meio, mas estava lá presente para ser o nosso apoio.

# Resumo

No presente relatório avaliou-se a pertinência da implementação das células F-11, um hibridoma derivado de neuroblastoma de ratinho e neurónios do gânglio da raiz dorsal de embriões de rato, como um modelo funcional, alternativo a neurónios de DRG, para a investigação e desenvolvimento de novas moléculas terapêuticas para o tratamento da dor.

Recorrendo a uma abordagem técnica multidisciplinar, que incluiu cultura de células, técnicas de eletrofisiologia (*whole-cell voltage-clamp* e *current-clamp*) e técnicas de biologia molecular (*western-blotting*) foi possível estudar a influência do processo de diferenciação das células F-11 sobre o perfil bioquímico e eletrofisiológico das correntes iónicas dependentes de voltagem, responsáveis pela modulação da fisiopatologia da dor.

O meio de crescimento F-12, suplementado com 10%FBS, e os meios de diferenciação DMEM, suplementado com 1% FBS, e DMEM, suplementado com 2%FBS e 2 $\mu$ M RA, permitiram registos de eletrofisiologia com os menores valores médios de *holding current* ( $I_h$  (pA)). A comparação dos resultados obtidos entre as células destes meios revelou um aumento da amplitude de correntes lentas de potássio e correntes de sódio totais em células F-11 diferenciadas. Esta observação explica-se pela variação da expressão proteica de alguns canais de potássio e sódio durante o processo de diferenciação. Por outro lado, a ausência de correntes de cálcio nas células F-11 sustenta a reduzida atividade neuronal, traduzida num registo quase nulo de potenciais de ação, tanto nas células não diferenciadas como nas diferenciadas. Os resultados sugerem ainda que as células F11 e os neurónios de DRG partilham o mesmo tipo de correntes lentas de potássio e o mesmo tipo de correntes de sódio sensíveis ao fármaco Tetrodotoxina.

Os resultados demonstram que a linha celular F-11, mantida e diferenciada nos meios analisados, pode ser usada como uma plataforma de investigação no âmbito da descoberta de novas moléculas terapêuticas para o tratamento da dor, sobretudo no que respeita ao envolvimento de canais de sódio e de potássio.

**Palavras-chave:**

Células F-11; Canais iónicos; *voltage-clamp*; *current-clamp*; neurónios DRG; excitabilidade.

# Abstract

In this report, the relevance of implementing F-11 cells, a hybridoma derived from mice's neuroblastoma and embryonic rat dorsal root ganglion neurons, as a functional model, in alternative to dorsal root ganglion neurons, for research and development of new therapeutic molecules for the treatment of pain.

Using a multidisciplinary technical approach, which included cell culture, electrophysiology techniques (*whole-cell voltage-clamp* and *current-clamp*) and molecular biology techniques (*western-blotting*), it was possible to study the influence of the differentiation process of F-11 cells on the electrophysiological and biochemical profile of voltage-gated ion currents, responsible for modulating the pathophysiology of pain.

The growth medium F-12, supplemented with 10%FBS and the differentiation mediums DMEM, supplemented with 1% FBS and DMEM supplemented with 2% FBS and 2 $\mu$ M RA, allowed electrophysiology recordings with the lowest average holding current (I<sub>h</sub> (pA)) values. Comparison between the results obtained from cells in these mediums, revealed an increase in the amplitude of slow potassium currents and total sodium currents in differentiated F-11 cells. This observation can be explained by the variation in protein expression of some potassium and sodium channels during the differentiation process. On the other hand, the absence of calcium currents in F-11 cells underpins the reduced neuronal activity, reflected in the almost null recording of action potentials in both differentiated and undifferentiated cells. The results also suggest that F-11 cells and dorsal root ganglion neurons share the same type of slow potassium currents and the same type of sodium currents sensitive to the drug Tetrodotoxin.

The results show that the F-11 cell line, kept and differentiated in the analysed mediums, can be used as a research platform for the discovery of new therapeutic molecules in pain treatment, especially regarding the involvement of sodium and potassium channels.

## **Key-words:**

F-11 cells; ionic channels; voltage-clamp; current-clamp; DRG neurons; excitability.

# Índice

Agradecimentos.....	iv
Resumo.....	v
Abstract .....	vii
Índice de Figuras.....	x
Lista Abreviaturas .....	xiii
1. Introdução Teórica .....	1
1.1. DRG: Neurónios primários sensoriais do gânglio da raiz dorsal das vértebras da espinal medula.....	1
1.2. Linha celular imortalizada F-11 .....	2
1.3. Canais iónicos dependentes da voltagem.....	4
1.3.1. Canais iónicos de $K^+$ .....	6
1.3.2. Canais iónicos de $Na^+$ .....	7
1.3.3. Canais iónicos de $Ca^{2+}$ .....	7
1.4. <i>Whole-cell patch-clamp</i> .....	8
1.4.1. <i>Whole-cell Voltage-clamp</i> .....	10
1.4.2. <i>Whole-cell Current-clamp</i> .....	11
2. Objetivos.....	12
3. Materiais e Métodos .....	13
3.1. Cultura de Células.....	13
3.2. <i>Whole-cell patch-clamp</i> .....	15
3.2.1. <i>Whole-cell voltage-clamp: <math>I_K</math></i> .....	17
3.2.2. <i>Whole-cell voltage-clamp: <math>I_{Na}</math></i> .....	18
3.2.3. <i>Whole-cell voltage-clamp: <math>I_{Ca}</math></i> .....	19
3.2.4. <i>Whole-cell current-clamp</i> .....	19
3.3. Expressão proteica dos canais iónicos nas células F-11.....	20
3.4. Análise de dados.....	26
4. Resultados .....	27
4.1. Otimização células F-11 como modelo celular em estudos eletrofisiologia.....	27
4.2. <i>Whole-cell Voltage-clamp</i> .....	34
4.2.1. Canais de $K^+$ ativados por voltagem .....	35
4.2.2. Canais de $Na^+$ ativados por voltagem.....	41

4.2.3.	Canais de Ca <sup>2+</sup> ativados por voltagem.....	45
4.3.	<i>Whole-cell current-clamp</i> .....	46
4.4.	<i>Western-Blotting</i> .....	47
5.	Discussão dos Resultados .....	50
6.	Conclusão .....	54
7.	Conclusions.....	55
8.	Proposta de Projeto de Investigação .....	56
9.	Referências Bibliográficas.....	59
10.	Anexos .....	64
	Anexo 1- Equações de análise utilizadas em eletrofisiologia .....	64
	Anexo 2- Soluções de <i>Western-blotting</i> .....	66

# Índice de Figuras

Figura 1.1 - Ilustração da localização dos neurónios primários sensoriais do gânglio da raiz dorsal das vértebras da espinal medula (imagem adaptada (1)).	2
Figura 1.2 - Ilustração da passagem de iões pelo poro do canal iónico.	5
Figura 1.3- Ilustração dos diferentes estados funcionais dos canais iónicos	6
Figura 1.4 – Configuração da técnica <i>whole-cell patch-clamp</i> , utilizada no presente relatório.	9
Figura 1.5 - Setup completo de eletrofisiologia para a técnica de <i>whole-cell patch-clamp</i> .	9
Figura 3.1- Meios de diferenciação utilizados no protocolo de diferenciação das células F-11.	13
Figura 3.2- Câmara de Neubauer. São contadas as células nos quadrados A, B, C e D da grelha.	14
Figura 3.3 - Protocolo de diferenciação.	14
Figura 3.4- <b>A</b> - células F-11 diferenciadas e tripsinizadas. <b>B</b> - Células F-11 diferenciadas em placa, sem tripsinização.	16
Figura 3.5 – Passos na formação da configuração Whole cell patch clamp. Registos no osciloscópio e interação entre pipeta e membrana das células.	17
Figura 3.6 - Esquema da extração de proteínas	21
Figura 3.7 - Preparação para a quantificação das proteínas da amostra.	22
Figura 3.8 - Placa de 96 poço com standards e amostra para leitura de absorvência.	23
Figura 3.9 - Gel de eletroforese com proteínas marcadas com reagente azul de Coomassie.	24
Figura 3.10 - Esquema da transferência das proteínas do gel de eletroforese para a membrana de western blotting.	25
Figura 4.1- Histogramas de Frequência da $I_h$ para <b>A</b> - meio de manutenção F-12 suplementado apenas com 10% FBS. <b>B</b> - meio de manutenção RPMI suplementado com 10% FBS. <b>C</b> - meio de crescimento DMEM suplementado com 10% FBS. <b>D</b> - meio de manutenção F-12 suplementado com 10% FBS e 2% de HAT.	28
Figura 4.2 - Correlação entre os valores de <i>holding current</i> ( $I_h$ (pA)) e os valores da capacitância da membrana ( $W_c$ (pF)) nos meios de manutenção analisados.	29
Figura 4.3 Histogramas de Frequência da $I_h$ para todos os meios de diferenciação utilizados na fase de otimização das condições de diferenciação da cultura de células F-11.	31
Figura 4.4 Correlação entre os valores de <i>holding current</i> ( $I_h$ (pA)) e os valores da capacitância da membrana ( $W_c$ (pF)) nos meios de diferenciação analisados.	32

Figura 4.5 Visualização das células F-11 ao microscópio nas 3 condições selecionadas para o estudo da implementação de F-11 como modelo celular complementar do estudo da dor. ....	34
Figura 4.6- Perfil da ativação das $I_K$ registadas com recurso à técnica de <i>whole-cell voltage-clamp</i> . Comparação entre células F-11 não diferenciadas (10% FBS) e diferenciadas (1% FBS e 2 $\mu$ M RA). ....	35
Figura 4.7- Perfil da inativação das $I_K$ registadas em células F-11 com recurso à técnica de <i>whole-cell voltage-clamp</i> . Comparação entre células F-11 não diferenciadas (10% FBS) e diferenciadas (1% FBS e 2 $\mu$ M RA). ....	37
Figura 4.8- Efeito de um bloqueador de canais de $K^+$ TEA-CI nas $I_K$ registada em células F-11 diferenciadas num meio com 1% FBS. ....	39
Figura 4.9- Comparação de correntes totais de $K^+$ registadas em neurónio DRG de rato e em células F-11 diferenciadas com 1% FBS. ....	40
Figura 4.10- Perfil da ativação das $I_{Na}$ registadas em células F-11 com recurso à técnica de <i>whole-cell voltage-clamp</i> . Comparação entre células F-11 não diferenciadas (10% FBS) e diferenciadas (1% FBS e 2 $\mu$ M RA). ....	42
Figura 4.11- Perfil da inativação das $I_{Na}$ registadas em células F-11 com recurso à técnica de <i>whole-cell voltage-clamp</i> . Comparação entre células F-11 não diferenciadas (10% FBS) e diferenciadas (1% FBS e 2 $\mu$ M RA) ....	43
Figura 4.12- Ilustração de correntes totais de $Na^+$ registadas em neurónio DRG de rato e em células F-11 diferenciadas com 2 $\mu$ M RA. ....	44
Figura 4.13- Correntes totais de $Ca^{2+}$ registadas em neurónio DRG isolado de rato... 45	45
Figura 4.14 - AP registados em células F-11 e neurónio de DRG com recurso à técnica de <i>whole-cell current-clamp</i> . Comparação do padrão de disparo de AP entre as células. ....	46
Figura 4.15- Estudo da expressão de canais iónicos em células F11 não diferenciadas (10% FBS) e diferenciadas (1% FBS e 2 $\mu$ M RA) ( <b>Ai, Bi, Ci</b> ). Quantificação da expressão em função do loading control ( $\beta$ -actina) ( <b>Aii, Bii, Cii</b> ) ....	48

# Índice de Tabelas

Tabela 3.1 - Instruções do Kir BIO-RAD Quick start Bovine Serum Albumin (BSA) Standard Set para preparação dos Standards. ....	21
Tabela 3.2 - Tabela dos anticorpos e respetivas diluições utilizadas. ....	26
Tabela 4.1 - Atividades realizadas durante o estágio e respetivos objetivos. ....	27
Tabela 4.2 - Parâmetros de eletrofisiologia estudados durante o procedimento de otimização da manutenção da cultura de células F-11: <i>holding current</i> ( $I_h$ ), <i>series resistance</i> ( $R_s$ ) e <i>whole-cell capacitance</i> ( $W_c$ ). ....	30
Tabela 4.3 - Parâmetros de eletrofisiologia estudados durante o procedimento de otimização da diferenciação da cultura de células F-11: <i>holding current</i> ( $I_h$ ), <i>series resistance</i> ( $R_s$ ) e <i>whole-cell capacitance</i> ( $W_c$ ). ....	33
Tabela 4.4 - Parâmetros da curva de ativação dos canais de $K^+$ - $V_h$ e $V_s$ obtidos através do assentamento dos pontos da curva de ativação. ....	36
Tabela 4.5 - Parâmetros da curva de inativação dos canais de $K^+$ - $V_h$ e $V_s$ obtidos através do assentamento dos pontos da curva de inativação. ....	38
Tabela 4.6 - Parâmetros da curva de ativação dos canais de $Na^+$ - $V_h$ e $V_s$ obtidos através do assentamento dos pontos da curva de ativação. ....	43
Tabela 4.7 - Parâmetros da curva de inativação dos canais de $Na^+$ - $V_h$ e $V_s$ obtidos através do assentamento dos pontos da curva de inativação. ....	44
Tabela 10.1- Receita de preparação tampão de lise (RIPA) ....	66
Tabela 10.2-1.5M Tris-HCl pH8.8 e 0.5M Tris-HCl pH6.8 ....	67
Tabela 10.3-- 5X Laemmli Sample Buffer (Loading Buffer) (10mL).....	67
Tabela 10.4-- Running Buffer pH 8.3 (1L).....	68
Tabela 10.5-- Transfer Buffer (2L) ....	68
Tabela 10.6- <b>A</b> - Stock 10X Tris Buffered Saline (TBS) pH 7.6 (1L). <b>B</b> -Solução 1X TBS-T (1L).....	69
Tabela 10.7-- <i>Comassie Blue</i> 0.1% (Staining Solution) (100mL) ....	69
Tabela 10.8- <i>Blocking Solution</i> (100 mL).....	70

# Lista Abreviaturas

AP: potenciais de ação

Ca<sup>2+</sup>: íão cálcio

db cAMP: Dibutyryl Cyclic Amp

DRG: gânglios da raiz dorsal

FBS: Fetal Bovine Sérum

FSK: Forskolin

I<sub>Ca</sub>:correntes de cálcio

I<sub>K</sub>: correntes de potássio

I<sub>Na</sub>: correntes de sódio

K<sup>+</sup>: íão Potássio

Na<sup>+</sup>: íão sódio

RA: Acido Retinóico

RMP: Potencial de repouso da membrana

SNC: Sistema Nervoso Central

SNP: Sistema Nervoso Periférico

TTXr: Tetrodoxina resistente

TTXs: Tetrodoxina sensível

VGPC: Canais de K<sup>+</sup> dependentes de voltagem

VGSC: Canais de Na<sup>+</sup> dependentes da voltagem

VGCC: Canais de Ca<sup>2+</sup> dependentes da voltagem

# 1. Introdução Teórica

O estágio foi realizado na Sea4Us, empresa de biotecnologia especializada no desenvolvimento de tratamentos para doenças sem cura a partir dos recursos marinhos portugueses. Fundada em 2013 por investigadores inspirados pela biodiversidade marinha na costa portuguesa, tem Sagres como o principal local de recolha de amostras, sendo o Laboratório de Lisboa na NOVA Medical School responsável pelo desenvolvimento pré-clínico (1).

A Sea4Us é certificada em Sistemas de Investigação, Desenvolvimento e Inovação pela eiC, de acordo com a norma NP4457:2007. Composta por uma equipa multidisciplinar focada na transformação de moléculas presentes no meio marinho em fármacos, que respondam a necessidades clínicas nomeadamente na área da dor.

O estágio foi realizado entre o Laboratório de Fisiologia localizado no Laboratório de Lisboa e o Laboratório de Microbiologia, havendo colaboração direta com a NOVA Medical School.

## 1.1. DRG: Neurónios primários sensoriais do gânglio da raiz dorsal das vértebras da espinal medula

Os gânglios das raízes dorsais (DRG do inglês *Dorsal Root Ganglia*) são compostos por células sensoriais primárias (neurónios de DRG) e estão localizados ao longo da coluna vertebral (2). Os DRG desempenham um papel fundamental na transmissão de sinais derivados de estímulos dolorosos (3). A localização anatómica dos DRG (Figura 1.1) coloca estas estruturas num ponto crucial da perceção da dor, onde ocorre a transmissão do sinal elétrico do Sistema Nervoso Periférico (SNP), para o Sistema Nervoso Central (SNC) (4). As características e localização dos DRG na via de sinalização da dor têm suscitado um elevado interesse no estudo da fisiologia e função destas estruturas (4-6).

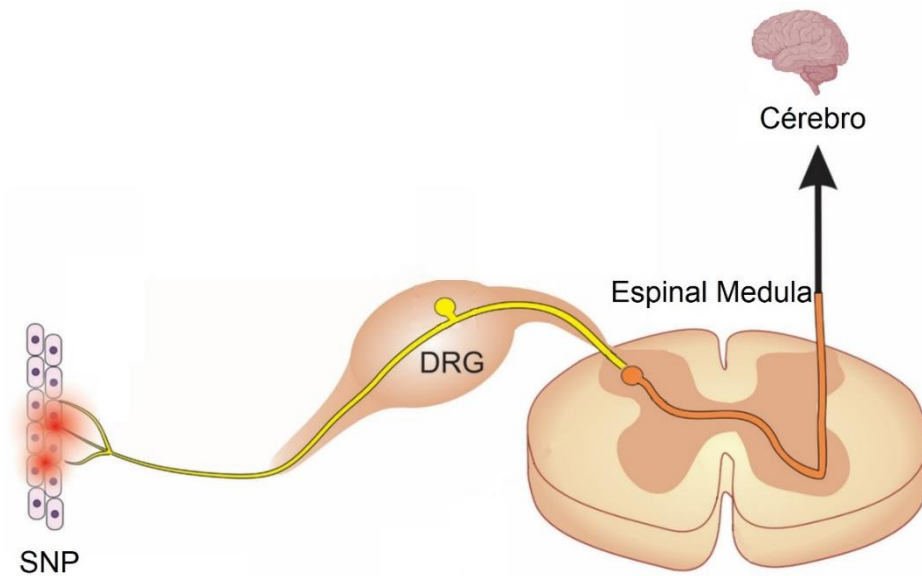


Figura 1.1 - Ilustração da localização dos neurónios primários sensoriais do gânglio da raiz dorsal das vértebras da espinal medula (imagem adaptada (2)).

Neste sentido, o estudo dos DRG tem sido um foco importante na pesquisa de novos fármacos com potencialidades analgésicas (6). Os investigadores têm procurado identificar moléculas-alvo específicas nos DRG, como canais iónicos, envolvidas na transdução e condução de sinais de dor (4,5). O conhecimento do funcionamento destas moléculas permite o desenvolvimento de compostos farmacológicos que possam modular a atividade das mesmas, e consequentemente, dos neurónios sensíveis a processos associados ao desenvolvimento da dor (4-6).

Os principais canais iónicos envolvidos na transmissão e sinal por propagação de potenciais de ação (AP) são canais ativados por voltagem, nomeadamente canais de  $K^+$  e  $Na^+$  (7). Os canais de  $Ca^{2+}$  ativados por voltagem são igualmente importantes pois permitem o fluxo de iões  $Ca^{2+}$  para o interior dos neurónios, o que sustenta, entre outros, uma frequência de AP necessária para a regular atividade neuronal e uma propagação da transmissão do sinal entre neurónios (8,9).

## 1.2. Linha celular imortalizada F-11

As células F-11 são uma linha celular imortalizada que conjuga o neuroblastoma de rato (N18TG2) com DRG de embriões de rato (10-12). Sendo um hibridoma, o

genoma das células F-11 tem na sua constituição cromossomas de ambas as origens (cromossomas de rato e ratinho). Esta linha celular imortalizada é utilizada como modelo celular funcional de neurónios de DRG, neurónios sensoriais primários, utilizados no estudo da dor (10-14). Ao serem provenientes de neurónios de DRG de embriões de rato, as células F-11 não diferenciadas têm propriedades semelhantes a neurónios imaturos (11). Os neurónios que não atingiram a maturação têm uma expressão de canais iónicos reduzida e não têm capacidade de produzir AP (11). A aproximação das células F-11 às propriedades características de neurónios maduros passa pela diferenciação das células F-11 (11,13). Quando sujeitas a protocolos de diferenciação, as células F-11 têm a capacidade de alterar a morfologia e expressão de canais iónicos (13,14).

Uma cultura de células F-11 diferenciadas pode expressar marcadores típicos de nociceptores e apresentar propriedades eletrofisiológicas semelhantes aos neurónios sensoriais primários maduros, incluindo os recetores e canais iónicos expressos (12,13). Por esta razão, as células F-11 são amplamente utilizadas como modelo análogo dos neurónios de DRG isolados (12,13). Estas células oferecem uma ferramenta valiosa para estudar a fisiologia dos neurónios DRG, bem como os mecanismos relacionados à perceção da dor e à descoberta de novos analgésicos (10).

O uso das células F-11 como modelo análogo dos DRG oferece várias vantagens, o que torna esta linha celular uma escolha atrativa para estudos de dor:

- **Disponibilidade e facilidade da cultura:** As células F-11 estão amplamente disponíveis e são relativamente fáceis de cultivar em laboratório, permitindo a realização de experiências de forma consistente (11).
- **Representatividade dos neurónios dos DRG:** As células F-11 exibem fenótipos e propriedades eletrofisiológicas semelhantes aos neurónios dos DRG, o que as torna um modelo relevante para o estudo dos mecanismos da dor e pesquisa de novas moléculas (12,13,15).
- **Manipulação genética e estudos moleculares:** As células F-11 são altamente suscetíveis a técnicas de manipulação genética, como transfeção e silenciamento genético, o que permite a investigação detalhada de vias de sinalização e moléculas-alvo envolvidas na perceção da dor (16).

- **Redução do uso de animais:** O uso das células F-11 em estudos de dor e descoberta de analgésicos pode ajudar a reduzir a necessidade de experimentação animal, oferecendo uma alternativa *in vitro* relevante e ética (12-13).
- **Rastreabilidade farmacológica:** As células F-11 permitem a triagem de compostos farmacológicos para identificar novos analgésicos potenciais, fornecendo um modelo celular prático e eficiente para avaliar a eficácia dos mesmos (12).
- **Eficiência e reprodutibilidade nos ensaios farmacológicos:** As células F-11 são amplamente utilizadas em ensaios farmacológicos para testar a eficácia e a segurança de novos compostos analgésicos. Estas células fornecem um modelo robusto e confiável para avaliar a atividade analgésica de diferentes substâncias, o que permite a triagem rápida e eficiente de potenciais candidatos a novos fármacos com efeito analgésico (12).

### 1.3. Canais iónicos dependentes da voltagem

A perceção da dor depende da capacidade dos neurónios responderem a estímulos que podem ser breves, mas alteram consideravelmente o potencial eléctrico da membrana celular (17). A membrana celular é um mosaico composto por uma dupla camada de fosfolípidos e proteínas transmembranares, tais como os canais iónicos. Em solução, os iões  $K^+$ ,  $Na^+$  e  $Ca^{2+}$  formam ligações com moléculas de água bipolares. As ligações dos iões às moléculas de água impedem a passagem destes pela membrana celular formada por fosfolípidos hidrofóbicos. Deste modo, a membrana celular torna-se pouco permeável aos iões  $K^+$ ,  $Na^+$  e  $Ca^{2+}$  (17). A travessia destes iões através da membrana celular deve-se à presença de canais iónicos e bombas iónicas, proteínas integradas na membrana (17). A rápida alteração no potencial de membrana responsável pela sinalização no sistema nervoso é mediada pelos canais iónicos. Esta classe de proteínas transmembranares pode encontrar-se em todas as células. No entanto, nos neurónios, estes canais têm uma maior expressão e estão especializados na sinalização e resposta a diversos tipos de estímulos, físicos e químicos (17). Todos os canais iónicos são proteínas integrais da membrana com um domínio



**Fechado e não ativável (inativo):** Neste estado o canal não pode ser aberto novamente devido a voltagens positivas (despolarização da membrana). O potencial de membrana tem de regressar a um valor negativo, potencial de repouso inicial (*Recovery*) para o canal regressar à conformação de repouso (fechado) e ser possível uma nova despolarização (17).

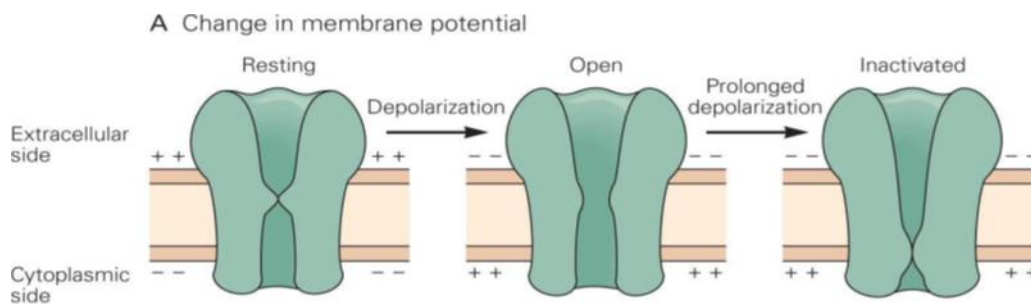


Figura 1.3- Ilustração dos diferentes estados funcionais dos canais iónicos (Adaptado de (17))

A regulação dos canais iónicos pode ser igualmente determinada farmacologicamente, através da aplicação de pequenas moléculas como drogas e toxinas (12,17). A maioria destes agentes bloqueia os canais iónicos, no entanto alguns têm também a capacidade de abrir os canais (17). O bloqueio dos canais por certos agentes pode ser feito diretamente, por obstrução do poro, podendo ser fraco e reversível, ou forte e irreversível, mas também de forma indireta, ao ligar-se ao local de regulação do poro.

### 1.3.1. Canais iónicos de $K^+$

Os canais de  $K^+$  são os canais iónicos mais abundantes nas células (17). Os canais de  $K^+$  dependentes de voltagem (VGPC) abrem e fecham em resposta a alterações no potencial da membrana (18). Estes canais formam um poro que atravessa a membrana e permite a passagem de iões  $K^+$  (17). Canais de  $K^+$  de inativação lenta permitem o fluxo de carga positiva (iões  $K^+$ ) para o exterior dos neurónios, sendo os principais responsáveis pelo potencial de repouso negativo da membrana (17). O potencial de repouso das células nervosas é estabelecido por uma classe de canais iónicos, que é mais permeável ao  $K^+$  do que ao  $Na^+$ . Por esta razão o potencial de repouso destas células está mais próximo do equilíbrio eletroquímico do ião  $K^+$ .

É conhecido que a inibição ou supressão da atividade de VGPC acontece após lesão dos nervos, o que aumenta a hipersensibilidade e suscetibilidade à dor neuropática (19).

Os canais de  $K^+$ , ativados por voltagem Kv, como Kv 1.1-1.4, Kv3.1 e Kv4.3 estão envolvidos na modulação da dor (20). Os canais Kv 1.1 e 1.2 são delayed rectifiers ativados por pequenas variações no potencial da membrana (19,21). O canal iónico Kv1.1 tem um papel importante na transdução da dor.

### 1.3.2. Canais iónicos de $Na^+$

Os canais de  $Na^+$  conduzem iões  $Na^+$  entre o meio extracelular e meio intracelular. Estão também envolvidos na formação de AP e sinalização nos DRG (7,17). Os neurónios de DRG têm várias  $I_{Na}$  (corrente TTXr e TTXs) que podem ser diferenciadas pela cinética da dependência da voltagem dos canais (22).

A produção e condução dos AP em neurónios de DRG excitáveis depende de canais de sódio dependentes de voltagem (VGSC) como Nav1.1–1.9 (17). Canais de  $Na^+$  dependentes de voltagem como Nav1.3, Nav1.7, Nav1.8, e Nav1.9 são essenciais para a transmissão de sinal na via da dor (22,23). Nav1.7, Nav1.8 e Nav1.9 são preferencialmente expressos nos neurónios de DRG (22,23). Os canais de  $Na^+$  dependentes de voltagem Nav1.7-1.9 são também frequentes alvos para estudo de moléculas com potencial analgésico (22,23).

### 1.3.3. Canais iónicos de $Ca^{2+}$

O  $Ca^{2+}$  é um mensageiro secundário envolvido na ativação de diversas cascatas de sinalização celulares (17). O influxo de  $Ca^{2+}$  controlado pelos canais de  $Ca^{2+}$  pode alterar vários processos metabólicos como ativação de várias enzimas, proteínas, dispersão de neurotransmissores e até alterações na expressão genética (17,24). O  $Ca^{2+}$  está também envolvido nos AP e na abertura de um tipo de canais de  $K^+$  que tem um papel importante na repolarização da membrana (8,17,21).

Os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem (VGCC) são também canais iónicos dependentes de ligandos (17). Existem 4 tipos de VGCC: a) os do tipo L estão envolvidos na modelação da excitabilidade neuronal ao contribuírem para a libertação de neurotransmissores na fenda sináptica; b) os canais do tipo N, Cav2.2, são expressos apenas no sistema nervoso e estão também envolvidos na transmissão sináptica do sinal de dor, libertação de neurotransmissores (9); c) os canais do tipo R, (Cav2.3), são também expressos em neurónios de DRG e contribuem para a transmissão de sinais de dor e modulação da excitabilidade neuronal (9); d) os canais do tipo T (LVA- Low Voltage Activated), como Cav3.2, são responsáveis pelo influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  na célula para pequenas alterações no potencial da membrana. Estes canais têm elevada importância na formação de AP em neurónios sensoriais envolvidos na transmissão da dor, como os neurónios de DRG (9).

Linhas celulares capazes de expressar uma variedade de canais da família de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem são uma ótima ferramenta para testar novos potenciais analgésicos (9,11,26).

#### 1.4. *Whole-cell patch-clamp*

Todas as células excitáveis, como por exemplo as células neuronais, expressam canais iónicos dependentes de voltagem e são elegíveis para técnicas de eletrofisiologia como *whole-cell patch-clamp* (7,17). Nesta técnica é possível registar em tempo real a atividade dos canais iónicos presentes em toda a membrana plasmática da célula e observar o efeito de compostos adicionados à preparação de células (27-28).

Nesta técnica é utilizada uma micropipeta com um eléctrodo, utilizado para injetar protocolos de corrente ou voltagem aos quais as células são expostas e registar a resposta dos canais iónicos da célula durante os protocolos (27-29). A configuração de *whole-cell* é atingida após formação de um bom selo (*patch*), entre a pipeta e membrana da célula (Figura 1.4) (7,27-28). Quando o selo é conseguido, é necessário aplicar uma pressão negativa crescente, e progressiva, até à rutura da membrana. Deste modo, a micropipeta fica em continuidade com a membrana da célula e o interior da pipeta entra em contacto com o citoplasma da mesma (Figura 1.4). Quanto melhor o selo conseguido (na ordem dos G $\Omega$ ), mais fidedigno é o registo obtido (7,27).

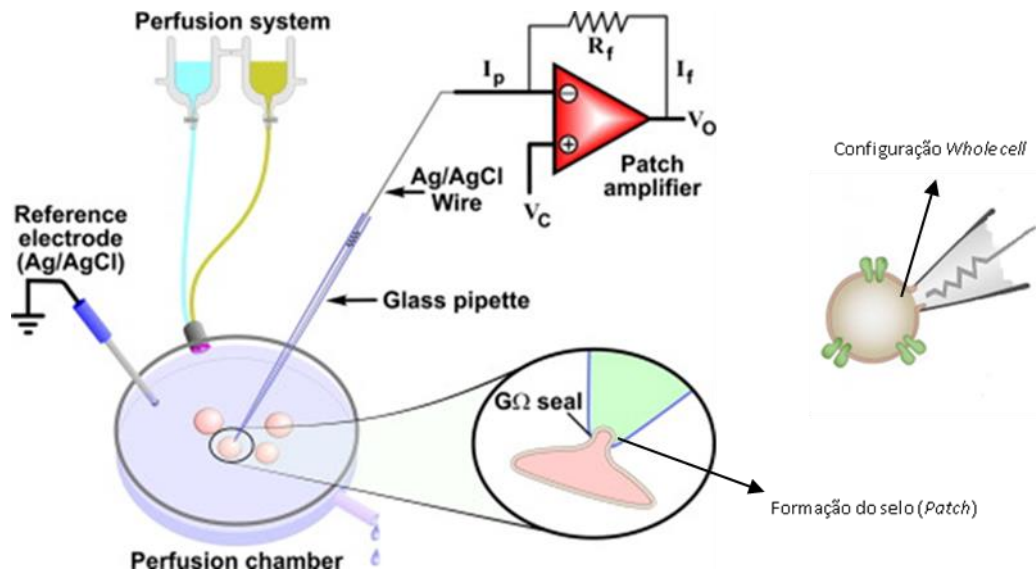


Figura 1.4 – Configuração da técnica *whole-cell patch-clamp*, utilizada no presente relatório. (Adaptado de (28))

Para o registo de correntes iónicas é necessário equipamento especializado e extremamente sensível, como ilustrado na Figura 1.5.

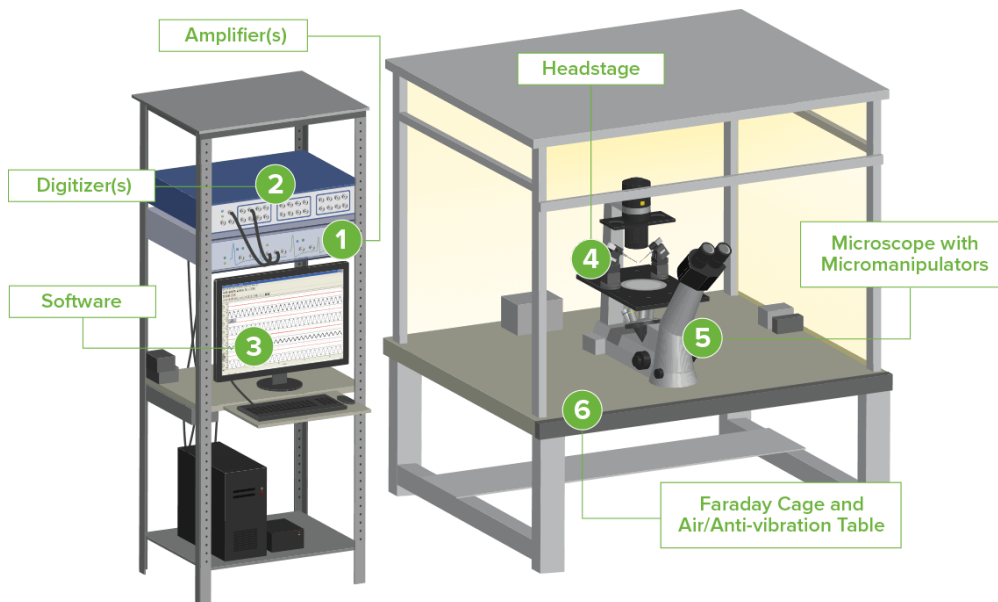


Figura 1.5 - Setup completo de eletrofisiologia para a técnica de *whole-cell patch-clamp*. (Adaptado de (30))

O setup de eletrofisiologia para registos de *whole-cell patch-clamp* é composto por um microscópio invertido para observar as células, micromanipuladores e macromanipuladores, que movimentam a pipeta do eléctrodo (responsável pela injeção do protocolo e o registo da resposta dos canais iónicos da célula). É também utilizado um eléctrodo de referência e uma perfusão conjugada com uma bomba para manutenção da solução externa onde se encontram as células (27-29). O equipamento referido encontra-se dentro de uma gaiola de Faraday, utilizada para mitigar o ruído eletrónico envolvente que pode interferir com o registo (29-30). A gaiola de Faraday é colocada sobre uma base de areia utilizada para minimizar quaisquer vibrações que possam interferir com a ação e movimento da pipeta do eléctrodo que se encontra sobre a célula. Movimentos indesejados da pipeta do eléctrodo podem interferir com o selo e consequentemente com o registo obtido (27,29-30). A pipeta do eléctrodo encontra-se ligada a um *headstage*, que transforma o sinal químico/iónico em sinal eletrónico para que este chegue ao amplificador (28-29). O sinal amplificado é transmitido para o computador com o software que regista os sinais elétricos obtidos e para o osciloscópio que permite acompanhar a resistência na ponta da pipeta (que dá indicação do estado do selo) (27-29).

Nesta técnica de eletrofisiologia é necessária a preparação de uma solução externa, solução que simula a composição iónica do meio extracelular, e de uma solução interna que mimetiza o meio intracelular. A constituição destas soluções depende do ião e canais iónicos em estudo, sendo de extrema importância controlar a concentração de iões presentes, o pH e a osmolaridade de ambas as soluções (27-28).

#### 1.4.1. *Whole-cell Voltage-clamp*

A configuração de *voltage-clamp* permite fixar e variar a voltagem de membrana da célula para registar alterações de corrente nos canais iónicos (31). Esta técnica permite analisar as correntes iónicas que são ativadas ou inativadas em resposta a variações no potencial de membrana, bem como o estudo das propriedades elétricas e farmacológicas dos canais presentes na célula (17,32). A utilização de diferentes soluções permite o estudo de diferentes tipos de canais iónicos dependentes de voltagem como o  $K^+$ ,  $Na^+$  e  $Ca^{2+}$  (11,17,31).

Para leituras de correntes iónicas sob a configuração de *voltage-clamp*, é necessário, além do setup, a preparação das soluções específicas para os canais em estudo. O eléctrodo de vidro conectado a um amplificador é inserido numa célula para formação do selo e posterior rutura da membrana da célula (27-31). O amplificador é capaz de medir a corrente elétrica que flui através do eléctrodo e aplicar uma corrente de compensação igual e oposta para manter a voltagem de membrana constante (Figura 1.4) (29). Isso permite a observação das correntes iónicas através dos canais iónicos de interesse resultantes das mudanças no potencial da membrana (17,29, 31-33).

#### 1.4.2. *Whole-cell Current-clamp*

Com a metodologia de *current-clamp* é possível para o operador fixar ou alterar a corrente injetada nas células e detetar alterações na voltagem da membrana celular que resultam da atividade dos canais iónicos presentes na membrana (17,33-35). A injeção de corrente é feita por via do eléctrodo no interior da micropipeta, que contém a solução interna condutora de corrente e que permite o registo das alterações no potencial de membrana da célula (29,33-34).

A configuração de *current-clamp* é utilizada para estudar a excitabilidade das células neuronais (33,35-36). Durante um protocolo de *current-clamp* o operador pode aplicar na célula uma determinada quantidade de corrente para medir o potencial de membrana ( $V_m$ ) provocado pela injeção de corrente e também registar AP (17,33,35-36). Os AP são sinais neuronais que dependem de vários canais iónicos como o  $K^+$ ,  $Na^+$  e  $Ca^{2+}$  (17,36). A formação de um AP depende da despolarização da membrana da célula provocada pela abertura dos canais de  $Na^+$  (17,36). Devido à elevada concentração de  $Na^+$  no exterior da célula, com a abertura dos canais de  $Na^+$ , há um influxo de iões de  $Na^+$  que despolarizam a membrana ao tornar o meio intracelular positivo. A recuperação (*Recovery*) da célula para o estado de repouso passa pela abertura dos canais de  $K^+$ , hiperpolarização, onde ocorre um efluxo de iões  $K^+$  a favor do gradiente eletroquímico (17,36). Alguns dos canais de  $K^+$  presentes na hiperpolarização não são canais iónicos dependentes de voltagem e estão dependentes de ligandos para regulação da abertura e fecho do poro (18). Muitos destes canais de  $K^+$  dependentes de ligandos envolvidos nos AP, são canais iónicos que dependem da presença e ligação de iões de  $Ca^{2+}$  para modelarem (17-18).

## 2. Objetivos

Tendo em consideração as questões éticas associadas ao uso de animais em contexto laboratorial há um crescente investimento na redução da utilização de modelos animais e procura por modelos análogos.

Este estágio destina-se a proporcionar o contacto direto com uma experiência profissional através de trabalho em contexto laboratorial e procurar implementar e otimizar a utilização de um modelo fisiológico análogo aos DRG, i.e., a linha celular imortalizada F-11. Os objetivos técnicos e de competência pessoal do estágio são:

1. Dominar os métodos laboratoriais e competências necessárias para manutenção de cultura de células;
2. Otimização de cultura de células F-11.
3. Identificar e quantificar a expressão genética dos canais iónicos associados à transmissão de dor, presentes nas células F-11 diferenciadas;
4. Estudo e caracterização do perfil bioquímico e biofísico, das correntes iónicas mediadas por canais iónicos presentes nas células F-11;
5. Implementação da linha celular F-11 como uma plataforma de investigação no âmbito da descoberta de novas moléculas terapêuticas para o tratamento da dor.
6. Compreensão do funcionamento de um laboratório de biotecnologia inserido num ambiente empresarial;
7. Desenvolvimento de automatismos resultantes das boas práticas laboratoriais, que garantam o bom funcionamento de um laboratório de investigação científica;
8. Aquisição de conhecimento técnico e científico que suportem o desenvolvimento académico e profissional da mestranda.

## 3. Materiais e Métodos

### 3.1. Cultura de Células

As células da linha celular imortalizada em estudo, células F-11 (ECACC 08062601) foram adquiridas junto do *European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC)* numa passagem 13 (p13). Para a cultura foram utilizados diferentes meios e suplementos para o crescimento e diferenciação das células F-11 (Figura 3.1).

#### Meios de Crescimento:

- DMEM+ 10% FBS
- F-12+ 10% FBS
- F-12+10% FBS+2%HAT
- RPMI+ 10% FBS

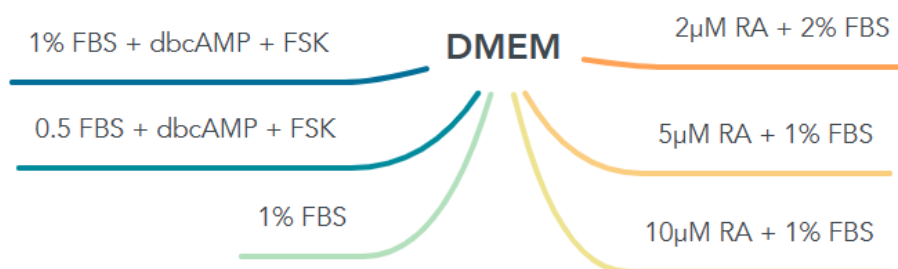


Figura 3.1- Meios de diferenciação utilizados no protocolo de diferenciação das células F-11.

As células foram mantidas com meio de crescimento em frascos de cultura T25 revestidos de poli-D-lisina a 0,01% e em atmosfera húmida a 37°C com 5% CO<sub>2</sub> até atingirem uma confluência de 70-80%. Foram realizadas passagens de 1:8 para manutenção das células. Quando confluentes, as células foram tratadas com tripsina a 0,05% por 5 minutos para soltar as células aderidas. Após a tripsinização, as células foram sujeitas a centrifugação a 1500G durante 5 minutos e suspensas no meio de crescimento por cerca de 3h para promover a sua aderência. Posteriormente, as células foram lavadas com DPBS e o meio de crescimento substituído pelo meio de diferenciação, reduzido em soro (Figura 3.3). Para a diferenciação celular, utilizou-se

uma densidade celular de 6000 células/cm<sup>2</sup>. Para tal, recorreu-se ao corante trypan blue, com uma diluição 1:2, para contagem das células numa câmara de Neubauer (Figura 3.2). O meio de diferenciação foi preparado no momento da troca de meios para prevenir a precipitação e formação de cristais dos suplementos utilizados. As células mantiveram-se no meio de diferenciação por um período de 2 a 14 dias.

Quando necessárias para técnicas de eletrofisiologia, as células em diferenciação nos frascos T25 foram tripsinizadas e suspensas no meio de crescimento.



Figura 3.2- Câmara de Neubauer. São contadas as células nos quadrados A, B, C e D da grelha.

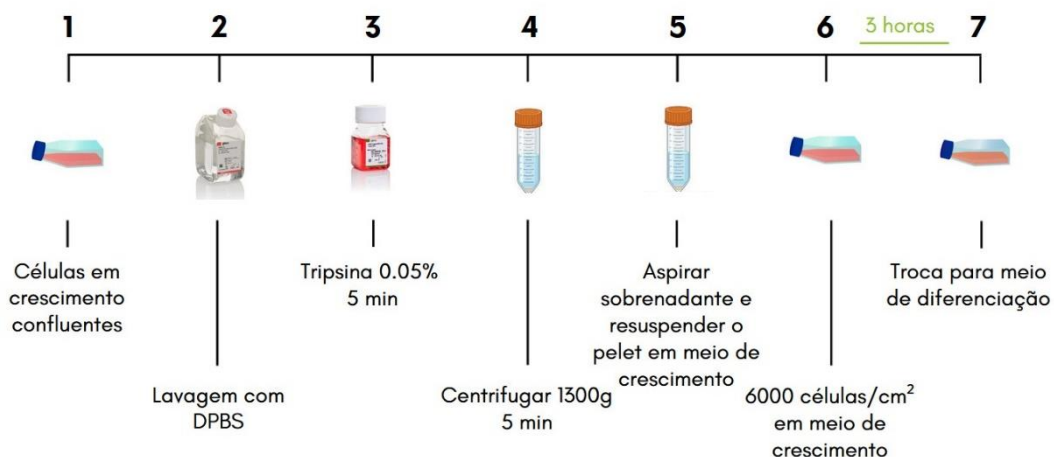


Figura 3.3 - Protocolo de diferenciação

Para as experiências de *western-blotting* as células F-11 foram mantidas em meio de crescimento F-12+10% FBS num frasco T25, até atingirem a confluência de 70-80%. As células diferenciadas obtiveram-se seguindo o mesmo protocolo de diferenciação descrito anteriormente, apenas com alteração no passo 6 da Figura 3.3, em que se fez

uma passagem 1:5 para o novo frasco T25 direccionado à diferenciação. Para a diferenciação usaram-se 2 meios de diferenciação distintos (DMEM+1% FBS e DMEM+2%FBS+2 $\mu$ M RA).

A manipulação das células, dos reagentes e dos materiais estéreis foi realizada numa câmara de fluxo horizontal. Para a observação do crescimento e diferenciação celulares recorreu-se a um microscópio invertido com contraste de fase.

### 3.2. *Whole-cell patch-clamp*

O registo das correntes membranares foi realizado utilizando a configuração de *whole cell patch clamp*. As correntes foram monitorizadas utilizando um osciloscópio (*Hitachi V-252*), detectadas, amplificadas num electrómetro (*Axopatch 200B*, Axon Instruments) e registadas num computador com o software apropriado (*Clampex*, versão 6.0.3, Axon Instruments).

As micropipetas utilizadas, com uma resistência de 1.5 a 3M $\Omega$ , foram produzidas a partir de tubos de vidro de borossilicato filamentado com diâmetro externo de 1,5mm e interno de 1,05mm (*Science Products GmbH*, GB150T-8P), num estirador de pipetas horizontal (*Sutter Instrument Co.* P-87), e cheias com solução interna. O eléctrodo de registo e o eléctrodo de referência eram filamentos de prata revestidos com cloreto de prata (Ag/AgCl). O eléctrodo de referência encontrava-se imerso numa câmara separada da câmara de registo, unidas por uma ponte salina com 4% de agár em 2mM de KCl (*Merck*).

As experiências foram realizadas em caixas de Petri de 8cm<sup>2</sup>, onde haviam sido semeadas as células, montadas na platina de um microscópio invertido de contraste de fase (*Olympus CK2*). A célula escolhida devia apresentar uma membrana lisa e contínua, com neurites curtas, bem como encontrar-se isolada (*Figura 3.4*), de modo a permitir que o potencial de membrana fosse espacialmente uniforme.

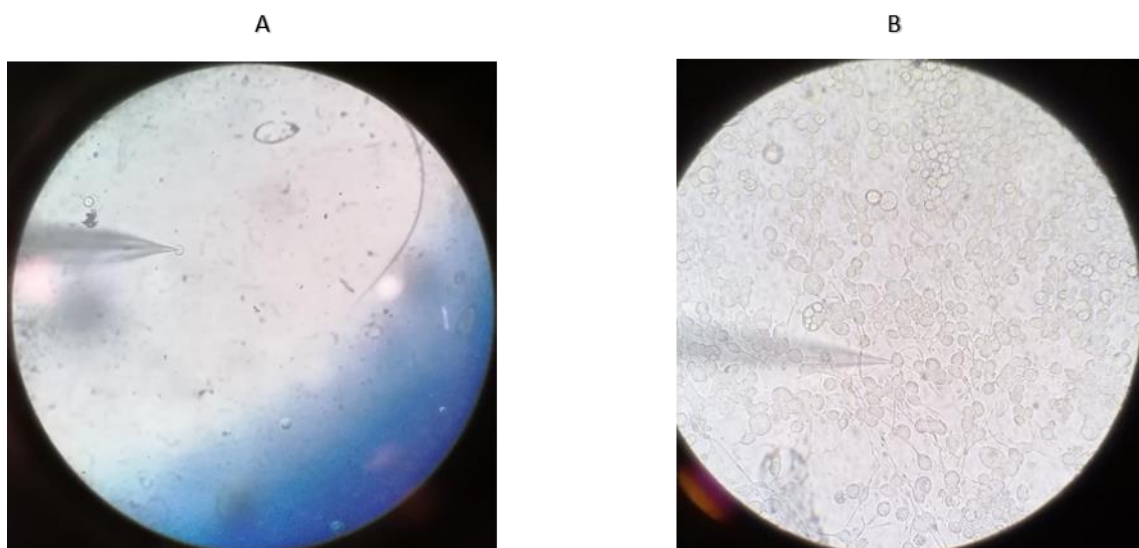


Figura 3.4- **A-** células F-11 diferenciadas e tripsinizadas. **B-** Células F-11 diferenciadas em placa, sem tripsinização.

Após seleção, centrou-se a célula no campo do microscópio invertido e aplicou-se pressão positiva à micropipeta, que foi mantida até ao contacto com a célula. Após mergulhar a pipeta na solução externa, aplicou-se um pulso de 5mV, que permitiu, por medição da amplitude da deflexão no sinal observado no osciloscópio, e consequente aplicação da lei de Ohm ( $V=IR$ ), determinar a resistência da pipeta. Depois da entrada da pipeta na solução externa, a formação do giga-selo (selo de resistência na ordem dos  $G\Omega$ ) deve ser obtida o mais rapidamente possível, uma vez que a taxa de sucesso de selagem é inversamente proporcional ao tempo da exposição da pipeta à solução externa (27).

O movimento da pipeta foi efetuado por intermédio de dois manipuladores: um manipulador (Narishige ONM-1) para deslocação da micropipeta fora da solução externa; e um manipulador hidráulico (Narishige ONO-131), de movimentos mais precisos. O contacto entre a ponta da micropipeta e a membrana celular era revelado por um pequeno aumento da resistência. Após libertação da pressão positiva da micropipeta, que provocou uma diminuição adicional da corrente, aplicou-se uma pressão negativa pequena, a fim de obter o giga-selo (formação do selo 'pipeta-membrana celular' de elevada resistência). Nas extremidades do pulso verificava-se a existência de transitórios rápidos, resultantes de correntes capacitivas devidas à capacitância da pipeta. O potencial do interior da pipeta foi ajustado a -60mV e a capacitância da pipeta foi compensada. Após formação do giga-selo, foi aplicado um

pulso rápido de pressão negativa que conduziu à rutura da membrana (configuração de *whole cell*; Figura 3.5). O acesso elétrico ao interior da célula foi indicado pelo aparecimento, no osciloscópio, de correntes capacitativas devidas à capacitância da célula. A capacitância da célula foi compensada e o valor registado. Antes de iniciar qualquer registo a célula deve permanecer em diálise com a solução da pipeta (solução interna) por 3-5 minutos. As células que apresentaram uma resistência em série ( $R_s$ ) instável ou um decréscimo acentuado da corrente ao longo do tempo (*rundown*) foram eliminadas. Todas as experiências foram realizadas à temperatura ambiente (20-23°C).

Os protocolos de voltagem foram gerados com o software *pClamp6* e aplicados através de uma interface de conversão do sinal analógico em digital (A/D) (*Axon Instruments*, DigiData 1200). O potencial de repouso (HP, *Holding Potential*) manteve-se a -70mV.

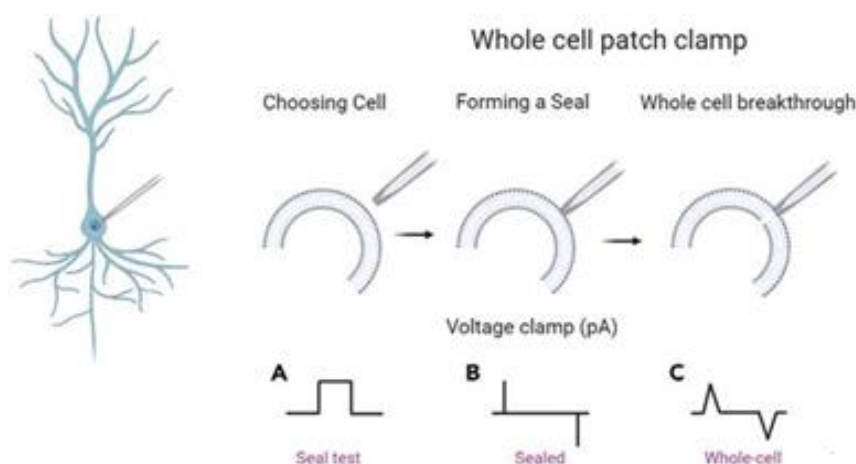


Figura 3.5 – Passos na formação da configuração Whole cell patch clamp. Registos no osciloscópio e interação entre pipeta e membrana das células

### 3.2.1. *Whole-cell voltage-clamp: $I_k$*

No registo de  $I_k$  foi utilizada a seguinte Solução Externa (mM): 140 NaCl, 4 KCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, 1.5 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES (FA) e 15 Glucose, pH 7.4 acertado com NaOH e aproximadamente 300mOsm de osmolaridade. E a seguinte Solução interna (mM): 140 KF, 1 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 EGTA, 10 HEPES, 2 Na 2- ATP e 0.5 Na-GTPc, pH 7.3

acertado com NaOH e osmolaridade de 290mOsm. Seguem-se os protocolos de voltagem utilizados:

Protocolo de ativação dos canais iónicos K<sup>+</sup>: A membrana da célula é mantida a -70mV até iniciar o protocolo com um pré-pulso de -120mV para remover a inativação dos canais de K<sup>+</sup> (*Recovery*). Segue-se uma série de pulsos de comando despolarizante, com uma gama de voltagens entre -80mV e +50mV, com incrementos de 10mV, e duração de 600ms. Entre os pulsos, havia um intervalo de 10 segundos para permitir a recuperação dos canais.

Protocolo de inativação dos canais de K<sup>+</sup>: A membrana das células é mantida a -70mV. O protocolo de inativação é composto por dois passos sequenciais, sendo que o primeiro (o pré-pulso) é composto por uma série de pulsos despolarizantes que variam entre -140mV e +10mV, em incrementos de 10mV (para promover a inativação dos canais ao longo da duração destes pulsos, 400ms), e o segundo (pulso comando, onde se regista a amplitude das correntes) é mantido a uma voltagem de 10mV, durante 500ms (para se estudar a amplitude das correntes dos canais que não foram inativados durante o pré-pulso). Entre cada série de pulsos havia intervalos de 20 segundos para recuperação dos canais.

### 3.2.2. *Whole-cell voltage-clamp*: I<sub>Na</sub>

Para registo das soluções de Na<sup>+</sup>, Solução Externa Na<sup>+</sup> (mM): 100 NaCl, 2 CoCl<sub>2</sub>, 30 TEA-Cl, 5 KCl, 10 HEPES, 1.8 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 25 Glucose e 3 4-AP, pH 7.4 acertado com NaOH e 290mOsm de osmolaridade. A solução interna é composta por (mM): 140 CsF, 10 NaCl, 10 HEPES e 10 EGTA, pH 7.2 acertado com CsOH e 280mOsm de osmolaridade.

Protocolo de Ativação: o potencial de membrana é inicialmente estabelecido nos -70mV. O protocolo de ativação inicia com um pré-pulso de -110mV para remover qualquer tipo de canais inativados. O pré-pulso é seguido de vários pulsos de despolarização que vão de -50mV até +40mV, durante 50ms, com intervalo de 5 segundos para recuperação dos canais.

Protocolo de Inativação: mantendo a membrana da célula a um potencial de -70mV, aplica-se o protocolo de inativação constituído por dois pulsos sequenciais: o pré-pulso compreende uma série despolarizante que compreende voltagens de membrana entre

-120mV e 0mV, incrementos de 10mV e duração de 100ms, e o pulso comando é mantido a +10mV, com uma duração de 50ms. Entre cada série de pulsos há 10 segundos de intervalo para recuperação dos canais de Na<sup>+</sup>.

### 3.2.3. *Whole-cell voltage-clamp*: I<sub>Ca</sub>

Para registar correntes de Ca<sup>2+</sup>, preparou-se uma solução externa com iões Ba<sup>2+</sup> na sua composição. Este ião divalente é seletivo dos canais de Ca<sup>2+</sup>, fornecendo melhores amplitudes de corrente do que aquelas obtidas com o ião Ca<sup>2+</sup>. A solução externa era composta por (em mM): 120 TEA-Cl, 5 CsCl, 10 HEPES, 10 BaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 20mM Glucose and 0.0003 TTX, pH 7.4, acertado com CsOH e uma osmolaridade 300mOsm aproximadamente. A solução da pipeta (mM): 120 CsF, 20 TEA-Cl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 EGTA, 10 HEPES, 2 MgATP and 0.2 Na-GTP, pH 7.1, acertado com CsOH e osmolaridade de 280mOsm.

Protocolo de ativação: o potencial de membrana é inicialmente estabelecido nos -70mV. O protocolo de ativação inicia com um pré-pulso de -120mV para a remoção de inativação de canais inativados. O pré-pulso é seguido de vários pulsos de despolarização que vão de -50mV a +40mV, durante 600ms, com intervalo de 5 segundos para recuperação dos canais.

### 3.2.4. *Whole-cell current-clamp*

O registo da atividade neuronal foi conseguido através da configuração *current clamp*, a qual permite induzir padrões de disparo de AP através da injeção de corrente para o interior dos neurónios. Os protocolos de corrente utilizados nesta técnica possibilitam, assim, manter uma administração constante de corrente e estudar qual o efeito dessa injeção no estímulo de AP.

As soluções utilizadas nesta técnica são as mesmas utilizadas para registar I<sub>K</sub> na configuração *voltage clamp*.

Protocolo de corrente: rampa de corrente, a começar nos 0pA e a terminar nos 1nA, com uma duração de 1s. Assim consegue estudar-se o perfil de disparo de AP numa gama alargada de correntes.

### 3.3. Expressão proteica dos canais iónicos nas células F-11

Para confirmar a expressão proteica e quantificar os canais iónicos de  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  ( $K_v$ ,  $Na_v$  e  $Ca_v$ ) nas células F-11 extraiu-se, em primeiro lugar, as proteínas das mesmas para, de seguida, se recorrer à técnica de Western blotting. Todas as soluções utilizadas estão descritas no Anexo 2- Soluções de Western-blotting.

#### Extração das proteínas das células F-11:

As células F-11 em frascos de cultura T25, colocadas em gelo por 5 minutos, foram lavadas com DPBS. O DPBS é então aspirado e substituído por tampão de lise. Para um frasco T25 utilizou-se 500 $\mu$ L de tampão de lise (RIPA) com 20 $\mu$ L PICS (25x). O frasco permaneceu em gelo por 20 minutos, com agitação permanente nos últimos 5 minutos. Um raspador de células foi utilizado para garantir que todo o material aderido se soltasse, sendo posteriormente coletado para um eppendorf 1,5mL. Os eppendorfs foram centrifugados a 12000G, durante 20 minutos, a 4°C. No final, o sobrenadante com as proteínas foi retirado para um novo eppendorf e o pellet descartado. A suspensão de proteínas foi guardada a 4°C por 2 semanas.

A Figura 3.6 esquematiza o protocolo de extração de proteínas utilizado nas células F-11.

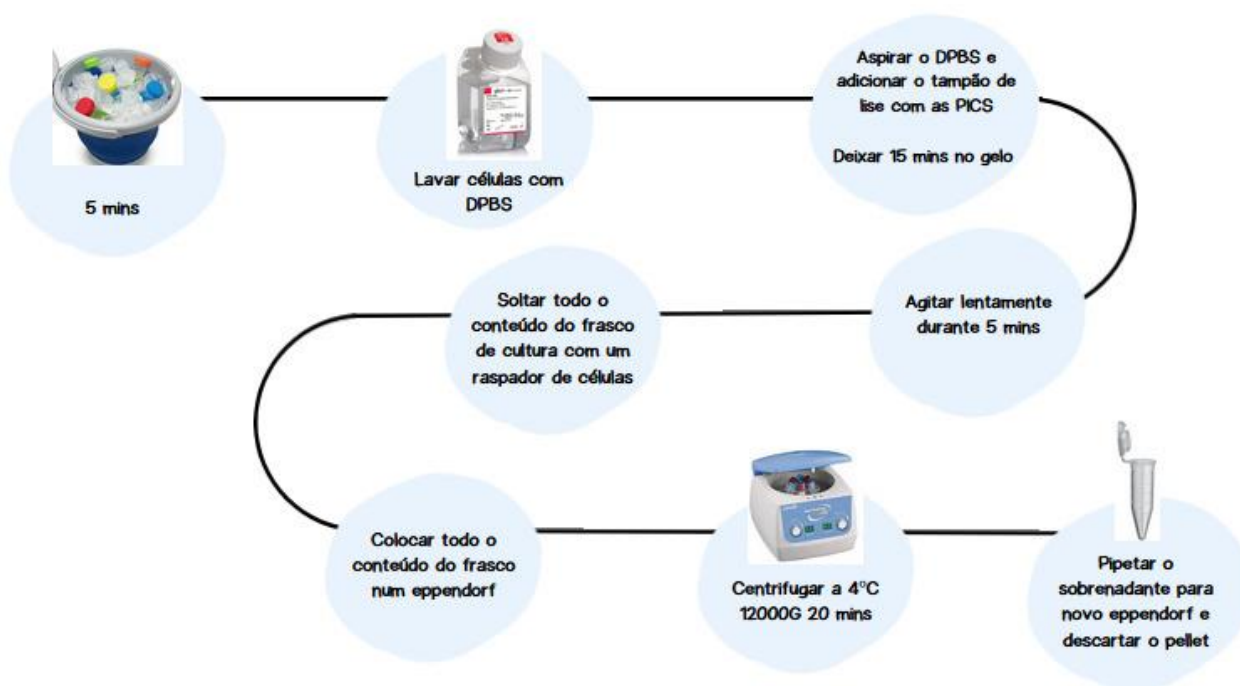


Figura 3.6 - Esquema da extração de proteínas

#### Quantificação das proteínas das células F-11:

Foi utilizado um ensaio de Bradford, com recurso ao kit BIO-RAD Quick start Bovine Serum Albumin (BSA) Standard Set. Os standards foram preparados segundo as instruções do fornecedor (Tabela 3.1) e foi utilizado o BIO-RAD Start Bradford 1X Dye Reagent como reagente de trabalho (Figura 3.7). A amostra foi diluída 1:100 em água destilada.

Tabela 3.1 - Instruções do Kit BIO-RAD Quick start Bovine Serum Albumin (BSA) Standard Set para preparação dos Standards.

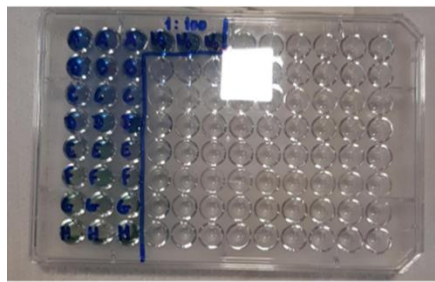
Tubo	Volume de Padrão(μL)	Padrão Stock	Volume de diluente (μL)	Concentração final de proteína (μg/mL)
A	10	2 mg/mL	790	25
B	5	2 mg/mL	495	20
C	5	1.5 mg/mL	495	15
D	5	1 mg/mL	495	10
E	5	0.5 mg/mL	495	5

F	5	0.25 mg/mL	495	2.5
G	5	0.125 mg/mL	495	1.25
H (branco)	-	-	500	0



Figura 3.7 - Preparação para a quantificação das proteínas da amostra.

Os standards e amostra foram colocados nos poços de uma placa de 96 poços em triplicado (Figura 3.8). A placa foi colocada a incubar à temperatura ambiente por 30 minutos em agitação constante. A leitura de absorvância foi feita no leitor (SPECTROstar Nano-601) no comprimento de onda de 595nm. A quantidade de proteína na amostra é calculada a partir da regressão linear da curva de calibração, obtida pela leitura de absorvância dos padrões ( $y=mx+b$ , em que **m** é o declive da curva e **b** a ordenada na origem).



30min em agitação



Leitura de absorvência a 595nm

Figura 3.8 - Placa de 96 poço com standards e amostra para leitura de absorvência.

### Separação das proteínas por peso molecular (Eletroforese):

Foram preparados sempre 2 géis por ensaio. Foram utilizados os BIO-RAD Mini PROTEAN® 3 System Glass Plates que eram colocados no suporte para molde do gel. O gel era preparado em falcons e colocado no suporte para polimerizar. De seguida estão descritas as receitas do gel de separação e gel de *stacking* utilizados.

#### *Gel de separação (20mL):*

9.938mL H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>,

5mL Tris 1.5M pH 8.8,

4.669mL Acrilamida,

10% SDS,

10% APS

1% TEMED

#### *Gel de stacking (10mL):*

5.95mL H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>,

1.335mL Tris 0.5M pH 6.8,

2.5mL Acrilamida,

10% SDS

10% APS

1% TEMED

O TEMED funciona como agente polimerizante do gel e só é adicionado no final da preparação de cada gel. O gel de separação é colocado cuidadosamente no suporte com o molde de vidro e é adicionado isopropanol (com menor densidade) para prevenir a formação de bolhas no gel. Quando o gel está polimerizado é retirado o

isopropanol com o auxílio de papel de filtro e adicionado o gel de stacking e o pente com molde para 10 poços até polimerizar. O gel pode ser guardado durante 1 dia a 4°C em papel húmido ou utilizado de imediato para eletroforese.

Na eletroforese todos os poços do gel foram carregados com 15µg de amostra proteica, diluída em 20% de Laemmli Sample Buffer. A eletroforese corre a 100mV, 400mA por 1:20h, em running Buffer. No final da eletroforese o gel é colocado numa tina com o running Buffer e com o auxílio de uma espátula o gel é retirado do molde de vidro (Figura 3.9). O gel de stacking é cortado e descartado.

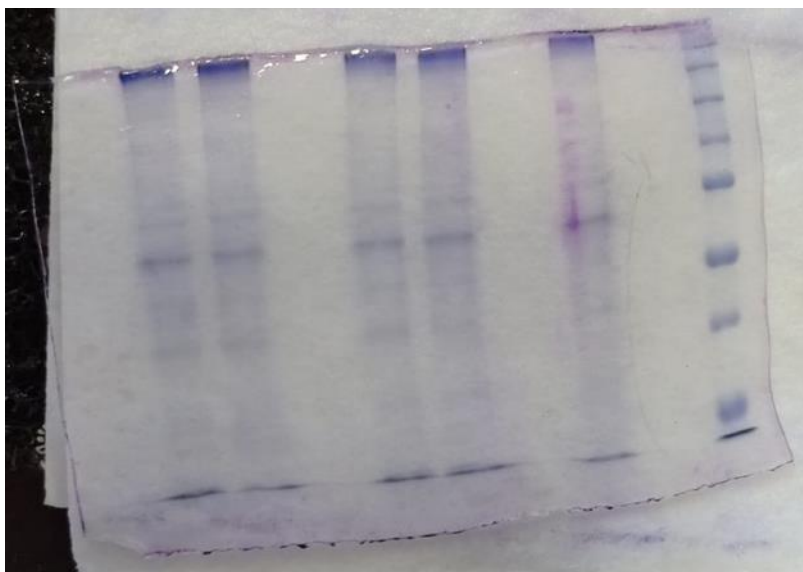


Figura 3.9 - Gel de eletroforese com proteínas marcadas com reagente azul de Coomassie.

#### Transferência das proteínas para a membrana:

Na transferência é utilizada uma membrana de PVDF (BIO-RAD Immun-Blor® PVDF Membrane For Protein Blotting), 4 papeis de filtro, e 2 esponjas por cada gel. As membranas foram marcadas e ativadas em metanol. Todos os componentes da montagem da cassette de transferência são humedecidos no buffer de transferência. A montagem da cassette é feita segundo a Figura 3.10. A transferência foi feita a 100mV, 400mA durante 1:30h, numa tina com gelo.

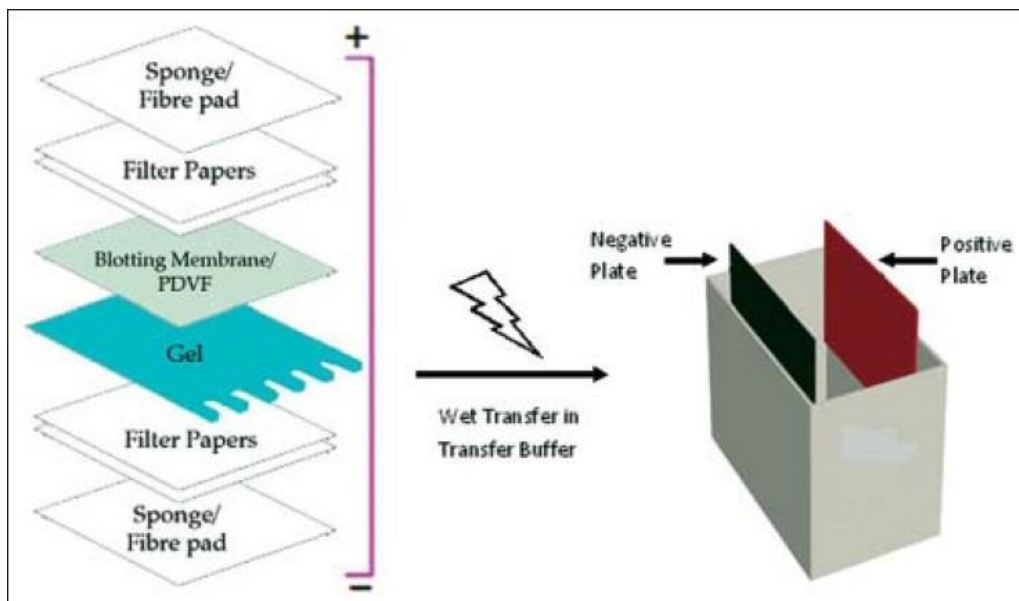


Figura 3.10 - Esquema da transferência das proteínas do gel de eletroforese para a membrana de western blotting.

No final da transferência, o gel foi colocado em azul de Comassie e a membrana em Ponceau S para verificar se a transferência foi bem sucedida. A membrana é lavada com TBS-T (1X) 3 vezes por 5 minutos em agitação e colocada na solução de bloqueio *overnight* a 4°C (quando possível em agitação). Após a incubação com a solução de bloqueio a membrana é lavada novamente com TBS-T (1X) 3 vezes por 5 minutos em agitação, e cortada nas zonas de interesse. As tiras de membrana cortadas foram deixadas a incubar no anticorpo primário de interesse, *overnight*, a 4°C, em agitação constante, garantindo a exposição do anticorpo a toda a superfície da membrana. No dia seguinte as membranas eram novamente lavadas com TBS-T (1X) 3 vezes por 5 minutos em agitação e deixada a incubar, *overnight*, com os anticorpos secundários, a 4°C, em agitação constante. No final da incubação as membranas eram reveladas no equipamento Chemidoc Molecular Imager (Chemidoc, BioRad) com recurso ao BIO-RAD Clarity™ Western ECL Substrate segundo as instruções do kit. A quantificação do sinal foi realizada por densitometria, sempre relativa ao sinal do *loading control* (no caso,  $\beta$ -actina).

A Tabela 3.2 mostra todos os anticorpos utilizados e respetivas diluições.

Tabela 3.2 - Tabela dos anticorpos e respetivas diluições utilizadas.

Anticorpos primários	Diluição
Kv 1.2	1:1000
Kv 1.3	
Kv 4.3	
Nav 1.7	
Nav 1.8	
Cav 3.2	
$\beta$ -actina	
Anticorpos secundários	Diluição
Goat anti-rabbit	1:5000
Goat anti-mouse	

### 3.4. Análise de dados

Os parâmetros de eletrofisiologia foram calculados com as fórmulas no **10. Anexo 1**. Os dados de eletrofisiologia foram analisados com recurso a diferentes softwares como o Clampfit 10.3 (Axon Instruments®), Microsoft Excel (Microsoft Office 2013 Professional Plus®), Origin Pro 8 (Microsoft Software®) e GraphPad Prism 6.01 (Window, GraphPad Software, San Diego California USA). Neste último foi realizada a análise de significância utilizando o teste *t-student* para dados paramétricos com  $n > 10$  e Mann-Whitney para dados não paramétricos ( $n < 10$ ). As diferenças foram apenas consideradas significativas quando  $p < 0.05$  ( $0.01 < p < 0.05$  representa 1 nível de significância (\*)) e  $0.001 < p < 0.01$  para 2 níveis de significância (\*\*)). Os resultados foram apresentados com a média e respetivo erro padrão (média  $\pm$  erro padrão) e o  $n$  representa a dimensão da amostra.

## 4. Resultados

Antes de começar a apresentação dos resultados é importante referir o plano de atividades realizadas durante o estágio e respetivos objetivos (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 - Atividades realizadas durante o estágio e respetivos objetivos.

Atividade	Objetivo
Pesquisa bibliográfica e estudo da função dos neurónios primários sensíveis à dor.	Compreensão dos mecanismos da dor
Cultura de células imortalizadas F-11	Utilização das células F-11 como base para realização de diversas técnicas durante o estágio
Otimização da manutenção e diferenciação de células F-11 para utilização em técnicas de eletrofisiologia	Utilização das células F-11 como modelo celular de dor em estudos de eletrofisiologia
Estudo das correntes iónicas recorrendo a técnicas de <i>whole-cell patch-clamp</i> ( <i>voltage-clamp</i> e <i>current-clamp</i> )	Caracterização do perfil das correntes iónicas e atividade neuronal nas células F-11 diferenciadas
Estudo da expressão dos canais iónicos por Western-blotting	Identificar a expressão dos canais iónicos tradicionalmente relacionados com a dor nas células F-11
Estudos de <i>whole cell patch clamp</i> em neurónios DRG isolados de ratos.	Comparar os resultados obtidos em células F-11 com os neurónios DRG isolados de rato (referência no estudo da dor)
Análise e interpretação dos dados científicos	Avaliar a implementação das células F-11 como modelo celular para o estudo da patologia da dor, associada à expressão de canais iónicos.

### 4.1. Otimização células F-11 como modelo celular em estudos eletrofisiologia

As atividades deste estágio iniciaram com a otimização da cultura de células F-11. Foram testados diversos meios de manutenção e diferenciação referidos na Secção **3.1- Cultura de células F-11**. A otimização tinha como finalidade a utilização das células F-11 em estudos de eletrofisiologia e por esta razão estudou-se a influência dos diferentes meios de crescimento e diferenciação, nos parâmetros de eletrofisiologia utilizados em *whole-cell patch-clamp* para avaliar a qualidade do registo. Um dos parâmetros tido em consideração para a adequabilidade dos meios à técnica de *whole-cell patch-clamp* foi o *holding current* ( $I_h$ ). Valores mais próximos de 0pA indicam boas condições experimentais para registar correntes iónicas, logo mais

fidedigno será o resultado obtido. Na Figura 4.1, está registada a frequência do  $I_h$  para cada meio de manutenção das células F-11.

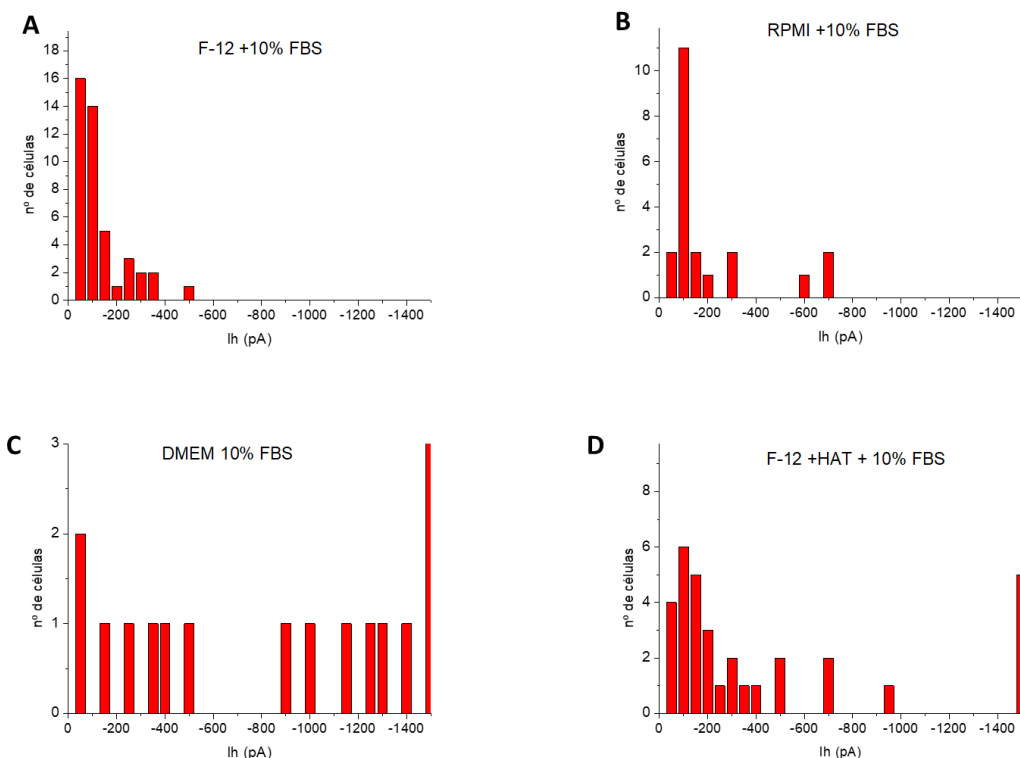


Figura 4.1- Histogramas de Frequência da  $I_h$  para **A-** meio de manutenção F-12 suplementado apenas com 10% FBS. **B-** meio de manutenção RPMI suplementado com 10% FBS. **C-** meio de crescimento DMEM suplementado com 10% FBS. **D-** meio de manutenção F-12 suplementado com 10% FBS e 2% de HAT.

No histograma de frequência **A** com meio de manutenção F-12 suplementado com 10% FBS foi obtida uma maior concentração de dados experimentais num conjunto de valores de  $I_h$  menor. Valores menores de  $I_h$  dão garantia de uma melhor integridade da membrana das células, logo melhores condições de registos eletrofisiológicos. Considerando outro parâmetro de whole-cell patch-clamp, a capacitância da célula ( $W_c$  (pF)), que permite inferir sobre o tamanho das células, estudou-se uma eventual correlação entre  $I_h$  e  $W_c$  (Figura 4.2).

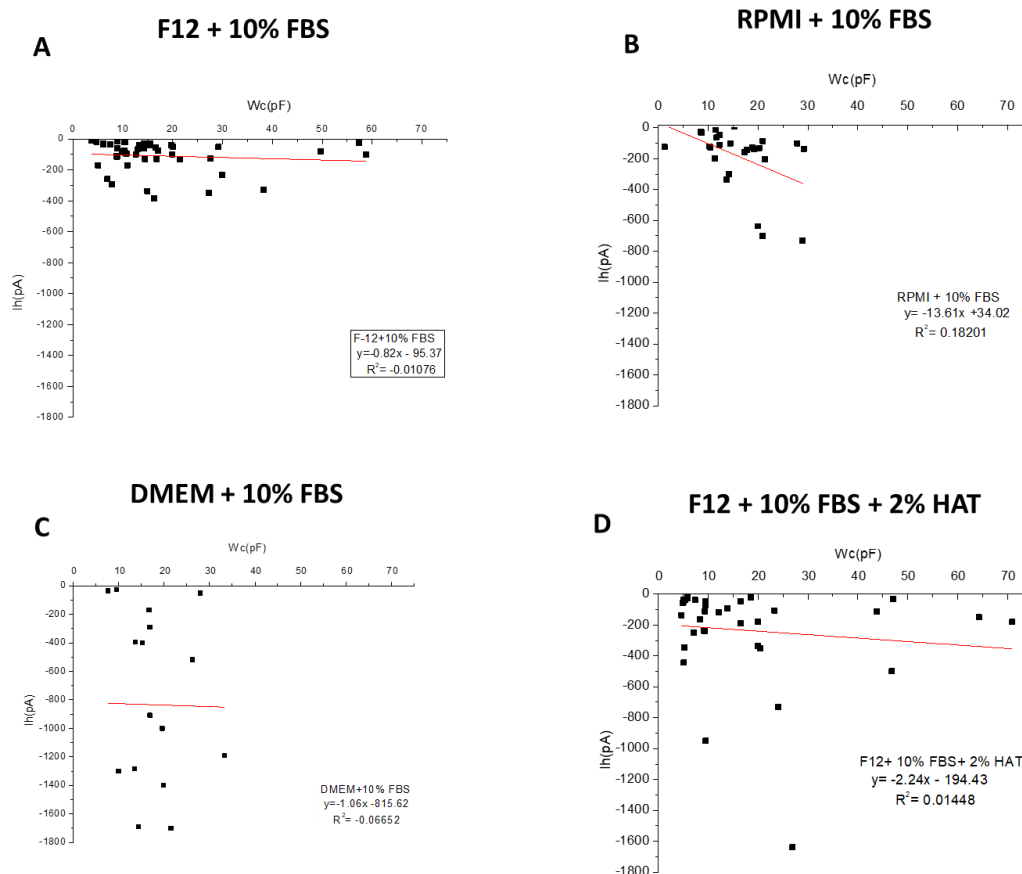


Figura 4.2 - Correlação entre os valores de *holding current* ( $I_h$  (pA)) e os valores da capacitância da membrana ( $W_c$  (pF)) nos meios de manutenção analisados.

Os gráficos  $I_h$  em função de  $W_c$  demonstram que as células F-11, quando mantidas no meio RPMI, apresentam uma correlação direta entre o tamanho das células e valores mais elevados de  $I_h$ . Esta observação é corroborada com o valor do declive da regressão liner dos pontos do gráfico 4.2 **B** (~13.6). No extremo oposto, quando mantidas em DMEM+10% FBS (Figura 4.2 **C**), as células F-11 não apresentam qualquer tipo de correlação entre  $I_h$  e  $W_c$ , não permitindo tirar conclusões a este nível. Este resultado está de acordo com a literatura no que respeita à utilização do meio DMEM em culturas de manutenção de células F-11, na medida em que o DMEM induz, por si só, algum nível de diferenciação das células F-11 (observação da formação de processos celulares - axónios). O crescimento das células F-11 no meio F-12 (Figura 4.2 **A**) também promove uma linearidade entre  $I_h$  e  $W_c$ , sendo que, numa gama de valores de capacitância entre 10 –20pF, se observa uma elevada concentração de células com valores de  $I_h$  a rondar os -100pA. De notar que o

suplemento 2% HAT no meio F-12 contribui para uma deterioração membranar das células F-11, tal como se observa numa maior variação de valores de  $I_h$  no gráfico 4.2 D.

A média dos parâmetros de eletrofisiologia utilizados durante o procedimento de otimização do crescimento e manutenção das células F-11 está apresentada na Tabela 4.2

Tabela 4.2 - Parâmetros de eletrofisiologia estudados durante o procedimento de otimização da manutenção da cultura de células F-11: *holding current* ( $I_h$ ), *series resistance* (Rs) e *whole-cell capacitance* (Wc).

Meios de crescimento	RPMI +10% FBS	F-12 +10% FBS	F-12 +10% FBS + 2% HAT	DMEM+ 10% FBS
$I_h$ (pA)	-179.37±38.75	-116.07±13.65	-740.24±263.24	-790.28±151.90
R.s. (Mohm)	5.63±0.49	5.57±0.28	5.59±0.48	6.70±0.41
W.c. (pF)	15.72±1.37	20.55±2.09	17.36±2.82	17.15±1.72
nº células	27	61	42	18

Os meios de crescimento RPMI e F-12 são aqueles que conferem melhores condições de sucesso em eletrofisiologia, dado os valores de  $I_h$  mais próximos de 0pA, o que significa uma maior robustez e integridade da membrana celular, fator preponderante para a técnica de *whole-cell patch-clamp*.

O meio F-12 suplementado com 10% FBS (F-12+10% FBS) foi selecionado como meio de crescimento para o desenvolvimento das restantes atividades do presente estágio por apresentar o valor médio de  $I_h$  mais baixo. Doravante, este meio será designado por '10% FBS' e representará a condição de células F-11 não diferenciadas.

Após a seleção do meio de crescimento, o passo seguinte foi a otimização das condições de diferenciação das células F-11, seguindo o mesmo racional de seleção com base na qualidade dos registos de eletrofisiologia. Todos os meios de diferenciação testados eram compostos por DMEM, suplementado com uma concentração mais reduzida de FBS (1% a 2%, em comparação com os 10% utilizados no meio de crescimento; Figura 4.3). Este ponto de partida comum permitiu

averiguar o efeito dos vários suplementos/fatores de diferenciação usados: 30 $\mu$ M FSK, 1mM db c-AMP e ácido retinóico (RA), este último a diferentes concentrações (2 $\mu$ M, 5 $\mu$ M e 10 $\mu$ M). Assim, durante o processo de otimização da diferenciação das células F-11, testaram-se 6 meios de diferenciação. A seleção das melhores condições de diferenciação, e respetiva aplicabilidade em estudos de eletrofisiologia, baseou-se na dispersão dos valores de  $I_h$  através de uma análise dos histogramas de frequências (Figura 4.3)

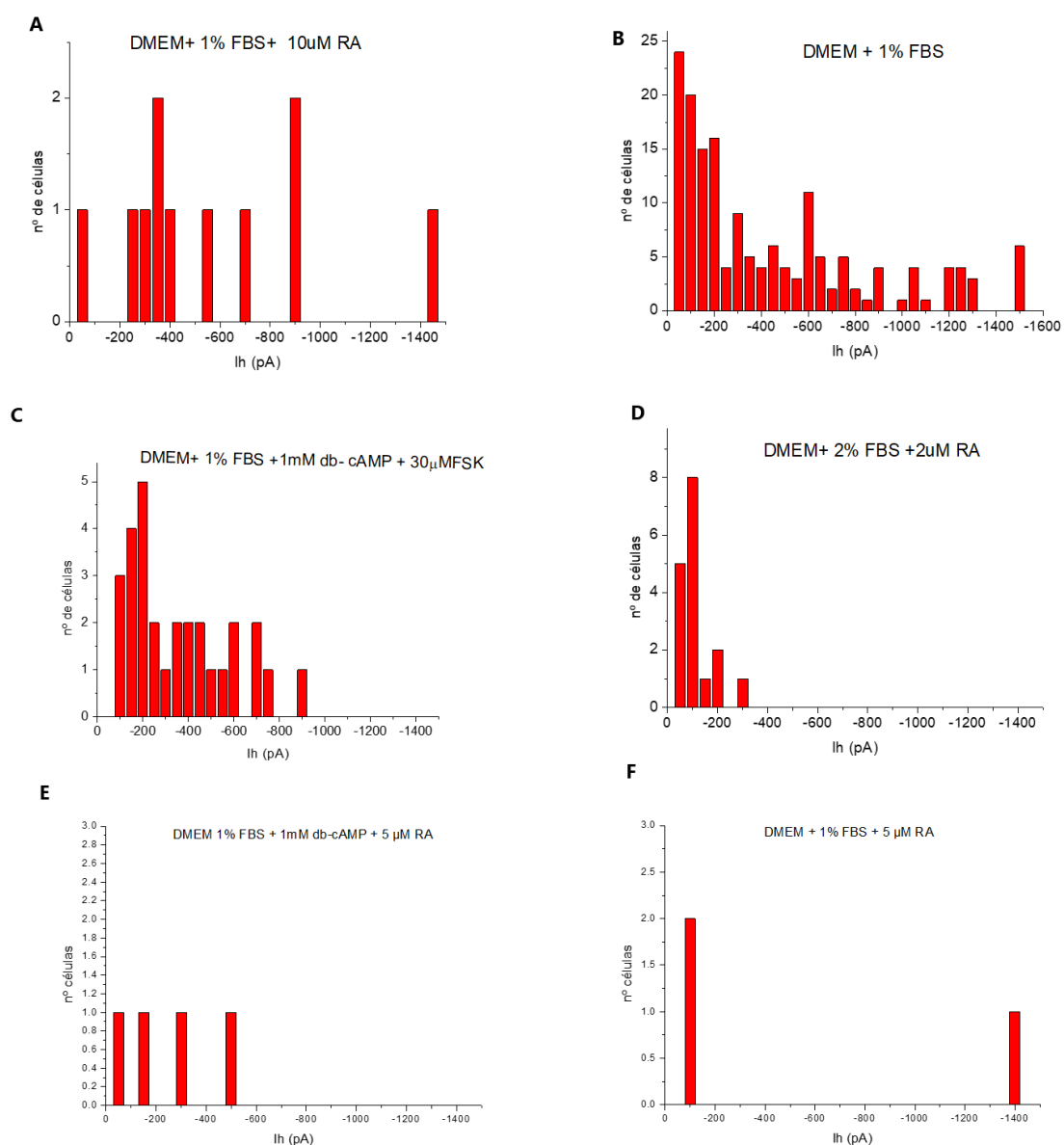


Figura 4.3 Histogramas de Frequência da  $I_h$  para todos os meios de diferenciação utilizados na fase de otimização das condições de diferenciação da cultura de células F-11.

A monitorização dos valores de  $I_h$  permitiu identificar o meio 'comum' DMEM + 1% FBS (Figura 4.3B) e o meio DMEM + 2%FBS + 2 $\mu$ M RA (Figura 4.3D), como os mais adequados para a prossecução das experiências de eletrofisiologia. A utilização destes meios aumenta a probabilidade de se registar valores de  $I_h$  mais reduzidos nos estudos de eletrofisiologia em células F-11, dada a tendência da dispersão de dados experimentais verificada nos histogramas de frequência (Figuras 4.3B e 4.3D). A correlação entre a  $I_h$  e  $W_c$  foi novamente estudada, no sentido de se perceber se existia alguma relação direta entre os dois parâmetros eletrofisiológicos (Figura 4.4).

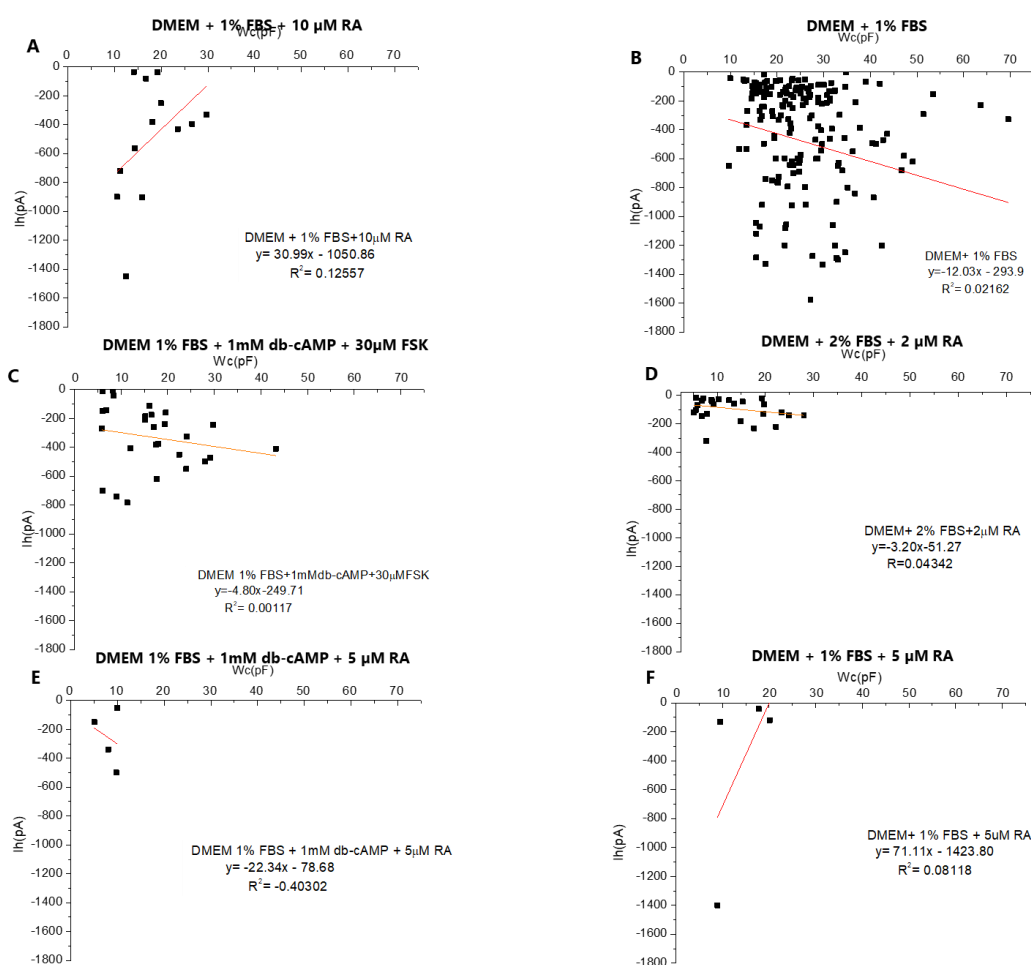


Figura 4.4 Correlação entre os valores de *holding current* ( $I_h$  (pA)) e os valores da capacitância da membrana ( $W_c$  (pF)) nos meios de diferenciação analisados.

A utilização dos meios DMEM + 1% FBS (Figura 4.4B), DMEM + 1% FBS + 1mM db c-AMP + 30 $\mu$ M FSK (Figura 4.4C) e DMEM + 2%FBS + 2 $\mu$ M RA (Figura 4.4D) permitiram estabelecer uma correlação entre valores de  $I_h$  e de  $W_c$ , na medida em que células maiores apresentam tendencialmente valores mais elevados de  $I_h$ , o que significa piores condições experimentais para o registo de correntes iónicas através da técnica de eletrofisiologia *whole cell patch clamp*. Os restantes meios, ora por ausência de declive na regressão linear dos pontos experimentais, ora por uma amostra experimental reduzida, não permitiram estabelecer tal comparação. Assim, para efeitos de continuidade dos estudos de eletrofisiologia, seleccionaram-se os meios de diferenciação *DMEM + 1% FBS* (doravante designado por '1% FBS') e *DMEM + 2%FBS + 2 $\mu$ M RA* (doravante designado por '2 $\mu$ M RA') pois foram aqueles que garantiram os melhores valores de  $I_h$ , cujas médias estão apresentadas na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 - Parâmetros de eletrofisiologia estudados durante o procedimento de otimização da diferenciação da cultura de células F-11: *holding current* ( $I_h$ ), *series resistance* ( $R_s$ ) e *whole-cell capacitance* ( $W_c$ ).

Meios de Diferenciação	DMEM+ 1% FBS + db-cAMP + FSK	DMEM+ 1% FBS	DMEM+ 1% FBS +10 $\mu$ M RA	DMEM+ 2% FBS +2 $\mu$ M RA	DMEM+ 1% FBS +5 $\mu$ M RA +db-cAMP	DMEM+ 2% FBS +5 $\mu$ M RA
$I_h$ (pA)	-332.12 $\pm$ 41.32	-513.36 $\pm$ 44.42	-497.62 $\pm$ 113.42	-92.76 $\pm$ 15.18	-423.00 $\pm$ 326.26	-260.75 $\pm$ 99.56
$R_s$ . (Mohm)	5.04 $\pm$ 0.3	7.16 $\pm$ 0.29	7.70 $\pm$ 1.07	7.49 $\pm$ 0.71	6.81 $\pm$ 0.55	15.75 $\pm$ 9.19
$W_c$ . (pF)	16.76 $\pm$ 1.74	15.31 $\pm$ 0.61	17.85 $\pm$ 1.63	12.81 $\pm$ 1.39	14.08 $\pm$ 2.86	8.15 $\pm$ 1.13
n $^\circ$ células	30	156	13	24	4	4

A Figura 4.5 ilustra a morfologia das células F-11 nos meios de manutenção e diferenciação seleccionados: 10% FBS, 1% FBS e 2 $\mu$ M RA (as últimas duas em dias de diferenciação diferentes).

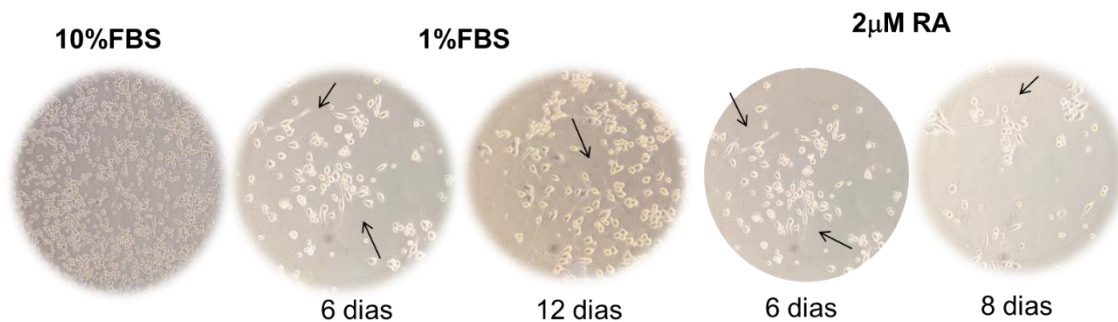


Figura 4.5 Visualização das células F-11 ao microscópio nas 3 condições selecionadas para o estudo da implementação de F-11 como modelo celular complementar do estudo da dor.

Nas células F-11 diferenciadas em 1% FBS, observa-se o aparecimento de processos celulares (neurites, indicadas com setas na Figura 4.5) a partir do sexto dia de diferenciação. Ao décimo segundo dia, assiste-se a um maior número de células com estes processos desenvolvidos, aumentando o contacto celular entre elas. No caso da diferenciação em 2µM RA, nota-se que o período de diferenciação das células é forçosamente menor, sendo que o aparecimento de processos celulares acontece mais cedo (dados não mostrados) e a viabilidade celular diminui drasticamente a partir dos 8 dias de diferenciação. Constatou-se que as células F-11 apresentam melhores condições de integridade membranar quando utilizadas aos 12 dias e 6 dias de diferenciação, para os meios 1% FBS e 2µM RA, respetivamente.

## 4.2. Whole-cell Voltage-clamp

Para se estudar o perfil das correntes iónicas nas 3 condições selecionadas, recorreu-se à técnica de *voltage-clamp* que permite registar o fluxo transmembranar de iões através dos poros dos canais iónicos a diferentes voltagens de membrana controladas pelo operador. Assim, através de um controlo rigoroso da composição das soluções externa e interna é possível estudar-se as correntes iónicas de interesse ( $I_K$ ,  $I_{Na}$ ,  $I_{Ca}$ ) numa gama variada de potenciais de membrana. De seguida apresentam-se os resultados relativos à ativação e inativação das correntes  $I_K$  e  $I_{Na}$  em células F-11, com recurso a diferentes protocolos de voltagem. De notar que não foi possível registar  $I_{Ca}$  nas condições estudadas, tendo-se confirmado o perfil destas correntes num neurónio de DRG isolado de rato.

## 4.2.1. Canais de K<sup>+</sup> ativados por voltagem

### Ativação de I<sub>K</sub>

A Figura 4.6 ilustra o perfil das I<sub>K</sub> registadas nas células F-11 não diferenciadas (10% FBS) e células F-11 diferenciadas (1% FBS), ativadas por um protocolo de voltagem que permite evocar o fluxo de K<sup>+</sup> do meio intracelular para o meio extracelular. Estas correntes positivas (‘para o exterior da célula’) de K<sup>+</sup> têm uma cinética semelhante à registada por outros autores (11,37-38), com uma grande expressão de correntes com uma inativação lenta, típicas de uma gama de canais de K<sup>+</sup> ativados por voltagem denominados *delayed rectifier* (18,21).

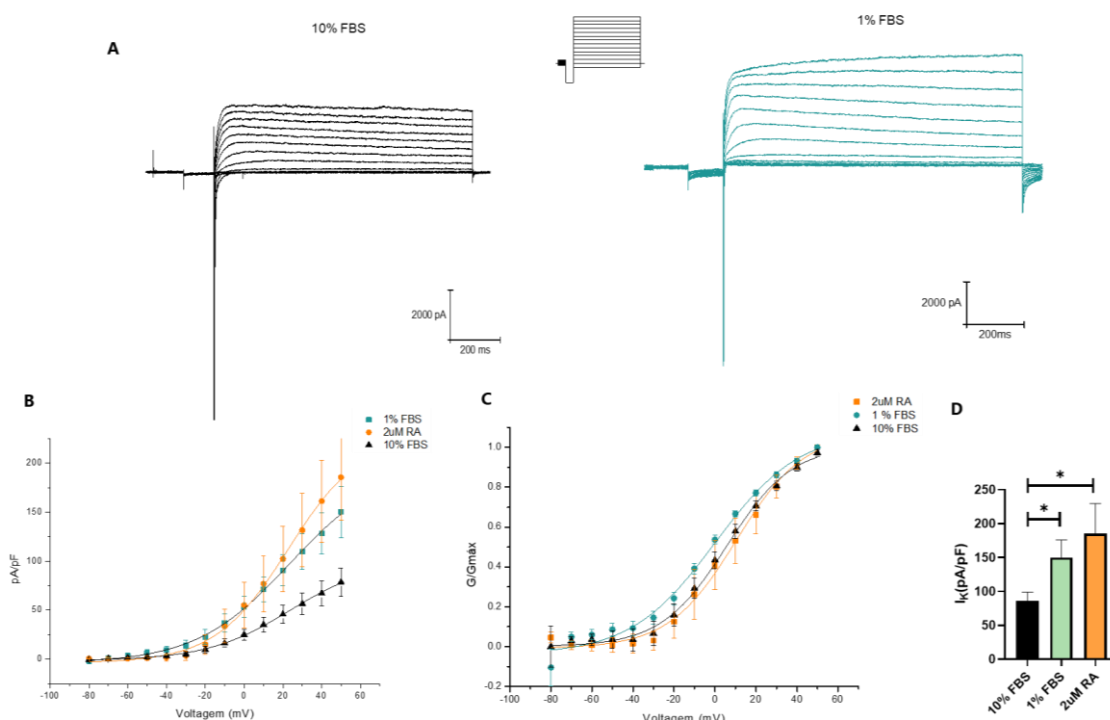


Figura 4.6- Perfil da ativação das I<sub>K</sub> registadas com recurso à técnica de *whole-cell voltage-clamp*. Comparação entre células F-11 não diferenciadas (10% FBS) e diferenciadas (1% FBS e 2µM RA).

Comparando os traços de corrente das células 10% FBS e 1% FBS observa-se um aumento da amplitude das correntes lentas de K<sup>+</sup>, nesta última condição. Esta diferença é estatisticamente significativa para uma voltagem de membrana de 50mV

( $78.62 \pm 14.42$  e  $150.05 \pm 25.97$ , para 10% FBS  $n=21$  e 1% FBS  $n=20$ , respetivamente, com  $0.01 < p \text{ value} < 0.05$ ). Esta diferença é igualmente observada nas células 2% FBS+2 $\mu$ M RA ( $78.62 \pm 14.42$  e  $185.59 \pm 44.18$ , para 10% FBS  $n=21$  e 2 $\mu$ M RA  $n=4$ , respetivamente, com  $0.01 < p \text{ value} < 0.05$ ) (Figura 4.6. **D**) Apesar desta diferença registada nas densidades de corrente, a dependência da ativação à voltagem de membrana não sofre alterações entre as condições analisadas (Figura 4.6 **C**), dado que as curvas de ativação estão praticamente sobreponíveis. Por outras palavras, as Figuras 4.6 **B** e **D**, denotam um aumento da expressão de canais de  $K^+$  após a diferenciação das células F-11 enquanto a Figura 4.6 **C** sugere que estas células F-11 expressam populações de canais com o mesmo perfil de ativação independentemente do estado de diferenciação. Esta última observação encontra-se espelhada na análise quantitativa dos parâmetros  $V_h$  e  $V_s$  (Tabela 4.4) calculados a partir do assentamento, por via de uma função de Boltzmann (ver Anexo 1 para mais detalhes), dos pontos do gráfico **C** da Figura 4.6.

Tabela 4.4 - Parâmetros da curva de ativação dos canais de  $K^+$ -  $V_h$  e  $V_s$  obtidos através do assentamento dos pontos da curva de ativação.

Meio de cultura	$V_h$ (mV)	$V_s$ (mV/e-fold)	N
10% FBS	$3.99 \pm 1.42$	$14.87 \pm 1.73$	21
1% FBS	$1.19 \pm 2.08$	$18.26 \pm 1.70$	20
2 $\mu$ M RA	$10.06 \pm 6.69$	$13.36 \pm 1.73$	3

O parâmetro  $V_h$  indica a voltagem da membrana à qual 50% dos canais de  $K^+$  estão ativos. O parâmetro  $V_s$  é, em termos matemáticos, o declive do assentamento dado pela função de Boltzmann, pelo que reporta a sensibilidade da ativação dos canais à variação da voltagem da membrana. Desta feita, a semelhança registada para os parâmetros  $V_h$  e  $V_s$  sugerem que as populações de canais presentes na superfície das membranas das células F-11 não diferenciadas e diferenciadas partilham padrões de ativação semelhantes.

#### Inativação das $I_K$

A dependência da inativação das  $I_K$  à voltagem foi estudada com recurso a um clássico protocolo de voltagem com dois pulsos (25) (Figura 4.7 A). O primeiro pulso serve para inativar as  $I_K$  dependentes da voltagem, sendo o segundo utilizado para quantificar a fração de canais que não inativaram na duração do primeiro pulso.

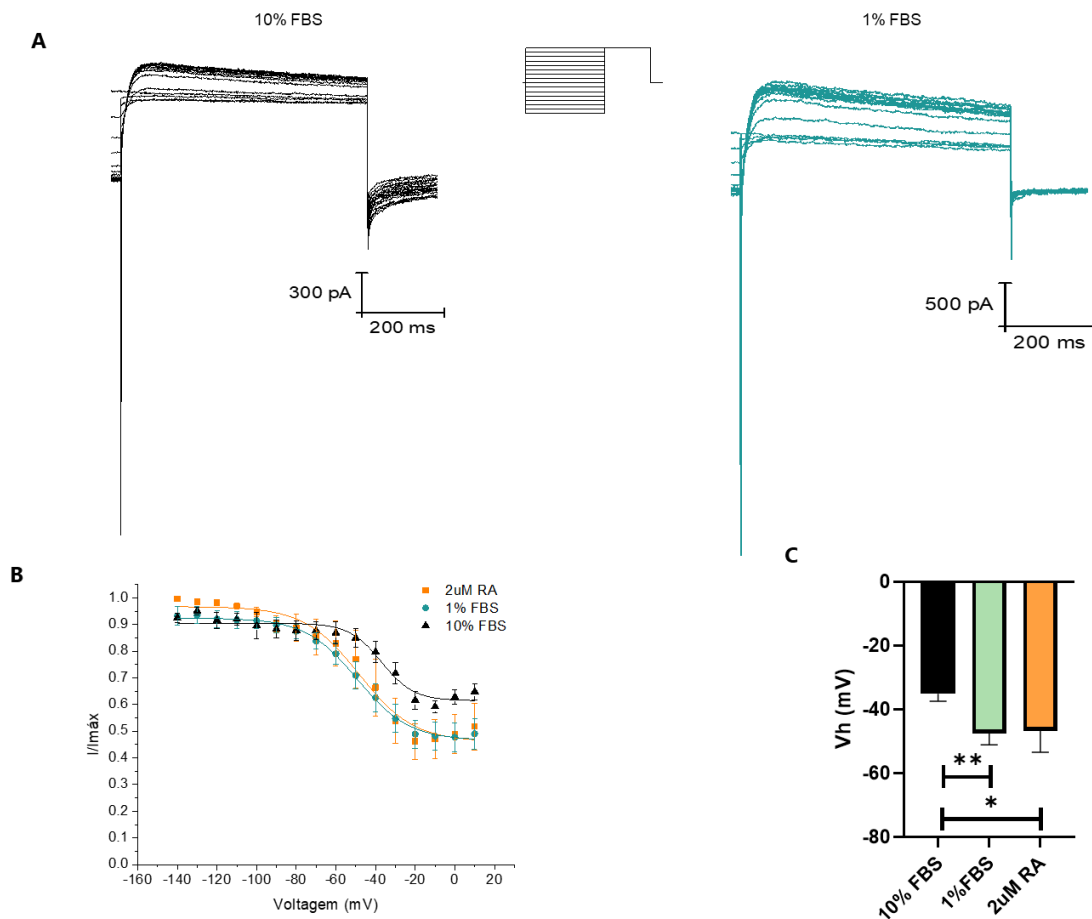


Figura 4.7- Perfil da inativação das  $I_K$  registadas em células F-11 com recurso à técnica de *whole-cell voltage-clamp*. Comparação entre células F-11 não diferenciadas (10% FBS) e diferenciadas (1% FBS e 2µM RA).

A Figura 4.7 A ilustra o perfil de inativação lenta das  $I_K$  das células F-11, o que está de acordo com os resultados das correntes de ativação acima apresentados e com o descrito na literatura (11). De notar que os traços de corrente apresentado apenas se referem ao segundo pulso do protocolo de voltagem. As curvas de inativação apresentadas na Figura 4.7 B ( $I/I_{max}$ , calculado através da normalização das amplitudes de corrente medidas no início do segundo pulso para o valor máximo de

amplitude, em função das voltagens de membrana do primeiro pulso) são condizentes com uma expressão de canais de  $K^+$  com uma inativação lenta, na medida em que as  $I_K$  das células F-11 de todas as condições analisadas não inativaram completamente. Por exemplo, a uma voltagem de membrana de 10mV, e para a condição 10% FBS, assiste-se a uma inativação de cerca de 40% dos canais existentes na membrana das células F-11, enquanto para as condições diferenciadas 1% FBS e 2 $\mu$ M RA se observa uma inativação ligeiramente maior, na ordem dos 50% dos canais de  $K^+$ . A sobreposição das curvas de inativação das duas condições de diferenciação contrasta com o desvio verificado na curva de inativação das células F-11 não diferenciadas (Figura 4.7 B). A magnitude deste desvio foi quantificada com recurso ao valor de  $V_h$  – potencial de membrana ao qual 50% dos canais se encontram inativos -, calculado através do assentamento dos dados experimentais com uma função de Boltzmann. A diferença da média dos valores de  $V_h$  verificada na Figura 4.7C (e tabela 4.5) é estatisticamente significativa entre 10% FBS e 1% FBS ( $0.001 < p < 0.01$ ) e entre 10% FBS e 2 $\mu$ M RA ( $0.01 < p < 0.05$ ). Estes resultados sugerem que a diferenciação das células F-11 promovem uma alteração no padrão de expressão de canais de  $K^+$  presentes na membrana plasmática: as células F-11 parecem expressar uma população de canais de  $K^+$  com uma inativação maioritariamente mais lenta quando comparada com a população de canais encontrada nas células F-11 diferenciadas.

Os valores dos parâmetros da dependência da inativação das  $I_K$  à voltagem da membrana –  $V_h$  e  $V_s$  - estão apresentados na Tabela 4.5. À semelhança do descrito na ativação das  $I_K$ , estes valores são calculados por via do assentamento dos pontos das curvas de inativação por uma função de Boltzmann.

Tabela 4.5 - Parâmetros da curva de inativação dos canais de  $K^+$ -  $V_h$  e  $V_s$  obtidos através do assentamento dos pontos da curva de inativação.

Meios de Cultura	$V_h$ (mV)	$V_s$ (mV/e-fold)	N
10% FBS	-35.11 $\pm$ 2.31	6.91 $\pm$ 0.89	15
1% FBS	-47.54 $\pm$ 3.55	11.62 $\pm$ 1.81	17
2 $\mu$ M RA	-46.67 $\pm$ 6.75	7.83 $\pm$ 2.20	5

## Confirmação farmacológica das $I_K$ nas células F-11

Para confirmar o tipo de canais de  $K^+$  expressos nas células F-11, foram registadas  $I_K$  sob o efeito de um bloqueador das  $I_K$  - TEA-Cl (a uma concentração de 2mM) -, descrito na literatura como específico para um tipo de canais de  $K^+$  denominado *delayed rectifiers*, com uma cinética de inativação lenta (19,20,38) (Figura 4.8).

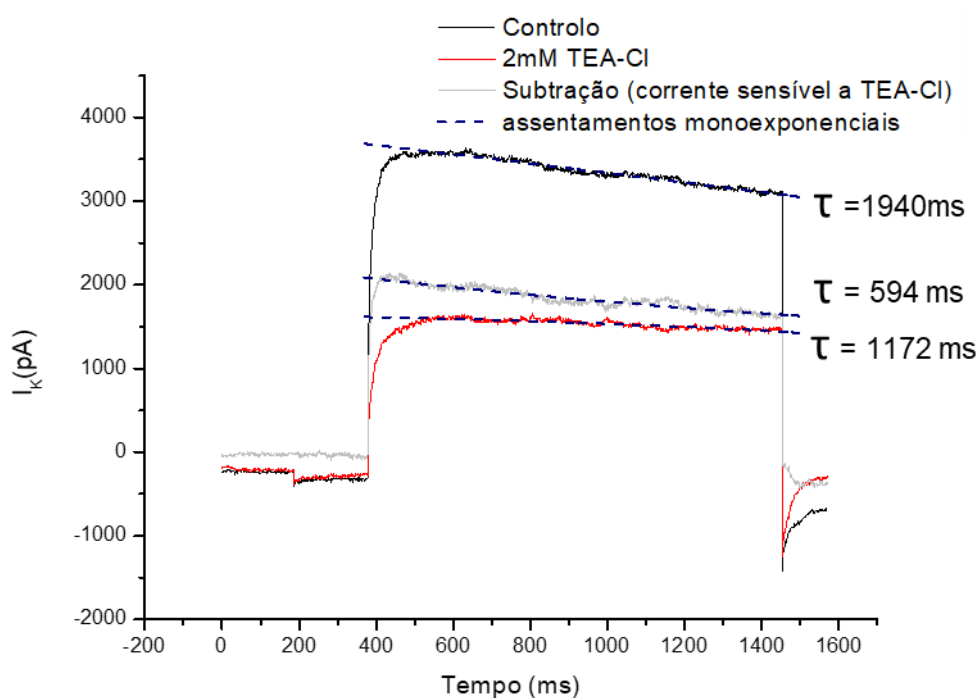


Figura 4.8- Efeito de um bloqueador de canais de  $K^+$  TEA-Cl nas  $I_K$  registada em células F-11 diferenciadas num meio com 1% FBS.

Após a adição do bloqueador TEA-Cl, observou-se uma diminuição da amplitude da  $I_K$ . A subtração do traço de corrente antes (controlo, traço preto Figura 4.8) e depois (TEA-Cl, traço vermelho Figura 4.8) da aplicação de TEA-Cl permite obter a corrente sensível à ação deste fármaco (traço cinzento, Figura 4.8). O assentamento monoexponencial do perfil de inativação destes traços de  $I_K$  permite quantificar a cinética de inativação ( $\tau$ (ms)) dos mesmos, sendo que a corrente sensível a TEA-Cl é a que regista um valor de tau menos lento. Confirma-se, então, a presença de uma população de canais de  $K^+$ , sensíveis à ação do bloqueador TEA-Cl ( $\tau \sim 594$ ms), com uma inativação lenta (canais de  $K^+$  *delayed rectifier*), e igualmente de outro grupo de

canais de  $K^+$ , não sensíveis à ação de TEA-Cl ( $\tau \sim 1172\text{ms}$ ), com uma inativação ainda mais lenta, ou, inclusivamente, não inativante (por exemplo, canais de  $K^+$  *slowed delayed rectifier* ( $I_{Ks}$ ) e/ou *M-currents* ( $I_{KM}$ )). As correntes M estão associadas ao processo de fisiopatologia da dor, tendo sido identificadas por outros autores em células F-11 (11-12).

### Comparação das $I_K$ registadas em células F-11 e em neurónios DRG

Durante a execução do plano de atividades do estágio identificou-se a necessidade de validar os registos eletrofisiológicos obtidos com as células F-11 por comparação com os obtidos em neurónios DRG isolados de rato, modelo tradicionalmente usado em estudos de dor. O objetivo desta atividade extra (não contemplada no plano inicial do estágio) era entender as semelhanças de expressão de correntes entre as células F-11 e os neurónios DRG e, assim, focar a aplicabilidade das células F-11 no estudo desse tipo de correntes (Figura 4.9).

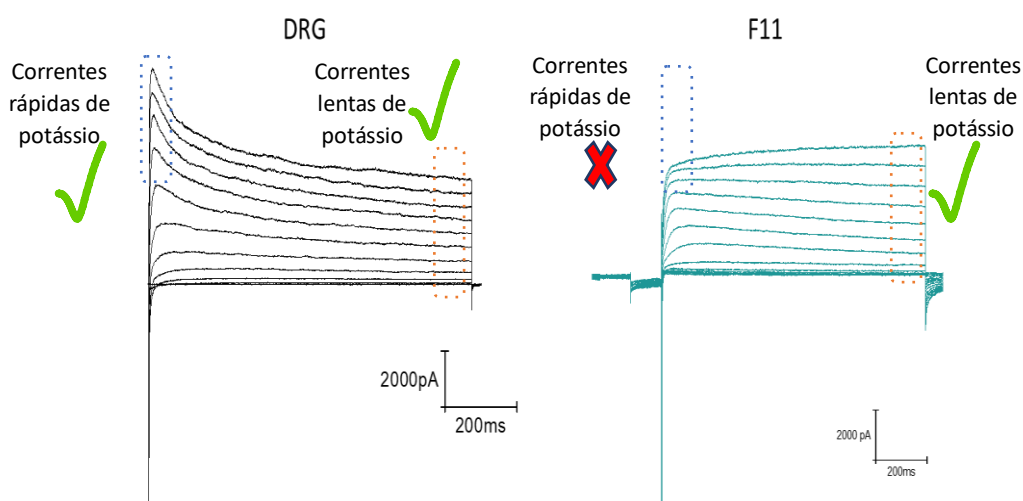


Figura 4.9- Comparação de correntes totais de  $K^+$  registadas em neurónio DRG de rato e em células F-11 diferenciadas com 1% FBS.

As  $I_K$  evocadas por um protocolo de voltagem de ativação (o mesmo utilizado nos traços de corrente da Figura 4.6 A), registadas em um neurónio DRG e uma célula F-11 diferenciada em 1% FBS, permitem concluir que ambos expressam correntes lentas

de  $K^+$ , pelo que a implementação das células F-11 em estudos de dor deverá focar-se nestas correntes. O próximo passo será identificar as entidades moleculares responsáveis pela modulação deste tipo de  $I_K$  lentas. Por outro lado, conclui-se que as células F-11 não expressam  $I_K$  rápidas, constituindo uma clara diferença relativamente ao neurónio DRG. Note-se que o traço da corrente apresentado para o neurónio DRG é representativo das  $I_K$  registadas em um conjunto de 13 neurónios isolados de rato.

#### 4.2.2. Canais de $Na^+$ ativados por voltagem

##### Ativação $I_{Na}$

A Figura 4.10 retrata o perfil representativo das  $I_{Na}$  registadas nas células F-11 não diferenciadas (10% FBS) e células F-11 diferenciadas ( $2\mu M$  RA), ativadas por um protocolo de voltagem de ativação que permite evocar o fluxo de  $Na^+$  do meio extracelular para o meio intracelular. Estas correntes negativas (para o interior da célula) de  $Na^+$  têm uma cinética semelhante à registada por outros autores (11,37-38), com uma grande expressão de correntes com uma inativação rápida típicas de uma gama de canais de  $Na^+$  sensíveis à ação do fármaco TTX (tetrodotoxina), denominados TTX-s (39).

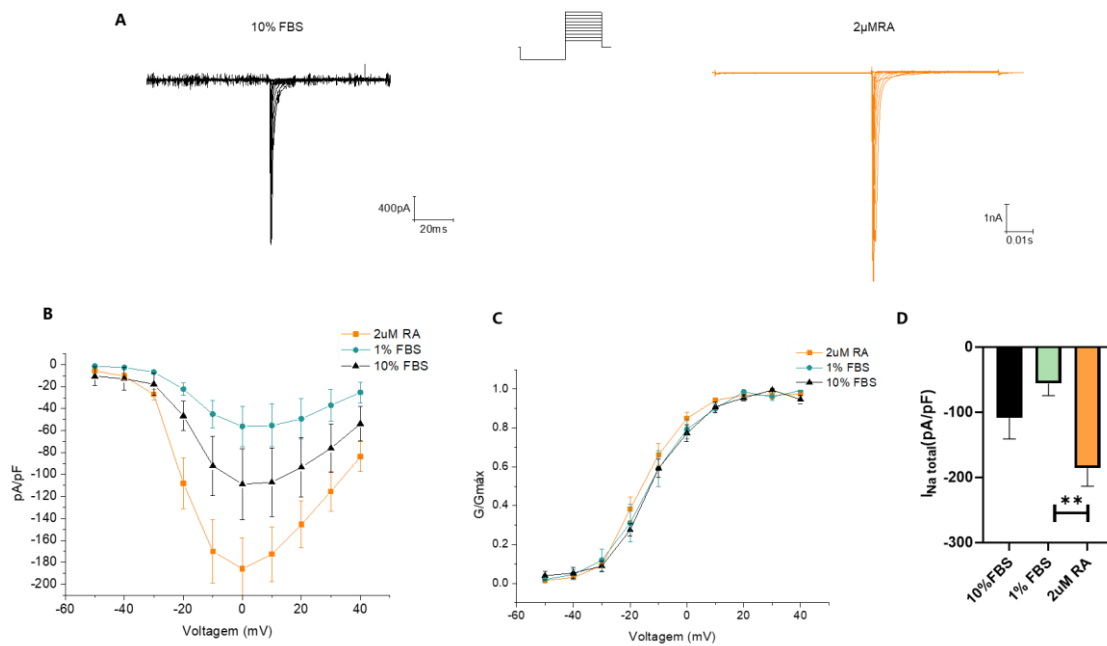


Figura 4.10- Perfil da ativação das  $I_{Na}$  registadas em células F-11 com recurso à técnica de *whole-cell voltage-clamp*. Comparação entre células F-11 não diferenciadas (10% FBS) e diferenciadas (1% FBS e 2µM RA).

Comparando os traços de corrente das células 10% FBS e 2µM RA (Figura 4.10 A) observa-se um aumento da amplitude do pico das  $I_{Na}$ , nesta última condição. No entanto, regista-se igualmente uma diminuição da amplitude das correntes quando se utiliza 1% FBS no processo de diferenciação das células F-11, quando comparado com os valores observados para as células não diferenciadas. A diferença da amplitude das  $I_{Na}$  entre os meios de diferenciação é, inclusivamente, estatisticamente significativa para uma voltagem de membrana de 0mV ( $-50.56 \pm 18.38$  e  $-173.9 \pm 27.87$ , para 1% FBS (n=4) e 2µM RA (n=14) respetivamente, com  $0.001 < p < 0.01$ ) (Figura 4.10 D). Apesar desta diferença registada nas densidades de corrente, a dependência da ativação à voltagem de membrana não sofre alterações entre as condições analisadas (Figura 4.10 C), dado que as curvas de ativação estão praticamente sobreponíveis, sugerindo que as células F-11 expressam populações de canais com o mesmo perfil de ativação independentemente do estado de diferenciação. Esta última observação é sustentada na semelhança verificada na análise quantitativa dos parâmetros  $V_h$  e  $V_s$  (Tabela 4.6), calculados a partir do assentamento, por via de uma função de Boltzmann, dos pontos da Figura 4.10 C.

Tabela 4.6 - Parâmetros da curva de ativação dos canais de Na<sup>+</sup>- V<sub>h</sub> e V<sub>s</sub> obtidos através do assentamento dos pontos da curva de ativação.

Meios de Cultura	V <sub>h</sub> (mV)	V <sub>s</sub> (mV/e-fold)	N
10% FBS	-11.67 ±1.98	7.27 ±0.57	7
1% FBS	-13.88 ±3.75	8.03 ±1.20	5
2 μM RA	-15.40 ±1.90	5.95 ±0.41	14

### Inativação I<sub>Na</sub>

A dependência da inativação das I<sub>Na</sub> à voltagem foi estudada com recurso a um clássico protocolo de voltagem com dois pulsos (25) (Figura 4.11 A), tal como descrito nos resultados referentes às I<sub>K</sub>.

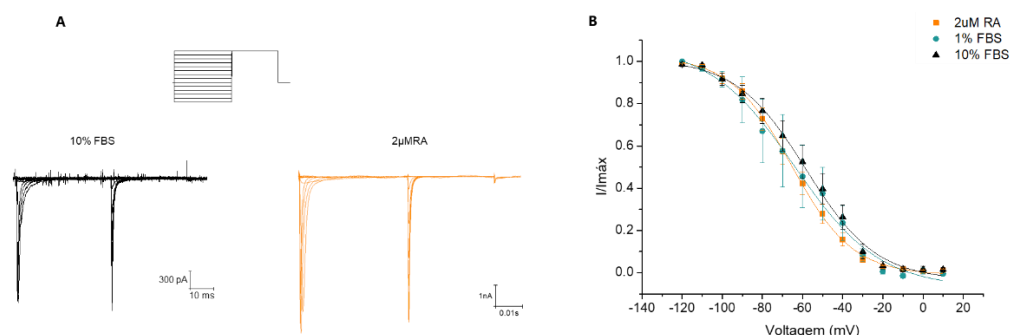


Figura 4.11- Perfil da inativação das I<sub>Na</sub> registadas em células F-11 com recurso à técnica de *whole-cell voltage-clamp*. Comparação entre células F-11 não diferenciadas (10% FBS) e diferenciadas (1% FBS e 2μM RA)

A Figura 4.11 demonstra que a inativação dos canais de Na<sup>+</sup> não sofreu alterações no processo de diferenciação das células F-11, como evidencia a sobreposição dos pontos que constituem as curvas de inativação das I<sub>Na</sub> (Figura 4.11 B). Com efeito, os parâmetros descritivos do assentamento das curvas de inativação das I<sub>Na</sub> - V<sub>h</sub> e V<sub>s</sub> - calculados para todas as condições estudadas (Tabela 4.7) apresentam valores muito semelhantes, corroborando o efeito sobreponível que se destaca na Figura 4.11 B.

Tabela 4.7 - Parâmetros da curva de inativação dos canais de Na<sup>+</sup>- V<sub>h</sub> e V<sub>s</sub> obtidos através do assentamento dos pontos da curva de inativação

Meio de cultura	V <sub>h fast</sub> (mV)	V <sub>s fast</sub> (mV/e-fold)	V <sub>h slow</sub> (mV)	V <sub>s slow</sub> (mV/e-fold)	N	V <sub>h</sub> (mV)	V <sub>s</sub> (mV/e-fold)	N
10% FBS	-69.93 ±4.93	11.92 ±1.42	-43.41 ±3.83	7.26 ±0.87	7	-77.00	19.17	1
1% FBS	-60.07 ±8.45	14.60 ±3.03	-41.08 ±1.68	7.03 ±0.69	3	-90.04	7.75	1
2μM RA	-64.41 ±7.04	11.43 ±1.06	-42.61 ±4.86	6.63 ±0.61	12	-74.06 ±7.55	10.17 ±0.50	2

### Comparação das I<sub>Na</sub> registadas em células F-11 e em neurónios DRG

À semelhança do concretizado para as I<sub>K</sub> validou-se os registos eletrofisiológicos obtidos com as células F-11 por comparação com os obtidos em neurónios DRG isolados de rato (Figura 4.12). De igual forma, o objetivo desta análise era entender as semelhanças de expressão de correntes entre as células F-11 e os neurónios DRG e, assim, focar a aplicabilidade das células F-11 no estudo desse tipo de correntes.

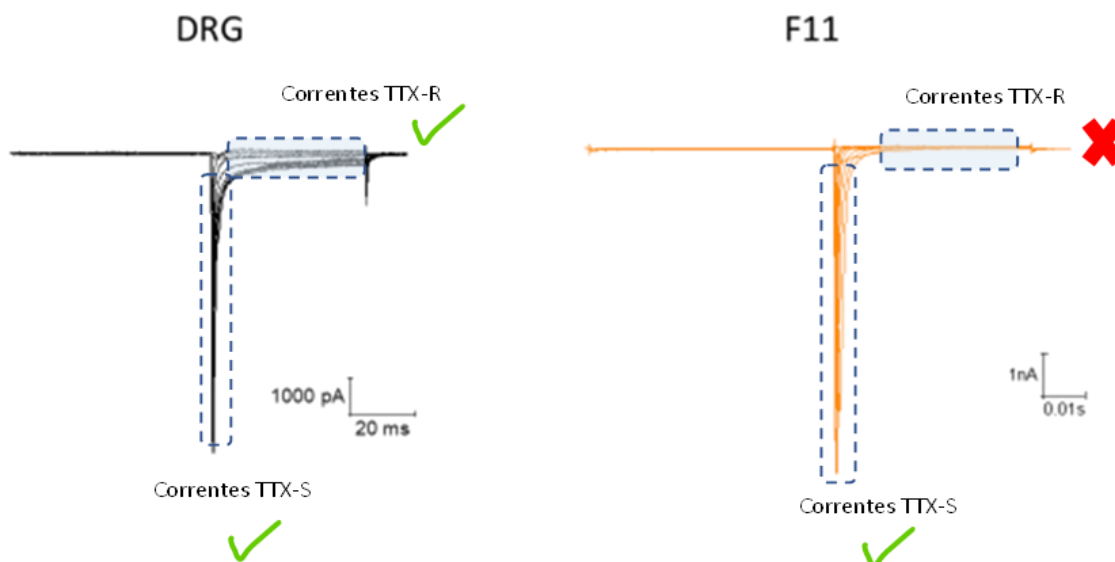


Figura 4.12- Ilustração de correntes totais de Na<sup>+</sup> registadas em neurónio DRG de rato e em células F-11 diferenciadas com 2μM RA.

As I<sub>Na</sub> evocadas por um protocolo de voltagem de ativação (o mesmo utilizado nos traços de corrente da Figura 4.10 A), registadas em um neurónio DRG e uma célula F-11 diferenciada em 2μM RA, permitem concluir que ambas as células expressam

correntes transientes de  $\text{Na}^+$  com uma cinética de inativação muito rápida, comumente associadas à expressão de um tipo de canais de  $\text{Na}^+$  sensíveis à ação do fármaco TTX, denominados TTX-S. Assim, se conclui que a implementação das células F-11 em estudos de dor deverá focar-se nestas correntes. Por outro lado, conclui-se que as células F-11 carecem da expressão de  $I_{\text{Na}}$  com uma cinética de inativação mais lenta, normalmente associados a um tipo de canais resistentes à ação de TTX, designados por TTX-R. Importa referir que os traços das  $I_{\text{Na}}$  relativas ao neurónio DRG são representativos de um conjunto de 9 células isoladas de rato.

### 4.2.3. Canais de $\text{Ca}^{2+}$ ativados por voltagem

No decorrer das atividades do estágio tentou-se registar  $I_{\text{Ca}}$  a partir de células F-11. No entanto, e apesar dos esforços de otimização destes registos (testagem de várias soluções de eletrofisiologia, com diversas composições iónicas e salinas), não foi possível registar  $I_{\text{Ca}}$  em células F-11 nas várias condições de diferenciação utilizadas (10% FBS (n=5), 1% FBS (n=4) e  $2\mu\text{M}$  RA (n=7)). Assim, com o intuito de validar a constituição das soluções de eletrofisiologia, por um lado, e perceber o tipo de correntes associadas ao fluxo transmembranar de  $\text{Ca}^{2+}$ , por outro, optou-se por registar as  $I_{\text{Ca}}$  em neurónios DRG isolados de rato (Figura 4.13).

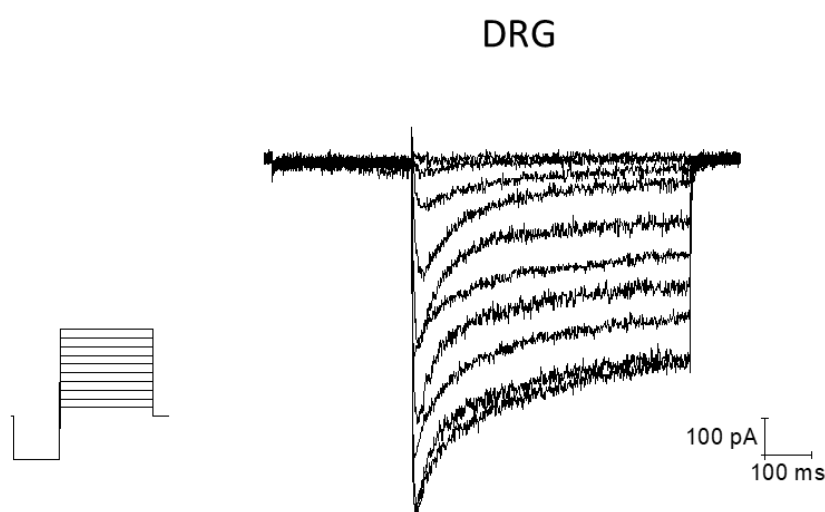


Figura 4.13- Correntes totais de  $\text{Ca}^{2+}$  registadas em neurónio DRG isolado de rato.

As correntes totais de  $\text{Ca}^{2+}$  foram ativadas por um protocolo de voltagem que permitiu a abertura dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  e conseqüente entrada dos iões  $\text{Ca}^{2+}$  para o interior da célula. Estas correntes negativas ('para o interior da célula') apresentam uma cinética

de inativação mais lenta que o Na<sup>+</sup>, sendo, no caso da Figura 4.13, notória a existência de correntes não inativantes.

### 4.3. Whole-cell current-clamp

Para se estudar a atividade neuronal das células F-11 nas 3 condições selecionadas, recorreu-se à técnica de *current-clamp* que permite registar a variação da voltagem de membrana de uma célula excitável a diferentes amplitudes de corrente controladas pelo operador. Assim, através de um controlo rigoroso da composição das soluções externa e interna é possível estudar-se os AP numa gama variada de pulsos de corrente.

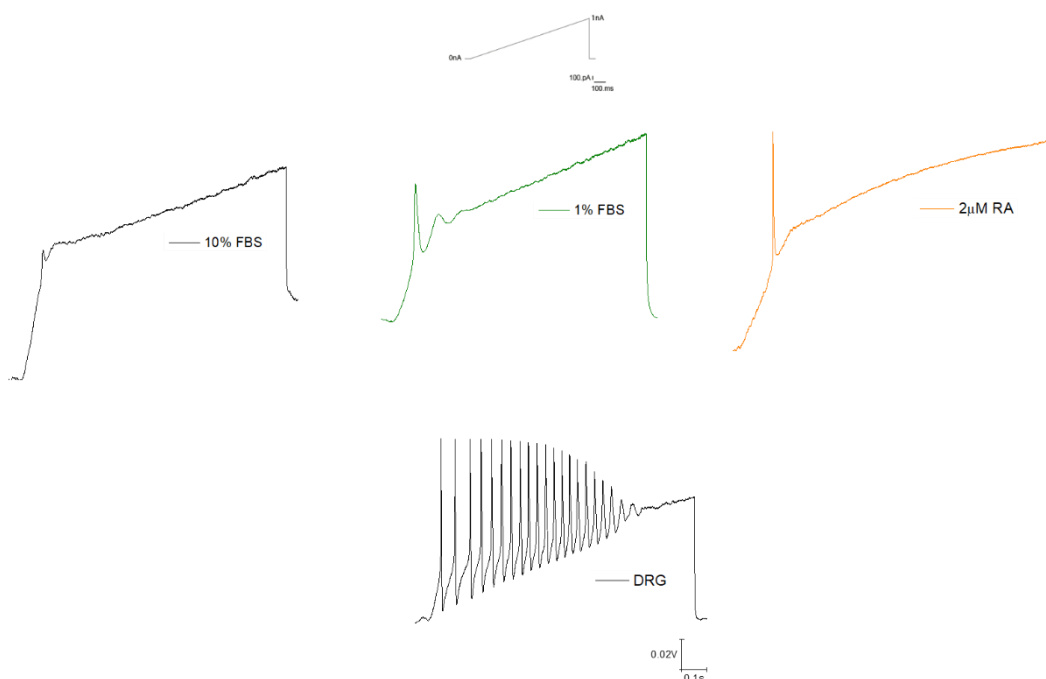


Figura 4.14 - AP registados em células F-11 e neurónio de DRG com recurso à técnica de *whole-cell current-clamp*. Comparação do padrão de disparo de AP entre as células.

A Figura 4.14 ilustra disparos de AP induzidos por uma rampa de corrente que permite varrer uma gama extensa de amplitudes, desde 0pA a 1nA. A célula F-11 em 10% FBS (não diferenciada) não foi capaz de disparar AP, enquanto as células F-11 diferenciadas (em ambas as condições de diferenciação) conseguiram disparar um AP no início do protocolo aplicado. Por sua vez, o neurónio DRG apresenta um padrão de disparo contínuo de AP, com uma característica diminuição da amplitude dos AP ao

longo do tempo. No que concerne às células F-11, estes resultados são representativos de um conjunto de 4 células 10% FBS, 4 células 1% FBS e 3 células 2 $\mu$ M RA. Relativamente ao resultado apresentado para o neurónio DRG, este é representativo de um conjunto de resultados obtido de 9 células DRG.

#### **4.4. *Western-Blotting***

Após o estudo do perfil eletrofisiológico das correntes iónicas expressas nas células F-11 não diferenciadas e diferenciadas, seguiu-se o estudo do perfil bioquímico das mesmas, através da identificação e quantificação das entidades moleculares responsáveis pelas perfis cinéticos das correntes acima apresentadas, recorrendo à técnica de *western-blotting*. A identificação das proteínas (canais iónicos) de interesse foi conseguida através da ligação específica de anticorpos a essas proteínas (ver secção de materiais e métodos, Tabela 3.2). Os resultados a seguir apresentados reportam, assim, a presença e a quantificação relativa de alguns canais iónicos com um papel importante no mecanismo neurofisiológico da dor. Contudo, importa referir que o reduzido tamanho da amostra dado que os resultados experimentais se referem apenas a uma amostra de proteínas extraídas de cada uma das condições de células F-11.

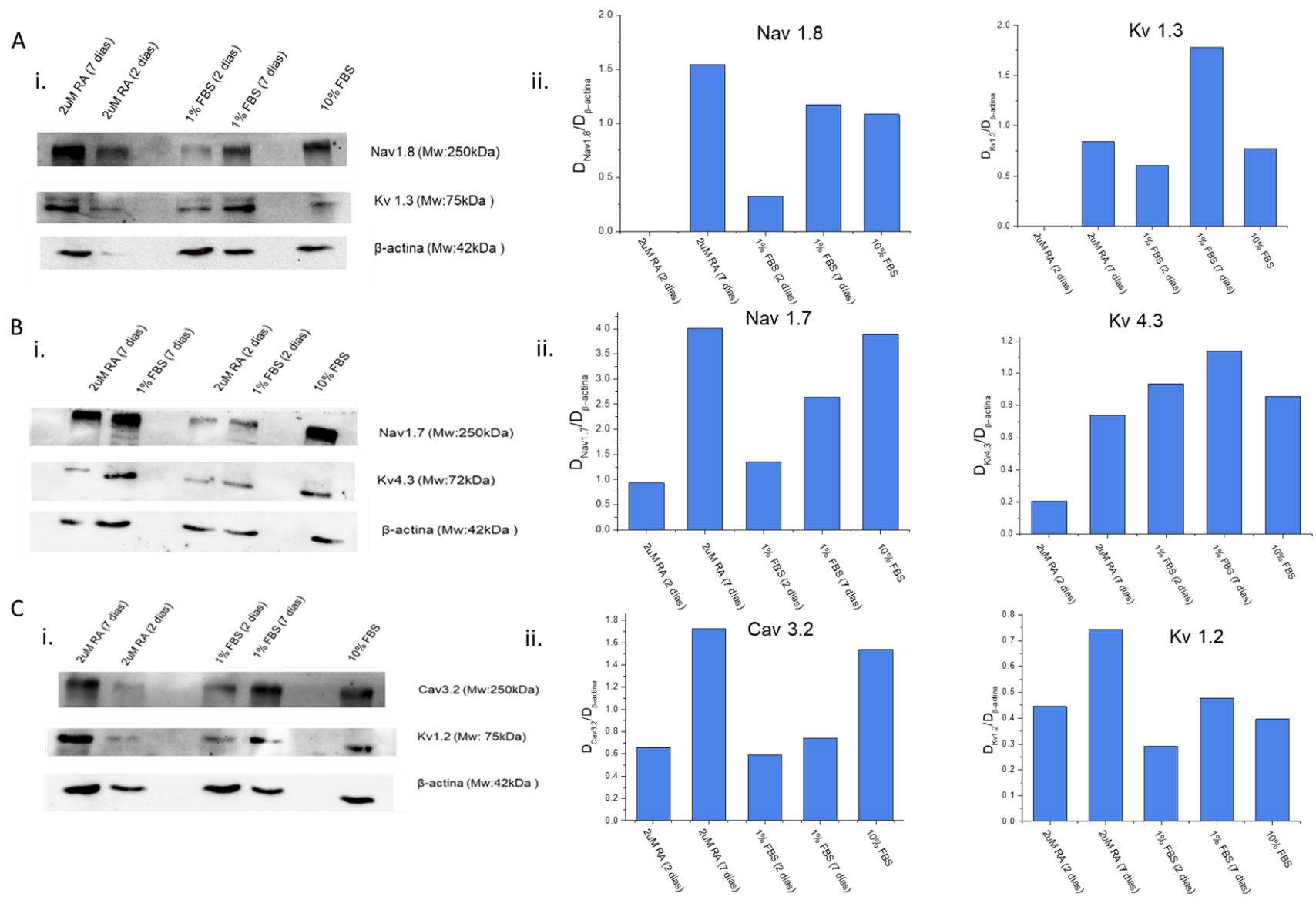


Figura 4.15-Estudo da expressão de canais iónicos em células F11 não diferenciadas (10% FBS) e diferenciadas (1% FBS e 2 $\mu$ M RA) (Ai, Bi, Ci). Quantificação da expressão em função do loading control ( $\beta$ -actina) (Aii, Bii, Cii)

A Figura 4.15 ilustra a expressão de vários canais iónicos dependentes da voltagem do lisado total de células F-11 não diferenciadas e diferenciadas (neste caso, estudou-se a expressão dos canais ao segundo e sétimo dias de diferenciação). A quantificação das bandas foi calculada por densitometria, em que a intensidade do sinal, forte ou fraco, indica a presença da proteína de interesse na amostra. Esta quantificação é sempre normalizada para a presença de  $\beta$ -actina, uma proteína ubíqua, e altamente conservada entre todos os organismos eucariotas. Por essa razão, a  $\beta$ -actina é tradicionalmente utilizada como o *loading control* em experiências de *western-blotting*.

Relativamente aos canais de  $\text{Na}^+$ , dois tipos de canais foram analisados – Nav1.7 e Nav1.8 -, com um papel preponderante no desenvolvimento dos processos biológicos de dor. Nas membranas de *western-blotting* apresentadas, observa-se que Nav1.8 tem um aumento de expressão na condição  $2\mu\text{M}$  RA (7 dias). Por sua vez, em comparação com a condição não diferenciada (10% FBS), o canal Nav1.7 não varia a sua expressão em condições  $2\mu\text{M}$  RA (7 dias). No entanto, em condições 1% FBS (7 dias), Nav1.7 tem uma redução dos seus níveis proteicos. Coincidentemente, a expressão de ambos os canais sofre uma diminuição ao segundo dia de diferenciação, independentemente do protocolo utilizado. No que respeita à presença de canais de  $\text{K}^+$ , Kv1.2 e Kv1.3 estão sobre expressos no sétimo dia de diferenciação das células F-11, tanto em 1% FBS, como em  $2\mu\text{M}$  RA. Por sua vez, a quantificação da proteína Kv4.3 apresenta valores semelhantes entre as células não diferenciadas em diferenciadas com 1% FBS, e uma redução dos níveis de expressão quando a diferenciação é induzida por  $2\mu\text{M}$  RA. Por fim, a presença de um canal específico de  $\text{Ca}^{2+}$  – Cav3.2 – foi analisado, sendo que os resultados sugerem uma semelhança na expressão deste canal entre as células não diferenciadas e diferenciadas, com uma notória redução dos níveis de Cav3.2 ao segundo dia de diferenciação, em ambas as condições experimentais (1% FBS e  $2\mu\text{M}$  RA).

## 5. Discussão dos Resultados

O presente relatório tem como objetivo principal avaliar a aplicabilidade das células F-11, um hibridoma de neuroblastoma de ratinho, com DRG de embrião de rato, na investigação científica no âmbito da dor. Os resultados confirmam que as células F-11 podem servir como uma plataforma de *drug screening*, na procura de novas terapêuticas para o tratamento da dor.

### Otimização da cultura células F-11 e seleção meios para eletrofisiologia

Dada a dificuldade associada em se desenvolver linhas celulares imortalizadas de DRG, as células F-11 surgem, em alternativa, como um excelente substrato celular, pois as características celulares, essencialmente conferidas pelo DNA do DRG de embrião de rato, garantem propriedades funcionais de um neurónio de DRG, importantes para a utilização das células F-11 no âmbito de estudos da dor (10,13,14-15,40-44). Desde o trabalho original com esta linha celular (45-46) muitos estudos têm sido desenvolvidos para avaliar a influência dos meios de cultura na diferenciação das células. Uma breve pesquisa na literatura permite concluir que não existe informação sobre o(s) melhor(es) meio(s) de manutenção e de diferenciação das células F-11, tal a diversidade de aplicações deste modelo celular (13-14,40,47). Assim, a seleção do(s) melhor(es) meio(s) de cultura varia(m), consoante o objetivo experimental. No contexto específico do presente relatório, há uma dispersão de informação sobre a composição dos meios de cultura, pelo que, com o objetivo de implementar as células F-11 como um modelo celular viável, teve de se proceder a um estudo exaustivo de otimização das condições de cultura e manutenção. Integrando a informação recolhida de vários autores, foram utilizados, na etapa da otimização da cultura das células F-11, 4 meios de crescimento e manutenção das células e 6 meios de diferenciação, suplementados com diferentes fatores de diferenciação, a diferentes concentrações, num total de 379 células analisadas. A primeira fase desta otimização foi escolher as condições de cultura que oferecessem garantias de bons registos de eletrofisiologia, através da técnica *whole-cell patch-clamp*. Para tal, recorreu-se a parâmetros importantes em eletrofisiologia, como o *holding current*,  $I_h$  (pA), e capacitância da membrana das células,  $W_c$  (pF), cujos valores funcionam como indicadores de qualidade e fiabilidade das experiências de eletrofisiologia (27-29,31,33,36).

A seleção dos melhores meios de cultura (meio de crescimento '10% FBS' e dois meios de diferenciação '1% FBS' e '2 $\mu$ M RA') foi, então, efetuada tendo por base os valores de  $I_h$  e  $W_c$  e a relação entre eles. Os gráficos da correlação entre  $I_h$  e  $W_c$  permitiram realçar um agrupamento de dados experimentais (ver Figuras 4.2 **A** e **D** e Figura 4.4 **B**), útil para a identificação de uma gama de tamanho de células ótima, que oferece maiores probabilidades de se obter registos de eletrofisiologia de elevada qualidade. Por outras palavras, verificou-se que células F-11 com valores de  $W_c$  entre 10pF e 15pF apresentam valores de  $I_h$  mais reduzidos, ou seja, melhores condições para o registo de correntes iónicas com recurso à técnica de *whole cell patch clamp*.

#### Integração dos resultados *western-blotting* e eletrofisiologia:

Apesar dos resultados da expressão proteica carecerem do aumento do tamanho da amostra a fim de se obter resultados robustos e consistentes, a conjugação dos resultados de *western-blotting* com os resultados de eletrofisiologia apresentados neste relatório permite estabelecer paralelismos relevantes que contribuem para uma melhor compreensão dos resultados obtidos durante o estágio.

Canais e  $I_K$ : A cinética das correntes de potássio apresentadas neste relatório ilustram uma expressão maioritária de  $I_K$  lentas, estando estas sobre expressas nas células diferenciadas. Os resultados demonstram igualmente uma alteração do perfil de inativação das  $I_K$  entre as células F-11 não diferenciadas e diferenciadas, o que sugere uma mudança no padrão de expressão de canais de  $K^+$  presentes na membrana plasmática: as células F-11 não diferenciadas parecem expressar uma população de canais de  $K^+$  com uma inativação maioritariamente mais lenta quando comparada com a população de canais encontrada nas células F-11 diferenciadas. Estas correntes lentas também se encontram nos neurónios de DRG o que indica que as células F-11 podem ser utilizadas numa plataforma de *drug screening* se se pretender estudar o efeito de novas moléculas analgésicas nas correntes lentas associadas ao mecanismo biológico do desenvolvimento de dor (18,20). Em sentido contrário, a ausência do registo de correntes rápidas de  $K^+$  foi corroborada pelos resultados da quantificação dos níveis proteicos de Kv4.3, um canal que regula as correntes rápidas de  $K^+$  (48). Os resultados de *western blotting* demonstram a presença de Kv1.2 e Kv1.3 nas células diferenciadas. Estes resultados estão alinhados com os registos de eletrofisiologia, dado que estes 2 tipos de canais modulam correntes lentas de  $K^+$  (pertencem ao grupo de canais de  $K^+$  denominados *delayed rectifier*) (21,49). Adicionalmente a utilização do bloqueador TEA-Cl (bloqueador de correntes *delayed rectifier*) (49)

possibilitou identificar a presença de outras  $I_K$  com uma cinética de inativação ainda mais lenta, e, possivelmente, não inativante. Estas características poderão ser atribuídas a um outro tipo de  $I_K$  - correntes M -, já identificadas nas células F-11 (12).

Canais e  $I_{Na}$ : Observou-se um aumento da expressão de correntes totais de  $Na^+$  apenas no meio de diferenciação suplementado com  $2\mu M$  RA, o que está de acordo com os valores de densidade de corrente calculados para as 3 condições de cultura. O meio  $2\mu M$  RA apresenta maiores valores  $I_{Na}$ , que conferem níveis elevados de excitabilidade, logo maior atividade neuronal (Figura 4.14) (22,50). De facto, o AP registado no meio  $2\mu M$  RA é o que apresenta maior amplitude, quando comparado com o AP registado na célula mantida no meio com 1% FBS. Relativamente à comparação dos registos obtidos em neurónio DRG e células F-11 (Figura 4.12), constata-se que as correntes totais de  $Na^+$  de células F-11 são maioritariamente mediadas por correntes TTXs. Não obstante, foi possível identificar a presença de um canal TTXr (Nav1.8), no lisado total das células F-11. Também se identificou um tipo de canal TTXs (Nav1.7), nas amostras proteicas das células F-11. Estes canais estão descritos na literatura como agentes moleculares muito importantes na regulação da dor (17, 22-23,50-51).

Canais e  $I_{Ca}$ : O canal iónico Cav3.2 foi identificado nos lisados totais de F-11, com um aumento da sua expressão ao sétimo dia de diferenciação, quando comparado com o nível de expressão nas células não diferenciadas. Este resultado contraria o facto de não se ter conseguido registar  $I_{Ca}$  nas células F-11, pelo que algumas considerações devem ser tecidas neste particular, que poderão explicar esta discrepância de resultados. Em primeiro lugar, os resultados de *western-blotting* referem-se à expressão proteica do lisado total de várias células F-11, o que contrasta com a tentativa de registo de  $I_{Ca}$ , realizadas sempre em células isoladas, individualizadas. O número de tentativas poderá não ter sido suficiente para se registar  $I_{Ca}$ , ou, por outro lado, as tentativas poderão ter sido sempre realizadas em células que não expressavam (ou expressavam muito pouco) canais de  $Ca^{2+}$  dependentes da voltagem. Assim, dever-se-á aumentar a amostra de registos de  $I_{Ca}$  para assegurar esta possibilidade. Em segundo lugar, e adicionalmente ao mencionado no ponto anterior, o registo de  $I_{Ca}$  nas células diferenciadas foram realizadas em células com poucos dias de diferenciação (2-3 dias), o que, segundo a Figura 4.15, poderá explicar a ausência de  $I_{Ca}$ , dada a reduzida expressão destes canais ao segundo dia de diferenciação. Por último, o sucesso do registo de  $I_{Ca}$  subentende uma presença de

canais iónicos na membrana plasmática das células, algo que não está completamente garantido com os resultados de *western-blotting*, dado o protocolo de extração de proteínas utilizado – lise de proteínas totais. Assim, as proteínas extraídas estavam localizadas em vários compartimentos celulares (entre outros, membranas intracelulares, que, por natureza, têm uma elevada expressão de canais de  $\text{Ca}^{2+}$ ), pelo que a sua quantificação não é exclusiva da membrana plasmática (52). Esta ressalva é importante quando se procede a uma análise integrada dos dados experimentais obtidos. Resumidamente, e relativamente a este último ponto, a expressão elevada de canais iónicos poderá estar relacionada com uma elevada densidade proteica noutros compartimento celulares, diferentes da membrana plasmática (relevante para os resultados obtidos pela técnica de *whole-cell patch-clamp*).

#### Avaliação da excitabilidade neuronal – Potenciais de ação

A ausência de frequência de disparo de AP em células F-11 poderá estar relacionada com a ausência de deteção de correntes de  $\text{Ca}^{2+}$ , cujo fluxo para dentro das células permite uma dinâmica de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (53-54) que provoca, entre outros, a ativação de canais de  $\text{K}^+$  envolvidos num passo importante do AP, denominada *after hyperpolarization* (AHP). Em termos fisiológicos, AHP é um mecanismo celular extremamente importante pois permite uma recuperação efetiva dos neurónios (*período refratário relativo*), preparando-os para o disparo do AP subsequente (55). Por outro lado, a grande expressão de correntes muito lentas (ou não inativantes) de  $\text{K}^+$  pode contribuir para uma redução da atividade neuronal das células F-11 (56). No futuro, tem de se testar novas condições de otimização, nomeadamente com a suplementação do meio de diferenciação com NGF e RA, ambos contribuindo para o aumento da excitabilidade celular (40,42-44,57-58).

A comparação do perfil eletrofisiológico e bioquímico dos canais iónicos expressos pelas células F-11 nas duas condições de diferenciação constituirá o princípio da construção de uma base de dados de diferenciação de células F-11, com uma diversidade de características moleculares que contribuirá para a implementação das células F-11 como substrato celular no estudo dos mecanismos da dor e desenvolvimento de novas terapêuticas. O engrossamento desta base de dados será essencial para uma aproximação das células F-11 à complexidade celular e molecular característica natural dos neurónios sensíveis à dor.

## 6. Conclusão

Os resultados dispostos no presente relatório permitiram uma caracterização do perfil bioquímico e biofísico das correntes iónicas mediadas por canais iónicos presentes na membrana plasmática nas células F-11. As conclusões tiradas do trabalho experimental desenvolvido durante o estágio são as seguintes:

- Melhor meio de crescimento: F-12 garante melhores condições de *patch*
- Melhor meio de diferenciação: 2 $\mu$ M RA - os valores mais elevados de densidade de corrente garantem níveis de excitabilidade neuronal superiores, logo maior atividade neuronal.
- $I_K$ : aumento da densidade de corrente das correntes lentas de  $K^+$  e uma variação do fenótipo dos canais de  $K^+$  que regulam este tipo de correntes, no processo de diferenciação.
- $I_{Ca}$ : não foi possível registar correntes de  $Ca^{2+}$  com os meios de diferenciação utilizados.
- A linha celular F-11, mantida e diferenciada nos meios analisados, pode ser usada como uma plataforma de investigação no âmbito da descoberta de novas moléculas terapêuticas para o tratamento da dor, sobretudo no que respeita ao envolvimento de canais de sódio e de potássio.

## 7. Conclusions

The results set out in this report allowed the biochemical and biophysical profiling of the ionic currents mediated by ion channels present in F-11 cells' plasma membrane. The conclusions drawn from the experimental work carried out during the internship are as follows:

- Best growth medium: F-12 ensures improved patch conditions.
- Best differentiation medium: 2 $\mu$ M RA, for having higher  $I_{Na}$ , better excitability conditions, hence allowing higher neuronal activity.
- $I_K$ : there is an increase in the current density of slow  $I_K$  and a variation in the phenotype of  $K^+$  channels that regulates this type of current, throughout the process of differentiation.
- $I_{Ca}$ : it was not possible to record  $I_{Ca}$  with the tested differentiation mediums.
- F-11 cell line, under the growth and differentiation cell culture protocols analysed in the present work, can be used as a research platform for the discovery of new therapeutic molecules for the treatment of pain, especially in what concerns the involvement of sodium and potassium channels.

## 8. Proposta de Projeto de Investigação

Com base na otimização feita na cultura e diferenciação das células F-11 para utilização como modelo celular de células de DRG em estudos da dor e resultados do perfil biofísico e bioquímicos destas células proponho um projeto de investigação de continuidade do estágio. Uma vez que os resultados de *current-clamp* obtidos com as células F-11 ficaram aquém do desejado o projeto apresentado pretende dar continuidade à otimização das células para obtenção de vários AP e procurar aprofundar a caracterização bioquímica das células F-11.

**Título:** Conhecer canais iónicos dependentes de voltagem expressos nas células F-11, para utilização da linha celular como modelo neurónios DRG no estudo da dor

**Objetivo:** Aumentar a base de dados da expressão de canais iónicos nas células F11 em função dos meios de diferenciação utilizados A utilização das células F11 em projetos de *drug screening* como modelo celular, como alternativa viável aos neurónios DRG, no estudo da dor

**Pertinência:** Existem vários fármacos e novas moléculas que atuam nos DRG e interferem com os canais iónicos e com a produção de potenciais de ação (59-60). A utilização das células F11 como modelo celular de DRG em estudos de dor está dependente da expressão de determinados canais iónicos nas células F11 (61) e da capacidade de gerar potenciais de ação. Para utilização das células como modelo de celular de DRG é necessário construir uma base de dados da expressão de canais nas células F11 em função do meio de diferenciação e estabelecer uma condição de diferenciação que apresente canais de cálcio nestas células e um perfil de disparo de potenciais de ação semelhante ao registado nos neurónios de DRG. Adicionalmente é importante conhecer em maior detalhe o perfil eletrofisiológico e bioquímico das correntes lentas de K<sup>+</sup>.

**Metodologia:**

#### Cultura de células F-11:

As células F11 vão ser colocada em meio de crescimento que consiste em F-12 suplementado com 10% FBS. Quando atingirem uma confluência de 70-80% as células serão tripsinizadas e diferenciadas em frascos T25 ou placas 35mm (6000 células/cm<sup>2</sup>) por um período de 3-7 dias a 37°C com 5% CO<sub>2</sub> em atmosfera húmida. As células em frascos no final da diferenciação para utilização em técnicas de eletrofisiologia vão ser tripsinizada com tripsina a 0,5% e ressuspensas no meio de crescimento.

#### Voltage-clamp:

A preparação para realização da técnica, soluções e protocolos de comando utilizados serão idênticos aos expressos nos pontos **3.2.1 Canais de K<sup>+</sup> ativados por voltagem** e **3.2.3 Canais de Ca<sup>2+</sup> ativados por voltagem**, deste relatório.

#### Current-clamp:

Com a utilização das mesmas soluções e protocolos já descritos no ponto **3.2.4 Whole-cell voltage-clamp: I<sub>Ca</sub>** e será estudada a capacidade de disparo das células F11 nos meios de diferenciação em estudo, através de protocolos com pulsos despolarizantes de corrente.

#### Western-Blotting:

A extração das proteínas, e protocolo de eletroforese e transferência serão iguais à descrita anteriormente no ponto **3.3 Expressão proteica dos canais iónicos nas células F11**. dos materiais e métodos e os reagentes estão os descritos no Anexo 2.

Para marcar as proteínas de interesse, nomeadamente proteínas correspondentes aos canais de Ca<sup>2+</sup>, será usado um anticorpo Pan-Cav, para identificar qualquer tipo de canal iónico de Ca<sup>2+</sup> presente nas células F-11 diferenciadas. Relativamente aos canais de K<sup>+</sup> será usado o anti-kv7.2 e anti-kv7.3 para a deteção de canais de K<sup>+</sup> não inativantes (associados a correntes M (I<sub>KM</sub>)).

**Análise e Interpretação dos Resultados:** Para análise de dados das técnicas de eletrofisiologia serão utilizados programas como o Clampfit 10.7 (Axon Instruments®), Microsoft Excel (Microsoft Office 2013 Professional Plus®), Origin Pro 8 (Microsoft Software®) e GraphPad Prism 6.01 (Window, GraphPad Software, San Diego California USA). Neste último será realizada a análise de significância utilizando o teste t-student para dados paramétricos com  $n > 10$  e Mann-Whitney para dados não paramétricos ( $n < 10$ ). Na quantificação das proteínas de interesse recorrer-se-á ao Image Lab 5.2.1 Software (Bio-Rad Laboratories).

Todos os resultados vão ser avaliados numa primeira fase pelo operador e discutidos conjuntamente com vários especialistas em sede de *Labmeeting*.

**Resultados Esperados:** Com o meio de diferenciação escolhido é esperado registar  $I_{Ca}$ , e potenciais de ação devido à suplementação com NGF. Espera-se validar a presença de  $I_{KM}$ , nas células F-11 e quantificar a sua expressão proteica no processo de diferenciação. Com base nos resultados esperados, e cuidadosa análise dos mesmos, é previsto que seja possível expandir a base de dados dos meios de diferenciação de células F-11 e conseqüentemente a classificação fenotípica. Tendo em conta esta base de dados é esperado que seja possível utilizar as células F-11 como plataforma de *drug screening* em substituição dos neurónios de DRG isolados.

## 9. Referências Bibliográficas

1. Sea4Us [Internet]. 2023 [cited 2023 Mar 25]. Available from: <https://sea4us.pt/en/sobre-nos/mission-vision/>
2. Vincent K, Dona CPG, Albert TJ, Dahia CL. Age-related molecular changes in the lumbar dorsal root ganglia of mice: Signs of sensitization, and inflammatory response. *JOR SPINE* [Internet]. 2020 Dec 1;3(4):e1124. Available from: <https://doi.org/10.1002/jsp2.1124>
3. Krames ES. The role of the dorsal root ganglion in the development of neuropathic pain. *Pain Med*. 2014 Oct;15(10):1669–85.
4. Dubin AE, Patapoutian A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J Clin Invest*. 2010 Nov;120(11):3760–72.
5. Aguggia M. Neurophysiology of pain. *Neurol Sci Off J Ital Neurol Soc Ital Soc Clin Neurophysiol*. 2003 May;24 Suppl 2:S57-60.
6. North RY, Li Y, Ray P, Rhines LD, Tatsui CE, Rao G, et al. Electrophysiological and transcriptomic correlates of neuropathic pain in human dorsal root ganglion neurons. *Brain* [Internet]. 2019 May 1;142(5):1215–26. Available from: <https://academic.oup.com/brain/article/142/5/1215/5382382>
7. Rubaiy HN. A short guide to electrophysiology and ion channels. *J Pharm Pharm Sci*. 2017;20(1):48–67.
8. Yang J, Xie M-X, Hu L, Wang X-F, Mai J-Z, Li Y-Y, et al. Upregulation of N-type calcium channels in the soma of uninjured dorsal root ganglion neurons contributes to neuropathic pain by increasing neuronal excitability following peripheral nerve injury. *Brain Behav Immun*. 2018 Jul;71:52–65.
9. Park J, Luo ZD. Calcium channel functions in pain processing. *Channels (Austin)*. 2010;4(6):510–7.
10. Francel PC, Harris K, Smith M, Fishman MC, Dawson G, Miller RJ, et al. F11 neuroblastoma × DRG neuron hybrid cells express inhibitory  $\mu$ - and  $\delta$ -opioid receptors which increase voltage-dependent K<sup>+</sup> currents upon activation. *J Neurochem*. 1992;590(1–2):329–33.
11. Pastori V, D'Aloia A, Blasa S, Lecchi M. Serum-deprived differentiated neuroblastoma F-11 cells express functional dorsal root ganglion neuron properties. *PeerJ*. 2019;7:e7951.
12. Jow F, He L, Kramer A, Hinson J, Bowlby MR, Dunlop J, et al. Validation of DRG-like F11 cells for evaluation of KCNQ/M-channel modulators. *Assay Drug Dev Technol*. 2006 Feb;4(1):49–56.
13. Haberberger RV, Barry C, Matusica D. Immortalized Dorsal Root Ganglion Neuron Cell Lines. *Front Cell Neurosci*. 2020;14(June).
14. Orozco Morato E, Knight B, Nair LS. Transcriptional profiling of neuronal ion channels in dorsal root ganglion-derived immortal cell line (F-11) under different culture conditions. *Vitr Model* [Internet]. 2022;1(4):385–95. Available from: <https://doi.org/10.1007/s44164-022-00036-7>

15. Platika D, Boulos MH, Baizer L, Fishman MC. Neuronal traits of clonal cell lines derived by fusion of dorsal root ganglia neurons with neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82(10):3499–503.
16. Gennarini G, Durbec P, Boned A, Rougon G, Goridis C. Transfected F3/F11 neuronal cell surface protein mediates intercellular adhesion and promotes neurite outgrowth. *Neuron*. 1991 Apr;6(4):595–606.
17. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ. Principles of Neuronal Science. In.
18. Akins PT, McCleskey EW. Characterization of potassium currents in adult rat sensory neurons and modulation by opioids and cyclic AMP. *Neuroscience*. 1993 Oct;56(3):759–69.
19. Zhang J, Rong L, Shao J, Zhang Y, Liu Y, Zhao S, et al. Epigenetic restoration of voltage-gated potassium channel Kv1.2 alleviates nerve injury-induced neuropathic pain. *J Neurochem*. 2021 Feb;156(3):367–78.
20. Du X, Gamper N. Potassium Channels in Peripheral Pain Pathways: Expression, Function and Therapeutic Potential. *Curr Neuropharmacol* [Internet]. 2013 Nov;11(6):621–40. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1570-159X&volume=11&issue=6&spage=621>
21. Rorsman P, Trube G. Calcium and delayed potassium currents in mouse pancreatic beta-cells under voltage-clamp conditions. *J Physiol*. 1986 May;374:531–50.
22. Yin R, Liu D, Chhoa M, Li C-M, Luo Y, Zhang M, et al. Voltage-gated sodium channel function and expression in injured and uninjured rat dorsal root ganglia neurons. *Int J Neurosci*. 2016;126(2):182–92.
23. Li Y, North RY, Rhines LD, Tatsui CE, Rao G, Edwards DD, et al. DRG Voltage-Gated Sodium Channel 1.7 Is Upregulated in Paclitaxel-Induced Neuropathy in Rats and in Humans with Neuropathic Pain. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2018 Jan;38(5):1124–36.
24. Vetter I, Lewis RJ. Characterization of endogenous calcium responses in neuronal cell lines. *Biochem Pharmacol*. 2010;79(6):908–20.
25. Hodgkin AL, Huxley AF, Katz B. Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J Physiol* [Internet]. 1952;116(4):424–48. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1113/jphysiol.1952.sp004716>
26. Chen J, Liu X, Yu S, Liu J, Chen R, Zhang Y, et al. A novel  $\omega$ -conotoxin Bu8 inhibiting N-type voltage-gated calcium channels displays potent analgesic activity. *Acta Pharm Sin B*. 2021 Sep 1;11(9):2685–93.
27. Hamill OP. Patch-Clamp Technique. In: *Encyclopedia of Life Sciences* [Internet]. 2014. Available from: <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0003382.pub2>
28. Conforti L. Chapter 20 - Patch-Clamp Techniques. In: Sperlakis N, editor. *Cell Physiology Source Book (Fourth Edition)* [Internet]. San Diego: Academic Press; 2012. p. 369–81. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123877383000202>
29. Molecular Devices, editor. *The Axon Guide- Electrophysiology and Biophysics*

- Laboratory Techniques. Fifth. San Jose; 2021.
30. Electrophysiology lab- Molecular Devices [Internet]. [cited 2023 May 24]. Available from: <https://www.moleculardevices.com/technology/electrophysiology>
  31. Sperelakis N. Introduction: patch clamp and single-cell voltage clamp techniques and selected data. *Mol Cell Biochem* [Internet]. 1989;80(1):3–7. Available from: <https://doi.org/10.1007/BF00230998>
  32. Petkov G V. Chapter 16 - Ion Channels. In: Hacker M, Messer W, Bachmann KBT-P, editors. San Diego: Academic Press; 2009. p. 387–427. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123695215000166>
  33. Cummins TR, Rush AM, Estacion M, Dib-Hajj SD, Waxman SG. Voltage-clamp and current-clamp recordings from mammalian DRG neurons. *Nat Protoc* [Internet]. 2009;4(8):1103–12. Available from: <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.91>
  34. Mason MJ, Simpson AK, Mahaut-Smith MP, Robinson HPC. The interpretation of current-clamp recordings in the cell-attached patch-clamp configuration. *Biophys J*. 2005 Jan;88(1):739–50.
  35. Hill CL, Stephens GJ. An Introduction to Patch Clamp Recording BT - Patch Clamp Electrophysiology: Methods and Protocols. In: Dallas M, Bell D, editors. New York, NY: Springer US; 2021. p. 1–19. Available from: [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0818-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0818-0_1)
  36. Catterall WA, Raman IM, Robinson HPC, Sejnowski TJ, Paulsen O. The Hodgkin-Huxley Heritage: From Channels to Circuits. *J Neurosci* [Internet]. 2012;32(41):14064–73. Available from: <https://www.jneurosci.org/content/32/41/14064>
  37. Blasa S, Borzenkov M, Pastori V, Doveri L, Pallavicini P, Chirico G, et al. Prussian Blue Nanoparticle-Mediated Scalable Thermal Stimulation for In Vitro Neuronal Differentiation. *Nanomater (Basel, Switzerland)*. 2022 Jul;12(13).
  38. Faravelli L, Arcangeli A, Olivetto M, Wanke E. A HERG-like K<sup>+</sup> channel in rat F-11 DRG cell line: pharmacological identification and biophysical characterization. *J Physiol*. 1996 Oct;496 ( Pt 1(Pt 1):13–23.
  39. Elliott AA, Elliott JR. Characterization of TTX-sensitive and TTX-resistant sodium currents in small cells from adult rat dorsal root ganglia. *J Physiol*. 1993 Apr;463:39–56.
  40. Martínez AL, Brea J, Monroy X, Merlos M, Burgueño J, Loza MI. A New Model of Sensorial Neuron-Like Cells for HTS of Novel Analgesics for Neuropathic Pain. *SLAS Discov Adv life Sci R D*. 2019 Feb;24(2):158–68.
  41. Fan SF, Shen KF, Scheideler MA, Crain SM. F11 neuroblastoma x DRG neuron hybrid cells express inhibitory mu- and delta-opioid receptors which increase voltage-dependent K<sup>+</sup> currents upon activation. *Brain Res*. 1992 Sep;590(1–2):329–33.
  42. Boland LM, Dingledine R. Expression of sensory neuron antigens by a dorsal root ganglion cell line, F-11. *Brain Res Dev Brain Res*. 1990 Feb;51(2):259–66.
  43. Hashemian S, Alhouayek M, Fowler CJ. TLR4 receptor expression and function in F11 dorsal root ganglion x neuroblastoma hybrid cells. *Innate Immun*. 2017

- Nov;23(8):687–96.
44. Francel PC, Harris K, Smith M, Fishman MC, Dawson G, Miller RJ. Neurochemical characteristics of a novel dorsal root ganglion X neuroblastoma hybrid cell line, F-11. *J Neurochem.* 1987 May;48(5):1624–31.
  45. Platika D, Boulos MH, Baizer L, Fishman MC. Neuronal traits of clonal cell lines derived by fusion of dorsal root ganglia neurons with neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985 May;82(10):3499–503.
  46. Platika D, Baizer L, Fishman MC. Sensory neurons “immortalized” by fusion with neuroblastoma cells. *Trans Assoc Am Physicians.* 1985;98:301–4.
  47. Orozco Morato E, Knight B, Nair LS. Transcriptional profiling of neuronal ion channels in dorsal root ganglion–derived immortal cell line (F-11) under different culture conditions. *Vitr Model [Internet].* 2022;1(4–5):385–95. Available from: <https://doi.org/10.1007/s44164-022-00036-7>
  48. Liu J, Kim K-H, Morales MJ, Heximer SP, Hui C-C, Backx PH. Kv4.3-Encoded Fast Transient Outward Current Is Presented in Kv4.2 Knockout Mouse Cardiomyocytes. *PLoS One.* 2015;10(7):e0133274.
  49. Mollereau C, Roumy M, Zajac J-M. Neuropeptide FF receptor modulates potassium currents in a dorsal root ganglion cell line. *Pharmacol Rep.* 2011;63(4):1061–5.
  50. Devor M. Sodium channels and mechanisms of neuropathic pain. *J pain.* 2006 Jan;7(1 Suppl 1):S3–12.
  51. Hameed S. Na(v)1.7 and Na(v)1.8: Role in the pathophysiology of pain. *Mol Pain.* 2019;15:1744806919858801.
  52. Ferron L, Koshti S, Zamponi GW. The life cycle of voltage-gated Ca(2+) channels in neurons: an update on the trafficking of neuronal calcium channels. *Neuronal Signal.* 2021 Apr;5(1):NS20200095.
  53. Catterall WA. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011 Aug;3(8):a003947.
  54. Marrion N V. Calcium Channel and Calcium-Activated Potassium Channel Coupling. In: Squire LRBT-E of N, editor. Oxford: Academic Press; 2009. p. 527–33. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080450469016508>
  55. Oh MM, Disterhoft JF. Neuron Excitability and Learning. In: Koob GF, Moal M Le, Thompson RFBT-E of BN, editors. Oxford: Academic Press; 2010. p. 416–24. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080453965002426>
  56. Mitterdorfer J, Bean BP. Potassium currents during the action potential of hippocampal CA3 neurons. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 2002 Dec;22(23):10106–15.
  57. Ambrosino P, Soldovieri MV, Di Zazzo E, Paventi G, Iannotti FA, Mosca I, et al. Activation of Kv7 Potassium Channels Inhibits Intracellular Ca(2+) Increases Triggered By TRPV1-Mediated Pain-Inducing Stimuli in F11 Immortalized Sensory Neurons. *Int J Mol Sci.* 2019 Sep;20(18).

58. Kusano K, Gainer H. Modulation of voltage-activated Ca currents by pain-inducing agents in a dorsal root ganglion neuronal line, F-11. *J Neurosci Res* [Internet]. 1993 Feb 1;34(2):158–69. Available from: <https://doi.org/10.1002/jnr.490340203>
59. Esposito MF, Malayil R, Hanes M, Deer T. Unique Characteristics of the Dorsal Root Ganglion as a Target for Neuromodulation. *Pain Med*. 2019 Jun;20(Suppl 1):S23–30.
60. Tsantoulas C, McMahon SB. Opening paths to novel analgesics: the role of potassium channels in chronic pain. *Trends Neurosci*. 2014 Mar;37(3):146–58.
61. Yin K, Baillie GJ, Vetter I. Neuronal cell lines as model dorsal root ganglion neurons: A transcriptomic comparison. *Mol Pain*. 2016;12:1–17.

## 10. Anexos

### Anexo 1- Equações de análise utilizadas em eletrofisiologia

Algumas das equações utilizadas para calcular determinados parâmetros de eletrofisiologia, utilizados na análise das correntes iónicas.

Densidade de corrente:

$$J = \frac{I}{C}$$

A densidade de corrente (pA/pF) está representada pelo J, I representa a corrente (em pA) e C representa a capacitância (pF).

Condutância (G):

$$G = \frac{I}{E - V_m} \text{ (sendo } E, E_{Na} \text{ ou } E_K)$$

$V_m$  representa a voltagem do pulso de comando.

Normalização dos valores da condutância:

$$G/G_{max} = \frac{(A1 - A2)}{1 + \exp \frac{V_m - V_H}{V_S}} + A_2$$

Utilizada para calcular as curvas de ativação no *software* Origin Pro 8 (Microsoft Software®).

Cinética de Inativação (para K<sup>+</sup>e Na<sup>+</sup>): m

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

A Cinética de Inativação das I<sub>Na</sub> e I<sub>K</sub> foi estudada pelo assentamento da curva exponencial no protocolo de ativação.

Normalização da dependência da voltagem dos canais iónicos:

$$\frac{I}{I_{max}} = \frac{a1}{1 + \exp\frac{Vh1 - Vm}{Vs1}} + \frac{1 - a1}{1 + \exp\frac{Vh2 - Vm}{Vs2}}$$

Recorreu-se a uma *doubleBoltzman* para calcular as curvas de inativação no *software* Origin Pro 8 (Microsoft Software®).

## Anexo 2- Soluções de *Western-blotting*

Todas as receitas de soluções utilizadas em *western-blotting* estão descritas nesta secção. O volume de todas as soluções foi feito com H<sub>2</sub>Od.

A Tabela 10.1 mostra a receita utilizada para preparação do tampão de lise (RIPA). Ao tampão de lise é adicionado um cocktail de inibidores de proteases (PIC (25X)). Para se obter a solução de PICS é necessário dissolve-se 1 tablet de stock em 2mL H<sub>2</sub>Od (água destilada). Em 1mL de tampão de lise utilizado são adicionados 20µL da solução de PICS. O tampão de lise deve ser guardado a -20°C e a solução de PICS a 4°C

Tabela 10.1- Receita de preparação tampão de lise (RIPA)

Tris-HCl pH 7.6	25 mM
NaCl	150 mM
NP-40 ou Triton X-100	1%
Sodium deoxycholate	1%
SDS	0.10%

As soluções de Tris utilizadas na receita dos géis e outras soluções descritas é conseguida pela diluição de Tris em H<sub>2</sub>Od e acerto do pH com HCL para pH8.8 e pH6.8 na solução 1.5M Tris-HCl e 0.5M Tris-HCl pH6.8, respetivamente (Tabela 10.2).

Tabela 10.2-1.5M Tris-HCl pH8.8 e 0.5M Tris-HCl pH6.8

Base Tris	28.151 g (para 250mL de 1.5M Tris-HCl)
	3.7535 g (para 100mL de 0.5M Tris-HCl)

Ajustar o pH com HCl

Os poços do gel de eletroforese foram sempre carregados com 15µg de solução proteica diluída no buffer denominado Loading Buffer a 20%.

Tabela 10.3-- 5X Laemmli Sample Buffer (Loading Buffer) (10mL)

Dithiothreitol (DTT)	0.385 g
Água destilada	3.75 mL
Azul Bromofenol	0.5 mL
Glicerol	2.5 mL
SDS	0.375 g
Tris-HCl (0.5M pH6.8)	3.125 mL

Para a eletroforese é utilizado um tampão *Running buffer* que os componentes se encontram descritos na Tabela 10.3. Esta solução pode ser guardada à temperatura ambiente e reutilizada.

Tabela 10.4-- Running Buffer pH 8.3 (1L)

Base Tris (25mM)	3.03 g
Glicina (190mM)	14.3 g
SDS (0.1%)	1 g

Na transferência é utilizado outro tampão *Transfer buffer* (Tabela 10.4) que deve ser colocado a 4°C pelo menos 1h antes da transferência. Este tampão também pode ser reutilizado e armazenado à temperatura ambiente.

Tabela 10.5-- Transfer Buffer (2L)

Base Tris (25mM)	6.06 g
Glicina (190mM)	28.6 g
SDS (opcional)	1 g
Metanol (20%)	400 mL

O Tris Buffered Saline (10X) (TBS (10X)) (Tabela 10.4) é uma solução de stock utilizada na preparação de TBS-T (1X) (Tabela 10.5), solução utilizada na lavagem das membranas de western.

Tabela 10.6- **A** - Stock 10X Tris Buffered Saline (TBS) pH 7.6 (1L). **B**-Solução 1X TBS-T (1L).

<b>A</b>		<b>B</b>	
TBS (10X) pH7.6		TBS-T (1X)	
Água destilada	10 mL	TBS (10X pH7.6)	100 mL
NaCl	80.06 g	Tween-20	1 mL
Tris Base	24.23 g	Água destilada	899 mL
Água destilada	800 mL		

A tabela 10.8 indica as soluções utilizada para corar o gel Comassie Blue 0.1%, e confirmar o sucesso da transferência

Tabela 10.7-- *Comassie Blue* 0.1% (Staining Solution) (100mL)

Metanol (50%)	50 mL
Ácido acético (10%)	10 mL
Água destilada (40%)	40 mL
Coomassie Brilliant Blue	0.1 g

Na tabela 10.9 está descrita a solução de bloqueio, *Blocking Solution*, utilizada em que foi deixada as membranas a incubar *overnight*

Tabela 10.8- *Blocking Solution* (100 mL)

TBST-T	100 ml
Leite em pó (5%)	2 mg