DANIEL BLANC ARAUJO

**O transporte de ânions em células INS-1E não compõe parte do
mecanismo da via de amplificação da secreção de insulina
estimulada pela glicose**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Fisiologia Humana do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Mestre em Ciências

São Paulo
2016

DANIEL BLANC ARAUJO

O transporte de ânions em células INS-1E não compõe parte do mecanismo da via de amplificação da secreção de insulina estimulada pela glicose

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Fernando Rodrigues de Moraes Abdulkader

Versão original

São Paulo
2016

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução parcial

Araújo, Daniel Blanc.

O transporte de ânions em células INS-1E não compõe parte do mecanismo da via de amplificação da secreção de insulina estimulada pela glicose / Daniel Blanc Araújo. – São Paulo, 2016.

Orientador: Fernando Rodrigues de Moraes Abdulkader.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Transporte em membranas e exocitose em células de ilhotas pancreáticas.

Versão do título para o inglês: The anion transport in INS-1E cell line do not composes part of the mechanism of the amplification pathway of glucose stimulated insulin secretion.

1. Insulina (secreção) 2. Glicose 3. INS-1E 4. Ânion 5. Transporte
6. Amplificação I. Abdulkader, Fernando Rodrigues de Moraes II.
Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB0101/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Daniel Blanc Araújo.

Título da Dissertação: O transporte de ânions em células INS-1E não compõe parte do mecanismo da via de amplificação da secreção de insulina estimulada pela glicose.

Orientador(a): Fernando Rodrigues de Moraes Abdulkader.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **159** nas fls. **137** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Fernando Rodrigues de Moraes Abdulkader**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Mecanismos celulares de secreção hormonal em ilhotas pancreáticas*" do qual participam o(s) aluno(s), **Juan Pablo Zúñiga Hertz, Daniel Blanc Araújo**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **30.10.2012**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 31 de outubro de 2012.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

Agradecimentos

A minha namorada Jessica que foi muito importante durante meu mestrado, sempre me dando muito carinho e muito amor. Mostrou-se muito presente e nas horas mais difíceis ela estava lá me incentivando sempre de todo jeito que podia.

Aos meus pais Peter e Célia que desde o começo estavam comigo me apoiando, me ajudaram quando enfrentei dificuldades e me deram todo o suporte que precisei até chegar ao final do mestrado.

Ao meu orientador Fernando que foi praticamente a pessoa mais importante desse trabalho. Exerceu seu trabalho como orientador sempre muito bem, estava sempre presente para ajudar, foi muito ético e correto em tudo que fazia. Porém, mais importante ele foi um grande amigo, sempre se importando como eu estava dentro e fora do ambiente de trabalho e buscando me ajudar de toda forma a seu alcance. Sinto muito orgulho em dizer pra qualquer pessoa que fui seu aluno e que ele é o melhor orientador que alguém pode ter.

A Andressa que foi minha companheira de todos os dias. A presença dela sempre deixava o ambiente de trabalho mais agradável, nossas conversas durante o dia sempre eram ótimas. Sempre pude contar com ela seja em relação a experimentos ou qualquer outra coisa da vida.

Ao Eduardo que foi um grande amigo, um segundo orientador e puxador de orelha profissional. Apreendi muito com ele não só sobre fisiologia ou como fazer experimentos, mas também como agir em diversas situações que podem aparecer no trabalho e, além dessa parte profissional, ele me mostrou as melhores cervejas.

Ao meu colega de laboratório Juan que desde a minha iniciação científica me recebeu muito bem no laboratório e me ensinou muito. Foram ótimos dias de trabalho e conversas sobre tudo de bobagens a fisiologia e ele ainda me ensinou um pouco de espanhol.

Ao Vinicius que entrou junto comigo no mestrado no mesmo laboratório e foi um grande companheiro de trabalho e amigo.

A minha colega de laboratório Amanda que foi uma pessoa que eu tive a oportunidade de ensinar e ao mesmo tempo aprender muito. Espero que continue sempre evoluindo e mostrando seu potencial.

Aos meus colegas de departamento Sinésio, Luciana, Bruna, Talita e Morango que foram amigos mais que especiais desde o início até o fim. Enfrentamos muitos altos e baixos durante esse tempo, mas sempre podíamos contar uns com os outros.

Aos professores Luciana, Cassola e Raif que se mostraram ótimos profissionais, foram competentes e éticos quando me avaliaram na qualificação e me fizeram crescer muito como profissional e ser humano.

Ao professor Cipolla e aos membros do seu laboratório por serem sempre receptivos e me oferecerem espaço para trabalhar enquanto meu laboratório estava em reforma.

Ao professor Ângelo e aos membros do seu laboratório por me ajudarem com experimentos e por oferecerem equipamento.

A todos os outros colegas e amigos que fiz durante o mestrado.

Aos funcionários da secretária Zé Maria e Paloma e da biblioteca Tereza e Valéria pela ajuda com questões administrativas.

Aos professores que ajudaram na minha formação profissional.

A CAPES e a FAPESP pelo apoio financeiro.

Epígrafe

***“Tell me and i'll forget, show me and I
may remember, involve me and i'll
understand”***

Antigo Provérbio chinês

RESUMO

BLANC-ARAUJO, Daniel. **O transporte de ânions em células INS-1E não compõe parte do mecanismo da via de amplificação da secreção de insulina estimulada pela glicose.** 2016. 74 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A via de amplificação da secreção de insulina estimulada por glicose (GSIS) é um fenômeno discutido na literatura, cujos componentes são amplamente debatidos. Evidências sugerem que a condutância a Cl^- compõe parte desta via. Porém, o mecanismo pelo qual essa condutância desempenharia papel na via de amplificação ainda é debatido, e, além disso, as ferramentas farmacológicas para estudo dessas afeta o transporte de outros ânions, como bicarbonato (HCO_3^-). Buscamos neste trabalho compreender a contribuição do transporte desses ânions para a via de amplificação da GSIS levando em consideração a distribuição de Cl^- e HCO_3^- extracelular em células INS-1E. Essas células foram cultivadas em meio RPMI e ensaios de secreção de insulina foram realizados com concentrações de glicose de 2,8 e 16,7 mM em solução Krebs tamponada com HCO_3^- ou HEPES na presença ou ausência de 100 μM de DIDS ou furosemida. Também foram realizados experimentos de *patch-clamp* para análise de atividade elétrica (ionóforo: anfotericina B) e correntes de vazamento de ânions (ionóforo: gramicidina D) em ambas as concentrações de glicose. Análise de qPCR também foi feita para avaliar a expressão de canais e transportadores já reportados em células β . A secreção de insulina não foi afetada por nenhum dos tampões utilizados nem pela adição de DIDS ou furosemida, comparado com os controles. A frequência de potenciais de ação, amplitude e potencial basal também não foi afetada pelo DIDS. A análise de corrente não mostrou alterações nas condutâncias a ânions ou potencial de reversão dependente de glicose. Não foram detectados os genes CFTR e Anoctamina 1 nas células INS-1E. Concluímos que o transporte de ânions nas células INS-1E não contribui para a via de amplificação da GSIS, porém essas células não expressaram os canais CFTR e Anoctamina 1 que foram relacionados com esse fenômeno. Acreditamos que em outras células secretoras de insulina que expressem esses canais, o transporte de ânions possua alguma relevância funcional.

Palavras-chaves: Insulina (secreção). Glicose. INS-1E. Ânion. Transporte. Amplificação.

ABSTRACT

BLANC-ARAUJO, Daniel. **The anion transport in INS-1E cell line do not composes part of the mechanism of the amplification pathway of glucose stimulated insulin secretion.** 2016. 74 p. Masters thesis (Human Physiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

The amplification pathway of glucose stimulated insulin secretion (GSIS) is a phenomenon discussed in the literature, which components are broadly debated. Evidence suggests that Cl^- conductance composes part of this pathway. However, the mechanism that this conductance would play role on the amplification pathway still is debated, and, besides that, the pharmacological tools to study these affects transport of other anions, such as bicarbonate (HCO_3^-). We aimed in this study to understand the contribution of anion transport for the amplification of GSIS considering the Cl^- and HCO_3^- extracellular distribution in INS-1E cells. Those cells were cultivated in RPMI medium and insulin secretion assays were performed with glucose concentrations of 2.8 and 16.7 mM in Krebs solution buffered with HCO_3^- or HEPES in the presence or absence of DIDS or furosemide. Also were performed patch clamp experiments for analysis of the electrical activity (ionophore: amphoterycin B) and leak anion conductance (ionophore: gramicidin D) in both glucose concentrations. qPCR analysis were also made to evaluate the expression of channels and transporters previously reported in β cells. Insulin secretion were not affected by changes in buffer systems, nor by addition of DIDS or furosemide, compared to controls. The frequency of action potentials, amplitude and interspike membrane potential were also not affected by DIDS. The current analysis did not shown changes on glucose-induced anion leak conductance or reversal potential. CFTR and Anoctamin 1 genes were not detected in INS-1E cell line. We concluded that anion transport in INS-1E cell line do not contribute for the amplification pathway of GSIS, however those cells do not express CFTR and Anoctamin 1 channels which were related with this phenomenon. We believe that in insulin secretin cells that express those channels, the anion transport may have a functional relevance.

Keywords: Insulin (secretion). Glucose. INS-1E. Anion. Transport. Amplifying.

Lista de Figuras

Figura 1 - Estrutura de uma ilhota pancreática contendo os quatro tipos celulares.

Figura 2 - Modelo de fusão de membranas catalisado por SNAREs.

Figura 3 - Esquema das vias de disparo e amplificação da secreção de insulina.

Figura 4 - Modelo dos mecanismos propostos para a importância do transporte de ânions para a GSIS.

Figura 5 - Secreção estática de insulina em células INS-1E ou ilhotas de camundongo NMRI expostas a 2,8 mM ou 16,7 mM de glicose na presença ou ausência de 100 ou 300 μ M de DIDS em soluções tamponadas com HEPES.

Figura 6 - Secreção estática de insulina em células INS-1E ou ilhotas de camundongo NMRI expostas a 2,8 mM ou 16,7 mM de glicose na presença ou ausência de 100 ou 300 μ M de DIDS em soluções tamponadas com HCO_3^- .

Figura 7 - Secreção estática de insulina em células INS-1E expostas a 2,8 mM ou 16,7 mM de glicose na presença ou ausência de 100 μ M de furosemida em soluções tamponadas com HCO_3^- ou HEPES.

Figura 8 - Registro representativo da atividade elétrica em células INS-1E expostas a 2,8 e 16,7 mM de glicose e 100 μ M de DIDS em solução tamponada com HCO_3^- .

Figura 9 - Registro representativo da atividade elétrica em células INS-1E expostas a 2,8 e 16,7 mM de glicose e 100 μ M de DIDS em solução tamponada com HEPES.

Figura 10 - Análise de picos correspondentes ao registro de atividade elétrica das figuras 8 e 9

Figura 11 - Registro representativo da atividade elétrica em células β pancreáticas expostas a 2,8 e 16,7 mM de glicose e 100 μ M de DIDS em solução tamponada com HCO_3^- .

Figura 12 - Análise de picos correspondentes ao registro de atividade elétrica da **figura 11**

Figura 13 - Registro representativo das correntes aniônicas geradas pela aplicação do protocolo de despolarizações acima exemplificado em células INS-1E expostas a 2,8 mM de glicose

Figura 14 - Registro representativo das correntes aniônicas geradas pela aplicação do protocolo de despolarizações acima exemplificado em células INS-1E expostas a 16,7 mM de glicose

Figura 15 - Análise quantitativa das correntes das **figuras 13 e 14**.

Figura 16. Concentração intracelular de Cl^- ($[\text{Cl}^-]_i$) em células INS-1E expostas a 2,8 ou 16,7 mM de Glicose

Figura 17 - Análise de expressão gênica em células INS-1E.

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Sequência dos primers utilizados.

Tabela 2 – Potencial de equilíbrio do Cl^-

Lista de Abreviaturas

α	Alfa
β	Beta
δ	Delta
Ach	Acetilcolina
ADP	Adenosina difosfato
AE	Trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$
AMP_c	Adenosina monofosfato cíclica
ANO1	Anoctamina 1
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
CamKII	Proteína quinase dependente de cálcio-calmodulina isoforma II
Ca_v	Canal para cálcio sensível a voltagem
CFTR	Regulador de condutância transmembrana da fibrose cística
ddp	diferença de potencial elétrico através da membrana
DIDS	Ácido 4,4'-diisotiocianato-2,2'-stilbenodisulfônico
Epac	<i>Exchange protein directly activated by cAMP</i>

GABA	Ácido gama-aminobutírico
GABA _A	Receptor de ácido gama-aminobutírico do tipo A
GLUT	Transportador de glicose
GLP-1	Peptídeo semelhante ao glucagon 1
GSIS	Secreção de insulina estimulada pela glicose
HEPES	ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-2-etanossulfônico
HVA	Ca _v ativados em alta voltagem
IRP	<i>pool</i> de liberação imediata
K _{ATP}	Canal para potássio sensível ao ATP
KRB	Krebs-Ringer-Bicarbonato
KRH	Krebs-Ringer-Hepes
LVA	Ca _v ativados em baixa voltagem
MAP-2	Proteína associada a microtúbulo isoforma 2
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido
Na _v	Canal para Na ⁺ sensível a voltagem
NBC	Cotransportador Na ⁺ /HCO ₃ ⁻
NCBE	Trocador Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻ impulsionado por Na ⁺

NKCC	Cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$
NKCC1	Cotransportador NKCC isoforma 1
NKCC2	Cotransportador NKCC isoforma 2
NMRI	<i>Naval Medical Research Institute</i>
PKA	proteína quinase A
PKC	proteína quinase C
PP	Polipeptídeo pancreático
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
Rap1	Proteína relacionada à ras isoforma 1
RP	<i>pool</i> de reserva
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RRP	<i>pool</i> de grânulos prontos para liberação
SNAP-25	Proteína associada a sinaptossomas 25
SNARE	Receptores para o fator solúvel sensível a N-etilmaleimida
t-SNARE	Receptores para o fator solúvel sensível a N-etilmaleimida de membrana
TTX	Tetrodotoxina
VAMP-2	Proteína de membrana associada a vesícula 2

VRAC Canal para ânions regulado por volume

v-SNARES Receptores para o fator solúvel sensível a N-etilmaleimida vesicular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Mecanismos de secreção de insulina induzidos pela glicose	21
1.2 Via de amplificação da GSIS	24
1.3 Mecanismos de transporte de Cl^- na membrana plasmática em células β pancreáticas e função na GSIS	26
2 OBJETIVO	32
3 JUSTIFICATIVA	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 Cultura de células	34
4.2 Animais	34
4.3 Soluções	35
4.4 Isolamento de ilhotas pancreáticas	36
4.5 Secreção estática de insulina	36
4.6 Radioimunoensaio	37
4.7 Eletrofisiologia	38
4.7.1 Atividade elétrica	38
4.7.2 Análise de corrente	38
4.8 Análise de expressão gênica	39
4.8.1 Extração de RNA de células INS-1E	39
4.8.2 Obtenção de c DNA	40
4.8.3 Análise quantitativa da expressão gênica por reação em cadeia da polimerase (q PCR)	41
4.9 Análise estatística	43
5 RESULTADOS	44
5.1 Canais e transportadores de ânions na GSIS	44
5.2 Efeito da inibição do cotransporte $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ na GSIS	47
5.3 Efeito de alterações na permeabilidade a ânions sobre a atividade elétrica de células β pancreáticas	49
5.4 Correntes aniônicas em células INS-1E	57
5.5 Expressão gênica em células INS-1E	62
6 DISCUSSÃO	64
7 CONCLUSÃO	68

REFERÊNCIAS 69

1 INTRODUÇÃO

O pâncreas é um órgão chave na manutenção da glicemia do organismo através da secreção de hormônios pela parte endócrina dessa glândula mista. O pâncreas endócrino é caracterizado por agrupamentos de diferentes células, especializadas principalmente na secreção de hormônios, chamados de ilhotas pancreáticas.

A ilhota pancreática é formada por quatro tipos celulares distintos com função endócrina, as células β , α , δ e PP (ORCI, 1982). Dentre esses tipos celulares, a célula β é a que se apresenta em maior número, correspondendo a aproximadamente 54 e 75% do total de células em ilhotas humanas e de camundongos, respectivamente (**figura 1**) (BRISSOVA et al., 2005). Essa célula é responsável por secretar um hormônio com ação hipoglicemiante, a insulina (ORCI, 1982), essencial para a manutenção da homeostase glicêmica do organismo. O controle da secreção da insulina pelas células β pancreáticas ocorre em resposta às variações nos níveis de nutrientes plasmáticos, principalmente a glicose, sendo ainda modulada por diversos hormônios e neurotransmissores (PRENTKI; MATSCHINSKY; MADIRAJU, 2013). Sua secreção é realizada por uma maquinaria celular precisa que finamente acopla os estímulos extracelulares com sua liberação.

Figura 1 - Estrutura de uma ilhota pancreática contendo os quatro tipos celulares: β (verde), α (vermelha), δ (azul) e PP (amarela). **A.** Ilhota humana

apresentando distribuição difusa das células. **B.** Ilhota de camundongo apresentando células beta predominantemente no centro.

1.1 Mecanismos de secreção de insulina induzidos pela glicose

O principal estímulo para a secreção de insulina é a concentração extracelular de glicose. A secreção de insulina estimulada pela glicose (GSIS) está diretamente associada a uma elevação nos níveis plasmáticos desse substrato (PRENTKI; TORNHEIM; CORKEY, 1997).

A GSIS se inicia pela captação da glicose para o citosol das células β através de transportadores de glicose (GLUTs) (NEWGARD; MCGARRY, 1995; SCHUIT, 1997). Foi reportada na célula β pancreática murina a presença dos GLUTs -1 e -2, que possuem baixo e elevado K_m , respectivamente. A presença do GLUT-2 nas células β pancreáticas permite que, frente às variações fisiológicas na concentração de glicose extracelular, a taxa de transporte desta hexose para o interior celular não se sature (SCHUIT, 1997; THORENS, 1992; THORENS et al., 1988).

No meio intracelular a glicose é metabolizada, o que se inicia por sua fosforilação pela enzima glicoquinase, formando glicose-6-fosfato. O metabolismo desse açúcar ocorre por uma sequência de reações catalisadas por enzimas, sendo este processo de catabolismo sequencial da glicose denominado glicólise. Nesse processo são produzidas moléculas de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido (NADH) e de piruvato que, posteriormente metabolizado, culmina na síntese de ATP pela mitocôndria. Desse modo, frente ao aumento na concentração extracelular de glicose, a célula β pancreática responde com um aumento intracelular da razão ATP/ADP (RORSMAN; BRAUN, 2013).

O aumento na razão ATP/ADP aumenta a probabilidade do estado fechado de canais para K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}), devido à alteração conformacional que o ATP promove na subunidade kir 6.2 formadora de poro desse canal, mudando sua estrutura para uma conformação não condutiva ao K^+ (TUCKER et al, 1997). Com a redução na condutância de K^+ na

membrana celular para o meio extracelular, ocorre retenção de cargas positivas no interior celular. Esse fenômeno diminui a diferença de potencial elétrico (ddp) através da membrana plasmática, ou seja, há uma despolarização da membrana. Sendo assim, a alteração na probabilidade do estado aberto do K_{ATP} pela ligação do ATP à subunidade Kir 6.2 deste canal, transduz mudanças metabólicas em sinais elétricos (ASHCROFT; HARRISON; ASHCROFT, 1984).

A despolarização inicial da membrana plasmática gerada pelo fechamento de canais K_{ATP} resulta no aumento da probabilidade de canais para Ca^{2+} sensíveis à voltagem (Ca_v) da família dos ativados em baixa voltagem (LVA) do tipo T passarem de uma conformação não condutiva para uma conformação condutiva a Ca^{2+} , permitindo que haja uma corrente de Ca^{2+} para o citosol (RORSMAN; BRAUN, 2013).

A entrada de Ca^{2+} pelo Ca_v leva a ddp de membrana para valores menos negativos e com isso aumenta a probabilidade de mudança de conformação de canais para Na^+ sensíveis à voltagem (Na_v) para um estado condutivo. O influxo de Na^+ pelo Na_v promove uma variação rápida e acentuada na ddp de membrana, fenômeno conhecido como potencial de ação (RORSMAN; BRAUN, 2013).

Durante a geração do potencial de ação a ddp de membrana atinge valores de voltagem os quais aumentam a probabilidade de um Ca_v da família dos ativados em alta voltagem (HVA) do tipo L sofrerem uma alteração conformacional para um estado condutivo ao Ca^{2+} (RORSMAN; BRAUN, 2013). A abertura de ambos os tipos de Ca_v leva a um aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} . Esse íon por sua vez, ativa a maquinaria celular de exocitose (DEENEY; PRENTKI; CORKEY, 2000; MACDONALD; JOSEPH; RORSMAN, 2005).

A exocitose dos grânulos que contêm insulina é um processo dependente de um conjunto de proteínas que constituem a maquinaria celular de exocitose, as proteínas SNAREs (receptores para ligação do fator solúvel sensível a N-etilmaleimida), efetoras da fusão da membrana do grânulo à membrana plasmática. Esse conjunto de proteínas é dividido em duas categorias, as v-SNAREs (sinaptobrevina/VAMP2) presentes na membrana das vesículas secretórias, e as t-SNAREs (SNAP-25 e syntaxina), presentes

na membrana plasmática. Os complexos v- e t-SNARE, ao interagirem, formam o complexo trans-SNARE ou SNAREpin. A formação do SNAREpin gera uma força vetorial que puxa as bicamadas do grânulo e da vesícula uma para a outra forçando sua fusão (**figura 2A**). Após a fusão das bicamadas a força vetorial desaparece e as SNAREs se apresentam em uma conformação de baixa energia chamada complexo cis-SNARE (**figura 2B**). Neste momento o conteúdo presente no grânulo pode ser liberado no meio extracelular (BARG, 2003; SÜDHOF; ROTHMAN, 2009).

Figura 2 - Modelo de fusão de membranas catalisado por SNAREs. **(A)** A formação do complexo de 4 hélices trans-SNARE ou SNAREpin ocorre por união das 3 hélices ancoradas na membrana plasmática (t-SNARE) com a hélice presente na membrana do grânulo (v-SNARE). Esse complexo de 4 hélices gera forças vetoriais para dentro (F) que puxa as bicamadas, forçando sua fusão. **(B)** Com a fusão das membranas a força vetorial desaparece e as SNAREs mudam para uma conformação de baixa energia chamada complexo cis-SNARE (Adaptado de SÜDHOF; ROTHMAN, 2009).

Esse mecanismo de secreção de insulina tem ainda um mecanismo de amplificação mediado pela própria glicose. Gembal; Gilon; Henquin (1992) propuseram que a GSIS é mediada por duas vias, uma de disparo e outra de amplificação (**figura 3**). A via de disparo é caracterizada pelo fechamento de canais K_{ATP} , seguido de despolarização da membrana plasmática, geração de potencial de ação e aumento da concentração do Ca^{2+} citosólico. A secreção

de insulina desencadeada pela via de disparo é aumentada pela via de amplificação, esta podendo ser induzida por uma via metabólica, a qual inclui o metabolismo da glicose, ou por uma via neurohormonal, incluindo neurotransmissores como acetilcolina (Ach) e hormônios, como peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1) (HENQUIN, 2009).

Figura 3 - Esquema das vias de disparo e amplificação da secreção de insulina (Adaptado de VEGA-MONROY; FERNANDEZ-MEJIA, 2011).

1.2 Via de amplificação da GSIS

A via de amplificação da GSIS é caracterizada por aumentar a eficiência do acoplamento entre estímulo e secreção de insulina provavelmente por mobilização de grânulos do *pool* de reserva (RP) para o *pool* de grânulos prontos para liberação (RRP) e renovação do *pool* de liberação imediata (IRP) (Fig. 3) (VEGA-MONROY; FERNANDEZ-MEJIA, 2011).

Alguns dos fatores envolvidos nessa via podem ser algumas cascatas de sinalização. Essas cascatas podem ser comuns a vias de amplificação tanto metabólicas como neurohormonais, como as vias da proteína quinase

dependente de cálcio-calmodulina isoforma II (CamKII) (EASOM, 1999; KRUEGER et al., 1997; MATSUMOTO et al., 1995, 1999; NIELANDER et al., 1995), proteína quinase A (PKA) (ÄMMÄLÄ; ASHCROFT; RORSMAN, 1993; HENQUIN; NENQUIN, 2014), *exchange protein directly activated by cAMP* (Epac) (SEINO et al., 2009; SEINO; SHIBASAKI; MINAMI, 2011; TAKAHASHI et al., 2015) proteína quinase C (PKC) (NESHER et al., 2002; ZAWALICH; BONNET-EYMARD; ZAWALICH, 1997) que, quando ativadas, podem contribuir mantendo ou aumentando a GSIS (VEGA-MONROY; FERNANDEZ-MEJIA, 2011).

Com a estimulação indireta para a entrada de Ca^{2+} promovida pela glicose, pode ocorrer ativação da CaMKII. Essa proteína, quando ativada, promove fosforilação de proteínas envolvidas com a maquinaria celular de exocitose como sinapsina 1 (MATSUMOTO et al., 1995, 1999), proteína associada a microtúbulo isoforma 2 (MAP-2) (KRUEGER et al., 1997) e sinaptobrevina/VAMP (NIELANDER et al., 1995). A possível modulação da via de amplificação da GSIS pela CaMKII pode se dar por mobilização de grânulos para a membrana pela fosforilação de MAP-2 além de auxiliar no atracamento do grânulo à membrana plasmática via fosforilação de sinaptobrevina/VAMP e sinapsina 1. Além disso foi sugerido que a CaMKII auxilia no reestabelecimento do RRP por se manter ativa após o estímulo de glicose (EASOM, 1999).

O estímulo com glicose para a secreção de insulina pode levar também a um aumento na produção de adenosina monofosfato cíclica (AMP_c) (DACHICOURT et al., 1996). Esse aumento de AMP_c por sua vez modula a via de amplificação da GSIS por vias dependentes ou independentes de PKA (HENQUIN; NENQUIN, 2014). Com a ativação da PKA, esta pode por sua vez fosforilar proteínas como canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem com correntes do tipo L, aumentando o influxo de Ca^{2+} e, com isso, acelerando a secreção de insulina (ÄMMÄLÄ; ASHCROFT; RORSMAN, 1993). Além disso, há um efeito direto da PKA sobre a maquinaria celular de exocitose, promovendo aumento da secreção de insulina (ÄMMÄLÄ; ASHCROFT; RORSMAN, 1993). Já na via independente de PKA, há a ativação da proteína Epac2 que é capaz de fosforilar proteínas, como a proteína relacionada à Ras isoforma 1 (Rap1) (TAKAHASHI et al., 2015). A ativação da via Epac2/Rap1

promove aumento no RRP e facilita o recrutamento de grânulos para a membrana plasmática (SEINO et al., 2009; SEINO; SHIBASAKI; MINAMI, 2011).

O metabolismo da glicose também foi relacionado com o aumento de PKC (ZAWALICH; BONNET-EYMARD; ZAWALICH, 1997). O aumento de PKC na célula β pancreática promove, assim como a PKA, a fosforilação de canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem e componentes da maquinaria celular de exocitose, aumentando assim a secreção de insulina (NESHER et al., 2002).

Além desses componentes descritos, há um possível papel na via de amplificação da GSIS mediado pelo fluxo de ânions pela membrana plasmática de células β pancreáticas, cuja função para esta ainda não foi bem estabelecida e possui muitas controvérsias na literatura.

1.3 Mecanismos de transporte de Cl^- na membrana plasmática em células β pancreáticas e função na GSIS

Existem diversas proteínas presentes na membrana plasmática que transportam ânions. Dentre elas, há canais e transportadores, sendo ambas importantes na manutenção da homeostase aniônica celular.

A homeostase aniônica, principalmente a do Cl^- , em células β pancreáticas vem sendo investigada por mais de três décadas. Apesar de ter sido observado que o transporte de ânions através da membrana plasmática possui relevância funcional para a GSIS (BARG et al., 2001; BEST et al., 2000; BEST; MILEY; YATES, 1996; BRAUN et al., 2010; DONG et al., 2006; KINARD et al., 2001; KINARD; SATIN, 1995; SANDSTRÖM, 1990; SANDSTRÖM; SEHLIN, 1988), há divergências sobre o mecanismo pelo qual este transporte modularia a GSIS.

Foi observada em células da linhagem HIT e células β de ratos Sprague Dawley a presença de uma corrente de ânions, gerada por exposição dessas células a uma solução hipotônica (BEST; MILEY; YATES, 1996; KINARD; SATIN, 1995), que possuía sensibilidade ao ácido 4,4'-diisotiocianato-2,2'-

estilbenodisulfônico (DIDS), um bloqueador de canais e transportadores aniônicos.

Posteriormente foi observado que a exposição de células HIT a uma solução hipotônica promove aumento da secreção de insulina, e esse aumento seria causado por efluxo de ânions, revertido pela adição de DIDS (KINARD et al., 2001).

No que diz respeito à GSIS, Best e colaboradores (2000), observaram uma redução na atividade elétrica, na $[Ca^{2+}]_i$ e na própria GSIS em células β pancreáticas estimuladas com 16,7 mM de glicose pela a adição de DIDS. Esse fenômeno foi atribuído a canais aniônicos modulados por volume que foram denominados VRACs (*Voltage-regulated anion channel*). Os autores propuseram que, durante a GSIS, o aumento de produtos gerados no metabolismo da glicose promoveria o aumento do volume celular, acarretando a abertura dos VRACs, com consequente efluxo de Cl^- e despolarização da membrana plasmática (BEST et al., 2010).

Por outro lado, a célula β pancreática possui também canais para Cl^- modulados por ligantes do tipo receptor de ácido gama-aminobutírico (GABA) do tipo A ($GABA_A$) (DONG et al., 2006). Em células da linhagem INS-1 foi verificado que, em baixa concentração de glicose, a adição de GABA promove efluxo de Cl^- e, em alta glicose, GABA promove influxo de Cl^- . Assim, na presença de alta glicose a adição de GABA afetaria a despolarização, reduzindo a $[Ca^{2+}]_i$ e a GSIS (DONG et al., 2006).

Dessa forma, os dados descritos por DONG et al., (2006) divergem claramente dos achados reportados por BEST et al., (2000), pois indicam que, durante a GSIS, a abertura de canais aniônicos promove influxo de Cl^- , enquanto os dados do grupo de BEST indicam que a abertura desses canais resulta no efluxo de Cl^- . Todavia, BRAUN et al., (2010) reportaram que, durante a GSIS, há efluxo de Cl^- em células β humanas via $GABA_A$, o que amplificaria a despolarização dessas células.

Outros dois canais cuja função conjunta foi relacionada com a GSIS foram os canais reguladores da condutância transmembrana de fibrose cística (CFTR) e anoctamina 1 (ANO1), que pertence ao grupo dos canais para ânions ativados por Ca^{2+} (EDLUND et al., 2014). Foi observado que durante a GSIS com o estímulo adicional de forskolina (um indutor do aumento de

AMP_c) a inibição da corrente de ânions gerada por esses canais promove redução da GSIS e da exocitose de grânulos (EDLUND et al., 2014). Esse efeito negativo sobre a secreção de insulina pelo bloqueio do CFTR também foi observado somente com o estímulo de glicose (GUO et al., 2014).

Além desses canais, tem sido demonstrada a importância dos transportadores aniônicos para a GSIS. Dentre esses, estão o cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ (NKCC) e transportadores de HCO_3^- , como o cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBC), o trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ impulsionado por Na^+ (NCBE) e o trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (AE) (PACE; TARVIN, 1983; SANDSTRÖM, 1990; SANDSTRÖM; SEHLIN, 1988).

A expressão do gene da isoforma 1 do NKCC (NKCC1) foi vista em células β pancreáticas de ratos (MAJID et al., 2001), em linhagens celulares, INS-1E e RIN-m5F (ALSHAHRANI; ALVAREZ-LEEFMANS; Di FULVIO, 2012), e em ilhotas pancreáticas de humanos (TANEERA et al., 2012). Além disso, foi verificada a presença da isoforma 2 do NKCC (NKCC2) nas linhagens celulares INS-1E e RIN-m5F (ALSHAHRANI; ALVAREZ-LEEFMANS; Di FULVIO, 2012). Ademais, há inferências de sua atividade em ilhotas pancreáticas pelo uso de diuréticos de alça que bloqueiam as isoformas NKCC1 e NKCC2, como furosemida e bumetanida, respectivamente (SANDSTRÖM, 1990; SANDSTRÖM; SEHLIN, 1988). Em camundongos ob/ob a adição de furosemida e bumetanida promoveu queda na permeabilidade da membrana ao Cl^- , no influxo de Ca^{2+} e na GSIS (SANDSTRÖM, 1990; SANDSTRÖM; SEHLIN, 1988). O mecanismo então proposto pelo que o NKCC influenciaria a GSIS é o de que, devido ao aumento de sua atividade na presença de alta concentração de glicose, esse transportador alteraria o potencial eletroquímico do Cl^- por aumentar sua concentração intracelular. Assim, na GSIS, durante a despolarização da membrana plasmática, a abertura de um canal aniônico promoveria o efluxo do ânion, favorecendo o processo de despolarização (BEST et al., 2010).

Em relação aos transportadores aniônicos envolvendo HCO_3^- foi observado em células β pancreáticas de camundongos que, durante a GSIS, a inibição no transporte de ânions pelo DIDS promove aumento na atividade elétrica dessas células (PACE; TARVIN, 1983). Foi sugerido que esse efeito despolarizante do DIDS seja devido à inibição de um AE (PACE; TARVIN,

1983). Esses dados são opostos aos dados de BEST e colaboradores (2000), que observaram efeito negativo do DIDS sobre a GSIS.

Esses dois trabalhos tiveram enfoques diferentes sobre o efeito do bloqueio do transporte de ânions pelo DIDS, em que BEST e colaboradores (2000) propuseram um mecanismo de transporte de ânions através de canais e PACE e TARVIN (1983) enfatizaram um possível efeito sobre um trocador. Observando os protocolos experimentais destes trabalhos, verificamos que as soluções utilizadas possuíam tipos diferentes de tamponamento. No estudo de PACE e TARVIN (1983), a solução é tamponada com HCO_3^- , portanto o efeito do DIDS poderia ser tanto sobre canais para Cl^- como transportadores aniônicos de HCO_3^- . Já no estudo de BEST et al., (2000), a solução utilizada foi tamponada com HEPES, portanto o efeito observado seria somente sobre transporte de ânions Cl^- através de canais, devido à ausência de HCO_3^- .

Em resumo dos mecanismos propostos na literatura (**figura 4**) vemos que pode haver uma relevância para a GSIS tanto de ânions Cl^- como de ânions HCO_3^- para esse processo. Além disso, acreditamos na hipótese de que se há importância desses dois ânions durante GSIS. A abordagem experimental utilizada em relação ao tipo de tamponamento pode influenciar o efeito desses ânions sobre a GSIS. Assim buscamos entender qual seria a importância do fluxo de ânions através membrana plasmática de células β pancreáticas para a GSIS levando em consideração a distribuição de HCO_3^- e Cl^- nos compartimentos extra e intracelular.

Figura 4 - Modelo dos mecanismos propostos para a importância do transporte de ânions para a GSIS. **A.** O metabolismo da glicose captada pode levar a um aumento da atividade do cotransportador NKCC, levando a um aumento na concentração de Cl⁻ intracelular e com isso alterando o potencial eletroquímico do Cl⁻ (μ_{Cl⁻}). Com essa alteração no μ_{Cl⁻}, a abertura de um canal para Cl⁻ iria resultar no efluxo desse ânion e com isso a uma despolarização da membrana. Um dos tipos de canais que pode estar envolvido nesse mecanismo são os VRACs que podem ter sua abertura modulada pelo aumento de metabólitos da glicose que aumentam a osmolaridade que por sua vez promove abertura desses canais. **B.** Neste outro modelo o metabolismo da glicose resultaria no aumento da concentração de H⁺ intracelular, resultando em uma acidificação. Essa acidificação promoveria inibição de um canal para K⁺ e com isso uma despolarização. Esse mecanismo seria contraregulado por um aumento no pH intracelular por meio de extrusão de H⁺ pelo trocador

Na^+/H^+ (NHE) ou por neutralização dos íons H^+ pelo HCO_3^- proveniente do AE.

2 OBJETIVO

O objetivo desse trabalho foi avaliar a importância do transporte aniônico através da membrana plasmática em células β pancreáticas para a GSIS observando aspectos de transporte por meio de proteínas canais e transportadoras e a possível contribuição distinta de ânions HCO_3^- e Cl^- nesse processo. Além disso, objetivou-se avaliar a importância da condutância de ânions para a via de amplificação da GSIS.

3 JUSTIFICATIVA

Devido à grande divergência na literatura sobre como o transporte de ânions na célula β pancreática poderia modular a GSIS e ao conhecimento parcial sobre como funciona a via de amplificação da GSIS, estudos novos a respeito desse fenômeno são necessários.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultura de células

Células INS-1E foram cultivadas em estufa a 37 °C contendo atmosfera com 5% CO₂ em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) (Cultilab, Campinas, São Paulo) contendo 11,1 mM glicose, 5% (v/v) soro fetal bovino (Gibco), 2 mM glutamina, 1 mM piruvato de sódio (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), 10 mM de HEPES-Na (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), 100 U/mL de penicilina (Gibco), 100 mg/mL de streptomicina (Gibco) e 47,61 mM NaHCO₃ (J.T.Baker). A manutenção da cultura foi semanal. Para o repique foi utilizado o método com tripsina (MERGLEN et al., 2004) e as passagens utilizadas foram entre 65 e 80.

4.2 Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem *Naval Medical Research Institute* (NMRI) criados no Biotério de Experimentação do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP) e C57/BL6, fornecidos pelo Biotério de Criação do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP) adultos, com idades variando entre 2 e 3 meses. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (cinco por gaiola) em ambiente com temperatura constante em torno de 23 ± 2 °C e sob ciclo de iluminação (claro/escuro) de 12/12 horas (acendimento das luzes artificiais às 7:00 horas), com livre acesso à água e a uma dieta padrão, ração comercial NUVILAB CR1, fornecida pela NUVITAL Nutrientes LTDA (Curitiba, PR, Brasil). Todos os procedimentos utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais em Experimentação (CEUA) (Protocolo nº

159/12) e estão de acordo com os princípios éticos adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL).

4.3 Soluções

Para o isolamento das ilhotas pancreáticas foi utilizada a solução tampão de Hanks (NaCl 137 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 1 mM, MgSO₄ 1 mM, Na₂HPO₄ 0,3 mM, KH₂PO₄ 0,4 mM, NaHCO₃ 4 mM, glicose 10 mM, 0,1% albumina, pH equilibrado para 7,4 com mistura de O₂/CO₂ 95:5 v/v e 280 mOsm/L). Para os experimentos de secreção estática de insulina e eletrofisiologia foram utilizadas as soluções tampão Krebs-Ringer-Hepes (KRH) (NaCl 118,5 mM, KCl 5 mM, NaH₂PO₄ 0,5 mM, MgSO₄ 0,5 mM, CaCl₂ 1,5 mM, HEPES-Na 24 mM, pH equilibrado para 7,4 com NaOH e 280 mOsm/L) ou com solução Krebs-Ringer-Bicarbonato (KRB) (NaCl 118,5 mM, KCl 5 mM, NaH₂PO₄ 0,5 mM, MgSO₄ 0,5 mM, CaCl₂ 1,5 mM, NaHCO₃ 24 mM, pH equilibrado para 7,4 com mistura de O₂/CO₂ 95:5 v/v e 280 mOsm/L) que corresponderam ao meio extracelular nesses experimentos. Nos experimentos de análise de corrente foi utilizada a solução KRH com modificações (NaCl 98,5 mM, TEA-Cl 20 mM, KCl 5 mM, NaH₂PO₄ 0,5 mM, MgSO₄ 0,5 mM, CoCl₂ 1,5 mM, HEPES-Na 24 mM 100 µM Tolbutamida, tetrodotoxina (TTX) 300 nM, pH equilibrado para 7,4 com NaOH e 280 mOsm/L). A solução correspondente ao meio intracelular utilizada nos experimentos de eletrofisiologia continha (em mM): 10 NaCl, 10 KCl, 1 MgCl₂, 76 K₂SO₄ e 5 HEPES (pH equilibrado para 7,35 com KOH e 300 mOsm/L). No experimento de secreção estática de insulina foi utilizada uma solução de álcool-ácido (etanol, H₂O deionizada, ácido clorídrico (HCl) fumegante 52:17:1 v/v/v) para extrair o conteúdo total de insulina das células. Para o experimento de radioimuno ensaio foi utilizado a solução tampão borato (H₃BO₃ 133,5 mM, NaOH 67,5 mM, pH equilibrado para 7,4 com HCl 10 N). Todos os sais utilizados nas soluções foram das marcas: Sigma-Aldrich (St Louis, MO), J.T.Baker, Mallinckrodt Chemicals (Irlanda) ou Synth (Diadema, SP)

4.4 Isolamento de ilhotas pancreáticas

A metodologia utilizada para o isolamento das ilhotas foi a digestão pancreática com collagenase proposta por Lacy and Kostianovsky (1967). O pâncreas insuflado por solução de collagenase tipo V (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) em tampão Hanks foi retirado do animal e colocado para digestão em banho-maria a 37 °C por 25 minutos. Após este período, as ilhotas pancreáticas foram coletadas e utilizadas para os experimentos de secreção estática. Para os experimentos de eletrofisiologia, as ilhotas coletadas foram dispersas em tripsina por 2,5 minutos a 37 °C e plaqueadas em placas de petri de plástico 35 x 10 mm CELL+ (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Alemanha) e cultivadas em atmosfera de 5% CO₂ a 37 °C em meio RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, São Paulo) suplementado com 10 % (v/v) de soro fetal bovino (Gibco), 2 mM de glutamina, 100 U/mL de penicilina (Gibco), 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco) e 10 mM glicose até o dia do experimento.

4.5 Secreção estática de insulina

Células INS-1E em placa de cultura de 24 poços contendo $1,5 \times 10^5$ células foram mantidas a 37 °C com meio de cultura RPMI sem glicose durante 2 horas antes do experimento.

No momento do experimento as células foram pré-incubadas com solução Krebs-Ringer-Bicarbonato (KRB) ou com solução Krebs-Ringer-Hepes (KRH), ambas contendo 2,8 mM de glicose por 30 minutos para se adaptarem ao novo meio. O mesmo procedimento de pré-incubação foi realizado para as ilhotas, quando grupos de 5 ilhotas de camundongos NMRI em tubos cônicos de plástico de 1,5 mL de capacidade passaram pelo mesmo processo. Após a pré-incubação o meio foi substituído por uma solução de KRB ou KRH com 2,8 ou 16,7 mM de glicose suplementada ou não com 100 µM de DIDS

(Sigma-Aldrich, St Louis, MO) em ambos tecidos ou também 100 μ M de furosemida (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) nos ensaios com células INS-1E durante 1 hora. Ao final da incubação foram coletados os sobrenadantes que, foram armazenados a -20 °C para posterior dosagem de insulina por radioimunoensaio. Para as ilhotas nos tubos e células aderidas na placa foi adicionada solução de álcool-ácido para extração do conteúdo total de insulina, também posteriormente dosado para insulina por radioimunoensaio.

4.6 Radioimunoensaio

Em tubos de ensaio de plástico com fundo redondo de 12 x 75 mm com capacidade para 5 mL (Labware Manufacturing Co, China) foram diluídas as amostras das secreções estática em tampão borato suplementado com 0,25% de albumina. Nessa mistura foram adicionadas quantidades conhecidas de anticorpo anti-insulina e de insulina marcada com iodo radioativo (125 I) (PerkinElmer, Turku, Finlândia). Tanto a insulina não-radioativa como a radioativa competem pelo mesmo local de ligação ao anticorpo. Portanto, quanto mais insulina não-radioativa presente na amostra, menos anticorpo se liga à insulina radioativa e vice-versa. Uma curva contendo quantidades conhecidas de insulina não-radioativa foi preparada da mesma maneira que as amostras, para que a quantidade de insulina em cada amostra possa ser mensurada. O complexo formado pela ligação do anticorpo com insulina Wfoi precipitado com soro de coelho e com polietilenoglicol (Synth, Brasil). A contagem da radiação nos tubos foi realizada em contador do tipo gama (PerkinElmer, Turku, Finlândia).

4.7 Eletrofisiologia

4.7.1 Atividade elétrica

Para a análise da atividade elétrica de células INS-1E foi utilizada a técnica de *current-clamp* utilizando a configuração *perforated patch* junto a um amplificador EPC-10 e o programa *Patch-master* (HEKA electronics; <http://www.heka.com>). As células foram perfundidas a 32 °C com solução KRB constantemente gaseada com mistura de O₂/CO₂ 95:5 v/v com a finalidade de manter o pH em valor de 7,4 ou com solução KRH, ambas contendo 2,8 ou 16,7 mM de glicose durante a realização do experimento. Para avaliar a função do transporte de ânions durante a atividade elétrica induzida por glicose em células β pancreáticas foram adicionados à perfusão 100 μ M de DIDS na solução contendo 16,7 mM de glicose. No dia do experimento era adicionado 260 μ M de Anfotericina B (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) na solução de pipeta com a finalidade de abrir poros na membrana da célula para que a pipeta de *patch* adquirisse acesso elétrico ao meio intracelular. As micropipetas de *patch* foram estiradas a partir de capilares de borosilicato em um sistema de dois estágios de aquecimento e posteriormente polidos em microforja, de forma que sua resistência ficasse por volta de 6-8 M Ω . A resistência em série máxima dos experimentos foi de 35 M Ω .

4.7.2 Análise de corrente aniônica

Para a análise das correntes aniônicas em células INS-1E foi utilizada a técnica de *voltage-clamp* utilizando a configuração *perforated patch* junto a um amplificador EPC-10 e o programa *Patch-master*. As células foram perfundidas a 32 °C com solução KRH onde foi substituído o CaCl₂ da solução por CoCl₂ com a finalidade de inibir as correntes de Ca²⁺. Foram adicionados

20 mM TEA-Cl para inibir canais para K^+ dependentes de voltagem, 100 μ M de tolbutamida para inibir os canais K_{ATP} e 300 nM de TTX para inibir os canais para Na^+ dependentes de voltagem. Com isso restariam as correntes de ânions. Além disso, a solução continha 2,8 ou 16,7 mM de glicose para avaliar a influência do metabolismo de glicose na corrente aniônica. Para avaliar a corrente de ânions sensível ao DIDS foi adicionada 100 μ M deste à solução. No dia do experimento foram adicionados 10 mg/mL de gramicidina D (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) na solução de pipeta com a finalidade de abrir poros na membrana da célula para que a pipeta de *patch* adquirisse acesso elétrico ao meio intracelular. Diferentemente da anfotericina B, a gramicidina D forma um poro na membrana que não conduz ânions, mantendo assim a concentração de Cl^- intracelular determinada pelo metabolismo. O protocolo aplicado consistiu em uma série de despolarizações de 10 mV, que foram aplicadas durante 500 ms a partir de uma voltagem de -100 mV até -30 mV. As micropipetas foram fabricadas da mesma maneira que no experimento de atividade elétrica e a resistência em série máxima dos experimentos foi de 35 M Ω .

4.8 Análise de expressão gênica

4.8.1 Extração de RNA de células INS-1E

Para que fosse realizada a extração do RNA, as células foram soltas da garrafa de cultura utilizando tripsina (Gibco). A tripsina foi neutralizada com a adição de meio RPMI e as células foram posteriormente lavadas com tampão PBS e colocadas em tubos de microcentrífuga livres de RNAase com 1,5 mL de capacidade. Em seguida foi adicionado a cada tubo contendo as células 1 mL de Trizol® Reagent (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA), os tubos foram homogeneizados em vortéx e ficaram por 5 minutos no gelo. Adicionou-se em cada amostra 0,5 mL de clorofórmio e as amostras foram novamente homogeneizadas em vortéx por 1 minuto. Essa mistura foi centrifugada

(5417R, Eppendorf, Alemanha) a 13000 g por 20 minutos a 4 °C. Em seguida, o sobrenadante aquoso foi transferido para uma nova série de tubos de microcentrífuga com 5 µg de glicogênio de ostra. As amostras foram deixadas em temperatura ambiente e em cada uma foi acrescentado 1 mL de isopropanol. Após misturá-las por inversão, as amostras foram acondicionadas a -80 °C, por um período de 12 horas.

Após esse período, as amostras foram levadas para a centrífuga durante 40 minutos a 4 °C e à velocidade de 12000 g, para a formação do precipitado. Após a centrifugação jogou-se fora o sobrenadante e adicionou-se ao precipitado 1 mL de álcool etílico gelado a uma concentração de 75%. A seguir as amostras foram levadas à centrífuga durante 5 minutos a 4 °C, à velocidade de 12000 g. O sobrenadante foi descartado e este procedimento foi novamente realizado. Após o descarte do sobrenadante foi adicionado 1 mL de álcool etílico absoluto gelado e as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas durante 40 minutos a 4 °C a 12000 g. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram deixadas por 10 min em temperatura ambiente, para que o álcool anteriormente adicionado evaporasse por completo. Após esse período, foram adicionados em cada amostra 10 µL de H₂O deionizada previamente tratada com DEPC (dietilpirocarbonato) para dissolução e armazenamento do precipitado a -80 °C

As amostras de RNA, foram quantificadas no NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, EUA). Os dados obtidos a partir dessa análise foram utilizados para calcular o volume necessário para se obter 10 µL de amostra RNA na concentração 1 µg/µL. Amostras com razão 260 nm/280 nm menor que 1,8 não foram utilizadas.

4.8.2 Obtenção de cDNA

Com o RNA extraído, mensurado e avaliado, o passo seguinte consistiu na obtenção do cDNA através da reação de transcriptase reversa. Para tal utilizou-se kit SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA). Em um tubo foram adicionados 1 µL da amostra contendo 1

μg de RNA, 1 μL de DNase (1U/μL), 1 μL de tampão da DNase 10 x e 7 μL de água DEPC (dietilpirocarbonato) para um volume final de 10 μL que ficou 15 minutos a 25 °C no termociclador SimpliAmp Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, California, EUA). Após os 15 minutos, os tubos foram retirados do termociclador e foi adicionado a cada tubo 1 μL de EDTA 25 mM que voltaram para o termociclador por 10 minutos a 65 °C para inibir a DNase. Os tubos foram novamente retirados do termociclador e neles foi adicionado 1 μL de primers randômicos que ficaram no termociclador por 10 minutos a 70 °C. Por fim os tubos foram novamente retirados do termociclador e a eles foram adicionados 4 μL de tampão RT 5 x, 1 μL de dNTP MIX 10 nM, após ficarem novamente no termociclador por 10 minutos a 25 °C, foram adicionados 2 μL de DTT 0,1 M. Os tubos foram então aquecidos por 2 minutos a 42 °C e por último foi adicionado aos tubos 1 μL da enzima Superscript III. Em seguida os tubos ficaram no termociclador por 50 minutos a 42 °C seguidos por 15 minutos a 70 °C.

Ao término da reação as amostras foram armazenadas a -20 °C.

4.8.3 Análise quantitativa da expressão gênica por reação em cadeia da polimerase (qPCR)

As amostras foram descongeladas em gelo e diluídas dez vezes em água Ultra-Pure™ Distilled Water (Gibco, EUA) para que chegassem à concentração de 5 ng/μL de cDNA. Para a preparação dos tubos utilizados na corrida de qPCR foram pipetados em cada tubo 2 μL de amostra e também 23 μL do mix, composto por: 12,5 μL de Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA), 9,5 μL de água Ultra-Pure, 0,5 μL de cada primer (sense e antisense, na concentração final de 10 μM), por cada gene investigado. O volume final por poço foi de 25 μL.

Os primers utilizados foram para os genes β-actina, Cftr, Slc4a2 (AE2), Slc4a4 (NBC), Slc4a10 (NCBE), Slc12a2 (NKCC1) e Tmem16a (Anoctamina 1). Estes foram desenhados a partir da sequência genômica de rato

disponível no GenBank® (NCBI – NIH, EUA). A tabela com a sequência genômica dos primers utilizados se encontra na Tabela 1.

Tabela 1 – Sequência dos primers utilizados.

Primer	NºAcesso	Sequências	Fragmento
β -actina	NM_031144.3	5' – GCATTGCTGACAGGATGCAG – 3' 5' – CCTGCTTGCTGATCCACATC – 3'	159 bp
Cftr	NM_031506.1	5' – TCAGTGCAAGTGACTGCGA – 3' 5' – TGCTTTCACGGGCATAGGT – 3'	89 bp
Slc4a2	NM_017048.2	5' – ATGGGCCTCACTGTCCTTC – 3' 5' – ATCTGCTCGACCACCTGATG – 3'	123 bp
Slc4a4	NM_053424.1	5' – TAGCTCTTGGGCACATGGAC – 3' 5' – CATTGGGTCGCCAAACTGGA – 3'	164 bp
Slc4a10	NM_178092.2	5' – AAGACACTGCAGAGCAAGGT – 3' 5' – CATTGGGCTCCCTGGTCTT – 3'	75 bp
Slc12a2	NM_031798.1	5' – TGGCAAGACTTCAACTCAGC – 3' 5' – TCCATCATCAAAAAGCCACCAG – 3'	157 bp
Tmem16a	NM_001107564.1	5' – AAGGCCAAGTACAGCATGGG – 3' 5' – ACCGTATTTCCACACTTCCG – 3'	87 bp

Lista dos primers utilizados, desenhados a partir das informações obtidas pela GenBank™ (NCBI – NIH, Bethesda, EUA), sendo informados também as sequências sense e antisense, além do tamanho dos fragmentos amplificados.

Fonte: NCBI – NIH, Bethesda, EUA.

Para a amplificação do material contido nos tubos, foi utilizado o termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden, Alemanha) com os seguintes parâmetros: etapa inicial de ativação da enzima mantendo as amostras a 95 °C por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram submetidas a 40 ciclos que incluíram a desnaturação a 95 °C por 30 segundos, seguida por anelamento dos *primers* a 60 °C por 30 segundos e a extensão a 72 °C por 30 segundos. Finalmente, após essa série de ciclos, as amostras foram submetidas a 1 ciclo para análise do *melting*, que consistiu em 65 °C por 90 segundos, seguido por um aumento gradativo da temperatura de 1 °C em 1 °C a cada 10 segundos até atingir 99 °C.

As curvas de melting e a quantificação do número de cópias de cada gene foram determinados pelo software do equipamento Rotor-Gene Q Series Software (Qiagen, Hilden, Alemanha).

Os resultados obtidos das amostras após a reação de qPCR foram normalizados pelo gene constitutivo β -actina.

4.9 Análise estatística

Foram utilizados os programas GraphPad Prism 6 e OriginPro 9.1 para a análise estatística. Os dados de secreção de insulina foram analisados no GraphPad Prism 6 sendo expressos como média $\pm$ erro padrão da média e analisados por análise de variância (ANOVA) de duas vias e pós-teste Bonferroni, com nível mínimo de significância de 95% (amostras significativamente diferentes se $p < 0,05$). Para os experimentos de eletrofisiologia foi utilizado o programa OriginPro 9.1 para as análises de atividade elétrica e os valores obtidos foram usados no GraphPad Prism 6 para a confecção dos gráficos. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média e analisados por teste *Wilcoxon*, com nível mínimo de significância 95% (amostras significativamente diferentes se $p < 0,05$). Os dados de corrente elétrica e qPCR foram analisados no GraphPad Prism 6, sendo expressos como média $\pm$ erro padrão da média e analisados por teste de *Wilcoxon*, com nível mínimo de significância 95% (amostras significativamente diferentes se $p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Canais e transportadores de ânions na GSIS

Para compreender a influência do transporte de ânions na GSIS foi realizado experimento de secreção estática de insulina utilizando o bloqueador de transporte aniônico DIDS. A solução utilizada foi tamponada com HEPES, com a finalidade de excluir o efeito do DIDS sobre transportadores aniônicos envolvendo bicarbonato. Foi constatado que o bloqueio do transporte aniônico promovido pelo DIDS em diferentes concentrações não promoveu alterações significativas na GSIS tanto em células INS-1E (**figura 5A**), como em ilhotas de camundongos (**figura 5B**).

Figura 5 - Secreção estática de insulina em células INS-1E (**A**) ou ilhotas de camundongo NMRI (**B**) expostas a 2,8 mM ou 16,7 mM de glicose na presença ou ausência de 100 ou 300 μ M de DIDS em soluções tamponadas com HEPES. Valores são médias $\pm$ EPM e número amostral indicado nas barras. Houve significância somente para o fator glicose **** p < 0,0001 ANOVA de 2 vias.

Devido a possibilidade de variações no pH_i pelo bloqueio de transportadores aniônicos envolvendo bicarbonato pelo DIDS (PACE; TARVIN, 1983) utilizamos a mesma manobra experimental da **figura 5**, porém

utilizando solução tamponada com HCO_3^- (**figura 6**), para avaliar o possível efeito do DIDS sobre o transporte de HCO_3^- . Interessantemente, mesmo com essa manobra experimental, a presença do DIDS também não promoveu alterações significativas na GSIS tanto em células INS-1E (**figura 6A**), como em ilhotas de camundongos (**figura 6B**). Dessa forma, o bloqueio do transporte de ânions tanto por canais (**figura 5**) quanto por transportadores (**figura 6**) não apresentou influência nem positiva nem negativa sobre a GSIS.

Figura 6 - Secreção estática de insulina em células INS-1E (**A**) ou ilhotas de camundongo NMRI (**B**) expostas a 2,8 mM ou 16,7 mM de glicose na presença ou ausência de 100 ou 300 μM de DIDS em soluções tamponadas

com HCO_3^- . Valores são médias $\pm$ EPM e número amostral indicado nas barras. Houve significância para o fator glicose *** $p < 0,001$ e interação $p < 0,05$ ANOVA de 2 vias.

5.2 Efeito da inibição do cotransporte $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ na GSIS

Visto que há relatos de modulações da GSIS por transporte de ânions e nossos dados até o momento mostram que esses mecanismos de transporte aniônico não interferem de maneira significativa na GSIS, buscamos realizar experimentos que demonstrassem se esse mecanismo realmente não interferiria na GSIS ou se a ausência de efeito do DIDS seja devido à inespecificidade da droga.

O NKCC é uma proteína cuja atividade possui relação com aumento nos níveis de Cl^- intracelular ($[\text{Cl}^-]_i$) e com isso modula o potencial eletroquímico do Cl^- . Portanto, seu bloqueio acarretaria em mudanças nesse potencial que, por sua vez, poderiam interferir na GSIS, como reportado por Sandström e Sehlin (1988). Para verificar se há alterações na GSIS promovida pelo bloqueio do NKCC, utilizamos seu bloqueador específico, furosemida, tanto em solução tamponada com HCO_3^- , como em solução tamponada com HEPES em experimento de secreção estática de insulina em células INS-1E (**figura 7**). Foi observado que a exposição às células INS-1E utilizando 100 μM de furosemida não promoveu alterações significativas na GSIS tanto em solução tamponada com HCO_3^- como em solução tamponada com HEPES.

Figura 7 - Secreção estática de insulina em células INS-1E expostas a 2,8 mM ou 16,7 mM de glicose na presença ou ausência de 100 μM de furosemida em soluções tamponadas com HCO_3^- (**A**) ou HEPES (**B**). Valores são médias $\pm$ EPM e número amostral indicado nas barras. Houve significância somente no fator glicose *** p<0,001 ANOVA de 2 vias.

5.3 Efeito de alterações na permeabilidade a ânions sobre a atividade elétrica de células β pancreáticas

Visto que alterando a permeabilidade a ânions utilizando fármacos durante a GSIS não é observada diferença significativa nos níveis de secreção de insulina, realizamos experimentos para observar como a atividade elétrica das células INS-1E seria alterada ou não frente à alteração na permeabilidade a ânions pela adição de DIDS tanto em soluções tamponadas com HCO_3^- ou com HEPES (**figuras 8 e 9**).

Figura 8 - Registro representativo da atividade elétrica em células INS-1E inicialmente expostas a 2,8 mM de glicose e 16,7 mM quando indicado nas barras e, além disso, foram adicionados 100 μM de DIDS também indicado

por barras em solução tamponada com HCO_3^- . As figuras **a** e **b** correspondem a uma expansão de 30 segundos do registro completo: exemplificando em maior resolução a atividade elétrica da célula β em 16,7 mM de glicose (**a**) 16,7 mM de glicose + 100 μM de DIDS (**b**).

Figura 9 - Registro representativo da atividade elétrica em células INS-1E inicialmente expostas a 2,8 mM de glicose e 16,7 mM quando indicado nas barras e, além disso, foram adicionados 100 μ M de DIDS também indicado por barras em solução tamponada com HEPES. As figuras **a** e **b** correspondem a uma expansão de 30 segundos do registro completo:

exemplificando em maior resolução a atividade elétrica da célula β em 16,7 mM de glicose **(a)** 16,7 mM de glicose + 100 μ M de DIDS **(b)**.

Em ambos registros é observado um padrão de atividade elétrica semelhante, onde durante a exposição a alta glicose há um período de cerca de 2 minutos de geração de potenciais de ação seguido por um período de repouso com cerca de 15 segundos tanto em solução tamponada com HEPES quanto em solução tamponada com HCO_3^- .

Tanto na **figura 8** como na **figura 9** qualquer alteração na permeabilidade a ânions provocada pelo DIDS aparentemente não ocasionou grandes consequências na atividade elétrica nas células gerada pela exposição a alta glicose em ambos tampões utilizados (**figuras 8a e 8b; 9a e 9b**). No entanto, há dados na literatura que indicam ou redução da atividade elétrica em tampão HEPES (BEST et al., 2000) ou aumento em tampão HCO_3^- (PACE; TARVIN, 1983) com o uso de DIDS. Dessa forma, foi feita uma análise quantitativa dos registros de atividade elétrica demonstrando a ausência de efeito com a aplicação de DIDS em nosso modelo experimental observando aspectos de frequência de potenciais de ação (**figura 10A e 10D**), voltagem máxima do pico de potencial de ação (**figura 10B e 10E**) e potencial basal da célula estimulada (**figura 10C e 10F**). Esses dados, apesar de contraditórios com os dados da literatura, fazem sentido quando correlacionados aos dados de secreção de insulina apresentados nas **figuras 5A e 6A**.

Figura 10 - Análise de picos correspondentes ao registro de atividade elétrica das **figuras 8** e **9** na presença de 16,7 mM de glicose e 16,7 mM de glicose + 100 μM de DIDS. Frequência de disparo de potenciais de ação em tampões (A) HCO_3^- e (B) HEPES. Média da voltagem máxima dos picos em tampões (C) HCO_3^- e (D) HEPES. Média do potencial basal das células em tampões (E) HCO_3^- e (F) HEPES. Valores são médias $\pm$ EPM, $n=2$ (A, C e E) e $n=4$ (B, D e F). Teste *Wilcoxon*.

Realizamos também a mesma manobra experimental em células primárias de camundongos C57/BL6 em uma situação mais fisiológica utilizando solução tamponada com HCO_3^- e verificamos que diferentemente da célula INS-1E, o padrão de geração de potenciais de ação é contínuo não intervalado (**figura 11**). Porém, assim como nas células INS-1E, não houve alterações significativas na atividade elétrica pela adição de 100 μM de DIDS, tanto qualitativamente (**figura 11**) quanto quantitativamente (**figura 12**).

Figura 11 - Registro representativo (4 células de 2 animais) da atividade elétrica em células β pancreáticas expostas a concentrações de glicose de 2,8 e 16,7 mM de glicose e 100 μ M de DIDS como indicado no gráfico. As figuras **a** e **b** correspondem a uma expansão de 30 segundos do registro completo:

exemplificando em maior resolução a atividade elétrica da célula β em 16,7 mM de glicose **(a)** 16,7 mM de glicose + 100 μ M de DIDS **(b)**.

Figura 12 - Análise de picos correspondentes ao registro de atividade elétrica da **figura 11** na presença de 16,7 mM de glicose e 16,7 mM de

glicose + 100 μM de DIDS. **(A)** Frequência de disparo de potenciais de ação. **(B)** Média da voltagem máxima dos picos. **(C)** Média do potencial basal das 2 células. Valores são médias $\pm$ EPM e $n=4$. Teste *Wilcoxon*.

5.4 Correntes aniônicas em células INS-1E

Visto que a adição de DIDS não promoveu alterações na atividade elétrica de células INS-1E tanto em solução tamponada com HEPES como em solução tamponada com HCO_3^- , buscamos observar as correntes para ânions existentes durante estímulo com glicose nessas células através da técnica de *voltage clamp* e se essas correntes possuem sensibilidade ao DIDS.

Foi visto que em células INS-1E expostas a 2,8 mM ou 16,7 mM de glicose há a presença de uma corrente aniônica, tanto na ausência quanto na presença de 100 μM de DIDS (**figuras 13 e 14**).

Figura 13 - Registro representativo das correntes aniônicas geradas pela aplicação do protocolo de despolarizações acima exemplificado em células

INS-1E expostas a 2,8 mM de glicose, na ausência (A) ou presença (B) de 100 μ M de DIDS.

Figura 14 - Registro representativo das correntes aniônicas geradas pela aplicação do protocolo de despolarizações acima exemplificado em células INS-1E expostas a 16,7 mM de glicose, na ausência (A) ou presença (B) de 100 μ M de DIDS.

Os dados obtidos nas **figuras 13** (n=2) e **14** (n=4) foram quantificados e com os valores geraram-se os gráficos da **figura 15**. Foi observado que as correntes aniônicas geradas por despolarizações entre -100 e -30 mV entre células expostas à baixa e alta glicose na presença ou ausência de DIDS não diferem muito entre si nas células INS-1E (**figura 15A**). Em relação às correntes aniônicas sensíveis ao DIDS foi observado que durante a GSIS estas são praticamente nulas (**figura 15B**).

Figura 15 - Análise quantitativa das correntes das **figuras 13 e 14**. Corrente aniônica total em células INS-1E expostas a 2,8 mM ou 16,7 mM de glicose na presença ou ausência de 100 μ M de DIDS (**A**). Correntes aniônicas sensíveis ao DIDS geradas pela subtração das correntes aniônicas totais

expostas a 2,8 mM ou 16,7 mM de glicose menos suas respectivas correntes na presença de 100 μ M de DIDS (**B**). Valores são médias $\pm$ EPM e n=2 para 2,8 mM de glicose; 2,8 mM de glicose + 100 μ M de DIDS e n=4 para 16,7 mM de glicose; 16,7 mM de glicose + 100 μ M de DIDS.

Utilizando os valores de corrente da **figura 15**, especificamente do intervalo de -80 a -60 mV, em que as correntes estão mais próximas do valor do potencial de reversão desta, foi realizada a regressão linear para o cálculo da condutância de ânions e do potencial de reversão dessa corrente. Neste caso o potencial de reversão corresponderia à corrente total de ânions. Porém, como o ânion mais abundante no sistema analisado é o Cl^- , consideramos este o equilíbrio do Cl^- (E_{Cl}).

Vimos que durante a GSIS não há grandes alterações no E_{Cl} (**Tabela 2**), onde temos que em 2,8 mM de glicose o E_{Cl} é de -69,93 ($\pm$ 0,767) mV e em 16,7 mM de glicose é de -70,02 ($\pm$ 1,285) mV.

Tabela 2 – Potencial de equilíbrio do Cl^-

E_{Cl}	Valor (mV) em 2,8 mM de Glicose	Valor (mV) em 16,7 mM de Glicose
Corrente total	-69,93 ($\pm$ 0,767)	-70,02 ($\pm$ 1,285)
Corrente sensível ao DIDS	-71,75 ($\pm$ 1,321)	-72,08 ($\pm$ 3,85)

Utilizamos este mesmo método para calcular o E_{Cl} das correntes de Cl^- sensíveis ao DIDS (**Tabela 2**) que foram semelhantes aos valores de corrente total sendo -71,75 ($\pm$ 1,321) mV em 2,8 mM de glicose e -72,08 ($\pm$ 3,85) em 16,7 mM de glicose.

Além disso, calculamos a concentração intracelular de Cl^- ($[\text{Cl}^-]_i$) nessas células durante o estímulo com glicose para observar se durante este há alguma alteração. Isso foi possível, pois utilizamos na solução de pipeta o antibiótico gramicidina D que forma poros impermeáveis ao Cl^- na membrana da célula, preservando assim a $[\text{Cl}^-]_i$ em níveis fisiológicos. Para o cálculo da $[\text{Cl}^-]_i$ foi utilizada a equação de Nernst (**equação 1**), onde foram utilizados os valores de E_{Cl} da **Tabela 2** e a concentração extracelular de Cl^- ($[\text{Cl}^-]_e$) foi calculada a partir dos componentes da solução utilizada (**figura 16**) que foram de 8,854 ($\pm 0,258$) mM em 2,8 mM de glicose e 8,823 ($\pm 0,424$) mM em 16,7 mM de glicose.

$$E_{\text{Cl}} = -R.T/z.F . \ln [\text{Cl}^-]_i/[\text{Cl}^-]_e$$

Equação 1 - Equação de Nernst. Para a constante dos gases (R) foi utilizado o valor de -8,31451 J/mol.K; para a temperatura (T) foi utilizado o valor de 305,15 K; para a valência do íon (z) foi utilizado o valor -1 e para a constante de Faraday (F) foi utilizado o valor de 96485 C.mol⁻¹.

Figura 16. Concentração intracelular de Cl^- ($[\text{Cl}^-]_i$) em células INS-1E expostas a 2,8 ou 16,7 mM de Glicose

5.5 Expressão gênica em células INS-1E

Visto que não houve efeito sobre a GSIS pela adição de DIDS ou furosemida sobre aspectos de secreção estática de insulina, atividade elétrica e corrente de Cl^- em células INS-1E e, além disso, há relatos sobre influência do uso dessas drogas sobre a GSIS na literatura (BEST et al, 2000; PACE; TARVIN, 1983; SANDSTRÖM; SEHLIN, 1988) utilizamos a técnica de qPCR para avaliar se há a presença de genes das proteínas envolvidas no transporte de ânions em nosso modelo experimental com a finalidade de avaliar se a ausência de efeito pela adição de DIDS ou furosemida observada é devida a uma possível ausência de expressão dessas proteínas.

Foi avaliada a expressão dos genes nas células INS-1E nas mesmas passagens utilizadas nos experimentos de secreção estática e eletrofisiologia. Dentre as proteínas avaliadas tivemos os transportadores sensíveis ao DIDS cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBC), trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ impulsionado por Na^+ (NCBE), trocador aniônico isoforma 2 (AE2), codificados respectivamente pelos genes *Slc4a4*, *Slc4a10* e *Slc4a2* (**figuras 17A-C**). Foi avaliada a expressão do gene *Slc12a2* que codifica o cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ isoforma 1 (NKCC1) sensível a furosemida (**figura 17D**). Foi também avaliada a presença dos canais reguladores da condutância transmembrana de fibrose cística (CFTR) e anoctamina isoforma 1 (ANO1) codificados pelos genes *Cftr* e *Tmem16a* (**figuras 17E-F**) que, apesar de não serem inibidos por DIDS nem por furosemida, estão relacionados com a GSIS (EDLUND et al, 2014). Observamos na **figura 17** que em células INS-1E somente não foi detectada a expressão dos genes *Cftr* e *Tmem16a*.

Figura 17 - Análise de expressão gênica em células INS-1E. **A.** Slc4a4. **B.** Slc4a10 **C.** Slc4a2 **D.** Slc12a2 **E.** Cftr **F.** Tmem16a. Valores são médias $\pm$ EPM e n=7 para INS-1E e para os controles positivos n=2 (córtex renal), n=4 (fígado) e n=1 (tireóide). Teste *Wilcoxon*

6 DISCUSSÃO

Nossos dados mostraram que, em ensaios de secreção estática de insulina, o bloqueio do transporte aniônico pelo DIDS não promoveu alterações na GSIS, independente do tipo de tamponamento, seja com HEPES ou HCO_3^- tanto em células INS-1E quanto em ilhotas de camundongos NMRI (**figuras 5 e 6**). Além disso, observando fenômenos elétricos que ocorrem durante a GSIS em células INS-1E, o bloqueio pelo DIDS não promoveu alterações nos parâmetros observados nem em solução tamponada com HCO_3^- (**figuras 10A, 10C e 10E**) como em solução tamponada com HEPES (**figuras 10B, 10D e 10F**) e ainda o padrão de atividade elétrica em ambas soluções foi semelhante (**figuras 8 e 9**). A adição de DIDS também não promoveu alterações nos parâmetros de atividade elétrica durante a GSIS em células β pancreáticas de camundongos (**figura 12**).

Considerando as hipóteses propostas para a importância do transporte de ânions para a GSIS mostradas na **figura 4**, nossos conjuntos de dados mostram que esse transporte não possui papel relevante neste fenômeno em células INS-1E.

Nossos dados contradizem a hipótese proposta por BEST et al., (2010), a qual sugere que os metabólitos provenientes do metabolismo da glicose promovem aumento do volume celular levando a abertura dos VRACs, onde, a abertura desses canais resultaria na saída de Cl^- favorecendo a despolarização celular induzida pela glicose. Isso, pois esses autores (BEST et al., 2000) haviam demonstrado que o bloqueio do transporte de Cl^- pelo DIDS cessa a atividade elétrica em células β pancreáticas durante a GSIS em solução tamponada com HEPES. Entretanto, apesar da hipótese proposta por BEST et al., (2010), nossos dados mostram que em células INS-1E o bloqueio do transporte de Cl^- utilizando DIDS frente ao estímulo com alta glicose em solução tamponada com HEPES não altera os níveis de secreção de insulina (**figura 5**), os parâmetros de atividade elétrica (**figuras 10B, 10D e 10F**), corrente de Cl^- (**figura 15**), E_{Cl} (**Tabela 2**) e $[\text{Cl}^-]_i$ (**figura 16**). Além disso, a condutância de Cl^- na célula INS-1E em alta glicose foi muito baixa, sendo de

0,00235 (+/- 0,000628) nS, portanto pode se sugerir que durante a GSIS em células INS-1E o transporte de Cl^- não possui relevância fisiológica neste fenômeno.

Nossos dados também contradizem outro estudo em que foi observado que a adição de quantidades crescentes de DIDS aumentava a atividade elétrica em células β de camundongos (PACE; TARVIN, 1983). Esse estudo contradiz também os dados do grupo de BEST et al., (2000) e, ao observar esses dois estudos vimos que o tampão que foi utilizado nas soluções era ou HEPES (BEST et al., 2000) ou HCO_3^- (PACE; TARVIN, 1983) e isso nos levou a pensar que o efeito do DIDS visto nestes estudos podia ter sido diferente devido ao tipo de tampão utilizado nas soluções, já que este bloqueia tanto canais como transportadores aniônicos. Ao realizar experimentos de secreção de insulina vimos que em tampão HCO_3^- não houve alterações na GSIS tanto em células INS-1E (**figura 6A**) quanto em células β de camundongos (**figura 6B**), assim como não houve alterações nos parâmetros de atividade elétrica tanto em células INS-1E (**figuras 10A, 10C e 10E**) nem em células β de camundongos (**figura 12**).

Visto que nossa hipótese inicial de que uma possível alteração na GSIS por inibição do transporte de ânions com DIDS em diferentes condições de tamponamento se mostrou incorreta em nosso modelo experimental, e considerando ainda os achados da literatura que demonstram que esse bloqueio prejudica (BEST et al., 2000) ou aumenta (PACE; TARVIN, 1983) a GSIS, observamos qual seria o efeito do bloqueio de uma proteína que modula os níveis de Cl^- intracelular, o NKCC, que é bloqueada por furosemida. Como o NKCC é uma proteína que aumenta a $[\text{Cl}^-]_i$, seu bloqueio acarretaria na redução desta, levando a uma alteração no fluxo de Cl^- e isso levaria a alterações na GSIS (BEST et al., 2010).

Foi reportado que em células β de camundongos ob/ob a adição de 100 μM de furosemida promoveu redução na GSIS e redução na captação de Cl^- nessas células em uma solução tamponada com HEPES (SANDSTRÖM; SEHLIN 1988). Realizamos então o experimento de secreção estática de insulina em células INS-1E utilizando a furosemida para ver se há algum efeito sobre a GSIS por alteração na $[\text{Cl}^-]_i$ causado pelo bloqueio do NKCC em soluções tamponadas com HEPES ou HCO_3^- (**figura 7**).

SANDSTRÖM e SEHLIN (1988) propuseram que a atividade do NKCC seria importante para concentrar o Cl^- no meio intracelular, e que frente ao estímulo de alta glicose isso contribuiria para a secreção de insulina. Posteriormente, BEST et al., (2010) associou a essa hipótese, o mecanismo de ativação dos VRACs pela alteração do volume celular, que favoreceria o efluxo de Cl^- e a despolarização da membrana plasmática (**figura 5A**). No entanto, nossos achados não dialogam com essas hipóteses, visto não encontrarmos alterações claras da GSIS nem pelo bloqueio do NKCC com furosemida e nem pelo bloqueio de proteínas transportadoras de ânions pelo DIDS.

Nossas análises funcionais resultaram em dados que foram contrários a nossa hipótese inicial, onde não foi demonstrada nenhuma possível importância do transporte aniônico para a via de amplificação da GSIS em nenhum dos tipos de tamponamento utilizados, visto que a inibição utilizando tanto DIDS como furosemida não alterou positivamente ou negativamente a GSIS em nenhum dos parâmetros observados. Porém, devido aos dados presentes na literatura que demonstram uma relevância para a GSIS do transporte aniônico, buscamos averiguar se nosso modelo experimental possuía expressão das proteínas transportadoras de ânions que podem estar relacionadas com a GSIS pela técnica de qPCR, e com isso compreender se em nosso modelo a ausência de efeito observada pela inibição do transporte aniônico é devido a ausência dessas proteínas ou se realmente esse mecanismo não possui relevância durante a via de amplificação da GSIS em células INS-1E.

Foi constatado que nas células INS-1E há a expressão de proteínas relacionadas com o transporte de HCO_3^- (**figuras 17A; 17B e 17C**), portanto pode se esperar que nos experimentos onde foi utilizado o tampão HCO_3^- a adição de DIDS poderia ter inibido estas proteínas, porém sem repercussões para a GSIS. A expressão do NKCC1 também foi detectada nas células INS-1E e com isso podemos sugerir que a inibição deste por furosemida que possivelmente levaria a uma redução no acúmulo de Cl^- intracelular também não compõe parte do mecanismo da via de amplificação da GSIS. Por fim verificamos que em nosso modelo não há expressão dos canais CFTR nem anoctamina 1 (ANO1).

Foi demonstrado por EDLUND e colaboradores (2014) que tanto o CFTR quanto a ANO1 são importantes para a GSIS, onde a inibição destes, seja individualmente ou conjunta, levou a prejuízos na GSIS tanto em ilhotas pancreáticas de camundongos NMRI quanto de humanos. Estes pesquisadores, porém, utilizaram um estímulo para a secreção de insulina com glicose e um indutor do aumento de AMP_c , que é um componente da via de amplificação da secreção de insulina, e viram que a inibição destes canais reduz somente o incremento secretório gerado pelo aumento de AMP_c , indicando que o papel do transporte de ânions para a via de amplificação da secreção de insulina pode estar relacionado também com o AMP_c .

Foi demonstrado também que com o estímulo para a secreção de insulina somente com glicose em ilhotas de camundongos C57/BL6 e células da linhagem RINm5F a adição de um inibidor específico para o CFTR resulta em prejuízos para a GSIS e redução da atividade elétrica gerada por alta glicose nessas células (GUO et al., 2014). Em células MIN6 também foi reportado prejuízo na GSIS pelo silenciamento do gene do CFTR (NTIMBANE et al., 2016). Um resultado semelhante foi visto também no mesmo modelo animal, porém utilizando um inibidor da ANO1, que reduziu a GSIS e a atividade elétrica nessas células (CRUTZEN et al., 2015). Portanto a ausência da expressão de CFTR e ANO1 nas células INS-1E pode ser o motivo de não haver grandes alterações na GSIS por inibição do transporte aniônico.

Esse modelo experimental, portanto, se mostrou incompleto para a hipótese proposta devido à ausência de CFTR e ANO1, que são proteínas que podem ser importantes para a GSIS. Porém, nele ainda há expressão dos transportadores de HCO_3^- NCBE; NBC e AE2, além da expressão do NKCC1, portanto, em relação a um possível efeito da inibição destas proteínas sobre a GSIS, este modelo poderia ser utilizado considerando que pode haver alguma diferença devido à ausência do CFTR e da ANO1.

7 CONCLUSÃO

Neste trabalho vimos que o transporte de ânions em células INS-1E não compõe parte da via de amplificação da GSIS. Entretanto acreditamos que esse mecanismo possa ser importante em outros tipos celulares que possuem expressão de CFTR e ANO1, já que na literatura há dados que demonstram muito bem a importância destes para a GSIS e nosso modelo não expressa essas proteínas. Ademais em nosso estudo mostramos que o transporte de ânions por proteínas transportadoras envolvendo HCO_3^- ou pelo NKCC não possuem papel relevante para a GSIS na célula INS-1E. Por fim, acreditamos que o papel de relevância fisiológica do transporte de ânions na via de amplificação da GSIS esteja mais atrelado ao CFTR e a ANO1 do que a proteínas transportadoras de ânions envolvendo HCO_3^- ou do NKCC, porém ainda são necessários mais estudos para esta hipótese.

REFERÊNCIAS*

ALSHAHRANI, S.; ALVAREZ-LEEFMANS, F. J.; Di FULVIO, M. Expression of the Slc12a1 gene in pancreatic β -cells: molecular characterization and in silico analysis. **Cell Physiol. Biochem.**, v. 30, n. 1, p. 95-112, 2012.

ÄMMÄLÄ, C.; ASHCROFT, F. M.; RORSMAN, P. Calcium-independent potentiation of insulin release by cyclic AMP in single beta-cells. **Nature**, v. 363, n. 6427, p. 356-358, maio. 1993.

ASHCROFT, F. M.; HARRISON, D. E.; ASHCROFT, S. J. Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells. **Nature**, v. 312, n. 5993, p. 446-448, dez. 1984.

BARG, S. et al. Priming of insulin granules for exocytosis by granular Cl(-) uptake and acidification. **J. Cell Sci.**, v. 114, p. 2145-2154, jun. 2001.

BARG, S. Mechanisms of exocytosis in insulin-secreting B-cells and glucagon-secreting A-cells. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 92, n. 1, p. 3-13, jan. 2003.

BEST, L. et al. Electrical activity in pancreatic islet cells: The VRAC hypothesis. **Islets**, v. 2, n. 2, p. 59-64, abr. 2010.

BEST, L. et al. Selective inhibition of glucose-stimulated beta-cell activity by an anion channel inhibitor. **J. Membr. Biol.**, v. 177, n. 2, p. 169-175, set. 2000.

BEST, L.; MILEY, H. E.; YATES, A. P. Activation of an anion conductance and beta-cell depolarization during hypotonically induced insulin release. **Exp. Physiol.**, v. 81, n. 6, nov. 1996.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BRAUN, M. Gamma-aminobutyric acid (GABA) is an autocrine excitatory transmitter in human pancreatic beta-cells. **Diabetes.**, v. 59, n. 7, jul. 2010.

BRISSOVA, M. et al. Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 53, n. 9, p. 1087-1097, set. 2005.

CRUTZEN, R. et al. Anoctamin 1 (Ano1) is required for glucose-induced membrane potential oscillations and insulin secretion by murine β -cells. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 468, n. 4, p. 573-591, 2016.

DACHICOURT, N. et al. Decreased glucose-induced cAMP and insulin release in islets of diabetic rats: reversal by IBMX, glucagon, GIP. **American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, v. 271, n. 4, p. E725-E732, 1996.

DEENEY, J. T.; PRENTKI, M.; CORKEY, B. E. Metabolic control of beta-cell function. **Semin. Cell. Dev. Biol.**, v. 11, n. 4, p. 267-275, ago. 2000.

DONG, H. et al. Gamma-aminobutyric acid up- and downregulates insulin secretion from beta cells in concert with changes in glucose concentration. **Diabetologia**, v. 49, n. 4, p. 697-705, abr. 2006.

EASOM, R. A. CaM kinase II: a protein kinase with extraordinary talents germane to insulin exocytosis. **Diabetes**, v. 48, n. 4, p. 675-684, abr. 1999.

EDLUND, A. et al. CFTR and Anoctamin 1 (ANO1) contribute to cAMP amplified exocytosis and insulin secretion in human and murine pancreatic beta-cells. **BMC. Med.**, v. 12, maio. 2014.

GEMBAL, M.; GILON, P.; HENQUIN, J. C. Evidence that glucose can control insulin release independently from its action on ATP-sensitive K⁺ channels in mouse B cells. **J. Clin. Invest.**, v. 89, n. 4, p. 1288-1295, abr. 1992.

GUO, J. H. et al. Glucose-induced electrical activities and insulin secretion in pancreatic islet β -cells are modulated by CFTR. **Nature communications**, v. 5, 2014.

HENQUIN, J. C. Regulation of insulin secretion: a matter of phase control and amplitude modulation. **Diabetologia**, v. 52, n. 5, p. 739-751, maio. 2009.

HENQUIN, J. C.; NENQUIN, M. Activators of PKA and Epac distinctly influence insulin secretion and cytosolic Ca^{2+} in female mouse islets stimulated by glucose and tolbutamide. **Endocrinology**, v. 155, n. 9, p. 3274-3287, set. 2014.

KINARD, T. A. et al. Chloride channels regulate HIT cell volume but cannot fully account for swelling-induced insulin secretion. **Diabetes**, v. 50, n. 5, p. 992-1003, maio. 2001.

KINARD, T. A.; SATIN, L. S. An ATP-sensitive Cl^- channel current that is activated by cell swelling, cAMP, and glyburide in insulin-secreting cells. **Diabetes**, v. 44, n. 12, p. 1461-1466, dez. 1995.

KRUEGER, K. A. Calcium-stimulated phosphorylation of MAP-2 in pancreatic betaTC3-cells is mediated by Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 43, p. 27464-27469, out. 1997.

LACY, P. E.; KOSTIANOVSKY, M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. **Diabetes**, v. 16, n. 1, p. 35-39, jan. 1967.

MACDONALD, P. E.; JOSEPH, J. W.; RORSMAN, P. Glucose-sensing mechanisms in pancreatic beta-cells. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v. 360, n. 1464, p. 2211-2225, dez. 2005.

MAJID, A. et al. Expression of the $\text{Na}^+\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ cotransporter in alpha and beta cells isolated from the rat pancreas. **Pflugers. Arch.**, v. 442, n. 4, p. 570-576, jul. 2001.

MATSUMOTO, K. et al. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and synapsin I-like protein in mouse insulinoma MIN6 cells. **Endocrinology**, v. 136, n. 9, p. 3784-3793. Set. 1995.

MATSUMOTO, K. et al. Cloning from insulinoma cells of synapsin I associated with insulin secretory granules. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 4, p. 2053-2059, jan. 1999.

MERGLEN, A. et al. Glucose sensitivity and metabolism-secretion coupling studied during two-year continuous culture in INS-1E insulinoma cells. **Endocrinology**, v. 145, n. 2, p. 667-678, 2004.

NESHER, R. et al. Beta-cell protein kinases and the dynamics of the insulin response to glucose. **Diabetes**, v. 51, n. 1, p. S68-S73, fev. 2002.

NEWGARD, C. B.; MCGARRY, J. D. Metabolic coupling factors in pancreatic beta-cell signal transduction. **Annu Rev Biochem.**, v. 64, p. 689-719, 1995.

NIELANDER, H. B. et al. Phosphorylation of VAMP/synaptobrevin in synaptic vesicles by endogenous protein kinases. **J. Neurochem.**, v. 65, n. 4, p. 1712-1720, out. 1995.

NTIMBANE, T. et al. CFTR silencing in pancreatic β -cells reveals a functional impact on glucose-stimulated insulin secretion and oxidative stress response. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 310, n. 3, p. E200-E212, 2016.

ORCI, L. Macro- and micro-domains in the endocrine pancreas. **Diabetes**, v. 31, n. 6, p. 538-565, jun. 1982.

PACE, T. S.; TARVIN J. T. pH modulation of glucose-induced electrical activity in B-cells: involvement of Na/H and HCO₃/Cl antiporters. **J. Membr. Biol.**, v. 73, n. 1, p. 39-49, 1983.

PRENTKI, M.; MATSCHINSKY, F. M.; MADIRAJU, S. R. Metabolic signaling in fuel-induced insulin secretion. **Cell. Metab.**, v. 18, n. 2, p. 162-185, ago. 2013.

PRENTKI, M.; TORNHEIM, K.; CORKEY, B. E. Signal transduction mechanisms in nutrient-induced insulin secretion. **Diabetologia**, v. 40, n. 2, p. S32-S41, jul. 1997.

RORSMAN, P.; BRAUN, M. Regulation of insulin secretion in human pancreatic islets. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 75, p. 155-179, 2013.

SANDSTRÖM, P.E. Bumetanide reduces insulin release by a direct effect on the pancreatic beta-cells. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 187, n. 3, p. 377-383, out. 1990.

SANDSTRÖM, P.E.; SEHLIN, J. Furosemide reduces insulin release by inhibition of Cl⁻ and Ca²⁺ fluxes in beta-cells. **Am. J. Physiol.**, v. 255, n. 5, p. E591-E596, nov. 1988.

SCHUIT, F. C. Is GLUT2 required for glucose sensing?. **Diabetologia**, v. 40, n. 1, p.104-111, jan. 1997.

SEINO, S. et al. Roles of cAMP signalling in insulin granule exocytosis. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 11, n. s4, p. 180-188, 2009.

SEINO, S.; SHIBASAKI, T.; MINAMI, K. Dynamics of insulin secretion and the clinical implications for obesity and diabetes. **The Journal of clinical investigation**, v. 121, n. 6, p. 2118-2125, 2011.

SÜDHOF, T. C.; ROTHMAN, J. E. Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. **Science**, v. 323, n. 5913, p. 474-477, jan. 2009.

TAKAHASHI, H. et al. Role of Epac2A/Rap1 signaling in interplay between incretin and sulfonylurea in insulin secretion. **Diabetes**, v. 64, n. 4, p. 1262-1272, 2015.

TANEERA, J. et al. γ -Aminobutyric acid (GABA) signalling in human pancreatic islets is altered in type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 57, n. 7, p. 1985-1994, jul. 2012.

THORENS, B. Molecular and cellular physiology of GLUT-2, a high-Km facilitated diffusion glucose transporter. **Int. Rev. Cytol.** v. 137, p. 209-238, 1992.

THORENS, B. et al. Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and beta-pancreatic islet cells. **Cell**, v. 55, n. 2, p. 281-290, out. 1988.

TUCKER, S. J. et al. Truncation of Kir6.2 produces ATP-sensitive K⁺ channels in the absence of the sulphonylurea receptor. **Nature**, v. 387, n. 6629, p. 179-183, maio. 1997.

VEGA-MONROY, M. L.; FERNANDEZ-MEJIA, C. Beta-cell Function and Failure in Type 1 Diabetes. In: WAGNER, D. **Type 1 Diabetes – Pathogenesis, Genetics and Immunotherapy**. 1. e

ZAWALICH, W. S.; BONNET-EYMARD, M.; ZAWALICH, K. C. Signal transduction in pancreatic beta-cells: regulation of insulin secretion by information flow in the phospholipase C/protein kinase C pathway. **Front Biosci**, v. 2, p. d160-72, 1997.