AMANDA SCHUKARUCHA GOMES

A alta concentração de glicose afeta a sinalização e o transporte de glicina em células secretoras de insulina?

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 Corrigida.

São Paulo
2019

RESUMO

SCHUKARUCHA GOMES, A. **A alta concentração de glicose afeta a sinalização e o transporte de glicina em células secretoras de insulina?** 2019. 50 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

As células β pancreáticas secretam insulina, um hormônio essencial para a homeostase glicêmica. Sua secreção é principalmente desencadeada por aumento na concentração extracelular de glicose, com deflagração de potenciais de ação, e é influenciada por vários neurotransmissores presentes nas ilhotas pancreáticas. Entre eles está a glicina, cujo papel nessas células só começou a ser elucidado recentemente. Os seus transportadores de membrana 1 (GlyT1) e 2 (GlyT2) medeiam a captação deste aminoácido do meio extracelular para o intracelular, o que afeta a sua disponibilidade nas vizinhanças da face extracelular da membrana plasmática. Portanto, os GlyTs podem modular de forma indireta a sinalização da glicina. Esse neurotransmissor age através de seus receptores ionotrópicos (GlyRs), os quais são canais iônicos ativados por ligante, seletivamente permeáveis ao íon cloreto. Os GlyRs são formados por diferentes combinações de suas 5 subunidades (α 1-4 e β). Já foi demonstrado que esses receptores estão presentes e são funcionais nas células β humanas, participando de uma retroalimentação positiva na secreção de insulina. Porém, viu-se que em ilhotas de doadores diabéticos os receptores de glicina possuem menor atividade. Não se sabe os mecanismos por trás desse achado. O objetivo deste trabalho foi investigar se a exposição crônica das células beta a diferentes concentrações de glicose, um fator presente no diabetes, é responsável por alterar a sinalização pelos GlyRs, através de mudanças em sua expressão e/ou em sua atividade. Para isso nós cultivamos a linhagem de células β INS-1E por 24 horas em concentrações de glicose 3 mM, 11.1 mM e 30 mM. Os tratamentos utilizados não influenciaram na viabilidade das células, verificada por citometria de fluxo. Nós quantificamos a expressão gênica dos GlyTs e das subunidades dos GlyRs, através de qPCR. A expressão das subunidades α 1, α 3 e β dos GlyRs não foi influenciada pelas diferentes concentrações de glicose utilizadas. Já a expressão dos GlyTs foi modulada pelas diferentes concentrações de glicose, com aumento relativo da expressão de GlyT1 em glicose 3 mM em relação às demais concentrações. Contrariamente, a expressão de GlyT2 acompanhou o aumento da concentração de

glicose no meio de cultivo. Entretanto, experimentos em que a condição de alta concentração de glicose foi comparada a um controle osmótico com adição equimolar de manitol sobre a concentração de glicose basal não demonstraram diferenças na expressão dos GlyTs entre essas condições, bem como à adição de anticorpo anti-insulina ao meio de cultivo. Nós registramos a corrente elétrica dessas células pela técnica de *whole-cell patch-clamp*, e encontramos indícios de correntes induzidas pela glicina. Portanto, demonstramos neste trabalho a expressão dos receptores e dos transportadores de glicina nas células INS-1E, e encontramos evidências eletrofisiológicas que indicam que os GlyRs são funcionais nessa linhagem, validando esse modelo celular para o estudo da regulação da secreção de insulina pela glicina. As alterações aqui relatadas na expressão dos transportadores de glicina com a variação da concentração de glicose parecem refletir uma resposta à alteração da osmolaridade, em lugar de uma resposta metabólica à glicose ou à sinalização de insulina.

Palavras-chave: Receptores de glicina. Transportadores de glicina. Células β . Células INS-1E. Concentração extracelular de glicose.

.

ABSTRACT

SCHUKARUCHA GOMES, A. **Does high glucose concentration affect the glycine signaling and transport in insulin secreting cells?** 2019. 50 p. Dissertation (Master's in Human Physiology) – Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2019.

The pancreatic β cells secrete insulin, an essential hormone for glucose homeostasis. Its secretion is elicited by an increase in the extracellular glucose concentration, with the triggering of action potentials, and can be influenced by various neurotransmitters found in the pancreatic islets. Among them is glycine, whose role in these cells was only recently unraveled. Its membrane transporters 1 (GlyT1) and 2 (GlyT2) mediate the cellular uptake of this amino acid from the extracellular to the intracellular compartment, which affects its disponibility in the vicinities of the extracellular plasma membrane. Therefore, the GlyTs can indirectly affect the glycine signaling. This neurotransmitter acts through its ionotropic receptors (GlyRs), which are ligand-gated ion channels, selectively permeable to the ion chloride. These channels can be composed by different combinations of its 5 subunits (α 1-4 and β). It has been demonstrated that these receptors are present and functional in human β cells, and they participate in a positive feedback loop during insulin secretion. However, in islets from diabetic donors, the GlyRs activity is diminished, and the mechanisms responsible for this difference are still unknown. Our study aimed to investigate if the exposure of the β cells to different glucose concentrations, a main feature of diabetes, is responsible for this difference in the physiological role of the GlyRs, through changes in its expression and/or its activity. For that we used the β cell line INS-1E, and cultivated these cells for 24 hours in 3 mM, 11.1 mM or 30 mM glucose. The treatments used did not affect the cell viability, measured by flow cytometry. We quantified the genetic expression of the GlyRs subunits and of the GlyTs, through qPCR. The gene expression of the GlyRs subunits α 1, α 3 and β was not influenced by the different glucose concentrations used. The GlyTs expression was modulated by the different glucose concentrations, with a relative increase in the expression of the GlyT1 in 3 mM glucose in comparison with the other concentrations. Conversely, the expression of the GlyT2 followed the increase of glucose concentration in the media. However, in experiments were the high glucose condition was compared to an osmotic control with the equimolar addition of mannitol to the basal glucose concentration, and with the

addition of anti-insulin antibody to the culture media, there was no difference in the expression of the GlyTs. We recorded the electric current of these cells through the *whole cell patch-clamp* technique, and found signs of glycine-induced currents. Therefore, we demonstrate in this work the expression of the glycine receptors and transporters, and we found electrophysiological evidence which indicates that the GlyRs are functional in the INS-1E cells. This validates this cell model for the study of the insulin secretion regulation by glycine. The alterations here reported in the expression of the GlyTs in the different glucose concentrations seem to reflect a response to the osmolarity changes, instead of a metabolic response to the glucose or to the insulin signaling.

Keywords: Glycine receptors. Glycine transporters. β cells. INS-1E cells. Extracellular glucose concentration.

1 INTRODUÇÃO

1.1 As células β e a secreção de insulina

As ilhotas pancreáticas são compostas por diferentes células endócrinas que mantêm a homeostase glicêmica do organismo. Suas principais células são as α , secretoras de glucagon, as β , secretoras de insulina, e as δ , secretoras de somatostatina. Essas células são eletricamente excitáveis, e sua secreção hormonal é desencadeada por potenciais de ação (Moriyama et al., 2003). As células das ilhotas podem modular a sua própria função através de interações autócrinas e/ou parácrinas entre si (Gammelsaeter et al., 2004, Hayashi et al., 2003, Moriyama et al., 2003).

A insulina é o principal hormônio hipoglicemiante do organismo, sendo que a sua secreção insuficiente para as necessidades corporais resulta em hiperglicemia. Essa é a principal característica do diabetes mellitus, uma doença com proporções epidêmicas atualmente (Rorsman; Braun, 2013).

A glicose é o principal estímulo para a secreção desse hormônio. Em situações fisiológicas, após a alimentação ocorre um aumento da glicemia, e a glicose plasmática é captada em maior quantidade pelas células β . Ao ser metabolizada, ela causa um aumento na concentração intracelular de ATP. Esse aumento na razão ATP/ADP promove o fechamento de canais para potássio dependentes de ATP (K_{ATP}). Com isso, os íons potássio, que antes seguiam um fluxo resultante do citoplasma para o meio extracelular por esses canais, passam a se acumular dentro da célula. Se o potencial de membrana for despolarizado até que seja atingido o limiar de excitabilidade, é desencadeado um potencial de ação decorrente da abertura de canais para sódio, para cálcio e para potássio dependentes de voltagem. A entrada de cálcio pelos seus canais leva a um aumento na concentração intracelular desse íon, o que promove a exocitose dos grânulos secretórios contendo insulina (Ashcroft; Rorsman, 2013). Portanto, a glicose acopla o metabolismo celular à atividade elétrica.

A regulação da secreção de insulina também é influenciada por outros metabólitos presentes na corrente sanguínea, como aminoácidos e lipídios (Newsholme et al., 2011, Rorsman; Braun, 2013), e por neurotransmissores presentes nas ilhotas pancreáticas (Allen, 2000, Satin; Kinard, 1998). Estes podem ser secretados pela inervação autonômica presente no pâncreas (Allen, 2000) ou pelas suas próprias células endócrinas (Hayashi et al., 2003, Moriyama et al., 2003). A perda

da sinalização adequada feita pelos neurotransmissores nas ilhotas já foi apontada como um dos fatores presentes no diabetes mellitus do tipo 2, e um possível alvo de tratamento para essa doença (Caicedo, 2013, Yan-Do et al., 2017, Marquard et al., 2015). Entre os neurotransmissores presentes nas ilhotas está a glicina, cujo papel nas células β só começou a ser elucidado recentemente.

1.2 Receptores e transportadores de glicina

A glicina é um aminoácido não-essencial, sintetizado a partir da serina. Além de ser um nutriente, ela possui um importante papel como neurotransmissor inibitório no sistema nervoso central, principalmente no tronco encefálico e na medula espinal (Betz; Laube, 2006). A base da ação da glicina como molécula sinalizadora é através de seus receptores ionotrópicos (GlyRs), os quais são canais iônicos ativados por ligante, permeáveis ao íon cloreto. Esses canais são pentâmeros que podem ser formados por diferentes arranjos de suas 5 subunidades, chamadas α 1-4 (expressas pelos genes *Gla*1-4, respectivamente) e β (expressa pelo gene *Glr*b). Os GlyRs são ancorados nas sinapses pela proteína gefirina, que se liga exclusivamente à subunidade β e conecta esses receptores ao citoesqueleto (Betz et al., 1999).

A estequiometria exata entre essas subunidades ainda é alvo de controvérsia. Alguns autores sugerem a estequiometria de $2\alpha : 3\beta$ (Yang et al., 2012, Grudzinska et al., 2005), e outros de $3\alpha : 2\beta$ (Durisic et al., 2012). As subunidades α 1-4 são capazes de formar receptores homoméricos funcionais em sistemas de expressão recombinante, mas a extensão da expressão fisiológica dos receptores nessa configuração ainda não é clara. A subunidade β é capaz apenas de formar receptores heteroméricos. Os estudos com receptores recombinantes mostraram que receptores homoméricos e heteroméricos possuem diferentes condutâncias (Lynch, 2009).

Nas sinapses glicinérgicas, a glicina é recaptada pelas células por dois subtipos de transportadores situados na membrana plasmática: o transportador de glicina 1 (GlyT1) e 2 (GlyT2). Ambos são cotransportadores eletrogênicos, sendo que o GlyT1 possui uma estequiometria de $2 \text{ Na}^+ : 1 \text{ Cl}^- : 1 \text{ glicina}$, enquanto a do GlyT2 é de $3 \text{ Na}^+ : 1 \text{ Cl}^- : 1 \text{ glicina}$. Já o transporte intracelular de glicina para as vesículas secretórias é feito pelo transportador vesicular de aminoácidos inibitórios (VIAAT), capaz de transportar também o neurotransmissor GABA (Eulenburg et al., 2005).

Em neurônios, a ativação de certas vias intracelulares é capaz de influenciar a atividade dos GlyRs através de sua fosforilação (Legendre, 2001, Caraiscos et al., 2002). Entre elas está a via da PI3K, que resulta na ativação da proteína Akt (Caraiscos et al., 2007), a via da PKA e a da PKC (Webb; Lynch, 2007).

Apesar de sua ação clássica como inibitória, já foi relatada a ação da glicina como excitatória em certos neurônios embrionários e adultos (Boehm et al., 1997, Kunz et al., 2012, Reichling et al., 1994). Quando a glicina se liga aos seus receptores, esses canais se abrem e aumentam a condutância da membrana pós-sináptica ao cloreto (Betz et al., 1999). Na maioria dos neurônios, como o potencial de equilíbrio do cloreto é mais negativo do que o potencial de membrana, ocorre um influxo resultante desse íon e uma hiperpolarização da célula. Porém, em células cujo potencial de equilíbrio do cloreto é mais positivo do que o potencial de membrana, ocorre um efluxo resultante desse íon quando esses canais são ativados, e uma consequente despolarização da membrana (Betz et al., 1999). Isso ocorre em células β humanas, nas quais o potencial de equilíbrio do cloreto é de -33 mV (Yan-Do et al., 2017), enquanto o potencial de repouso da membrana é de -70 mV (Rorsman; Braun, 2013).

1.3 Glicina nas células β

A glicina é considerada um biomarcador para o diabetes do tipo 2, uma vez que sua concentração plasmática é inversamente relacionada ao risco e à ocorrência dessa doença (Yan-Do et al., 2017). Além disso, a ingestão deste aminoácido melhora a tolerância à glicose e promove secreção de insulina (Gannon et al., 2002, Gonzalez-Ortiz et al., 2001). Nas ilhotas pancreáticas, esse neurotransmissor exerce uma sinalização autócrina nas células β . A glicina age diretamente nessas células através de seus receptores ionotrópicos, os quais estão presentes e são funcionais. Em ilhotas humanas, altas concentrações desse aminoácido são capazes de aumentar a secreção de insulina (Yan-Do et al., 2016).

Já foi demonstrado que as células β secretam glicina junto com a insulina. Portanto, esse neurotransmissor exerce uma retroalimentação positiva na secreção desse hormônio (Figura 1).

Figura 1 – Mecanismo de secreção de insulina estimulada pela glicose e o possível papel dos GlyRs nas células beta pancreáticas. Após a glicose entrar nas células β , ela é metabolizada e aumenta os níveis intracelulares de ATP, o que promove o fechamento dos K_{ATP} . Consequentemente, ocorre uma despolarização da célula, e se o limiar de excitabilidade for atingido é desencadeado um potencial de ação. Os canais para cálcio dependentes de voltagem se abrem, causando um aumento na concentração intracelular desse íon, o que resulta na exocitose das vesículas contendo insulina. A glicina secretada junto com a insulina age em seus receptores, causando um efluxo resultante do íon cloreto, o que aumenta a despolarização da célula.

A insulina, por sua vez, é capaz de potencializar a ação dos receptores ionotrópicos de glicina (Yan-Do et al., 2016), assim como acontece no sistema nervoso central (Caraiscos et al., 2007). Porém, em experimentos com ilhotas de doadores com diabetes do tipo 2, os receptores de glicina apresentaram correntes com menores amplitudes, e a insulina não foi capaz de potencializar sua atividade (Yan-Do et al., 2016). Ainda não se sabe conclusivamente o mecanismo por trás desse achado.

Um dos fatores presentes em todos os tipos de diabetes é a exposição crônica dos vários tecidos à alta concentração de glicose plasmática, a qual é capaz de alterar o funcionamento das células β de diversas maneiras (Brereton et al., 2014, Brereton et al. 2016). Desse modo, a hiperglicemia crônica poderia alterar a função dos receptores de glicina por algum mecanismo intracelular, como a via da PI3K, que é capaz de modular esses receptores no sistema nervoso central. Essa via poderia agir através da modulação da expressão (gênica ou proteica) dos GlyRs ou da diminuição de sua atividade, modificando assim a repercussão de sua atividade nas células β .

1.4 Justificativa

Apesar do papel fisiológico dos receptores de glicina nas células β ter sido estabelecido, ainda não se sabe o que causa a alteração do funcionamento desses receptores no diabetes. O presente projeto propõe investigar a hipótese de que a hiperglicemia seria o fator responsável por alterar a função desses receptores, contribuindo assim para o entendimento da sinalização desse aminoácido nas ilhotas pancreáticas. A sinalização por neurotransmissores se mostra um aspecto cada vez mais importante da fisiologia das células β e está emergindo como um novo alvo para o tratamento da diabetes melito. Utilizamos a linhagem INS-1E, onde encontramos previamente a expressão gênica dos GlyRs, para investigar esse fenômeno especificamente nas células β , sem a influência de possíveis fatores parácrinos advindos de outras células endócrinas presentes nas ilhotas pancreáticas.

6 CONCLUSÃO

- Constatamos que os tratamentos utilizados não influenciam na viabilidade, apoptose e morte celular;
- A expressão gênica dos GlyRs não foi modulada pelas diferentes concentrações de glicose usadas;
- A expressão dos GlyTs 1 e 2 foi alterada pela glicose. Entretanto, não houve diferença na expressão desses transportadores nas condições de glicose alta e glicose basal com concentração equimolar de manitol, o que sugere que as alterações sejam devido à mudança da osmolaridade e não de um efeito metabólico da glicose;
- Verificamos que as mudanças na expressão gênica dos GlyTs não foram mediadas pela concentração de insulina no meio;
- Encontramos evidências eletrofisiológicas que indicam que os GlyRs são funcionais nessa linhagem.

REFERÊNCIAS

ALLEN, B. Autonomic regulation of islet hormone secretion – implications for health and disease. **Diabetologia**, v. 43, p. 393–410, 2000.

ANDERSON, C. R.; STEVENS, C. F. Voltage clamp analysis of acetylcholine produced end-plate current fluctuations at frog neuromuscular junction. **The Journal of Physiology**, v. 235 (3), p.655-91, 1973.

ASHCROFT, F. M.; RORSMAN, P. KATP channels and islet hormone secretion: new insights and controversies. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 9, p. 660-669, 2013.

BETZ, H. et al. Structure and Functions of Inhibitory and Excitatory Glycine Receptors. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 868, p. 667–676, 1999.

BETZ, H.; Laube B. Glycine receptors: recent insights into their structural organization and functional diversity. **Journal of Neurochemistry**, v. 97, p. 1600–10, 2006.

BLODGETT, D. M. et al. Novel observations from next- generation RNA sequencing of highly purified human adult and fetal islet cell subsets. **Diabetes**, v. 64 (9), p. 3172–3181, 2015.

BOEHM, S. et al. Glycine receptors in cultured chick sympathetic neurons are excitatory and trigger neurotransmitter release. **Journal of Physiology**, v. 504, p. 683–694, 1997.

BRERETON M. F. et al. Reversible changes in pancreatic islet structure and function produced by elevated blood glucose. **Nature Communications**, v. 5 (4639), 2014.

BRERETON, M. F. et al. Hyperglycaemia induces metabolic dysfunction and glycogen accumulation in pancreatic β -cells. **Nature Communications**, v. 7 (13496), 2016.

CAICEDO, A. Paracrine and autocrine interactions in the human islet: More than meets the eye. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 24 (1), p. 11-21, 2013.

CARAISCOS, V. B. et al. Tyrosine kinases enhance the function of glycine receptors in rat hippocampal neurons and human $\alpha 1\beta$ glycine receptors. **Journal of Physiology**, v. 539 (2), p. 495–502, 2002.

CARAISCOS, V. B. et al. Insulin Increases the Potency of Glycine at Ionotropic Glycine Receptors. **Molecular Pharmacology**, v. 71(5), p. 1277-1287, 2007.

CARDOZO, A. K. et al. Cytokines Downregulate the Sarcoendoplasmic Reticulum Pump Ca^{2+} ATPase 2b and Deplete Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} , Leading to Induction of Endoplasmic Reticulum Stress in Pancreatic-Cells. **Diabetes**, v. 54 (2), p. 452-461, 2005.

DURISIC, N. et al. Stoichiometry of the Human Glycine Receptor Revealed by Direct Subunit Counting. **The Journal of Neuroscience**, v. 32 (37), p.12915–12920, 2012.

EULENBURG, V. et al. Glycine transporters: essential regulators of neurotransmission. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 30 (6), 2005.

GAMMELSAETER, R. et al. Glycine, GABA and their transporters in pancreatic islets of Langerhans: evidence for a paracrine transmitter interplay. **Journal of Cell Science**, v. 117, p. 3749-3758, 2004.

GANNON, M. C., Nuttall, J. A., Nuttall, F. Q. The metabolic response to ingested glycine. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76 (6), p. 1302–1307, 2002.

GONZALEZ-ORTIZ, M. et al. Effect of glycine on insulin secretion and action in healthy first-degree relatives of type 2 diabetes mellitus patients. **Hormone and Metabolic Research**, v. 33 (6), p. 358–360, 2001.

GRUDZINSKA, J. et al. The β Subunit Determines the Ligand Binding Properties of Synaptic Glycine Receptors. **Neuron**, v. 45 (5), p. 727-739, 2005.

HALL, E. et al. The effects of high glucose exposure on global gene expression and DNA methylation in human pancreatic islets. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 472, p. 57-67, 2018.

HAYASHI, M. et al. Secretory granule-mediated co-secretion of L-glutamate and glucagon triggers glutamatergic signal transmission in islet of Langerhans. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 1966–1974, 2003.

KUNZ, P. A. et al. Glycine receptors support excitatory neurotransmitter release in developing mouse visual cortex. **Journal of Physiology**, v. 590, p. 5749–5764, 2012.

LI, J. et al. Single-cell transcriptomes reveal characteristic features of human pancreatic islet cell types. **EMBO Rep**, v. 17 (2), p.178–187, 2016.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25 (4), p. 402-8, 2001.

MERGLEN, A., et al. Glucose Sensitivity and Metabolism-Secretion Coupling Studied during Two-Year Continuous Culture in INS-1E Insulinoma Cells. **Endocrinology**, v. 145 (2), p. 667-678, 2004.

MORIYAMA, Y., Hayashi, M. Glutamate-mediated signaling in the islets of Langerhans: a thread entangled. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 24 (10), p. 511-517, 2003.

NEWSHOLME, P. et al. Amino acids and diabetes: implications for endocrine, metabolic and immune function. **Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)**, v. 16, p. 315-39, 2011.

PASQUEL, F. J.; UMPIERREZ, G. E. Hyperosmolar Hyperglycemic State: A Historic Review of the Clinical Presentation, Diagnosis, and Treatment. **Diabetes Care**, v. 37, p. 3124–3131, 2014.

REICHLING, D. B. et al. Mechanisms of GABA and glycine depolarization-induced calcium transients in rat dorsal horn neurons. **Journal of Physiology**, v. 476, p. 411–421, 1994.

RORSMAN, P.; BRAUN, M. Regulation of insulin secretion in human pancreatic islets. **Annual Review of Physiology**, v. 75, p. 155-179, 2013.

SATIN, L.S.; KINARD, T.A. Neurotransmitters and their receptors in the islets of Langerhans of the pancreas. **Endocrine**, v. 8, p. 213–223, 1998.

SEGERSTOLPE, A. et al. Single-cell transcriptome profiling of human pancreatic islets in health and type 2 diabetes. **Cell Metabolism**, v. 24 (4), p. 593–607, 2016.

STEEVES, C. L.; BALTZ, J. M. Regulation of intracellular glycine as an organic osmolyte in early preimplantation mouse embryos. **Journal of Cellular Physiology**, v. 204, p. 273-279, 2005.

STEEVES, C. L. et al. The glycine neurotransmitter transporter GLYT1 is an organic osmolyte transporter regulating cell volume in cleavage-stage embryos. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100 (24), p. 13982-13987, 2003.

THASTRUP, O. et al. Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca^{2+} stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, p. 2466-2470, 1990.

TREIMAN, M. et al. A tool coming of age: thapsigargin as an inhibitor of sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 19 (4), p. 131-135, 1998.

UMPIERREZ, G.; KORYTKOWSKI, M. Diabetic emergencies — ketoacidosis, hyperglycaemic hyperosmolar state and hypoglycaemia. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 12, p. 222–232, 2016.

WANG, Y. J. et al. Single-cell transcriptomics of the human endocrine pancreas. **Diabetes**, vol. 65 (10), p. 3028–3038, 2016.

WIECZOREK D., et al. Methods of RNA Quality Assessment. [Internet] 2012. Disponível em: <http://www.promega.com.br/resources/pubhub/methods-of-rna-quality-assessment/>. Acesso em 20 de setembro de 2019.

XIN, Y. et al. RNA sequencing of single human islet cells reveals type 2 diabetes genes. **Cell Metabolism**, v. 24 (4), p. 608–615, 2016.

YAN-DO, R. et al. A Glycine-Insulin Autocrine Feedback Loop Enhances Insulin Secretion From Human β -Cells and Is Impaired in Type 2 Diabetes. **Diabetes**, v. 65 (8), p. 2311-2321, 2016.

YAN-DO, R.; MACDONALD, P. E. Impaired “Glycine”-mia in Type 2 Diabetes and Potential Mechanisms Contributing to Glucose Homeostasis. **Endocrinology**, v. 158 (5), p. 1064-1073, 2017.

YANG, Z. et al. Stoichiometry and Subunit Arrangement of $\alpha 1\beta$ Glycine Receptors as Determined by Atomic Force Microscopy. **Biochemistry**, v. 51, p. 5229–5231, 2012.