

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

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. 73 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. 73 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.

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.

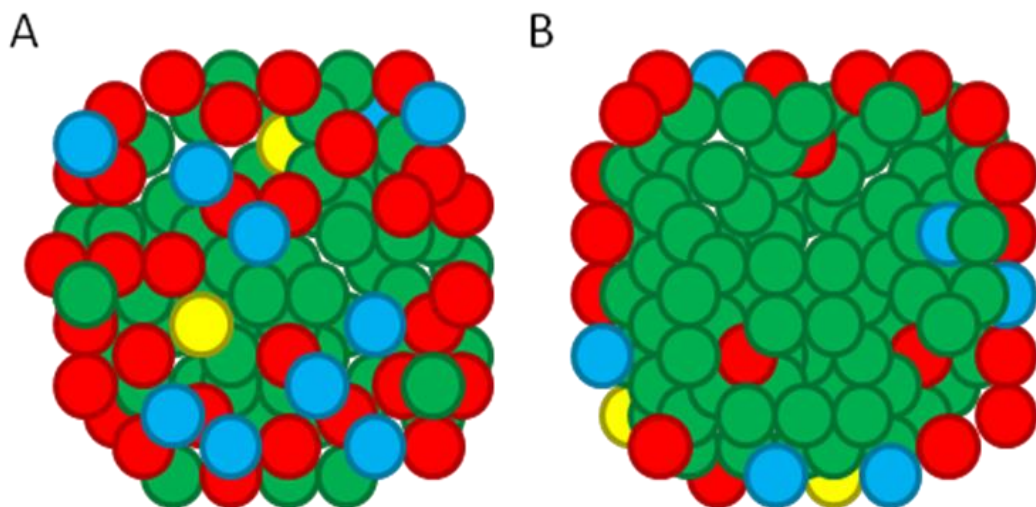


Figura 1 - Estrutura de uma ilhota pancreática contendo os quatro tipos celulares: β (verde), α (vermelha), δ (azul) e PP (amarela). **A.** Ilhota humana

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).

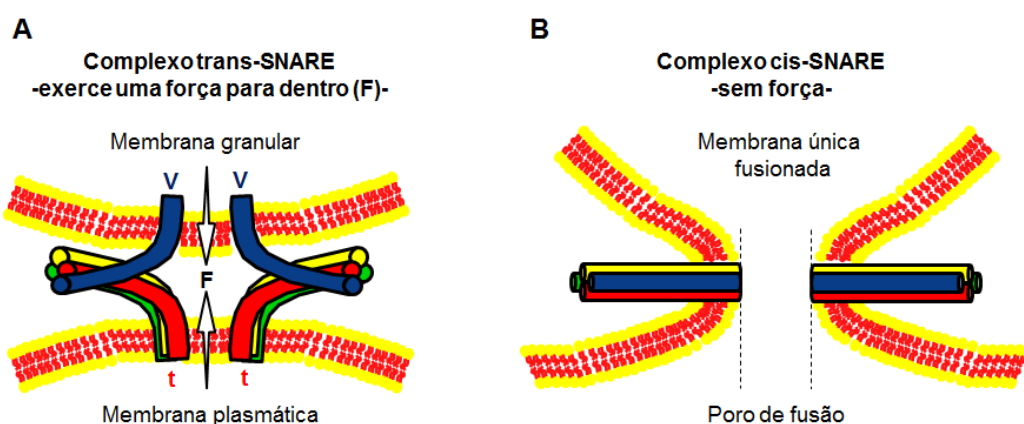


Figura 2 - Modelo de fusão de membranas catalisado por SNAREs. **(A)** A formação do complexo de 4 hélices trans-SNARE ou SNAREpin ocorre por união das 3 hélices ancoradas na membrana plasmática (t-SNARE) com a hélice presente na membrana do grânulo (v-SNARE). Esse complexo de 4 hélices gera forças vetoriais 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).

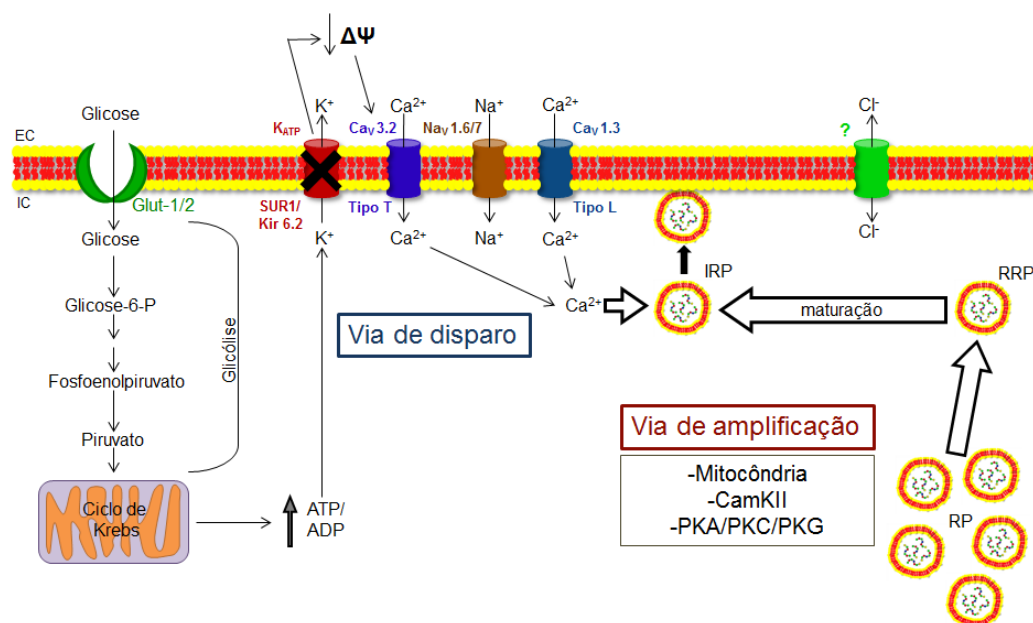


Figura 3 - Esquema das vias de disparo e amplificação da secreção de insulina (Adaptado de VEGA-MONROY; FERNANDEZ-MEJIA, 2011).

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 excitação 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 excitação, 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 conseqüente 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 Na⁺/K⁺/2Cl⁻ (NKCC) e transportadores de HCO₃⁻, como o cotransportador Na⁺/HCO₃⁻ (NBC), o trocador Cl⁻/HCO₃⁻ impulsionado por Na⁺ (NCBE) e o trocador Cl⁻/HCO₃⁻ (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 (ALSHAHRI; 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 (ALSHAHRI; 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 Ca²⁺ 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 HCO₃⁻ 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.

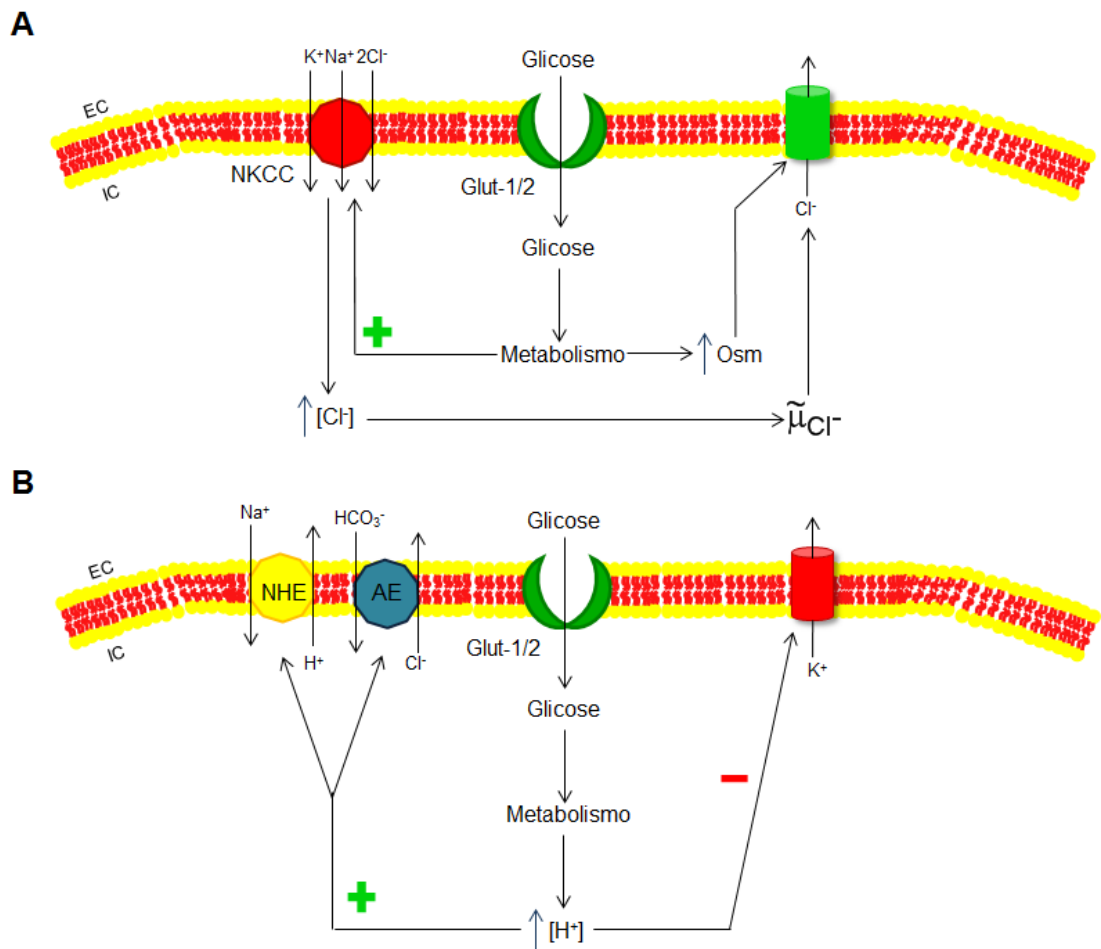


Figura 4 - Modelo dos mecanismos propostos para a importância do transporte de ânions para a GSIS. **A.** O metabolismo da glicose captada pode levar a um aumento da atividade do cotransportador NKCC, levando a um aumento na concentração de Cl⁻ intracelular e com isso alterando o potencial eletroquímico 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.

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 $Na^+K^+-2Cl^-$ 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.

MERGLIN, 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-K_m 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.