

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.

São Paulo
2019

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

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Schukarucha Gomes, Amanda

A alta concentração de glicose afeta a sinalização e o transporte de glicina em células secretoras de insulina? / Amanda Schukarucha Gomes; orientador Fernando Rodrigues de Moraes Abdulkader. -- São Paulo, 2019.

50 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Receptores de glicina. 2. . Transportadores de glicina. 3. Células beta. 4. Células INS-1E. 5. Concentração extracelular de glicose. I. Rodrigues de Moraes Abdulkader, Fernando, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato (a): Amanda Schukarucha Gomes

Título da Dissertação/Tese: A alta concentração de glicose afeta a sinalização e o transporte de glicina em células secretoras de insulina?

Orientador: Prof. Dr. Fernando Rodrigues de Moraes Abdulkader

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o (a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



3113

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº 901/2017 referente ao projeto intitulado: *"Papel da hiperglicemia na atividade dos receptores de glicina em células secretoras de insulina"* sob a responsabilidade de *Amanda Schukarucha Gomes* e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) *Fernando Rodrigues de Moraes Abdulkader*, do Departamento de Fisiologia e Biofísica, foi analisado pela CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais e pelo CEPESH - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466 de 2012.

São Paulo, 21 de agosto de 2017.

Luciane V. Sita
Profª. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora CEUA ICB/USP

Camila Squarzoni Dale
Profª. Dra. **Camila Squarzoni Dale**
Coordenadora CEPESH ICB/USP



AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Fernando, que sempre me apoiou e me incentivou imensamente. Muito obrigada por ter me ensinado tanto durante todos esses anos, e pela confiança sempre depositada em mim.

À professora Silvana Bordin, que sempre me deu todo o apoio necessário e sempre esteve disponível para me ajudar e tirar todas as minhas dúvidas.

À professora Carla e ao professor Ângelo, pelas colaborações.

À Andressa, que me ajudou imensamente não só com os experimentos, mas com sua companhia no dia a dia.

Ao Gilson Murata, que muito me ensinou desde a minha iniciação científica.

Aos meus companheiros de laboratório Carol Chaves, Frhan, Sandro, Carol Deleffe, Larissa, Davidson, Vivi, e todos os colegas dos laboratórios 101, 105 e 117.

À Patrícia por ter me ajudado muito com os experimentos de viabilidade.

À minha família, minha mãe Sônia e meu irmão Alexandre, por terem sempre acreditado em mim e no meu potencial.

Aos meus amigos Maria Rita, Felipe e Francisco, por sempre estarem presentes me apoiando.

Ao Zé Maria e Paloma da secretaria da pós-graduação da Fisiologia, pela ajuda com todas as questões burocráticas.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro, processo número 160314/2017-8.

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.

LISTA DE ABREVIATURAS

α	Alfa
β	Beta
δ	Delta
ADP	Adenosina difosfato
Akt	Proteína quinase B
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina do soro bovino
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CO ₂	Gás carbônico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GlyRs	Receptores de glicina
GlyT1	Transportador de glicina 1
GlyT2	Transportador de glicina 2
K _{ATP}	Canal para potássio sensível ao ATP
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
mM	Milimolar
mV	Milivolts
Pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
qPCR	Reação da cadeia da polimerase quantitativa
RNA	Ácido ribonucleico
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>

<i>rRNA</i>	Ácido ribonucleico ribossomal
TBE	Tris/Borato/EDTA
TBST	Salina Tris tamponada com Tween
VIAAT	Transportador vesicular de aminoácidos inibitórios

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismo de secreção de insulina estimulada pela glicose.....	18
Figura 2 - Registro das flutuações de corrente na placa motora.....	26
Figura 3 - Viabilidade celular.....	29
Figura 4 - Apoptose e morte celular.....	30
Figura 5 - Expressão gênica das subunidades dos GlyRs.....	32
Figura 6 - Expressão gênica do GlyT1.....	34
Figura 7 - Expressão gênica do GlyT2.....	35
Figura 8 - Registro representativo da corrente elétrica na presença da glicina.....	36
Figura 9 - Valor quadrático médio das correntes registradas.....	37
Figura 10 – Expressão dos GlyRs e dos GlyTs nas células INS-1E.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequências de bases dos primers utilizados.....	24
Tabela 2 - Secreção de insulina nas células incubadas com glicose 11.1 mM.....	38
Tabela 3 - Secreção de insulina nas células incubadas com glicose 30 mM.....	39

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 As células β e a secreção de insulina.....	15
1.2 Receptores e transportadores de glicina	16
1.3 Glicina nas células β	17
1.4 Justificativa.....	19
2 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo Geral	20
2.2 Objetivos específicos	20
3 MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 Cultivo das células.....	21
3.2 Teste de viabilidade celular.....	21
3.3 Extração de RNA	22
3.4 Síntese de cDNA	23
3.5 Reações de qPCR	23
3.6 Eletrofisiologia	24
3.7 Secreção de insulina.....	26
3.8 Análise estatística	27
4 RESULTADOS	28
4.1 Teste de Viabilidade Celular	28
4.2 Expressão gênica	31
4.2.1 Expressão gênica das subunidades do receptor de glicina (GlyR)	31
4.2.2 Expressão gênica dos transportadores de glicina (GlyT)	33
4.3 Medidas de corrente elétrica por <i>patch-clamp</i>	36
4.4 Secreção de insulina.....	38
5 DISCUSSÃO	40
6 CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS	46

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 $2 \text{ Na}^+ : 1 \text{ Cl}^- : 1$ glicina, enquanto a do GlyT2 é de $3 \text{ Na}^+ : 1 \text{ Cl}^- : 1$ 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).

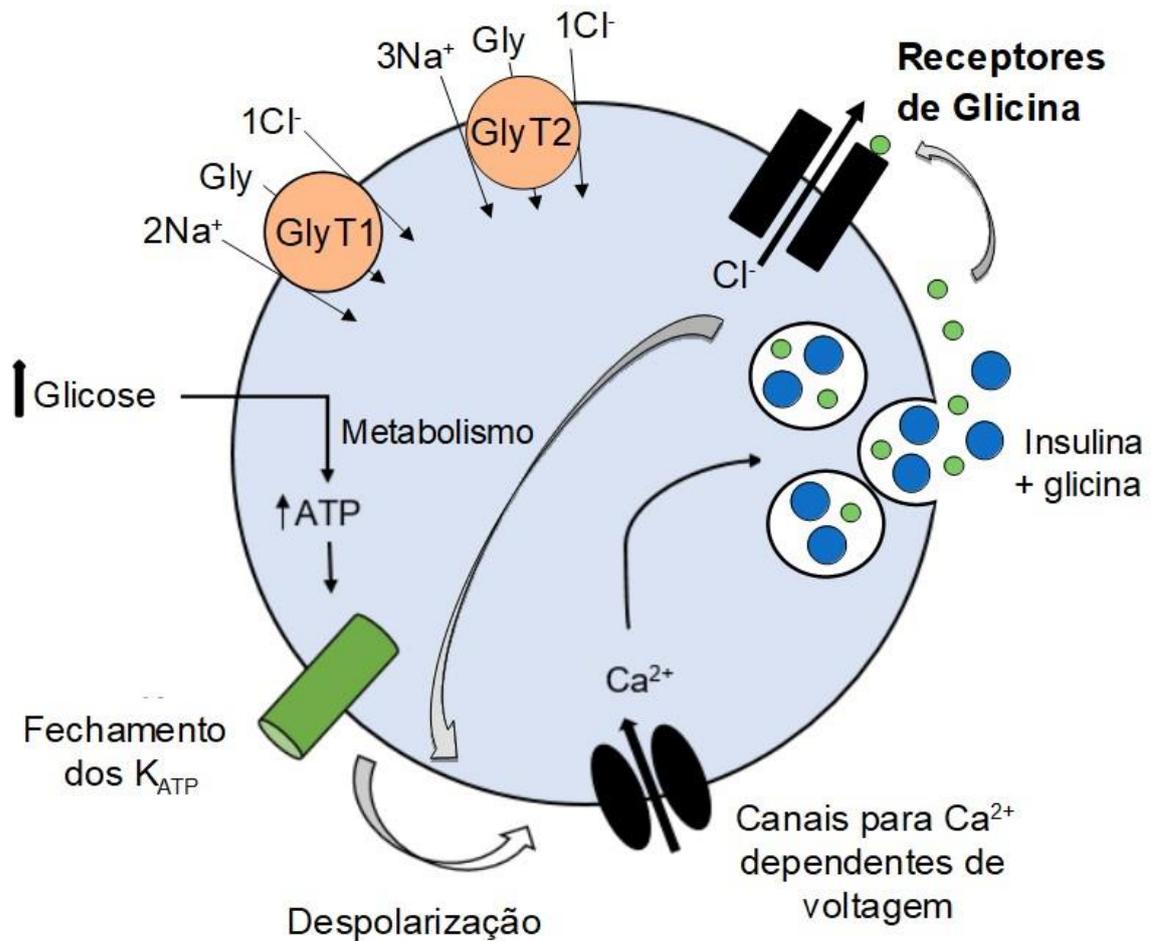


Figura 1 – Mecanismo de secreção de insulina estimulada pela glicose e o possível papel dos GlyRs nas células beta pancreáticas. Após a glicose entrar nas células β , ela é metabolizada e aumenta os níveis intracelulares de ATP, o que promove o fechamento dos K_{ATP} . Consequentemente, ocorre uma despolarização 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.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Verificar se a exposição da linhagem INS-1E a diferentes concentrações de glicose é capaz de alterar a atividade e/ou a expressão dos receptores de glicina nessas células, e se essas possíveis alterações são mediadas pela concentração de insulina no meio.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar a viabilidade das células após o cultivo de 24 horas nas diferentes condições;
- Quantificar a expressão gênica dos receptores de glicina e de seus transportadores nas células INS-1E cultivadas por 24 horas em diferentes concentrações de glicose e na presença de anticorpo inativador de insulina;
- Medir as correntes dos receptores de glicina nas células INS-1E cultivadas em diferentes concentrações de glicose por 24 horas;
- Verificar a secreção de insulina na presença da glicina e do inibidor de seu receptor, a estricnina, em células cultivadas em diferentes concentrações de glicose.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultivo das células

As células da linhagem INS-1E (gentilmente cedidas pelo Prof. Pierre Maechler, Université de Genève, Suíça) foram cultivadas entre as passagens 63 e 85 em garrafas de 25 cm² (BD Biosciences, Bedford, MA., EUA), as quais permaneceram em uma estufa a 37°C com atmosfera de 5% CO₂. Cada garrafa foi mantida com 1·10⁶ células e 5 mL de meio RPMI-1640 (Gibco, Waltham, MA., EUA), contendo 11.1 mM glicose e suplementado com: 5% de soro fetal bovino (Gibco), 100 mM de piruvato de sódio (Sigma-Aldrich, St Louis, MO., EUA), 3.4 µM ditiotreitol (DTT) (Sigma-Aldrich), 11.9 mM de NaHCO₃ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ., EUA), 100u/mL de penicilina (Gibco) e 100 mg/mL de estreptomicina (Gibco). O subcultivo foi feito a cada 7 dias, e o meio trocado por um novo a cada 2 dias.

O cultivo habitual da linhagem INS-1E é feito no meio RPMI 1640 com glicose na concentração de 11.1 mM (Merglen et al., 2004). Para os tratamentos, esse meio foi utilizado com glicose (Sigma-Aldrich) nas concentrações de 3 mM e 30 mM por 24 horas previamente aos experimentos. Foi também feito o cultivo por 24 horas em glicose 11.1 mM com 18.9 mM de manitol (Sigma-Aldrich), usado como um controle osmótico, e em glicose 30 mM com anticorpos anti-insulina gerados em cobaia (doação da Dr. Leclercq-Meyer, Université Libre de Bruxelles), na diluição de 1:500. Os anticorpos anti-insulina foram utilizados para se garantir que os efeitos vistos são resultantes da hiperglicemia e não da grande quantidade de insulina secretada pelas células cultivadas em alta glicose.

3.2 Teste de viabilidade celular

Para verificar se o cultivo por 24 horas nas condições mencionadas acima afeta a viabilidade celular, foram feitos testes utilizando o Kit Guava® ViaCount™ Reagent (Merck Millipore, Burlington, MA., EUA), capaz de identificar as células viáveis, em apoptose e mortas.

As células foram aliqüotadas em uma placa de 24 poços Multiwell™ (Becton Dickinson, NJ., EUA), com 0,75·10⁵ células por poço, junto com 500 µL de meio RPMI-1640 (Gibco). A placa foi deixada em cultivo em uma estufa a 37°C com atmosfera de

5% CO₂ por 4 dias. Vinte e quatro horas antes do experimento, o meio foi trocado por outro nas seguintes condições: 11.1 mM glicose, 3 mM glicose, 30 mM glicose, 11.1 mM glicose + 18.9 mM manitol, 30 mM glicose com anticorpo diluído 1:500. Também foi utilizado o meio 11.1 mM glicose com taspigargina 1 µM, usado como um controle positivo de apoptose e morte celular, incubado por 16 horas.

Antes da contagem, as células foram retiradas da placa com tripsina, sendo o meio de cultura e todas as soluções utilizadas coletadas. A solução foi então centrifugada e as células foram ressuspensas em 50 µL de meio.

Em uma placa de 96 poços, foram aliqotados 225 µL do reagente ViaCount e 25 µL da suspensão de células. A placa foi incubada por 5 minutos no escuro, e as células foram contadas utilizando o Citômetro de fluxo Guava® easyCyte 8HT Benchtop Flow Cytometer (Merck Millipore, Burlington, MA., EUA).

3.3 Extração de RNA

O RNA foi extraído a partir de toda a cultura de garrafas de 25 cm², cuja passagem foi cultivada por 5 a 7 dias conforme descrito acima. A extração foi feita usando o reagente TRIzol® (Life Technologies, Carlsbad, CA., EUA), segundo as instruções do fabricante. Para analisar a qualidade do RNA extraído, 1µL de cada amostra obtida foi quantificada com o instrumento Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA., EUA), verificando se as razões de absorbância A260/280 e A260/230 se encontram perto de 2. Além disso, foi feita uma eletroforese em gel de agarose (Bio-Rad, Hercules, CA., EUA) para checar a integridade do RNA a partir da visualização das bandas do RNA das subunidades ribossomais (rRNA 28S:18S com uma proporção de 2:1, que representam um RNA de boa qualidade). Com a eletroforese também é possível visualizar se há contaminação das amostras com DNA genômico (Wieczorek et al., 2002). Os RNAs que se mostraram contaminados com DNA genômico foram submetidos, antes da síntese de seu cDNA, a um tratamento com a DNase I Amplification Grade (Invitrogen, Waltham, MA., EUA), conforme as instruções do fabricante, e em seguida a uma nova eletroforese para confirmar que o tratamento foi eficaz.

3.4 Síntese de cDNA

O cDNA foi sintetizado a partir das amostras de RNA extraídas que se mostraram íntegras e de boa qualidade, conforme descrito acima. A reação foi feita utilizando o High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific), conforme as instruções do fabricante.

3.5 Reações de qPCR

As reações de PCR quantitativo das amostras de cDNA sintetizadas foram feitas utilizando os kits RT² SYBR Green ROX qPCR Mastermix (Qiagen, Hilden, Alemanha) e SYBR Green PCR Mastermix (Applied Biosystems, Foster City, CA., EUA), conforme instruções dos fabricantes, no aparelho Stratagene MX3005P (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha). Foram feitas reações para os genes *Gira1-4*, *Glr1b*, *SLC6A9* (*GlyT1*) e *SLC6A5* (*GlyT2*). A expressão gênica foi quantificada pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), e foi normalizada pela expressão do gene constitutivo histona desacetilase 1 (*HDAC1*).

Para a escolha do gene constitutivo utilizado para as diferentes condições, foram testados os genes *RPL37A*, *HDAC1*, *GAPDH* e *Srnp14*. O resultado da reação de qPCR para esses genes foi analisado através do software *geNorm* (<https://genorm.cmgg.be/>), que indicou como mais apropriado para ser utilizado como constitutivo o gene *HDAC1*.

As sequências de bases dos primers utilizados estão descritas na tabela 1.

Tabela 1 - Sequências de bases dos primers utilizados para as reações de qPCR.

Gene	Sense	Anti-Sense
Gla1	5'-CTGAAGAATTTCCCGATGGA-3'	5'-GAGATCCAGGACAGGATGA-3'
Gla2	5'-GCATCTCTGCCAAAGGTCTC-3'	5'-AAGTGGGTTGGCAGGTGTAG-3'
Gla3	5'-GGATGATGAGGTGAGGGAGA-3'	5'-CGATCTTCTTAGCCCTGTTCG-3'
Gla4	5'-CCACCTGTGAATGTGACCTG-3'	5'-AAGTTGGCCCCTTTCTCATT-3'
Glrb	5'-AAAGGTGGAAACGCAGCTAA-3'	5'-CGGAGGCTTCTTGTCTTTG-3'
GlyT1	5'-CATCCCATTGTACGCATTG-3'	5'-GCTGAACCTCAAACCCATC-3'
GlyT2	5'-GGCATCTCCTATGTGTACGGC-3'	5'-GGACCAGTTAGGGTAGCGGTAG-3'
HDAC1	5'-GCCAGTCATGTCCAAAGTAATGG-3'	5'-CATTAGGGATCTCTGTGTCCAGG-3'

3.6 Eletrofisiologia

O efeito da glicina nos GlyRs sobre as propriedades eletrofisiológicas das células INS-1E foi avaliada por experimentos de “patch-clamp” na configuração de “standard whole-cell”. Os registros foram feitos utilizando o amplificador EPC-10 (HEKA Electronics, Lamprecht, Alemanha) sob comando do programa Patch-Master (HEKA Electronics). Os microeletrodos foram estirados em um aquecedor de dois níveis (Narishige, Tóquio, Japão) e micropolidos por aquecimento em uma microforja (Narishige), tendo uma resistência de 6-10 M Ω quando preenchidos com solução intracelular (ver abaixo).

Foram aliqüotadas em uma placa de 9 cm² (TPP, Trasadingen, Suíça) 2·10⁵ células com 1.5 mL de meio RPMI-1640. A placa foi deixada em uma estufa a 37°C com atmosfera de 5% CO₂ por 3 ou 4 dias. O meio foi trocado 24 horas antes dos registros por outro com glicose nas concentrações de 11.1 mM ou 30 mM (alta glicose).

Os reagentes utilizados para as soluções são da Sigma-Aldrich, Synth (Diadema, SP., Brasil) ou J. T. Baker. Como solução intracelular foi utilizada uma solução com 120 mM CsCl, 1 mM MgCl₂·6H₂O, 10 mM EGTA, 1 mM CaCl₂·2H₂O, 10 mM HEPES e 3mM MgATP, cujo pH foi ajustado para 7.2 com CsOH. Foi utilizada

uma solução de Krebs-Henseleit (140 mM NaCl, 3.6 mM KCl, 0.5 mM NaH₂PO₄·H₂O, 0.5 mM MgSO₄·7H₂O, 1.5 mM CaCl₂·2H₂O, 5 mM HEPES, 2 mM NaHCO₃ e 11.1 mM glicose, cujo pH foi ajustado para 7.4 com NaOH) como solução extracelular, na ausência e presença de glicina (Sigma-Aldrich) 0.1 mM. Essa solução foi perfundida continuamente com uma bomba peristáltica, durante todo o experimento, a 30-32°C.

As correntes iônicas na voltagem fixada de -70 mV – considerada o potencial de repouso das células beta – foram registradas na ausência e na presença de 0,1 mM de glicina na solução extracelular. A análise das correntes consistiu na avaliação do aumento do ruído quadrático médio da corrente devido à abertura aleatória de receptores ionotrópicos de glicina na presença de seu agonista. Essa análise segue em parte a abordagem originalmente proposta por Anderson & Stevens (1973) para a análise do agonismo de receptores nicotínicos por acetilcolina nas junções neuromusculares da musculatura esquelética de sapos (Figura 2). O ruído quadrático médio da corrente (RMS) foi calculado como:

$$RMS = \frac{\sum_{i=1}^n \sqrt{(I_i - \bar{I})^2}}{n}$$

em que I_i é a corrente iônica registrada no i -ésimo ponto do registro temporal da corrente, \bar{I} é a corrente iônica média no intervalo do registro considerado e n é o número de pontos $I=f(t)$ que constituem o registro.

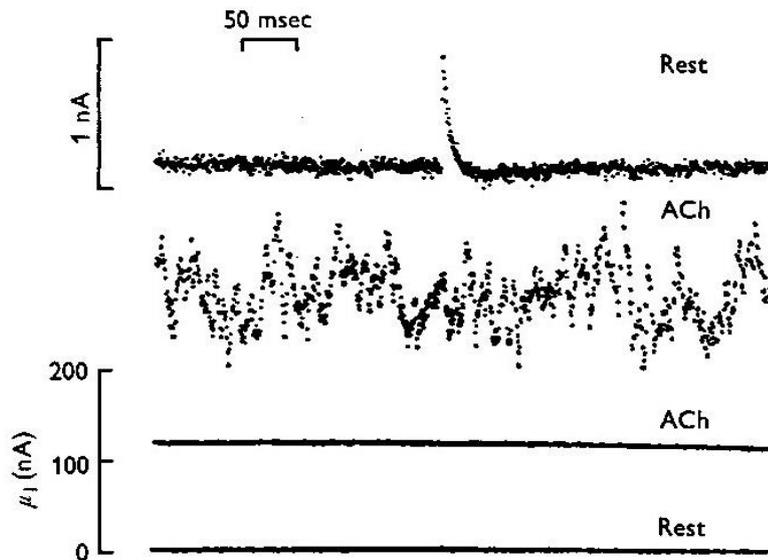


Figura 2 – Registro das flutuações de corrente em resposta a acetilcolina na placa motora, retirado de Anderson; Stevens, 1973.

3.7 Secreção de insulina

Quatro dias antes do ensaio, foram aliqotadas em uma placa de 24 poços Multiwell™ (Becton Dickinson, NJ., EUA) $0,75 \cdot 10^5$ células em cada poço junto com 500 μ L de meio RPMI-1640 (Gibco). A placa foi cultivada em uma estufa a 37°C com atmosfera de 5% CO₂. Vinte e quatro horas antes do experimento, o meio foi trocado por um novo com glicose nas concentrações de 3, 11.1 ou 30 mM.

Após esse período, o meio foi trocado por um novo de composição semelhante, porém sem glicose, e as células foram privadas por duas horas. Em seguida foi feita uma pré-incubação de 30 minutos com uma solução de Krebs-Henseleit (115 mM NaCl, 24 mM NaHCO₃, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ 0.2% albumina (Sigma-Aldrich), pH 7.4 equilibrado com mistura de O₂/CO₂ 95:5 v/v) com 2.8 mM de glicose (J. T. Baker). Foi então feita uma incubação de uma hora utilizando a mesma solução de Krebs Henseleit, nas condições de: glicose 2.8 mM, glicose 16.7 mM, glicose 16.7 mM + glicina 0.1 mM (Synth, Diadema, SP, Brasil), glicose 16.7 mM + glicina 0.1 mM + estircina 0.01 mM ((Sigma-Aldrich).

O sobrenadante foi transferido dos poços para tubos de microcentrífuga, e centrifugado a 180 g por 5 minutos a 4°C. Dessa solução, 400 μ L foram aliqotados em novos tubos e armazenados. Foram adicionados 500 μ L de uma solução de álcool

ácido (etanol, H₂O deionizada, ácido clorídrico (HCl) fumegante 52:17:1 v/v/v) aos poços para lisar as células e liberar o conteúdo de insulina. Foi recolhida toda essa solução em tubos de microcentrífuga e armazenada.

Todas as amostras foram armazenadas a -20° C até a sua dosagem, feita pelo kit Rat/Mouse Insulin ELISA Kit (Merck Millipore), segundo as instruções do fabricante.

3.8 Análise estatística

Todas as análises foram feitas utilizando o programa GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Valores de $P < 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes. A normalidade dos dados foi verificada com os testes Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov, e a homogeneidade de variância com os testes de Bartlett e Brown-Forsythe. Os valores foram analisados utilizando teste t de Student (para comparações entre duas condições) ou ANOVA de uma via (para comparar três condições entre si) com pós-teste de Bonferroni. Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média ou média \pm desvio padrão da média.

4 RESULTADOS

4.1 Teste de Viabilidade Celular

Nós quantificamos a porcentagem de células viáveis (Figura 3), em apoptose e mortas (Figura 4) na linhagem INS-1E após os cultivos de 24 horas com: glicose 11.1 mM (controle), glicose 3 mM, glicose 30 mM, glicose 30 mM com anticorpo anti-insulina e glicose 11.1 mM + manitol 18.9 mM. Além disso, foi feita uma incubação de 16 horas em glicose 11.1 mM com a taspigargina, utilizada como um controle positivo de morte celular e apoptose. Esse composto age inibindo a bomba de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (SERCA) (Thastrup et al., 1990), causando estresse de retículo e morte celular por apoptose, o que já foi relatado em células β e na linhagem INS-1E (Cardozo et al., 2005).

Não houve diferença estatística na viabilidade, apoptose e morte celular entre os tratamentos utilizados e a condição controle (cultivo na glicose 11.1 mM). A única condição que apresentou diferença estatística foi a incubação com a taspigargina, no qual houve uma diminuição da porcentagem de células viáveis e um aumento na apoptose e morte, assim como esperado.

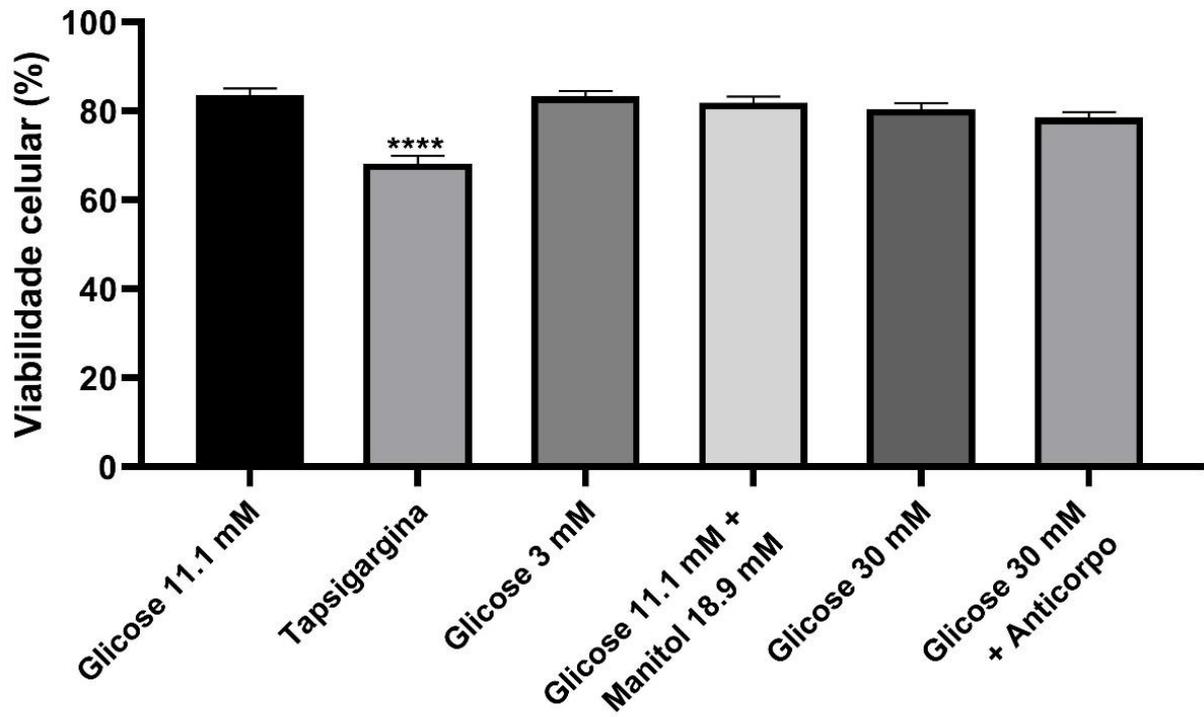
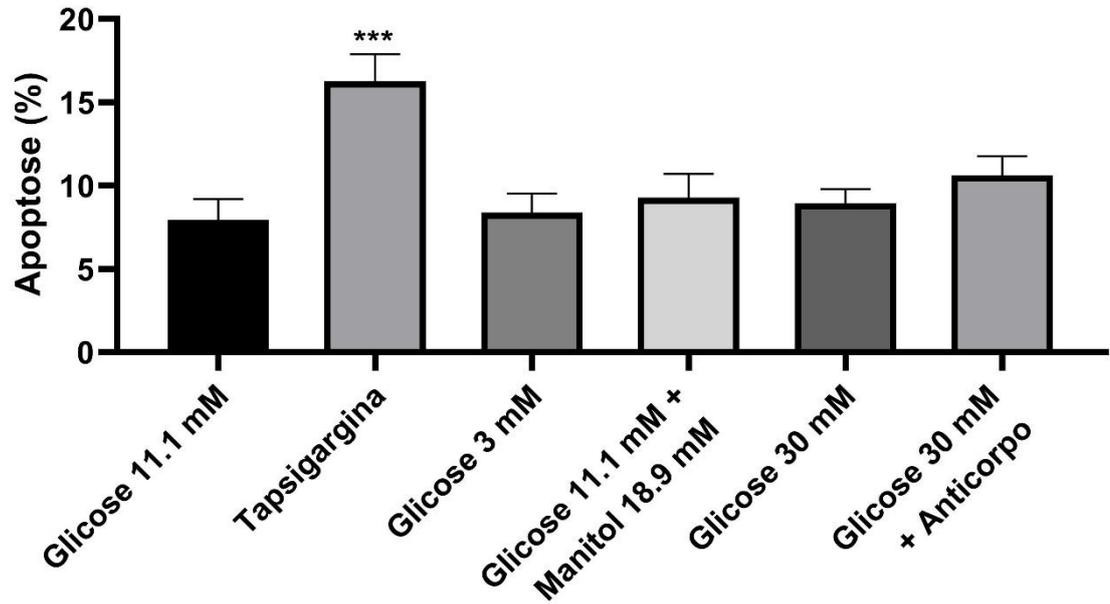


Figura 3 - Porcentagem de células viáveis em relação ao total de células contadas após 24 horas em diferentes concentrações de glicose. Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média. Análise estatística por ANOVA de uma via com pós teste de Bonferroni (**** $P \leq 0.0001$ vs. controle, $n = 7$).

A



B

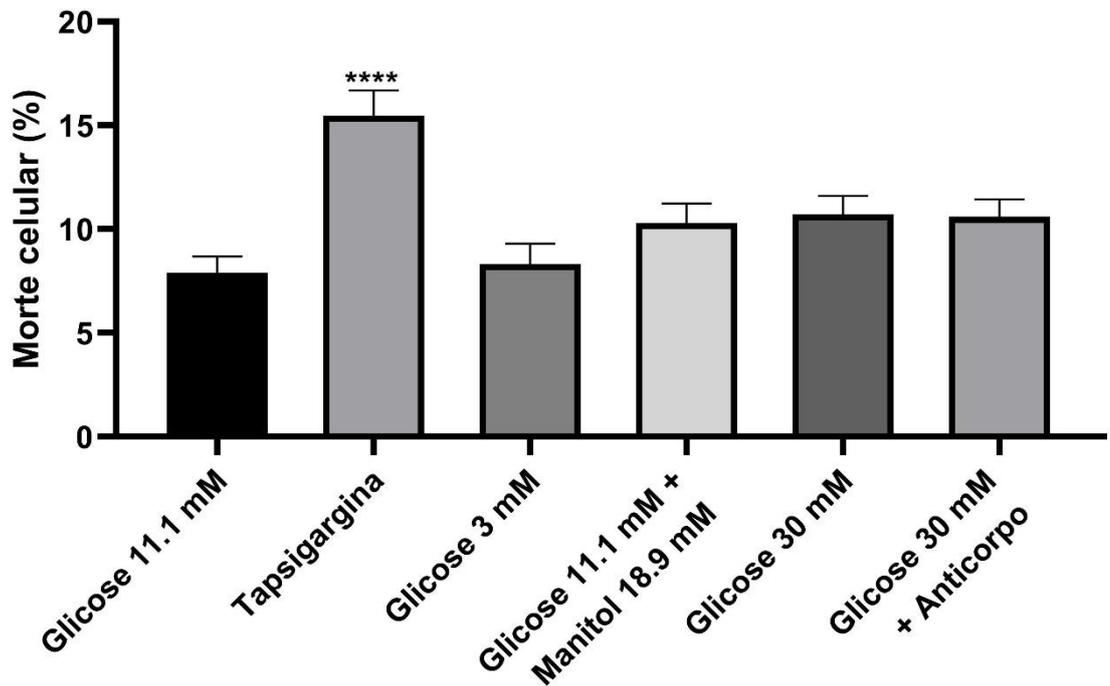


Figura 4 - Porcentagem de células A: em apoptose e B: mortas em relação ao total de células contadas após 24 horas em diferentes concentrações de glicose. Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média. Análise estatística por ANOVA de uma via entre as condições com pós teste de Bonferroni (***) $P \leq 0.001$ vs. controle, ****) $P \leq 0.0001$ vs. controle, $n = 7$).

4.2 Expressão gênica

A quantificação de todos os genes citados foi feita em relação ao gene constitutivo HDAC1 (Histona Deacetilase 1).

4.2.1 Expressão gênica das subunidades do receptor de glicina (GlyR)

A Figura 5 mostra a quantificação da expressão gênica na linhagem INS-1E dos genes que expressam as subunidades do receptor de glicina. As subunidades $\alpha 1$, $\alpha 3$ e β são codificadas pelos genes *Glr1*, *Glr3* e *Glrb*, respectivamente. Observa-se que não houve alteração estatística significativa na expressão gênica dessas 3 subunidades nas diferentes condições.

Não foi possível detectar a expressão das subunidades $\alpha 2$ e $\alpha 4$ (codificadas pelos genes *Glr2* e *Glr4*, respectivamente) pelo qPCR, mesmo com o dobro da quantidade de cDNA na reação, indicando que, dentre as quatro subunidades α conhecidas dos GlyR, as células INS-1E expressam somente $\alpha 1$ e $\alpha 3$.

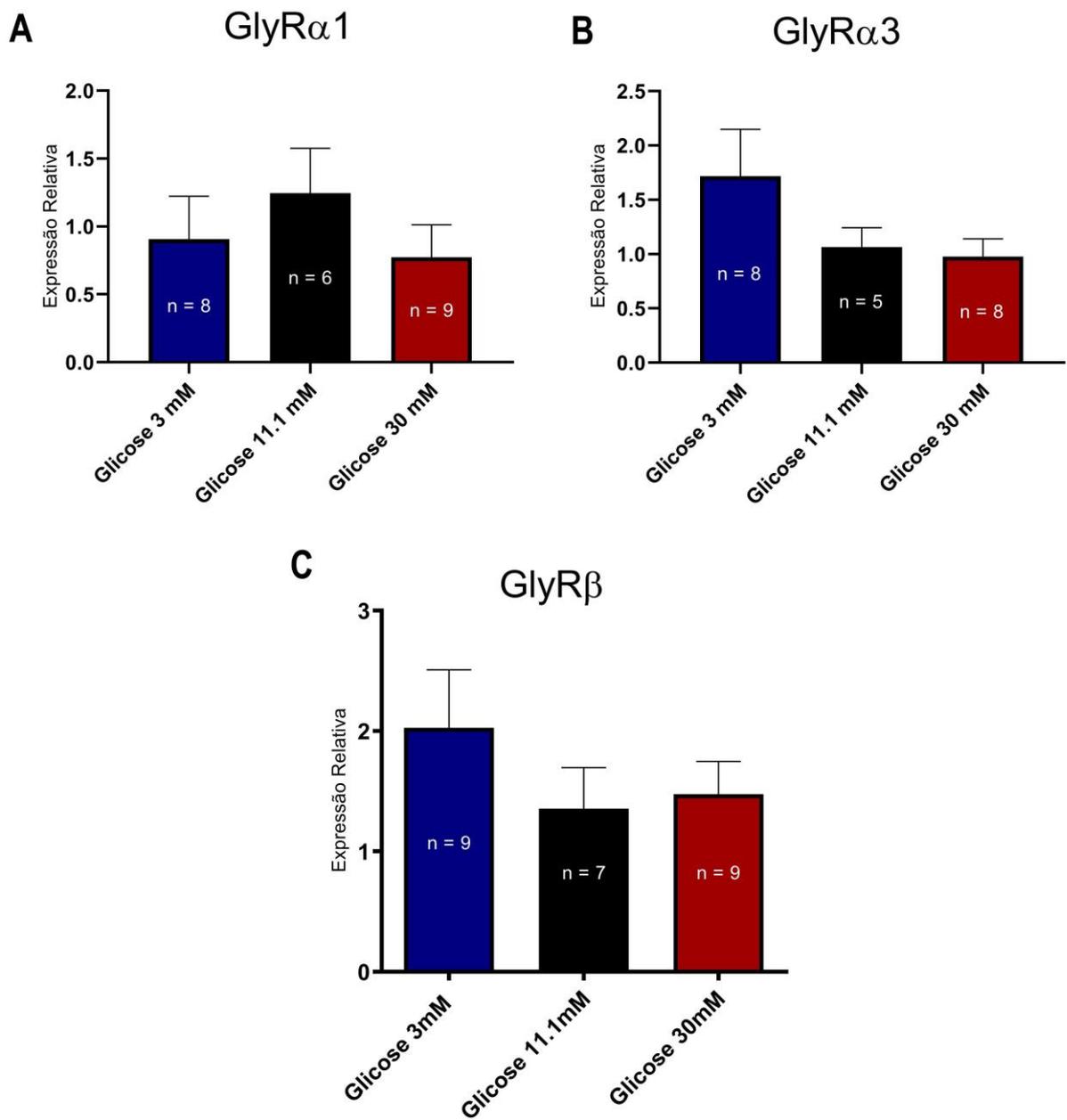


Figura 5 - Expressão gênica das subunidades dos GlyRs após 24 horas em diferentes concentrações de glicose. A: subunidade α 1 (n= 6-9), B: subunidade α 3 (n= 5-8), C: subunidade β (n= 7-9). Análise estatística por ANOVA de uma via com pós teste de Bonferroni entre as 3 condições. Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média.

4.2.2 Expressão gênica dos transportadores de glicina (GlyT)

A expressão gênica dos transportadores de glicina 1 (GlyT1) e 2 (GlyT2) foi alterada pelas diferentes concentrações de glicose usadas. A expressão do GlyT1 foi maior na concentração de glicose 3 mM (Figura 6), enquanto a expressão do GlyT2 aumentou de acordo com as concentrações de glicose utilizadas (Figura 7). Porém, não houve diferença na expressão de ambos os transportadores nas incubações de 24 horas em glicose 30 mM, glicose 30 mM com anticorpos anti-insulina e glicose 11.1 mM com manitol 18.9 mM (usado como controle osmótico).

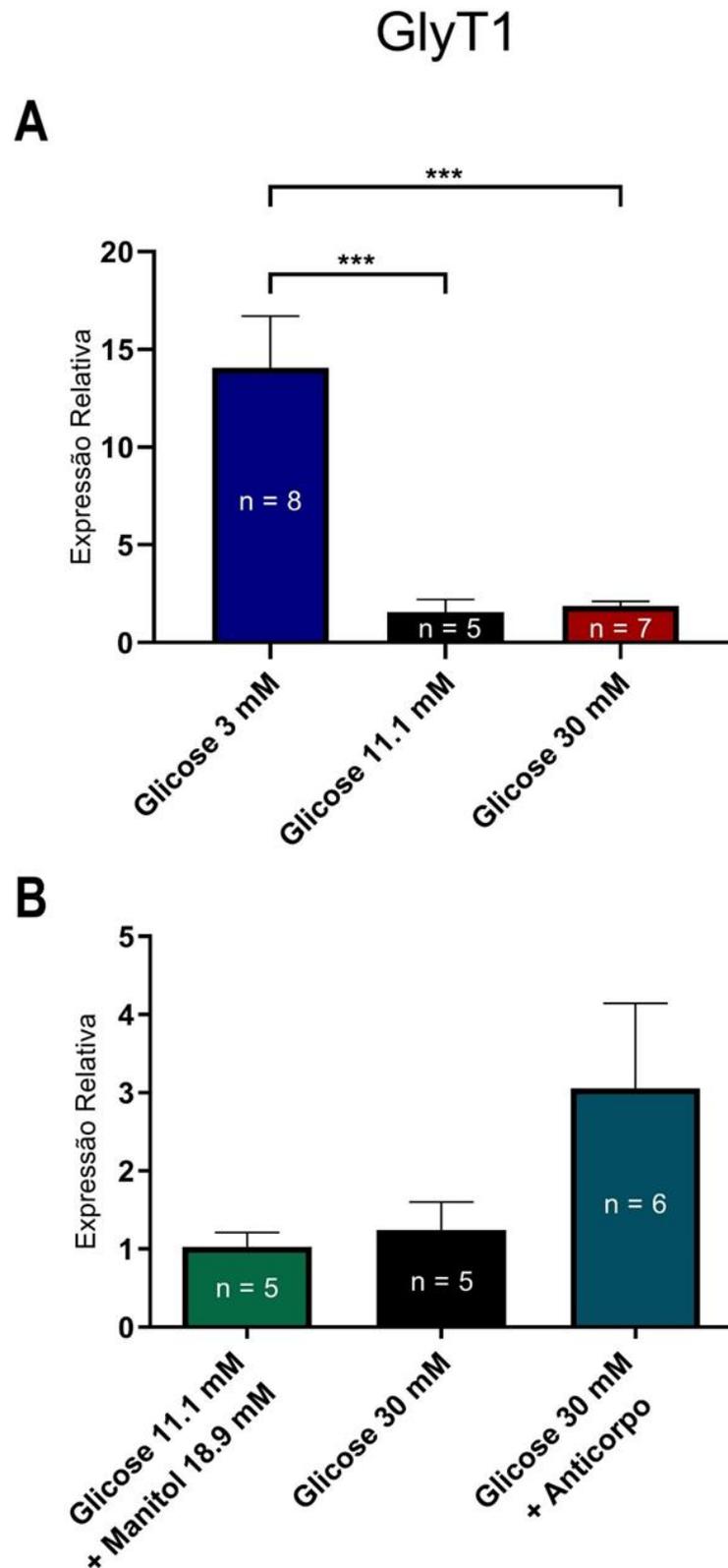
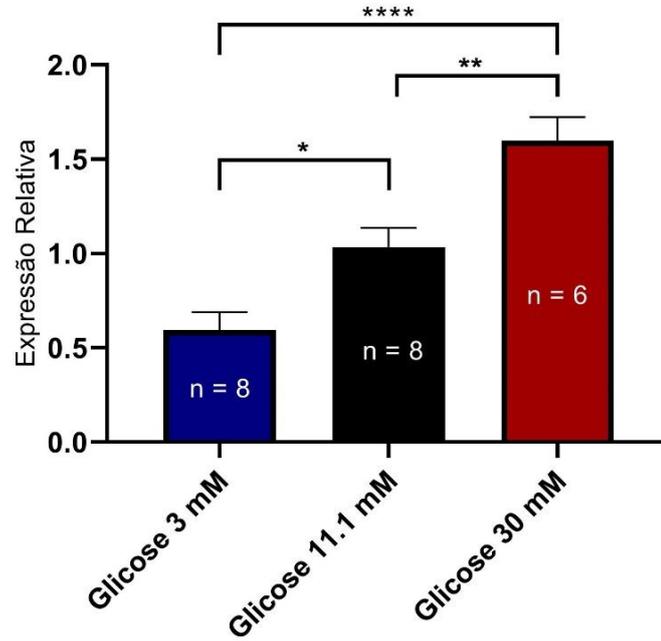


Figura 6 - Expressão gênica do gene GlyT1 após 24 horas em A: diferentes concentrações de glicose (n = 5-8) e B: glicose 30 mM, glicose 30 mM + anticorpo anti-insulina, glicose 11.1 mM + manitol 18.9 mM. (n= 5-6). Os valores são expressos como média ± erro padrão da média. Análise estatística por ANOVA de uma via com pós teste de Bonferroni entre as 3 condições (***) $P \leq 0.001$).

GlyT2

A



B

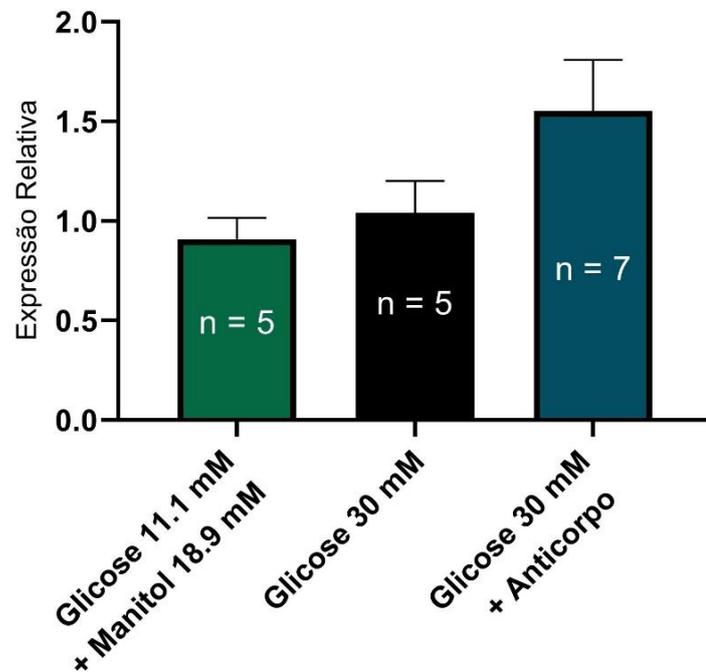


Figura 7 - Expressão gênica do gene GlyT2 após 24 horas em A: diferentes concentrações de glicose (n= 6-8) e B: glicose 30 mM, glicose 30 mM + anticorpo anti-insulina e glicose 11.1 mM + manitol 18.9 mM (n= 5-7). Os valores são expressos como média ± erro padrão da média. Análise estatística por ANOVA de uma via entre as 3 condições com pós teste de Bonferroni (* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, **** $P \leq 0.0001$).

4.3 Medidas de corrente elétrica por *patch-clamp*

A corrente elétrica das células INS-1E foi registrada através da técnica de *whole-cell patch-clamp*, na ausência e na presença da glicina 0.1 mM. Foi aplicado um protocolo de relação corrente-voltagem, e analisamos as correntes obtidas quando a voltagem da célula foi fixada em -70 mV. Encontramos uma maior variabilidade da corrente na presença da glicina, mostrada na Figura 8, o que é sugestivo da abertura estocástica de canais de vazamento por glicina, isto é, da ativação de GlyRs.

Para analisar a variância dessa corrente, calculamos o ruído quadrático médio utilizando os valores médios de corrente de cada experimento, na presença e na ausência da glicina (Figura 9).

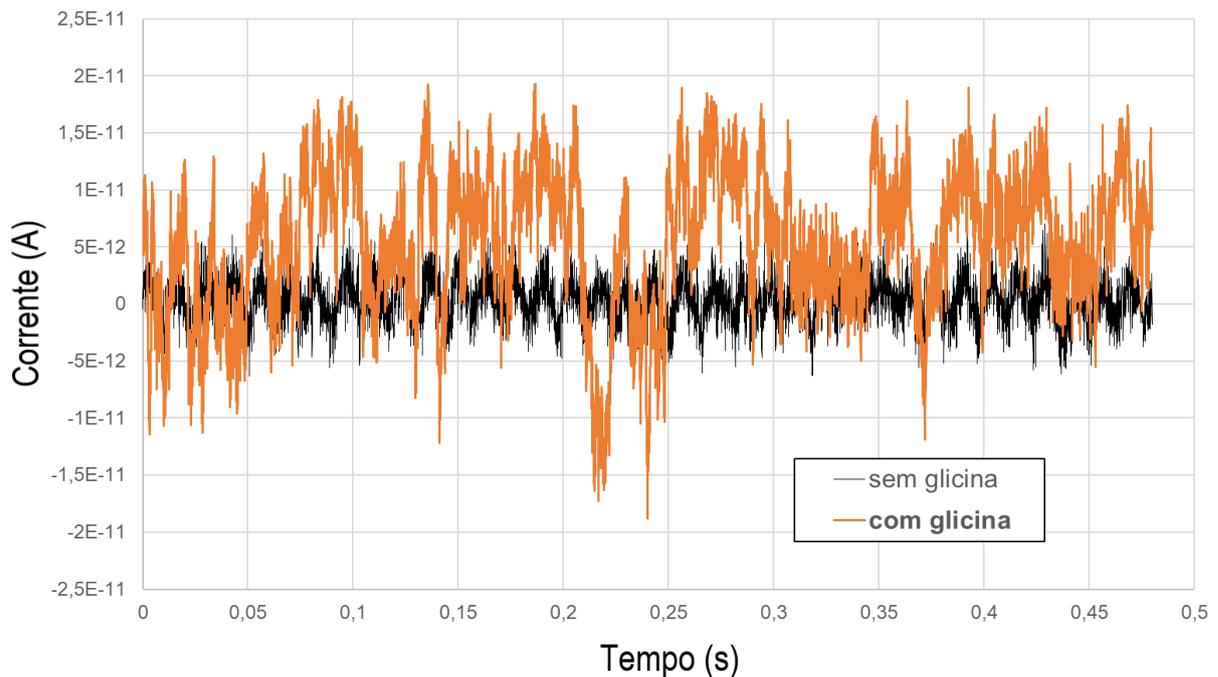


Figura 8 – Registro representativo da corrente elétrica das células INS-1E em -70 mV, na ausência (traços pretos) e na presença (traços laranja) de glicina 0.1 mM.

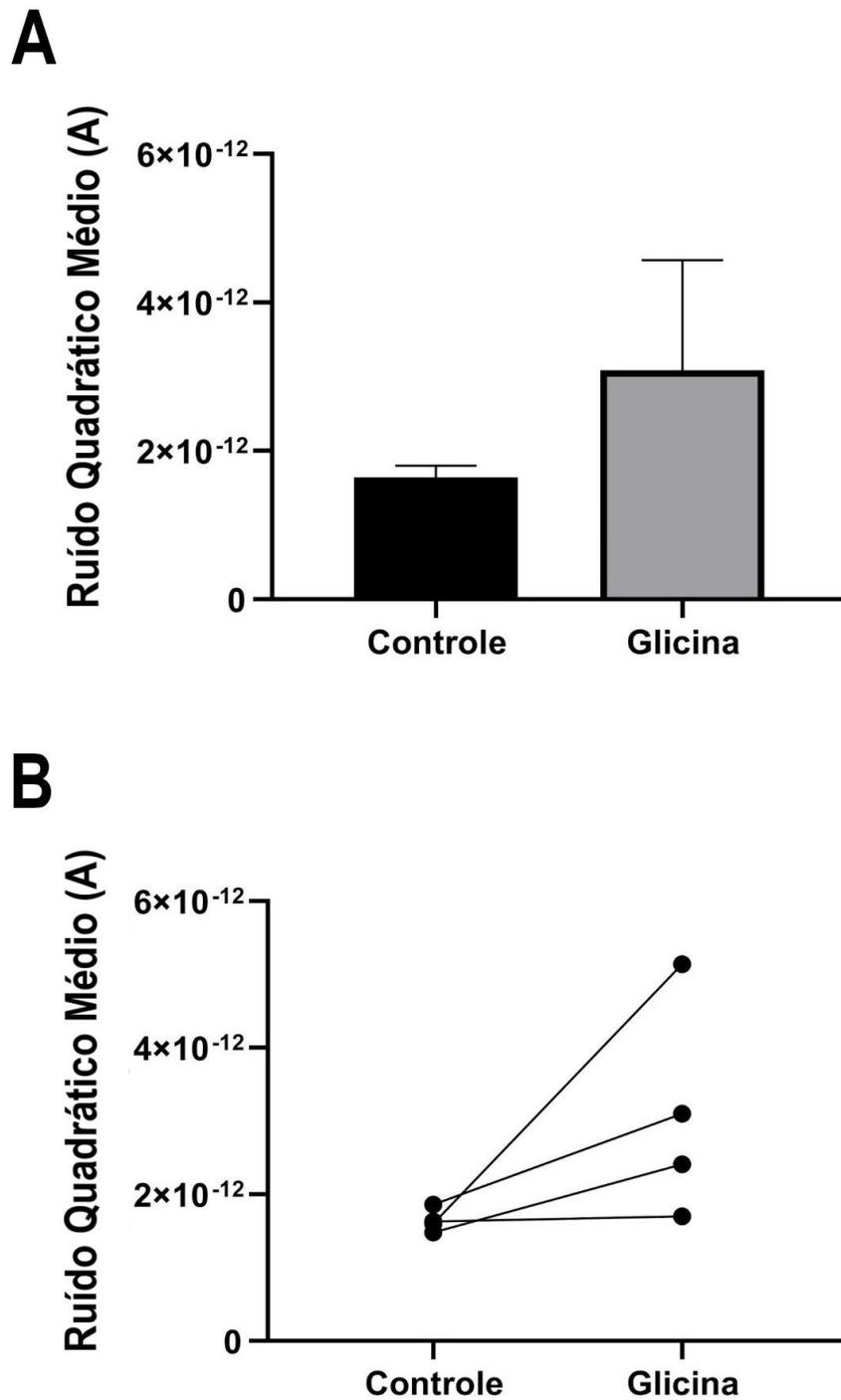


Figura 9 – Ruído quadrático médio das correntes registradas (RMS) em -70 mV, antes e após a adição de glicina (n=4 células). A: Média do valor quadrático médio da corrente registrada nas células antes (controle) e durante a exposição a 0,1 mM de glicina no meio extracelular. B: evolução do ruído quadrático médio com a exposição a glicina nos registros de corrente de cada célula registrada. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão. Análise estatística por teste t.

4.4 Secreção de insulina

Para verificar a influência das incubações com diferentes concentrações de glicose e da glicina na secreção de insulina, foram feitos ensaios de secreção das células INS-1E. Os ensaios foram feitos nas seguintes condições: glicose 2.8 mM, glicose 16.7 mM, glicose 16.7 mM + glicina 0.1 mM, glicose 16.7 mM + glicina 0.1 mM + estricnina 0.01 mM. A estricnina é um inibidor específico dos receptores de glicina, e foi usada para verificar se um possível efeito da glicina na secreção de insulina é mediado pelos seus receptores ionotrópicos.

As quantidades de insulina medidas, em ng/mL, após os experimentos com as células incubadas por 24 horas nas concentrações de glicose de 11.1 mM e 30 mM são mostradas nas tabelas 2 e 3, respectivamente. Observa-se que, na maioria dos ensaios, as células não responderam adequadamente ao estímulo agudo com alta glicose (16.7 mM), o que inviabiliza o experimento. Esperava-se que as células INS-1E secretassem pelo menos 1.5 vezes mais insulina na incubação com glicose 16.7 mM do que na glicose 2.8 mM. Como isso aconteceu em apenas 3 dos 8 experimentos realizados, não foi possível fazer uma análise apropriada.

Tabela 2. Concentração de insulina medida (em ng/mL) após o ensaio de secreção das células INS-1E incubadas por 24 horas em glicose 11.1 mM.

Passagem	Glicose 2.8 mM	Glicose 16.7 mM			
		-	Glicina 0.1mM	Glicina 0.1mM + Etrinsicina	Conteúdo
64	21.4	36.36	-	21.18	179
65	22.25	31.08	-	34.45	545
66	29.38	15.16	63.1	23.09	417
69	29.01	30.19	25.41	27.99	923
72	39.81	11.66	26.38	18.6	1104
78	9.4	13.96	13.54	32.4	-
82	6.13	5.45	5.21	33.52	-
83	149.67	73.72	53.59	88.57	521

Tabela 3. Concentração de insulina medida (em ng/mL) após o ensaio de secreção das células INS-1E incubadas por 24 horas em glicose 30 mM.

Passagem	Glicose 2.8 mM	Glicose 16.7 mM			
		-	Glicina 0.1 mM	Glicina 0.1mM + Etrinsicina	Conteúdo
64	29.29	25.11	27.62	33.69	718
65	24.31	51.21	60.34	117.28	129
66	21.51	5.91	23.3	60.68	496
69	29.2	40.98	21.62	43.5	635
72	25.8	21.94	17.66	30.82	-
78	1.29	5.91	11.81	14.63	260
82	1.79	7.58	5.21	9.05	-
83	196.69	-	21.94	44.33	389

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho, investigamos o efeito de diferentes concentrações de glicose nos receptores ionotrópicos de glicina (GlyRs) e em seus transportadores (GlyTs), na linhagem de células β INS-1E. Constatamos que nenhum dos tratamentos utilizados (glicose 3 mM, glicose 30 mM, glicose 11.1 mM com manitol 18.9 mM e glicose 30 mM + anticorpo anti-insulina) afeta a viabilidade, a apoptose ou a morte das células, o que poderia alterar sua fisiologia.

Nós encontramos a expressão gênica das subunidades $\alpha 1$, $\alpha 3$ e β , mas não das subunidades $\alpha 2$ e $\alpha 4$ dos GlyRs. Nosso achado está de acordo com a expressão gênica e proteica vista até então nas células β . A expressão gênica da subunidade $\alpha 1$ já foi descrita em células β humanas (Taneera et al., 2015, Hall et al., 2018, Blodgett et al., 2015, Li et al., 2016, Segerstolpe et al., 2016), assim como da $\alpha 3$ e β (Wang et al., 2016, Xin et al., 2016). Recentemente, a expressão proteica das subunidades $\alpha 1$, $\alpha 3$ e β em ilhotas humanas foi confirmada (Yan-Do et al., 2016), assim como a da subunidade $\alpha 1$ na linhagem INS-1 (Chen et al., 2018).

Acredita-se que a subunidade $\alpha 2$ seja expressa em maior quantidade durante o desenvolvimento embrionário, e diminua a partir do período pós-natal, quando as subunidades $\alpha 1$ e $\alpha 3$ passam a predominar (Lynch et al., 2017). O gene *Gla4*, que codifica a subunidade $\alpha 4$, é um pseudogene em humanos (Lynch, 2009, Lynch et al., 2017) e, até o momento, não há evidências de sua expressão em ratos, apesar de já ter sido encontrado em outras espécies (Webb, Lynch, 2007).

Foi avaliada a expressão gênica dos GlyRs em resposta ao cultivo dessa linhagem por 24 horas nas concentrações de glicose 3 mM, 11.1 mM e 30 mM. Não houve nenhuma diferença na expressão gênica das subunidades $\alpha 1$, $\alpha 3$ e β nas diferentes concentrações de glicose utilizadas. Diferentemente do nosso achado, foi relatado recentemente na literatura que a incubação de ilhotas humanas por 48 horas em glicose 19 mM diminui a expressão gênica da subunidade $\alpha 1$, e provoca alterações na metilação do DNA de seu gene (Hall et al., 2018). A incubação de ilhotas por 24 horas em glicose alta também altera a expressão desse gene (Taneera et al., 2015). Além disso, houve menor expressão do gene *Gla1* em ilhotas de doadores hiperglicêmicos (Taneera et al., 2015). Foi encontrada uma menor expressão proteica da subunidade $\alpha 1$ em ilhotas de doadores diabéticos, apesar de sua expressão gênica estar aumentada (Yan-Do et al., 2016).

É necessário confirmar se a expressão proteica dessas subunidades também não se altera em resposta à glicose, uma vez que há um relato de uma modulação oposta da expressão gênica e proteica da subunidade $\alpha 1$ (Yan-Do et al., 2016).

Nós medimos as correntes elétricas das células INS-1E, e encontramos um aumento na variância das correntes na presença de glicina 0.1 mM. Esta mesma concentração de glicina provocou correntes na linhagem GK-P3, uma linhagem derivada de insulinoma de camundongo (Weaver et al., 1998), e em células beta humanas, onde também aumentou a frequência de disparos de potenciais de ação (Yan-Do et al., 2016). Nas células beta humanas, a insulina potenciou as correntes induzidas pela glicina, assim como também acontece no sistema nervoso central (Caraiscos et al., 2007). Seria interessante verificar se esse fenômeno também acontece na linhagem INS-1E.

Não foi possível comparar as correntes de células incubadas em diferentes concentrações de glicose, e, portanto, não sabemos se a atividade dos GlyRs é alterada em resposta à hiperglicemia.

O fluxo de cloreto através dos GlyRs depende do seu potencial de equilíbrio, determinado em parte pelas suas concentrações no meio intra e extracelular. O valor do potencial de equilíbrio do cloreto nas células INS-1E não é conhecido, assim como a sua concentração intracelular. Nós medimos as correntes iônicas das células através da técnica de *whole-cell patch-clamp*, na qual o conteúdo intracelular é substituído pela solução presente na pipeta. Deste modo, não é possível inferir qual a direção do fluxo resultante de cloreto através desses receptores em condições fisiológicas na linhagem INS-1E, e se a glicina exerce um efeito inibitório, assim como na maioria dos neurônios adultos, ou excitatório, assim como acontece nas células beta humanas.

Os transportadores de glicina GlyT1 e GlyT2 são responsáveis pela captação celular desse neurotransmissor. Eles regulam a concentração de glicina do meio extracelular e, portanto, sua atividade pode afetar diretamente a sinalização por esse aminoácido (Eulenburg et al., 2005). A expressão do GlyT2 já foi relatada em células β de ratos (Gammelsaeter et al., 2004), e a do GlyT1, na linhagem INS-1 (Chen et al., 2018). Ambos os transportadores também já foram encontrados em células β humanas (Yan-Do et al., 2016). Até o momento, nenhum trabalho verificou se existe alguma alteração na expressão desses transportadores em células de doadores diabéticos, ou se ocorre alguma modulação em resposta à glicose.

Nós identificamos a expressão gênica dos transportadores de glicina 1 (GlyT1) e 2 (GlyT2) na linhagem INS-1E, sendo que a expressão desses transportadores foi modulada pelas diferentes concentrações de glicose (Figura 10). A expressão gênica do GlyT1 foi maior nas células cultivadas em baixa concentração de glicose (3 mM) do que nas cultivadas em glicose 11.1 e 30 mM, sendo que não houve diferença na expressão entre essas duas últimas condições. Já a expressão do GlyT2 parece ter sido regulada positivamente pela concentração de glicose.

A expressão desses transportadores foi igual na glicose 30 mM e na glicose 30 mM com anticorpo anti-insulina. Isso sugere que as alterações vistas não foram causadas por alguma possível ação da insulina, secretada em alta quantidade nas células cultivadas nessa condição. Também não houve nenhuma diferença estatisticamente significativa entre as condições de glicose 30 mM e glicose 11.1 mM com manitol 18.9 mM. Isso indica que o aumento da expressão do GlyT2 em alta glicose foi devido a um efeito osmótico, e não da glicose em si. Dado que ocorre um aumento na osmolaridade plasmática em pacientes diabéticos durante as crises hiperglicêmicas (Pasquel; Umpierrez, 2014, Umpierrez; Korytkowski, 2016), é possível que a modulação dos GlyTs induzida pela mudança de osmolaridade também aconteça nessa doença.

O GlyT1 participa da regulação osmótica em embriões de camundongo no estágio de pré-implantação (Steeves et al., 2003), onde o aumento da osmolaridade extracelular é seguido por um acúmulo intracelular de glicina mediado por esse transportador. Isso ocorre mesmo em variações fisiológicas da osmolaridade. É possível que ocorra um efeito semelhante nas células beta, porém mediado pelo GlyT2.

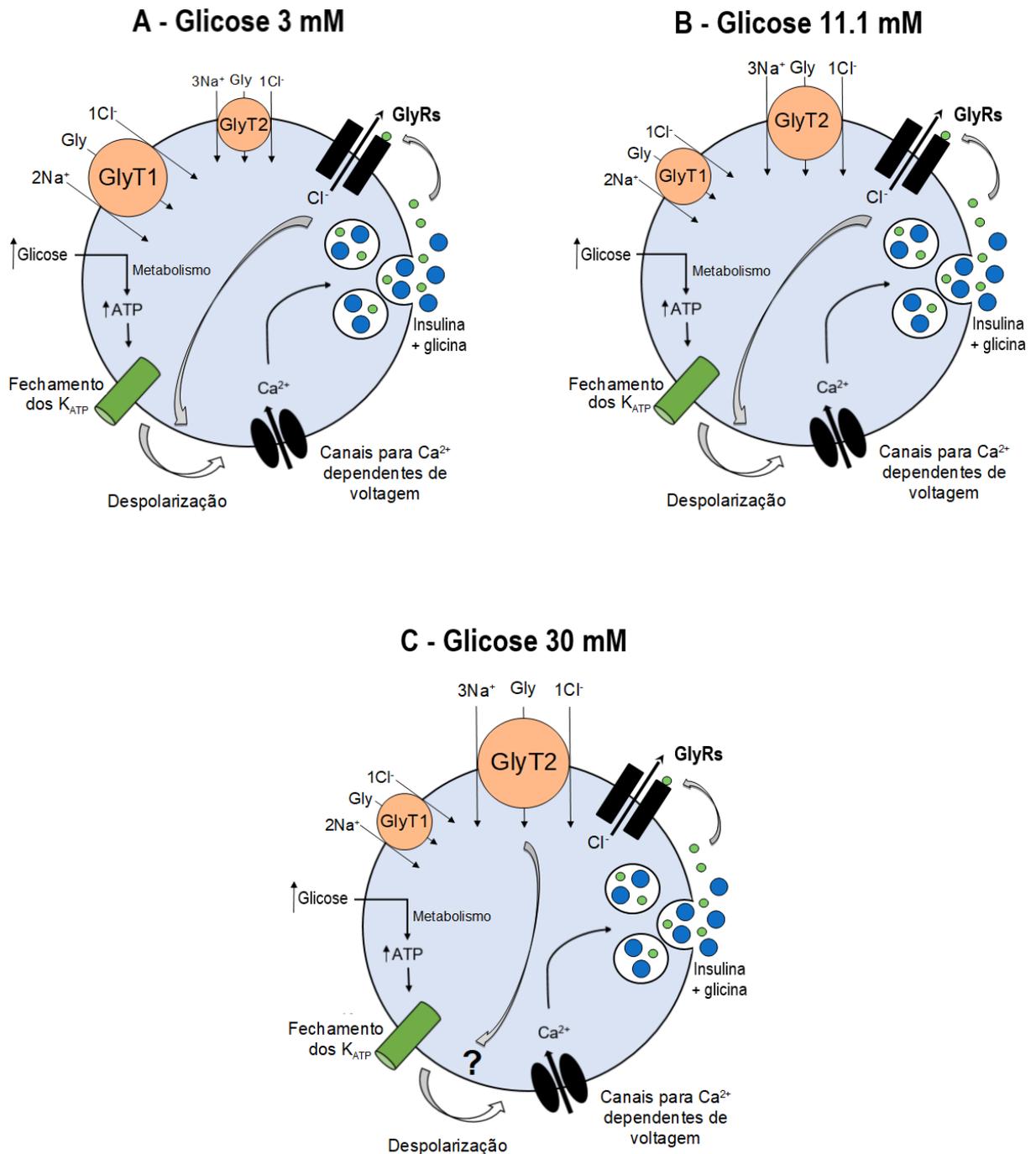


Figura 10 - Mecanismo de secreção de insulina estimulada pela glicose e o possível papel dos GlyRs e dos GlyTs nas células INS-1E após 24 horas nas concentrações de glicose A: 3 mM, B: 11.1 mM e C: 30 mM. A expressão gênica do GlyT1 foi maior na concentração de glicose 3 mM, enquanto a do GlyT2 acompanhou o aumento da concentração de glicose no meio de cultivo. A expressão dos GlyRs permanece a mesma em todas as condições.

Não foi possível verificar a expressão proteica dos GlyRs e dos GlyTs. No entanto, será essencial confirmar se o efeito da glicose na expressão proteica é o mesmo visto na expressão gênica dos GlyRs e GlyTs.

A presença dos GlyTs na linhagem INS-1E sugere que essas células acumulam glicina e podem secretá-la, assim como acontece nas células β humanas (Yan-Do et al., 2016). Desse modo, a futura caracterização da presença de toda a maquinaria necessária para a secreção e para a sinalização da glicina validaria essa linhagem como um modelo de estudo desse neurotransmissor nas células β .

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.

MERGLIN, 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.