

Joana Isabel Estudante Batista Real

Regulação da atividade elétrica da célula β -pancreática por canais de K^+ sensíveis a Ca^{2+}

2013



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Regulação da atividade elétrica da célula β -pancreática por canais de K^+ sensíveis a Ca^{2+}

Joana Isabel Estudante Batista Real

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, para prestação de provas de Doutoramento em Bioquímica, na especialidade de Biofísica Celular, sob orientação do Doutor Luís Martinho do Rosário e Doutora Célia Antunes

Universidade Coimbra
2013

“Põe quanto És no Mínimo que Fazes

*Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.*

*Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.*

*Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive”*

Ricardo Reis, in "Odes"
Heterónimo de Fernando Pessoa

Agradecimentos

Os meus sinceros agradecimentos

ao Centro de Neurociências e Biologia Celular de Coimbra, em especial ao grupo de Biofísica Celular, e à Universidade de Évora, por me terem proporcionado as condições necessárias para a realização deste trabalho;

ao Professor Doutor Luís Martinho do Rosário, orientador científico desta dissertação, pela disponibilidade, apoio e rigor que demonstrou no esclarecimento de dúvidas, científicas ou técnicas e pelo facto de estimular a liberdade criativa tornando possível o meu crescimento na ciência;

à Professora Doutora Célia Antunes, orientadora científica desta dissertação, pelo tempo dispendido no esclarecimento de dúvidas e discussão de protocolos experimentais;

à Professora Doutora Rosa Maria Santos, pela disponibilidade constante, apoio e paciência que demonstrou no esclarecimento de dúvidas, científicas ou técnicas. As suas sugestões e análises críticas foram essenciais para a concretização deste trabalho;

a todos aqueles que comigo partilharam o laboratório de Biofísica Celular do Centro de Neurociências e Biologia Celular de Coimbra, pela companhia, alegria e incentivo;

ao Ângelo Tomé pela preciosa ajuda, especialmente em questões de informática; e à Ana Costa, pelo apoio e acompanhamento no laboratório nas longas horas de isolamento de ilhéus e cultura de células;

à Patrícia Martins e Patrícia Dolores, pela amizade, paciência e apoio nos momentos em que me escutaram e aconselharam;

à Ana Cristina e Carla Jorge, pela presença e amizade que têm demonstrado ao longo da minha vida;

a todos os amigos que fiz em Coimbra, em especial à Ana Sofia, Ana Simões, Carla Lopes, Ângela, Patrícia Machado, Rui Benfeitas, Catarina Pereira, João Soeiro, Sérgio Azenha e Márcio Ribeiro, obrigada pelos sorrisos e por me fazerem ver a luz ao fundo do túnel; sem vocês a minha Coimbra não seria a mesma;

aos amigos de Lisboa e Aveiro, em especial à Helga Garcia, Andreia Ruivo, Andreia Farinha, Eddy e Flávio pelo apoio e incentivo;

aos amigos de Portalegre, em especial ao João Camejo, Luís Rebocho, Henrique Candeias, Cátia Faria, Nuno Pratas, Marisa Maurício, Mário Tavares, Joana e Ricardo Eustáquio, Sérgio Cebolas, Sofia Galopim, João Sequeira, Teresa Costa e Anselmo por não duvidarem da minha amizade mesmo com períodos de ausência prolongada;

à minha família, em especial à minha mãe, ao meu pai e ao meu irmão, pelo amor, carinho, incentivo e compreensão e por nunca duvidarem das minhas capacidades ao longo da vida; o amor que sinto por vocês é incondicional e eterno;

a todos aqueles que acreditaram neste trabalho

Muito Obrigada

Joana Isabel Estudante Batista Real

Índice

Agradecimentos	iii
Abreviaturas	xiii
Resumo	xvi
Summary	xix
Capítulo 1 - <u>Introdução</u>	1
1.1 O pâncreas endócrino e secreção de insulina.....	2
1.1.1 O ilhéu de Langerhans.....	2
1.1.2 A célula β -pancreática.....	3
1.1.3 Secreção de insulina e diabetes <i>mellitus</i> tipo 2.....	4
1.2. Mecanismos de acoplamento estímulo-secreção na célula β -pancreática.....	6
1.2.1 Canais de K^+ e metabolismo da glicose.....	6
1.2.2 Atividade elétrica e canais iónicos subjacentes ao potencial de ação.....	9
1.2.3 Oscilações de potencial de membrana.....	13
1.2.4 Oscilações de Ca^{2+} intracelular.....	17
1.3 Canais de K^+ sensíveis a Ca^{2+} (K_{Ca}) na célula β -pancreática.....	20
1.3.1 Canais K_{Ca} de elevada condutância (BK).....	21
1.3.2 Canais K_{Ca} de baixa condutância (SK).....	25
1.3.3 Canais K_{Ca} de condutância intermédia (IK).....	28
1.4 Objetivos do trabalho.....	31
Capítulo 2 - <u>Material e Métodos</u>	33
2.1 Preparação do material biológico.....	34
2.1.1 Materiais e meio de cultura para isolamento de ilhéus e células β -pancreáticas.....	34
2.1.2 Isolamento dos ilhéus de Langerhans.....	36
2.1.3 Dispersão e cultura de células β -pancreáticas.....	43
2.1.4 Linha celular BRIN-BD11.....	44

2.1.5 Microdisseção do ilhéu de Langerhans.....	47
2.2 Registo de correntes iónicas por <i>patch-clamp</i>	50
2.2.1 Soluções	50
2.2.2 A técnica de <i>Patch-clamp</i>	52
2.2.3 Montagem experimental	57
2.2.4 Micropipetas	63
2.2.5 Sistema de perfusão	66
2.2.6 Aquisição e análise de dados	66
2.3 Registo intracelular de potencial de membrana.....	70
2.3.1 Soluções	70
2.3.2 Montagem experimental	71
2.3.3 Registo do potencial de membrana	77
2.4 Quantificação da $[Ca^{2+}]_i$ por microscopia de fluorescência	81
2.4.1 Sonda fluorescente de Ca^{2+}	81
2.4.2 Montagem experimental	82
2.4.3 Incorporação celular de FURA-2.....	85
2.4.4 Aquisição do sinal de fluorescência.....	85
2.4.5 Calibração do sinal de fluorescência	86
2.5 Reagentes.....	86
2.6 Análise estatística.....	87
Capítulo 3 - <u>Modulação da atividade elétrica e das oscilações de cálcio intracelular por bloqueadores dos canais BK</u>.....	88
3.1 Ação de caribdotoxina e penitrem A nos <i>bursts</i> de atividade elétrica	89
3.2 Ação de caribdotoxina, penitrem A e iberiotoxina nas oscilações de Ca^{2+} intracelular	99
3.3 Ação de caribdotoxina e penitrem A nos potenciais de ação	106
Capítulo 4 - <u>Correntes de K^+ mediadas por canais BK</u>.....	111
4.1 Estudos em células BRIN-BD11	112
4.1.1 Dissecção de correntes e optimização das condições de registo.....	112

4.1.2 Correntes sensíveis a penitrem A e iberiotoxina.....	122
4.2 Estudos em células β -pancreáticas isoladas.....	130
4.2.1 Corrente sensível a penitrem A.....	130
4.2.2 Corrente sensível a iberiotoxina.....	140
Capítulo 5 - <u>Modulação da atividade elétrica por bloqueadores dos canais SK</u>	149
5.1 Ação de UCL 1684 e apamina nos <i>bursts</i> de atividade elétrica	150
5.2 Ação de UCL 1684 e apamina nos potenciais de ação	156
Capítulo 6 - <u>Eletrofisiologia de um bloqueador dos canais IK</u>.....	167
6.1 Ação de TRAM-34 nos <i>bursts</i> de atividade elétrica	168
6.2 Ação de TRAM-34 nos potenciais de ação.....	174
6.3 Sensibilidade farmacológica da corrente IK.....	180
6.3.1 Registo de correntes em condições simétricas de K^+ transmembranar..	180
6.3.2 Registo de correntes em condições fisiológicas de K^+ transmembranar	185
Discussão	190
Bibliografia	199

Lista de Figuras

Figura 1.1: Canal K_{ATP}	7
Figura 1.2: Atividade elétrica registada num ilhéu microdissecado	11
Figura 1.3: Corrente K_{slow}	15
Figura 1.4: Atividade oscilatória de ilhéu de Langerhans intacto.....	18
Figura 1.5: Estrutura dos canais de potássio sensível a cálcio.....	26
Figura 2.1: Exposição e estrangulamento do colédoco.	38
Figura 2.2: Etapas sucessivas até à remoção do pâncreas.....	40
Figura 2.3: Isolamento dos ilhéus de Langerhans..	42
Figura 2.4: Ilhéus de Langerhans visualizados à lupa.....	49
Figura 2.5: Imagem do <i>setup</i> de <i>patch-clamp</i>	58
Figura 2.6: Imagem do <i>setup</i> para registo do potencial de membrana..	73
Figura 2.7: Imagem do <i>setup</i> de microscopia de fluorescência.....	84
Figura 3.1: Efeitos de caribdotoxina na atividade elétrica oscilatória e nos potenciais de ação (ilhéu 1).	91
Figura 3.2: Efeitos de caribdotoxina na atividade elétrica oscilatória e nos potenciais de ação (ilhéu 2).	93
Figura 3.3: Efeito de penitrem A na atividade elétrica e nos potenciais de ação.	95
Figura 3.4: Variabilidade dos efeitos de caribdotoxina e penitrem A na duração dos <i>bursts</i> de atividade elétrica.....	97
Figura 3.5: Efeito de caribdotoxina nas oscilações de Ca^{2+} induzidas por glicose .	100
Figura 3.6: Efeito de penitrem A nas oscilações de Ca^{2+} induzidas por glicose.....	102
Figura 3.7: Efeito de iberiotoxina nas oscilações de Ca^{2+} induzidas por glicose.....	104
Figura 3.8: Efeitos de caribdotoxina em diferentes parâmetros dos potenciais de ação	107
Figura 3.9: Efeitos de penitrem A em diferentes parâmetros de potenciais de ação em células despolarizadas com tolbutamida.....	110

Figura 4.1: Correntes totais em células BRIN-BD11.....	113
Figura 4.2: Efeito de 2 mM TEA ⁺ nas correntes totais em células BRIN-BD11.....	115
Figura 4.3: Dependência da voltagem das correntes sensíveis a 2 mM TEA ⁺ em células BRIN-BD11.....	117
Figura 4.4: Correntes de Na ⁺ sensíveis à voltagem e supressão por TTX em células BRIN-BD11.....	119
Figura 4.5: Correntes sensíveis a 4-AP (tipo A) em células BRIN-BD11.....	121
Figura 4.6: Correntes sensíveis a penitrem A em células BRIN-BD11.....	123
Figura 4.7: Efeito de penitrem A nas correntes, registadas em células BRIN-BD11 no modo de <i>perforated patch</i>	125
Figura 4.8: Dependência da voltagem das correntes sensíveis a penitrem A em células BRIN-BD11.....	127
Figura 4.9: Dependência da voltagem das correntes sensíveis a iberiotoxina em células BRIN-BD11.....	129
Figura 4.10: Curso temporal do efeito inibidor de penitrem A nas correntes totais de K ⁺ , registadas na célula β.....	132
Figura 4.11: Dependência da voltagem das correntes sensíveis a penitrem A na célula β.....	134
Figura 4.12: Efeito de stromatoxina nas correntes totais de K ⁺ na célula β.....	136
Figura 4.13: Efeito de penitrem A na corrente registada na presença de stromatoxina (ScTx).....	139
Figura 4.14: Dependência da voltagem das correntes sensíveis a iberiotoxina na célula β.....	141
Figura 4.15: Efeito de iberiotoxina na corrente registada na presença de stromatoxina (ScTx).....	144
Figura 4.16: Efeito de iberiotoxina e penitrem A nas correntes induzidas por despolarização, na presença de 3 mM TEA ⁺	146

Figura 5.1: Efeito de UCL 1684 na atividade elétrica oscilatória.....	151
Figura 5.2: Efeito de UCL 1684 na duração média dos <i>bursts</i> de atividade elétrica..	153
Figura 5.3: Efeito de 1 μ M apamina na atividade elétrica oscilatória.....	155
Figura 5.4: Disrupção do disparo de potenciais de ação por UCL 1684.....	157
Figura 5.5: Efeito de UCL 1684 nos potenciais de ação em condições "isopotenciais" de limiar de disparo.....	161
Figura 5.6: Efeito de apamina nos potenciais de ação em condições "isopotenciais" de limiar de disparo.....	163
Figura 5.7: Efeito de UCL 1684 na atividade elétrica em 30 mM glicose.....	165
Figura 6.1: Efeito de TRAM-34 na atividade elétrica oscilatória.....	169
Figura 6.2: Curso temporal dos efeitos de TRAM-34 na duração da fase ativa e silenciosa dos <i>bursts</i>	171
Figura 6.3: Efeito de TRAM-34 em parâmetros temporais dos <i>bursts</i> de atividade elétrica.....	173
Figura 6.4: Adaptação da frequência de disparo ao longo do <i>burst</i> e inibição por TRAM-34.....	175
Figura 6.5: Decaimento da amplitude dos potenciais de ação ao longo do <i>burst</i> e inibição por TRAM-34.....	177
Figura 6.6: Efeitos de TRAM-34 nos potenciais de ação em células despolarizadas com tolbutamida.....	179
Figura 6.7: Efeito de TRAM-34 nas correntes de K^+ em condições simétricas de K^+ transmembranar.....	182
Figura 6.8: Efeito de DCEBIO nas correntes de K^+ em condições simétricas de K^+ transmembranar.....	184
Figura 6.9: Efeito de TRAM-34 nas correntes de K^+ em condições fisiológicas de K^+ transmembranar.....	186
Figura 6.10: Ausência de efeito de DCEBIO nas correntes de K^+ em condições de baixo Ca^{2+} intracelular.....	188

Lista de Tabelas

Tabela 2.1: Composição das soluções utilizadas para o isolamento dos ilhéus de Langerhans.....	35
Tabela 2.2: Composição das soluções utilizadas para obtenção de células β -pancreáticas isoladas.....	35
Tabela 2.3: Soluções utilizadas para lavagem e destacamento das células Brin-BD11.....	46
Tabela 2.4: Composição das soluções utilizados em registos de <i>patch-clamp</i>	51
Tabela 2.5: Composição da solução de referência interna.....	71

Abreviaturas e estrangeirismos

$[Ca^{2+}]_i$	Concentração de Ca^{2+} intracelular livre
$[Ca^{2+}]_o$	Concentração de Ca^{2+} extracelular
$[K^+]_i$	Concentração de K^+ intracelular
$[K^+]_o$	Concentração de K^+ extracelular
$[Na^+]_i$	Concentração de Na^+ intracelular
AHP	Hiperpolarização pós-potencial (de " <i>afterhyperpolarization potential</i> ")
fAHP	AHP de duração curta (de " <i>fast AHP</i> ")
mAHP	AHP de duração media (de " <i>medium AHP</i> ")
sAHP	AHP de duração longa (de " <i>slow AHP</i> ")
Ag/AgCl	Eléctrodo de referência de prata/cloreto de prata
ASC	Área sob a curva
4-AP	4-aminopiridina
BK	Canal K_{Ca} de elevada condutância
BSA	Albumina sérica bovina (de " <i>bovine serum albumin</i> ")
BRIN-BD11	Linha celular secretora de insulina, obtida por eletrofusão de células normais de rato com células RINm5F
<i>Burst</i>	Rajada de potenciais de ação
<i>Bursting</i>	Modo de disparo na forma de rajadas de potenciais de ação
Ca_v	Canal de Ca^{2+} sensível à voltagem
<i>Cell-attached</i>	Configuração de registo de correntes iónicas por <i>patch-clamp</i> (ponta da pipeta ligada à membrana celular intacta)
C_m	Capacidade eléctrica da membrana celular
CTX	Caribdotoxina
<i>Current-clamp</i>	Técnica de registo de potencial de membrana em que é mantida constante a corrente total através da membrana
DAT	Gravador ou cassete para gravação digital (de " <i>digital audio tape</i> ")

Abreviaturas

DCEBIO	5,6-dicloro-etilbenzimidazolona
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGTA	Ácido etilenoglicol-bis(2-aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetra-acético
E_m	Potencial de membrana
F_{340}	Fluorescência emitida por excitação a 340 nm
F_{380}	Fluorescência emitida por excitação a 380 nm
f_{osc}	Frequência das oscilações
Fura-2	Ácido 1-(6-amino-2-(5-carboxi-2-oxazolil)-5-benzofuraniloxi)-2-(2-amino-5-metilfenoxi)etano-N,N,N',N'-tetra-acético, sal pentapotássio <i>("1-(6-amino-2-(5-carboxy-2-oxazolyl)-5-benzofuranyloxy)-2-(2-amino-5-methylphenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid, pentapotassium salt")</i>
Fura-2/AM	Derivado acetoximetilado de Fura-2
GLUT-2	Transportador de glicose tipo 2
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazino-etano-sulfónico <i>("4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid")</i>
HIT	Linha celular secretora de insulina derivada de hamster
IbTx	Iberiotoxina
IC_{50}	Concentração responsável por uma inibição de 50%
IK	Canal K_{Ca} de condutância intermédia
I/V	Relação corrente-voltagem
K_A	Canal de K^+ tipo-A
K_{ATP}	Canal de K^+ sensível a ATP
K_{Ca}	Canal de K^+ sensível a cálcio
K_d	Constante de dissociação
Kir6.2	Subunidade do canal K_{ATP} que forma o poro, com propriedades de retificação de entrada
K_m	Constante de Michaelis

Abreviaturas

K_{slow}	Corrente de K^+ de desenvolvimento lento, responsável pela terminação do <i>burst</i> na célula β -pancreática
K_V	Canal de K^+ sensível à voltagem
PBS	Solução salina tamponizada com fosfato (de “ <i>phosphate buffered saline</i> ”)
<i>Patch-clamp</i>	Técnica de registo de correntes iónicas em que é mantida constante a diferença de potencial através de um “pedaço” (<i>patch</i>) de membrana
PTA	Penitrem A
R_a	Resistência em série
RINm5F	Linha celular secretora de insulina, obtida por irradiação de células normais de rato
R_s	Resistência em série
R_{selagem}	Resistência da selagem
ScTx	Stromatoxina
SK	Canal K_{Ca} de baixa condutância
SUR	Subunidade do canal K_{ATP} que liga sulfonilureias (de “ <i>sulphonylurea receptor</i> ”)
TEA	Tetraetilamónio
TRAM-34	1-(2-clorofenil)difenilmetil)-1H-pirazole (“ <i>(1-((2-chlorophenyl)diphenylmethyl)-1H-pyrazole)</i> ”)
TRP	Grupo de canais catiónicos não seletivos (de “ <i>transient receptor potential</i> ”)
TTX	Tetrodotoxina
UCL1684	Bis-quinolino ciclofano
<i>Voltage-clamp</i>	Técnica de registo de correntes iónicas em que é mantida constante a diferença de potencial através da membrana
<i>Whole-cell</i>	Configuração de registo de correntes iónicas por <i>patch-clamp</i> (ponta da pipeta em contacto direto com o interior celular)

Resumo

FUNDAMENTOS: As células β -pancreáticas segregam insulina de forma pulsátil em resposta a glicose. Este processo é causado por oscilações da atividade elétrica (*bursting*), que consistem no disparo de potenciais de ação (PAs) dependentes de Ca^{2+} a partir de fases despolarizadas (ativas) alternando com fases hiperpolarizadas (silenciosas).

As transições entre fases são promovidas por uma corrente de K^+ de desenvolvimento lento, sensível a Ca^{2+} (K_{slow}). Pensa-se que canais K_{Ca} SK e/ou IK desempenham um papel central em K_{slow} . As células β -pancreáticas expressam um terceiro membro da família de canais K_{Ca} , o canal BK. A relevância dos canais K_{Ca} para a fisiologia da célula β -pancreática não é bem conhecida, devido em parte à insuficiente utilização dos bloqueadores de canais disponíveis.

OBJECTIVO GERAL: O objetivo principal deste trabalho consistiu em determinar o envolvimento de diferentes canais K_{Ca} nos processos de *bursting* e disparo de PAs induzidos por glicose em células β -pancreáticas.

TÉCNICAS: A atividade elétrica foi registada com microelétrodos de alta resistência em ilhéus de murganho microdissecados. As correntes de K^+ foram registadas por *patch-clamp* (*whole-cell*) em células β -pancreáticas isoladas ou células BRIN-BD11 secretoras de insulina. A $[\text{Ca}^{2+}]_i$ foi registada em ilhéu único por microfluorimetria de Fura-2.

RESULTADOS E CONCLUSÕES: A ação dos bloqueadores BK caribdotoxina (CTX) e penitrem A (PTA) na atividade elétrica induzida por glicose (GIEA) é reportada no Capítulo 3. Os registos envolvendo CTX foram obtidos em células do ilhéu muito superficiais de forma a aumentar o acesso do péptido. Ambos os bloqueadores afetaram quer o processo de *bursting* (hiperpolarizando o patamar do *burst*, reduzindo a duração e causando disrupção da sua regularidade) quer as oscilações da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ correspondentes (reduzindo a sua duração e amplitude). A ação dos bloqueadores pode ser explicada por um modelo segundo o qual os canais BK

desempenham um papel não convencional em regular a corrente K_V e o limiar do potencial de disparo dos PAs.

Tal como se reporta no Capítulo 4, PTA bloqueou uma componente da corrente de K^+ induzida por voltagens no intervalo +20/+80 mV. A corrente sensível a PTA exibiu ativação rápida e uma cinética de inativação lenta. Esta corrente era idêntica à componente isolada por iberiotoxina, validando assim a utilidade de PTA como bloqueador BK em células β -pancreáticas.

A ação dos bloqueadores apamina e UCL 1684 na GIEA é reportada no Capítulo 5. Ambos os bloqueadores aumentaram moderadamente a duração e amplitude dos PAs e diminuíram acentuadamente a AHP, indicando que os canais SK são ativados pela entrada de Ca^{2+} e participam na repolarização dos PAs. Os bloqueadores causaram disrupção do disparo de PAs ao longo do *burst*, gerando frequentemente um modo de disparo em forma de "picos e vales" consistindo em episódios de disparo de alta frequência com repolarizações incompletas, separados por períodos hiperpolarizados. Os "picos" são provavelmente causados pela redução da AHP, ao passo que os "vales" podem refletir a ativação de outros canais K_{Ca} pelos aumentos decorrentes de Ca^{2+} . Ambos os bloqueadores reduziram a duração do *burst*, de forma consistente com o efeito putativo naqueles canais.

A ação do bloqueador TRAM-34 na GIEA é reportada no Capítulo 6. O bloqueador antagonizou o decaimento da frequência dos PAs e a redução da sua amplitude ao longo do *burst*. A corrente IK da célula β -pancreática pode assim ser encarada como uma corrente subjacente a uma AHP lenta, que em neurónios é responsável pela adaptação da frequência de disparo. Desta forma, nalgumas experiências TRAM-34 reduziu a duração da fase silenciosa e aumentou a duração do *burst*. Noutros casos TRAM-34 reduziu a duração do *burst*, sugerindo que o aumento putativo de Ca^{2+} associado à perda de adaptação pode ativar uma componente K_{slow} diferente. Em consonância com a sua qualidade de bloqueador IK, o fármaco inibiu uma corrente de K^+ sensível a Ca^{2+} e ao agonista DCEBIO, corrente esta que exibiu características de retificação de entrada para concentrações simétricas de K^+ transmembranar.

IMPLICAÇÕES FISIOLÓGICAS: Para além dos canais IK nenhum dos outros canais K_{Ca} contribui para o processo de terminação do *burst* em condições fisiológicas, apesar de que todos parecem estar envolvidos no controlo da excitabilidade da célula β -pancreática. Os canais BK são determinantes para a regularidade do processo de *bursting* e para a robustez das oscilações de Ca^{2+} . Já os canais SK são determinantes para a regularidade do disparo de potenciais de ação. Os canais IK, por seu turno, regulam principalmente a excitabilidade da célula β -pancreática através do processo de adaptação da frequência de disparo.

Summary

BACKGROUND: Pancreatic β -cells secrete insulin in a pulsatile fashion in response to glucose. Pulsatile insulin release is subserved by an oscillatory pattern of electrical activity (bursting), consisting of Ca^{2+} -dependent action potentials firing from depolarized plateau (active) phases which alternate with hyperpolarized (silent) phases.

The burst active phase-silent phase transitions are seemingly promoted by a Ca^{2+} -sensitive, slowly developing K^+ current (K_{slow}). Ca^{2+} -activated K^+ channels (i.e., small-conductance or SK and/or intermediate-conductance or IK channels) are thought to play a key role in K_{slow} . Pancreatic β -cells express a third member of the K_{Ca} channel family, the large-conductance BK channel. The relevance of K_{Ca} channels in pancreatic β -cell physiology is generally poorly understood, owing in part to insufficient use of available channel blockers or experimental pitfalls related to its use in intact islets.

GENERAL AIM: The major aim of this work was to assess the involvement of the different K_{Ca} channels in glucose-induced bursting and spiking activity in pancreatic β -cells.

TECHNIQUES: The electrical activity was recorded from microdissected mouse islets using high-resistance microelectrodes. K^+ currents were recorded from single pancreatic β -cells or clonal insulin-secreting BRIN-BD11 cells, using the whole-cell configuration of the patch-clamp technique. The $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was recorded from single islets via Fura-2 microfluorometry.

RESULTS AND CONCLUSIONS: The actions of the BK blockers charybdotoxin (ChTx) and penitrem A (PTA) on glucose-induced electrical activity (GIEA) are reported in Chapter 3. For ChTx the recordings were made from rather superficial islet cells to enhance access of the peptide. Both blockers affected bursting (i.e., hyperpolarized the plateau, reduced the duration and often disrupted its regularity) and the correlative $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscillations (i.e., reduced the duration as well as the

amplitude). Blocker actions may be accounted for by a model whereby BK channels play a non-canonical role in regulating the K_v current and the voltage threshold for action potential firing.

As reported in Chapter 4, PTA blocked a component of whole-cell K^+ current elicited by steps to voltages in the range +20/+80 mV. The PTA-sensitive current exhibited fast activation and slow inactivation kinetics. This current was identical to the current component isolated by the prototypical BK blocker iberiotoxin, thus validating the usefulness of PTA as a BK blocker in pancreatic β -cells.

The actions of the SK blockers apamine and UCL 1684 on GIEA are reported in Chapter 5. The blockers caused moderate increases in spike duration and amplitude and decreased markedly the AHP, indicating that SK channels are activated by Ca^{2+} entry and participate in spike repolarization. The blockers often disrupted spike firing throughout the burst, generating a "peak-and-valley" firing mode consisting of episodes of high-frequency spiking with incomplete repolarizations separated by hyperpolarized troughs. While the "peaks" likely originate from the depressed AHP the "valleys" may reflect activation of other K_{Ca} channels by the resulting Ca^{2+} rises. The blockers generally decreased burst duration, consistent with the putative effect on the latter channels.

The action of the IK blocker TRAM-34 on GIEA is reported in Chapter 6. The blocker opposed the decay in spike frequency and the reduction in spike amplitude along the burst. The pancreatic β -cell IK current may thus be regarded as underlying a slow AHP, which in neurons accounts for spike-frequency adaptation. Consistently, TRAM-34 reduced the burst silent phase duration and increased burst duration in some experiments. In other cases TRAM-34 reduced burst duration, suggesting that the putative Ca^{2+} rise associated with the adaptation loss might activate a distinct K_{slow} component. Consistent with TRAM-34 blocking IK channels, the drug inhibited a Ca^{2+} - and DCEBIO-sensitive K^+ current displaying inward rectification for symmetrical transmembrane K^+ concentrations.

PHYSIOLOGICAL IMPLICATIONS: None of the different K_{Ca} channel subtypes besides IK channels contributes to burst termination under physiological conditions,

Summary

although they all appear involved in the control of pancreatic β -cell excitability in different ways. BK channels are critical to sustaining regular bursting and robust Ca^{2+} waves. As to SK channels, they are key determinants of spike firing regularity. IK channels, in turn, modulate excitability in pancreatic β -cells primarily by accounting for spike-frequency adaptation.

Capítulo 1

Introdução

1.1 O pâncreas endócrino e a secreção de insulina

1.2 Mecanismos de acoplamento estímulo-secreção na célula β -pancreática

1.3 Canais de K^+ sensíveis a Ca^{2+} (K_{Ca}) na célula β -pancreática

1.4 Objetivos do trabalho

1. Introdução

1.1 O pâncreas endócrino e secreção de insulina

O pâncreas tem a capacidade de desempenhar uma dupla função na medida em que apresenta dois tipos de secreção: endócrina e exócrina. O pâncreas endócrino está organizado em micro-órgãos, designados por ilhéus de Langerhans, que se encontram dispersos no tecido exócrino. Os ilhéus segregam um conjunto de hormonas, nomeadamente insulina e glucagina, que chegam aos órgãos alvo através da circulação sanguínea.

O pâncreas endócrino está diretamente relacionado com a regulação da glicémia no organismo. Alterações no seu funcionamento podem causar ou reforçar patologias associadas a hiperglicémia (caso da *diabetes mellitus*) ou a hipoglicémia (caso da hipoglicémia hiperinsulinémica persistente da infância), isto é, disfunções da regulação da concentração de glicose no sangue.

Já o pâncreas exócrino funciona como glândula digestiva, uma vez que o suco digestivo (constituído por diferentes enzimas digestivas ou respetivos precursores, como por exemplo α -amilase, lipase pancreática e tripsinogénio) é segregado diretamente para o tubo digestivo.

1.1.1 O ilhéu de Langerhans

Os ilhéus de Langerhans são estruturas encapsuladas por uma camada de fibroblastos e colagénio, encontrando-se pois parcialmente separadas do tecido exócrino de forma a funcionar como micro-órgãos. Em termos de massa representam uma pequena fração do tecido exócrino (cerca de 1 a 2 %). O teor de insulina dos ilhéus não é o mesmo ao longo do pâncreas, verificando-se que os ilhéus localizados na extremidade dorsal contêm e segregam mais insulina do que os do lobo duodenal (Trimble et al., 1982; Bonner-Weir, 1991).

O tamanho dos ilhéus e, conseqüentemente, o número de células por ilhéu é altamente heterogéneo dentro do mesmo pâncreas, estando os respetivos diâmetros

Introdução

tipicamente distribuídos entre os 50 e os 400 μm . Apesar de os ilhéus de menores dimensões ($< 160 \mu\text{m}$) se encontrarem em maior percentagem, o volume que ocupam no pâncreas é inferior ao dos ilhéus de maiores dimensões (Bonner-Weir, 1991; Elayat *et al.*, 1995).

Os ilhéus de Langerhans podem considerar-se aglomerados de diferentes células endócrinas. De facto cada ilhéu contém entre 500 e 5000 células, das quais aproximadamente 80 % são células β secretoras de insulina. Entre as restantes 20 % podem encontrar-se células α secretoras de glucagina, células δ secretoras de somatostatina e células PP, secretoras de polipéptido pancreático (Bonner-Weir, 1991).

O ilhéu de Langerhans é uma estrutura altamente vascularizada, característica que é fundamental para uma correta homeostasia da glicose, tornando possível a libertação de insulina na corrente sanguínea em tempo útil, em resposta a alterações da concentração de glicose no sangue. O fluxo sanguíneo ocorre do núcleo do ilhéu em direção ao manto, isto é, no sentido células $\beta \rightarrow$ células $\alpha \rightarrow$ células δ , já que as células α e δ ocupam regiões essencialmente periféricas (Samols *et al.*, 1988).

1.1.2 A célula β -pancreática

As células β -pancreáticas são as únicas células que, em animais adultos, expressam ativamente o gene da insulina. Esta hormona é primeiramente sintetizada sob a forma de pró-insulina, sendo em seguida clivada por endopeptidases e uma carboxipeptidase, originando a hormona nativa insulina e peptídeo C, que se acumulam em grânulos secretores. A insulina é constituída por duas cadeias polipeptídicas de 21 e 30 aminoácidos, que se encontram unidas por pontes dissulfeto (Jones & Persaud, 2010).

Após estimulação da célula β -pancreática pelo aumento da concentração plasmática de glicose, os grânulos secretores fundem-se com a membrana celular e libertam o seu conteúdo na rede de capilares do ilhéu. A secreção de insulina ocorre

quase exclusivamente por exocitose e, tal como acontece noutras células, é um processo dependente de Ca^{2+} e de várias proteínas envolvidas no transporte, ancoragem e fusão dos grânulos secretores com a membrana plasmática (Rorsman & Renstrom, 2003).

Um outro elemento distintivo da célula β -pancreática é o seu sistema de transporte transmembranar de glicose, baseado em transportadores específicos, GLUT-2. Esta isoforma do transportador de glicose apresenta uma elevada capacidade e baixa afinidade para a hexose, fazendo com que a concentração intracelular de glicose seja muito próxima da concentração extracelular e que, portanto, a célula β -pancreática possa ser considerada como um “sensor de glicose” (Lenzen & Tiedge, 1994).

1.1.3 Secreção de insulina e diabetes *mellitus* tipo 2

A secreção de insulina que se verifica após ocorrerem aumentos da concentração plasmática de glicose apresenta uma resposta bifásica. De facto, quando a concentração de glicose aumenta de valores basais para níveis estimulatórios observa-se um incremento da taxa de secreção que atinge um pico durante os primeiros 2 ou 3 minutos, após o que sofre um decaimento durante os 5-10 minutos subsequentes; este período designa-se por 1ª fase da secreção de insulina. Depois desta fase, se a concentração de glicose se mantiver em níveis estimulatórios observa-se uma 2ª fase, caracterizada por um aumento lento da taxa de secreção que atinge um máximo ao fim de cerca de 1 hora. Este patamar mantém-se sensivelmente constante durante 3-4 horas. Para exposições mais prolongadas a glicose observa-se um decréscimo da taxa de secreção, associado a fenómenos de dessensibilização da célula β -pancreática (Nesher & Cerasi, 2002).

Sabe-se que, em estudos *in vitro*, as características da resposta bifásica de secreção de insulina estimulada por glicose podem variar com as condições de cultura a que são sujeitos os ilhéus. Aquelas características variam também com a espécie. Por exemplo, em murganhos a 2ª fase da secreção de insulina é muito menos pronunciada do que a 1ª fase, ao contrário do que sucede com ratos e humanos (Zawalich *et al.*, 2008).

Introdução

O perfil da variação da secreção de insulina com a concentração de glicose tem uma forma invariavelmente sigmóide. No entanto, tanto a concentração limiar de glicose como o valor da concentração de glicose a partir do qual a secreção é máxima, exibem algumas diferenças entre espécies. Por exemplo, no caso de murganhos, a concentração limiar de glicose para a estimulação da secreção de insulina é cerca de 6-7 mM, um valor claramente superior ao encontrado em rato (cerca de 4 mM). Esta deslocação da curva dose-resposta também tem consequências no valor mínimo da concentração de glicose correspondente ao máximo de secreção (cerca de 20 mM e 16-20 mM para murganho e rato, respectivamente) (Gembal *et al.*, 1992; Ostenson *et al.*, 1993).

A normalidade do padrão de secreção de insulina pela célula β -pancreática e do seu reconhecimento por tecidos periféricos, com destaque para o músculo esquelético, é criticamente importante para a regulação da glicémia pós-prandial. De fato, a insuficiência na secreção de insulina associada ao desenvolvimento de insulino-resistência periférica pode produzir um quadro de hiperglicémia crônica, susceptível de causar as várias manifestações clínicas características da diabetes *mellitus* tipo 2.

A etiologia desta disfunção metabólica ainda está insuficientemente estabelecida, sendo geralmente aceite, no entanto, que a incidência da patologia se intensifica quando à predisposição genética se associam factores ambientais (como uma dieta rica em hidratos de carbono e gordura saturada) e a ocorrência de obesidade abdominal.

A intervenção de factores genéticos condicionantes da função da célula β -pancreática é relevada pela observação de que a capacidade secretora se encontra parcialmente comprometida em indivíduos normais que sejam descendentes diretos de diabéticos (O'Rahilly *et al.*, 1988). Atestando ainda a relevância da célula β -pancreática para a etiologia da diabetes tipo 2, sabe-se de há muito que a 1ª fase da secreção de insulina se encontra comprometida em indivíduos portadores daquela patologia (Porte, 1991).

1.2. Mecanismos de acoplamento estímulo-secreção na célula β -pancreática

O acoplamento estímulo-secreção na célula β -pancreática tem por base três pontos fundamentais: primeiro, a glicose tem de ser metabolizada para induzir secreção de insulina (Grodsky *et al.*, 1963); segundo, na ausência de cálcio extracelular, o metabolismo da glicose não aumenta a secreção de insulina (Milner & Hales, 1967); e, por último, quando estimulada com glicose a célula β -pancreática apresenta uma atividade elétrica que envolve a geração de potenciais de ação de Ca^{2+} (Dean & Matthews, 1970a).

O metabolismo da glicose produz fatores de acoplamento que alteram as permeabilidades iônicas da membrana plasmática. O conhecimento dos diferentes canais iônicos presentes na célula β -pancreática e do seu envolvimento na atividade elétrica permite uma melhor compreensão dos mecanismos associados ao acoplamento entre o principal estímulo (glicose) e a secreção de insulina.

1.2.1 Canais de K^+ e metabolismo da glicose

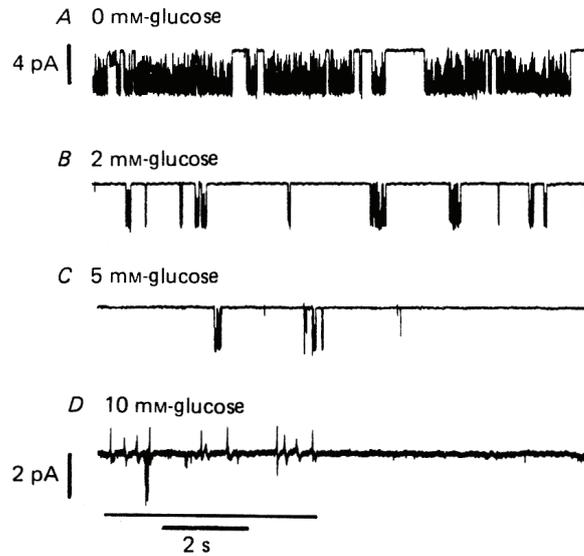
Para o conhecimento do papel desempenhado pelo metabolismo da glicose na atividade elétrica da célula β -pancreática foi crucial que, em 1984, Cook e Hales identificassem, pela primeira vez, o canal de K^+ sensível a ATP (K_{ATP}), um canal de potássio inibido rápida e reversivelmente por ATP (Cook & Hales, 1984).

Os primeiros estudos de *patch-clamp* revelaram que este canal é inibido por concentrações de ATP da ordem dos micromolar, sendo a curva dose-resposta deslocada para concentrações maiores na presença de ADP (Cook & Hales, 1984; Kakei *et al.*, 1986). De fato, foi confirmado posteriormente que é a variação da razão ATP/ADP, e não as concentrações individuais de cada um dos nucleótidos, que controla a atividade do canal K_{ATP} (Dunne & Petersen, 1986).

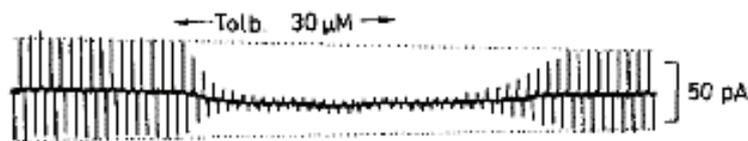
Em célula β isolada na ausência de glicose, o canal K_{ATP} apresenta uma elevada probabilidade de abertura, constituindo portanto o principal determinante do potencial de membrana (Rorsman *et al.*, 2011). A adição de glicose às células reduz a atividade do canal de uma forma dose-dependente (ver **Figura 1.1 (A)**).

Introdução

A



B



C

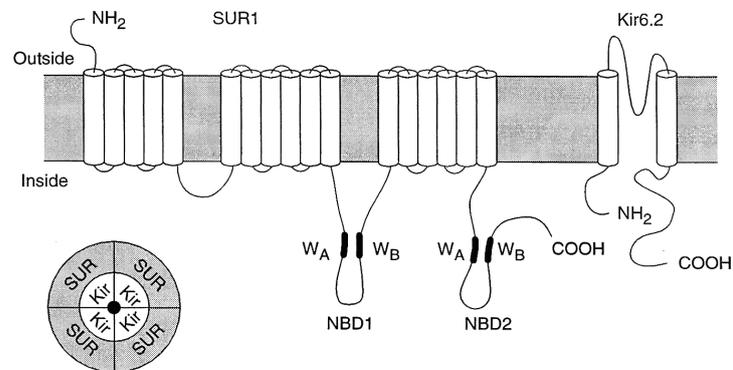


Figura 1.1: Canal K_{ATP} . **(A)** Atividade do canal em função da concentração de glicose, registada por *patch-clamp* no modo *cell-attached* (as aberturas são denotadas pelas deflexões negativas da corrente). A estimulação progressiva com glicose reduz o tempo médio em que o canal se encontra aberto. Adaptado de (Ashcroft *et al.*, 1988) **(B)** Efeito de tolbutamida, uma sulfonilureia bloqueadora do canal K_{ATP} , nas correntes evocadas por pulsos de potencial de ± 10 mV (registro de *patch-clamp* no modo *whole-cell*). Adaptado de (Trube *et al.*, 1986); **(C)** Estrutura do canal K_{ATP} mostrando cada uma das subunidades SUR1 e Kir6.2. Adaptado de (Ashcroft, 2000).

A partir de 1999 Göpel e colaboradores registaram correntes em células β -pancreáticas localizadas em ilhéus intactos (Gopel *et al.*, 1999a; Rorsman *et al.*, 2011). Estas correntes são pouco contaminadas por correntes provenientes das células adjacentes, devido à baixa condutância ($\approx 0,2$ nS) das uniões comunicantes (*gap junctions*) que mantêm as células em contacto (Perez-Armendariz *et al.*, 1991; Zhang *et al.*, 2008). Verificou-se que a curva de dose-resposta para a ação de glicose no canal K_{ATP} se encontra claramente desviada para maiores concentrações relativamente à situação verificada na célula β -pancreática isolada (valores de IC_{50} de aproximadamente 5 mM vs. 1 mM) (Ashcroft *et al.*, 1988; Gopel *et al.*, 1999a). Desta forma, para além de a inibição dos canais K_{ATP} pela glicose ser responsável pela despolarização da célula β -pancreática e pela indução de atividade elétrica, parece também contribuir para a modulação desta última na região de maiores concentrações de glicose.

Em termos das suas propriedades biofísicas, o canal K_{ATP} não é sensível à voltagem e apresenta uma relação corrente-voltagem com características de retificação de entrada (Findlay *et al.*, 1985a; Ashcroft, 1988; Ribalet *et al.*, 1988).

Este canal, um membro da família de transportadores "ATP-binding cassette transporters", é constituído por dois tipos de subunidades: a proteína SUR1, com funções reguladoras e que inclui os locais de ligação das sulfonilureias, diazóxido (fármaco ativador) e nucleótidos, e a proteína Kir6.2 que forma o poro, determinando a condutância e seletividade a K^+ (Ashcroft, 2000). O canal funcional envolve a associação de quatro subunidades SUR1 a quatro subunidades Kir6.2, na forma de um octâmero (Aittoniemi *et al.*, 2009) (ver **Figura 1.1 (C)**).

A ligação das sulfonilureias a SUR1 (ex: tolbutamida, utilizada neste trabalho) exerce uma ação inibidora sobre o canal K_{ATP} (ver **Figura 1.1 (B)**). Desta forma estes fármacos despolarizam a célula β -pancreática e estimulam a secreção de insulina, razão por que são utilizados na terapia da *diabetes mellitus* tipo 2. As sulfonilureias diminuem a probabilidade de abertura do canal, não afetando a corrente unitária (Ashcroft *et al.*, 1984; Ashcroft, 1988).

O aumento da razão ATP/ADP citoplasmática, induzido pela glicose, ocorre na sequência da fosforilação desta pela enzima de baixa afinidade glucocinase, a que se

Introdução

segue a oxidação pela glicólise, ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa. A consequência é o fecho de canais K_{ATP} e a despolarização da célula β -pancreática para níveis que, provavelmente, são parcialmente determinados pela atividade de canais catiónicos não seletivos da família dos canais TRP (*transient receptor potential*) (Flockerzi *et al.*, 2007; Rorsman *et al.*, 2011). Esta despolarização desencadeia atividade elétrica na forma de potenciais de ação, cujo sistema de canais sensíveis à voltagem será abordado na secção seguinte.

1.2.2 Atividade elétrica e canais iónicos subjacentes ao potencial de ação

O desenvolvimento da técnica de registo intracelular do potencial de membrana, utilizando microelétrodos de alta resistência, permitiu o estudo, com elevada resolução temporal, da atividade elétrica em ilhéus de Langerhans microdissecados (Dean & Matthews, 1970b).

Registos obtidos na ausência de glicose mostram que a célula β -pancreática se encontra silenciada, mantendo um potencial de membrana estável e próximo de -70 mV (Meissner *et al.*, 1978). Nestas condições o potencial de membrana é determinado pela permeabilidade ao ião K^+ , através dos canais sensíveis a ATP referidos na secção anterior. O aumento da concentração de glicose para um valor limiar, que em murganho corresponde a aproximadamente 7 mM, induz a despolarização da membrana para um patamar de cerca de -55 mV e o disparo de potenciais de ação (Meissner *et al.*, 1978).

O disparo de potenciais de ação, causado pela exposição a concentrações de glicose acima do valor limiar, é contínuo durante um período que varia entre 1 a 3 minutos. Segue-se um período em que o disparo de potenciais de ação alterna entre fases despolarizadas (ativas) e fases hiperpolarizadas (silenciosas), padrão normalmente conhecido por *bursting* (ver **Figura 1.2 (A)**). Tipicamente a diferença de potencial entre o patamar das fases ativas e as fases silenciosas dos *bursts* é de cerca de 10 mV (Henquin & Meissner, 1984).

O incremento progressivo da concentração de glicose traduz-se no aumento da duração da fase activa e na diminuição da duração da fase silenciosa dos *bursts*

(ver **Figura 1.2 (B)**). Para valores suficientemente elevados da concentração as células entram em modo contínuo de disparo de potenciais de ação (Ribalet & Beigelman, 1979).

A fase despolarizante dos potenciais de ação é assegurada pela ativação de canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem (canais Ca_V), que na célula β -pancreática de murganho existem na forma de quatro tipos (Barg et al., 2001; Schulla et al., 2003; Vignali et al., 2006): tipo L (Ca_V 1.2, contribuem com 50-60 % da corrente total de Ca^{2+} induzida por despolarização), tipo P/Q (Ca_V 2.1, 10-15 %), tipo N (Ca_V 2.2, 0-15 %) e tipo R (Ca_V 2.3, 15-25 %). Ao contrário de outras espécies (ex: humanos e rato (Braun et al., 2008)), não existe evidência para a expressão de canais tipo T (Ca_V 3.0) em células β -pancreáticas de murganho. Nesta espécie os canais tipo L parecem desempenhar um papel preponderante na corrente total de Ca^{2+} induzida por despolarização, sendo provavelmente esta a razão por que o seu bloqueio inibe a secreção de insulina em cerca de 80 % (Schulla et al., 2003).

É de salientar, no entanto, que supressão do disparo de potenciais de ação na célula β -pancreática requer concentrações anormalmente elevadas de nifedipina, um bloqueador de canais tipo L da família das di-hidropiridinas (isto é, concentrações da ordem de grandeza de 10 μM , sendo 1 μM ineficiente) (Rosario *et al.*, 1993); este efeito ocorre em condições em que o potencial de membrana na base dos potenciais de ação assume valores muito menos negativos, sugerindo que a acção inibidora de nifedipina se deve, pelo menos em parte, à inativação dos canais de Ca^{2+} pela voltagem, processo proeminente na célula β -pancreática (Rorsman et al., 2011). Estes resultados levantam ainda a hipótese de que, para além dos canais tipo L, outros tipos de canais Ca_V contribuem para a fase despolarizante dos potenciais de ação.

Introdução

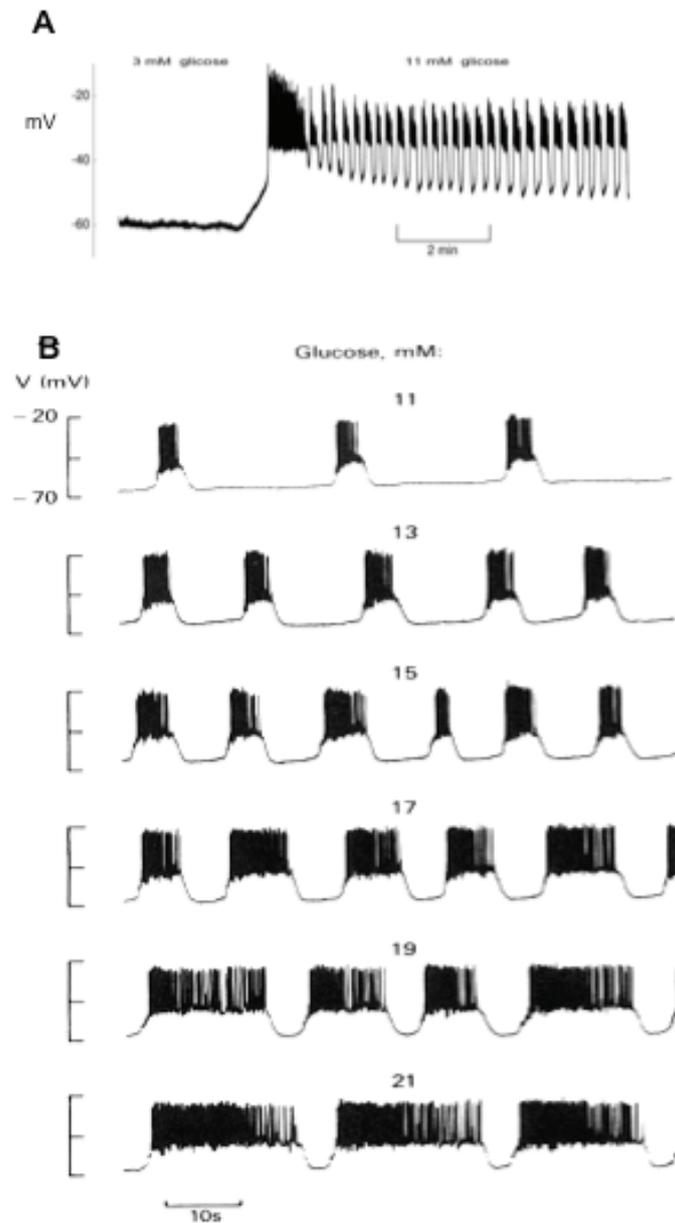


Figura 1.2: Atividade elétrica registada num ilhéu microdissecado. **(A)** Registo com microelétrodos intracelulares da atividade elétrica, induzida por um aumento da concentração de glicose de 3 para 11 mM. A membrana encontra-se hiperpolarizada quando as células são sujeitas à concentração subestimulatória de glicose (3 mM). A estimulação com 11 mM glicose traduz-se num período de atividade elétrica contínua a partir de um patamar despolarizado, a que se segue o disparo de potenciais na forma de *bursts*; **(B)** Efeito do aumento da concentração de glicose na duração das fases ativa e silenciosa dos *bursts*. Adaptado de (Sherman *et al.*, 1990).

Relativamente à célula β -pancreática isolada, as correntes de Ca^{2+} induzidas por despolarização são consistentemente maiores quando medidas em células integradas no ilhéu intacto. Por exemplo, a despolarização para 0 mV induz correntes de aproximadamente 90 e 180 pA em células β -pancreática isoladas e células integradas no ilhéu, respectivamente (Gopel et al, 1999). Não obstante, os valores das correntes são diminutos e indicativos de uma densidade membranar de canais muito baixa (da ordem de grandeza de 0,5 canais por μm^2). Sendo a secreção de insulina dependente do influxo de Ca^{2+} , é plausível que a eficácia do acoplamento seja conseguida à custa da co-localização de canais de Ca^{2+} e grânulos secretores (Bokvist et al., 1995). Esta hipótese é compatível com a observação de que a actividade de múltiplos canais só é detectável numa fracção relativamente pequena dos registos de correntes unitárias (nos restantes casos não é detectada qualquer actividade), sugerindo uma distribuição marcadamente heterogénea dos canais de Ca^{2+} na membrana, com tendência para aglomeração (Barg et al., 2001).

No que diz respeito à repolarização dos potenciais de ação os canais de K^+ sensíveis à voltagem (canais K_v) têm um papel importante embora não exclusivo, tendo sido também sugerido um papel para os canais de K^+ ativados por Ca^{2+} (canais K_{Ca}), que serão considerados mais à frente no presente capítulo. Na célula β -pancreática já foram identificados canais K_v das sub-famílias K_v1 , K_v2 e K_v3 (MacDonald *et al.*, 2001).

De entre os vários tipos de canais K_v , são os canais $\text{K}_v2.1$ os que provavelmente mais contribuem para a corrente de saída dependente da voltagem na célula β -pancreática. A supressão farmacológica ou genética destes canais afeta marcadamente a secreção de insulina. Verificou-se, assim, que a supressão da corrente de saída mediada por canais $\text{K}_v2.1$ aumentou acentuadamente a secreção de insulina (MacDonald et al., 2001); por outro lado, a ablação dos genes que codificam os canais $\text{K}_v2.1$ aumentou marcadamente a duração dos potenciais de ação disparados pela célula β -pancreática, apresentando-se os animais hiperinsulinémicos e hipoglicémicos (Jacobson *et al.*, 2007).

A inativação das correntes mediadas por canais $\text{K}_v2.1$ é pequena e muito lenta à temperatura ambiente, embora estas características sofram uma alteração

Introdução

significativa quando as experiências são realizadas a 32-35 °C, ou na presença de secretagogos (MacDonald *et al.*, 2003). De facto, aqueles canais apresentam diversos sítios de fosforilação pela proteína cinase A (terminal carboxílico da subunidade α) e proteína cinase C (*loop* intracelular entre S4 e S5), tendo sido apresentados como um alvo adicional dos secretagogos de insulina (MacDonald *et al.*, 2003; MacDonald & Wheeler, 2003).

1.2.3 Oscilações de potencial de membrana

Os canais de potássio sensíveis a ATP (K_{ATP}) são há muito considerados a chave do mecanismo de acoplamento estímulo-secreção, observado na célula β -pancreática. Estes canais teriam assim um papel central na despolarização da membrana plasmática e na ativação dos canais de cálcio sensíveis à voltagem subjacentes aos potenciais de ação, bem como nos consequentes aumentos da concentração de Ca^{2+} intracelular livre ($[Ca^{2+}]_i$).

A ideia de que os canais K_{ATP} constituem os sensores exclusivos do metabolismo da glicose, mediando não só a despolarização inicial como também a modulação da atividade elétrica oscilatória que ocorre para concentrações de glicose superiores a cerca de 7 mM, não é no entanto consensual entre a comunidade científica.

De fato, quando os canais K_{ATP} foram suprimidos farmacologicamente, recuperando-se no entanto o padrão oscilatório do potencial de membrana através do aumento da concentração de Ca^{2+} extracelular para três ou quatro vezes o seu nível normal, demonstrou-se que a regulação da atividade elétrica pela glicose tinha um perfil semelhante ao que se verifica em condições normais (Rosario *et al.*, 2008). Por outro lado, em animais onde foi removida geneticamente uma das subunidades do canal K_{ATP} (a subunidade Kir6.2), o aumento da concentração de glicose continuava a aumentar o influxo de cálcio através dos canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem (Ravier *et al.*, 2009). É assim plausível que, para além dos canais K_{ATP} , outros canais iónicos tenham um papel ativo na modulação das oscilações do potencial de membrana e do influxo de Ca^{2+} induzidos por glicose na célula β -pancreática. A clarificação destes mecanismos de regulação pela glicose pressupõe a

identificação dos canais subjacentes à atividade elétrica oscilatória e, em particular, dos canais que controlam a duração da fase activa dos *bursts*.

Já em 1983 Atwater e colaboradores formularam a hipótese de que os canais de potássio sensíveis a Ca^{2+} (K_{Ca}) de elevada condutância (canais BK) seriam os canais responsáveis pela terminação da fase activa dos *bursts* e correspondente hiperpolarização membranar, conducente à fase silenciosa. Foi então proposto que, durante a fase activa do *burst*, o influxo de Ca^{2+} associado ao disparo de potenciais de ação causava um aumento progressivo da $[\text{Ca}^{2+}]_i$, susceptível de ativar os canais BK e induzir a transição para a fase hiperpolarizada (Atwater *et al.*, 1983).

No entanto, estudos realizados com caribdotoxina, um bloqueador peptídico de canais BK presentes na célula β -pancreática (Kukuljan *et al.*, 1991) e noutros tipos celulares (Miller *et al.*, 1985), mostraram que a toxina não afetava os *bursts* de atividade elétrica registada com microelétrodos intracelulares em ilhéus intatos (Kukuljan *et al.*, 1991). Muito embora estes resultados pareçam negar o putativo papel dos canais BK na hiperpolarização que termina a fase activa dos *bursts*, atrás referido, foi considerado que os efeitos de caribdotoxina, testados em condições de ilhéu intacto, poderiam ser fortemente condicionados pela difícil acessibilidade da toxina às células sob registo. Foram assim realizadas as experiências descritas no Capítulo 3, em que a actividade eléctrica foi registada a partir de células β -pancreáticas localizadas em camadas muito superficiais do ilhéu. O estudo foi complementado com a análise da acção do alcaloide indólico penitrem A, um potente inibidor de canais BK com eficácia comprovada de penetração em tecidos (Asano *et al.*, 2012), na atividade eléctrica oscilatória induzida por glicose.

Um outro marco na análise das condutâncias iónicas subjacentes ao *burst* foi o estudo de Gopel e colaboradores (Gopel *et al.*, 1999b), em que se desenvolveu um protocolo experimental de estimulação da célula β -pancreática consistindo na aplicação, em regime de *voltage-clamp*, de um comando de voltagem desenhado para simular as alterações de potencial de membrana que ocorrem durante o *burst*. Este comando consta de uma despolarização de -70 mV para -40 mV, a que se segue uma sucessão de pulsos de potencial com uma duração individual de 100 ms e um potencial máximo de 0 mV; o potencial de membrana é subsequentemente mantido em -40 mV durante um período adicional de 10-20s (**Figura 1.3 (A)**).

Introdução

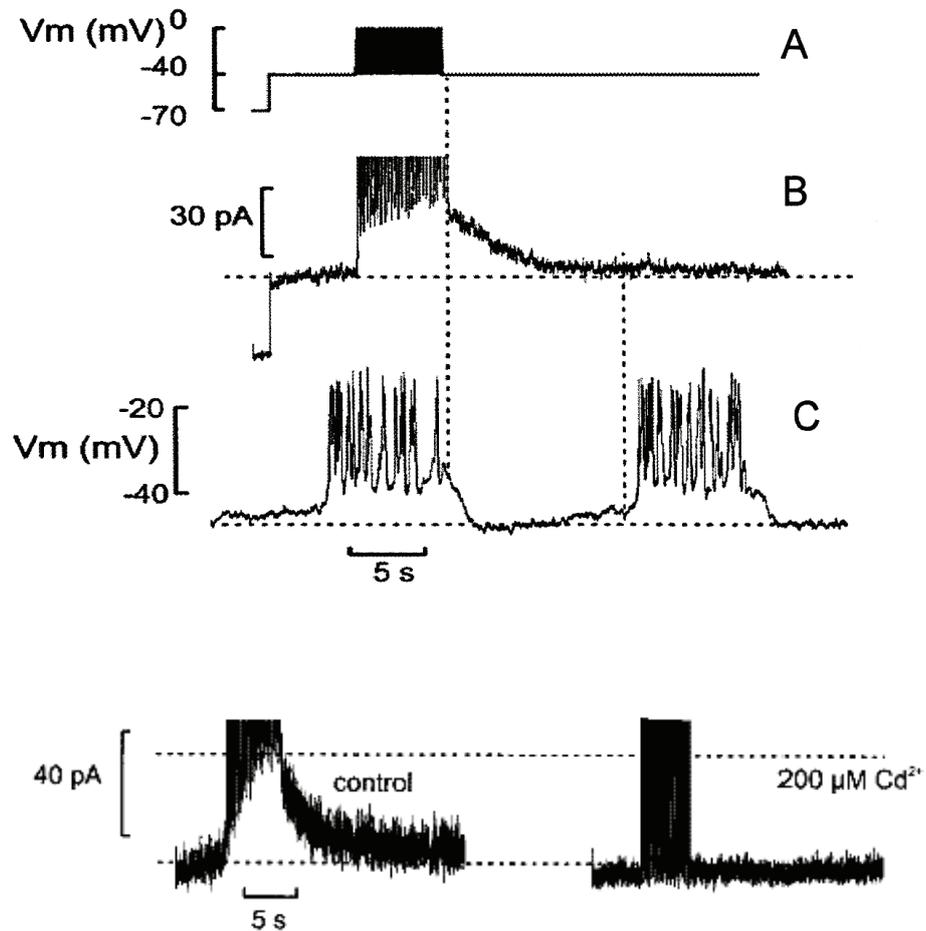


Figura 1.3: *Corrente* K_{slow} . **(A)** Protocolo de pulsos simulando um *burst* de potenciais de ação (ver texto principal); **(B)** Corrente gerada na célula β -pancreática pelo comando de voltagem mostrado em (A). A corrente K_{slow} corresponde à corrente que se desenvolve lentamente durante a geração das correntes transitórias induzidas pelas rampas de voltagem em (A); **(C)** Atividade elétrica de uma célula β -pancreática na presença de 11 mM glicose; **(D)** Efeito de Cd^{2+} na corrente K_{slow} . Adaptado de (Gopel *et al.*, 1999b).

A aplicação de comandos de voltagem com estas características traduziu-se no registo de correntes totais em que é visível uma corrente de saída de desenvolvimento lento (constante de ativação de cerca de 2 s; **Figura 1.3 (B)**). Verificou-se que o potencial de reversão desta corrente variava com a concentração de K^+ extracelular ($[K^+]_o$) de acordo com o previsto pela equação de Nernst para o íão K^+ , identificando-a como uma corrente de K^+ a que se atribuiu a designação de K_{slow} (Gopel *et al.*, 1999b).

A corrente K_{slow} é suprimida por agentes que bloqueiam o influxo de Ca^{2+} na célula β -pancreática (ex: Cd^{2+} e nimodipina, que bloqueiam canais Ca_v (Gopel *et al.*, 1999a; Goforth *et al.*, 2002), sugerindo que a corrente é, pelo menos em parte, transportada por canais K_{Ca} .

A farmacologia da corrente K_{slow} não é de todo clara. Por exemplo, Gopel e colaboradores descreveram uma completa insensibilidade da corrente a tolbutamida (Gopel *et al.*, 1999a); no entanto, num segundo estudo do mesmo laboratório, foi reportada uma sensibilidade muito variável à sulfonilureia (inibição entre 0 e 90%; Kanno *et al.*, 2002). A insensibilidade da corrente K_{slow} a tolbutamida foi também descrita por outros laboratórios (Goforth *et al.*, 2002; Houamed *et al.*, 2010). Não obstante as discrepâncias, K_{slow} é normalmente descrita como sendo uma corrente-mosaico composta por componentes mediadas por canais K_{ATP} e K_{Ca} (Rorsman *et al.*, 2011). (De acordo com Henquin e colaboradores, a actividade dos canais K_{ATP} pode ser indiretamente afetada pelos níveis de Ca^{2+} , dado que aumentos da concentração de Ca^{2+} reduzem os níveis intracelulares de ATP por via da atividade de Ca^{2+} -ATPases (Detimary *et al.*, 1998). Os canais K_{Ca} que contribuem para a corrente K_{slow} não parecem incluir canais BK, dada a aparente insensibilidade da corrente a caribdotoxina (Gopel *et al.*, 1999; Dufer *et al.*, 2009).

Foi reportado, por outro lado, que a corrente K_{slow} é aparentemente insensível a apamina (Gopel *et al.*, 1999b; Goforth *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2005), um inibidor peptídico específico de canais K_{Ca} de baixa condutância (canais SK; Adelman *et al.*, 2012). No entanto, num estudo com uma mensagem contraditória, Zhang e colaboradores mostraram que UCL 1684, um inibidor não-peptídico de canais SK (Rosa *et al.*, 1998), reduziu acentuadamente a corrente (Zhang *et al.*, 2005).

De acordo com Lebrun e colaboradores, a exposição de ilhéus intatos a apamina não pareceu afetar a atividade elétrica induzida por glicose, registada com microelétrodos intracelulares (Lebrun *et al.*, 1983). Com o propósito de avaliar o possível envolvimento de canais SK na dinâmica do *burst*, no presente trabalho foi

Introdução

re-investigada a ação de apamina e investigada pela primeira vez a ação de UCL 1684 na atividade elétrica oscilatória (Capítulo 5).

Foi ainda reportada a ação inibidora da corrente K_{slow} por TRAM-34 (Dufer et al., 2009), um inibidor não-peptídico de canais K_{Ca} de condutância intermédia (canais IK) (Wulff et al., 2000). O Capítulo 6 descreve pela primeira vez a ação de TRAM-34 nas correntes de K^+ da célula β -pancreática isolada e na atividade elétrica oscilatória, registada em ilhéus intactos com microelétrodos intracelulares.

A corrente K_{slow} é inibida pela glicose no intervalo de concentrações 5-10 mM (Goforth et al., 2002) e 15-30 mM (Kanno et al., 2002). Muito embora esta inibição possa refletir a redução da atividade de canais K_{ATP} , é também plausível que os canais K_{Ca} que contribuem para aquela corrente possam estar sujeitos a controlo negativo pelo metabolismo da glicose.

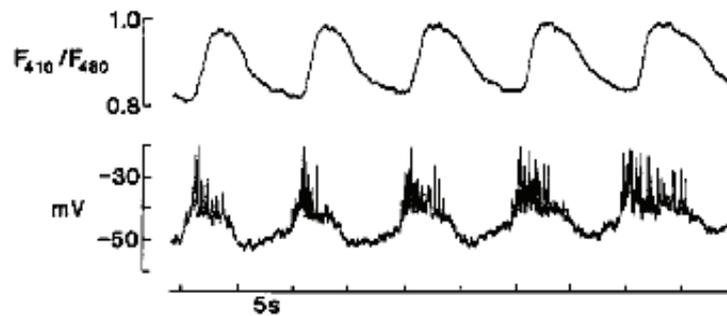
1.2.4 Oscilações de Ca^{2+} intracelular

Tal como se referiu anteriormente, o disparo de potenciais de ação traduz-se em influxo de Ca^{2+} através de canais Ca_V e em aumentos da concentração de Ca^{2+} intracelular livre ($[Ca^{2+}]_i$). São estes aumentos da $[Ca^{2+}]_i$ (mais precisamente, os aumentos dos níveis de Ca^{2+} sub-membranar nas proximidades dos canais) que estimulam a exocitose dos grânulos secretores da célula β -pancreática, produzindo a secreção de insulina em resposta a glicose; os canais que mais contribuem para o acoplamento glicose-insulina são os canais $Ca_V1.2$, tanto ao nível da primeira como da segunda fase da secreção (Rorsman *et al.*, 2012).

As células β -pancreáticas encontram-se acopladas elétrica e metabolicamente através de uniões comunicantes (Meda *et al.*, 1986), possibilitando a sincronização da atividade elétrica ao longo do ilhéu (Meda *et al.*, 1984), que assim funciona como um "sincício". Previu-se assim que seria possível medir variações globais da $[Ca^{2+}]_i$ ao nível de um único ilhéu intacto (ou de parte de um ilhéu), o que de fato se veio a verificar em 1989, recorrendo a uma sonda fluorescente de Ca^{2+} e a técnicas de microscopia quantitativa de fluorescência (Valdeolmillos et al., 1989).

Demonstrou-se então pela primeira vez que, na presença de uma concentração estimulatória de glicose, a $[Ca^{2+}]_i$ oscilava com uma frequência compatível com a dos *bursts* de atividade elétrica.

A



B

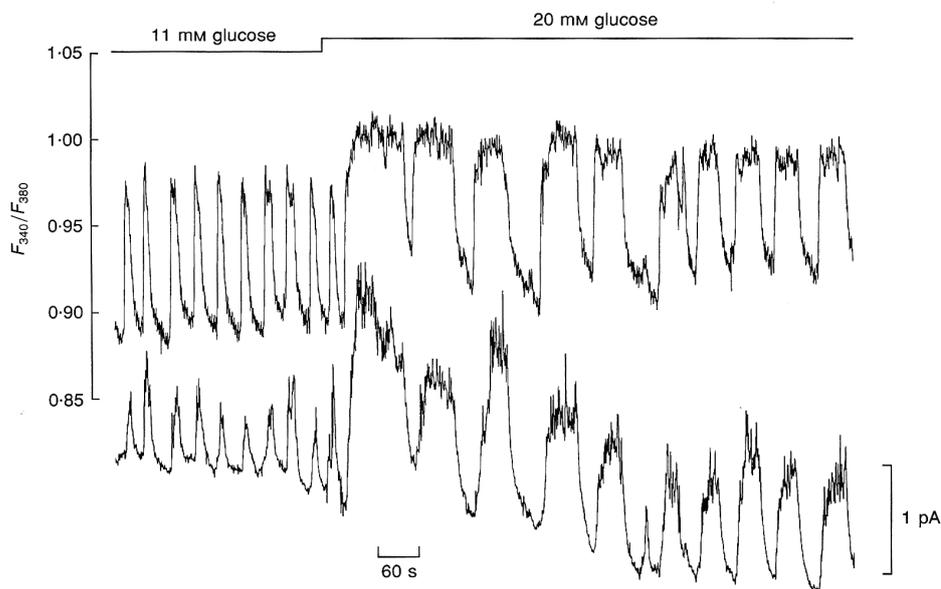


Figura 1.4: Atividade oscilatória do ilhéu de Langerhans intacto. (A) Registo simultâneo de potencial de membrana de uma célula β -pancreática utilizando microelétrodos intracelulares e dos níveis de Ca^{2+} livre intracelular do ilhéu inteiro por microscopia de fluorescência. Adaptado de (Santos *et al.*, 1991); **(B)** Registo simultâneo de oscilações da concentração de Ca^{2+} livre intracelular por microscopia de fluorescência e da secreção de 5-HT/insulina por microamperometria com elétrodos de fibra de carbono. Adaptado de (Barbosa *et al.*, 1998).

Introdução

O passo seguinte foi dado com a realização de uma série adicional de experiências, em que se registou simultaneamente a $[Ca^{2+}]_i$ ao nível de um único ilhéu (com uma sonda fluorescente) e o potencial de membrana de uma célula β -pancreática do mesmo ilhéu (com microelctrodos intracelulares). Neste estudo Santos e colaboradores (Santos et al., 1991) demonstraram o elevado grau de sincronia entre os *bursts* de atividade elétrica e as oscilações da $[Ca^{2+}]_i$, em ilhéus estimulados com glicose (ver **Figura 1.4 (A)**). Utilizando técnicas de imagiologia de fluorescência, os mesmos autores verificaram que as características das oscilações não pareciam depender da região do ilhéu onde era recolhido o sinal de fluorescência. O facto de o ilhéu se comportar como um "sincício" está também subjacente à deteção de oscilações da concentração de K^+ no espaço intercelular do ilhéu (com microelctrodos sensíveis a K^+ ; (Perez-Armendariz *et al.*, 1985) e à deteção de oscilações da libertação de insulina a partir de um único ilhéu (Rosario *et al.*, 1986), utilizando técnicas de radioimunoensaio com amostragem discreta (Scott *et al.*, 1981). Utilizando uma técnica de microamperometria baseada em microelctrodos de fibra de carbono com vista à deteção em tempo real de 5-hidroxitriptamina (5-HT ou serotonina) no espaço intercelular do ilhéu (Barbosa *et al.*, 1996), em simultâneo com a medição da $[Ca^{2+}]_i$ no mesmo ilhéu, verificou-se que a libertação oscilatória de 5-HT / insulina ocorria em sincronia com as oscilações da $[Ca^{2+}]_i$ (Barbosa et al., 1998) (ver **Figura 1.4 (B)**). Neste estudo procedeu-se a uma análise da correlação entre a quantidade de 5-HT libertada por oscilação e a duração da oscilação correspondente da $[Ca^{2+}]_i$, a várias concentrações de glicose no intervalo 11-20 mM. Esta correlação foi linear, não se tendo encontrado evidência para a ocorrência, em células β -pancreática de murganho, da "via de amplificação" da secreção de insulina, considerada um aspecto central do mecanismo de acoplamento estímulo-secreção (ver Henquin, 2011). Neste mecanismo foi postulada a existência de fatores de origem metabólica que aumentariam a eficácia do íão Ca^{2+} em induzir a secreção excitotica de insulina. A natureza destes fatores permanece desconhecida.

Para além das oscilações da $[Ca^{2+}]_i$ associadas à atividade de *bursting*, de frequência relativamente elevada (tipicamente entre 2 a 7 oscilações por minuto; oscilações "rápidas"), conhecem-se oscilações de baixa frequência (0,2-1 min^{-1} ; oscilações "lentas") que têm sido associadas a oscilações metabólicas (Bergsten et al., 1994). Tem-se reportado ainda um padrão misto, envolvendo sobreposição de oscilações "rápidas" em "lentas" (Valdeolmillos et al., 1989).

1.3 Canais de K⁺ sensíveis a Ca²⁺ (K_{Ca}) na célula β-pancreática

O influxo de Ca²⁺ pode produzir diferentes fenómenos nas células, incluindo a ativação ou modulação de canais de K⁺. Desta forma, alterações dos níveis de Ca²⁺ intracelular podem afetar o potencial de membrana, sublinhando a relevância dos canais sensíveis a Ca²⁺ no controlo da atividade elétrica e da excitabilidade celular.

Os canais de K⁺ sensíveis a Ca²⁺ (canais K_{Ca}) são normalmente classificados em três grandes grupos, essencialmente de acordo com a sua condutância, estrutura e farmacologia (Sah & Louise Faber, 2002): canais BK (ou K_{Ca}1.1) de elevada condutância, tipicamente entre 100 e 300 pS (Marty, 1981); canais SK (ou K_{Ca}2) de baixa condutância (2-25 pS) (Blatz & Magleby, 1986); e canais IK (ou K_{Ca}3.1) de condutância intermédia (25-100 pS) (Ishii et al., 1997b). Dada a sua elevada condutância os canais BK são também conhecidos por "maxi-K"; uma designação alternativa é "Slo/Slo1", derivada do nome do único gene que codifica a subunidade que forma o poro dos canais (*Slowpoke*) (Lee & Cui, 2010).

Os canais BK são ativados tanto pela voltagem como pelo Ca²⁺ intracelular (máximo de ativação para concentrações da ordem dos micromolar), estando estabelecido que o aumento dos níveis de Ca²⁺ causa a deslocação para a esquerda (isto é, para valores mais negativos de potencial) da curva de ativação pela voltagem (Cui *et al.*, 2009). Por outro lado, como se verá adiante, a ativação dos canais SK e IK é independente da voltagem e mais sensível a Ca²⁺ (máximo de ativação para concentrações abaixo do micromolar).

1.3.1 Canais K_{Ca} de elevada condutância (BK)

Sendo os canais BK sensíveis à despolarização celular e ao aumento dos níveis de Ca^{2+} , a sua ativação traduz-se normalmente na repolarização da membrana e no fecho de canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem, com a consequente diminuição do influxo de Ca^{2+} .

Em termos estruturais, os canais BK são constituídos por dois tipos de subunidades: a subunidade que forma o poro (α) e uma subunidade reguladora (β) (ver **Figura 1.5 (A)**). Cada canal funcional contém quatro subunidades α em organização tetramérica, a que se podem associar subunidades β , que lhe conferem diversidade funcional em função da expressão nos diferentes tecidos (McManus et al., 1995; Cui & Lee, 2009).

A subunidade α é composta por uma região que atravessa a membrana através de sete segmentos transmembranares (S0-S6) e por um domínio citoplasmático de grandes dimensões, que proporciona o terminal carboxílico e que em larga medida a diferencia da subunidade α dos canais K_v (o outro elemento diferenciador é o segmento S0, que não está presente em canais K_v) (Cui & Lee, 2009).

A região da subunidade α que atravessa a membrana compreende um domínio que funciona como sensor de voltagem (VSD ou *voltage sensing domain*, correspondente a S1-S4) e um domínio responsável pela formação do poro (PGD ou *pore-gate domain*, correspondente a S5-S6). Neste domínio está localizado o local de ligação dos bloqueadores peptídicos do canal (ex: caribdotoxina e iberiotoxina, que se ligam à zona externa do poro, obstruindo o fluxo de iões K^+ (Knaus et al., 1994)). O segmento S0 proporciona o terminal amínico extracelular e parece funcionar como ponte de ligação para a organização tetramérica das subunidades α (Wallner et al., 1996).

Os locais de ligação do Ca^{2+} intracelular encontram-se no domínio citoplasmático de grandes dimensões da subunidade α . Cada subunidade contém dois locais de ligação de alta afinidade. Um dos locais está presente no subdomínio RCK1 (*regulator of K^+ conductance 1*) e envolve resíduos de aspartato, mediando

alterações conformacionais após ligação a Ca^{2+} que conduzem à abertura do canal (Xia et al., 2002). O segundo local (" Ca^{2+} bowl") também envolve resíduos de aspartato e está presente no subdomínio RCK2, localizado entre os segmentos S9 e S10 do domínio citoplásmico de grandes dimensões da subunidade α (Schreiber & Salkoff, 1997).

Para além da voltagem e do Ca^{2+} , também o ião Mg^{2+} desempenha um papel na ativação dos canais BK. De facto, concentrações de Mg^{2+} da ordem dos milimolar aumentam a probabilidade de abertura dos canais e provocam uma deslocação da curva corrente/voltagem para potenciais mais negativos (Zhang et al., 2001; Shi & Cui, 2001). Ao contrário da ativação dos canais por Ca^{2+} , a ativação por Mg^{2+} envolve interações eletrostáticas com o sensor de voltagem (Horrigan & Aldrich, 2002; Yang et al., 2007; Lee & Cui, 2010).

Foram já identificadas quatro subunidades β dos canais BK. Quando ligadas às subunidades α , as subunidades β 1-4 alteram a atividade do canal, modulando a inativação das correntes, a sua sensibilidade a Ca^{2+} intracelular e ainda a sua sensibilidade a bloqueadores (Ghatta *et al.*, 2006). Por exemplo, o *loop* extracelular que une os dois segmentos transmembranares de cada subunidade β (ver **Figura 1.5 (A)**) determina a ligação de bloqueadores peptídicos (incluindo caribdotoxina) à subunidade α , modulando assim a sensibilidade dos canais aos bloqueadores (Hanner et al., 1998). Neste contexto, é interessante verificar que a expressão conjunta das subunidades α e β 3 na linha tumoral secretora de insulina RINm5F, bem como em células cromafins da medula adrenal, causa uma redução da sensibilidade a caribdotoxina (Xia et al., 1999).

No que respeita à modulação das características de inativação dos canais BK pelas subunidades β , deve sublinhar-se que a presença das subunidades β 1 ou β 4 não induz normalmente inativação das correntes, ao contrário das subunidades β 2 ou β 3, cuja presença induz uma acentuada inativação das mesmas. Esta é provavelmente a razão por que as características de inativação das correntes BK variam acentuadamente entre tipos de células secretoras de insulina. De fato, enquanto que em células HIT a inativação é diminuta, em células RINm5F, bem como em células β de murganho e humanas, a inativação é substancialmente mais pronunciada, embora variável (Braun et al., 2008; Houamed et al., 2010; Li *et al.*, 1999).

Introdução

À semelhança do canal K_v de inativação rápida ($K_v1.0$), o elemento responsável pela inativação do canal BK é provavelmente o terminal amínico da subunidade β , que parece estar localizado entre o domínio VSD e os domínios RCK (RCK1 e RCK2) responsáveis pela ligação de Ca^{2+} (Xia et al., 1999).

Na célula β -pancreática, a presença de uma permeabilidade membranar a K^+ sensível a Ca^{2+} foi primeiramente sugerida por Rojas e colaboradores (Atwater et al., 1979). À data deste estudo era apenas possível recorrer à técnica de registo intracelular de potencial de membrana, mas com o avanço da técnica de *patch-clamp* foi possível identificar e caracterizar o primeiro canal K_{Ca} de elevada condutância, ativado pela voltagem e sensível a Ca^{2+} (Cook et al., 1984; Findlay et al., 1985b; Tabcharani & Mislner, 1989). Os primeiros estudos puseram em evidência um canal com uma condutância entre 70 pS (para $[K^+]_o=5,6$ mM; Smith et al., 1990) e cerca de 350 pS (para $[K^+]_o=400$ mM; Tabcharani & Mislner, 1989). Verificou-se ainda que o canal BK presente na célula β -pancreática era sensível a Mg^{2+} e ao pH intracelular (Tabcharani & Mislner, 1989).

Os canais BK presentes na célula β -pancreática são sensíveis a vários bloqueadores peptídicos, frequentemente utilizados nesta e noutras preparações como ferramentas farmacológicas para a clarificação do envolvimento dos canais em processos fisiológicos. É o caso da caribdotoxina, cuja afinidade para os canais é muito elevada (constante de dissociação aparente da ordem dos nanomolar; Smith et al., 1986) e que bloqueia totalmente as correntes BK para concentrações inferiores a 20 nM; a toxina não afeta as correntes K_v da célula β (Kukuljan et al., 1991). Foram detectadas variações da sensibilidade a caribdotoxina entre linhas celulares secretoras de insulina (Li et al., 1999), o que provavelmente reflete variabilidade nos tipos de subunidades β que entram na composição dos canais (ver acima).

Tal como os canais BK de outros tecidos, os canais BK da célula β -pancreática são também inibidos por moléculas não-peptídicas, como por exemplo o antifúngico tremorgénico paxilina. Este bloqueia seletivamente os canais de forma semelhante à iberiotoxina, requerendo no entanto concentrações muito superiores para produzir inibições comparáveis (Houamed et al., 2010). Outro exemplo é penitrem A, cujas ações na atividade elétrica e na corrente total de K^+ serão apresentadas no Capítulo 3 e Capítulo 4, respetivamente. Em músculo liso penitrem A, que não partilha o mesmo local de ligação com bloqueadores peptídicos, inibe potentemente a corrente

BK sem afetar as correntes transportadas por outros canais, incluindo canais K_{Ca} distintos dos canais BK (Knaus et al., 1994; Asano et al., 2012).

São muito recentes os estudos em que foram utilizados bloqueadores peptídicos e não-peptídicos para isolar correntes BK na célula β -pancreática, ao mesmo tempo que se tentou averiguar o papel destas correntes na dinâmica dos potenciais de ação. Em 2008 Rorsman e colaboradores isolaram uma componente transitória da corrente de K^+ sensível a iberiotoxina, de ativação muito rápida e estritamente dependente do influxo de Ca^{2+} através de canais Ca_V (Braun et al., 2008). Esta corrente exibiu uma dependência da voltagem em forma de sino, refletindo no essencial a dependência da voltagem do influxo de Ca^{2+} mediado por canais Ca_V ; o máximo da curva I/V ocorre no entanto para valores de potencial mais positivos do que os correspondentes ao máximo da curva I/V relativa à corrente Ca_V , traduzindo a sensibilidade à voltagem e o aumento da força eletromotriz que atua sobre os canais de K^+ . Neste estudo a exposição das células a iberiotoxina aumentou a amplitude dos potenciais de ação.

Em 2010 Houamed e colaboradores utilizaram o bloqueador não-peptídico paxilina (ver acima) para isolar uma corrente BK caracterizada por um processo de inativação muito mais lento para um patamar; a corrente exibiu uma cinética de ativação rápida, sendo igualmente dependente do influxo de Ca^{2+} através de canais Ca_V (Houamed et al., 2010). A exposição das células a paxilina aumentou acentuadamente a amplitude dos potenciais de ação, muito embora não parecesse afetar outros parâmetros tais como o potencial limiar, a duração, a velocidade de repolarização ou a hiperpolarização pós-potencial. Ao mesmo tempo Jacobson e colaboradores reportaram um efeito idêntico nos potenciais de ação de outro bloqueador BK, slotoxina (Jacobson et al., 2010).

Finalmente, recorrendo à ablação genética de canais BK, Dufer e colaboradores reportaram um aumento da duração dos potenciais de ação, que no entanto, surpreendentemente, não foi acompanhado por variações da sua amplitude e frequência de disparo (Dufer et al., 2011).

Muito embora os estudos realizados por Braun, Houamed, Jacobson e respectivos colaboradores tivessem evidenciado um aumento da amplitude dos potenciais de ação compatível com a hipótese de que os canais BK estivessem envolvidos no processo de repolarização (Braun et al., 2008; Houamed et al., 2010; Jacobson et al., 2010), esta hipótese não foi consubstanciada pela ausência recorrente de uma análise detalhada da ação dos vários bloqueadores BK noutros

Introdução

parâmetros dos potenciais de ação. O estudo descrito no Capítulo 3 pretendeu avaliar aquela hipótese, recorrendo a uma análise detalhada da ação de caribdotoxina e penitrem A nos potenciais de ação.

1.3.2 Canais K_{Ca} de baixa condutância (SK)

Os canais K_{Ca} de baixa condutância (SK ou K_{Ca2}) têm uma topologia semelhante aos membros da superfamília de canais K_V , incluindo seis segmentos transmembranares (S1-S6 ver **Figura 1.5 (B)**), em que o poro se encontra associado aos segmentos S5 e S6. Relativamente ao segmento S4, que confere sensibilidade à voltagem aos canais K_V , apresenta um número muito reduzido de aminoácidos carregados positivamente. Estas diferenças na estrutura primária constituem a base molecular para a reconhecida independência à voltagem dos canais SK (Stocker, 2004; Adelman et al., 2012).

Foram até ao momento clonados três subtipos de canais SK: SK1 ($K_{Ca2.1}$), SK2 ($K_{Ca2.2}$) e SK3 ($K_{Ca2.3}$). Estes subtipos apresentam uma elevada homologia no que respeita ao domínio transmembranar, estando as principais diferenças concentradas nos domínios citoplasmáticos que proporcionam os terminais amínico e carboxílico. Os canais SK funcionais constituem-se normalmente como tetrâmeros homoméricos; podem ocorrer contudo associações heteroméricas, tanto em sistemas de expressão heteróloga como em tecidos nativos (Faber, 2009).

Contrariamente aos canais BK, os canais SK não apresentam motivos de ligação de Ca^{2+} na estrutura primária das respectivas subunidades. Na realidade, a sensibilidade dos canais SK a Ca^{2+} é conferida pela ligação a calmodulina, que tem presença constitutiva e independente de Ca^{2+} . A ligação de iões Ca^{2+} a algumas das mãos E-F da calmodulina traduz-se em alterações conformacionais que conduzem à abertura do canal. A inserção de calmodulina nas diferentes subunidades do canal ocorre ao nível do domínio citoplasmático que corresponde à extensão do segmento S6 (e que portanto contém o terminal carboxílico), mais especificamente na imediata proximidade deste; esta região, normalmente designada por domínio de ligação de calmodulina (CaMBD), é altamente conservada dentro da família SK, fazendo com que os seus membros tenham um perfil de resposta a Ca^{2+} muito parecido. Por exemplo, todos os sub-tipos de canais SK são sensores muito rápidos de Ca^{2+} (constantes de tempo de activação da ordem de 10 ms) (Adelman et al., 2012).

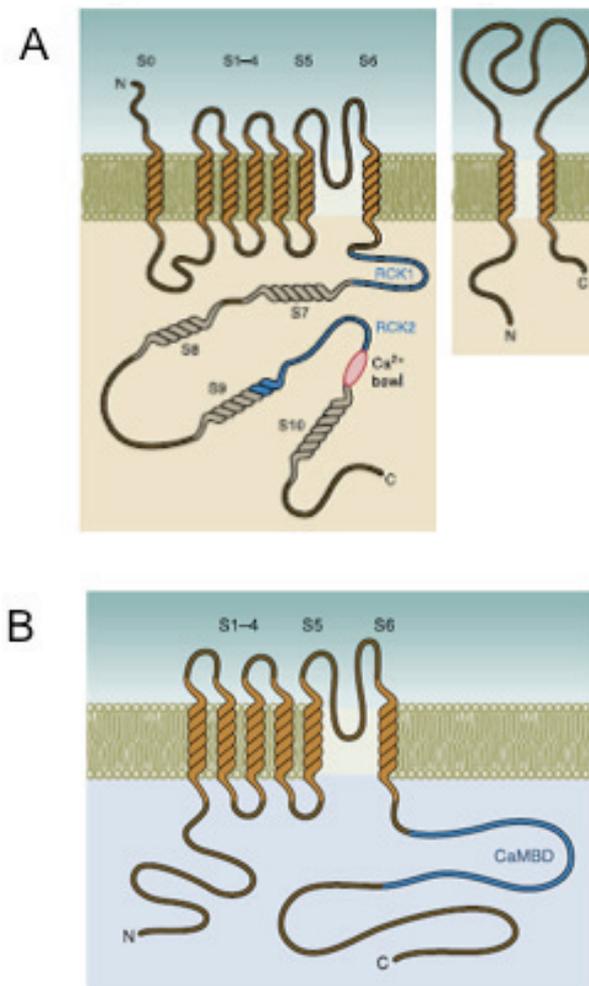


Figura 1.5: Estrutura dos canais de potássio sensível a cálcio. **(A)** Estrutura das sub-unidades α (esquerda) e β (direita) do canal de potássio sensível a cálcio de elevada condutância (BK); **(B)** Estrutura da sub-unidade α do canal de potássio sensível a cálcio de baixa condutância (SK).

Introdução

A corrente transportada por canais SK exibe características de retificação de entrada, aparentemente devida ao bloqueio dependente da voltagem dos canais por catiões divalentes intracelulares, incluindo Mg^{2+} . As correntes SK podem ainda ser moduladas por fosforilação. Por exemplo, foi demonstrado que o canal SK2 possui um local de fosforilação pela proteína cinase A nas proximidades do terminal carboxílico; a fosforilação do canal por esta via reduz a sua expressão na membrana. Ainda outra modalidade de regulação, aparentemente relacionada com a sensibilidade a Ca^{2+} , é proporcionada por caseína cinase 2 (CK2) e proteína fosfatase 2A (PP2A), que se encontram constitutivamente associadas à proteína que constitui o poro (Faber, 2009).

Os canais SK são bloqueados por um número elevado de agentes peptídicos e não-peptídicos. Os primeiros incluem a apamina, um péptido com 18 aminoácidos presente no veneno de abelha que inibe os vários subtipos de canais SK a concentrações sub-nanomolar ou da ordem de poucos nanomolar. Ishii e colaboradores estabeleceram que a ligação a apamina ocorre entre os segmentos S5 e S6, bem como num local extracelular entre os segmentos S3 e S4 (Ishii et al., 1997a). Assim, a sensibilidade a apamina parece ser conferida por ligação a resíduos de aminoácidos dentro e fora do poro do canal, sugerindo que a toxina actua quer através da oclusão do poro quer como inibidor alostérico (Adelman et al., 2012).

Tamarina e colaboradores demonstraram a expressão dos genes SK1, SK2 e SK3 na célula β -pancreática de murganho (Tamarina et al., 2003). Verificaram ainda a ocorrência de aumentos de Ca^{2+} intracelular em ilhéus expostos a apamina, por sua vez ausentes em ilhéus cuja expressão de canais SK3 foi eliminada. Estes resultados são aparentemente contraditórios com o fato de Lebrun e colaboradores, muitos anos antes (Lebrun et al., 1983), não terem conseguido detetar efeitos de apamina (a uma concentração muito elevada, 1 μ M) na atividade elétrica de ilhéus estimulados com 11 mM glicose. É pois possível que a aparente falta de ação da toxina neste estudo tivesse sido causada por problemas de penetração da molécula no tecido do ilhéu.

UCL 1684 foi o primeiro bloqueador não-peptídico de canais SK a ser desenvolvido (Rosa et al., 1998). O efeito de UCL 1684 em correntes SK foi

inicialmente investigado em células cromafins onde inibiu rápida e reversivelmente a corrente sensível a apamina a concentrações da ordem dos nanomolar (Dunn, 1999), tendo permanecido como um bloqueador de eleição, tanto do ponto de vista da potência (próxima da da apamina) como da especificidade. Tal como a apamina, UCL 1684 não é seletivo para qualquer subtipo de canais SK (Adelman et al., 2012).

A análise da ação de bloqueadores específicos de canais SK na atividade elétrica da célula β -pancreática permanece incipiente. Para além de terem investigado a ação de UCL 1684 na corrente K_{slow} , Zhang e colaboradores (Zhang et al., 2005) reportaram efeitos nos potenciais de ação que se limitaram ao potencial limiar e à frequência de disparo (desvio do potencial limiar para valores menos negativos e aumento da frequência), não tendo sido possível estabelecer conclusões claras quanto ao possível papel dos canais SK na atividade elétrica.

Tal como foi referido os canais SK são rapidamente ativados por Ca^{2+} (em milissegundos), sendo expectável que contribuam para a repolarização dos potenciais de ação na célula β -pancreática. O estudo descrito no Capítulo 5 pretendeu avaliar esta hipótese, recorrendo a uma análise detalhada da ação de apamina e UCL 1684 nos potenciais de ação.

1.3.3 Canais K_{Ca} de condutância intermédia (IK)

Os canais K_{Ca} de condutância intermédia (IK ou $KCa3.1$) são também conhecidos por "canais de Gardós", por se ter concluído que medeiam o aumento de efluxo de K^+ causado por inibição metabólica em eritrócitos, um processo dependente de Ca^{2+} extracelular originalmente descrito pelo cientista húngaro G. Gardós em 1958 (ver Jensen et al., 2001). Estes canais são codificados por um único gene e a sua expressão em eritrócitos humanos foi primeiramente reportada em 2003 (Hoffman et al., 2003).

Os canais IK estão expressos em numerosos tecidos do organismo, designadamente células do sistema hematopoiético, células epiteliais e células do endotélio vascular (Jensen et al., 2001). Na sequência da sua clonagem em 1997 a partir de pâncreas, placenta e tecido linfóide (Ishii et al., 1997b; Joiner et al. 1997; Logsdon et al. 1997), admitiu-se que os canais IK só estavam presentes em

Introdução

neurónios do sistema nervoso periférico, designadamente neurónios sensoriais, simpáticos e entéricos. No entanto, estudos mais recentes atestam a sua presença em tipos particulares de neurónios do sistema nervoso central, designadamente células de Purkinje do córtex cerebelar (Engbers *et al.*, 2012).

As sequências primárias dos canais IK e SK são homólogas em 42-44% (Wulff *et al.*, 2007). Não surpreende portanto que os canais IK apresentem uma topologia muito parecida à dos canais SK, envolvendo subunidades em organização tetramérica; cada uma das subunidades inclui seis segmentos transmembranares (S1-S6), estando o poro associado aos segmentos S5 e S6. Outras características em comum são a sua falta de dependência da voltagem (igualmente uma consequência da estrutura primária do segmento S4) e o fato de os canais serem ativados por Ca^{2+} através da ligação a calmodulina, que também se encontra constitutivamente associada ao canal em regiões próximas do segmento S6 junto ao terminal carboxílico (Jensen *et al.*, 2001; Pedarzani & Stocker, 2008); a probabilidade de abertura dos canais IK é regulada por Ca^{2+} citossólico a concentrações inferiores ao micromolar (Fanger *et al.*, 1999). Do ponto de vista estrutural uma diferença significativa dos canais IK em relação aos SK reside ao nível do terminal amínico, que é manifestamente mais curto nos primeiros.

Em contraste com os canais BK e SK, que se encontram frequentemente co-localizados com as respectivas fontes de Ca^{2+} (normalmente canais Ca_v ou canais operados por receptor), os canais IK parecem fazer parte de sistemas de sinalização que envolvem aumentos de Ca^{2+} intracelular relativamente globais e prolongados (Wulff *et al.*, 2007). Esta é provavelmente a razão por que os canais IK presentes em neurónios não contribuem para a AHP de duração curta (milissegundos ou dezenas de milissegundos, fAHP) ou média (dezenas ou centenas de milissegundos, mAHP); estas são causadas pela ativação de canais BK e SK, respectivamente, que assim contribuem para a regulação do intervalo entre potenciais de ação e, portanto, da sua frequência de disparo (Bond *et al.*, 2005; Adelman *et al.*, 2012). Devido à aparente ausência de co-localização entre canais Ca_v e canais IK, a ativação destes últimos em neurónios tem potencial para mediar variações secundárias do potencial de membrana que resultem da acumulação mais lenta e global de Ca^{2+} intracelular, associada ao disparo de grupos de potenciais de ação. De fato, em neurónios entéricos os canais IK parecem contribuir para a geração da AHP de duração longa ($\sim 1-2$ s, sAHP) (Neylon *et al.*, 2006; Nguyen *et al.*, 2007). No entanto, a origem da

sAHP permanece largamente desconhecida na grande maioria dos casos (Andrade et al., 2012).

Os canais IK são absolutamente insensíveis a concentrações elevadas (100-1000 nM) de inibidores peptídicos específicos de canais BK (ex: iberiotoxina) ou SK (ex: apamina). Os canais IK são no entanto bloqueados de uma forma relativamente seletiva por algumas moléculas não-peptídicas, designadamente clotrimazol, um fármaco antimicótico da família dos imidazois (Wulff et al., 2007). Um passo importante no desenvolvimento de bloqueadores IK mais seletivos consistiu na transformação da molécula de clotrimazol de forma a eliminar a sua ação fungicida, relacionada com a inibição de enzimas dependentes do citocromo P450; assim nasceu o triarilmetano TRAM-34 (Wulff *et al.*, 2000), que exhibe uma seletividade 200 a 1500 vezes maior para canais IK relativamente a outros tipos de canais de K⁺ (ex: canais K_v e canais BK/SK) e a uma vasta gama de outros canais, incluindo canais de Na⁺, Ca²⁺ e TRP (Jensen et al., 2001; Wulff et al., 2007).

São conhecidos, para além de bloqueadores, "moduladores positivos" da atividade dos canais IK, sendo exemplos prototípicos a etilbenzimidazolona (EBIO) e o seu derivado 5,6-dicloro-EBIO (DCEBIO; Pedarzani & Stocker, 2008; Wulff et al., 2007). A acção destes agentes parece envolver o desvio para menores concentrações da curva de ativação por Ca²⁺, traduzindo-se num aumento da sensibilidade dos canais a Ca²⁺ (Pedersen et al., 1999; von Hahn et al., 2001).

O primeiro estudo de correntes IK em células secretoras de insulina foi realizado na linha celular βTC-3 e em células β porcinas (Kozak et al., 1998). A corrente de K⁺, registada em células isoladas no modo de *whole-cell (perforated patch)*, foi evocada por despolarizações para potenciais que induziam o influxo de Ca²⁺, apresentando uma dependência da voltagem em forma de sino com um máximo a cerca de 0 mV; estas características denotam um processo de ativação dependente do influxo de Ca²⁺ por canais sensíveis à voltagem. Em conformidade, a corrente foi bloqueada por Cd²⁺ e remoção de Ca²⁺ extracelular. A corrente revelou-se no entanto insensível a tetraetilamónio, iberiotoxina e apamina, demonstrando uma natureza diferente das correntes transportadas por canais BK ou SK. Não menos importante, a corrente caracterizada por Kozak e colaboradores foi inibida por clotrimazol e exibiu uma cinética de ativação e desativação muito lenta em

Introdução

comparação com as correntes transportadas por canais BK ou SK (isto é, constantes de tempo de ativação e desativação no intervalo entre 1,5 e 3 s).

Mais recentemente Dufer e colaboradores investigaram o efeito da ablação do gene dos canais IK na atividade elétrica da célula β -pancreática em murgancho (Dufer et al., 2009). Verificaram que o potencial limiar dos potenciais de ação ficou menos negativo e que a frequência de disparo aumentou, em concordância com o efeito de TRAM-34 em células β -pancreática de animais controlo. Verificaram ainda que a exposição das células a DCEBIO hiperpolarizou a membrana, não sendo o efeito observável nos animais modificados. Muito embora o estudo apontasse para a existência de canais IK funcionais em células β normais de murgancho, a informação obtida sobre o seu possível envolvimento na regulação do padrão da atividade elétrica foi incipiente, não se tendo procedido à análise do efeito daquelas intervenções na atividade de *bursting*.

Em neurónios, o processo de adaptação da frequência de disparo de potenciais de ação é causado pela corrente subjacente à sAHP (Andrade et al., 2012; Madison & Nicoll, 1984; Madison & Nicoll, 1982). Tendo em conta que a corrente K_{slow} da célula β -pancreática tem as características de uma corrente sAHP, que a corrente K_{slow} é inibida por TRAM-34 e por ablação do gene IK (Dufer et al., 2009) e que os *bursts* na célula β exibem um decaimento da frequência de disparo de potenciais de ação, um objectivo específico do presente trabalho consistiu em avaliar a possível contribuição de canais IK para este processo de adaptação de frequência (Capítulo 6). No mesmo capítulo foi avaliada a capacidade de a ferramenta farmacológica utilizada para este efeito (TRAM-34) inibir a corrente IK da célula β -pancreática.

1.4 Objetivos do trabalho

A célula β -pancreática expressa os vários membros da família de canais K_{Ca} (BK, SK e IK). A relevância destes canais para a fisiologia da célula β não é bem conhecida, devido em parte à insuficiente utilização dos bloqueadores de canais disponíveis.

O objetivo principal deste trabalho consistiu assim em esclarecer o envolvimento dos diferentes tipos de canais K_{Ca} nos processos de *bursting* e disparo de potenciais de ação induzidos por glicose em células β , utilizando ferramentas essencialmente farmacológicas e a célula β -pancreática de murganho como principal modelo celular. Os registos de potencial de membrana foram obtidos em ilhéus microdissecados estimulados com glicose.

Com vista a satisfazer este objectivo genérico foram definidos os seguintes objectivos específicos:

- 1) Esclarecer o papel desempenhado pelos canais BK na atividade elétrica oscilatória e nos potenciais de ação, utilizando um bloqueador peptídico (caribdotoxina) e não-peptídico (penitrem A) dos canais, este último com uma elevada capacidade de penetração no tecido.
As experiências envolvendo caribdotoxina foram realizadas em células β muito superficiais. O estudo foi complementado com a análise da ação de ambos os agentes nas oscilações rápidas da $[Ca^{2+}]_i$, medida microfluorometricamente (fura-2) em ilhéus isolados enzimaticamente.
- 2) Proceder à avaliação de penitrem A como bloqueador BK na célula β . Para tal procedeu-se à comparação da ação de penitrem A nas correntes de K^+ com a ação de iberiotoxina, recorrendo à técnica de *patch-clamp (whole-cell)* em células β isoladas.
O procedimento pressupôs a optimização prévia das condições metodológicas, realizada em células tumorais secretoras de insulina (BRIN-BD11).
- 3) Estabelecer o papel desempenhado pelos canais SK na atividade elétrica oscilatória e nos potenciais de ação, utilizando um bloqueador peptídico (apamina) e não-peptídico (UCL 1684) dos canais.
- 4) Esclarecer o papel desempenhado pelos canais IK na atividade elétrica oscilatória e nos potenciais de ação, utilizando TRAM-34, um bloqueador não-peptídico dos canais. Foi dada uma ênfase especial à análise do processo de adaptação de frequência de disparo ao longo do *burst*.
- 5) Proceder à avaliação de TRAM-34 como bloqueador IK na célula β . Recorreu-se para tal à análise da sua ação numa corrente de K^+ sensível a Ca^{2+} e a DCEBIO (um ativador de canais IK), utilizando a técnica de *patch-clamp (whole-cell)* em células β isoladas.

Capítulo 2

Material e Métodos

2.1 Preparação do material biológico

2.2 Registo de correntes iónicas por *patch-clamp*

2.3 Registo intracelular de potencial de membrana

2.4 Quantificação da $[Ca^{2+}]_i$ por microscopia de fluorescência

2.5 Reagentes

2.6 Análise estatística

2.1 Preparação do material biológico

Os ilhéus de Langerhans, cujo conjunto forma o pâncreas endócrino, encontram-se disseminados por todo o órgão. Sendo os ilhéus de Langerhans estruturas em que os diferentes tipos de células que as constituem apresentam uma distribuição espacial e ligação por *gap junctions*, relevantes fisiologicamente, a sua manipulação requer técnicas que consigam, consoante o objetivo, isolá-los completamente do pâncreas exócrino, mantendo a sua completa integridade, ou isolá-los de forma a que se mantenham firmemente agarrados a uma pequena porção de pâncreas exócrino que lhes sirvam de suporte .

2.1.1 Materiais e meio de cultura para isolamento de ilhéus e células β -pancreáticas

A maioria do material convencional de laboratório foi adquirida à VWR International (West Chester, PA, EUA) e à Costar Corporation (Cambridge, MA, EUA). O material estéril para cultura de células, tal como frascos de cultura e caixas de petri, foram obtidos da Sarstedt AG&Co. (Nümbrecht, Alemanha).

As soluções salinas foram preparadas com água desionizada (resistividade superior a $18 \mu\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$).

Na **Tabela 2.1** estão descritas as soluções para o isolamento dos ilhéus de Langerhans. Estava sempre disponível uma solução *stock* com HEPES e bicarbonato, preparada sem cálcio ou magnésio (uma vez que estes catiões podem precipitar com o bicarbonato) e sem glicose, com uma concentração 10 vezes superior à pretendida no final. Em cada dia de experiência esta solução era diluída para a concentração pretendida, sendo CaCl_2 e MgCl_2 adicionados a partir de uma solução 1 M; a glicose também era adicionada à concentração pretendida (Solução I).

Para a digestão do pâncreas, utilizou-se uma mistura de colagenases A e B conhecida como Liberase TL (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Alemanha) (solução II, **Tabela 2.1**); a concentração desta solução foi ajustada de modo a que a atividade enzimática fosse suficiente para digerir o pâncreas exócrino sem digerir os

Material e Métodos

ilhéus. A reação era parada com solução **I** suplementada com 3 % BSA (m/v) (solução **III**, **Tabela 2.1**), em gelo. Tanto a temperatura como a albumina inibem a reação. As soluções **I** e **III** foram continuamente gasificadas com 95 % O₂/5 % CO₂.

Tabela 2.1: Composição das soluções utilizadas para o isolamento dos ilhéus de Langerhans.

Solução	Composição
I (HEPES e bicarbonato)	(em mM): 115 NaCl; 5 KCl; 10 NaHCO ₃ ; 1,2 NaH ₂ PO ₄ ; 25 HEPES/H ⁺ ; 2,56 CaCl ₂ ; 1,1 MgCl ₂ e 11,1 glicose (pH=7,2, ajustado com NaOH 2 M)
II (Liberase TL)	Solução I suplementada com <i>stock</i> de Liberase TL para concentração final de 0,433 Wu/mL
III (% BSA)	Solução I com 3% BSA (m/v)
IV (Krebs G0/G11/G17)	(em mM): 120 NaCl; 5 KCl; 25 NaHCO ₃ ; 2,56 CaCl ₂ ; 1,1 MgCl ₂ e 0, 11 ou 17 glicose

Para a dispersão das células β -pancreáticas, os ilhéus isolados eram colocados primeiro numa solução sem Ca²⁺ (Solução **V**, **Tabela 2.2**) e, posteriormente, numa solução com tripsina 0,05 % (solução **VI**), de forma a facilitar o isolamento das células primárias.

Tabela 2.2: Composição das soluções utilizadas para obtenção de células β -pancreáticas isoladas.

Solução	Composição
V (sem Ca ²⁺)	(em mM): 112 NaCl; 4,7 KCl; 20 NaHCO ₃ ; 1,2 NaH ₂ PO ₄ ; 1,2 NaHSO ₄ ; 1 EGTA; 16 HEPES/H ⁺ ; 1,2 MgCl ₂ e 11,1 glicose (pH=7,2, ajustado com NaOH 2 M)
VI (tripsina)	Solução IV suplementada com 0,05 % tripsina (m/v)
VII (RPMI suplementado)	4 g/L RPMI 1640, 11.1 mM glicose, 25 mM NaHCO ₃ (pH=7,3 ajustado com HCL 1M)
VIII (meio cultura)	Solução VI suplementada com 10 % FBS (v/v), 100 U/ml penicilina e 100 μ g/ml streptomina.

Tanto os ilhéus isolados como as células β -pancreáticas isoladas foram mantidos em ambiente estéril, isto é, em meio de cultura RPMI 1640; o meio, após suplementação adequada (solução **VII**, **Tabela 2.2**), era esterilizado com filtros de poro 0,2 μ m numa câmara de fluxo laminar vertical, sendo ainda adicionados ao

meio de cultura antibióticos e soro fetal bovino previamente esterilizados (solução VIII, Tabela 2.2).

2.1.2 Isolamento dos ilhéus de Langerhans

Os ilhéus de Langerhans foram isolados de pâncreas de murganhos fêmeas, da estirpe CD1, provenientes da *Charles River Laboratories SA* (Barcelona, Espanha), por um método enzimático inicialmente descrito por Lacy e Kostianovsky em 1967 (Lacy & Kostianovsky, 1967), mas que entretanto sofreu algumas alterações de modo a aumentar a eficiência do isolamento (Rosario *et al.*, 1993; Antunes *et al.*, 2000).

Os animais eram sacrificados por deslocamento cervical, segundo normas da *Federation for European Laboratory Animal Science Associations* (FELASA) e de acordo com a portaria nº 1005792 (23 de Outubro) do Estado Português. Relativamente à decapitação o deslocamento cervical tem a vantagem de evitar a perda de sangue do animal, e conseqüente descoloração do pâncreas, o que impediria uma boa visualização durante a sua remoção. Após sacrifício, os animais eram pesados (20-40 g) e lavados, de modo a minimizar a contaminação do pâncreas com pêlos.

Todo o processo, desde o sacrifício do animal até à remoção do pâncreas, era feito num curto período de tempo, de modo a impedir que as células entrassem em hipóxia.

No decurso do isolamento do pâncreas, e devido às reduzidas dimensões, recorreu-se a uma lupa estereoscópica (SMZ-2T Nikon, Japão) com iluminação (fibra óptica KL1500-T, Nikon, Japão).

Com o animal numa posição dorsal, e com o auxílio de pinça e tesoura, a cavidade abdominal era aberta: primeiro a pele, da púbis até ao pescoço, e, com uma segunda incisão, a parede abdominal, da púbis até ao apêndice xifóide. Os órgãos do animal, agora expostos, eram regularmente humedecidos com solução I (Tabela 2.1) mantida em gelo, de forma a evitar a sua desidratação e baixar a temperatura. O apêndice xifóide era removido de modo a permitir o posicionamento do fígado sobre o tórax, sendo assim possível visualizar o colédoco. O duodeno era também

Material e Métodos

colocado numa posição em que fosse possível manter o colédoco numa posição rectilínea (**Figura 2.1 (A)**).

A terminação do colédoco era em seguida estrangulada (**Figura 2.1 (B)**) com um duplo nó feito com fio de sutura (5-0, Goliath, USA); deste modo impedia-se que a solução enzimática, que posteriormente era inserida no colédoco, saísse para o intestino (**Figura 2.1 (C)**). Logo após as ramificações hepáticas, onde posteriormente seria colocada a cânula, o colédoco era rodeado por fio de sutura com um nó solto (**Figura 2.1 (D)**).

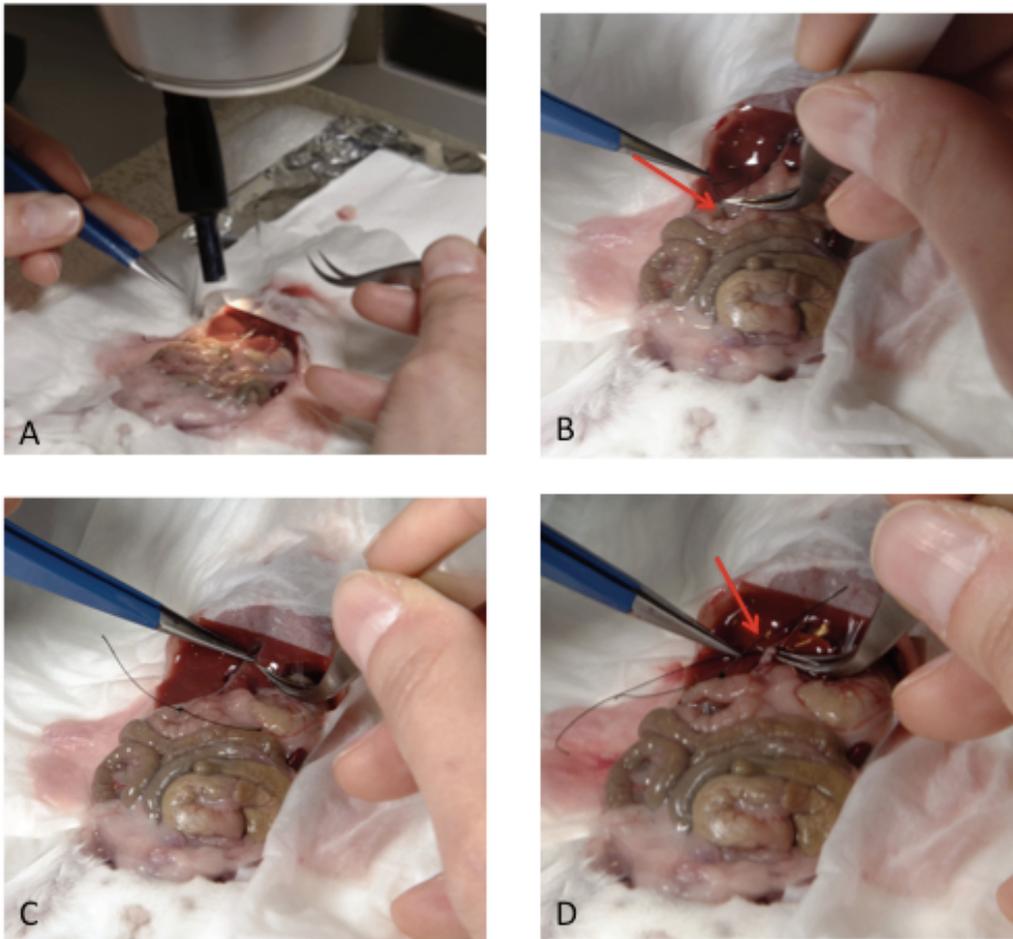


Figura 2.1: Exposição e estrangulamento do colédoco. **(A)** Exposição da cavidade abdominal; **(B)** Estrangulamento da terminação do colédoco; **(C)** Terminação do colédoco estrangulada com fio de sutura após procedimento em B; **(D)** Colocação de fio de sutura a rodear o colédoco abaixo das ramificações hepáticas.

Material e Métodos

Com uma tesoura oftalmológica de pontas finas era feito um corte transversal e parcial no colédoco (**Figura 2.2 (A)**), um pouco abaixo das ramificações hepáticas. Era então colocada uma cânula (forma em ângulo reto) acoplada a uma seringa que continha a solução enzimática (solução **II**, **Tabela 2.1**) arrefecida, de forma a não haver perda de atividade (**Figura 2.2 (B)**); o nó solto era apertado à volta do colédoco e sobre a cânula, para esta ficar segura e imóvel durante o processo de injeção de solução no pâncreas. Injetava-se um volume entre 2 e 4 ml de solução **II** (**Tabela 2.1**), muito lentamente, à medida que se ia tendo a percepção de que o pâncreas começava a encher (**Figura 2.2 (C)**). Este processo era dado por terminado quando todo o pâncreas estivesse distendido.

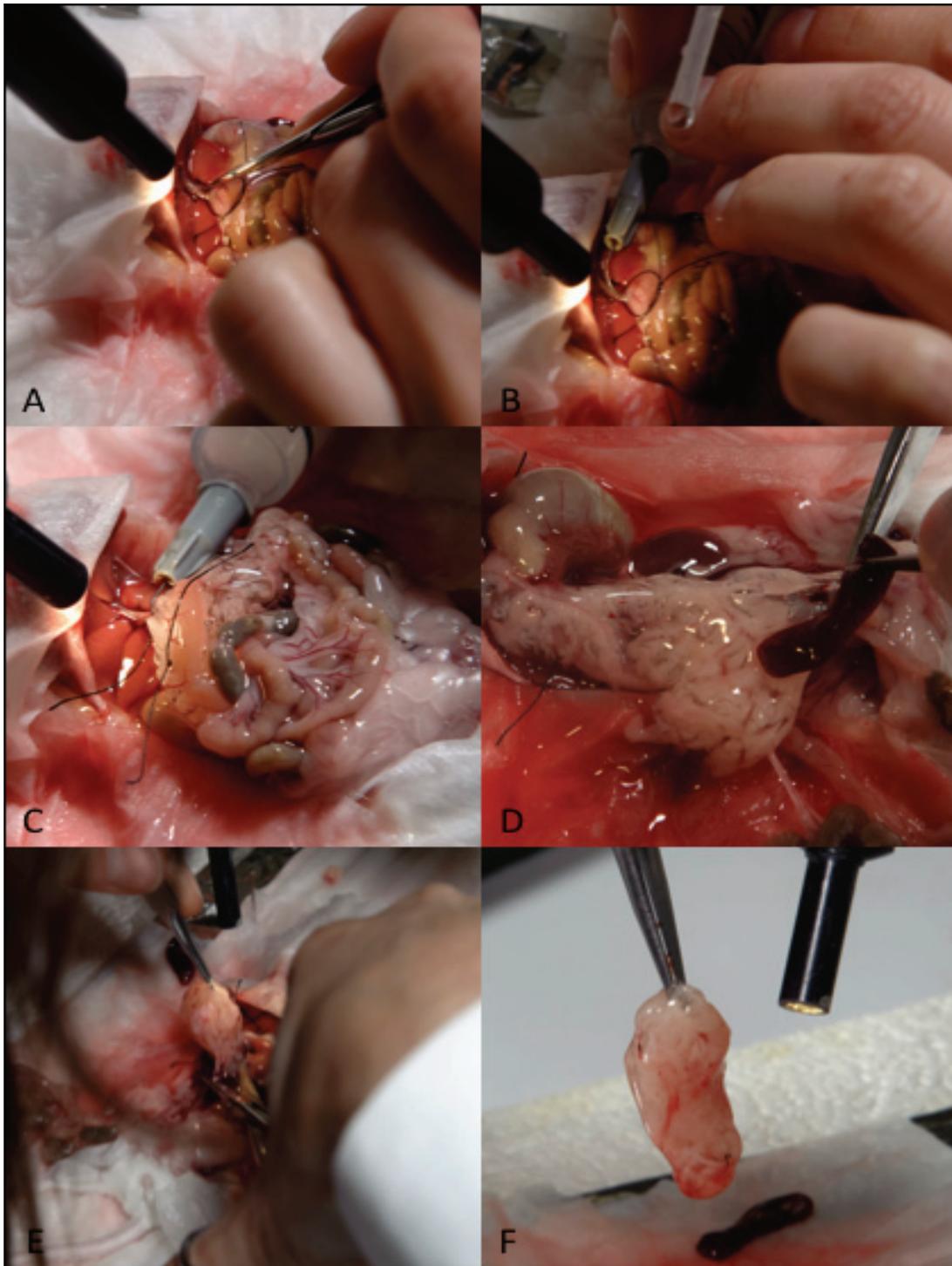


Figura 2.2: Etapas sucessivas até à remoção do pâncreas. (A) Corte transversal e parcial, com uma tesoura oftalmológica de pontas finas, do colédoco; (B) Colocação da cânula no interior do colédoco; (C) Enchimento do pâncreas com solução de Liberase arrefecida; (D-E) Remoção do pâncreas; (F) Pâncreas removido, distendido com solução enzimática.

Material e Métodos

O pâncreas era então dissecado separando-o dos órgãos (começando pelo intestino e prosseguindo com o estômago e baço) e do máximo de gordura envolvente (**Figura 2.2 (D-F)**). O pâncreas assim removido era colocado num tubo de *Falcon* de 15 ml e incubado num banho termostaticado a 37 °C, com agitação manual suave para não haver rutura mecânica (**Figura 2.3 (A)**).

O tempo de digestão era variável (entre 3 e 7 minutos), provavelmente devido ao fato de a atividade enzimática diminuir de forma variável ao longo do tempo de dissecação. Optou-se assim por ter em conta o aspeto visual do pâncreas, valorizando-se a separação de alguns fragmentos e a turbidez da solução. O momento exato para parar a reação é muito importante porque se corre o risco de não manter a integridade dos ilhéus, por rutura da cápsula de colagenase; assim, antes de se chegar a esse ponto, o tubo era imediatamente colocado em gelo e cheio com solução **III** arrefecida (**Tabela 2.1**). O tubo era então agitado vigorosamente, a fim de se desintegrar o pâncreas por disrupção mecânica, e colocado em repouso até que todo o material biológico sedimentasse; posteriormente era retirado o sobrenadante com a gordura que se mantinha à superfície, utilizando uma pipeta de Pasteur. Procedia-se a nova ressuspensão em solução **III** arrefecida (**Tabela 2.1**), processo repetido duas vezes de modo a garantir-se que toda a Liberase TL era removida. Na última etapa de lavagem a solução **III** (**Tabela 2.1**) adicionada já se encontrava à temperatura ambiente. Neste ponto procedia-se à pipetagem da suspensão utilizando uma pipeta descartável de 5 ml, de modo a desfazer o resto do pâncreas e facilitar a separação dos ilhéus. A suspensão resultante, contendo os ilhéus isolados, era então colocada numa caixa de Petri (60 mm de diâmetro), a partir da qual os ilhéus eram visualizados com a lupa e retirados. A remoção manual dos ilhéus era feita com a ajuda de uma micropipeta (P₂₀, Gilson Medical Electronics, França) para novas caixas de Petri (35 mm de diâmetro, com solução **III**, **Tabela 2.1**) até que fossem separados de todo o tecido exócrino. A seleção dos ilhéus intactos teve por base o seu aspeto morfológico, ou seja, a sua opacidade e contornos bem definidos (ver **Figura 2.3 (B)**).

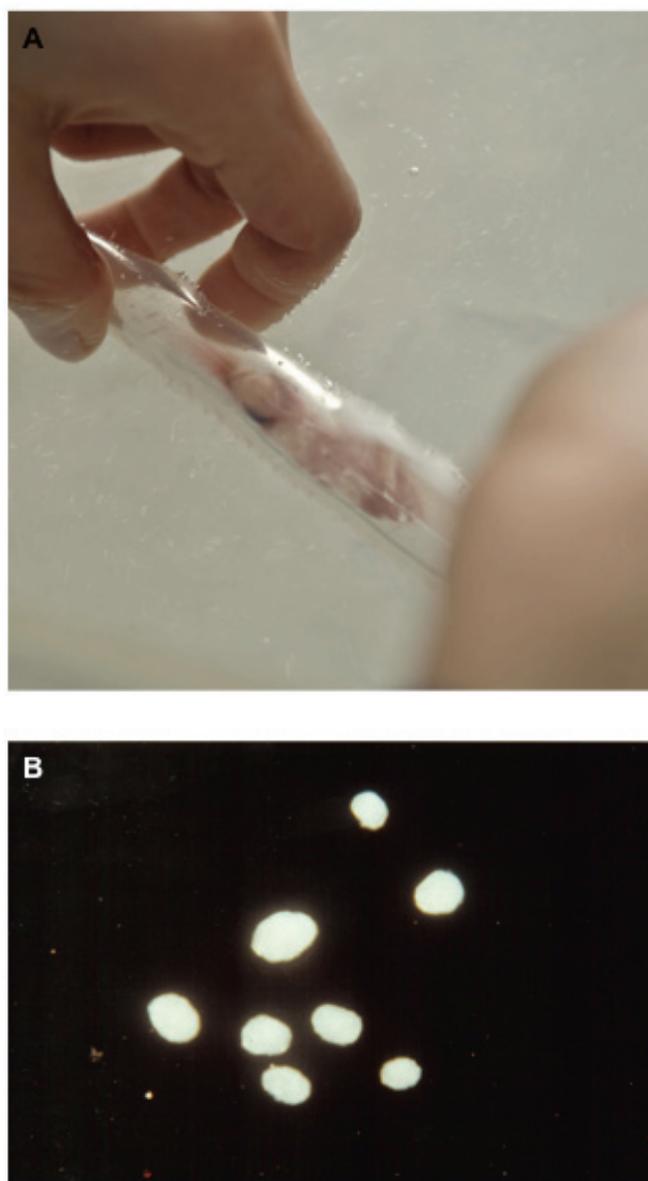


Figura 2.3: Isolamento dos ilhéus de Langerhans. **(A)** Separação dos ilhéus do tecido exócrino por reação enzimática (liberase). Processo realizado num banho termostático a 37 °C e sob agitação manual suave; **(B)** Ilhéus de Langerhans isolados visualizados à lupa.

Após o isolamento dos ilhéus, estes eram transferidos para uma solução de “Krebs G17” (solução **IV**, **Tabela 2.1**) de modo a recuperarem durante cerca de 1 hora. Após este tempo, e já em condições assépticas, eram esterilizados por passagens sucessivas em meio de cultura esterilizado contendo RPMI 1640 (solução **VIII**, **Tabela 2.2**). A partir daqui os ilhéus, mantinham sempre as condições assépticas, independentemente de serem utilizados para colocação imediata em cultura ou para obtenção de células.

2.1.3 Dispersão e cultura de células β -pancreáticas

O isolamento de células β -pancreáticas tinha como objetivo a sua utilização em experiências de *patch-clamp*. Uma vez que esta técnica requer a selagem entre uma micropipeta e a membrana da célula, era crucial que esta estivesse o mais limpa possível, ou seja, livre da matriz extracelular. Assim, foi utilizado um método de isolamento com tripsina.

Já em condições de esterilidade, os ilhéus isolados, eram transferidos para microtubos Eppendorf contendo uma solução sem cálcio, à temperatura ambiente (solução **V**, **Tabela 2.2**), à temperatura ambiente. Eram então centrifugados (350 g, 2 min, 16 °C) para remover do sobrenadante algum meio que pudesse ter sido transferido juntamente com os ilhéus. Este passo foi repetido 3 vezes para, por diluições sucessivas, garantir a remoção de todo o meio de cultura original e promover a completa substituição pela solução de isolamento sem cálcio. Após a última centrifugação, a suspensão era homogeneizada com uma pipeta automática P₂₀₀ e mantida à temperatura ambiente durante 8-10 minutos.

No final era adicionada uma solução com tripsina arrefecida (solução **VI**, **Tabela 2.2**), agitando-se manualmente durante 2 ou 3 minutos. Após este tempo, a suspensão era centrifugada e procedia-se à remoção do sobrenadante e substituição por nova solução (solução **VI**, **Tabela 2.2**), agora à temperatura de 37 °C. Procedia-se novamente a agitação manual até a solução ficar turva e sem partículas visíveis, sinal de que os ilhéus se tinham dissociado em células isoladas.

Já com células isoladas no microtubo procedia-se a nova centrifugação (350 g, 5 min a 16 °C), garantindo-se que todas as células sedimentavam; removia-se então o sobrenadante e adicionava-se meio de cultura (solução **VIII**, **Tabela 2.2**)

para parar a reação enzimática. Após uma nova centrifugação as células eram ressuspensas em meio de cultura (usualmente cerca de 100 µl).

A fim de poderem ser utilizadas em experiências de *patch-clamp*, as células isoladas tinham de ser fixadas num suporte, a uma densidade conhecida. Assim, determinava-se previamente, utilizando uma câmara de *Neubauer*, o número total de células que tinham sido isoladas. O procedimento envolvia a transferência de 10 µl da suspensão celular para a câmara de *Neubauer*, após o que se contava o número de células presentes nos 4 cantos externos da câmara, de forma a calcular o número total de células presentes num dado volume¹.

Depois de determinado o volume de suspensão celular necessário para se ter uma densidade de cerca de 7000 células/lamela, as células eram transferidas para lamelas de 15 mm, previamente revestidas com poli-L-lisina². Estas foram mantidas em ambiente controlado (37 °C, 5 % CO₂) e humidade controlada numa incubadora (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) para serem utilizadas em experiências de *patch-clamp* até 2-3 dias após isolamento.

2.1.4 Linha celular BRIN-BD11

A utilização de linhas celulares secretoras de insulina traz certas vantagens comparativamente às células isoladas a partir de ilhéus de Langerhans, nomeadamente a permanente disponibilidade para realização de experiências.

Assim, foram desenvolvidas linhas celulares secretoras de insulina, que inicialmente (caso das células RINm5F e HIT-T15) tinham a sua sensibilidade à

¹ N^o células/100 µl = 1000 * n^o médio de células por quadrado

² O processo de revestimento de lamelas com poli-L-lisina foi feito em condições assépticas, após lavagem das lamelas com água miliQ filtrada e etanol a 95 %. Depois de estarem secas, e já na câmara de fluxo laminar, eram colocadas com uma das faces em poli-L-Lisina (0,1 mg/ml, preparada a partir de um stock 10 mg/ml) em tampão borato (borato de sódio, 150 mM, pH 8,4) no mínimo 2 horas. Após este tempo, as lamelas eram lavadas em água miliQ estéril, para remover os monómeros não polimerizados que poderiam ser tóxicos para as células, e armazenadas em caixas de Petri de 35 mm.

Material e Métodos

glicose modificada devido a alterações no seu transporte e fosforilação (Hamid *et al.*, 2002).

Posteriormente foram desenvolvidas outras linhas celulares, que contudo apresentavam algumas insuficiências: as células INS-1, apesar de apresentarem uma resposta normal à glicose, requerem mercaptoetanol para a sua proliferação em cultura; as células MIN-6, apesar de responderem adequadamente à glicose, apresentam alterações apressíveis no seu perfil de concentração-resposta; e as células β TC-3 apresentam uma sensibilidade demasiado elevada a concentrações sub-fisiológicas de glicose (Hamid *et al.*, 2002).

O desenvolvimento de técnicas de fusão de células *in vitro* proporcionou o desenvolvimento da linha celular BRIN-BD11, por electrofusão de células β de rato com a linha celular RINm5F (McClenaghan & Flatt, 1999). Comparativamente às células RINm5F aquelas células expressam mais GLUT-2 (aumentando a sua capacidade de transporte de glicose), e têm um conteúdo em insulina muito superior. Contudo, a maior vantagem em relação às outras linhas celulares reside no fato de as células BRIN-BD11 apresentarem um perfil gradativo de secreção de insulina em resposta a aumentos da concentração de glicose (McClenaghan *et al.*, 1998).

Neste trabalho foram utilizadas células BRIN-BD11 que se encontravam congeladas em azoto líquido, entre as passagens 19 e 21 (estas células mantêm-se viáveis até à passagem 50).

Ao contrário do congelamento das células, que deve ser um processo lento (exposição a -80°C durante cerca de 24h e posterior manutenção em azoto líquido), o descongelamento deve ser feito o mais rapidamente possível. Assim, sempre que se pretendia descongelar uma amostra, eram previamente colocados 20 mL de meio de cultura (solução **VIII**, **Tabela 2.2**) num frasco de cultura de 75 cm^2 , a 37°C . O conteúdo do *vial*, descongelado num banho a 37°C , era posteriormente adicionado ao meio de cultura no frasco. Após ressuspensão durante 2 ou 3 minutos, as células eram observadas ao microscópio e, se se encontrassem redondas e brilhantes, era sinal de que estavam viáveis. O frasco era mantido numa incubadora (atmosfera de 95% ar/5% CO_2 com temperatura e humidade controlada), até as células atingirem cerca de 80% de confluência, altura em que eram diluídas.

Após adesão das células ao fundo do frasco o meio de cultura era mudado em dias alternados, de modo a remover as células mortas e repor diferentes constituintes, essenciais ao crescimento e viabilidade das células; para tal o meio de cultura era aspirado com uma pipeta de Pasteur, após o que era adicionado meio de cultura ao frasco (solução **VIII**, **Tabela 2.2**).

Quando as células se encontravam praticamente confluentes, ou seja, quando ocupavam cerca de 80 % do fundo do frasco, eram diluídas para uma densidade de cerca de 20 000 células/frasco, contando este processo como uma nova passagem das células. O meio era removido, após o que as células eram lavadas com 5 ml de tampão PBS (solução **IX**, **Tabela 2.3**) para remover as proteínas do soro e destacadas com 2 ml de solução de versénio (solução **X**, **Tabela 2.3**) durante cerca de 2-3 minutos na incubadora com esta solução (para facilitar o desprendimento das células provocava-se ocasionalmente alguma trepidação nos frascos). No seguimento deste processo já era possível observar ao microscópio células redondas e brilhantes em suspensão, às quais eram adicionados 5 ml de meio de cultura. Retirava-se em seguida uma amostra de 10 μ L para a contagem de células na câmara de *Neubauer*. Depois de calculada a densidade de células na suspensão, era determinado o volume a retirar para um novo frasco de cultura de 75 cm² com 15 ml de meio de cultura (solução **VIII**, **Tabela 2.2**), de modo a atingir-se a densidade de cerca de 20 000 células/frasco.

Tabela 2.3: Soluções utilizadas para lavagem e destacamento das células BRIN-BD11.

Solução	Composição
IX (Tampão PBS)	(em mM): 137 NaCl; 2,7 KCl; 1,8 KH ₂ PO ₄ ; 10,1 Na ₂ HPO ₄ (pH=7,4 ajustado com NaOH 2 M)
X (Versénio)	(em mM): 135 NaCl; 2,5 KCl; 1,5 KH ₂ PO ₄ ; 8,0 Na ₂ HPO ₄ ; 0,5 EDTA; 0,004ppm vermelho fenol (pH=7,3 ajustado com NaOH 2 M)

A fixação de células em lamelas previamente revestidas com poli-L-lisina, para posterior utilização em experiências de *patch-clamp*, era efetuada a uma densidade de cerca de 7000 células/lamela. De forma a fazer com que o volume da suspensão celular a colocar nas lamelas fosse significativo, a 2 ml da suspensão adicionava-se a 8 ml de meio de cultura (solução **VIII**, **Tabela 2.2**), perfazendo-se um total de 10 ml; após esta diluição, eram tipicamente colocados entre 12 e 20 μ L de suspensão em cada lamela.

Material e Métodos

Uma vez que esta linha celular apenas se mantém viável até às passagens 45-50, quando se atingia este ponto era necessário descongelar uma nova amostra de células. Como tal, houve sempre o cuidado de voltar a congelar cerca de 10 novas amostras por cada uma que se descongelava, de modo a manter um *stock* razoável de células congeladas em azoto líquido. O meio de congelação (80 % de meio de cultura, 10 % de soro fetal bovino e 10 % DMSO) era preparado tendo em conta o número total de amostras a congelar (em cada *vial* era colocado 1 mL de suspensão celular). Para o processo de congelamento, as células eram destacadas, e ressuspensas em tubos *Falcon* com 15 mL de meio de cultura (solução **VIII**, **Tabela 2.2**); após centrifugação durante 4 min a 4000 g, o sobrenadante era removido e as células ressuspensas em meio de congelamento ainda sem DMSO a 10%. Só após os *vials* estarem todos identificados (nome da linha celular, data, número de passagem, nome do experimentador) é que o DMSO era adicionado ao frasco, de modo a minimizar o tempo de contacto com as células. Depois de se ter efetuado a adição de DMSO era colocado rapidamente 1 mL de suspensão em cada *vial*, sendo estes colocados de imediato no Mr. Frosty³ – 80 °C.

2.1.5 Microdissecção do ilhéu de Langerhans

Os ilhéus de Langerhans foram microdissecados a partir de pâncreas de murganhos fêmea da estirpe CD1. Após sacrifício por deslocamento cervical, o animal era pesado (20 – 40 g) e colocado em posição, após o que era feita uma incisão no abdómen para expor os órgãos. O pâncreas era removido juntamente com o baço que servia para orientação e suporte, uma vez que ao longo de todo o processo nunca deveria tocar-se o pâncreas com as pinças (a fim de não ocorrer danificação do tecido). Os dois órgãos eram então transferidos para um recipiente⁴ que continha solução **IV** com 11 mM glicose (**Tabela 2.1**) à temperatura ambiente. Com a ajuda de alfinetes, o pâncreas era fixado e ligeiramente esticado (**Figura 2.4**

³ Utilizado para criopreservação celular; contém 100 % de álcool isopropílico, permitindo que o congelamento se processe lentamente, uma vez que a diminuição de temperatura ocorre a -1 °C/minuto.

⁴ Recipiente de vidro onde era colocada uma mistura de cera e carvão. Deste modo era possível fixar o pâncreas com a ajuda de alfinetes e por outro lado tínhamos um fundo preto de modo a haver contraste para visualizarmos os ilhéus na altura da microdissecção.

(A)). Após visualização, era escolhido um ilhéu bem isolado de outros e com algum tecido exócrino à volta.

Na grande maioria dos casos foi necessário expor o topo do ilhéu, que também continha tecido exócrino, ao mesmo tempo que o ilhéu era microdissecado com algum tecido exócrino à sua volta; isto porque, por um lado era necessário que o acesso ao ilhéu estivesse desimpedido para poder ocorrer a penetração pelo eletrodo e porque, por outro, era necessário algum tecido exócrino para fixar o ilhéu na câmara de perfusão com alfinetes entomológicos (**Figura 2.4 (B)**). Todo o procedimento de microdisseção foi realizado com a ajuda de uma lupa e de um iluminador de fibra ótica (WILD HEERBRUGG e Alpha-1501,respectivamente).

Material e Métodos

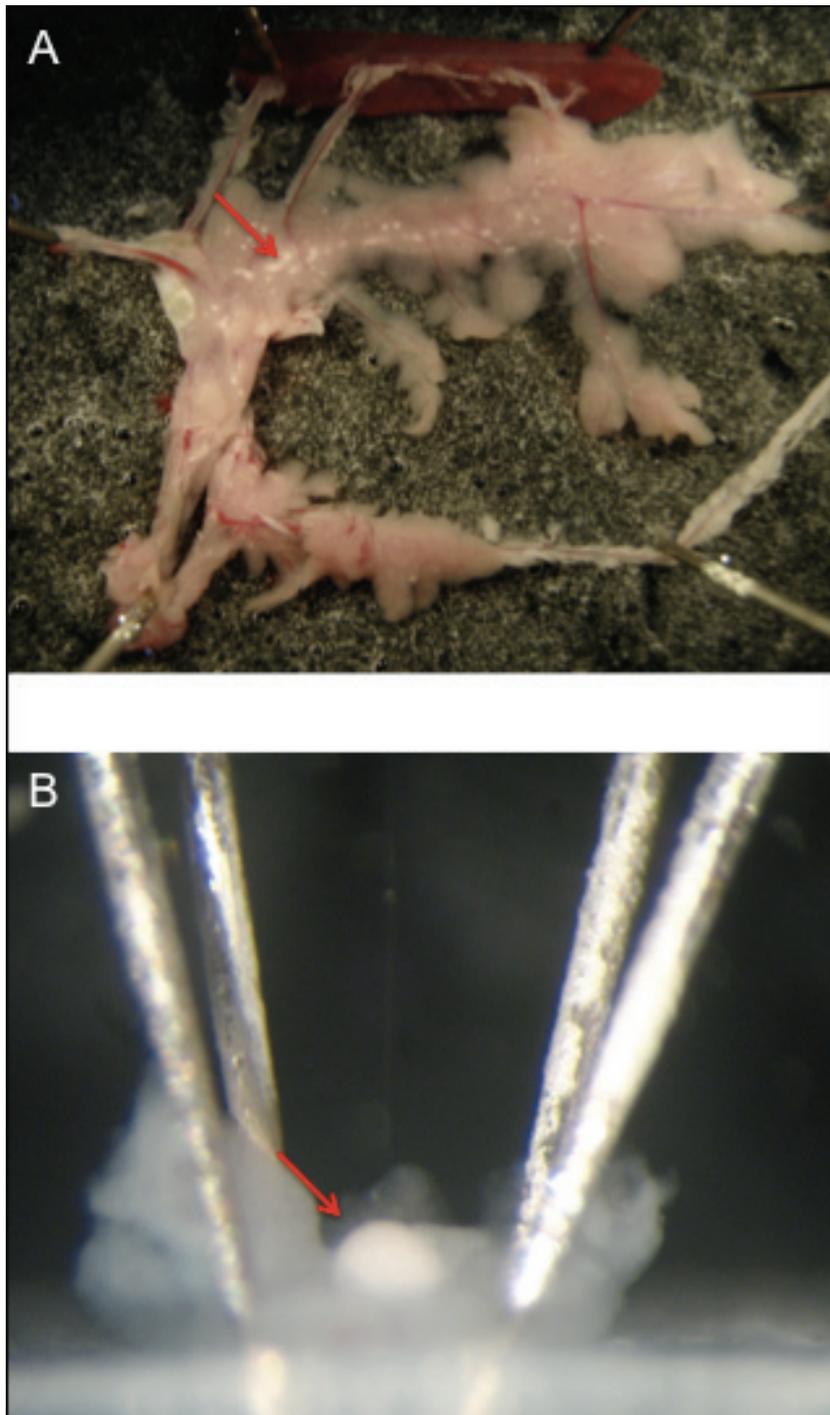


Figura 2.4: Ilhéus de Langerhans visualizados à lupa. **(A)** Pâncreas e baço distendidos sobre uma superfície preta para criar contraste, visualizados através de uma lupa com amplificação de 60x; **(B)** Ilhéu microdissecado e colocado na câmara de perfusão, ancorado com 4 alfinetes entomológicos inseridos no tecido exócrino adjacente. Visualização através de uma lupa com amplificação de 500x. Na perpendicular ao ilhéu é possível observar o microelétrodo. A seta vermelha aponta para o ilhéu.

2.2 Registo de correntes iónicas por *patch-clamp*

A técnica de *patch-clamp* é uma ferramenta muito poderosa nas ciências biológicas. Em 1991, Neher e Sakmann receberam o prémio Nobel da Fisiologia ou Medicina por desenvolverem a técnica de *patch-clamp* (Hamill et al., 1981).

A introdução desta técnica teve grandes implicações nos estudos eletrofisiológicos: primeiro, porque permitiu que se medissem correntes através de um só canal iónico (correntes unitárias), permitindo assim a realização de estudos de permeabilidade, cinética, farmacologia e modulação; e segundo, porque tornou possível que mais tipos celulares pudessem ser estudados por *voltage-clamp*, o que até então, não era possível, pois as técnicas convencionais implicavam a introdução de dois microelétrodos em cada célula (Hamill et al., 1981).

2.2.1 Soluções

Todas as soluções foram preparadas com água desionizada, com uma resistividade superior a $18 \mu\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$.

Foram utilizadas diferentes soluções intra e extracelulares, dependendo do objetivo de cada estudo. A composição destas soluções encontra-se descrita na **Tabela 2.4**.

Em cada dia de experiência, todas as soluções a utilizar eram filtradas utilizando filtros de $0,2 \mu\text{m}$, de forma a impedir a presença de detritos e, conseqüentemente, a promover a estabilidade da selagem e o não entupimento da pipeta ou das tubagens de perfusão.

Material e Métodos

Tabela 2.4: Composição das soluções utilizados em registos de *patch-clamp*.

Solução		Composição	[Ca ²⁺] _i livre
Intracelular	A	(em mM): 125 KCl; 1 MgCl ₂ ; 2 CaCl ₂ ; 10 EGTA; 5 HEPES; pH 7,15 ajustado com KOH 2M (para 100 mL de solução adicionado 340 µL de KOH)	88 nM
	B	(em mM): 10 KCl; 10 NaCl; 70 K ₂ SO ₄ ; 4 MgCl ₂ ; 2 CaCl ₂ ; 10 EGTA; 5 HEPES; pH 7,15 ajustado com KOH 2M (para 100 mL de solução adicionado 350 µL de KOH)	88 nM
	C	(em mM): 10 KCl; 10 NaCl; 70 K ₂ SO ₄ ; 1 MgCl ₂ ; 2 CaCl ₂ ; 5 EGTA; 10 HEPES; pH 7,15 ajustado com KOH 2M (para 100 mL de solução adicionado 410 µL de KOH)	230 nM
	D	(em mM): 10 KCl; 70 K ₂ SO ₄ ; 1 CaCl ₂ ; 1 EGTA; 10 HEPES; pH 7,15 ajustado com KOH 2M (para 100mL de solução adicionado 190 µL de KOH)	19 µM
Extracelular	E	(em mM): 5,6 KCl; 138 NaCl; 1,2 MgCl ₂ ; 2,6 CaCl ₂ ; 5 HEPES; pH 7,4 ajustado com NaOH 2M (para 100mL de solução adicionado 105 µL de NaOH)	-
	F	(em mM): 5 KCl; 140 NaCl; 1,2 MgCl ₂ ; 2,6 CaCl ₂ ; 10 HEPES; pH 7,4 ajustado com NaOH 2M (para 500mL de solução adicionado 1060 µL de NaOH)	-
	G	(em mM): 150 KCl; 1,2 MgCl ₂ ; 2,6 CaCl ₂ ; 10 HEPES; pH 7,4 ajustado com NaOH 2 M (para 250 mL de solução adicionado 510 µL de NaOH)	-

À solução extracelular foram adicionadas diferentes toxinas e/ou fármacos, dependendo do objetivo do estudo. Estes eram adicionados apenas no dia da experiência, tendo-se sempre preparado a “solução teste” a partir da “solução controlo”, de modo a que a diferença entre as duas soluções fosse apenas o fármaco/toxina em estudo.

Quando se efetuaram registos no modo *perforated-patch*, eram sempre preparadas soluções de anfotericina B⁵ (BIOTREND Chemikalien GmbH, Colónia, Alemanha). Estas soluções foram preparadas adicionando anfotericina B a uma das “soluções intracelulares” da **Tabela 2.4** a partir de um *stock* de 40 mg/ml. A preparação adequada deste *stock* revelou-se crucial para o bom funcionamento da técnica. Assim, a anfotericina B era dissolvida em DMSO, agitada durante 1 min num vortex e sonicada durante 2 ou 3 minutos; o produto era manipulado com proteção da luz e armazenado imediatamente num congelador a -20 °C.

Quando era preparada solução de trabalho contendo anfotericina B, uma amostra de *stock* era sempre homogeneizada por pipetagem até se observar que nenhum composto permanecia aderente à ponta da pipeta. A amostra de *stock* era mantida até 1 semana a -20 °C. Sempre que nova solução de trabalho era preparada, tanto esta como o *stock* de anfotericina B eram devidamente agitados e sonicados.

2.2.2 A técnica de *Patch-clamp*

Selagem

A principal razão pela qual é possível obter registos de correntes unitárias com a técnica de *patch-clamp* é a elevada resistência que se forma entre a ponta da pipeta e a membrana celular, que não só reduz a corrente de fuga como o ruído basal.

Para se obter uma selagem de elevada resistência é necessário ter em atenção algumas condições experimentais: primeiro, a membrana das células deve estar perfeitamente limpa de detritos e de matriz extracelular, o que implica que, quando se utilizam células de culturas primárias estas sejam tratadas enzimaticamente com tripsina; segundo, as soluções utilizadas devem estar livres de resíduos, o que requer a sua filtração diária utilizando filtros de 0,2 µm; terceiro, logo depois da lamela com as células aderidas ser retirada do meio de cultura deve proceder-se á sua colocação em solução extracelular antes de ser colocada na câmara de perfusão, de modo a remover vestígios de soro e meio de cultura; quarto, a ponta da pipeta deve estar perfeitamente limpa, o que é conseguido não só pela limpeza da pipeta com ácido nítrico e etanol, como também pelo polimento da ponta

⁵ Antifúngico produzido por culturas de actinomicetos *Streptomyces nodosus* que forma poros na membrana, aumentando a permeabilidade desta a pequenas moléculas e iões.

Material e Métodos

da pipeta (*fire-polishing*) após esta ter sido estirada; e, por último, antes de a pipeta entrar na solução do banho, deve ser aplicada uma ligeira pressão positiva à solução da pipeta para gerar um pequeno fluxo de saída que impeça que eventuais detritos entrem em contacto com a ponta da pipeta.

Os passos prévios à selagem da ponta da pipeta com a membrana celular consistiam na escolha da célula, na colocação da pipeta no suporte e na aplicação de uma pressão positiva à solução da pipeta para garantir que esta seja mantida limpa quando entra em contacto com a célula.

Após imersão da ponta da pipeta no banho, a linha de base era ajustada a zero pelo *offset* do amplificador. O passo seguinte consistia em medir a resistência da pipeta (R_{pip}), tendo em conta a corrente gerada em resposta a um pulso de potencial teste (5 mV). Pela Lei de Ohm, esperar-se-ia obter uma resistência $R_{pip} = (5 \times 10^{-3}) / (i \times 10^{-12}) \text{ V/A} = (5/i) \times 10^9 \Omega = 5000/i \text{ M}\Omega$, em que i é expressa em pA. A corrente i , dada pela deflexão de potencial observada no osciloscópio, determina-se conhecendo o ganho total do sistema $\alpha\beta$ (em mV/pA), em que α é o ganho do amplificador (normalmente fixado em 10) e β o ganho do pré-amplificador (pré-definido em 0,1). Ou seja, se a deflexão observada fosse ΔV (em mV), a corrente i seria $\alpha\beta\Delta V = \Delta V$ (em pA) e a resistência da pipeta seria simplesmente dada por $R_{pip} = 5000/\Delta V$ (em M Ω).

O circuito utilizado para produzir o pulso teste é pois utilizado para monitorizar a resistência elétrica da pipeta, simplesmente por observação da resposta obtida no osciloscópio, uma vez que a resposta óhmica é proporcional ao pulso teste aplicado. Trata-se também de um componente do sistema muito importante para detetar algum problema com a pipeta ou para monitorizar a selagem desta com a membrana da célula. Várias situações podem acontecer: por exemplo, se a ponta da pipeta entupisse parcialmente, a resistência aumentaria, o que se traduziria numa diminuição na amplitude da resposta; se a deflexão de potencial não aumentasse em resposta ao pulso teste quando a pipeta entrasse em contacto com o banho, poderia acontecer que a solução intracelular não estivesse em contacto com o eléctrodo. Por outro lado, o processo de obtenção da selagem monitorizado com o auxílio do pulso teste, ou seja, quando a pipeta tocava na célula observava-se uma diminuição na resposta, já que a resistência aumentava. Se por alguma razão a amplitude da resposta ao pulso teste aumentasse após ter

diminuído, a hipótese de obter uma selagem de elevada resistência seria praticamente nula, uma vez que a ponta da pipeta já estaria contaminada com material celular, quando tocasse novamente na membrana.

Depois de determinada a resistência da pipeta, esta era aproximada da célula com o macromanipulador; o plano focal da objetiva do microscópio era colocado acima da célula e, ao mesmo tempo que se ia baixando a pipeta, baixava-se também o plano focal até fazer coincidir a focagem da célula com a da ponta da pipeta. Neste momento, o microscópio era alterado para alta magnificação e a aproximação final da pipeta à célula era feita por controlo fino com recurso a um micromanipulador hidráulico. Quando a pipeta tocava na célula era observada uma depressão na sua superfície e a resposta ao pulso teste obtida no osciloscópio tornava-se cada vez menor (resultado de ter ocorrido um aumento da resistência). A partir deste momento, a pipeta já não era movida e a pressão positiva era retirada. A formação da selagem de elevada resistência por vezes ocorria espontaneamente, mas na maioria dos casos este processo levava algum tempo sendo então aplicada sucção (pressão negativa) à pipeta recorrendo ao mesmo sistema que era utilizado para aplicar pressão positiva.

No decorrer da selagem era também aplicado um potencial de *holding* de -70mV à pipeta; este potencial aproximava-se do potencial de repouso da célula pelo que, após ruptura da membrana, não ocorriam variações bruscas de potencial.

Em experiências bem sucedidas as selagens obtidas tinham sempre elevada resistência (nunca inferior a 2-10 G Ω), que era confirmada pela resposta ao pulso teste monitorizada no osciloscópio.

Todo o processo de selagem era feito com a perfusão ligada, embora não incidindo diretamente na célula. Depois de se ter obtido uma selagem adequada a perfusão era então direcionada para a célula, com “solução controlo” a fluir. Garantia-se assim que o sistema de perfusão não causava disrupção mecânica da selagem, já que o fluxo na câmara era constante.

Configurações de *whole-cell*

Registo convencional

Após obtenção de uma selagem de elevada resistência, estavam reunidas as condições para atingir a configuração de *whole-cell* da técnica de *patch-clamp*.

Começava-se por aplicar um pequeno pulso retangular de potencial, verificando-se o aparecimento de uma corrente que fluía para a capacidade da pipeta durante a transição entre os dois potenciais. Geravam-se assim transientes capacitivos rápidos, visualizáveis no início e fim do pulso. É possível reduzir substancialmente ou mesmo suprimir estes transientes introduzindo uma corrente capacitiva apropriada na entrada do amplificador de *feedback* do pré-amplificador, utilizando o comando de compensação da capacidade da pipeta ("*pipette capacitance compensation*", ver à frente) no amplificador de *patch-clamp*.

Com os transientes capacitivos cancelados era então aplicada uma leve e súbita sucção à pipeta, de modo a provocar o rompimento da membrana. Quando, por observação no osciloscópio os transientes capacitivos reapareciam e assumiam dimensões consideráveis, concluía-se que a sucção tinha sido efetiva em provocar o rompimento da membrana. De fato, neste momento o interior da pipeta estaria em continuidade elétrica com o interior da célula e os transientes capacitivos observados deveriam representar a capacidade da membrana celular (ver à frente).

Na configuração de registo de *whole-cell* o potencial de membrana é controlado pelo potencial aplicado ao eléctrodo da pipeta. O controlo deste potencial não é completo, dependendo do valor da resistência de acesso entre o eléctrodo e o interior celular, bem como da amplitude das correntes que fluem através desta resistência. Esta resistência de acesso é designada por resistência em série (R_s), uma vez que constitui uma resistência em série com a membrana. Uma parte da resistência está associada à própria pipeta, muito embora a maior parte derive da resistência residual oferecida pelo *patch* fragmentado da membrana, que proporciona o acesso eléctrico ao interior celular. Muitas vezes R_s é suficientemente grande de forma a causar erros significativos no potencial registado em *voltage-clamping*. Desta forma, R_s deve ser compensada eletronicamente ou, pelo menos, determinada de forma a poder demonstrar-se que contribui pouco significativamente para o potencial registado.

No presente trabalho, obtiveram-se tipicamente valores de R_s inferiores a 10 M Ω (para o método de cálculo ver texto mais à frente). Uma vez que as correntes máximas registadas foram da ordem de magnitude de 1000 pA ou menos, o erro resultante da queda de potencial através de R_s pode ser estimado como sendo ≤ 10 mV. Não foram consideradas experiências em que R_s aumentou significativamente ($> 10\%$).

Perforated-patch

Na configuração descrita anteriormente, a solução colocada na pipeta (solução intracelular) diluía o conteúdo celular. Para evitar o efeito indesejado que este processo de dialise pode acarretar, nalgumas experiências optou-se pela configuração *perforated-patch*.

A configuração *perforated-patch* envolve o uso de substâncias inseridas na pipeta que, ao entrarem em contacto com a membrana celular, criam poros permeáveis a pequenas moléculas e iões, mas não a macromoléculas. Neste trabalho utilizou-se anfotericina B, preparada de acordo com o descrito na secção 2.2.1.

A preparação da pipeta envolvia, em primeiro lugar, o enchimento pela ponta com solução sem anfotericina B (por capilaridade); procedia-se em seguida ao enchimento pelo topo com a mesma solução, mas contendo agora o agente permeabilizante à concentração desejada (ver secção 2.2.4).

Depois de se obter uma selagem de elevada resistência os transientes capacitivos demoravam algum tempo a aumentar, indicando que os poros já se tinham formado e que era possível começar a registar correntes iónicas. Este tempo de latência, que por razões práticas não deveria exceder cerca de 15 minutos, refletia provavelmente o tempo que anfotericina B demorava a atingir a ponta da pipeta por difusão. A redução deste tempo implicava aumentar a concentração de anfotericina B na solução da pipeta; verificou-se, no entanto, que o aumento da concentração aumentava a probabilidade de se perder a selagem. Finalmente optou-se por utilizar uma concentração de 180 $\mu\text{g/mL}$, o que permitiu assegurar a estabilidade da selagem, ao mesmo tempo que proporcionava resistências de acesso só um pouco mais elevadas do que as obtidas na configuração convencional de *whole-cell*.

2.2.3 Montagem experimental

A técnica de *patch-clamp* envolve a utilização de diferentes componentes instrumentais, como se pode observar pela imagem da **Figura 2.5**. Apesar de na imagem não ser visível toda a instrumentação que faz parte do *setup*, alguns componentes serão considerados mais à frente.

Estabilidade e ruído

A natureza das medições feitas em *patch-clamp* torna indispensável que se isolem as vibrações e o ruído, de modo a garantir que a selagem entre a pipeta e a membrana celular seja estável, bem como maximizar a estabilidade das correntes registadas, com uma razão sinal/ruído elevada.

As vibrações foram minimizadas através da utilização de uma mesa hidráulica anti-vibratória (Technical Manufacturing Corporation, Peabody, MA, USA), onde o microscópio, o pré-amplificador e os micromanipuladores foram colocados.

Existem dois tipos de ruído: o ruído externo, que provém de fontes eletromagnéticas que se encontram próximas da montagem, e o ruído interno, inerente à selagem e ao sistema de registo em si.

Para reduzir interferências eletromagnéticas, a maior parte da instrumentação está colocada no interior de uma gaiola de *Faraday*, que é montada de maneira a não tocar na mesa flutuante ou em qualquer outro componente, não transmitindo vibrações; como a gaiola é aberta num dos lados, de modo a permitir o acesso ao microscópio, era colocada em frente à câmara de perfusão uma pequena malha condutora idêntica à utilizada na gaiola de *Faraday*. Adicionalmente, todos os componentes metálicos estavam ligados à terra num ponto comum do amplificador.

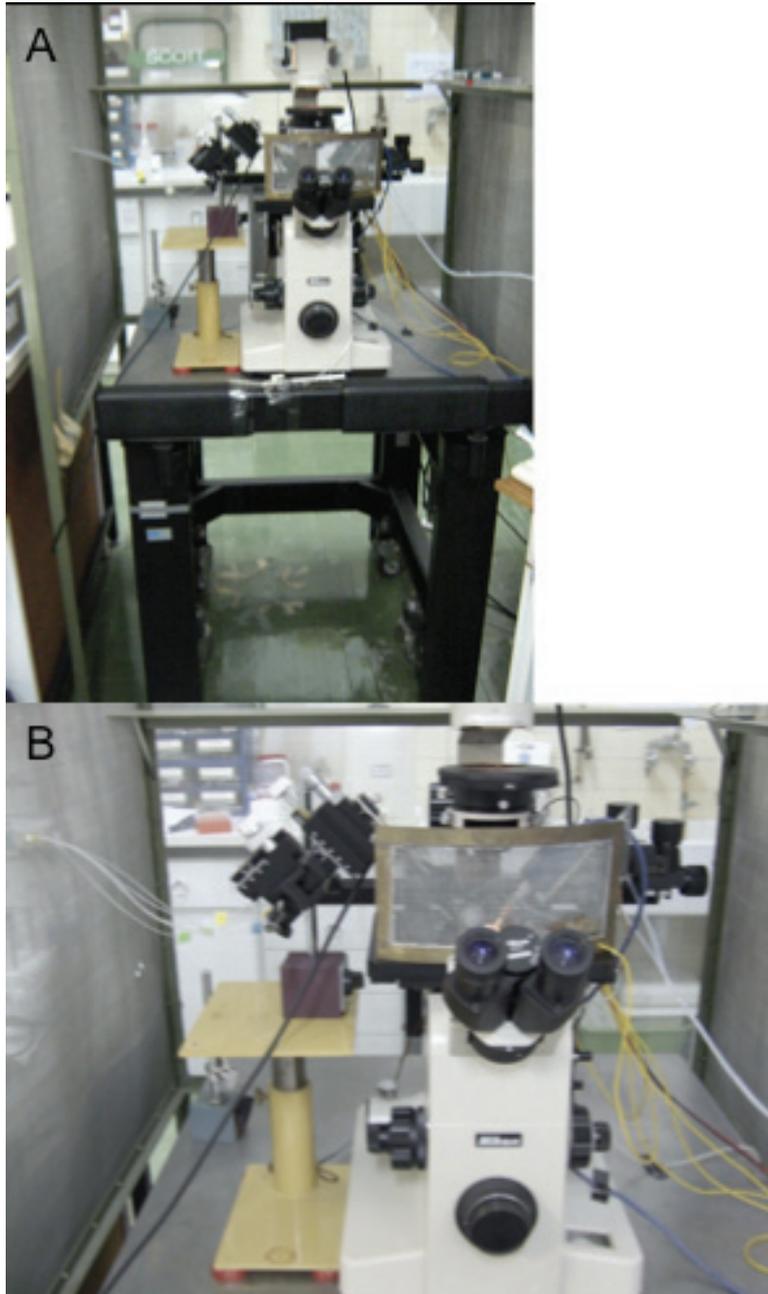


Figura 2.5: Imagem do setup de patch-clamp.

Amplificador e pré-amplificador

O amplificador utilizado no presente trabalho (Axopatch 200A Patch Clamp, Axon Instruments Inc., Foster City, CA, USA) dispõe dos vários recursos que permitem que diferentes comandos sejam aplicados à célula. Faz-se em seguida referência aos vários comandos disponíveis que foram consistentemente utilizados, numa perspectiva operacional.

O comando "offset control" permite ajustar o sinal de corrente a zero quando o circuito elétrico entre o banho e a pipeta é fechado, isto é, após a ponta da pipeta ser submersa na solução de perfusão.

O comando "holding potential" permite definir o potencial de *holding* (V_h) antes de se estabelecer o protocolo de pulsos de potencial (o valor de V_h relativo ao protocolo de pulsos é definido por *software*).

O comando "low pass Bessel filter" permite eliminar o ruído de alta frequência do sinal, utilizando um filtro Bessel passa-baixas (*low pass*) de quatro pólos com cinco frequências de corte. Em regra foi seleccionada a frequência de corte de 5 kHz.

Tal como referido anteriormente, o comando "pipette capacitance compensation" é utilizado para compensar os transientes capacitivos relacionados com a pipeta antes da entrada em modo de *whole-cell*.

Estes transientes capacitivos dependem das constantes de tempo da pipeta, considerada como tendo características de condensador. O comando permite cancelar os componentes mais rápidos (*FAST*, valores mais baixos da constante de tempo) e mais lentos (*SLOW*, valores mais baixos da constante de tempo) dos transientes capacitivos, utilizando controlos para a magnitude e constante de tempo.

A importância desta compensação prende-se com a possibilidade de, numa fase posterior, se poder determinar a capacidade da membrana e a resistência em série, sem ter em conta a constante de tempo da pipeta.

O comando "zap" pode ser utilizado em alternativa ao sistema de sucção (seringa acoplada a um tubo que se encontrava ligado ao suporte da pipeta), para romper o *patch* de membrana e entrar na configuração de *whole-cell* depois de obtida a selagem de elevada resistência. O comando é responsável pela injeção no *patch* de uma corrente DC (1,3 V) durante um tempo pré-definido (0,5-50 ms), podendo ainda ser utilizado no modo manual. A aplicação da corrente causa frequentemente a quebra dielétrica da membrana.

Nos estudos realizados com a linha celular BRIN-BD11 optou-se sempre por aplicar sucção com a seringa, já que das poucas vezes que o comando "zap" foi utilizado era notório que a resistência da selagem ou diminuía ou ficava bastante instável. Já no caso das células primárias, que apresentam uma membrana mais difícil de romper, este controlo era aplicado conjuntamente com a sucção.

O comando "output gain" permite definir o ganho do amplificador α , anteriormente considerado para o cálculo da resistência da pipeta. Juntamente com o ganho do pré-amplificador determina a amplificação do sinal de corrente e, portanto, a amplitude máxima da corrente que é possível registar.

O pré-amplificador (Axon Instruments 202A) encontra-se colocado na platina do microscópio, estabelecendo a conexão entre a pipeta de *patch* e o amplificador. Trata-se de um conversor de corrente em voltagem, em que o elemento principal é um amplificador operacional cuja função é fazer com que o potencial da pipeta (que alimenta a entrada negativa do amplificador) siga o potencial aplicado (ou comando, que alimenta a entrada positiva). Para tal é injetada

Material e Métodos

na pipeta, através de uma elevada resistência de *feedback* (50 M Ω), a corrente necessária para anular a diferença entre os dois potenciais.

Microscópio

Na técnica de *patch-clamp* podem ser utilizados dois tipos de microscópios, dependendo da natureza da preparação celular utilizada. Fatias de tecido requerem o uso de microscópios em que as objetivas estão colocadas acima da preparação, enquanto que para células isoladas se utilizam microscópios invertidos, isto é, com as objetivas abaixo da preparação. Esta última configuração deixa mais espaço livre para manipular a pipeta.

Uma vez que neste trabalho foram utilizadas células isoladas, utilizou-se um microscópio invertido (Diaphot-TMD, Nikon Corporation, Japão) com uma óptica de contraste de fase, para dar algum brilho às células, sendo assim possível visualizar a membrana e o citoplasma destas.

Neste tipo de microscópio, a preparação celular (que é previamente fixada numa lamela e, posteriormente, disposta numa câmara própria para o efeito) é colocada na plataforma do microscópio, que não é móvel na direcção vertical. Quando a focagem era alterada apenas se movia a objetiva e não a preparação em si, para evitar que esta colidisse com a pipeta.

Micromanipuladores

Os movimentos da pipeta têm de ser muito precisos e estáveis para que a aproximação à célula ocorra sem problemas. Para tal, utilizou-se um micromanipulador hidráulico que permite movimentos ao longo dos três eixos.

O micromanipulador hidráulico utilizado (MHW-3, Narishige Scientific Instrument Lab, Japão) estava montado dentro da gaiola de *Faraday*, fixado à torre

do microscópio. Esta disposição permite diminuir as vibrações. O pré-amplificador, por sua vez, estava colocado no micromanipulador para reduzir a distância à célula.

Após visualização da pipeta e da célula no mesmo plano de focagem, com a ajuda dos movimentos grosseiros do micromanipulador, as aproximações subsequentes eram realizadas com o controlador remoto, dos movimentos finos do micromanipulador, colocado fora da mesa pneumática para evitar formação de vibrações à preparação.

Osciloscópio

A utilização de um osciloscópio (digital storage oscilloscope Tektronix 2201, Tektronix Inc., USA) foi fundamental para monitorizar o progresso da selagem e a qualidade do registo. Basicamente, desde que a pipeta era submersa no banho até que a selagem estava formada e se começavam a registar as correntes, tudo era controlado no osciloscópio: levar a zero o potencial da pipeta; medir a sua resistência depois de estabelecer selagem com a membrana da célula; e, finalmente, proceder à compensação dos transientes capacitivos.

2.2.4 Micropipetas

Micropipeta é o termo vulgarmente atribuído ao capilar de vidro estirado, onde é colocado o fio de prata cloretado. Este entra em contacto com a solução da pipeta, estabelecendo-se assim o contacto elétrico.

Estiramento das micropipetas

As pipetas foram estiradas a partir de capilares de vidro (Harvard Apparatus Ltd, Kent, Inglaterra). O vidro utilizado de borossilicato, tinha um diâmetro interno de 1,17 mm e um diâmetro externo de 1,5 mm; estes capilares possuíam filamento interno para facilitar o enchimento da pipeta por capilaridade, e impedir a formação de bolhas.

Antes de se proceder ao estiramento os capilares de vidro foram limpos, colocados durante a noite em ácido nítrico diluído (50/50 v/v), passados abundantemente por água miliQ filtrada e por último colocados em etanol a 95 % filtrado; depois de secos na estufa estavam prontos para serem utilizados.

Imediatamente antes de se estirar uma nova pipeta, eram ainda removidas possíveis deposições de gordura dos dedos e alguma sujidade que se pudesse ter alojado no interior do capilar, limpando-se o exterior com papel humedecido com álcool e fazendo-se passar etanol a 95 % filtrado pelo seu interior; depois de estar completamente seco (com a ajuda de ar quente) o capilar era colocado no estirador de pipetas (Flaming/Brown P-87, Sutter Instrument Co., USA), onde era sujeito a um ciclo de três etapas de aquecimento e arrefecimento, obtendo-se assim duas micropipetas idênticas com cerca de 1-2 μm de diâmetro de ponta.

O estiramento do capilar pode deixar algumas irregularidades na ponta da micropipeta que, com polimento, são eliminadas. Embora não seja essencial para se conseguir uma boa selagem, promove selagens com resistências acima dos 10 G Ω na maioria dos casos.

A microforja contém um filamento de platina que se torna incandescente por aplicação de corrente, podendo ser utilizado para fundir parcialmente o vidro na ponta da pipeta, eliminando as referidas irregularidades. A fim de evitar a deposição do metal evaporado na ponta da pipeta, o filamento de platina era regularmente revestido com vidro.

Após o estiramento da pipeta, esta era colocada num suporte e posicionada recorrendo ao micromanipulador acoplado à microforja (CPM-2, ALA Scientific Instruments Inc., NY, USA). Utilizando a objetiva de menor ampliação (100x), a pipeta e o filamento de platina eram colocados no centro do campo visual, frente a frente. Utilizando uma objetiva com maior ampliação (400x), e com a pipeta e o filamento ajustados no mesmo plano horizontal a corrente aplicada ao filamento era então aumentada até à incandescência e até que se observasse uma pequena diminuição na abertura da ponta da pipeta (o que poderia demorar alguns segundos); o polimento era então parado, procedendo-se ao revestimento da pipeta com *Sylgard* e ao seu enchimento com a solução intracelular.

Revestimento com *Sylgard*

A ponta da pipeta, quando colocada em solução, tem a capacidade de armazenar cargas, funcionando como um condensador; daí ser aconselhável proceder-se à redução da sua capacidade. Como o valor da capacidade aumenta com a porção da pipeta que é imersa em solução, a altura da solução na câmara foi mantida em cerca de 2 mm. No entanto, há sempre um filme de solução que sobe pela parede exterior da pipeta, aumentando muito a capacidade e o ruído elétrico.

No sentido de evitar o contacto do vidro com a solução, a pipeta era revestida com silicone (*Sylgard*, Dow Corning Corporation, USA). Esta substância hidrofóbica para além de reduzir o ruído, aumenta muito a espessura da parede da ponta da

Material e Métodos

pipeta, diminuindo portanto a sua capacidade. Depois de o capilar ser estirado, a silicone era colocada junto à ponta da pipeta e curada, com uma fonte de calor, havendo sempre o cuidado que não obstruísse a ponta.

Enchimento das micropipetas

No caso de pipetas preparadas para registos de correntes na configuração *whole-cell*, o capilar era provido de um filamento no seu interior e o enchimento com solução era exclusivamente realizado por *backfilling* (isto é, introduzindo a solução através da parte superior da pipeta utilizando uma seringa). No caso de pipetas preparadas para registos no modo de *perforated patch*, o enchimento foi realizado de forma diferente: (i) a ponta da pipeta era previamente inserida num tubo Eppendorf contendo a solução intracelular sem anfotericina B, a fim de promover o seu enchimento por capilaridade; (ii) após um curto período de tempo (cerca de 5 a 10 segundos), procedia-se ao enchimento da pipeta pelo topo utilizando uma seringa contendo solução intracelular e anfotericina B (evitava-se desta forma a introdução inicial na ponta da pipeta de uma grande quantidade de solução sem anfotericina B, o que resultaria num aumento do seu tempo de difusão e num atraso impraticável na permeabilização do *patch*).

Todas as soluções eram filtradas no próprio dia de utilização.

Conexão da pipeta ao sistema

O suporte da pipeta (*holder* HL-1-17, Axon Instruments, Inc.), feito em policarbonato, para além de garantir a estabilidade necessária, estabelece a conexão com um tubo que está ligado a uma seringa, de forma a permitir a aplicação da pressão positiva ou negativa ao interior da pipeta. O suporte da pipeta tem inserido um fio de prata cloretado, que em contacto com a solução intracelular forma um eléctrodo de Ag/AgCl.

A pipeta foi cheia apenas com a quantidade de solução necessária para que o fio de prata cloretado ficasse imerso na solução.

2.2.5 Sistema de perfusão

As soluções eram aplicadas através de um sistema de perfusão (Six channel perfusion valve control system VC-77SP e Perfusion Fast-step SF-77B, Warner Instrumens Co.). Este sistema permite um fluxo constante (0,3 mL/min) controlado por gravidade, bem como uma troca muito rápida⁶ de soluções aplicadas na proximidade da célula, possibilitando assim a obtenção de respostas muito rápidas. A troca da solução perfundida consistia em mover um capilar de três vias localizado na proximidade da célula, de forma a que a boca de uma das vias do capilar por onde saia a solução desejada banhasse diretamente a célula.

Na câmara de perfusão (Round coverslip chamber, model RC-25F, Warner Instrumens Co., USA), onde é colocada a lamela com as células isoladas, o nível da solução foi mantido baixo por aspiração da solução a uma velocidade constante utilizando uma bomba peristáltica (Gilson, Inc., Middleton, USA), localizada longe do sistema de registo.

2.2.6 Aquisição e análise de dados

As correntes foram armazenadas num computador através de uma interface Digidata 1200 Interface (Axon Instruments, Inc.).

⁶ Quando a troca de solução ocorre entre 2 dos 3 capilares acoplados e movidos por um motor, a mudança de solução perfundida levava apenas 5 ms; se a troca fosse feita entre 2 vias ligadas à mesma saída do capilar levaria 20 ms.

Material e Métodos

A conversão do sinal analógico para digital ocorreu a uma frequência de amostragem variável, dependente da duração do registo durante cada pulso e do número máximo de pontos de aquisição disponíveis por pulso. Como este último era constante (2048 pontos), definiu-se a duração típica do pulso de forma a maximizar a frequência de amostragem e minimizar a distorção dos dados durante o processo de amostragem. Para a duração normalmente utilizada (200 ms) a frequência de amostragem foi 5 Hz.

O *software* utilizado para definir o protocolo dos pulsos de voltagem e para a aquisição dos dados foi o programa pClamp (Axon Instruments), que possibilitava desenhar e aplicar um dado protocolo, observar o resultado e gravar automaticamente os dados.

Subtração da corrente de fuga

Uma análise correta dos dados requer o isolamento da corrente em estudo, sendo por isso necessário subtrair a corrente de fuga (*leakage*). Esta é normalmente uma pequena corrente de saída, transportada por canais insensíveis à voltagem que não são ativados pelos procedimentos utilizados para ativar os canais em estudo. A corrente de fuga obedece à lei de Ohm, razão por que pode ser calculada a partir da corrente registada a um potencial (normalmente negativo) em que não estão ativas as correntes em estudo.

A subtração da corrente fuga pode ser feita durante a realização da experiência, caso em que os respetivos dados não seriam armazenados, ou após a realização da experiência. Nesta situação o experimentador faz a subtração da componente passiva utilizando os dados armazenados.

A subtração *online* é feita por aplicação de uma rotina incorporada no protocolo de pulsos (“P/N subtraction”), utilizando valores de corrente obtidos a um potencial onde não estejam ativadas as correntes.

Esta rotina não foi utilizada no presente trabalho, optando-se pela subtração *offline*, utilizando-se o programa clampfit (versão 10.2).

Determinação da capacidade da célula e resistência em série

Viu-se anteriormente que o conhecimento da resistência em série é fundamental para avaliar a qualidade do controlo do potencial a que o *patch* de membrana está sujeito.

A resistência em série pode ser calculada a partir dos transientes capacitivos registados na configuração *whole-cell*, tal como se descreve em seguida. Uma vez que a corrente necessária para carregar a capacidade da membrana flui através de R_s (pode considerar-se que esta resistência e o condensador associado à membrana celular constituem um circuito RC), a constante de tempo do processo de carga é dada por

$$\tau = R_s.C_m \text{ (equação 1)}$$

em que C_m representa a capacidade da membrana. Por conseguinte a determinação de R_s implica a medição de τ e a estimativa de C_m . A constante de tempo pode ser medida ajustando a corrente capacitiva em queda a uma função de decaimento mono-exponencial.

Já a capacidade da membrana pode ser estimada por integração da corrente capacitiva, o que permite a determinação direta da carga total Q transferida para as placas do condensador. Tem-se de facto que

Material e Métodos

$$Q = C_m \cdot \Delta V \text{ (equação 2)}$$

em que ΔV representa a magnitude do pulso de voltagem aplicado.

A medição de τ e C_m foi realizada com a ajuda do programa Origin (versão 6).

2.3 Registo intracelular de potencial de membrana

Nesta secção é descrita a metodologia necessária para o estudo das variações de potencial de membrana ao longo do tempo com recurso a um microeléctrodo intracelular.

2.3.1 Soluções

Todas as soluções foram preparadas com água desionizada (resistência superior a $18 \mu\Omega \text{ cm}^{-1}$).

Após dissecação do pâncreas, o tecido era colocado num suporte em solução **IV** (solução Krebs G11, **Tabela 2.1**).

Esta solução é preparada sem CaCl_2 e MgCl_2 (uma vez que Ca^{2+} e Mg^{2+} podem precipitar sob a forma de carbonato de cálcio ou magnésio), dez vezes mais concentrada. No dia da experiência a solução é diluída para a concentração desejada e saturada com 95 % O_2 /5 % CO_2 . Após 30min são adicionados CaCl_2 e MgCl_2 a partir de uma solução *stock* 1 M.

A solução que se encontrava a ser perfundida quando o ilhéu era colocado na câmara de perfusão foi por norma a solução **IV** (solução Krebs G11, **Tabela 2.1**). A mesma solução era usada durante a penetração das células.

Sempre que numa experiência a concentração de glicose era alterada, a nova solução era preparada a partir da solução **IV** (solução Krebs G0, **Tabela 2.1**).

Os fármacos ou toxinas eram adicionados à solução **IV** (normalmente solução Krebs G11, **Tabela 2.1**, excepto quando referido) no momento em que o registo de potencial estava estável.

Alguns fármacos e toxinas eram reconstituídos em DMSO, tendo-se sempre em atenção que posteriormente, após diluição, a percentagem de DMSO na solução de perfusão não deveria exceder os 0,01-0,05 %.

Material e Métodos

As soluções eram continuamente gasificadas e mantidas num banho termostático, com uma temperatura de aproximadamente 37 °C.

No registo intracelular, a célula é penetrada por um microelétrodo de elevada resistência. Isto significa que a pipeta tem condutividade elétrica limitada e que a ponta tem um diâmetro da ordem das dezenas de nanómetros, evitando assim a diluição do citoplasma e a morte celular. Para estabelecer contacto elétrico entre os meios intracelular e extracelular era colocada solução **XI** (**Tabela 2.5**) na pipeta, onde se tinha inserido um fio de prata cloretado. No banho encontrava-se um outro eletrodo, que neste caso consistia num *pellet* que estabelecia o contacto à terra.

Tabela 2.5: Composição da solução de referência interna.

Solução	Composição
XI (referência interna)	(em M): 1.5 KCl, 0.5M C ₆ H ₅ O ₇ K ₃ (pH=7,2, ajustado com NaOH 2 M)

Esta solução era preparada por diluição (50/50 v/v) a partir de soluções *stock* KCl 3 M e de C₆H₅O₇K₃ 1 M, sendo filtrada com um filtro de 0,2 µm e guardada a 4-8 °C durante vários meses.

2.3.2 Montagem experimental

O registo do potencial de membrana pode ocorrer por longos períodos de tempo, sendo por isso necessário assegurar a sua estabilidade, o que implica ter atenção a alguns aspetos técnicos, tal como a manutenção da estabilidade mecânica do sistema, a localização do laboratório e a estrutura do edifício. No nosso caso, o laboratório estava localizado no piso térreo.

O *setup* para registo do potencial de membrana (**Figura 2.6**) pode ser dividido em 3 partes:

1) Componentes que se encontram dentro da gaiola de *Faraday*, fixados com magnetes a um tampo de ferro colocado sobre uma mesa: micromanipulador, câmara de pré-aquecimento, câmara de perfusão, válvulas de comutação de

soluções (*stopcock*) e pré-amplificador. O tampo de ferro e a mesa estavam colocados sobre uma placa composta por uma mistura de borracha com cortiça, a fim de eliminar vibrações.

2) Componentes de iluminação, aquecimento e gasificação de soluções, que eram colocadas fora da gaiola de *Faraday*.

3) Componentes para registo do sinal: amplificador, osciloscópio, gravador digital e registador de papel.

Como foi referido anteriormente, é importante reduzir os níveis de ruído elétrico. Assim, cada um dos componentes referidos em 1) encontrava-se ligado à terra num ponto comum da gaiola de *Faraday*, estando este ponto por sua vez ligado à terra do osciloscópio.

Nas secções seguintes serão desenvolvidas as principais características destes componentes.

Material e Métodos

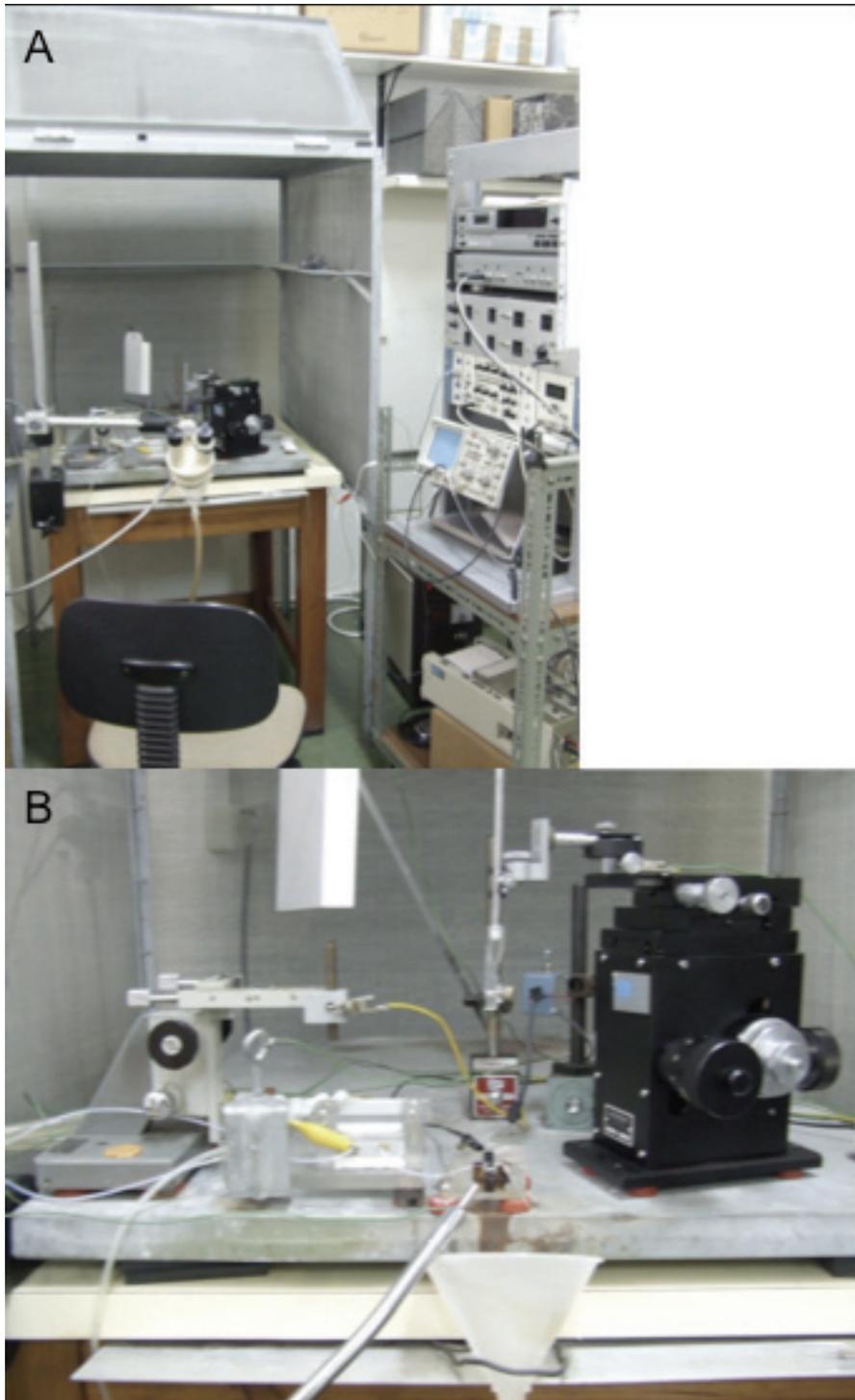


Figura 2.6: Imagem do *setup* para registo do potencial de membrana.

Micromanipulador

O suporte onde se colocava o microelétrodo era posicionado com um micromanipulador. A aproximação da pipeta ao ilhéu era feita com um micromanipulador tridimensional (Narishige MX-1, Tóquio, Japão), sendo o posicionamento fino junto à superfície do ilhéu visualizado através de uma lupa (Wild M5, Suíça). A última aproximação do microelétrodo à célula era visualizada no osciloscópio. De notar ainda que havia cuidado em posicionar a micropipeta paralelamente ao movimento vertical do micromanipulador, já que pequenas pressões causadas na superfície do ilhéu poderiam causar instabilidade no sistema.

Câmara de perfusão

A câmara de perfusão foi escavada num paralelepípedo de *perspex*, tendo 30 μL de volume útil e abertura superior. A câmara era provida com dois acessos para entrada ou saída de soluções. A saída de solução da câmara era feita por transbordo; para minimizar perturbações associadas ao gotejamento foi colocado um capilar à saída da câmara, permitindo que apenas ocorresse a uma certa distância.

A parte frontal da câmara era transparente (lamela) de modo a permitir a visualização do ilhéu e da pipeta.

Tanto o capilar para despejo da solução da câmara como a lamela foram fixadas com *shellac*, uma resina inerte que é sólida à temperatura ambiente, mas que funde com o aquecimento, tornando possível mudar a lamela e o capilar sempre que necessário.

O fundo da câmara foi construído com *perspex* negro de modo a proporcionar o contraste necessário à adequada visualização do ilhéu e do microelétrodo. A base da câmara era constituída por um tapete de silicone, perfeitamente ajustado, que funcionava de suporte aos alfinetes entomológicos que fixavam o ilhéu.

Material e Métodos

Sistema de perfusão

A solução a perfundir entrava na câmara a uma velocidade controlada por gravidade; a altura do banho onde estavam colocados os frascos com as diferentes soluções era ajustada de modo a garantir-se uma velocidade de perfusão entre 1 e 1,8 mL/min, que deveria ser igual nos dois canais do *stopcock*.

Um *stopcock* posicionado junto à câmara, que consistia numa válvula de comutação, com dois canais de entrada e dois canais de saída, permitia a troca das soluções da entrada na câmara. As soluções eram conduzidas por tubos de Teflon. Cada um dos tubos de entrada está, numa das extremidades, mergulhado numa das soluções a perfundir e, na outra, ligado a uma das entradas do *stopcock*; uma das vias de saída do *stopcock* estava ligada à câmara, sendo a outra encaminhada para o lixo. Desta maneira era possível mudar de solução muito rapidamente, com um tempo morto curto e sem introdução de bolhas no sistema de perfusão.

As soluções a perfundir foram mantidas a uma temperatura entre 37,5 e 38 °C num banho termostático (D-3006, GFL, Alemanha), sendo continuamente gasificadas com 95 % O₂/5 % CO₂ para manter o pH a 7,4.

O controlo da temperatura foi crucial, porque abaixo de 37,5-38 °C a quantidade de gás dissolvido aumenta, levando a que este se liberte posteriormente na câmara, provocando instabilidade no microelétrodo. Por outro lado, temperaturas acima de 38 °C também são problemáticas, uma vez que o cálcio precipita na forma de carbonato.

Câmara de pré-aquecimento

Como já foi referido anteriormente a temperatura é um fator importante em todo o processo de obtenção de registos. A temperatura a que as soluções chegam à câmara de perfusão é crítica pois a atividade elétrica é sensível a este parâmetro. Assim, para além de as soluções serem pré-aquecidas antes de atingirem o *stopcock*, também o eram depois, através da colocação de uma câmara de pré-aquecimento entre o *stopcock* e a câmara de perfusão. Esta última tinha no seu interior água aquecida em circulação, onde passava a tubagem com solução de perfusão. A sua

temperatura era controlada em função da temperatura a que a solução chegava à câmara de perfusão, isto é, dependia do fluxo da solução. Por esta razão o fluxo nas duas vias do *stopcock* tinha de ser constante, durante toda a experiência.

A temperatura na câmara de perfusão era verificada com um termopar (HH-80E, Omega Engineering Inc.).

Sistema de iluminação

A boa visualização do ilhéu e do microelétrodo na câmara é essencial para o correto posicionamento deste último, o que por sua vez é indispensável para a obtenção de uma penetração estável. Foi assim utilizado um dispositivo de fibra ótica (Schott Mainz, KL150, Alemanha), localizado fora da gaiola de *Faraday*, com a iluminação dirigida para a câmara de perfusão.

Amplificador

Para além do pré-amplificador, o amplificador utilizado no presente trabalho possuía um circuito de medição diferencial, um circuito de medição não diferencial, um circuito de injeção de corrente e um circuito destinado a facilitar a penetração da célula com o microelétrodo. O pré-amplificador e amplificador principal foram fabricados no laboratório.

No modo não diferencial, utilizado neste trabalho, mediu-se a diferença de potencial entre o microelétrodo de vidro no interior da célula e o eletrodo de referência externo, colocado na câmara de perfusão. O pré-amplificador foi construído com base num circuito seguidor de voltagem, que incluía um amplificador operacional de ganho unitário e com uma elevadíssima resistência de entrada ($10^{14} \Omega$). Assim, a voltagem medida (V) é dada por

$$V = E_m \cdot R / (R + R_e) \text{ (equação 3)}$$

em que E_m representa o potencial de membrana, R a referida resistência de entrada e R_e a resistência do microelétrodo. Tendo em conta que R_e é tipicamente da ordem de grandeza de $100 \text{ M}\Omega$, o potencial de membrana é medido pelo amplificador com um erro negligenciável (inferior a 0,1 %).

2.3.3 Registo do potencial de membrana

Microelétrodos

Para a obtenção de microelétrodo de elevada resistência foram utilizados capilares de vidro (borossilicato; FHC Brunswick, USA) com 2 mm de diâmetro externo e 1 mm de diâmetro interno. As micropipetas depois de serem estiradas num estirador de pipetas (Puller 753, Campden Instruments, Londres), eram cheias com solução de referência interna (solução **XI, Tabela 2.5**), e colocadas num suporte e guardadas num recipiente com ambiente húmido a 4 °C. Este procedimento evitava a formação de cristais na ponta dos microelétrodo.

As micropipetas eram cheias pelo topo com uma seringa de plástico estirada.

Tipicamente os microelétrodo tinham entre 24,5 e 26,5 mm de comprimento (medido desde o ombro até à ponta), o que lhes conferia grande flexibilidade, característica muito importante para a obtenção de registos longos e estáveis; o diâmetro da ponta era inferior a 0,1 µm, necessário para penetrar células β-pancreáticas que têm um diâmetro entre 8 e 12 µm. Desta forma, a resistência dos microelétrodo era muito elevada, variando entre 80 e 140 MΩ.

Para se estabelecer a conexão elétrica era colocado um elétrodo de Ag/AgCl dentro da micropipeta. Este era obtido por revestimento de um fio de prata em solução 0,1 M HCl, durante a noite, com deposição eletrolítica lenta, de forma a garantir um revestimento uniforme de todo o fio. Posteriormente, o potencial era medido em relação a um potencial externo de 0 mV (assegurado por um elétrodo de referência de Ag/AgCl na câmara de perfusão, ligado à terra).

Colocação do ilhéu na câmara de perfusão

O ilhéu, após microdissecação, era transferido para a câmara de perfusão (com solução **IV**, **Tabela 2.1**) com uma pinça, onde era ancorado ao fundo com alfinetes entomológicos; eram normalmente colocados quatro alfinetes a segurar o tecido exócrino, de modo a que a superfície do ilhéu ficasse ligeiramente distendida, mas não sob tensão, de forma a facilitar a penetração pelo microelétrodo.

Penetração da célula

A diferença de potencial ΔE , medida entre o microelétrodo e o eletrodo de referência externo, é aproximadamente dada por

$$\Delta E = E_{\text{ponta}} + E_{\text{jl}} \text{ (equação 4)}$$

em que E_{ponta} representa o potencial de ponta associado às micropipetas de elevada resistência e E_{jl} o potencial de junção líquida entre o eletrólito no interior da pipeta e o eletrólito no meio de perfusão.

Estes potenciais extracelulares podem cancelar-se utilizando o *offset* de voltagem do amplificador, operação que era realizada depois de o ilhéu já estar ancorado na câmara e de o microelétrodo ter sido inserido verticalmente na solução com a ajuda do micromanipulador. Desta forma, após penetração da célula, a diferença de potencial medida representa apenas o potencial de membrana se os potenciais E_{ponta} e E_{jl} não sofrerem alteração.

Ainda com o microelétrodo mergulhado na solução extracelular, procedia-se à medição da sua resistência utilizando um gerador de pulsos de corrente externo ao amplificador. Ou seja, injetava-se uma corrente elétrica na forma de um pulso rectangular (normalmente 0,1 nA) e observava-se no microscópio a deflexão de potencial correspondente; o cálculo da resistência do microelétrodo era efectuado por aplicação da Lei de Ohm.

Em seguida "balanceava-se o microelétrodo" utilizando um circuito de ponte nula. Isto consistia em anular as deflexões induzidas de potencial (excluindo os transientes capacitivos), de forma a ter-se a possibilidade de seguir a evolução da penetração ou de medir a resistência da membrana celular, utilizando-se em ambos os casos um protocolo idêntico de injeção de pulsos.

Material e Métodos

Com a superfície do ilhéu ligeiramente distendida, e o microelétrodo posicionado por cima deste, a primeira penetração era feita recorrendo simplesmente ao micromanipulador, ou seja, descendo o microelétrodo até à cápsula que envolve o ilhéu. Depois de esta ter sido proferida, e caso não fosse penetrada numa célula, o processo poderia ser facilitado recorrendo a um circuito do amplificador (*puncture*), que fazia uso de uma corrente alterna de elevada frequência e amperagem.

Com o microelétrodo dentro de uma célula, o potencial começava a tomar valores negativos, ou seja, a aproximar-se do potencial da célula; com o tempo (minutos) este potencial tornava-se cada vez mais negativo, indicando que se estava a aproximar o ponto em que o microelétrodo estaria completamente selado à membrana com uma corrente de fuga insignificante. No decurso da selagem podia-se injectar corrente DC negativa para manter o interior da célula negativo enquanto a fuga entre a membrana e o microelétrodo fosse elevada, ou a glicose da solução para reduzir o processo excitatório e estabilizar a membrana.

Calibração do sinal

Apesar de se proceder rotineiramente ao *offset* da voltagem no início de cada experiência, registava-se sempre o sinal no final, com o microelétrodo de novo em solução, para confirmar a estabilidade do zero e realizar a calibração. Esta implicava rodar o potenciómetro do *offset* da voltagem de 10 em 10 mV no intervalo entre 0 e -60 mV, ao mesmo tempo que se visualizava o sinal no osciloscópio e se procedia ao registo, quer em papel, quer em cassette.

Se se pretendesse determinar a corrente de entrada da célula era necessário verificar se a resistência do microelétrodo não se tinha alterado durante a experiência.

Gravação e análise do sinal

O sinal foi gravado em cassetes digitais utilizando um gravador DAT (DTR 1404, Biologic, França) e visualizado simultaneamente num osciloscópio (HM205-3, Hameg Gmb, Alemanha) e num registador de papel (Pen oscillograph, 8K31, Nec San-ei Instruments Lta., Tóquio, Japão). A gravação digital foi efetuada a 48 kHz,

permitindo o armazenamento de dados de cerca de duas horas de registo contínuo (equivalente a 1,4 Gb). Os sinais foram depois transferidos em diferido para um computador à frequência de 1 kHz, por intermédio de uma interface D12-IEEE/N (Biologic, França). Na aquisição dos sinais foi utilizado o programa Biomouse 2.3, desenvolvido no laboratório por António Abrunhosa.

O registo em papel permitiu ter uma percepção imediata dos resultados obtidos ao longo das experiências, possibilitando ainda a realização de ajustes nos protocolos experimentais.

2.4 Quantificação da $[Ca^{2+}]_i$ por microscopia de fluorescência

As medições da $[Ca^{2+}]_i$ foram realizadas por microscopia quantitativa de fluorescência utilizando-se o indicador fluorescente FURA-2.

2.4.1 Sonda fluorescente de Ca^{2+}

O FURA-2 é uma molécula que deriva do EGTA, o que lhe confere uma elevada afinidade ao cálcio. A sonda forma complexos 1:1 com o catião. Deste modo, é possível detetar quantitativamente variações da $[Ca^{2+}]_i$ na região dos sub- μ M (Grynkiewicz *et al.*, 1985).

Uma vez que devido às suas cargas negativas a pH fisiológico a molécula FURA-2 não permeia a membrana celular a sua utilização como sonda fluorescente intracelular envolve o precursor acetoximetilado FURA-2/AM. Esta molécula é pouco fluorescente e muito hidrofóbica, atravessando facilmente a membrana; aquando no citoplasma as ligações acetoximetil-éster são hidrolisadas por esterases não específicas, dando origem a FURA-2 (Paredes *et al.*, 2008).

O aumento da concentração de cálcio causa o aumento e diminuição da fluorescência à esquerda e direita do ponto isobéctico (360 nm), respectivamente. Uma vez que é aos comprimentos de onda de excitação de 340 e 380 nm que se observam alterações mais significativas, foram estes os comprimentos de onda escolhidos para monitorizar as variações da $[Ca^{2+}]_i$. A razão das intensidades de fluorescência a 340 (F_{340}) e 380 nm (F_{380}) (isto é, F_{340}/F_{380}) proporciona uma estimativa mais fidedigna da $[Ca^{2+}]_i$, uma vez que é independente da concentração e da sensibilidade do sistema de deteção.

2.4.2 Montagem experimental

As oscilações da $[Ca^{2+}]_i$, registadas em ilhéus de Langherhans isolados, foram obtidas com recurso a um sistema de microfluorescência de dupla excitação Deltascan (PTI, Birmingham, NJ, EUA) associada a um microscópio invertido (Nikon Diaphot, Tokio, Japão).

Sistema de microfluorescência

O sistema pode ser sub-dividido em quatro partes:

- 1) *Produção e seleção da radiação de excitação:* A excitação é conseguida através de uma lâmpada de xénon de 75 W e a radiação emitida atravessa um diafragma até um espelho rotativo. Para evitar a degradação da sonda com o tempo de exposição, existe um obturador colocado antes do diafragma de modo a bloquear o trajecto óptico da radiação. O espelho rotativo divide a radiação em dois feixes, que seguem ordenadamente para os dois monocromadores. Estes permitem seleccionar os comprimentos de onda de excitação e, para além disso, ajustar a largura de banda da radiação de excitação permitindo assim a regulação da intensidade do feixe. A radiação que provém dos monocromadores é depois conduzida por uma fibra óptica até ao microscópio de fluorescência.
- 2) *Deteção da radiação emitida e amplificação do sinal:* A fluorescência é detectada por um fotomultiplicador digital em modo de *single photon counting*. Em relação à voltagem aplicada (750 V) o fotocátodo liberta um electrão primário por cada fóton incidente. Os electrões assim produzidos são acelerados contra os dínodos, que se encontram dispostos em série e são submetidos a uma voltagem crescente. Em condições adequadas, a intensidade da corrente produzida é proporcional à intensidade da radiação incidente.

Material e Métodos

- 3) *Microscópio de fluorescência*: A componente essencial do microscópio invertido consiste no espelho dicróico, posicionado a 45°, que intercepta o feixe de excitação antes deste atingir o ilhéu. O espelho possui um revestimento especial que permite que toda a radiação acima do comprimento de onda de corte (420 nm) seja transmitida, ao mesmo tempo que reflete a radiação de excitação centrada a 340 ou 380 nm em direcção à objetiva de quartzo e, por conseguinte, à amostra em estudo. A fluorescência que é posteriormente emitida pela amostra, é transmitida através da objetiva e do espelho dicróico até um filtro de interferência centrado a 510 nm. Assim, a deteção da fluorescência de interesse pelo fotomultiplicador é conseguida com um mínimo de interferência por radiação espúria.
- 4) *Aquisição do sinal*: É através de uma placa de interface e de um computador que se procede à aquisição do sinal. É também através do computador que se ajustam os comprimentos de onda dos monocromadores e que se procede à abertura ou fecho do obturador. O sinal eléctrico obtido é processado através de *software* específico (DeltaScan, PTI).

Sistema de perfusão

O sistema de perfusão aqui utilizado é em tudo idêntico ao sistema utilizado no registo intracelular do potencial de membrana (secção 2.3.2), tendo-se observado todos os cuidados anteriormente descritos relativos à temperatura das soluções, gasificação e velocidade das soluções de perfusão.



Figura 2.7: Imagem do *setup* de microscopia de fluorescência.

2.4.3 Incorporação celular de FURA-2

A incorporação da sonda era feita simultaneamente em 2-4 ilhéus, os quais tinham sido isolados tal como descrito na secção 2.1.2. Os ilhéus eram incubados numa solução salina de bicarbonato contendo 3 mM glicose, 3 % BSA e FURA-2/AM a uma concentração de 4 μ M, numa incubadora a 37 °C durante cerca de 50 min. Após este período, os ilhéus eram colocados na lamela revestida com poli-L-lisina que constituía o fundo da câmara de perfusão. Os ilhéus eram tipicamente deixados a interagir com a lamela durante cerca de 10 min, de modo a promover interacções electrostáticas entre a lamela e as células e, desta forma, imobilizar os ilhéus durante as experiências.

2.4.4 Aquisição do sinal de fluorescência

A perfusão dos ilhéus era iniciada com solução de Krebs suplementada com 3 mM glicose, que corresponde à condição basal dos ilhéus. O protocolo experimental desejado era aplicado depois de terem decorrido alguns minutos naquelas condições.

Dos 2-4 ilhéus colocados na lamela, era escolhido o que tivesse o rebordo mais bem definido, de menores dimensões e com os maiores níveis de fluorescência.

O ilhéu seleccionado era então colocado no centro do campo de visão do microscópio a fim de ser definida uma região adequada ao registo da fluorescência. À fluorescência cada um dos comprimentos de onda (340 e 380 nm) era subtraída a fluorescência emitida por uma área equivalente na ausência do ilhéu (correção da fluorescência de fundo).

A fluorescência foi monitorizada por observação da evolução temporal da razão F_{340}/F_{380} demorando uma experiência tipicamente entre 20 e 70 minutos.

Após conclusão de todos os registos realizados durante um dia de experiências procedia-se à calibração dos sinais de fluorescência. Só depois era possível converter os sinais adquiridos em níveis de cálcio intracelular.

A análise dos registos obtidos foi efetuada *offline*, após gravação no disco rígido do computador.

2.4.5 Calibração do sinal de fluorescência

Tal como referido anteriormente os sinais de fluorescência eram calibrados regularmente de modo a poder calcular-se a $[Ca^{2+}]_i$. A equação de calibração utilizada foi (Grynkiewicz *et. al.*, 1985):

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \times \frac{(R - R_{\min})}{(R_{\max} - R)} \times \frac{S_{F2}}{S_{B2}} \quad (\text{Equação 5})$$

onde K_d representa a constante de dissociação do complexo FURA-2/ Ca^{2+} , R a razão de fluorescência aos dois comprimentos de onda (F_{340}/F_{380}), R_{\min} o valor de R para FURA-2 não complexado com cálcio, R_{\max} o valor máximo de R para FURA-2 totalmente complexado com o cálcio e S_{F2}/S_{B2} a razão de fluorescência do indicador não ligado (S_{F2}) e do indicador ligado (S_{B2}), com emissão a 380 nm.

Os diferentes parâmetros da equação de calibração foram obtidos regularmente a partir de espectros de excitação de soluções contendo FURA-2 livre e totalmente complexado. É de salientar que estes espectros eram obtidos exactamente nas mesmas condições em que eram realizadas as experiências (por exemplo, voltagem do fotomultiplicador, abertura do diafragma e tamanho do campo).

2.5 Reagentes

Excepto quando indicado em contrário, os reagentes utilizados no decurso do trabalho foram adquiridos à Merk KGaA (Darmstad, Alemanha) e à Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, Mo, USA), todos com pureza analítica.

Em particular, o meio RPMI 1640 (com L-glutamina, sem glicose e bicarbonato e testado para culturas celulares), a albumina sérica bovina (BSA; sem proteases) e a glicose foram adquiridos à Sigma.

Material e Métodos

As toxinas caribdotoxina (CTX), e stromatoxina (ScTx) foram adquiridas à Alomone Labs Ltd. (Jerusalém, Israel). A apamina, iberiotoxina (IbTx) e tetrodotoxina (TTX) foram adquiridas à Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, Mo, USA), Latoxan (Valence, França) e Tocris (Tocris Bioscience, Bristol, Inglaterra), respetivamente.

Os fármacos DCEBIO (5,6-dicloro-etilbenzimidazolona) e penitrem A (PTA) foram adquiridos à Tocris (Tocris Bioscience, Bristol, Inglaterra) e Alomone Labs Ltd. (Jerusalém, Israel), respetivamente.

2.6 Análise estatística

Os resultados referidos no texto principal e figuras são apresentados como os valores médios \pm desvio padrão (s.d.). O significado estatístico da diferença entre os valores médios de dois grupos de dados foi avaliado pelo Teste do *t* de *Student*. A hipótese nula ($\mu_1 = \mu_2$) foi testada contra a hipótese alternativa ($\mu_1 \neq \mu_2$), sendo o resultado expresso em termos da probabilidade *p* de a hipótese nula ser verdadeira.

Capítulo 3

Modulação da atividade elétrica e das oscilações de cálcio intracelular por bloqueadores dos canais BK

Resultados

3.1 Ação de caribdotoxina e penitrem A nos *bursts* de atividade elétrica

3.2 Ação de caribdotoxina, penitrem A e iberiotoxina nas oscilações de Ca^{2+} intracelular

3.3 Ação de caribdotoxina e penitrem A nos potenciais de ação

3. Modulação da atividade elétrica e das oscilações de cálcio intracelular por bloqueadores dos canais BK

3.1 Ação de caribdotoxina e penitrem A nos *bursts* de atividade elétrica

Neste capítulo proceder-se-á fundamentalmente ao estudo do envolvimento de canais BK na geração de potenciais de ação e *bursts* de atividade elétrica da célula β -pancreática, registados com microelétrodos intracelulares em ilhéus microdissecados.

O estudo fisio-farmacológico dos canais BK na célula β -pancreática tem sido marcado por uma aparente discrepância na ação de bloqueadores específicos para aqueles canais. De fato, enquanto que o inibidor peptídico caribdotoxina não pareceu afectar a atividade elétrica registada com microelétrodos intracelulares em ilhéus intactos (isto é, as características dos *bursts* e dos potenciais de ação) (Kukuljan *et al.*, 1991), tanto o inibidor não peptídico de baixo peso molecular paxilina (Houamed *et al.*, 2010) como o inibidor peptídico slotoxina (Jacobson *et al.*, 2010) aumentaram marcadamente a amplitude dos potenciais de ação, registados com pipetas de *patch* no modo de *current-clamp* em ilhéus intactos. Dada a natureza desta técnica de registo, é provável que os efeitos detetados reflitam maioritariamente a ação dos bloqueadores BK em células beta localizadas na periferia do ilhéu.

Modulação da atividade elétrica e das oscilações de cálcio intracelular por bloqueadores dos canais BK

Admitindo a hipótese de que a extensão do efeito de caribdotoxina pode depender criticamente da sua acessibilidade às células, foram realizadas experiências em que a atividade elétrica foi registada a partir de células β -pancreáticas localizadas em camadas muito superficiais do ilhéu. Foi ainda utilizado penitrem A (Asano *et al.*, 2012), um alcalóide indólico hidrofóbico com eficácia comprovada de penetração em tecidos, cuja ação como bloqueador de canais BK será analisada no Capítulo 4.

Para além de investigar os efeitos de caribdotoxina e penitrem A nas características dos potenciais de ação, o outro objetivo principal dos trabalhos descritos neste capítulo consistiu em avaliar os efeitos possíveis daqueles bloqueadores BK nas características dos *bursts* de atividade elétrica. Com exceção do estudo de Houamed e colegas (Houamed *et al.*, 2010), em que é reportada a ausência de efeito de paxilina na dinâmica (duração) dos *bursts* de potenciais de ação, registados com pipetas de *patch* no modo de *current-clamp* em ilhéus intactos, a literatura mais recente continua a ser omissa relativamente à ação de bloqueadores BK na atividade de *bursting*.

A **Figura 3.1 (A)** e a **Figura 3.2 (A)** ilustram a atividade elétrica registada em condições controlo (11 mM glicose, segmentos à esquerda) e na presença de 50 nM caribdotoxina (CTX), tal como é indicado pelas barras horizontais. Os registos foram obtidos em dois ilhéus diferentes a partir de células β -pancreáticas localizadas em camadas muito superficiais.

A atividade elétrica registada no período controlo consiste em fases despolarizadas (ativas) que alternam com fases hiperpolarizadas (silenciosas). Durante as fases ativas é possível observar o disparo de potenciais de ação a partir de um patamar.

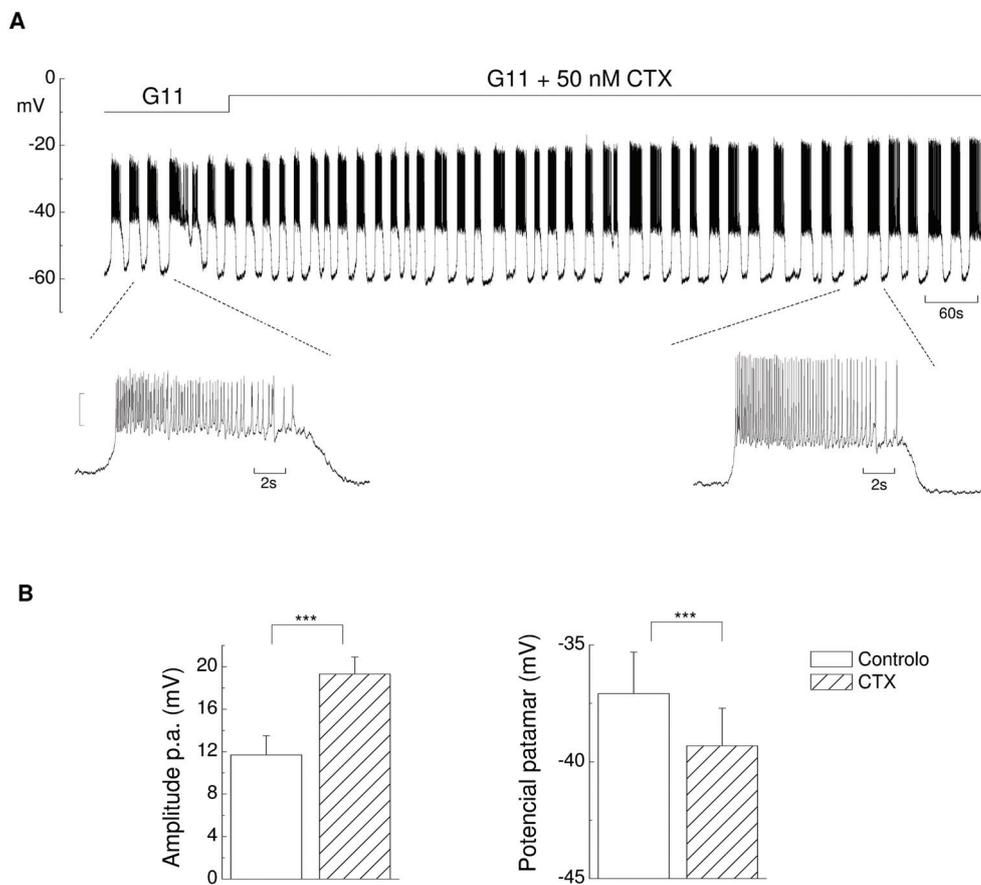


Figura 3.1: Efeitos de caribdotoxina na atividade elétrica oscilatória e nos potenciais de ação (ilhéu 1). (A) Registo do potencial de membrana de uma célula β -pancreática superficial num ilhéu microdissecado, exposto continuamente a 11 mM glicose ("G11"). Caribdotoxina (CTX, 50 nM) foi adicionada e mantida em solução tal como é indicado pela barra horizontal. As expansões temporais mostram um *burst* representativo em cada condição experimental; (B) Efeitos de CTX, ao fim de 10 minutos de aplicação, na amplitude dos potenciais de ação e no potencial de patamar dos *bursts*. Análise do registo ilustrado no painel A. Os valores são apresentados como média \pm desvio padrão (n = 51-60 potenciais de ação). ***, $p < 0,001$.

Modulação da atividade elétrica e das oscilações de cálcio intracelular por bloqueadores dos canais BK

A análise da ação de CTX na atividade elétrica revelou que um dos efeitos mais salientes foi um aumento acentuado da amplitude dos potenciais de ação. A quantificação destes efeitos foi realizada 10 minutos após aplicação da toxina, revelando aumentos de 1,7 vezes e 2,9 vezes relativamente ao controlo para as experiências ilustradas nas **Figuras 3.1 (A)** e **3.2 (A)**, respetivamente (ver gráficos mais à esquerda nas **Figuras 3.1 (B)** e **3.2 (B)**). Num conjunto mais alargado de experiências o aumento médio relativamente ao controlo foi de $1,9 \pm 0,7$ vezes (n=5 ilhéus).

O aumento da amplitude dos potenciais de ação, induzido por CTX, resultou de dois efeitos: (i) os potenciais de ação atingiram valores máximos de potencial de membrana mais positivos na presença da toxina (ver **Figuras 3.1 (A)** e **3.2 (A)**); (ii) tal como se pode observar nos gráficos mais à direita das **Figuras 3.1 (B)** e **3.2 (B)**, os potenciais de ação foram disparados a partir de potenciais de patamar mais negativos na presença de CTX.

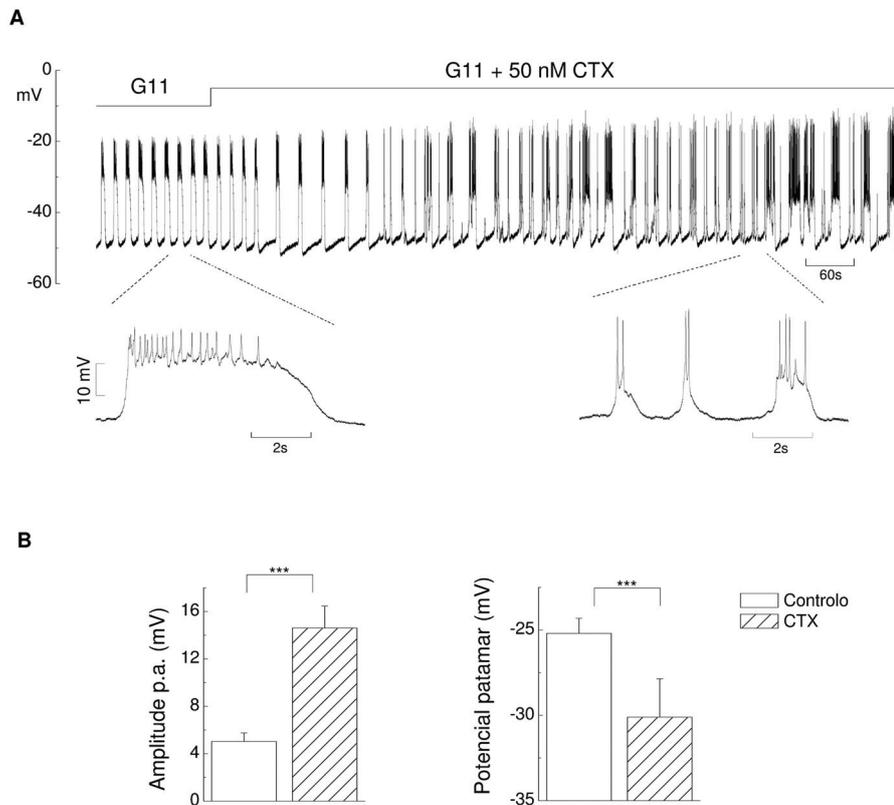


Figura 3.2: Efeito de caribdotoxina na atividade elétrica oscilatória e nos potenciais de ação (ilhéu 2). **(A)** Registo do potencial de membrana de uma célula β -pancreática superficial num ilhéu microdissecado, exposto continuamente a 11 mM glicose ("G11"). Caribdotoxina (CTX, 50 nM) foi adicionada e mantida em solução tal como é indicado pela barra horizontal. As expansões temporais mostram um *burst* representativo em cada condição experimental; **(B)** Efeitos de CTX, ao fim de 10 minutos de aplicação, na amplitude dos potenciais de ação e no potencial de patamar dos *bursts*. Análise do registo ilustrado no painel A. Os valores são apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 20-29$ potenciais de ação). ***, $p < 0,001$.

Modulação da atividade elétrica e das oscilações de cálcio intracelular por bloqueadores dos canais BK

Nas experiências seguintes foi examinada a possibilidade de penitrem A (PTA) poder exercer ações qualitativamente comparáveis às da toxina.

Tal como se pode observar na **Figura 3.3 (A)**, a aplicação de 25 nM PTA hiperpolarizou progressivamente o patamar na base dos potenciais de ação e desviou para valores mais positivos o potencial de membrana no pico dos mesmos. O resultado, apresentado na **Figura 3.3 (B)**, foi um aumento acentuado da amplitude dos potenciais de ação que atingiu um máximo ao fim de 8-10 minutos de exposição a PTA.

Pode ainda observar-se que o aumento da concentração de PTA para 50 nM não potenciou os efeitos ao fim de 10 minutos na presença de 25 nM PTA. De fato, o curso temporal apresentado na **Figura 3.3 (B)** revela que não ocorreram ações adicionais de 50 nM PTA, quer sobre a amplitude dos potenciais de ação quer sobre o potencial de patamar dos *bursts*. Num conjunto mais alargado de experiências realizadas com um protocolo idêntico (n=3 ilhéus), verificou-se que o aumento médio da amplitude relativamente ao controlo, causado por 25 nM e 50 nM PTA, foi de $1,8 \pm 0,6$ vezes para ambas as concentrações.

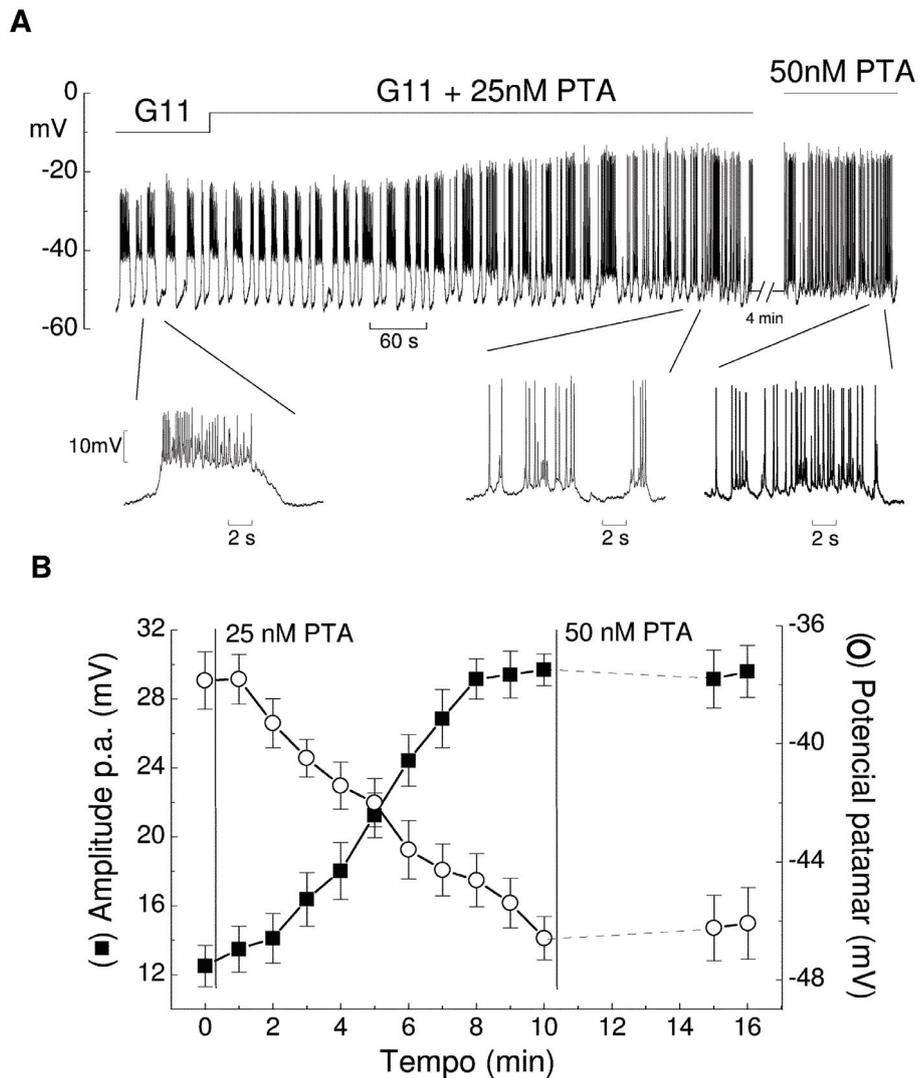


Figura 3.3: Efeito de penitrem A na atividade elétrica oscilatória e nos potenciais de ação. (A) Registo do potencial de membrana de uma célula β -pancreática num ilhéu microdissecado, exposto continuamente a 11 mM glicose ("G11"). Penitrem A (PTA, 25 e 50 nM) foi adicionado e mantido em solução tal como é indicado pelas barras horizontais. A interrupção do registo corresponde a 4 minutos de exposição contínua a 50 nM PTA (representada pelos tracejados no painel B). São também ilustradas expansões temporais de segmentos da atividade elétrica nas várias condições experimentais; **(B)** Análise do curso temporal dos efeitos de 25 e 50 nM PTA na amplitude dos potenciais de ação (quadrados) e no potencial de patamar dos *bursts* (círculos). Dados da experiência ilustrada no painel A. Os valores são apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 15-34$ potenciais de ação).

Modulação da atividade elétrica e das oscilações de cálcio intracelular por bloqueadores dos canais BK

Verificou-se também, nalgumas experiências (por exemplo, nas experiências ilustradas nas **Figuras 3.2 e 3.3**), que tanto CTX como PTA perturbaram a regularidade do padrão oscilatório observado em 11 mM glicose. Nestas experiências a ação dos bloqueadores resultou num padrão "caótico" de *bursting* em que apareceram misturados, de uma forma aparentemente errática, eventos despolarizantes de duração maior e mais curta (incluindo potenciais de ação isolados).

Constatou-se, nas experiências em que o efeito dos bloqueadores foi particularmente "caótico", que estes diminuíram consideravelmente (> 40%) a duração média dos *bursts* em relação ao controlo (11 mM glicose). Foi o caso das experiências 3.2 e 3.3, representadas nas **Figuras 3.4 (A) e 3.4 (B)** por diamantes e quadrados/círculos, respectivamente. No caso das experiências em que os bloqueadores praticamente não afetaram a regularidade das oscilações (ex: experiência ilustrada na **Figura 3.1**, representada na **Figura 3.4 (A)** por triângulos invertidos) o efeito na duração média dos *bursts* foi muito menor (tipicamente < 15%).

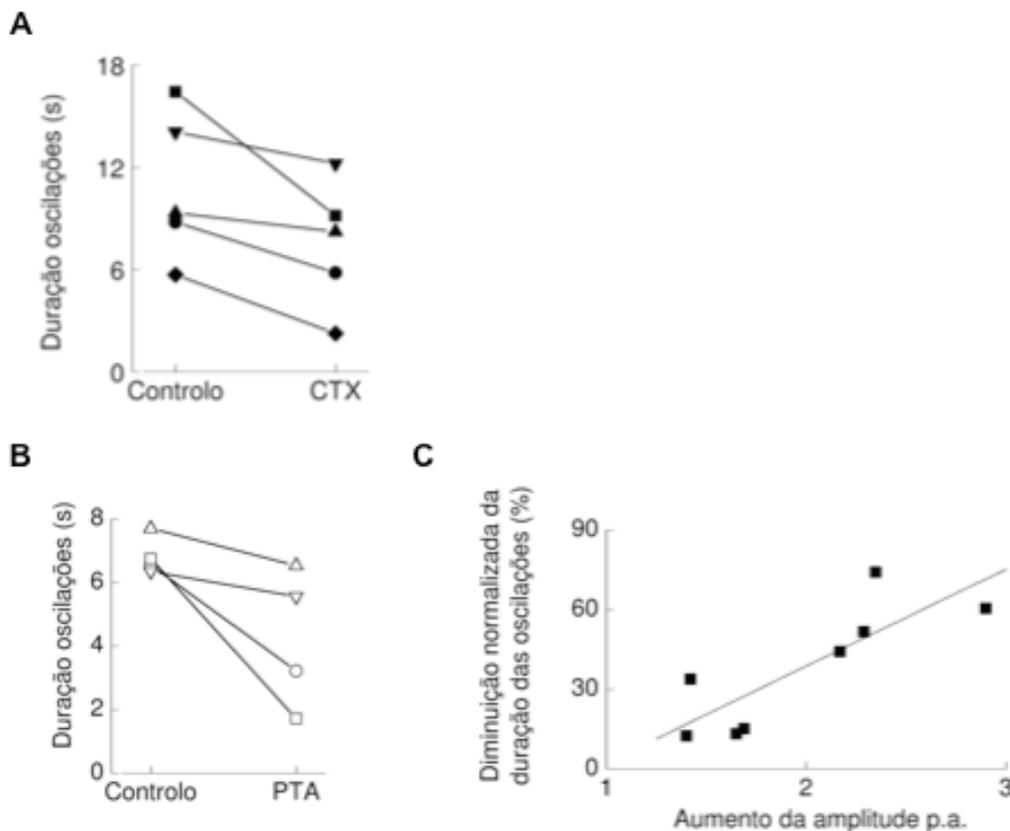


Figura 3.4: Variabilidade dos efeitos de caribdotoxina e penitrem A na duração dos *bursts* de atividade elétrica. **(A)** Efeitos de caribdotoxina (CTX, 50 nM) na duração média dos *bursts* ("duração oscilações"), registados em 5 ilhéus diferentes segundo um protocolo semelhante ao das **Figuras 3.1** e **3.2** ($n = 6-36$ *bursts* para o controlo e CTX, em cada experiência). Dados das experiências ilustradas na **Figura 3.1** (triângulos invertidos) e na **Figura 3.2** (losangos) e de outras experiências similares; **(B)** Efeitos de penitrem A (PTA, 25 e 50 nM) na duração média dos *bursts*, registados em 4 ilhéus diferentes ($n = 8-24$ *bursts* para o controlo e PTA, em cada experiência). Dados da experiência ilustrada na **Figura 3.3** (quadrados e círculos) e de outras experiências similares. Em cada experiência a duração média dos *bursts* foi determinada no controlo (11 mM glicose) e aproximadamente ao fim de 10 minutos de aplicação de CTX (painel A) ou PTA (painel B). As barras de erro não foram inseridas por razões de clareza de representação gráfica (todas as diferenças foram estatisticamente significativas ao nível de confiança de 95-99,9 %, com exceção das experiências representadas por triângulos normais e triângulos invertidos vazios); **(C)** Correlação entre os efeitos de CTX e PTA (25 e 50 nM) na duração média dos *bursts* e na amplitude média dos potenciais de ação (ver texto principal). Os valores da duração foram extraídos dos gráficos nos painéis A e B. A linha reta representa o melhor ajuste dos dados a uma função linear ($r=0,82$).

Modulação da atividade elétrica e das oscilações de cálcio intracelular por bloqueadores dos canais BK

Independentemente da extensão do efeito, tanto CTX como PTA reduziram a duração média dos *bursts*, tal como se pode verificar na **Figura 3.4 (A)**, em que são apresentados os efeitos de 50 nM CTX em 5 ilhéus, bem como na **Figura 3.4 (B)** em que são apresentados os efeitos de 25 e 50 nM PTA em 4 ilhéus. A duração de cada *burst* foi determinada como o tempo que decorreu entre o disparo do primeiro potencial de ação e a meia altura da fase descendente (repolarização final do *burst*).

Tal como se mostra na **Figura 3.4 (C)**, verificou-se existir uma correlação entre o efeito dos bloqueadores na duração média dos *bursts* e o efeito na amplitude média dos potenciais de ação. O efeito na duração foi expresso em termos da diminuição normalizada da duração média, $100(\Delta t_c - \Delta t_T)$, em que Δt_c e Δt_T representam a duração média nos períodos controlo (11 mM glicose) e teste (CTX e PTA), respetivamente. O efeito na amplitude dos potenciais de ação foi expresso em termos da razão h_T/h_c , em que h_T e h_c representam a amplitude média nos períodos controlo e teste, respetivamente.

Considerando que o efeito na amplitude dos potenciais de ação reflete apertadamente a extensão do bloqueio dos canais BK (ver Discussão), os resultados sugerem que a disrupção manifesta do padrão regular da atividade oscilatória pressupõe o bloqueio de uma fração crítica daqueles canais.

3.2 Ação de caribdotoxina, penitrem A e iberiotoxina nas oscilações de Ca^{2+} intracelular

O aumento da amplitude dos potenciais de ação, causado por exposição aos bloqueadores BK, pode refletir um incremento do fluxo de Ca^{2+} através de canais de cálcio sensíveis à voltagem, com o correspondente aumento da amplitude das oscilações da $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Esta hipótese foi investigada na presente secção, recorrendo a medições da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por microscopia quantitativa de fluorescência em ilhéus isolados envolvendo a sonda fluorescente fura-2.

Na presença de 11 mM glicose os ilhéus exibiram um padrão de oscilações da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bastante regular e com uma frequência comparável à dos *bursts* (**Figura 3.5 (A)**, registo superior), refletindo uma relação estreita entre os dois fenómenos oscilatórios (Santos et al., 1991).

O efeito da aplicação de 50 nM CTX ao fim de 8-12 minutos é também ilustrado na **Figura 3.5 (A)** (registo inferior). É visível que a toxina teve um efeito acentuado em diferentes parâmetros das oscilações, cuja análise é apresentada na **Figura 3.5 (B)**. Por exemplo, ao contrário do que se poderia antecipar, observou-se que CTX reduziu a amplitude das oscilações em aproximadamente 16 %; nas várias experiências realizadas com o mesmo protocolo a redução média foi de 27 ± 13 % ($n = 3$ ilhéus).

Modulação da atividade elétrica e das oscilações de cálcio intracelular por bloqueadores dos canais BK

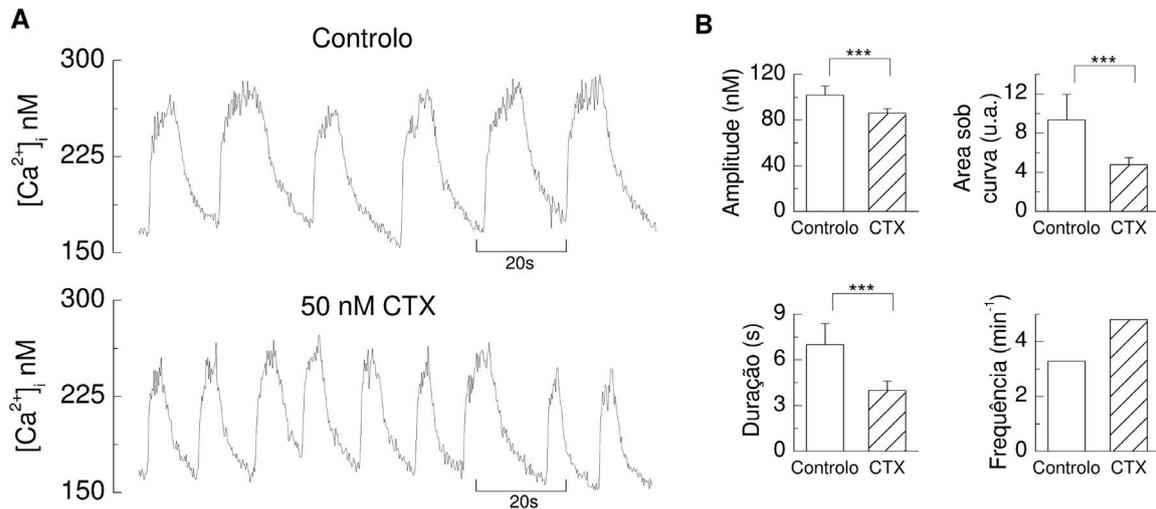


Figura 3.5: Efeito de caribdotoxina nas oscilações de Ca²⁺ induzidas por glicose. A concentração de Ca²⁺ intracelular livre ([Ca²⁺]_i) foi registada por microscopia de fluorescência num ilhéu isolado, utilizando a sonda Fura-2. **(A)** Registos representativos, obtidos na situação controlo (11 mM glicose) e ao fim de aproximadamente 10 minutos de exposição a 50 nM caribdotoxina (CTX) na presença continuada de 11 mM glicose; **(B)** Efeitos de CTX, ao fim de 10 minutos de aplicação, na frequência, amplitude e duração média das oscilações. É também mostrado o efeito na média da área sob a curva por oscilação (em unidades arbitrárias, "u.a."), calculada pelo integral do sinal ao longo de uma oscilação. Análise da experiência ilustrada no painel A. Os valores são apresentados como média ± desvio padrão (n = 7-9 oscilações). ***, p < 0,001.

Por outro lado, de forma consistente com o observado na atividade elétrica, CTX reduziu a duração das oscilações em cerca de 43 % (a redução média observada nas várias experiências foi de 46 ± 14 %, $n = 3$ ilhéus). Não surpreende, por conseguinte, que a área sob a curva por oscilação (ASC), calculada pelo integral do sinal ao longo de uma oscilação, tivesse sido reduzida em 49 % (redução média: 55 ± 14 %, $n = 3$ ilhéus).

Pode considerar-se que o produto da área sob a curva pela frequência das oscilações (f_{osc}) reflete a " $[Ca^{2+}]_i$ efetiva média", constituindo portanto uma grandeza potencialmente útil para prever o efeito de CTX na secreção de insulina. Na experiência da **Figura 3.5** a toxina aumentou f_{osc} 1,5 vezes relativamente ao controlo (aumento médio de $1,6 \pm 0,5$ vezes, $n = 3$ ilhéus). Assim, nesta experiência $ASC \times f_{osc}$ sofreu uma redução de cerca de 25 % (redução média de 30 ± 6 %, $n = 3$ ilhéus).

Modulação da atividade elétrica e das oscilações de cálcio intracelular por bloqueadores dos canais BK

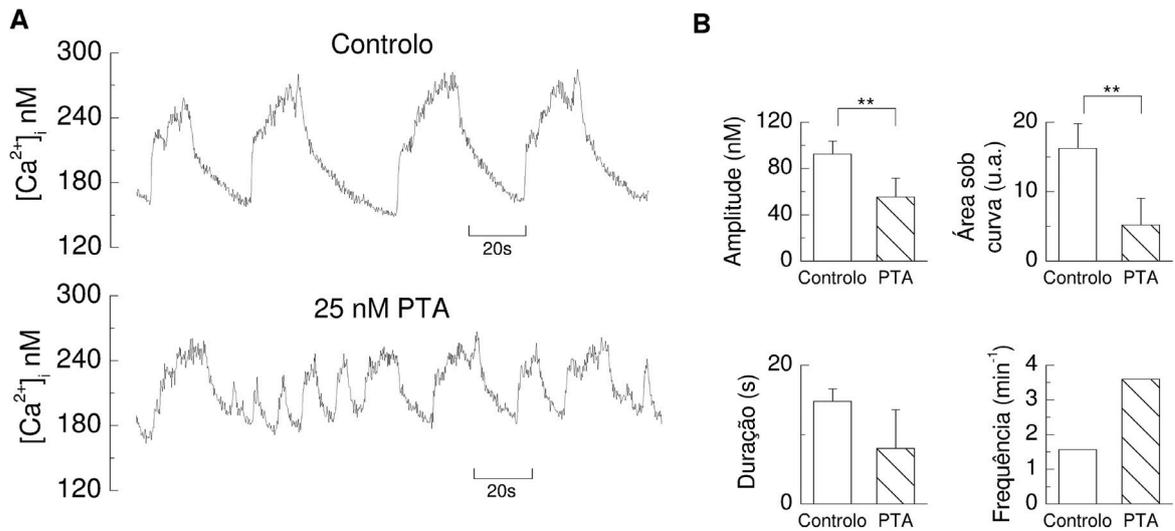


Figura 3.6: Efeito de penitrem A nas oscilações de Ca²⁺ induzidas por glicose. A concentração de Ca²⁺ intracelular livre ([Ca²⁺]_i) foi registada por microscopia de fluorescência num ilhéu isolado, utilizando a sonda Fura-2. **(A)** Registos representativos, obtidos na situação controlo (11 mM glicose) e ao fim de aproximadamente 10 minutos de exposição a 25 nM penitrem A (PTA) na presença continuada de 11 mM glicose; **(B)** Efeitos de PTA, ao fim de 10 minutos de aplicação, na frequência, amplitude e duração média das oscilações. É também mostrado o efeito na média da área sob a curva por oscilação (em unidades arbitrárias, "u.a."), calculada pelo integral do sinal ao longo de uma oscilação. Análise da experiência ilustrada no painel A. Os valores são apresentados como média ± desvio padrão (n = 7-19 oscilações). **, p<0,01.

Verificou-se que 25 nM PTA teve um efeito semelhante a CTX nos vários parâmetros das oscilações da $[Ca^{2+}]_i$, tal como se exemplifica na **Figura 3.6**. De fato, o bloqueador reduziu a amplitude e duração das oscilações em 40 % e 46 %, respectivamente (reduções médias de 26 ± 22 % e 64 ± 15 %, respetivamente; $n = 4$ ilhéus). Este último resultado é consistente com o efeito observado na duração dos *bursts*. PTA reduziu ainda a área sob a curva por oscilação em 68 % (redução média de 74 ± 9 %, $n = 4$ ilhéus) e aumentou a frequência das oscilações 2,3 vezes (aumento médio de $2,3 \pm 0,1$ vezes, $n = 4$ ilhéus), causando uma redução de 26 % de $ASC \times f_{osc}$ (redução média de 40 ± 20 %, $n = 4$ ilhéus).

Pode também observar-se, na experiência ilustrada na **Figura 3.6 (A)**, que a exposição do ilhéu a PTA diminuiu a regularidade das oscilações da $[Ca^{2+}]_i$. Este resultado é consistente com a ação do bloqueador na atividade elétrica oscilatória.

Modulação da atividade elétrica e das oscilações de cálcio intracelular por bloqueadores dos canais BK

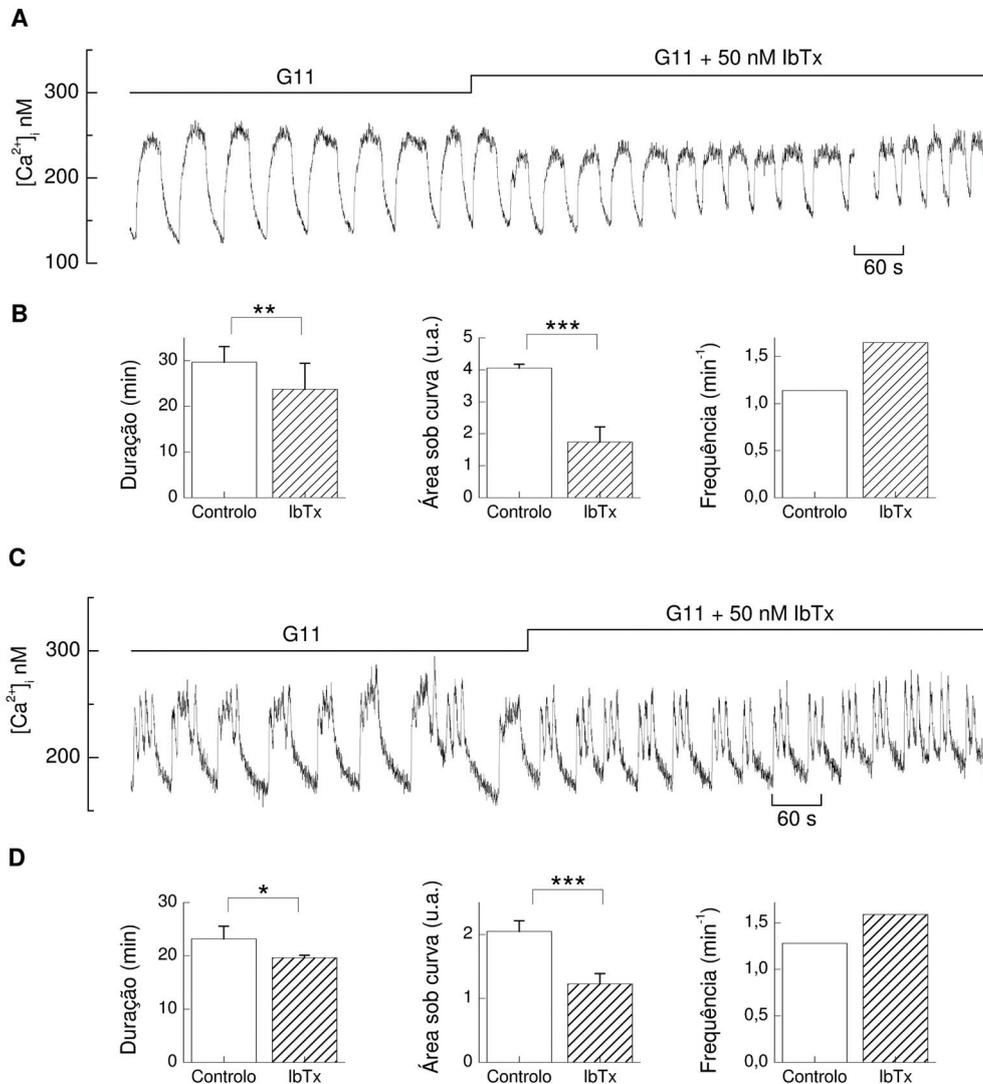


Figura 3.7: Efeitos de iberiotoxina nas oscilações de Ca^{2+} induzidas por glicose. A concentração de Ca^{2+} intracelular livre ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) foi registada por microscopia de fluorescência em dois ilhéus isolados (A-B: ilhéu 1; C-D: ilhéu 2), utilizando a sonda Fura-2. **(A)** Registo da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ no primeiro ilhéu, exposto continuamente a 11 mM glicose ("G11"). Iberiotoxina (IbTx, 50 nM) foi adicionada e mantida em solução tal como é indicado pela barra horizontal; **(B)** Efeitos de IbTx, ao fim de 10 minutos de aplicação, na frequência e duração média das oscilações. É também mostrado o efeito na média da área sob a curva por oscilação (em unidades arbitrárias, "u.a."), calculada pelo integral do sinal ao longo de uma oscilação. Análise da experiência ilustrada no painel A. Os valores são apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 5-26$ oscilações); **(C)** O mesmo que no painel A para o segundo ilhéu; **(D)** O mesmo que no painel B para o segundo ilhéu ($n = 4-15$ oscilações). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

Finalmente, foi testado o efeito de 50 nM iberiotoxina (IbTx), um inibidor específico de canais BK (Ghatta *et al.*, 2006), nas oscilações da $[Ca^{2+}]_i$, registadas em dois ilhéus estimulados com 11 mM glicose.

A **Figura 3.7 (A) e (C)** mostra que IbTx reduziu a amplitude das oscilações em ambos os casos, sendo o efeito quase imediato e, portanto, muito mais rápido do que os efeitos homólogos de CTX e PTA.

No que respeita aos demais parâmetros das oscilações os efeitos de IbTx também foram semelhantes aos de CTX e PTA, tal como é ilustrado na **Figura 3.7 (B) e (D)**. De fato, a toxina reduziu a duração das oscilações em 15-20 %. IbTx reduziu ainda a área sob a curva por oscilação em 40-57 % e aumentou a frequência das oscilações 1,2-1,5 vezes, causando uma redução de 44-54 % de $ASC \times f_{osc}$.

Deve sublinhar-se neste ponto que todos os bloqueadores BK utilizados reduziram a intensidade média do sinal de cálcio, permitindo prever um efeito inibidor na secreção de insulina induzida por glicose. Com uma exceção (Houamed *et al.*, 2010), este efeito inibidor foi de facto observado noutros estudos (Braun *et al.*, 2008; Dufer *et al.*, 2011).

3.3 Ação de caribdotoxina e penitrem A nos potenciais de ação

Numa tentativa de resolver a aparente contradição entre a ação de CTX e PTA na amplitude dos potenciais de ação (ver **Figuras 3.1, 3.2 e 3.3**) e na amplitude das oscilações da $[Ca^{2+}]_i$ (ver **Figuras 3.5 e 3.6**), recorreu-se a uma análise mais pormenorizada do efeito daqueles bloqueadores nas características dos potenciais de ação, tendo-se dado ênfase às seguintes condições: (i) fase inicial ($< 1s$) do disparo de potenciais de ação dentro de cada *burst* (experiências com CTX); (ii) disparo contínuo de potenciais de ação na presença do bloqueador de canais K_{ATP} tolbutamida (experiências com PTA). Os ilhéus foram continuamente estimulados com 11 mM glicose em ambos os casos.

Tal como se descreve a seguir, estas análises revelaram efeitos pronunciados de CTX e PTA noutros parâmetros dos potenciais de ação para além da amplitude (já considerada anteriormente), designadamente a velocidade de despolarização máxima ao longo da fase ascendente (determinada por derivação do potencial de membrana em ordem ao tempo), a velocidade de repolarização máxima ao longo da fase descendente (igualmente determinada por derivação em ordem ao tempo), a duração (tempo decorrido entre o ponto de meia-subida e o ponto de meia-descida), a hiperpolarização pós-potencial (HHP, isto é, a diferença entre o potencial limiar de disparo e o potencial mais negativo que é atingido imediatamente após repolarização) e o intervalo de tempo entre potenciais de ação consecutivos.

A **Figura 3.8 (A)** ilustra dois potenciais de ação com potenciais limiar idênticos, registados no início de um *burst* na presença e ausência de 50 nM CTX. Pode verificar-se que a aplicação da toxina aumentou a velocidade de despolarização ao longo da fase ascendente, tendo a velocidade máxima aumentado 2,5 vezes de acordo com a análise apresentada na **Figura 3.8 (B)** para o mesmo ilhéu (aumento médio de $1,8 \pm 0,6$ vezes, $n = 4$ ilhéus). Este resultado é consistente com o fato de os canais BK exibirem uma cinética de ativação mais rápida relativamente aos canais de K^+ retificadores tardios (Braun et al., 2008).

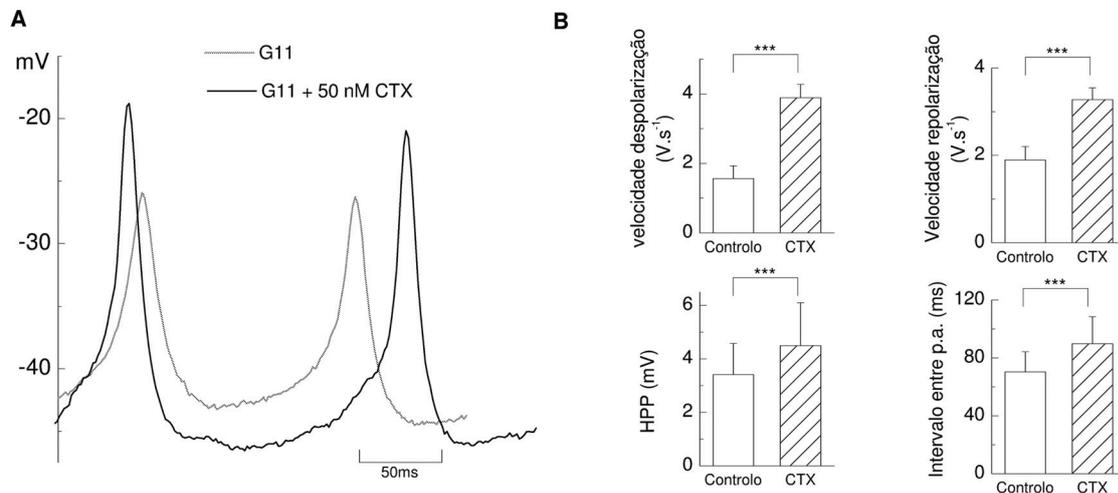


Figura 3.8: Efeitos de caribotoxina em diferentes parâmetros dos potenciais de ação. Um ilhéu foi exposto a 11 mM glicose ("G11") e a 50 nM caribotoxina (CTX) na presença contínua de glicose. **(A)** Exemplos de potenciais de ação com potenciais limiar idênticos, registados no início (< 1s) dos *bursts* na presença e ausência de CTX; **(B)** Efeitos de CTX na velocidade máxima de despolarização ao longo da fase ascendente dos potenciais de ação, velocidade máxima de repolarização ao longo da fase descendente, HPP (hiperpolarização pós potencial (AHP)) e intervalo de tempo entre potenciais de ação consecutivos. Dados da experiência ilustrada na **Figura 3.1**, relativos a potenciais de ação disparados na fase inicial dos *bursts* na presença e ausência ("controlo") de CTX (10 minutos de exposição). Os valores são apresentados como média ± desvio padrão (n = 38-55 potenciais de ação de 5-6 *bursts* para cada condição). ***, p<0,001.

Modulação da atividade elétrica e das oscilações de cálcio intracelular por bloqueadores dos canais BK

No que diz respeito à velocidade de repolarização máxima dos potenciais de ação também se observou um aumento, neste caso de 1,7 vezes (aumento médio de $1,5 \pm 0,3$ vezes, $n = 4$ ilhéus). Este efeito pode explicar-se assumindo que a intensificação da despolarização aumenta as correntes K_v (ver Discussão).

Apesar de não ter sido representada na **Figura 3.8 (B)**, a consequência do aumento das velocidades de despolarização e repolarização foi uma redução estatisticamente significativa da duração dos potenciais de acção (20 %, $p < 0,001$) que, contudo, mostrou ser altamente variável de ilhéu para ilhéu (média de 0,1 %, com valores entre -20 % e + 20%).

Pode ainda verificar-se (**Figura 3.8 (B)**) que a aplicação de CTX aumentou a AHP em 32 % (aumento médio de 36 ± 30 %), resultando num aumento de 28 % do intervalo de tempo entre potenciais de ação (aumento médio de 118 ± 81 %, $n = 4$ ilhéus). Não surpreende, por conseguinte, que a frequência de disparo de potenciais de ação tenha diminuído cerca de 44 % ($6 \pm 3 \text{ s}^{-1}$ na presença de CTX vs. $10 \pm 2 \text{ s}^{-1}$ no controlo, $n = 4$ ilhéus).

É pois provável que o decréscimo da amplitude das oscilações da $[\text{Ca}^{2+}]_i$, causado pelos bloqueadores BK, tenha por base uma diminuição global do fluxo de Ca^{2+} associada à redução da frequência de disparo.

A exposição a 500 μM tolbutamida despolarizou a membrana da célula β -pancreática e induziu um padrão de disparo contínuo de potenciais de ação, tal como se ilustra na **Figura 3.9 (A)**. Nestas condições PTA aumentou a amplitude dos potenciais de ação 1,8 vezes e tornou mais negativo o potencial de patamar (**Figura 3.9 (B)**), em consonância com o observado na ausência da sulfonilureia (ver **Figura 3.3**).

Os efeitos de PTA nos outros parâmetros dos potenciais de ação foram também semelhantes aos efeitos de CTX anteriormente descritos, observados durante a fase inicial dos *bursts*. Assim, PTA aumentou as velocidades máximas de despolarização e repolarização (1,7 vezes em ambos os casos), originando ainda aumentos da AHP (8 %) e do intervalo de tempo entre potenciais de ação (32 %). Observou-se, conseqüentemente, uma diminuição de 32 % da frequência de disparo de potenciais de ação (de 7,4 s^{-1} no controlo para 5,8 s^{-1} na presença de PTA).

Modulação da atividade elétrica e das oscilações de cálcio intracelular por bloqueadores dos canais BK

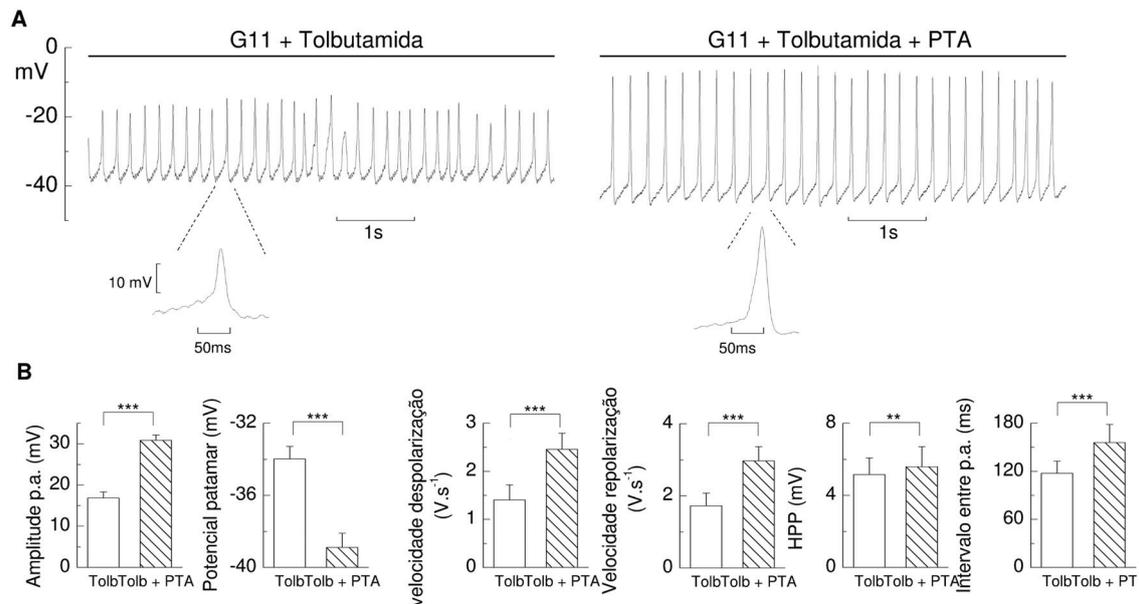


Figura 3.9: Efeitos de penitrem A em diferentes parâmetros de potenciais de ação em células despolarizadas com tolbutamida. **(A)** Registos representativos de um ilhéu exposto a 11 mM glicose ("G11") + 500 μ M tolbutamida (controlo, esquerda) e glicose + tolbutamida + penitrem A (PTA, 10 minutos). As expansões temporais mostram um potencial de ação representativo de cada condição experimental; **(B)** Os potenciais de ação foram analisados em termos de amplitude e potencial de patamar, bem como dos vários parâmetros na **Figura 3.8**, na presença (10 minutos) e ausência de PTA. Os valores são apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 86$ -137 potenciais de ação para cada condição). **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

Capítulo 4

Correntes de K⁺ mediadas por canais BK

Resultados

4.1 Estudos em células BRIN-BD11

4.2 Estudos em células β -pancreáticas isoladas

4. Correntes de K⁺ mediadas por canais BK

Neste capítulo avaliou-se a sensibilidade da corrente de K⁺ ao bloqueador não-peptídico de canais BK penitrem A (PTA) (Knaus *et al.*, 1994; Asano *et al.*, 2012), extensamente utilizado no Capítulo 3 como putativo bloqueador de canais BK da célula β -pancreática. Deu-se ênfase ao estudo comparativo da ação de PTA e da toxina de escorpião iberiotoxina, um inibidor prototípico de canais BK sem ações colaterais conhecidas (Galvez *et al.*, 1990; Ghatta *et al.*, 2006). É relativamente recente o estudo em que iberiotoxina foi utilizada para isolar correntes BK na célula β humana (Braun *et al.*, 2008), não tendo ainda sido mostrado o seu efeito na célula β de roedores.

As correntes foram quase exclusivamente medidas por *patch-clamp* no modo de *whole-cell*, expondo as células a bloqueadores de outros canais na tentativa de facilitar a dissecação de correntes BK. Esta optimização metodológica, que envolveu vários aspetos não relacionados com a utilização de fármacos, foi efectuada recorrendo a células BRIN-BD11, uma linha celular secretora de insulina obtida por electrofusão de células normais de rato com células tumorais RINm5F (McClenaghan & Flatt, 1999). O laboratório onde este trabalho foi realizado tem experiência demonstrada com o manuseamento e utilização de células BRIN-BD11 para o estudo de problemas de acoplamento estímulo-secreção (Salgado *et al.*, 1999; Salgado *et al.*, 2000).

No final do Capítulo proceder-se-á à discussão específica dos resultados, de forma a facilitar a Discussão geral.

4.1 Estudos em células BRIN-BD11

4.1.1 Dissecação de correntes e optimização das condições de registo

As células foram tipicamente estimuladas com séries de pulsos retangulares de potencial de magnitude crescente no intervalo entre - 80 e + 60 mV a partir de um potencial de *holding* (V_h) de - 90 mV, tal como é ilustrado na **Figura 4.1 (A)**. A magnitude dos pulsos teste foi incrementada de 10 em 10 mV ao longo do tempo, muito embora para efeitos de representação gráfica apareçam sobrepostos.

Correntes de K⁺ mediadas por canais BK

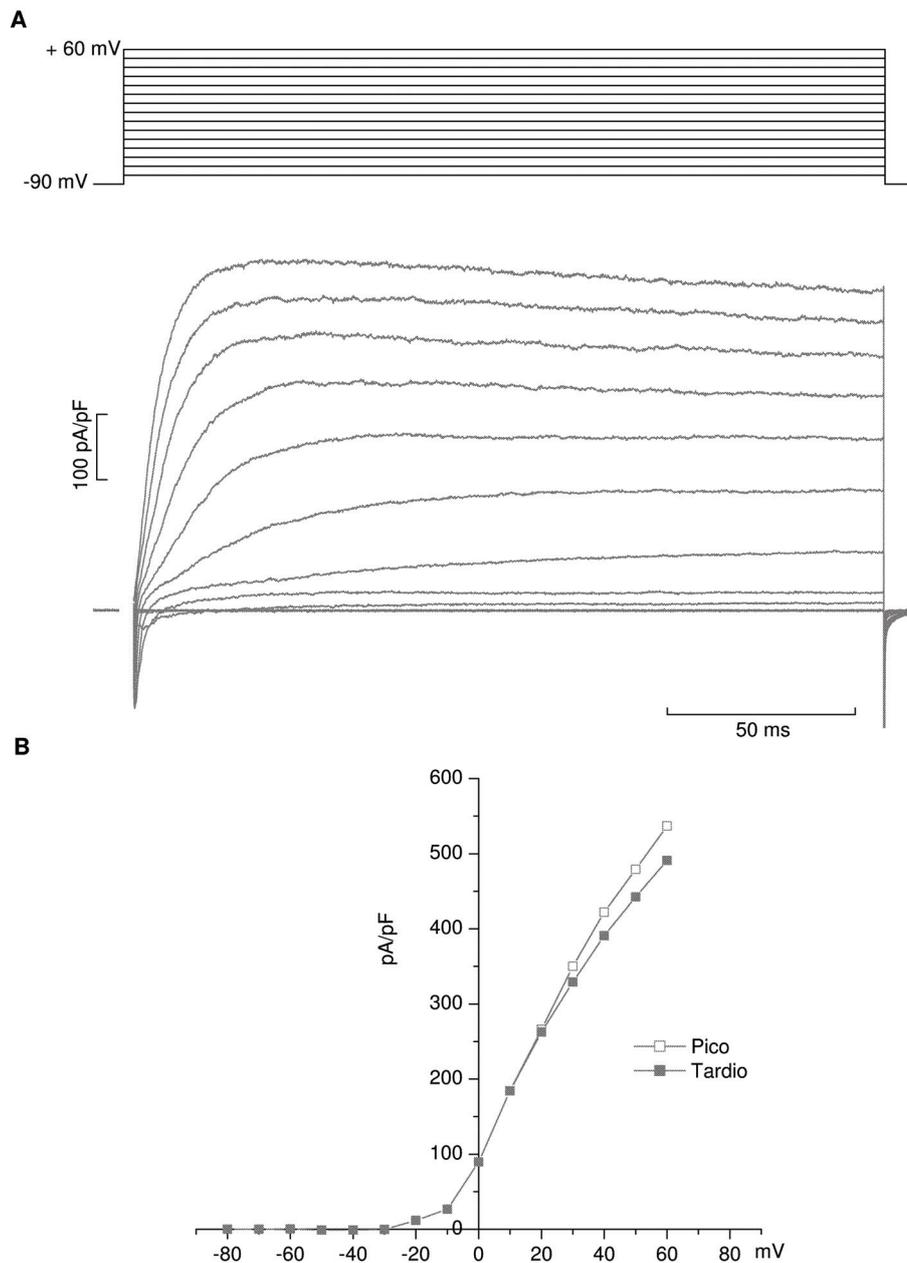


Figura 4.1: Correntes totais em células BRIN-BD11. As correntes foram registadas por *patch-clamp* na configuração *whole-cell*, utilizando as soluções **F** (5 mM K⁺ e 2,6 mM Ca²⁺) e **B** (157 mM K⁺, 88 nM Ca²⁺) como soluções extracelular e intracelular (pipeta), respectivamente (ver **Tabela 2.4** em Material e Métodos). A célula foi continuamente exposta a 500 μ M tolbutamida e 11 mM glicose. **(A)** Exemplos de correntes totais, obtidas em resposta a pulsos retangulares de potencial (200 ms) de magnitude crescente (incrementos de 10 mV) no intervalo entre - 80 e + 60 mV a partir de $V_h = - 90$ mV, tal como é ilustrado no diagrama; **(B)** Curvas I/V obtidas a partir dos registos do painel **A**, tendo as correntes sido medidas quando atingiram o valor máximo (pico, quadrados vazios) e aos 200 ms (tardio, quadrados a cheio).

A aplicação de um pulso despolarizante produziu uma corrente total multifásica, normalmente constituída por uma componente de entrada (negativa) e por uma corrente de saída (positiva). A primeira, muito rápida e de natureza transitória, será considerada mais à frente nesta secção. As correntes de saída eram nulas para potenciais aplicados mais negativos que - 30 mV, aumentando a sua amplitude consistentemente com o potencial para valores mais positivos até ao limite do intervalo (+ 60 mV).

Pode ainda verificar-se na **Figura 4.1 (A)** que a ativação das correntes de saída era tanto mais rápida quanto mais se aumentava a magnitude do pulso teste. Até um potencial aplicado de cerca de + 20 mV as correntes evoluíam monotonicamente para um patamar, ao passo que para potenciais mais positivos atingiam um máximo e decaíam subseqüentemente de uma forma lenta ao longo do pulso. Para os potenciais mais positivos a corrente máxima (pico) era normalmente atingida aos 30-50 ms.

A **Figura 4.1 (B)** ilustra as relações corrente-voltagem (curvas I/V) para a experiência ilustrada no painel A, tendo as correntes sido medidas no pico e na fase final (200 ms). Ambas as curvas atestam uma elevada sensibilidade à voltagem no intervalo 0/+60 mV, embora com tendência para encurvar negativamente (menores aumentos da corrente para idênticos incrementos de voltagem) de uma forma cada vez mais pronunciada à medida que o potencial aplicado aumenta.

O TEA⁺ é um conhecido bloqueador de canais K_v e BK (Bokvist *et al.*, 1990b, a), podendo ser utilizado para avaliar o envolvimento de canais de K⁺ nas correntes totais. Os canais BK são mais sensíveis a TEA⁺, razão por que concentrações mais baixas (alguns mM) bloqueiam quantitativamente canais BK ao mesmo tempo que afetam uma fração relativamente pequena de canais K_v.

A **Figura 4.2 (A)** ilustra o efeito de 2 mM TEA⁺ nas correntes totais, registadas numa célula BRIN-BD11 segundo um protocolo idêntico ao anteriormente descrito. TEA⁺ inibiu substancialmente as correntes, sendo provável que as correntes registadas na presença do fármaco reflitam principalmente a ativação de canais K_v. Foram observadas inibições acentuadas das correntes por 2 mM TEA⁺ em 3 experiências similares.

Correntes de K⁺ mediadas por canais BK

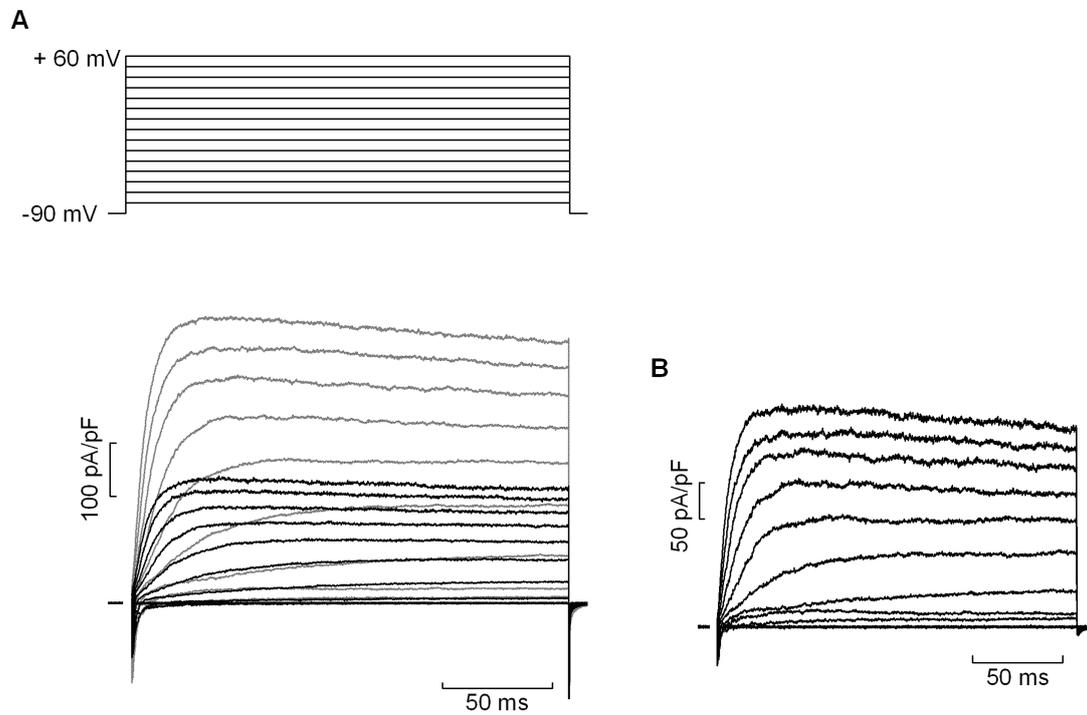


Figura 4.2: Efeito de 2 mM TEA⁺ nas correntes totais em células BRIN-BD11. **(A)** Correntes observadas em resposta a pulsos retangulares de potencial no intervalo entre - 80 e + 60 mV a partir de $V_h = - 90$ mV (diagrama), na presença (traços a negro) e ausência (traços a cinzento) de 2 mM TEA⁺. As correntes foram registadas segundo um protocolo idêntico ao da experiência ilustrada na **Figura 4.1**; **(B)** Correntes sensíveis a 2 mM TEA⁺, obtidas por subtração das correntes registadas na presença do fármaco às correntes registadas na sua ausência.

As correntes sensíveis a 2 mM TEA⁺ são representadas na **Figura 4.2 (B)**, tendo sido obtidas por subtração das correntes registadas na presença do fármaco às correntes registadas na sua ausência (controlo). É pois plausível que, relativamente ao controlo, as correntes sensíveis a 2 mM TEA⁺ tenham uma contribuição relativa maior de correntes mediadas por canais BK, podendo mesmo refletir exclusivamente a ativação destes últimos. Deve salientar-se o fato de estas correntes manterem o perfil de decaimento ao longo do pulso anteriormente observado para as correntes controlo, isto é, decaimento lento após um pico aos 30-50 ms para potenciais aplicados mais positivos que + 20 mV.

A análise do efeito de 2 mM TEA⁺ nas correntes é apresentada na **Figura 4.3**. Pode observar-se que o fármaco inibiu as correntes para todos os potenciais aplicados, tanto no pico (painel A) como na fase final (200 ms; painel C). Por exemplo, a + 60 mV TEA⁺ inibiu as correntes medidas no pico e na fase final em $54 \pm 3\%$ e $55 \pm 2\%$, respectivamente ($n = 3$ células). Esta observação sugere que os canais BK em células BRIN-BD11 são persistentemente ativados ao longo de um pulso de potencial, sofrendo uma inativação pouco relevante ou incompleta. No entanto, não é possível afastar a hipótese de 2 mM TEA⁺ inibir os canais K_v mais extensamente em células BRIN-BD11 do que noutras células.

A **Figura 4.3** mostra ainda curvas I/V para a corrente sensível a 2 mM TEA⁺, determinadas tanto no pico (painel B) como na fase final (painel D). Verifica-se em ambos os casos a tendência para "curvatura negativa" anteriormente descrita para as correntes controlo. Esta curvatura ocorre numa zona de potencial em que a força eletromotriz para a entrada de Ca²⁺ através de canais de Ca²⁺ sensíveis à voltagem diminui, o que se poderá traduzir numa menor ativação de canais BK. A curvatura está no entanto longe de assumir a forma de sino anteriormente descrita por Smith e colaboradores em células β -pancreáticas de murganho (Smith *et al.*, 1990).

Correntes de K⁺ mediadas por canais BK

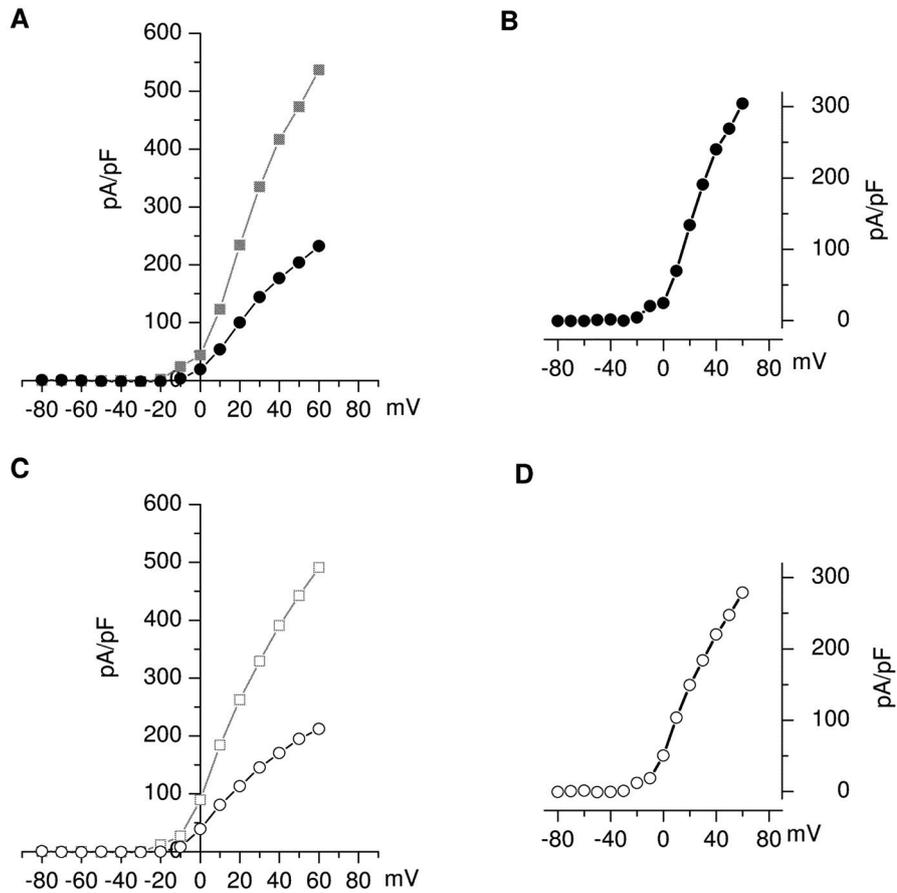


Figura 4.3: Dependência da voltagem das correntes sensíveis a 2 mM TEA⁺ em células BRIN-BD11. Análise dos efeitos de 2 mM TEA⁺ na experiência da **Figura 4.2**. **(A)** e **(C)**: Curvas I/V obtidas na ausência (quadrados) e presença (círculos) de 2 mM TEA⁺, tendo as correntes sido medidas no pico (pico, painel A) e na fase final (200 ms, painel C); **(B)** e **(D)**: Curvas I/V para as correntes sensíveis a 2 mM TEA⁺, determinadas no pico e na fase final. Estas correntes foram obtidas por subtração das correntes registadas na presença do fármaco às correntes registadas na sua ausência.

A possibilidade de isolar correntes BK em células BRIN-BD11 será retomada mais tarde nesta secção, utilizando agentes farmacológicos mais específicos.

Nas experiências seguintes a atenção concentrou-se nas correntes de entrada observadas nas experiências anteriores. Estas correntes pareciam ser dominadas por uma componente com características temporais semelhantes à corrente de Na⁺ anteriormente descritas em células β -pancreáticas de murganho, cuja cinética de ativação e inativação era muito rápida (Hiriart & Matteson, 1988).

As experiências envolveram a intensificação do gradiente de Na⁺ transmembranar, de forma a potenciar as correntes de Na⁺ e facilitar a sua análise (ver legenda da **Figura 4.4**). Foi ainda adicionado Cd²⁺ (200 μ M) à solução extracelular, de forma a suprimir as correntes de Ca²⁺ que eventualmente não tivessem sofrido *rundown* causado pela diálise do interior celular pelo conteúdo da pipeta, após a abertura do *patch* e entrada em *whole-cell*.

A **Figura 4.4 (A)** evidencia as correntes de entrada resultantes da aplicação de pulsos retangulares de potencial para -20 e 0 mV, a partir de $V_h = -90$ mV. Estas correntes foram suprimidas por 200 nM TTX, confirmando a sua mediação por canais de Na⁺ sensíveis à voltagem. Pode ainda verificar-se que a aplicação da toxina permitiu isolar as correntes de saída anteriormente descritas.

A fim de determinar o perfil de variação das correntes de Na⁺ com o potencial aplicado, as células foram sujeitas a um protocolo de pulsos idêntico ao anteriormente utilizado para a caracterização das correntes totais (ver diagrama na **Figura 4.4 (B)**). Às correntes assim obtidas (não ilustradas) foram subtraídas as correntes de saída isoladas com TTX, o que resultou na família de correntes de entrada apresentada na **Figura 4.4 (B)**.

Correntes de K⁺ mediadas por canais BK

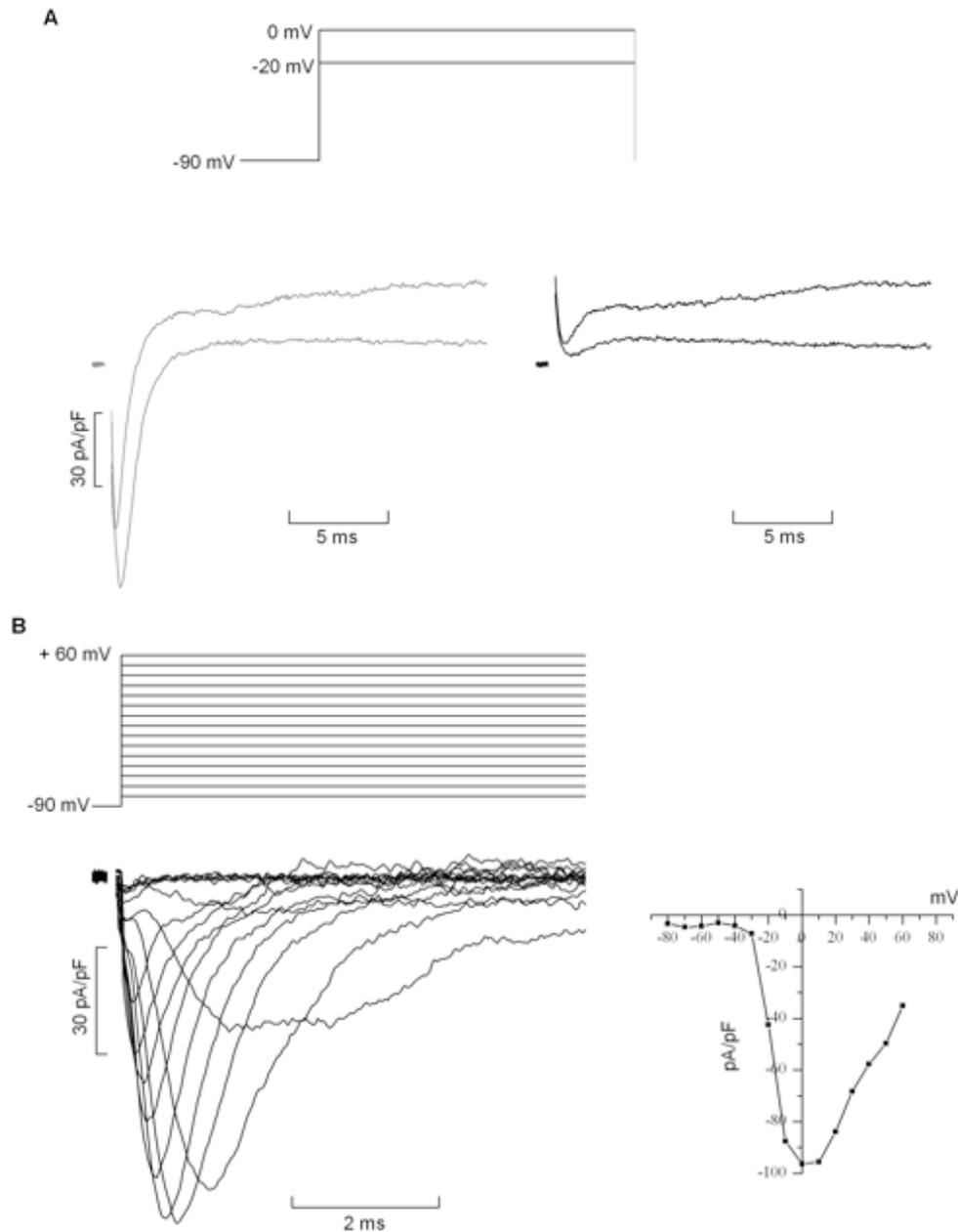


Figura 4.4: Correntes de Na⁺ sensíveis à voltagem e supressão por TTX em células BRIN-BD11. As correntes foram registradas por *patch-clamp* na configuração *whole-cell*, utilizando as soluções E (140 mM Na⁺) e A (sem Na⁺ adicionado) como soluções extracelular e intracelular (pipeta), respectivamente (ver **Tabela 2.4** em Material e Métodos). A célula foi continuamente exposta a 11 mM glicose, 500 μ M tolbutamida e 200 μ M Cd²⁺. **(A)** Exemplos de correntes totais, obtidas em resposta a pulsos de potencial (25 ms, diagrama) a partir de $V_h = -90$ mV, na ausência (registos à esquerda) e presença de 200 nM TTX; **(B)** Correntes de entrada induzidas por pulsos de magnitude crescente no intervalo entre -80 e +60 mV (diagrama), obtidas por subtração das correntes de saída isoladas com TTX às correntes totais (não ilustradas). As correntes foram medidas no pico e expressas em função do potencial aplicado, produzindo a curva I/V à direita.

Pode verificar-se que as correntes são rapidamente ativadas, após o que sofrem um processo de inativação mais lento ao longo de cada pulso. A amplitude máxima (pico) da corrente aumenta com o potencial aplicado no intervalo até cerca de 0 mV, refletindo a dependência da voltagem da condutância de Na⁺, após o que diminui à medida que o potencial aplicado se aproxima do potencial de equilíbrio de Na⁺, isto é, que se reduz a força eletromotriz que atua sobre os canais de Na⁺. O resultado é uma curva I/V com forma de "sino invertido", típica das correntes de Na⁺ (**Figura 4.4 (B)**). Os resultados são representativos de 3 experiências similares.

Com base nestes resultados e de forma a suprimir as correntes de entrada de Na⁺, passou a adicionar-se TTX à solução extracelular em todas as experiências.

Outra corrente que poderia contaminar a corrente BK é a corrente tipo A descrita por Smith e colaboradores em células β de murganho (Smith *et al.*, 1989). Trata-se de uma corrente transitória ativada pela voltagem, de ativação e inativação rápida e que não se encontra inativada para o potencial de *holding* utilizado nas experiências anteriores (-90 mV). As experiências seguintes foram desenhadas para colocar em evidência esta corrente e, caso tal se confirmasse, proceder ao seu bloqueio com 4-aminopiridina (4-AP). As experiências foram realizadas na presença de 10 mM TEA⁺, bloqueando-se assim os canais BK e SK1-3 e reduzindo-se acentuadamente a corrente mediada por canais K_V

Nestas condições, e tal como se ilustra na **Figura 4.5 (A)**, a aplicação do protocolo habitual de pulsos com $V_h = -90$ mV (ver **Figura 4.1** e **Figura 4.2**) resultou no aparecimento de correntes com ativação rápida e tendência para sofrerem inativação ao longo da fase inicial dos pulsos, principalmente para os potenciais mais positivos. Estas correntes transitórias foram suprimidas por 2 mM 4-AP.

Correntes de K⁺ mediadas por canais BK

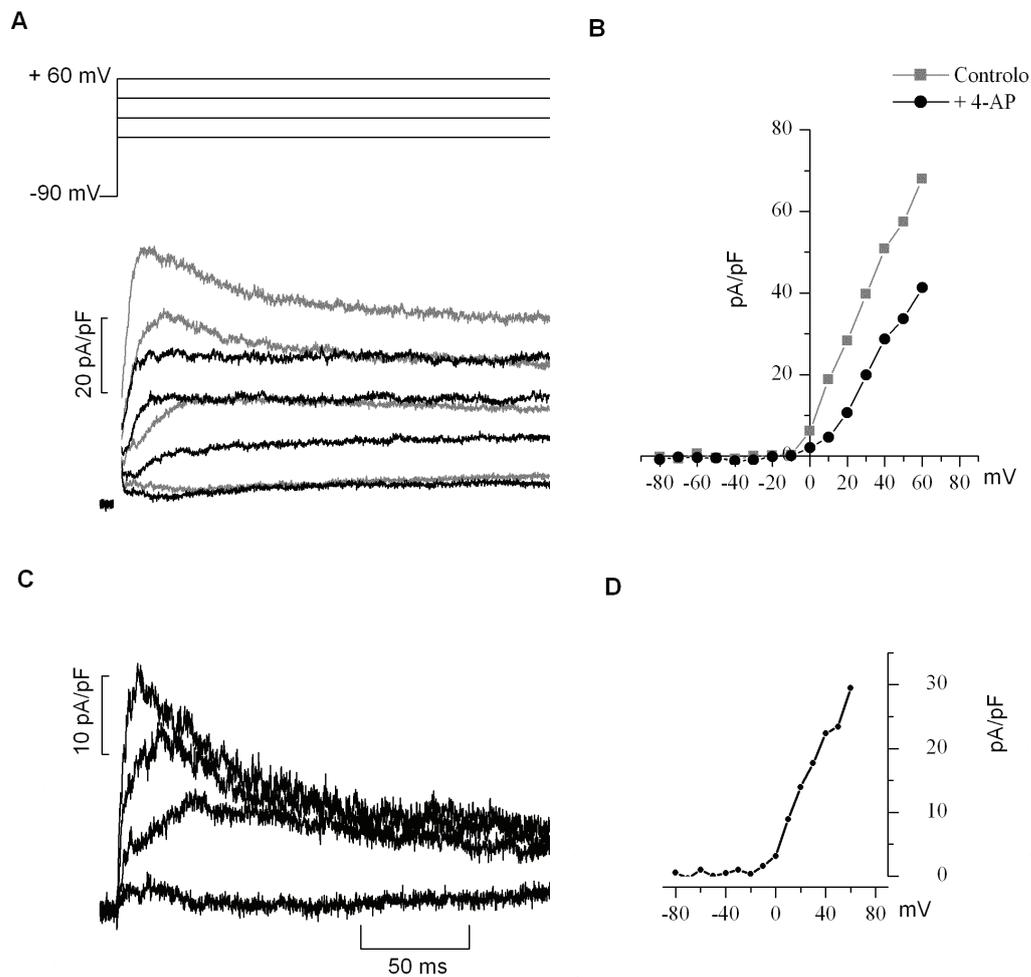


Figura 4.5: Correntes sensíveis a 4-aminopiridina (tipo A) em células BRIN-BD11. As correntes foram registradas em resposta a pulsos retangulares de potencial no intervalo entre + 30 e + 60 mV a partir de $V_h = -90$ mV, segundo um protocolo idêntico ao da experiência ilustrada na **Figura 4.1 (A)**. **(A)** Exemplos de correntes induzidas por despolarizações para 0, + 20, + 40 e + 60 mV na presença (traços a negro) e ausência (traços a cinzento) de 2 mM 4-aminopiridina (4-AP). A célula foi continuamente exposta a 11 mM glicose, 500 μ M tolbutamida e 200 nM TTX; **(B)** Curvas I/V para as correntes máximas na ausência (quadrados) e presença (círculos) de 2 mM 4-AP. Os valores foram extraídos dos registos do painel A, bem como dos registos adicionais correspondentes à estimulação pelos restantes potenciais aplicados; **(C)** Correntes sensíveis a 2 mM 4-AP, obtidas por subtração das correntes registadas na presença do fármaco às correntes registadas na sua ausência; **(D)** Curva I/V para a corrente sensível a 2 mM 4-AP, medida no pico.

As correntes sensíveis a 4-AP, obtidas subtraindo às correntes totais as correntes registadas na presença de 4-AP e apresentadas na **Figura 4.5 (C)**, evidenciaram os processos de ativação e inativação atrás referidos, tendo características semelhantes às correntes tipo A descritas por Smith e colaboradores (Smith *et al.*, 1989). A corrente sensível a 4-AP varia linearmente com o potencial (**Figura 4.5 (D)**), não apresentando portanto a "curvatura negativa" anteriormente descrita para a corrente sensível a 2 mM TEA⁺. Os resultados são representativos de 3 experiências similares.

Com base nestes resultados, nalgumas experiências a supressão das correntes tipo A foi assegurada adicionando 4-AP à solução extracelular.

4.1.2 Correntes sensíveis a penitrem A e iberiotoxina

Foi testado em seguida o efeito de penitrem A (PTA) nas correntes de saída em células BRIN-BD11, utilizando condições experimentais idênticas às utilizadas nas experiências das **Figura 4.1** e **Figura 4.2**, exceto que o potencial de *holding* foi ajustado para - 100 mV e se incluiu 200 nM TTX e 2 mM 4-AP nas soluções. O protocolo de estimulação foi simplificado, envolvendo apenas a aplicação de dois pulsos despolarizantes (para + 40 e + 60 mV).

A **Figura 4.6 (A)** e **(B)** mostra que 50 nM PTA inibiu substancialmente ambas as correntes, sendo a ativação das correntes na presença do fármaco mais lenta do que a ativação das correntes controlo. A corrente sensível a PTA (supostamente a corrente BK), obtida subtraindo a corrente registada na presença do fármaco à corrente controlo, é representada nos painéis C e D para ambos os potenciais aplicados. A corrente atingiu um pico em 10-15 ms, sofrendo subsequentemente um processo de inativação lento ao longo dos pulsos (decaimento de 25-30 %).

Na tentativa de otimizar a deteção de correntes mediadas por canais BK, foram realizadas experiências em que as células foram submetidas a pulsos despolarizantes no modo de registo de *perforated-patch*. Nesta configuração é preservada a composição do meio intracelular e minimizado o *rundown* dos canais de Ca²⁺ sensíveis à voltagem, sendo expectável que a despolarização resultasse numa ativação mais efetiva dos canais BK.

Correntes de K⁺ mediadas por canais BK

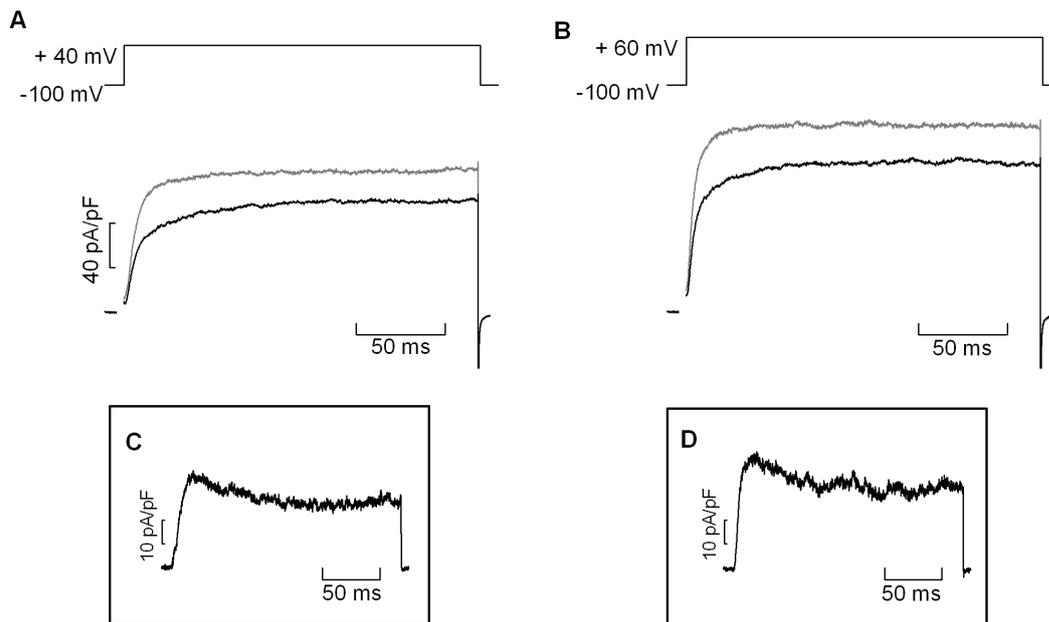


Figura 4.6: Correntes sensíveis a penitrem A em células BRIN-BD11. **(A)** e **(B)** Correntes observadas em resposta a pulsos retangulares de potencial de $V_h = -100$ mV para +40 mV **(A)** e +60 mV **(B)**, na presença (traços a negro) e ausência (traços a cinzento) de 50 nM PTA. As correntes foram registadas segundo um protocolo idêntico ao da experiência ilustrada na **Figura 4.1**, excepto que a célula foi continuamente exposta a 200 nM TTX e 2 mM 4-AP (para além de glicose e tolbutamida); **(C)** e **(D)**. Correntes sensíveis a PTA, obtidas por subtração das correntes registadas na presença do fármaco às correntes registadas na sua ausência para os potenciais aplicados de +40 mV **(C)**, correntes em **(A)** e +60 mV **(D)**, correntes em **(B)**.

Nestas experiências as células foram igualmente despolarizadas para + 40 e + 60 mV, sendo no entanto aplicado um pré-pulso de 20 ms para 0 mV ($V_h = -100$ mV; ver diagramas na **Figura 4.7 (A) e (B)**). O objectivo deste novo protocolo de estimulação consistiu em ativar os canais BK pela despolarização final (de 0 para + 40 ou + 60 mV) em condições em que os níveis de Ca^{2+} intracelular nas imediações da boca intracelular dos canais estivessem aumentados pela pré-despolarização (o pico de activação dos canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem ocorre aproximadamente a 0 mV), tornando assim mais efetiva a indução de correntes BK.

Os resultados são apresentados na **Figura 4.7**, sendo visível que PTA inibiu as correntes de forma idêntica ao anteriormente observado (**Figura 4.6**). Verificou-se igualmente que a evolução temporal das correntes sensíveis a PTA era idêntica. Sendo assim, e tendo em conta a maior complexidade experimental do registo de correntes no modo de *perforated-patch*, optou-se por prosseguir o estudo continuando a recorrer à configuração de *whole-cell*.

Correntes de K⁺ mediadas por canais BK

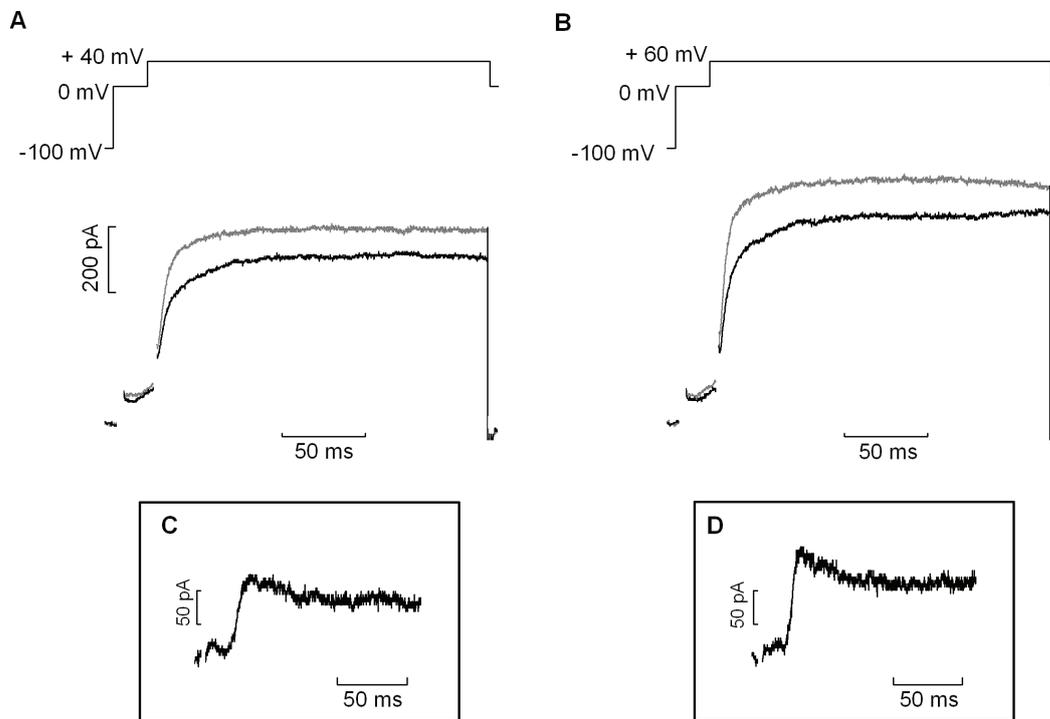


Figura 4.7: Efeito de penitrem A nas correntes, registadas em células BRIN-BD11 no modo de perforated-patch. Foram utilizadas as soluções **F** (5 mM K⁺ e 2,6 mM Ca²⁺) e **B** (157 mM K⁺, 88 nM Ca²⁺) como solução extracelular e solução da pipeta, respetivamente (ver **Tabela 2.4** em Material e Métodos). A célula foi continuamente exposta a 11 mM glicose, 500 μ M tolbutamida, 200 nM TTX e 2 mM 4-AP. **(A)** e **(B)** Correntes observadas em resposta a pulsos de potencial de + 40 mV **(A)** e + 60 mV **(B)**, na presença (traços a negro) e ausência (traços a cinzento) de 50 nM PTA. Aquelas despolarizações foram precedidas de pré-pulsos de 20 ms para 0 mV ($V_h = -100$ mV); **(C)** e **(D)** Correntes sensíveis a PTA, obtidas por subtração das correntes registadas na presença do fármaco às correntes registadas na sua ausência para os potenciais aplicados de + 40 mV **(C, correntes em A)** e +60 mV **(D, correntes em B)**.

Foram no entanto efetuados os seguintes ajustes experimentais, com o intuito de continuar a otimizar a detecção de correntes mediadas por canais BK. Por um lado, foi aumentado o nível de Ca^{2+} livre na solução intracelular (pipeta) utilizada nas experiências (de 88 para 230 nM, ver legenda da **Figura 4.8**). Em segundo lugar, deixou de ser adicionada glicose à solução extracelular, atendendo a indicações de que o seu metabolismo pode reduzir a atividade de canais BK (Ribalet *et al.*, 1988) (nas experiências anteriores foi utilizada glicose à concentração de 11 mM). Finalmente, e tendo em conta a ação inibidora de 4-AP sobre canais BK reportada em células do músculo liso (Petkova-Kirova *et al.*, 2000), aparentemente mediada por interferência da alcalinização intracelular induzida pelo fármaco nos níveis de Ca^{2+} livre, optou-se por retirar 4-AP das soluções e impedir a ativação da corrente tipo A sujeitando as células a um potencial de *holding* de -70 mV, para o qual a corrente se encontra praticamente inactivada (Smith *et al.*, 1989).

Correntes de K⁺ mediadas por canais BK

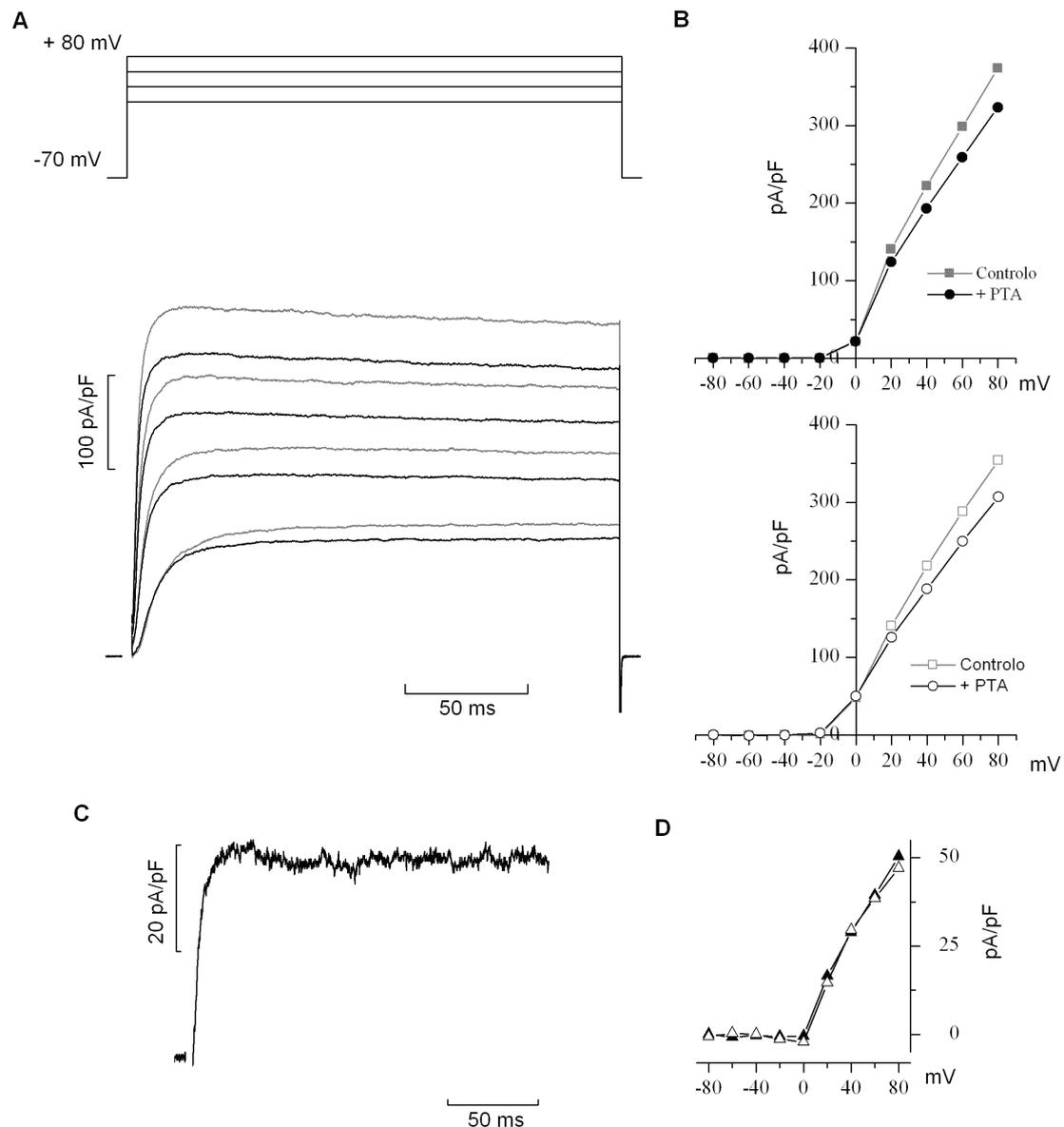


Figura 4.8: Dependência da voltagem das correntes sensíveis a penitrem A em células BRIN-BD11. As correntes foram registadas por *patch-clamp* na configuração *whole-cell*, utilizando as soluções **F** (5 mM K⁺ e 2,6 mM Ca²⁺) e **C** (158 mM K⁺, 230 nM Ca²⁺) como soluções extracelular e intracelular (pipeta), respetivamente (ver **Tabela 2.4** em Material e Métodos). A célula foi continuamente exposta a 500 μM tolbutamida e 200 nM TTX (soluções extracelulares sem glicose e 4-AP). **(A)** Correntes observadas em resposta a pulsos retangulares de potencial (200 ms) de magnitude crescente (incrementos de 20 mV) no intervalo entre + 20 e + 80 mV a partir de V_h = - 70 mV, na presença (traços a negro) e ausência (traços a cinzento) de 50 nM PTA; **(B)** Curvas I/V obtidas na ausência (quadrados) e presença de PTA (círculos), tendo as correntes sido medidas quando atingiram o valor máximo (símbolos a cheio) e na fase final (200 ms, símbolos vazios); **(C)** Corrente sensível a PTA, obtida por subtração da corrente registada na presença do fármaco à corrente registada na sua ausência para o potencial aplicado de + 60 mV; **(D)** Curvas I/V para as correntes sensíveis a PTA, determinadas quando atingiram o valor máximo (triângulos a cheio) e na fase final (triângulos vazios).

A experiência ilustrada na **Figura 4.8** mostra correntes de ativação muito rápidas, registradas nas novas condições experimentais. As correntes foram induzidas por aplicação de pulsos despolarizantes no intervalo entre - 60 e + 80 mV a partir de $V_h = - 70$ mV.

PTA (50 nM) inibiu as correntes (**Figura 4.8 (A)**), observando-se o efeito para todos os potenciais positivos aplicados (**Figura 4.8 (B)**). A extensão do efeito foi sensivelmente a mesma no pico e na fase final das correntes, sugerindo que os canais BK são persistentemente ativados ao longo dos pulsos, tal como de fato se observa determinando a corrente sensível a PTA (**Figura 4.8 (C)**). As curvas I/V para esta corrente exibem uma "curvatura negativa" (**Figura 4.8 (D)**), curiosamente semelhante à anteriormente observada nas experiências com 2 mM TEA⁺ (ver **Figura 4.3**).

A **Figura 4.9** ilustra uma experiência desenhada para testar o efeito de iberiotoxina, utilizando um protocolo de estimulação e condições experimentais idênticos aos da experiência anteriormente descrita. Os resultados foram qualitativamente idênticos aos obtidos com PTA.

Correntes de K⁺ mediadas por canais BK

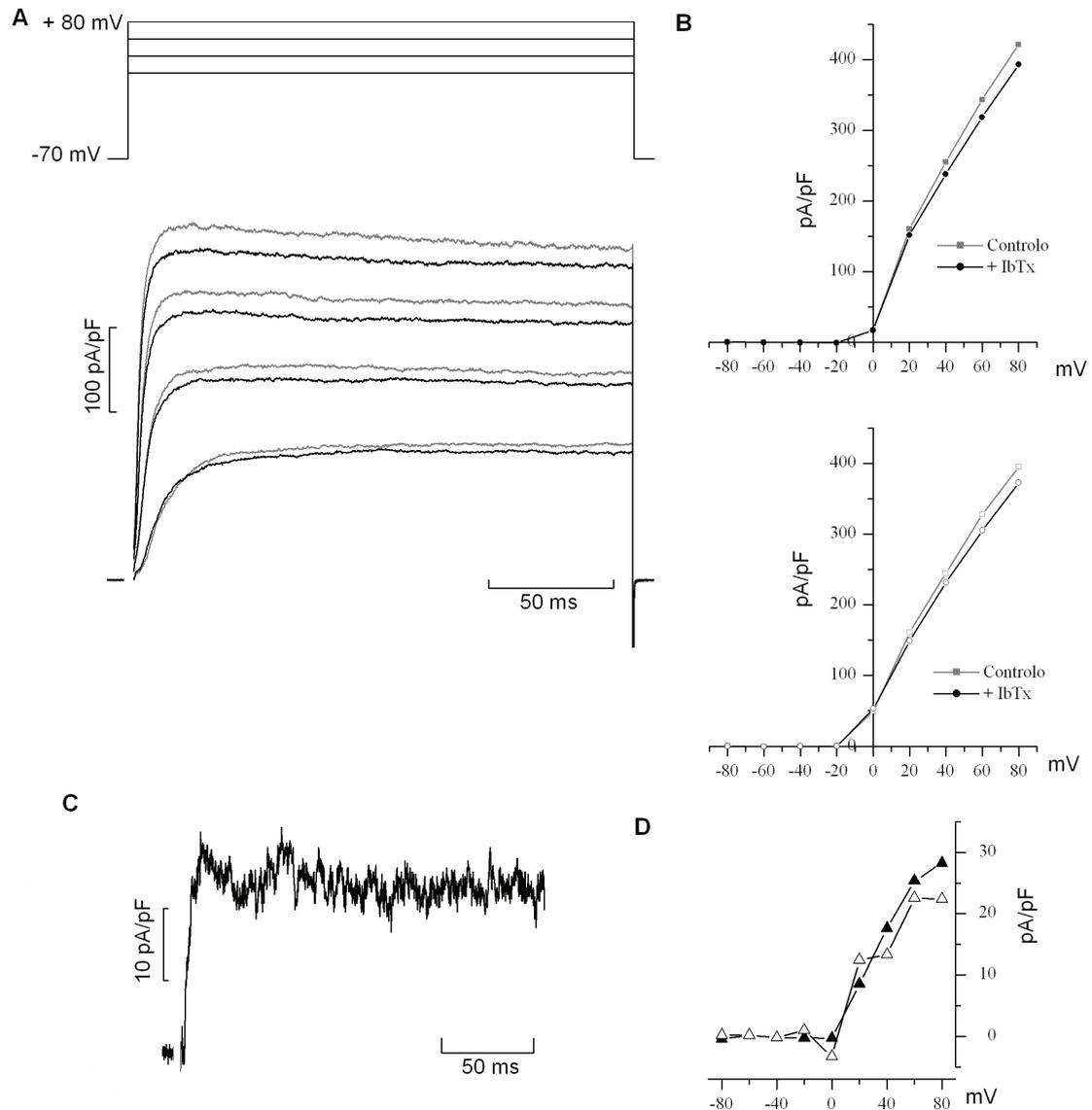


Figura 4.9: Dependência da voltagem das correntes sensíveis a iberiotoxina em células BRIN-BD11. **(A)** Correntes observadas em resposta a pulsos de potencial de magnitude crescente no intervalo entre + 20 e + 80 mV a partir de $V_h = -70$ mV, na presença (traços a negro) e ausência (traços a cinzento) de 50 nM iberiotoxina (IbTx). As correntes foram registadas segundo um protocolo idêntico ao da experiência ilustrada na **Figura 4.8**; **(B)** Curvas I/V obtidas na ausência (quadrados) e presença de IbTx (círculos), tendo as correntes sido medidas quando atingiram o valor máximo (símbolos a cheio) e na fase final (200 ms, símbolos vazios); **(C)** Corrente sensível a IbTx, obtida por subtração da corrente registada na presença da toxina à corrente registada na sua ausência para o potencial aplicado de + 60 mV; **(D)** Curvas I/V para as correntes sensíveis a IbTx, determinadas quando atingiram o valor máximo (triângulos a cheio) e na fase final (triângulos vazios).

4.2 Estudos em células β -pancreáticas isoladas

As experiências anteriormente apresentadas, realizadas em células BRIN-BD11, visaram principalmente otimizar as condições de registo das correntes totais de K^+ , de forma a permitir a deteção de correntes mediadas por canais BK na célula β -pancreática nativa. Este objetivo foi reforçado com as experiências em que se utilizou penitrem A e IbTx, ainda em células BRIN-BD11 (ver figuras 4.8 e 4.9).

Nas experiências a seguir descritas, realizadas em células β -pancreáticas isoladas, as correntes de K^+ foram registadas no modo de *whole-cell* de acordo com as condições experimentais optimizadas: (i) estimulação a partir de um potencial de *holding* de -70 mV, de forma a inativar as correntes tipo A; (ii) inclusão de 200 nM TTX (para bloquear canais de Na^+ sensíveis à voltagem) e 500 μ M tolbutamida (para bloquear canais K_{ATP}) nas soluções extracelulares; (iii) ausência de glicose (para maximizar as correntes BK). Continuaram a ser utilizadas as soluções **F** (5 mM K^+ e 2,6 mM Ca^{2+}) e **C** (158 mM K^+ e 230 nM Ca^{2+} ; ver **Tabela 2.4** em Material e Métodos) como soluções extracelular e intracelular (pipeta), respetivamente.

As células submetidas a registo foram escolhidas de entre as de maiores dimensões (diâmetro 15-20 μ m), razão por que se assume que eram células secretoras de insulina. De fato, o isolamento de células a partir de ilhéus proporciona principalmente células β mas também outras células endócrinas com especial relevo para as células alfa, sendo estas últimas de menores dimensões (Gopel *et al.*, 1999). O valor médio do diâmetro das células β utilizadas nas experiências pode ser estimado a partir da capacidade membranar (C_m), uma propriedade elétrica das células proporcional à sua área de superfície. O valor médio de C_m para 17 células foi 10 ± 3 pF. Assumindo uma geometria esférica e um valor de 1 μ F/cm² para a capacidade específica da membrana, obtém-se um diâmetro celular de cerca de 18 μ m.

4.2.1 Corrente sensível a penitrem A

Foi primeiramente realizado um estudo do curso temporal do efeito de PTA (50 nM) na corrente total de K^+ , evocada por um pulso despolarizante de + 60 mV com a duração de 200 ms.

Correntes de K⁺ mediadas por canais BK

Tal como é ilustrado na **Figura 4.10 (A)** (registo a cinzento), a estimulação efetuada em condições controlo (isto é, antes da aplicação do fármaco) traduziu-se no desenvolvimento de uma corrente com características semelhantes às registadas em células BRIN-BD11 em condições homólogas (ver por exemplo a **Figura 4.8**). Em particular, a corrente exibiu uma ativação muito rápida e um processo lento de inativação ao longo do pulso despolarizante.

Pode ainda observar-se na **Figura 4.10 (A)** que a exposição da célula a PTA reduziu progressivamente a amplitude da corrente, tanto na fase inicial como na final. A **Figura 4.10 (B)** representa a evolução temporal da percentagem de bloqueio da corrente máxima, que atingiu cerca de 10 % no período 30-90 s (valor médio 9 ± 2 %, $n = 4$ células) e cerca de 39 % no período 250-430 s (35 ± 8 %, $n = 4$ células), altura em que pareceu estabilizar. Os resultados são representativos de 4 experiências, realizadas segundo um protocolo idêntico. Desta forma, a análise da ação de PTA nas várias experiências a seguir descritas foi sempre realizada para tempos de exposição ao fármaco iguais ou superiores a 4 minutos.

Em murganho o canal BK apresenta uma cinética de ativação muito rápida relativamente ao canal K_v responsável pela repolarização do potencial de ação (constantes de tempo de ativação da ordem de 3 e 18 ms, respetivamente (Smith *et al.*, 1990; Rorsman & Trube, 1986)). Desta forma, ao se bloquearem os canais BK com PTA deveria esperar-se um enlentecimento da ativação das correntes totais (ou seja, um aumento da respetiva constante de tempo de ativação), o que de facto se observou (ver traço representado a azul na **Figura 4.10 (A)**).

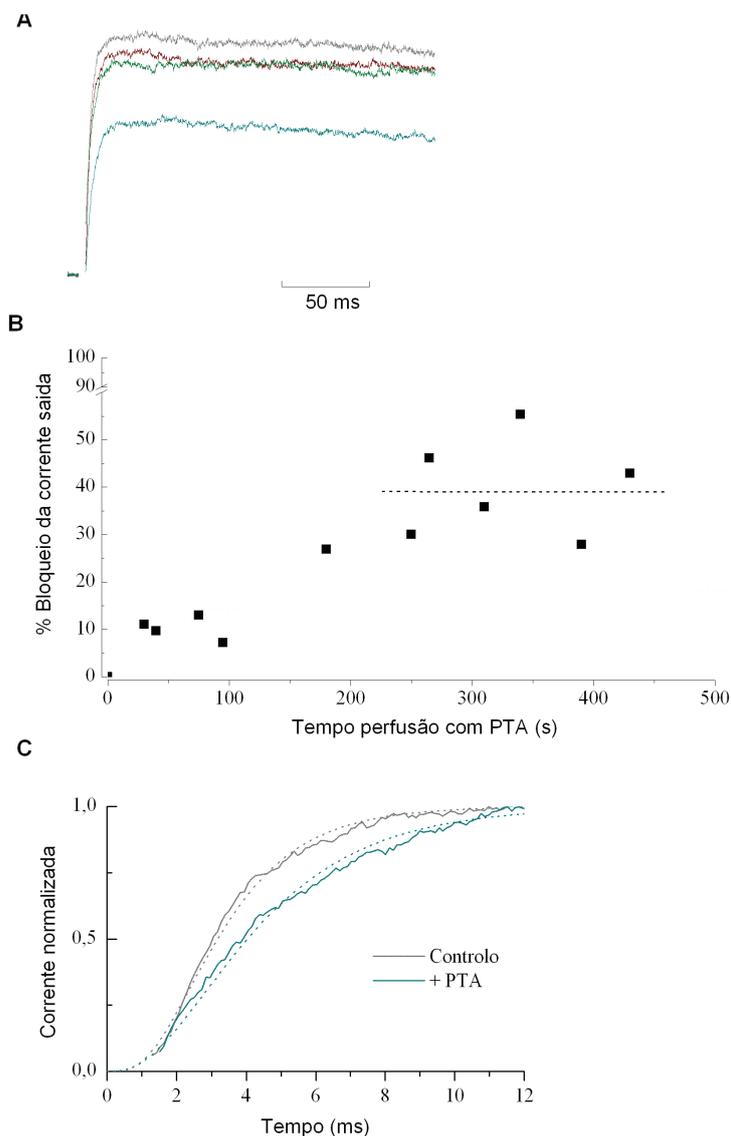


Figura 4.10: Curso temporal do efeito inibidor de penitrem A nas correntes totais de K^+ , registadas na célula β . **(A)** Correntes observadas em resposta a pulsos retangulares de potencial de $V_h = -70$ mV para $+60$ mV, com a duração de 200 ms, na ausência (controlo, traço a cinzento) e na presença de 50 nM penitrem A (PTA) aos 30 s (traço a vermelho), 95 s (verde) e 265 s (azul) de exposição ao fármaco. As correntes foram registadas por *patch-clamp* na configuração *whole-cell*, segundo um protocolo idêntico ao da experiência ilustrada na **Figura 4.8**. Foram utilizadas as soluções **F** (5 mM K^+ e 2,6 mM Ca^{2+}) e **C** (158 mM K^+ e 230 nM Ca^{2+}) como soluções extracelular e intracelular (pipeta), respectivamente (ver **Tabela 2.4** em Material e Métodos). A célula foi continuamente exposta a 500 μ M tolbutamida e 200 nM TTX (soluções extracelulares sem glicose); **(B)** Evolução temporal da percentagem de bloqueio da corrente máxima ao longo da exposição da célula a PTA (iniciada ao tempo 0). A percentagem de bloqueio foi calculada tomando como controlo a corrente registada imediatamente antes da aplicação de PTA. A linha a tracejado representa o valor médio das percentagens de bloqueio relativas às últimas seis estimulações com pulsos de potencial; **(C)** Expansões temporais das fases iniciais das correntes normalizadas registadas no controlo (traço a cinzento) e na presença de PTA (traço a azul, correspondente a 265 s de exposição ao fármaco). As curvas a tracejado representam o melhor ajuste das correntes à função $n^2(t) = [1 - \exp(-t/\tau)]^2$, em que τ representa a constante de tempo de ativação (ver texto principal).

Correntes de K⁺ mediadas por canais BK

Procedeu-se a uma estimativa das constantes de tempo de ativação, na ausência e presença de PTA, recorrendo ao formalismo de Hodgkin e Huxley para as correntes de K⁺ sensíveis à voltagem (ver por exemplo Hille, 1992), assumindo um número mínimo de partículas n por razões de simplicidade de cálculo. Verificou-se que a ativação das correntes de K⁺ podia ser razoavelmente descrita por uma cinética de n^2 , em que $n(t) = 1 - \exp(-t/\tau)$ (τ representa a constante de tempo de ativação). A **Figura 4.10 (C)** mostra expansões temporais das fases iniciais das correntes normalizadas registadas no controlo e na presença de PTA (265 s de exposição), bem como as curvas a tracejado que representam o melhor ajuste das correntes à função $n^2(t)$. Os melhores valores de τ obtidos nestes ajustes foram 1,7 ms para o controlo e 2,5 ms na presença de PTA. Nas restantes três experiências obtiveram-se valores similares, indicando que PTA inibe uma componente de ativação rápida da corrente total de K⁺.

Nas experiências seguintes a ação inibidora de PTA (50 nM) foi investigada aplicando pulsos despolarizantes de diferentes magnitudes no intervalo entre - 60 e + 80 mV.

A **Figura 4.11 (A)** mostra exemplos representativos dos efeitos de PTA a três potenciais aplicados (+ 20, + 40 e + 60 mV). As correntes controlo (obtidas estimulando a célula antes da aplicação do fármaco) são representadas a cinzento. Estas correntes decaíram lentamente após atingirem um máximo inicial, processo que se acentuou com o aumento da amplitude dos pulsos despolarizantes. Tal como se observou anteriormente em células BRIN-BD11 (ver por exemplo a **Figura 4.8**), PTA inibiu as correntes aos vários potenciais aplicados. Esta inibição foi também observada ao longo de cada pulso despolarizante. No entanto, nas presentes experiências PTA inibiu mais acentuadamente as correntes na fase inicial de cada pulso, proporcionando o desenvolvimento de correntes que praticamente não exibiram processos de decaimento lento (traços a negro na **Figura 4.11 (A)**). É portanto plausível que a corrente sensível a PTA seja controlada por um processo de inativação, susceptível de determinar o decaimento lento das correntes totais. Aparentemente a cinética deste processo de inativação é variável de célula para célula, fazendo com que em algumas (exemplo na **Figura 4.10**) a extensão da ação inibidora de PTA não varie significativamente ao longo do pulso.

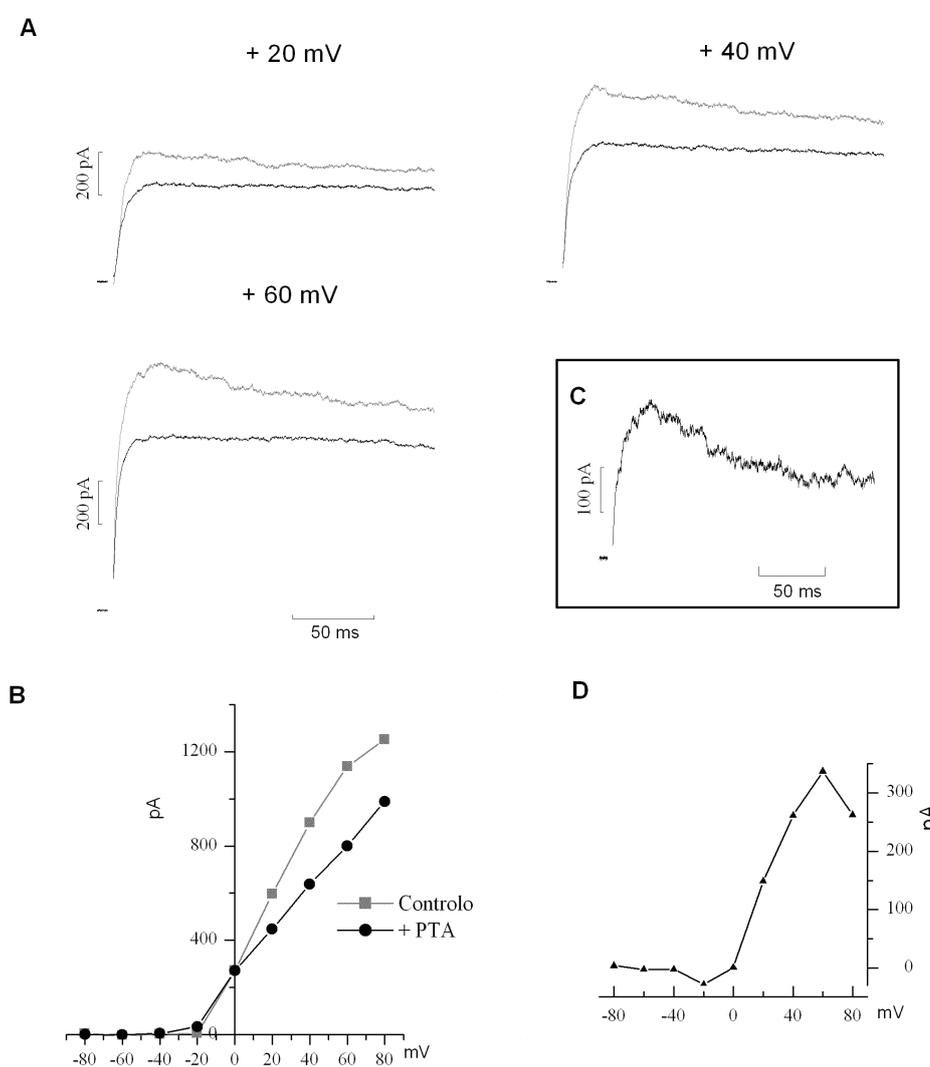


Figura 4.11: Dependência da voltagem das correntes sensíveis a penitrem A na célula β -pancreática. **(A)** Correntes observadas em resposta a pulsos de potencial de + 20, + 40 e + 60 mV a partir de $V_h = -70$ mV, na presença (traços a negro) e ausência (controlo, traços a cinzento) de 50 nM penitrem A (PTA). As correntes foram registadas segundo uma metodologia idêntica à da experiência ilustrada na **Figura 4.10** (protocolo de pulsos descrito na legenda da **Figura 4.8**); **(B)** Curvas I/V correspondentes às correntes máximas, obtidas na ausência (quadrados) e presença de PTA (círculos). Foram aplicados pulsos de voltagem num intervalo mais extenso do que em A (ver legenda da **Figura 4.8**); **(C)** Corrente sensível a PTA, obtida por subtração da corrente registada na presença do fármaco à corrente registada na sua ausência para o potencial aplicado de + 60 mV; **(D)** Curva I/V para a corrente máxima sensível a PTA.

Correntes de K⁺ mediadas por canais BK

A corrente sensível a PTA (supostamente a corrente BK), obtida subtraindo a corrente registada na presença do fármaco à corrente controlo, é representada na **Figura 4.11 (C)** para o potencial aplicado de + 60 mV. Pode verificar-se que a corrente foi ativada rapidamente pelo pulso (tempo necessário para atingir $100(1 - e^{-1}) = 63\%$ da corrente máxima < 6 ms) e que atingiu um máximo em 20-30 ms (13-30 s para observações realizadas em 4 células); a corrente foi subsequentemente controlada por um processo de inativação parcial que a reduziu no final do pulso a aproximadamente 48 % da corrente máxima. É interessante realçar que a corrente sensível a bloqueadores de canais BK (PTA ou IbTx) não sofreu inativação mensurável nas experiências efetuadas com controlo optimizado em células BRIN-BD11 (ver **Figuras 4.8 (C)** e **4.9 (C)**), situações em que, aliás, a extensão da ação inibidora dos bloqueadores não variou significativamente ao longo do pulso.

As curvas I/V construídas com base nas correntes máximas, registadas na ausência e presença de PTA, são apresentadas na **Figura 4.11 (B)**. À semelhança do observado em células BRIN-BD11 (ver **Figura 4.8 (B)**), PTA inibiu as correntes para todos os potenciais positivos aplicados. Por exemplo, a + 40 e + 60 mV o fármaco inibiu as correntes em 29 e 30%, respectivamente (valores médios $29 \pm 11\%$ e $25 \pm 10\%$, respetivamente; n = 4 células).

Tal como se observa na **Figura 4.11 (D)**, a curva I/V correspondente à corrente sensível a PTA exibiu uma "curvatura negativa" semelhante à observada nas experiências com 2 mM TEA⁺ e 50 nM PTA em células BRIN-BD11 (ver **Figuras 4.3 (B)** e **4.8 (B)**), que no entanto assumiu claramente a forma de sino para potenciais mais positivos que + 40 mV, de acordo com o reportado por Smith e colaboradores (Smith *et al.*, 1990).

A stromatoxina (ScTx) é uma toxina extraída do veneno da tarântula africana *Stromatopelma calceatum* que bloqueia com alta afinidade os canais K_V de inativação lenta Kv2.1 e Kv2.2 (Escoubas *et al.*, 2002; Mouhat *et al.*, 2008). A toxina foi anteriormente testada na célula β humana, onde inibiu a componente mais persistente da corrente total de K⁺ (Braun *et al.*, 2008). Nas experiências seguintes ScTx foi utilizada com a finalidade de inibir a corrente K_V da célula β de murganho e, desta forma, colocar mais em evidência a ação inibidora de PTA.

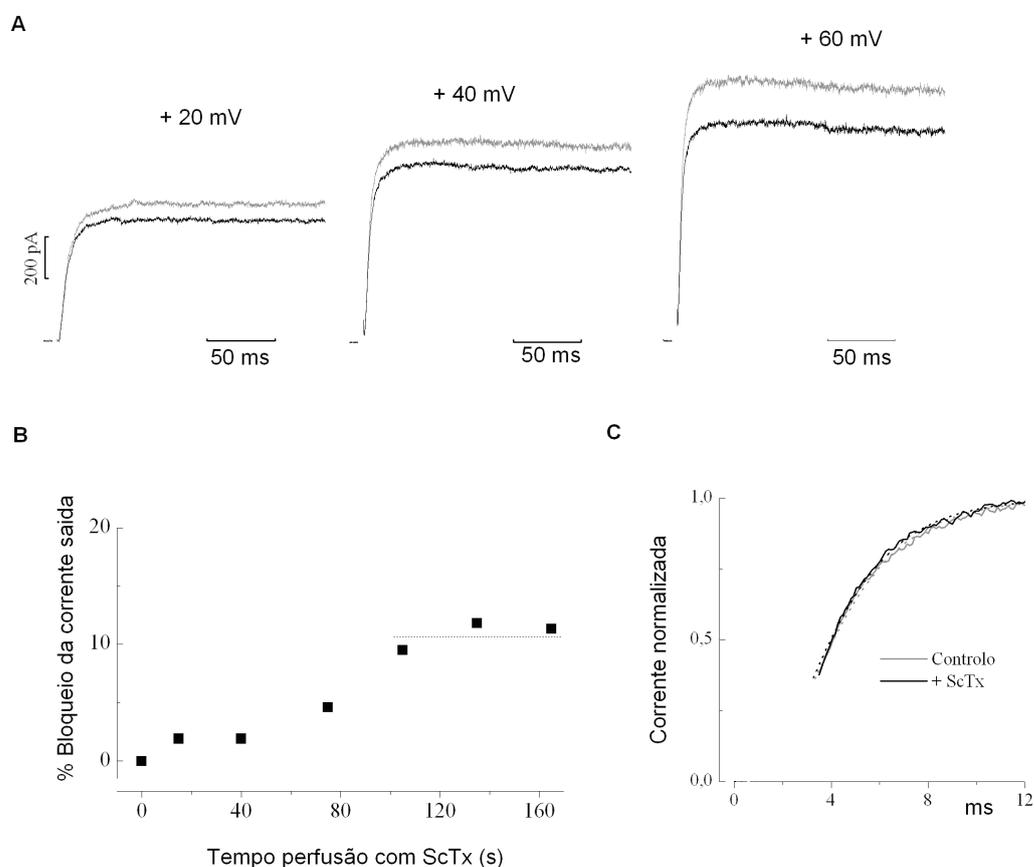


Figura 4.12: Efeito de stromatotoxina nas correntes totais de K^+ na célula β -pancreática. **(A)** Correntes observadas em resposta a pulsos de potencial de + 20, + 40 e + 60 mV a partir de $V_h = -70$ mV, na presença (traços a negro) e ausência (controlo, traços a cinzento) de 100 nM stromatotoxina (ScTx). As correntes foram registadas segundo uma metodologia idêntica à da experiência ilustrada na **Figura 4.10** (protocolo de pulsos descrito na legenda da **Figura 4.8**); **(B)** Evolução temporal da percentagem de bloqueio da corrente (medida na fase final do pulso de + 60 mV) ao longo da exposição da célula a ScTx (iniciada ao tempo 0). A percentagem de bloqueio foi calculada tomando como controlo a corrente registada imediatamente antes da aplicação de ScTx. A linha a tracejado representa o valor médio das percentagens de bloqueio relativas às últimas três estimulações com pulsos de potencial; **(C)** Expansões temporais das fases iniciais das correntes normalizadas registadas no controlo e na presença de ScTx (potencial aplicado de + 60 mV). As curvas a tracejado representam o melhor ajuste das correntes à função $n^2(t) = [1 - \exp(-t/\tau)]^2$, em que τ representa a constante de tempo de ativação (ver texto principal).

Correntes de K⁺ mediadas por canais BK

A **Figura 4.12 (A)** mostra exemplos representativos dos efeitos de 100 nM ScTx a três potenciais aplicados no intervalo + 20/+ 60 mV. Nesta experiência as correntes controlo ou não decaíram ao longo do pulso ou decaíram mais lentamente do que na experiência ilustrada na **Figura 4.11 (A)** para potenciais homólogos. Pode verificar-se que ScTx inibiu as correntes aos vários potenciais. Tal como seria de esperar a inibição ocorreu ao longo das fases intermédia e final dos pulsos, onde seria expectável que a corrente K_V já estivesse substancialmente ativada, devendo contribuir acentuadamente para a corrente total; durante a fase inicial dos pulsos (isto é, durante as primeiras dezenas de milissegundos) também se verificou inibição das correntes, sugerindo que a activação da corrente K_V já foi significativa nesta fase.

A **Figura 4.12 (C)** mostra expansões temporais das fases iniciais das correntes normalizadas registadas no controlo e na presença de ScTx, bem como as curvas a tracejado que representam o melhor ajuste das correntes à função $n^2(t)$, anteriormente utilizada para descrever a cinética de activação da corrente de K⁺ de acordo com um formalismo simplificado de Hodgkin e Huxley (ver **Figura 4.10 (C)**). Os melhores valores da constante de tempo de activação obtidos nestes ajustes foram 2,1 ms para o controlo e 2,2 ms na presença de ScTx. A diferença é negligenciável, indicando que, ao contrário de PTA, a toxina não afeta a componente de activação mais rápida da corrente total de K⁺.

A **Figura 4.12 (B)** representa a evolução temporal da percentagem de bloqueio da corrente medida na fase final do pulso, que aumentou até atingir cerca de 13% no período 100-170 s, altura em que pareceu estabilizar. Desta forma, a aplicação de penitrem A e iberiotoxina nas experiências a seguir descritas foi realizada aos 3 minutos de exposição a ScTx.

Tomados no seu todo, os resultados apresentados na **Figura 4.12** indicam que ScTx inibe uma componente persistente da corrente total de K⁺ (supostamente a corrente mediada por canais K_{v2}), distinta da componente de activação rápida sensível a PTA.

A **Figura 4.13 (A)** mostra o efeito inibidor de 50 nM PTA na corrente de K⁺ registada na presença de 100 nM ScTx. Tal como se observou anteriormente (ver **Figura 4.11 (A)**) PTA inibiu mais acentuadamente a corrente na fase inicial do pulso, pondo em evidência uma corrente de activação lenta, que na **Figura 4.11 (A)**

não foi tão evidente. Esta observação sugere que a ação inibidora de PTA tenha sido agora mais acentuada e/ou que uma corrente BK inativante contribua mais para a corrente total. É provável que a corrente registada na presença de PTA e ScTx tenha ainda uma forte contribuição da corrente K_v , sugerindo que 100 nM ScTx só inibiu parcialmente esta última.

A **Figura 4.13 (B)** mostra que a corrente sensível a PTA, obtida subtraindo a corrente registada na presença do fármaco (PTA + ScTx) à corrente controlo (ScTx), tem características semelhantes às observadas anteriormente. Trata-se de fato de uma corrente de ativação rápida (tempo necessário para atingir $100(1-e^{-1}) = 63\%$ da corrente máxima < 4 ms) e que atingiu um máximo em 15-25 ms; a corrente foi subsequentemente controlada por um processo de inativação parcial que a reduziu no final do pulso a aproximadamente 75 % da corrente máxima.

Correntes de K^+ mediadas por canais BK

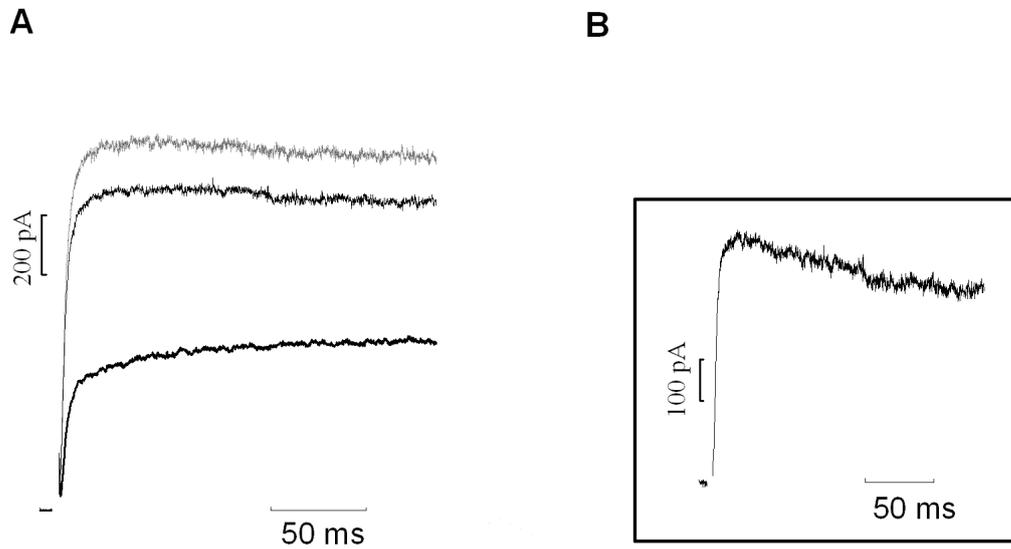


Figura 4.13: Efeito de penitrem A na corrente registada na presença de stromatotoxina (ScTx). As correntes foram registadas aplicando pulsos retangulares de potencial para +60 mV a partir de $V_h = -70$ mV segundo uma metodologia idêntica à da experiência ilustrada na **Figura 4.10**. **(A)** Efeito de 100 nM ScTx (traço intermédio) e de 50 nM penitrem A (PTA) + ScTx (traço inferior) na corrente controlo (traço superior); **(B)** Corrente sensível a PTA, obtida por subtração da corrente registada na presença de 100 nM ScTx + 50 nM PTA à corrente registada na presença de ScTx.

4.2.2 Corrente sensível a iberiotoxina

As experiências seguintes foram destinadas a testar a ação de iberiotoxina nas correntes de K^+ da célula β -pancreática, de forma a permitir uma comparação com a ação de PTA.

A ação inibidora de iberiotoxina (IbTx, 50 nM), ilustrada na **Figura 4.14**, foi inicialmente investigada aplicando pulsos despolarizantes de diferentes magnitudes no intervalo entre - 60 e + 80 mV, de forma idêntica ao realizado com PTA (ver **Figura 4.11**). A **Figura 4.14 (A)** mostra exemplos representativos dos efeitos de IbTx a três potenciais aplicados no intervalo + 20/+ 60 mV. Tal como se observou anteriormente, as correntes controlo decaíram lentamente após atingirem um máximo inicial. De igual forma, a ação inibidora de IbTx traduziu-se no desenvolvimento de correntes que praticamente não exibiram processos de decaimento lento.

Tal como no caso de PTA, estes resultados sugerem que a corrente sensível a IbTx é controlada por um processo de inativação, susceptível de determinar o decaimento lento das correntes totais. Este processo de inativação é de fato aparente na corrente obtida por subtração da corrente registada na presença da toxina à corrente controlo, representada na **Figura 4.14 (C)** para o potencial aplicado de + 60 mV (no final do pulso a corrente foi reduzida a aproximadamente 45% da corrente máxima). É ainda visível que a corrente sensível a IbTx é uma corrente de ativação rápida (tempo necessário para atingir $100(1-e^{-1}) = 63\%$ da corrente máxima < 3 ms) e que atingiu um máximo em cerca de 15 ms.

Correntes de K⁺ mediadas por canais BK

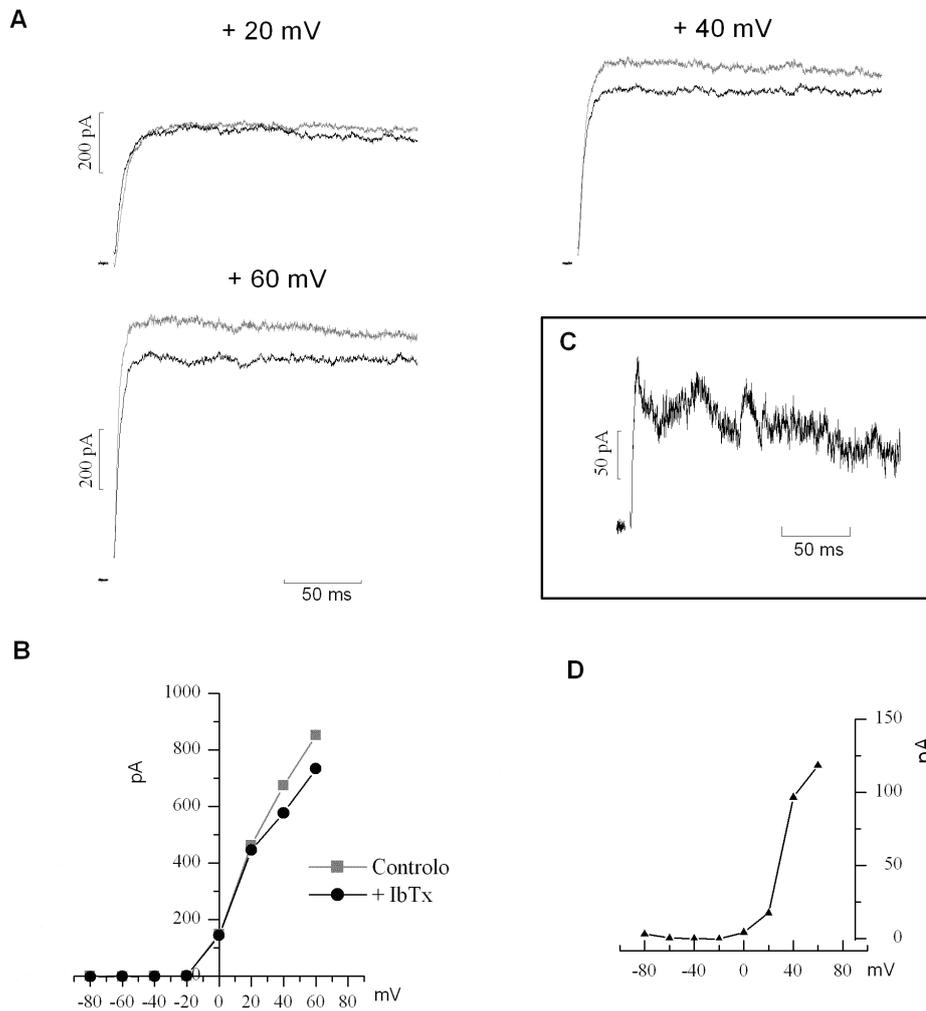


Figura 4.14: Dependência da voltagem das correntes sensíveis a iberiotoxina na célula β -pancreáticas. **(A)** Correntes observadas em resposta a pulsos de potencial de + 20, + 40 e + 60 mV a partir de $V_h = -70$ mV, na presença (traços a negro) e ausência (controlo, traços a cinzento) de 50 nM iberiotoxina (IbTx). As correntes foram registadas segundo uma metodologia idêntica à da experiência ilustrada na **Figura 4.10** (protocolo de pulsos descrito na legenda da **Figura 4.8**); **(B)** Curvas I/V correspondentes às correntes máximas, obtidas na ausência (quadrados) e presença de IbTx (círculos). Foram aplicados pulsos de voltagem num intervalo mais extenso do que em A (ver legenda da **Figura 4.8**); **(C)** Corrente sensível a IbTx, obtida por subtração da corrente registada na presença da toxina à corrente registada na sua ausência para o potencial aplicado de + 60 mV; **(D)** Curva I/V para a corrente máxima sensível a IbTx.

As curvas I/V, construídas com base nas correntes máximas registadas na ausência e presença de IbTx, denotam uma inibição idêntica (14 %) das correntes a + 40 e + 60 mV (**Figura 4.11 (B)**). É ainda importante sublinhar que, à semelhança do observado em células BRIN-BD11 (ver **Figura 4.9 (D)**) e em células β sujeitas à ação de PTA (ver **Figura 4.11 (D)**), a curva I/V correspondente à corrente sensível a IbTx exibiu uma "curvatura negativa" na zona de potenciais positivos (**Figura 4.14 (D)**).

Em seguida descreve-se a ação inibidora de iberiotoxina na presença de stromatoxina, utilizada como antes para inibir canais K_v2 .

A **Figura 4.15 (A)** mostra o efeito inibidor de 50 nM IbTx na corrente de K^+ registada na presença de 100 nM ScTx. Tal como se observou anteriormente (ver **Figura 4.14 (A)**) IbTx inibiu mais acentuadamente a corrente na fase inicial do pulso, pondo em evidência uma corrente de ativação lenta, que na **Figura 4.14 (A)** não foi tão evidente. O efeito de IbTx foi portanto semelhante ao de PTA (ver **Figura 4.13 (A)**).

A **Figura 4.15 (B)** mostra que a corrente sensível a IbTx, obtida subtraindo a corrente registada na presença da toxina (IbTx + ScTx) à corrente controlo (ScTx), tem características semelhantes às observadas anteriormente. Trata-se de fato de uma corrente de ativação rápida (tempo necessário para atingir $100(1-e^{-1}) = 63\%$ da corrente máxima < 4 ms) e que atingiu um máximo em 10-25 ms, sendo subsequentemente controlada por um processo de inativação parcial que a reduziu no final do pulso a aproximadamente 67 % da corrente máxima.

Finalmente, investigou-se a possibilidade de PTA ou IbTx inibirem a corrente K_v . Para tal as correntes BK foram suprimidas expondo as células a uma baixa concentração (3 mM) de TEA⁺ (ver secção 4.1.1 e **Figura 4.2**). Tal como se ilustra na **Figura 4.16**, a célula foi estimulada com pulsos de potencial de + 60 mV, o que induziu o aparecimento das correntes de saída anteriormente descritas. Pode verificar-se que nenhum dos inibidores BK (50 nM IbTx ou 50 nM PTA) afetou a amplitude das correntes.

Os resultados obtidos nesta secção indicam que penitrem A exerceu uma ação inibidora na corrente de K^+ semelhante à de iberiotoxina, reforçando a ideia de

Correntes de K⁺ mediadas por canais BK

que o alcalóide inibe a corrente mediada por canais BK na célula β , tal como noutros tipos celulares (Knaus *et al.*, 1994; Asano *et al.*, 2012).

Em primeiro lugar, tanto PTA como IbTx inibiram a corrente ao longo de um pulso despolarizante. A inibição foi razoavelmente independente da voltagem em ambos os casos e incidiu tanto na fase inicial como na fase final da corrente, não obstante o fenótipo da "corrente BK" (aqui considerada como a diferença entre a corrente total e a corrente registada na presença de PTA ou IbTx) ter características de inativação parcial (ver à frente).

Em segundo lugar, a "corrente BK" é uma corrente de ativação muito rápida (tempo necessário para atingir 63 % da corrente máxima a + 60 mV geralmente inferior a 3-4 ms). Este tempo é compatível com a cinética de ativação de canais BK noutras preparações (Sah & Louise Faber, 2002; Cui *et al.*, 2009). O facto de PTA aumentar moderadamente a constante de tempo de ativação da corrente total sugere que a "corrente BK" constitui a componente mais rápida daquela corrente. No entanto, o reduzido valor da constante de tempo ainda assim obtido na presença de PTA não é compatível com a possibilidade de a restante corrente ser maioritariamente a corrente K_v, cuja cinética de ativação é muito mais lenta. A explicação mais plausível para esta discrepância é que a corrente tipo A (uma corrente de ativação muito rápida, ver **Figura 4.5 (C)**) não esteja totalmente inativada a $V_h = -70$ mV, contribuindo assim para a corrente total. Deve salientar-se que, mesmo estando presente, esta corrente não contribuiria para a formação da "corrente BK". Desta forma, as características cinéticas da "corrente BK" refletem exclusivamente as propriedades de ativação e inativação dos canais BK.

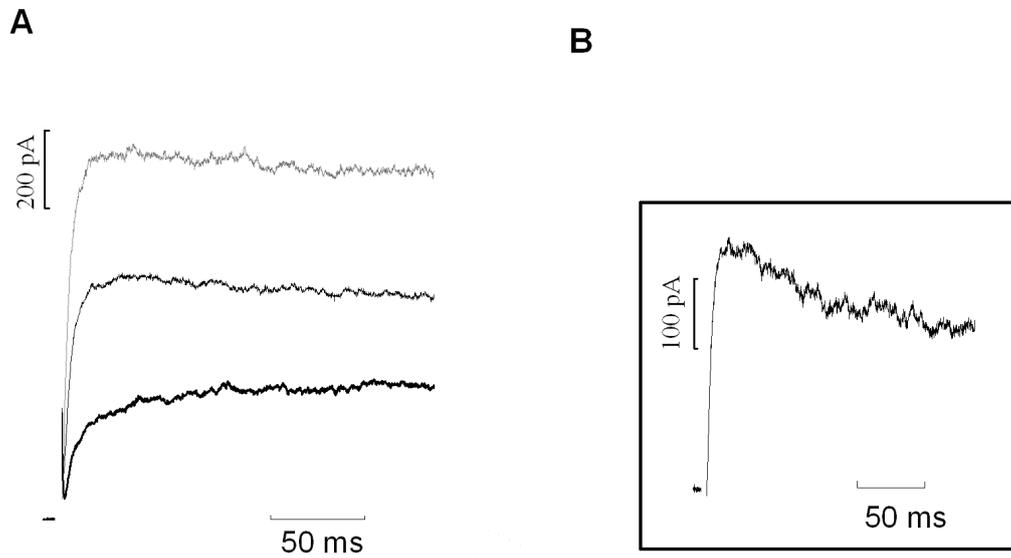


Figura 4.15: Efeito de iberiotoxina na corrente registada na presença de stromatoxina (ScTx). As correntes foram registadas aplicando pulsos retangulares de potencial para $+60$ mV a partir de $V_h = -70$ mV segundo uma metodologia idêntica à da experiência ilustrada na **Figura 4.10**. **(A)** Efeito de 100 nM ScTx (traço intermédio) e de 50 nM iberiotoxina (IbTx) + ScTx (traço inferior) na corrente controlo (traço superior); **(B)** Corrente sensível a IbTx, obtida por subtração da corrente registada na presença de 100 nM ScTx + 50 nM IbTx à corrente registada na presença de ScTx.

Correntes de K⁺ mediadas por canais BK

Em terceiro lugar, a curva I/V da "corrente BK" exibe uma "curvatura negativa" para potenciais próximos do potencial de equilíbrio de Ca²⁺, provavelmente decorrente da diminuição da força eletromotriz para a entrada de Ca²⁺. É portanto possível que a amplitude da corrente não seja estritamente determinada pela voltagem aplicada e pelo valor global da [Ca²⁺]_i (determinado pela solução da pipeta), podendo ser também afetada por influxo de Ca²⁺ através de canais Cav co-localizados com canais BK em subdomínios membranares (Fakler & Adelman, 2008). Contudo a referida curvatura está longe de assumir a forma de sino que constitui a assinatura da corrente BK (Smith *et al.*, 1990), pelo que a contribuição do influxo de Ca²⁺ para a activação de canais BK deve ser considerada residual. De fato, nas condições das experiências (extensa diálise do citoplasma pelo conteúdo da pipeta) os canais Cav estão sujeitos a *rundown*, contribuindo de forma muito limitada para o influxo de Ca²⁺ (Plant, 1988).

Em quarto lugar, nem PTA nem IbTx inibiram a corrente de K⁺ resistente a 3 mM TEA⁺, demonstrando a insensibilidade dos canais K_v a ambos os agentes.

O processo de inativação observado nas "correntes BK" merece alguns comentários adicionais. O decaimento das correntes é particularmente acentuado quando a célula é despolarizada para valores próximos do potencial de equilíbrio de Ca²⁺ (por exemplo + 60 mV), o que exclui a possibilidade de ser causado por desativação de canais BK subsequente à inativação de canais Cav e inerente redução da [Ca²⁺]_i nos sub-domínios onde estão presentes os aglomerados Cav/BK.

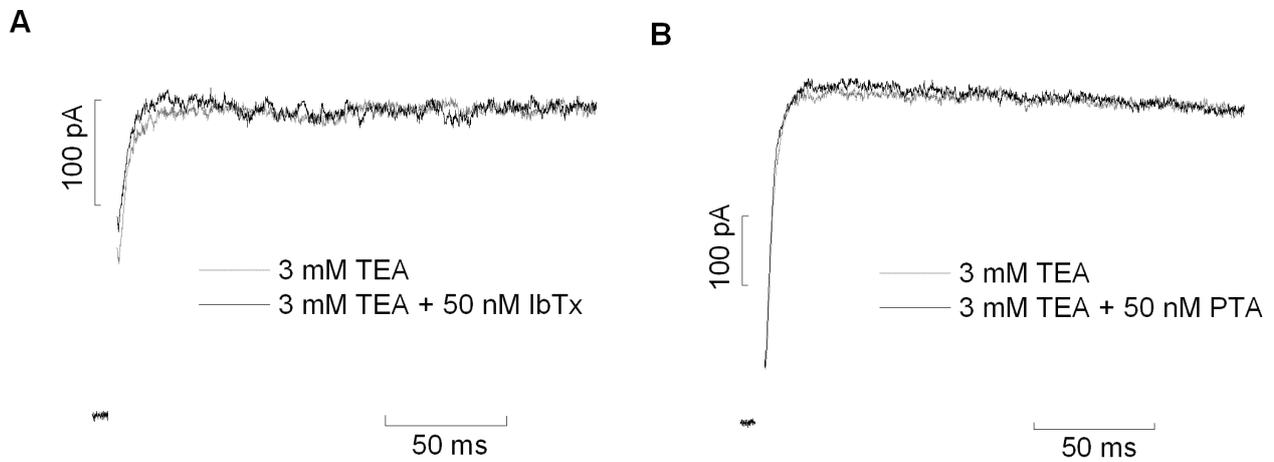


Figura 4.16: Efeito de iberiotoxina e penitrem A nas correntes induzidas por despolarização, na presença de 3 mM TEA⁺. **(A)** Corrente observada em resposta a um pulso de potencial de +60 mV a partir de $V_h = -70$ mV, na presença (traço a negro) e ausência (traço a cinzento) de 50 nM iberiotoxina (IbTx). A célula foi exposta continuamente a 3 mM TEA⁺; **(B)** O mesmo que em A, exceto que IbTx foi substituída por 50 nM penitrem A (PTA). As correntes foram registadas segundo uma metodologia idêntica à da experiência ilustrada na **Figura 4.10**.

Correntes de K⁺ mediadas por canais BK

Em certos tipos celulares (por exemplo, células cromafins da medula adrenal de rato e células tumorais secretoras de insulina RINm5F) foram detetados processos de inativação de correntes BK particularmente rápidos e extensos (Solaro & Lingle, 1992; Li *et al.*, 1999). A co-expressão da subunidade α que forma o poro (BK α) com subunidades reguladoras β 2 (BK β 2) (Wallner *et al.*, 1999) ou β 3 (BK β 3) (Xia *et al.*, 1999) produziu canais com idênticas características de inativação. Recentemente Ohya e colaboradores descobriram uma nova variante de *splicing* de BK β 2 (BK β 2b), amplamente expressa em tecido pancreático humano e de roedores, bem como em células RINm5F; surpreendentemente, ao contrário da variante de *splicing* original da subunidade β 2 (BK β 2a), a co-expressão de BK β 2b com BK α produziu canais desprovidos de inativação (Ohya *et al.*, 2010). Assim, é possível que a variabilidade de fenótipos de inativação, observada entre diferentes tecidos e mesmo dentro de populações celulares essencialmente homogêneas, possam resultar não só da associação de BK α com diferentes subunidades β (BK β 1-4, muito embora só BK β 2 e BK β 3 confirmam propriedades de inativação), como também da expressão diferencial de variantes de *splicing* destas últimas.

É sabido que podem ser produzidos diferentes fenótipos de inativação em função das combinações heteromultiméricas dos canais BK (4 subunidades BK α + 1 a 4 subunidades BK β) (Ding *et al.*, 1998). Isto pode explicar o fato de, em contraste com as “correntes BK” observadas em células BRIN-BD11 nalgumas experiências (ver **Figuras 4.8 e 4.9**), as correntes registadas em células β durante o presente trabalho exibirem consistentemente processos de inativação pronunciados, embora lentos e saturáveis. Curiosamente as células HIT (insulinoma de hamster) exibem quase exclusivamente canais BK sem inativação (Li *et al.*, 1999), ao contrário de células RINm5F, que têm sido descritas como exibindo fenótipos quase puros de inativação rápida e completa (Li *et al.*, 1999) ou fenótipos mistos, em que certas células exibem inativação e outras não (Ohya *et al.*, 2010). O fenótipo de inativação observado por outros autores (Houamed *et al.*, 2010) em células de murganho assemelha-se ao aqui descrito.

As bases moleculares e função do processo de inativação das correntes BK permanecem largamente desconhecidos na célula β , constituindo um campo promissor de estudo.

Capítulo 5

Modulação da atividade elétrica por bloqueadores dos canais SK

Resultados

5.1 Ação de UCL 1684 e apamina nos *bursts* de atividade elétrica

5.2 Ação de UCL 1684 e apamina nos potenciais de ação

5. Modulação da atividade elétrica por bloqueadores dos canais SK

Neste capítulo proceder-se-á ao estudo do envolvimento de canais SK na geração de potenciais de ação e *bursts* de atividade elétrica da célula β -pancreática, registados com microelétrodos intracelulares em ilhéus microdissecados. Não foram registadas correntes de K^+ mediadas por canais SK, dada a condutância destes canais ser baixa e as correntes difíceis de discriminar das outras correntes K_{Ca} .

As experiências envolveram a perfusão de ilhéus com um inibidor peptídico (apamina) ou não-peptídico (UCL 1684) de canais SK. A apamina é hoje considerada absolutamente específica para canais SK, inibindo os vários subtipos (SK1, SK2 e SK3) a concentrações sub-nM ou da ordem de poucos nM e não se conhecendo proteínas distintas daquelas onde a ligação à toxina ocorra com perda de função (Adelman *et al.*, 2012).

O interesse por UCL 1684 (Rosa *et al.*, 1998) proveio do estudo de Zhang *et al.* (2005), onde se mostrou que o bloqueador SK tinha a capacidade de inibir a corrente K_{slow} subjacente ao *burst*. No entanto, nesse estudo não foi investigado o efeito de UCL 1684 na atividade elétrica oscilatória. Lebrun e colaboradores (1983) verificaram que a apamina, utilizada a concentrações muito elevadas (1 μ M), aparentemente não influenciava a atividade elétrica de ilhéus de ratinho estimulados com 11 mM glicose. Tendo-se admitido que esta aparente insensibilidade pudesse refletir problemas de penetração da toxina no tecido do ilhéu, foram feitas tentativas para demonstrar o seu efeito inibidor da toxina na corrente K_{slow} . Curiosamente estas tentativas revelaram-se infrutíferas (Gopel *et al.*, 1999; Goforth *et al.*, 2002), incluindo a realizada mais recentemente por Zhang *et al.* (2005).

O interesse pela ação de bloqueadores SK proveio também do conhecimento de que os canais SK desempenham um papel fundamental na gênese da AHP de duração média (mAHP) e na regulação da excitabilidade em neurónios (Bond *et al.*, 1999; Adelman *et al.*, 2012). Tendo em conta que as células do ilhéu contêm os genes que codificam os vários canais SK (Tamarina *et al.*, 2003), pareceu plausível

que a atividade elétrica da célula β -pancreática pudesse ser afectada por apamina e UCL 1684 ao nível do potencial de ação (p.a.).

5.1 Ação de UCL 1684 e apamina nos *bursts* de atividade elétrica

O papel dos canais SK na atividade elétrica oscilatória foi primeiramente investigado recorrendo a UCL 1684 (0,5-1 μ M), aplicado a ilhéus estimulados com 11 mM glicose.

A **Figura 5.1** ilustra a atividade elétrica registada em condições controlo (11 mM glicose, esquerda) e na presença do fármaco, tal como é indicado à direita pela barra horizontal. Tal como se observou anteriormente, a atividade elétrica consiste em fases hiperpolarizadas (silenciosas) que alternam com fases despolarizadas (ativas) onde se sobrepõem potenciais de ação.

Surpreendentemente, tomando em conta os efeitos de UCL 1684 na corrente K_{slow} descritos por Zhang et al. (2005), uma inspeção rápida da **Figura 5.1** não permite detectar efeitos substanciais do fármaco. No entanto, uma inspeção mais apurada, possibilitada pela expansão temporal das oscilações, permite detectar alguns efeitos mais subtis que importa realçar, tipificados em termos do potencial de patamar (tomado como o potencial limiar médio dos potenciais de ação), principalmente na fase inicial dos *bursts*. Esta inspeção realça também o efeito do fármaco na duração dos *bursts*.

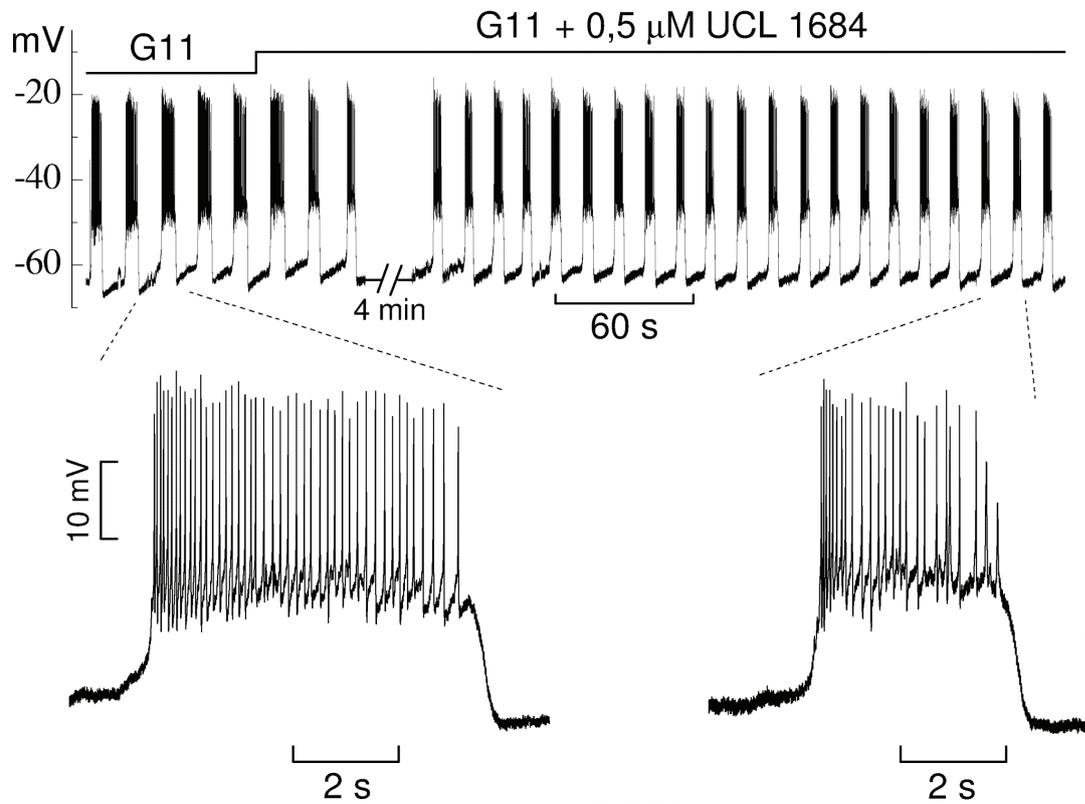


Figura 5.1: Efeito de UCL 1684 na atividade elétrica oscilatória. Registo do potencial de membrana da célula β -pancreática num ilhéu isolado, exposto continuamente a 11 mM glicose (G11). UCL 1684 foi adicionado e mantido em solução tal como é indicado pela barra horizontal. A interrupção do registo tem a duração de 4 minutos. São também ilustradas expansões de *bursts* representativos, registados durante o controlo e na presença de UCL 1684.

Modulação da atividade elétrica por bloqueadores dos canais SK

Assim, na experiência ilustrada na **Figura 5.1**, verificou-se que o potencial de patamar no início (primeiros segundos) do *burst* é cerca de 1,6 mV mais positivo na presença de UCL 1684 relativamente ao controlo (valores médios: $-43,1 \pm 1,6$ mV vs. $-44,7 \pm 1,5$ mV, respectivamente; $n = 72-86$ p.a., $p < 0,01$). O desvio do potencial de patamar para valores mais positivos, induzido por aplicação de $0,5 \mu\text{M}$ UCL 1684, foi observado num conjunto mais alargado de experiências (6 e 4 ilhéus expostos a $0,5$ e $1 \mu\text{M}$ UCL 1684, respetivamente).

A análise do efeito de UCL 1684 ($0,5$ e $1 \mu\text{M}$) na duração média dos *bursts*, medida no controlo e ao fim de cerca de 10 minutos de aplicação do fármaco, é apresentada na **Figura 5.2** para as várias experiências efetuadas.

Contrariamente ao esperado com base no efeito de UCL 1684 na corrente K_{slow} descrito por Zhang et al. (2005), verificou-se que o efeito predominante do fármaco foi o de diminuir a duração dos *bursts* (9 ilhéus em 10). No entanto, em vários casos a extensão do efeito foi ligeira e não teve significado estatístico (ver legenda da **Figura 5.2**). Quando expressa em termos da percentagem da duração medida no controlo, a diminuição média da duração induzida por $0,5$ e $1 \mu\text{M}$ UCL 1684 foi de $17 \pm 14 \%$ e $14 \pm 11 \%$, respetivamente.

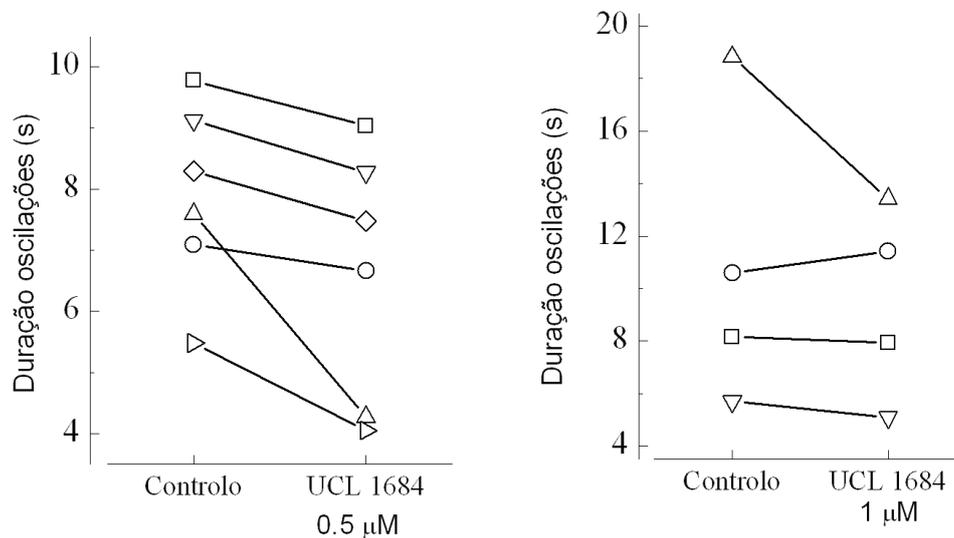


Figura 5.2: Efeito de UCL 1684 na duração média dos *bursts* de atividade elétrica. Para cada experiência, realizada de acordo com um protocolo semelhante ao da **Figura 5.1**, a duração média dos *bursts* foi determinada no controlo (11 mM glicose) e aproximadamente ao fim de 10 minutos de aplicação de 0,5 μM (gráfico à esquerda) e 1 μM UCL 1684 (gráfico à direita). Diminuições da duração com significado estatístico para as experiências com 0,5 μM UCL 1684: quadrados, losangos e triângulo orientados para a direita (valores de p inferiores a 0,001, 0,01 ou 0,05); diminuições da duração com significado estatístico para as experiências com 1 μM UCL 1684: triângulos normais e triângulos orientados para baixo (valores de p inferiores a 0,001 ou 0,01). A experiência ilustrada na **Figura 5.1** corresponde aos triângulos orientados para a direita no gráfico à esquerda.

Modulação da atividade elétrica por bloqueadores dos canais SK

A apamina afetou os *bursts* de atividade elétrica de uma forma semelhante ao observado com UCL 1684, tal como se ilustra na **Figura 5.3 (A)**. A toxina foi aplicada invariavelmente à concentração de 1 μM , de modo a maximizar os efeitos na célula β -pancreática, principalmente quando esta se localizava numa região menos superficial do ilhéu.

É de fato visível, em primeiro lugar, que a apamina reduziu a duração dos *bursts* (3 ilhéus em 4; **Figura 5.3 (B)**). Quando expressa em termos da percentagem da duração medida no controlo, a diminuição média da duração induzida por apamina foi de $18 \pm 7 \%$. Este valor é da mesma ordem de grandeza que os calculados anteriormente para os efeitos de 0,5 e 1 μM UCL 1684.

A análise dos *bursts* expandidos (**Figura 5.3 (A)**) permite verificar, por outro lado, que, na presença de apamina, os potenciais de ação no início do *burst* são disparados a partir de valores de potencial de membrana significativamente mais positivos do que os registados no controlo. Ou seja, o potencial de patamar no início do *burst* foi aumentado por apamina, em concordância com o verificado com UCL 1684.

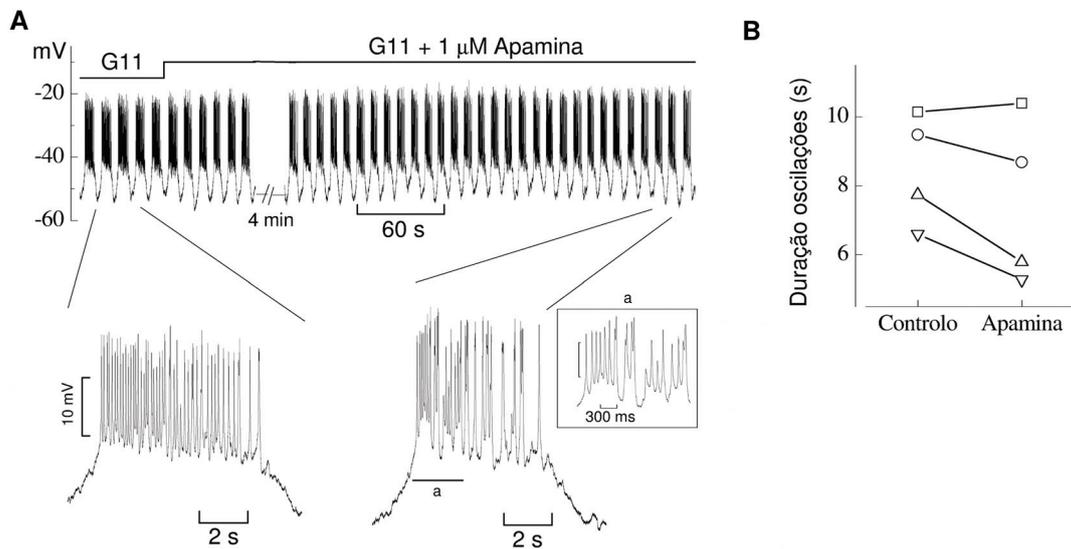


Figura 5.3: Efeito de 1 μ M apamina na atividade elétrica oscilatória. **(A)** Registo do potencial de membrana da célula β -pancreática num ilhéu isolado, exposto continuamente a 11 mM glicose (G11). A apamina foi adicionada e mantida em solução tal como é indicado pela barra horizontal. A interrupção do registo tem a duração de 4 minutos. São também ilustradas expansões de *bursts* representativos, registados durante o controlo e na presença de apamina. O retângulo representa uma expansão temporal do registo de atividade elétrica delimitado pelo segmento identificado com letra a (fase inicial do *burst*); **(B)** Efeito de 1 μ M apamina na duração média dos *bursts* de atividade elétrica. Para cada experiência, realizada de acordo com um protocolo semelhante ao do painel A, a duração média dos *bursts* foi determinada no controlo (11 mM glicose) e aproximadamente ao fim de 10 minutos de aplicação de apamina. Diminuição da duração com significado estatístico: triângulo normal ($p < 0,001$). A experiência ilustrada no painel A corresponde ao triângulo orientado para cima.

Os dados relativos à duração do *burst* sugerem que os canais SK não representam a principal condutância de K_{slow} , um ponto que será retomado na Discussão.

5.2 Ação de UCL 1684 e apamina nos potenciais de ação

Na experiência ilustrada na **Figura 5.3 (A)** pode verificar-se que a apamina afetou profundamente a regularidade de disparo dos potenciais de ação, induzindo agrupamentos de potenciais de ação incompletos separados por períodos hiperpolarizados. Muito embora este padrão "caótico" de disparo não tenha sido produzido por UCL 1684 na experiência ilustrada na **Figura 5.1**, foi observado em várias outras experiências em que o bloqueador foi utilizado. A disrupção causada por UCL 1684 (0,5 ou 1 μ M) e apamina será descrita em seguida.

A **Figura 5.4 (A)** ilustra uma experiência em que a disrupção do disparo de potenciais de ação causada por UCL 1684 foi particularmente evidente, apresentando-se a fase ativa de um *burst* representativo do período controlo (à esquerda) e a fase ativa de um *burst* representativo do período em que foi aplicado o bloqueador (à direita).

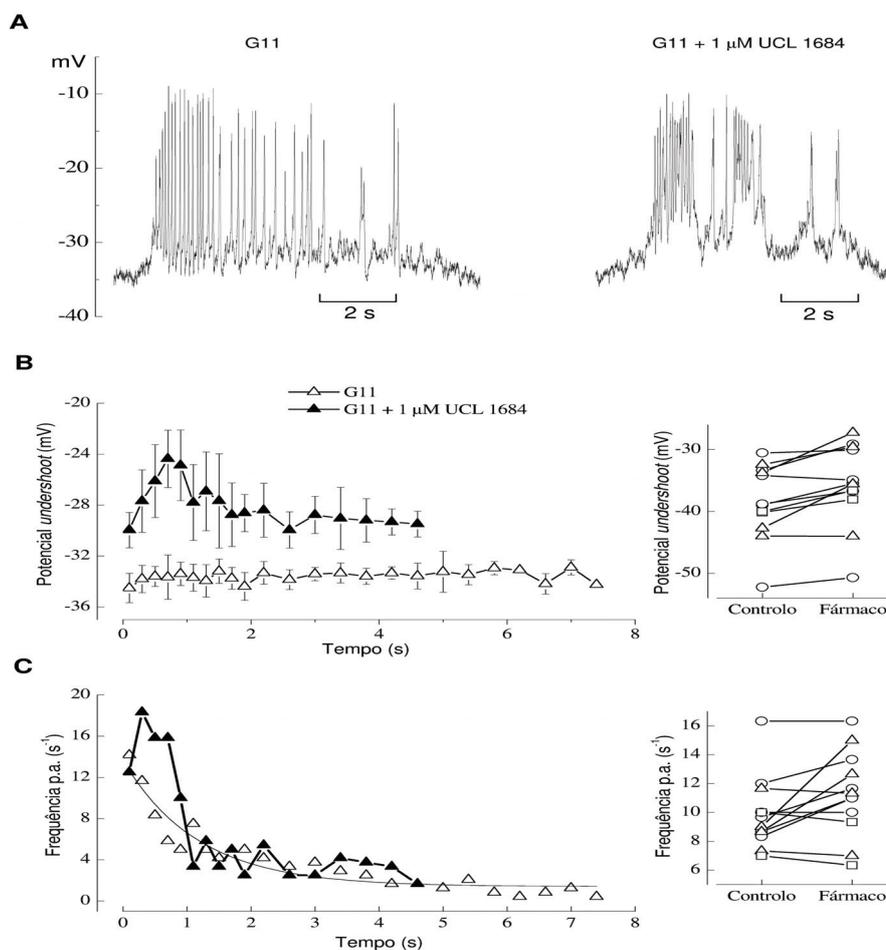


Figura 5.4: Disrupção do disparo de potenciais de ação por UCL 1684. **(A)** Fases ativas de *bursts* representativas da atividade elétrica, registada no controlo (G11) e após exposição do ilhéu a 1 μ M UCL 1684; **(B) (gráfico à esquerda)** Curso temporal do valor médio do potencial de *undershoot* (potencial mais negativo atingido imediatamente após cada potencial de ação), calculado após amostragem de 200 em 200 ms (primeiro período de 2 s) ou de 400 em 400 ms (até ao final do *burst*) ao longo de três *bursts*, registados durante o período controlo (triângulos vazios) ou após aplicação de UCL 1684 (triângulos a cheio). Os dados, obtidos a partir da experiência ilustrada no painel A, são apresentados como média \pm desvio padrão; **(B) (gráfico à direita)** Efeito da aplicação de 0,5 μ M UCL 1684 (círculos), 1 μ M UCL 1684 (triângulos) ou 1 μ M apamina (quadrados) nos valores médios dos potenciais de *undershoot*, calculados durante o primeiro segundo de cada um de três *bursts* a partir de experiências semelhantes à ilustrada no painel A. O controlo refere-se ao período em que o ilhéu se encontra exposto a 11 mM glicose sem bloqueador; **(C) (gráfico à esquerda)** Curso temporal ao longo do *burst* do valor médio da frequência de potenciais de ação, calculado após amostragem idêntica à descrita em B para o período controlo (triângulos vazios) ou após aplicação de UCL 1684 (triângulos a cheio); **(C) (gráfico à direita)** Efeito da aplicação de 0,5 μ M UCL 1684 (círculos), 1 μ M UCL 1684 (triângulos) ou 1 μ M apamina (quadrados) nos valores médios da frequência dos potenciais de ação, calculados durante o primeiro segundo de cada um de três *bursts* a partir de experiências semelhantes à ilustrada no painel A.

Modulação da atividade elétrica por bloqueadores dos canais SK

A aplicação de UCL 1684 traduziu-se no disparo de grupos de potenciais de ação em que estes não sofreram o processo de repolarização completo, eventualmente separados por períodos hiperpolarizados com duração variável. Os potenciais mais negativos atingidos imediatamente após cada potencial de ação (aqui designados como "potenciais de *undershoot*") definiram assim um contorno irregular, indicativo de uma despolarização global dentro do *burst*.

A **Figura 5.4 (B) (gráfico à esquerda)** representa uma tentativa de colocar em evidência este contorno de potencial. Para tal procedeu-se a uma amostragem dos potenciais de *undershoot* de 200 em 200 ms ao longo do primeiro período de 2 s de cada um de três *bursts* (contado a partir da ocorrência do primeiro potencial de ação), a que se seguiu uma amostragem de 400 em 400 ms até ao final do *burst*, tanto na situação controlo como na presença de UCL 1684. O gráfico mostra o curso temporal do valor médio \pm desvio padrão de todos os potenciais medidos para cada período homólogo de amostragem.

Pode verificar-se que, em média, os potenciais de ação sofreram repolarização para valores bastante mais negativos na situação controlo. Estes valores mantiveram-se essencialmente constantes ao longo do *burst*. No caso de ilhéus expostos a UCL 1684, o potencial de *undershoot* médio aumentou durante o primeiro segundo do *burst*, a que se seguiu um decaimento para um patamar cerca de 6 mV mais despolarizado do que o patamar controlo.

A média dos potenciais de *undershoot* foi calculada para todas as experiências realizadas com UCL 1684 (0,5 e 1 μ M) ou apamina. O cálculo envolveu, para cada experiência, todos os potenciais de ação disparados ao longo do primeiro segundo de cada um de três *bursts*, registados no período controlo ou na presença do bloqueador. Os resultados são apresentados na **Figura 5.4 (B) (gráfico à direita)**.

Pode verificar-se que o potencial de *undershoot* médio, calculado na fase inicial do *burst*, sofreu uma alteração considerável (isto é, assumiu valores menos negativos) num número elevado de experiências (9 em 12) após aplicação do bloqueador. Nos restantes casos permaneceu inalterado ou sofreu ligeiras

alterações para valores mais negativos. A tendência de variação não pareceu depender da natureza ou concentração do bloqueador.

O efeito de UCL 1684 nos potenciais de *undershoot*, medido durante a fase inicial do *burst*, foi acompanhado por um aumento acentuado da frequência dos potenciais de ação, tal como se ilustra na **Figura 5.4 (C) (gráfico à esquerda)** para a experiência do painel A. Este aumento foi transitório, ocorrendo um decaimento rápido para valores próximos do controlo ao fim de aproximadamente 1 s. É de salientar que a frequência dos potenciais de ação, determinada no período controlo da experiência, sofreu um decaimento exponencial desde o início do *burst*.

A frequência média dos potenciais de ação foi calculada para todas as experiências realizadas com UCL 1684 (0,5 e 1 μ M) ou apamina. Tal como para os potenciais de *undershoot* o cálculo envolveu, para cada experiência, todos os potenciais de ação disparados ao longo do primeiro segundo de cada um de três *bursts*, registados no período controlo ou na presença do bloqueador. Os resultados são apresentados na **Figura 5.4 (C) (gráfico à direita)**.

Pode verificar-se que a frequência média dos potenciais de ação, calculada na fase inicial do *burst*, sofreu um aumento considerável após aplicação do bloqueador em 50 % das experiências (6 em 12). Nos restantes casos permaneceu inalterada ou sofreu ligeiras diminuições.

Proceder-se-á em seguida a uma tentativa para avaliar a ação de apamina e UCL 1684 noutras características dos potenciais de ação, não imediatamente perceptíveis nos registos até aqui apresentados: amplitude, duração e AHP (hiperpolarização pós potencial).

Uma das consequências da aplicação dos bloqueadores, anteriormente evidenciada, é o desvio do potencial limiar de disparo dos potenciais de ação para valores menos negativos. Este desvio, de amplitude variável de ilhéu para ilhéu, tendeu a ser mais pronunciado em experiências em que os bloqueadores provocaram uma disrupção mais acentuada do padrão de disparo. É plausível que as características dos potenciais de ação atrás referidas (amplitude, duração e AHP) dependam criticamente do valor do potencial limiar, razão por que a análise se restringiu, para cada experiência, a um sub-conjunto de potenciais de ação com

Modulação da atividade elétrica por bloqueadores dos canais SK

limiares de disparo praticamente “isopotenciais”, tanto no período controle como durante a aplicação do bloqueador. Esta exigência fez com que certas experiências não pudessem ter sido consideradas para análise, dada a escassez (ou mesmo ausência) de potenciais de ação com limiares de disparo "isopotenciais". A análise foi também restringida a potenciais de ação não agrupados (não exibiram repolarizações completas).

A **Figura 5.5** é representativa das seis experiências efetuadas com UCL 1684 (0,5 ou 1 μM) em que foi possível fazer uma amostragem significativa de potenciais de ação com limiares de disparo "isopotenciais". Nesta experiência, o intervalo de potenciais considerado para a restrição dos potenciais de ação foi o compreendido entre - 40 e - 38 mV. O painel A mostra registos expandidos da fase ativa de *bursts*, obtidos no controle e durante aplicação de 1 μM UCL 1684.

Pode verificar-se (**Figura 5.5 (B)**) que UCL 1684 aumentou ligeiramente a amplitude dos potenciais de ação, não sendo no entanto o efeito estatisticamente significativo nesta experiência. A duração dos potenciais de ação foi aumentada em 12 % (n = 43 potenciais de ação para cada uma das condições, p < 0,05). Já a AHP foi inibida em 14 % (n = 43 potenciais de ação para cada uma das condições, p < 0,05). Efeitos qualitativamente idênticos, embora de extensão variável, foram obtidos em duas experiências adicionais com 1 μM UCL 1684 e em três experiências com 0,5 μM UCL 1684.

Modulação da atividade elétrica por bloqueadores dos canais SK

A **Figura 5.6** é representativa das duas experiências efetuadas com 1 μM apamina em que foi possível fazer uma amostragem significativa de potenciais de ação com limiares de disparo "isopotenciais". Nesta experiência, o intervalo de potenciais considerado para a restrição dos potenciais de ação foi o compreendido entre -34 e -33 mV.

Pode verificar-se (**Figura 5.6 (C)**) que a ação de apamina nos três parâmetros foi qualitativamente idêntica à de UCL 1684. De facto, enquanto que a amplitude dos potenciais de ação praticamente não sofreu alteração, a duração foi aumentada em 17 % (n = 7 p.a. no controlo e 13 p.a. na presença da toxina; $p < 0,05$) e a AHP reduzida em 47 % (n = 7 p.a. no controlo e 13 p.a. na presença da toxina; $p < 0,01$). Estes efeitos podem também observar-se nos registos sobrepostos de potenciais de ação da **Figura 5.6 (B)**. Efeitos qualitativamente idênticos, embora de extensão variável, foram obtidos numa experiência adicional com 1 μM apamina.

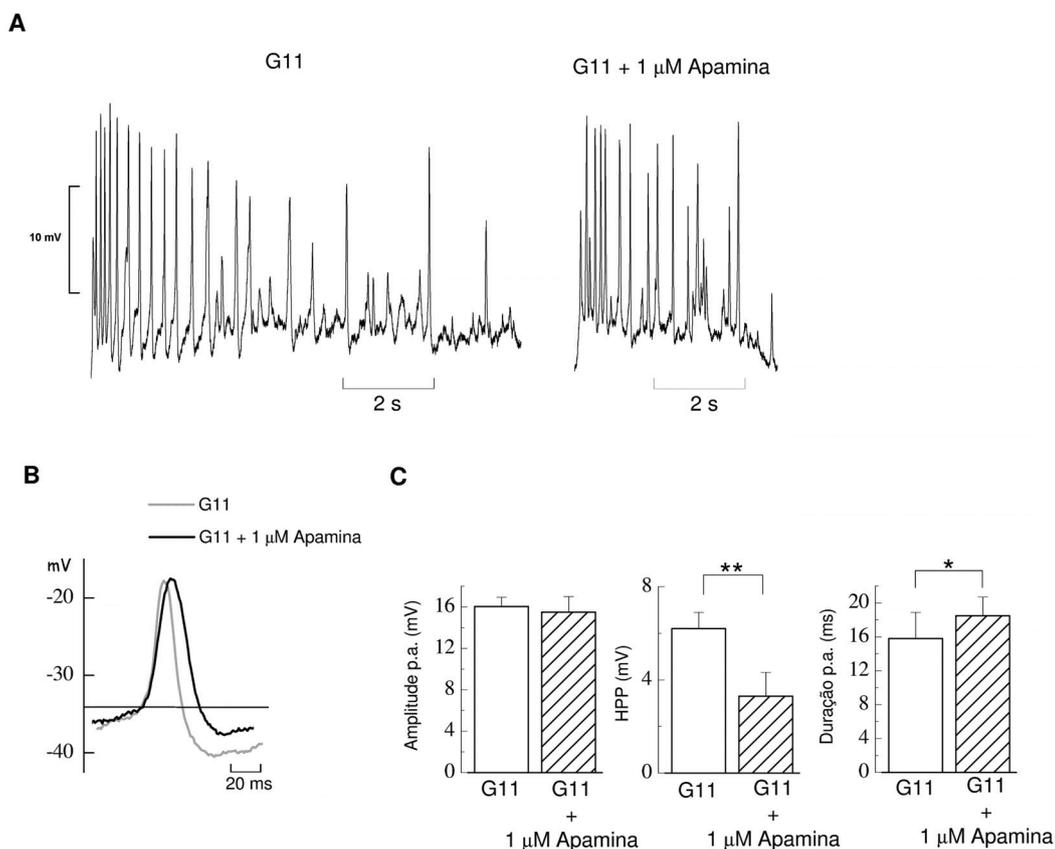


Figura 5.6: Efeito de apamina nos potenciais de ação em condições "isopotenciais" de limiar de disparo. (A) Um ilhéu foi exposto a 11 mM glicose (G11) e a 1 μ M apamina na presença contínua de glicose, segundo um protocolo idêntico ao da **Figura 5.3**. São apresentados registos expandidos de atividade elétrica, obtidos no período controlo (esquerda) e na presença da toxina (direita). A análise dos vários parâmetros dos potenciais de ação foi restringida a um sub-conjunto de potenciais de ação com limiares de disparo praticamente isopotenciais (entre -34 mV e -33 mV), tanto no período controlo como durante a aplicação do bloqueador (informação mais detalhada no texto principal) (B) Potenciais de ação sobrepostos com idêntico limiar de disparo (indicado pela linha horizontal), registados no controlo (G11) e na presença de apamina ("G11 + Apamina"); (C) Análise de vários parâmetros dos potenciais de ação com limiares de disparo "isopotenciais". A hiperpolarização pós potencial foi abreviada para HPP (AHP no texto principal). As colunas representam as médias \pm desvio padrão (n = 7-13 para os diferentes parâmetros). *, p < 0,05; **, p < 0,01.

Modulação da atividade elétrica por bloqueadores dos canais SK

Foram finalmente realizadas experiências preliminares em condições de disparo contínuo a uma frequência constante. Nestas experiências os ilhéus foram expostos a uma concentração muito elevada de glicose (30 mM) ou a um bloqueador de canais K_{ATP} (tolbutamida à concentração de 500 μM) na presença de 11 mM glicose. Ambas as intervenções resultaram na despolarização das células e na indução de um padrão de disparo contínuo de potenciais de ação, ilustrado na **Figura 5.7** (registo superior) para a experiência com 30 mM glicose.

Pode verificar-se que, na presença de 0,5 μM UCL 1684 (registo inferior), os potenciais de ação exibiram frequentemente uma repolarização incompleta (ex: 1º, 3º, 4º e 6º na **Figura 5.7**, painel inferior). Em consonância com o anteriormente descrito para situações "isopotenciais" do limiar de disparo em experiências com 11 mM glicose, e quando analisados somente os potenciais de ação que exibiram repolarizações completas (ex: 2º, 5º e 7º na **Figura 5.7**, painel inferior), o fármaco reduziu a AHP e aumentou a duração dos potenciais de ação. O UCL 1684 teve efeitos semelhantes quando aplicado na presença de tolbutamida, com a diferença de que se verificou um aumento mais pronunciado da amplitude dos potenciais de ação.

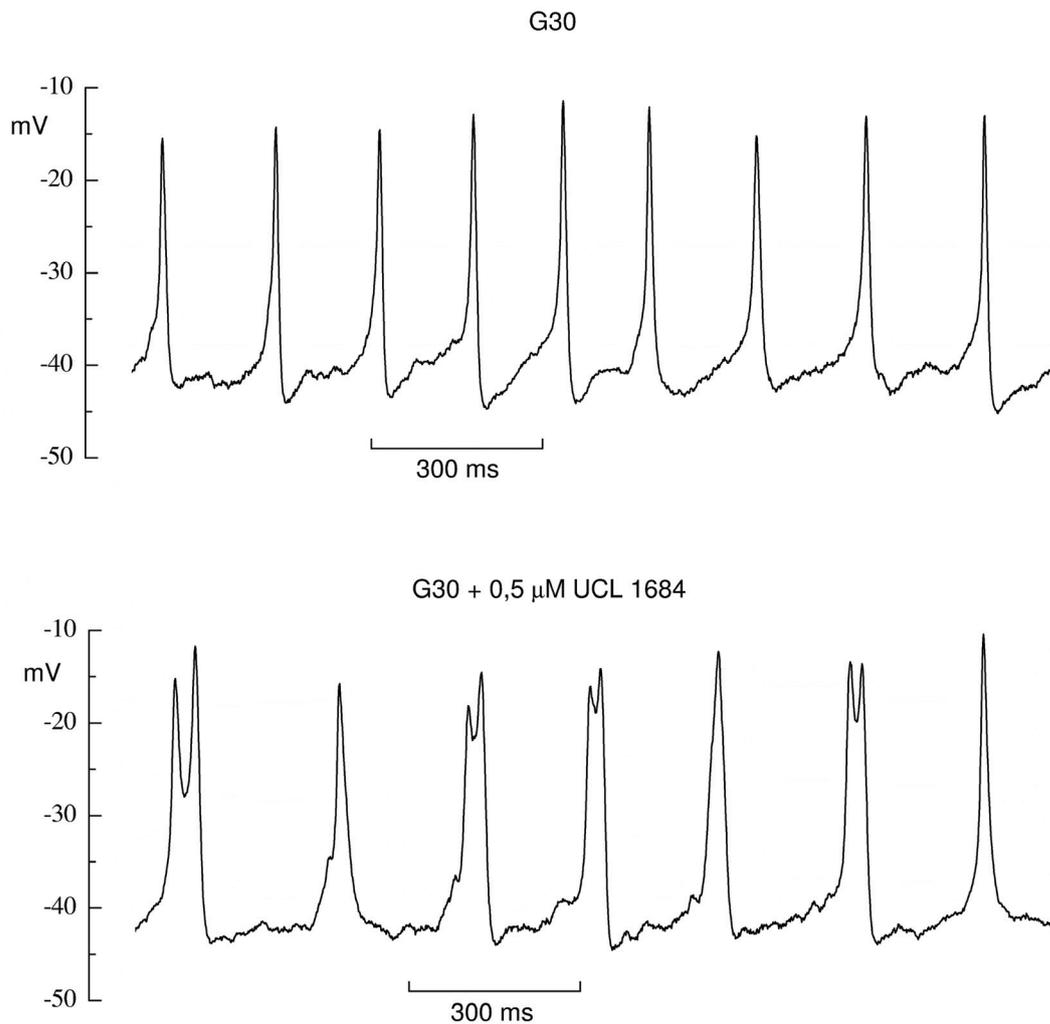


Figura 5.7: Efeito de UCL 1684 na atividade elétrica em 30 mM glicose. Um ilhéu foi exposto a 30 mM glicose (G30) e a 0,5 μM UCL 1684 na presença contínua de glicose, segundo um protocolo idêntico ao da **Figura 5.1**. São apresentados registos expandidos de atividade elétrica, obtidos no período controlo (em cima) e na presença do fármaco (em baixo).

Estes resultados sugerem que os canais SK, ao contrário dos canais BK, são ativados durante a repolarização do potencial de ação contribuindo para a duração deste, bem como para a AHP.

Capítulo 6

Eletrofisiologia de um bloqueador dos canais IK

Resultados

6.1 Ação de TRAM-34 nos *bursts* de atividade elétrica

6.2 Ação de TRAM-34 nos potenciais de ação

6.3 Sensibilidade farmacológica da corrente IK

6. Eletrofisiologia de um bloqueador dos canais IK

Neste capítulo proceder-se-á ao estudo do envolvimento de canais IK na geração de potenciais de ação e *bursts* de atividade elétrica, registados com microelétrodos intracelulares em ilhéus microdissecados. Foram ainda registadas correntes de K⁺ mediadas por canais IK, com o objectivo principal de validar a ferramenta farmacológica utilizada (TRAM-34).

Até ao momento não foram reportadas correntes IK na célula β -pancreática. No entanto, em células β TC-3 e células β -porcinas foi descrita uma corrente K_{Ca} de ativação lenta, insensível a apamina e inibida por clotrimazole, isto é, com as características principais de uma corrente IK (Kozak *et al.*, 1998).

O interesse por TRAM-34 (Wulff *et al.*, 2000) proveio do estudo de Dufer *et al.* (2009), onde se mostrou que o bloqueador IK tinha a capacidade de inibir a corrente K_{slow} subjacente ao *burst*.

Em neurónios, o processo de adaptação da frequência de disparo de potenciais de ação é causado pela corrente subjacente à AHP de duração longa (sAHP). Os canais responsáveis por esta corrente permanecem largamente desconhecidos (Andrade *et al.*, 2012), apesar de se admitir o envolvimento de canais IK nalguns tipos celulares (Neylon *et al.*, 2006; Nguyer *et al.*, 2007). Tendo em conta que a corrente K_{slow} da célula β -pancreática tem as características da corrente sAHP, pareceu plausível que a adaptação de frequência ao longo de um *burst* de potenciais de ação pudesse ser afetada por bloqueio da corrente IK.

6.1 Ação de TRAM-34 nos *bursts* de atividade elétrica

O papel dos canais IK na atividade elétrica oscilatória foi investigado recorrendo a TRAM-34 (2,5-7,5 μM), aplicado a ilhéus estimulados com 11 mM glicose.

Tomando em conta o efeito inibidor de TRAM-34 na corrente K_{slow} , descrito por Dufer et. al. (2009), esperar-se-ia que o fármaco aumentasse a duração dos *bursts* de atividade elétrica. Este efeito é de fato visível numa das experiências ilustradas na **Figura 6.1 (A - ilhéu 1)**, em que se verificou que 7,5 μM TRAM-34, aplicado na presença de 11 mM glicose, aumentou progressivamente a duração da fase ativa dos *bursts*. O resultado é representativo de 3 experiências num total de 5, realizadas segundo um protocolo idêntico.

Nas restantes duas experiências não se verificou, surpreendentemente, o efeito esperado. Na realidade, tal como se pode observar na segunda experiência ilustrada na **Figura 6.1 (B - ilhéu 2, ver *bursts* expandidos)**, 7,5 μM TRAM-34 reduziu a duração da fase ativa dos *bursts*, efeito que persistiu durante a exposição ao fármaco.

Uma inspeção mais apurada dos registos permitiu ainda verificar que TRAM-34 reduziu a duração da fase hiperpolarizada (silenciosa) dos *bursts* em todas as experiências efectuadas.

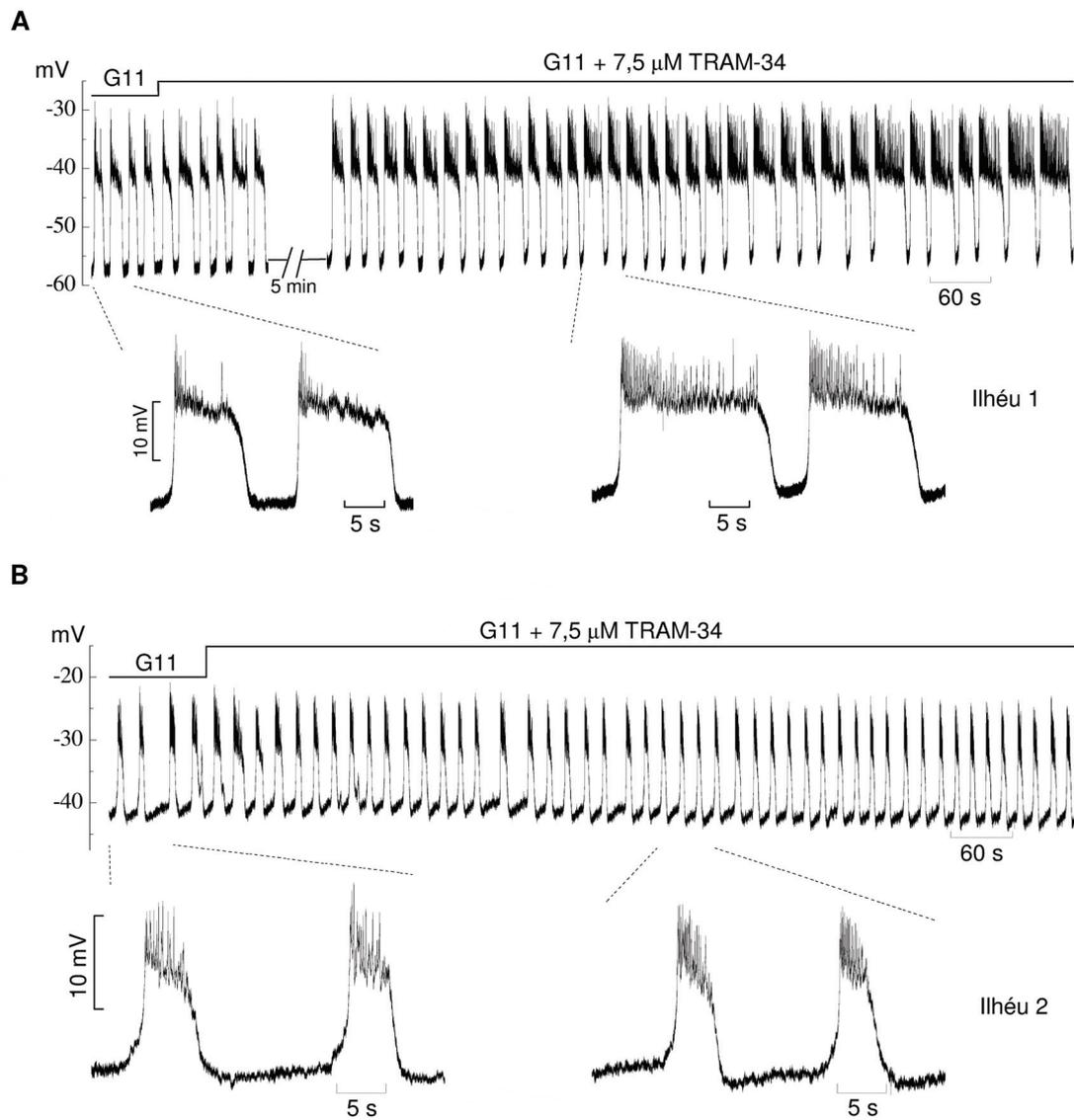


Figura 6.1: Efeito de TRAM-34 na atividade elétrica oscilatória. Registos do potencial de membrana da célula β -pancreática em dois ilhéus isolados diferentes (**A** - ilhéu 1; **B** - ilhéu 2), expostos continuamente a 11 mM glicose (G11). TRAM-34 foi adicionado e mantido em solução tal como é indicado pela barra horizontal. São também ilustradas expansões temporais de *bursts* representativas de cada experiência, registados durante o controlo e na presença de TRAM-34.

Eletrofisiologia de um bloqueador dos canais IK

O curso temporal dos efeitos de TRAM-34 na duração da fase ativa e silenciosa dos *bursts*, relativo às duas experiências ilustradas na **Figura 6.1**, é apresentado na **Figura 6.2**. Esta análise envolveu o cálculo do valor médio da duração da fase ativa (ou silenciosa) em grupos consecutivos de três *bursts*, antes e depois da aplicação do fármaco.

Pode verificar-se que o aumento da duração da fase ativa e a diminuição da duração da fase silenciosa, causados por TRAM-34 na experiência do ilhéu 1, se acentuaram ao longo de todo o período de aplicação, tendendo para a estabilização ao fim de 15-20 minutos. Já a diminuição da duração das fases activa e silenciosa, observada na experiência do ilhéu 2, pareceu sofrer estabilização mais cedo, tendendo para um máximo ao fim de aproximadamente 10 minutos de aplicação de TRAM-34. Tendo em conta a variabilidade do tempo de aplicação do fármaco nas várias experiências (14-28 minutos), considerou-se razoável proceder à quantificação dos efeitos aos 13-15 minutos de aplicação.

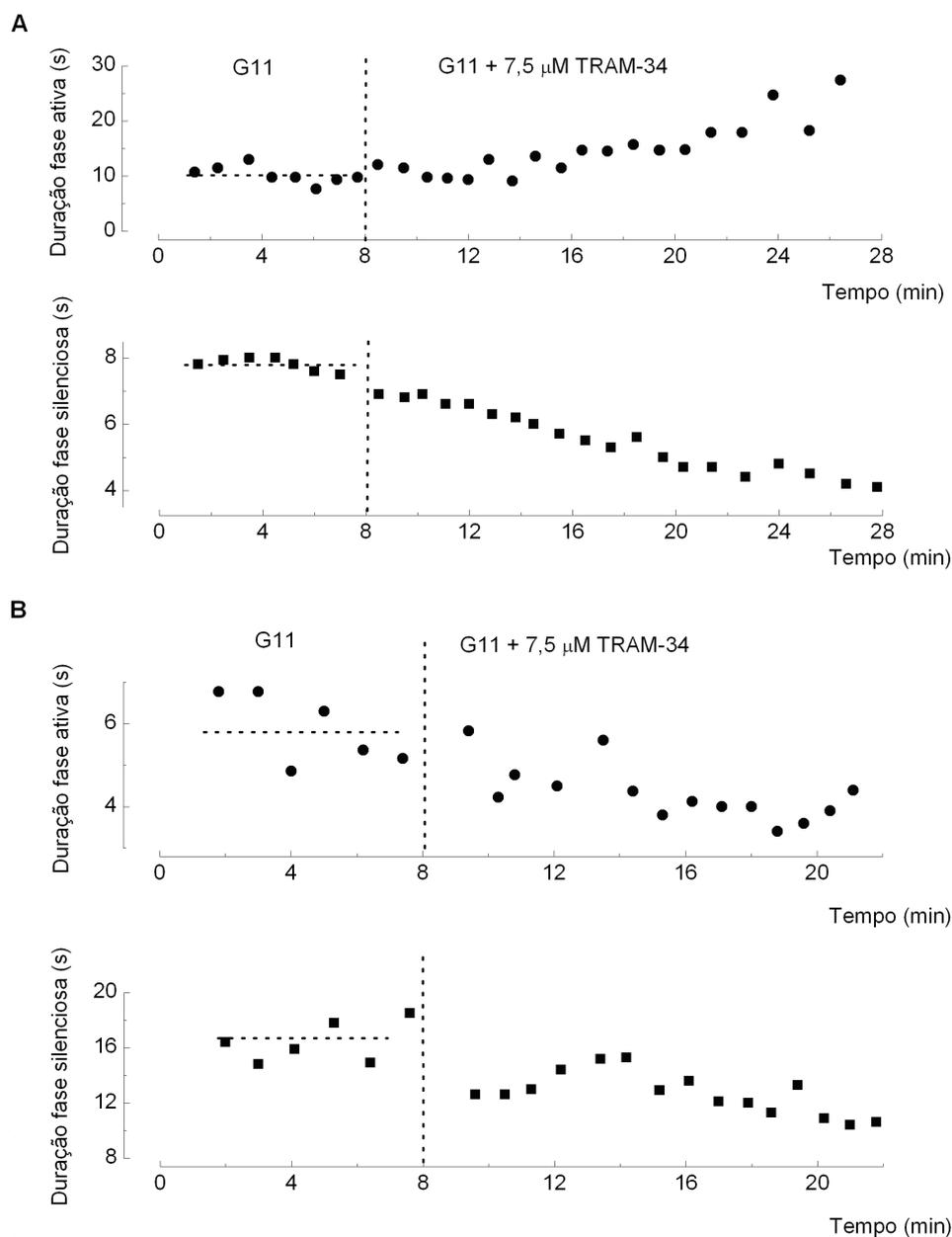


Figura 6.2: Curso temporal dos efeitos de TRAM-34 na duração da fase ativa e silenciosa dos *bursts*. Dados obtidos a partir das experiências ilustradas na **Figura 6.1** (**A** - ilhéu 1; **B** - ilhéu 2). "G11" assinala a parte controlo de cada experiência (ilhéu exposto a 11 mM glicose antes da aplicação do fármaco) e "7,5 μ M TRAM-34" a parte da experiência em que o ilhéu é exposto ao fármaco na presença de 11 mM glicose. A aplicação de TRAM-34 é assinalada pela linha vertical a tracejado (tempo 0). Os pontos representam os valores médios da duração da fase ativa (círculos) ou silenciosa (quadrados) em grupos consecutivos de três *bursts*.

Eletrofisiologia de um bloqueador dos canais IK

A análise do efeito de 7,5 μM TRAM-34 na duração média das fases ativa e silenciosa dos *bursts*, medida no controlo e ao fim de 13-15 minutos de aplicação do fármaco, é apresentada na **Figura 6.3** para as várias experiências efetuadas.

Tal como se salientou acima, 7,5 μM TRAM-34 aumentou a duração da fase ativa em 3 experiências e reduziu-a em 2 experiências, sendo os efeitos estatisticamente significativos em todos os casos (ver legenda da **Figura 6.3**). Por outro lado, o fármaco reduziu significativamente a duração da fase silenciosa nas várias experiências; quando expressa em termos da percentagem da duração medida no controlo, a diminuição média da duração foi de $27 \pm 14 \%$. A consequência foi um aumento da fração de tempo na fase ativa de 7 - 32% (valor médio $20 \pm 9\%$), igualmente visível na **Figura 6.3**.

A **Figura 6.3** inclui ainda resultados de uma experiência em que se utilizou TRAM-34 à concentração de 2,5 μM (igualmente em 11 mM glicose) e de uma experiência em que se utilizou 7,5 μM TRAM-34 na presença de 15 mM glicose.

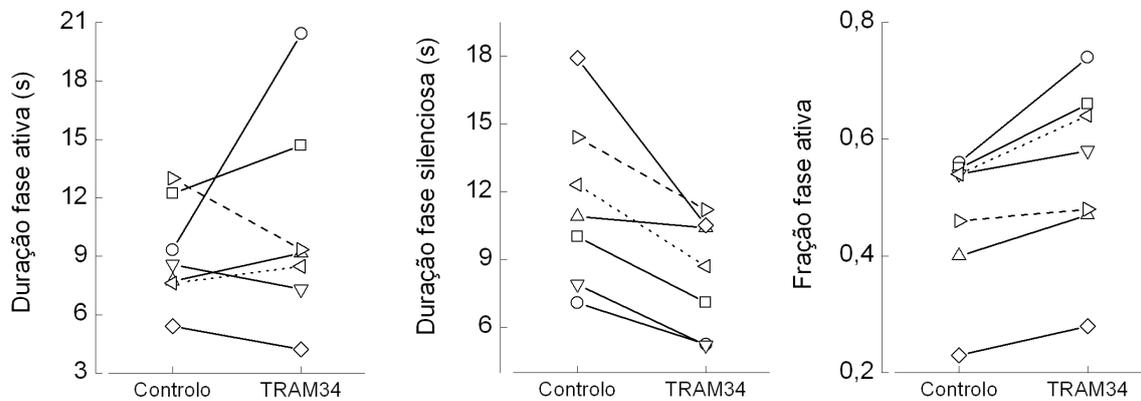


Figura 6.3: Efeito de TRAM-34 em parâmetros temporais dos *bursts* de atividade elétrica. Para cada experiência, realizada de acordo com um protocolo semelhante ao da **Figura 6.1**, a duração média da fase ativa (gráfico à esquerda), a duração média da fase silenciosa (gráfico ao centro) e a fração de tempo na fase ativa dos *bursts* (gráfico à direita) foram determinadas no controlo e ao fim de 13-15 minutos de aplicação de TRAM-34. Em 5 experiências o controlo correspondeu a 11 mM glicose e a concentração de TRAM-34 foi 7,5 μ M (pontos unidos por linhas a cheio); numa experiência manteve-se a condição controlo mas a concentração do fármaco foi diminuída para 2,5 μ M (linhas a tracejado); noutra experiência manteve-se a concentração do fármaco mas a concentração de glicose no controlo foi alterada para 15 mM (linhas a ponteadas). Os efeitos de TRAM-34 na duração da fase ativa e na duração da fase silenciosa foram estatisticamente significativas em todos os casos (valores de p inferiores a 0,001 ou 0,05). Os valores relativos às experiências ilustradas na **Figura 6.1** (ilhéu 1 e ilhéu 2) foram assinalados com círculos e losangos, respectivamente.

6.2 Ação de TRAM-34 nos potenciais de ação

Os registos apresentados nas experiências das **Figura 6.4** e **Figura 6.5**, reproduzidos com maior resolução temporal, permitem verificar o padrão de distribuição dos potenciais de ação ao longo do *burst*, tanto em condições controlo (11 mM glicose, registos à esquerda) como ao fim de 13-15 minutos de exposição a TRAM-34 (registos à direita).

A inspeção visual dos registos sugere a ocorrência de um processo de adaptação do disparo dos potenciais de ação na ausência do fármaco, cuja frequência e amplitude decaem progressivamente ao longo do *burst*, muito embora com cinéticas e intensidades variáveis de ilhéu para ilhéu (o ilhéu testado na **Figura 6.4** parece exibir um processo de adaptação mais rápido do que o ilhéu testado na **Figura 6.5**). É também visível que TRAM-34 teve um efeito pronunciado na distribuição dos potenciais de ação em ambos os casos, parecendo enlentece o decaimento da frequência e proporcionando o disparo de potenciais com amplitudes consideráveis ao longo do *burst*.

A quantificação do efeito do fármaco na frequência exigiu a implementação de um protocolo de amostragem dos potenciais de ação, envolvendo a segmentação de vários bursts em períodos de 1 segundo tanto em condições controlo como na presença de TRAM-34 (13-15 minutos), após o que se determinou a frequência média de disparo para cada período.

A variação desta frequência "instantânea" ao longo do *burst* está exemplificada pela experiência da **Figura 6.4 (B)**. Pode verificar-se que a frequência de disparo decaiu ao longo do tempo tanto no período controlo como na presença do fármaco, sendo no entanto a velocidade de decaimento claramente inibida por TRAM-34.

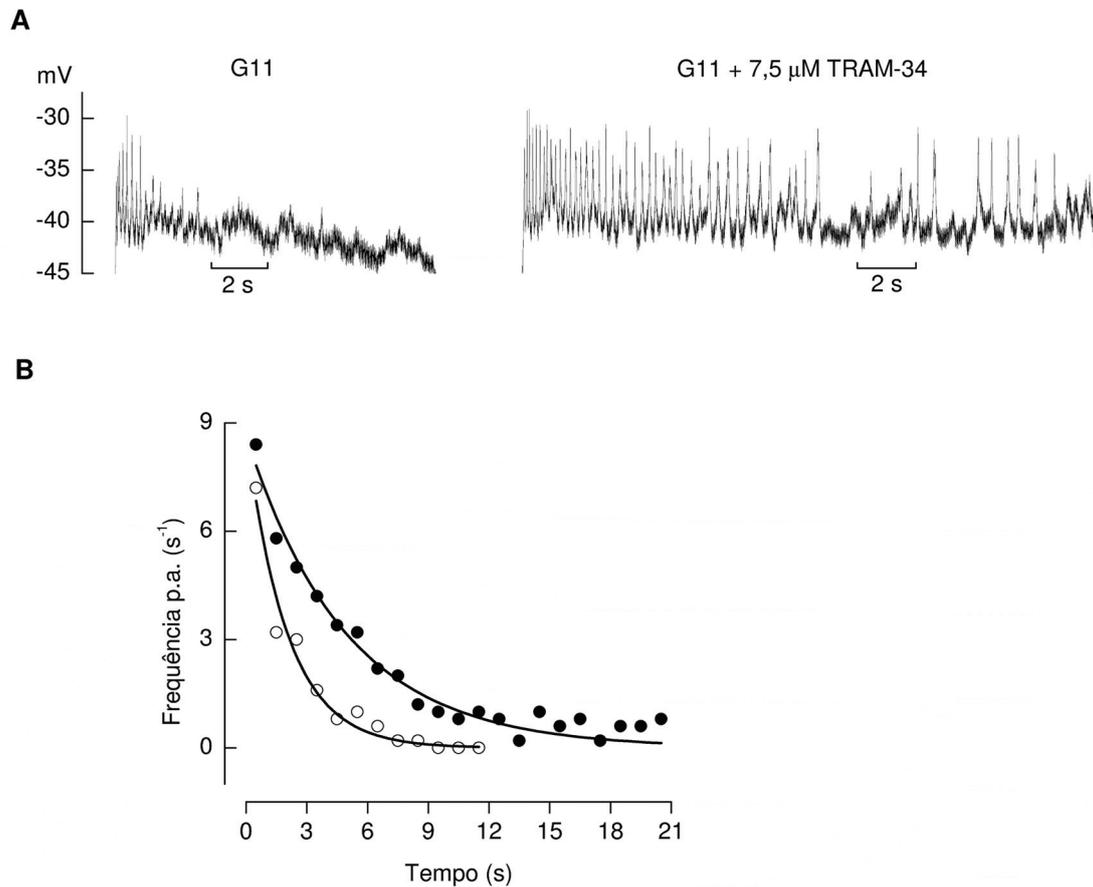


Figura 6.4: Adaptação da frequência de disparo ao longo do *burst* e inibição por TRAM-34. **(A)** O ilhéu foi exposto a 11 mM glicose (G11) e a 7,5 μ M TRAM-34 na presença contínua de glicose, segundo um protocolo idêntico ao da **Figura 6.1**. São apresentados registos expandidos da atividade elétrica ao longo de dois *bursts*, obtidos no período controlo (esquerda) e ao fim de aproximadamente 14 minutos na presença do fármaco (direita); **(B)** Curso temporal do valor médio da frequência de disparo de potenciais de ação, calculado após amostragem de 1 em 1 s ao longo de cinco *bursts*, registados durante o período controlo (círculos vazios) ou 13-15 minutos após aplicação de TRAM-34 (círculos a cheio). As curvas representam o melhor ajuste dos dados experimentais a uma função de decaimento mono-exponencial (ver texto principal).

Eletrofisiologia de um bloqueador dos canais IK

A variação da frequência foi descrita pela função de decaimento mono-exponencial $F = F_0 \exp(-t/\tau) + F_1$, em que F_0 e F_1 são constantes e τ representa a constante de tempo do decaimento. Os valores das constantes de tempo, determinados para a experiência ilustrada na **Figura 6.4** através do melhor ajuste dos dados experimentais à função $F(t)$ na ausência e presença do fármaco, foram 2.1 s e 4.9 s, respetivamente.

O decaimento da amplitude dos potenciais de ação foi avaliado através da sua amostragem durante a fase inicial (primeiro segundo) e durante a fase final de disparo no burst (último segundo), tanto em condições controlo como na presença de TRAM-34 (13-15 minutos), após o que se determinou a amplitude média para cada período. Tirando partido de uma pequena variabilidade da duração dos bursts registados durante cada um dos estados, para o processo de amostragem foram intencionalmente seleccionados bursts com durações mais aproximadas.

A variação máxima da amplitude dos potenciais de acção ao longo do burst, determinada através deste protocolo de amostragem, está exemplificada pela experiência da **Figura 6.5**. Pode verificar-se que a amplitude decaiu tanto no período controlo como na presença de TRAM-34; a extensão do decaimento foi, no entanto, claramente menor na presença do fármaco (cerca de 6 % vs. 61 % no controlo).

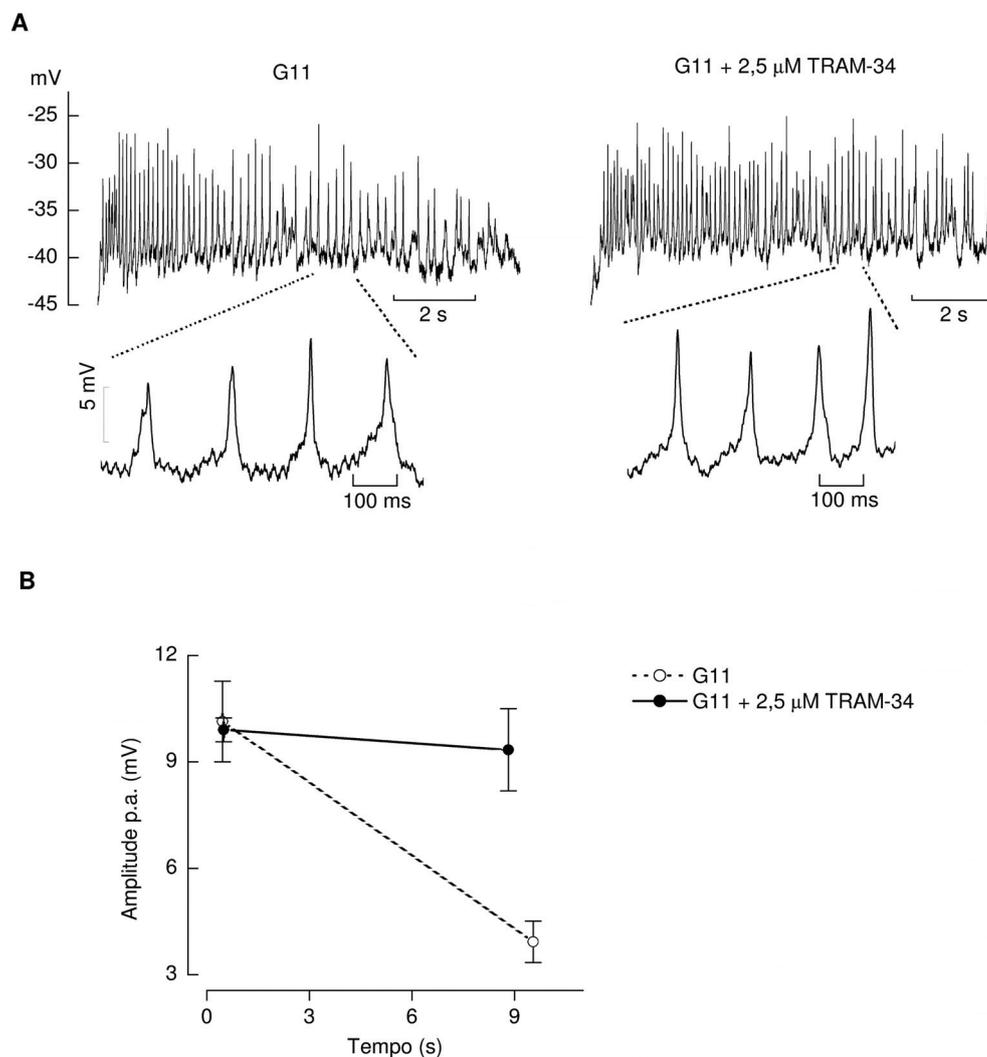


Figura 6.5: Decaimento da amplitude dos potenciais de ação ao longo do *burst* e inibição por TRAM-34. **(A)** O ilhéu foi exposto a 11 mM glicose (G11) e a 2,5 μM TRAM-34 na presença contínua de glicose, segundo um protocolo idêntico ao da **Figura 6.1**. São apresentados registos expandidos da atividade elétrica ao longo de dois *bursts*, obtidos no período controlo (esquerda) e ao fim de aproximadamente 14 minutos na presença do fármaco (direita); **(B)** Valores médios da amplitude dos potenciais de ação em cinco *bursts*, calculados na fase inicial (primeiro segundo) e na fase final de disparo (último segundo), tanto durante o período controlo da experiência (círculos vazios) como durante aplicação de TRAM-34 (13-15 minutos; círculos a cheio). Os dados são apresentados como média ± desvio padrão.

Eletrofisiologia de um bloqueador dos canais IK

Os resultados acima apresentados sugerem que o bloqueio dos canais IK se opõe à adaptação de frequência e concomitante decaimento da amplitude dos potenciais de ação ao longo do *burst*. O aumento expectável de cálcio intracelular favoreceria a terminação do *burst* (via ativação da componente da corrente K_{slow} não afetada por TRAM-34), podendo ter como resultado líquido a diminuição da duração do *burst*, tal como se observou nalgumas experiências. Nas restantes, em que se observou um aumento da duração, preponderaria o efeito da inibição da componente IK da corrente K_{slow} . Esta hipótese será retomada na Discussão.

Testou-se finalmente o efeito de TRAM-34 numa situação em que a célula β -pancreática dispara continuamente potenciais de ação, a fim de remover os constrangimentos de análise causados pelos fenómenos de adaptação atrás descritos.

Tal como se pode observar na experiência ilustrada na **Figura 6.6**, em que se expôs o ilhéu ao fármaco na presença do agente despolarizante tolbutamida, verificou-se que TRAM-34 aumentou acentuadamente a duração e amplitude dos potenciais de ação. Foram observados efeitos idênticos numa segunda experiência efetuada com tolbutamida. Deve salientar-se que a duração dos potenciais de ação registados na presença da sulfonilureia (cerca de 100-150 ms) é muito superior à duração na sua ausência (cerca de 10-20 ms).

Estes efeitos contrastam com as observações anteriores em ilhéus simplesmente expostos a glicose, em que TRAM-34 não afetou as características (por exemplo, amplitude e duração) dos potenciais de ação registados no início dos *bursts* (ver registos mais expandidos na **Figura 6.5**). Isto sugere fortemente que TRAM-34 não interfere com os canais (em particular os canais Cav e Kv) que contribuem para os potenciais de ação da célula β , em concordância com a literatura (Jensen *et al.*, 2001; Wulff *et al.*, 2007). Aquelas observações sugerem igualmente que os canais IK não contribuem para a repolarização dos potenciais de ação em condições fisiológicas (isto é, na ausência de tolbutamida), provavelmente porque a sua duração é tal que os aumentos da $[Ca^{2+}]_i$ correspondentes não são suficientes para ativar significativamente os canais. A apreciação dos efeitos observados na presença de tolbutamida será retomada na Discussão.

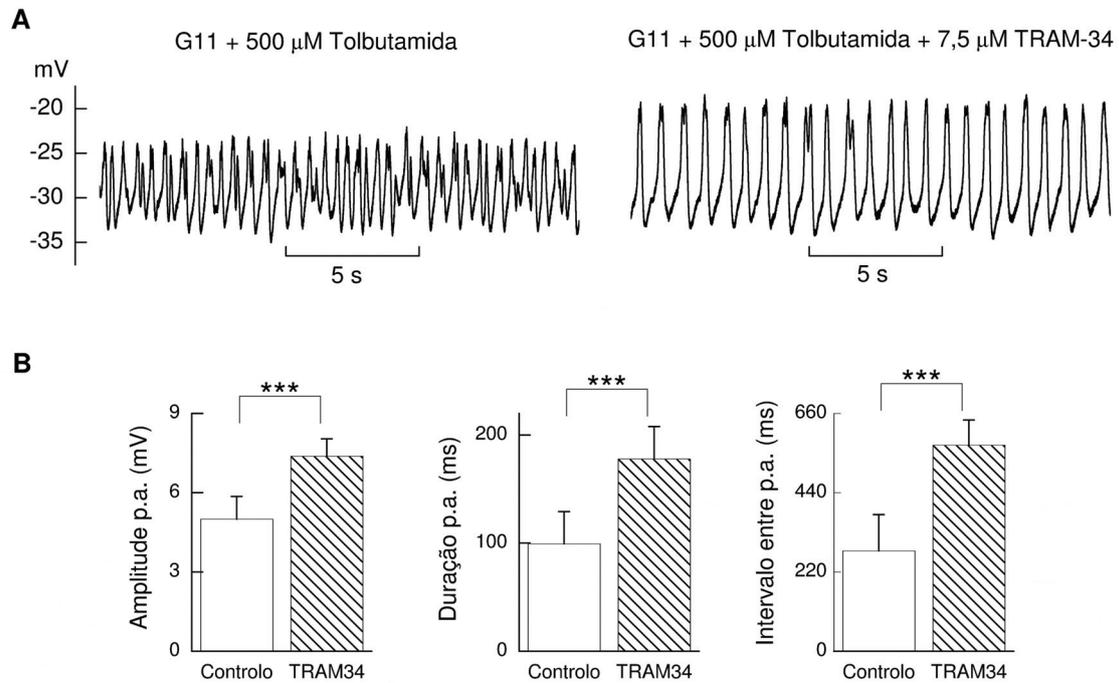


Figura 6.6: Efeitos de TRAM-34 nos potenciais de ação em células despolarizadas com tolbutamida. **(A)** Um ilhéu foi exposto a 11 mM glicose (G11) + 500 μ M tolbutamida (controlo, registo à esquerda) e a 7,5 μ M TRAM-34 (~13 min) na presença contínua de glicose e tolbutamida (registo à direita); **(B)** Análise de vários parâmetros dos potenciais de ação (amplitude, duração e intervalo entre potenciais de ação consecutivos), medidos no período controlo e ao fim de 13-15 minutos na presença de TRAM-34. As colunas representam as médias \pm desvio padrão (n=52-53 para a amplitude, n=48-52 para a duração e n=11-30 para o intervalo entre potenciais de ação). ***, $p < 0.001$.

6.3 Sensibilidade farmacológica da corrente IK

Nesta secção avaliou-se a sensibilidade da corrente IK a TRAM-34 e ao ativador DCEBIO (Pedersen *et al.*, 1999), recorrendo a experiências em que células β -pancreáticas isoladas foram sujeitas a *patch-clamping* no modo de *whole-cell*.

As correntes foram medidas através da aplicação de rampas de voltagem entre - 100 mV e + 60 mV, de forma a determinar o seu perfil de variação com a voltagem de uma forma expedita. Têm sido utilizadas rampas de voltagem para a caracterização dos canais IK desde os primeiros estudos eletrofisiológicos (Ishii *et al.*, 1997).

Nas experiências que se descrevem em seguida as células foram invariavelmente expostas a 200 nM TTX, 500 μ M tolbutamida e 20 mM TEA⁺ de forma a bloquear canais de Na⁺ sensíveis à voltagem, canais K_{ATP} e canais K_V/BK/SK, respetivamente (os canais IK são resistentes a TEA⁺ (Kozak *et al.*, 1998)). Este procedimento permitiu uma dissecação farmacológica mais efetiva das correntes IK, ao mesmo tempo que eliminou as complexidades associadas à dinâmica temporal e à sensibilidade a cálcio de algumas das correntes atrás referidas.

Sendo os canais IK sensíveis a cálcio, a sua ativação foi assegurada mantendo o cálcio intracelular livre em níveis suficientemente elevados por tamponização da solução da pipeta de *patch* com EGTA. Não foram bloqueados farmacologicamente os canais de Ca²⁺ sensíveis à voltagem, atendendo ao facto de vários bloqueadores destes canais (incluindo as di-hidropiridinas como nitrendipina ou nifedipina) também bloquearem canais IK (Jensen *et al.*, 1998).

6.3.1 Registo de correntes em condições simétricas de K⁺ transmembranar

Numa série inicial de experiências o registo de correntes foi realizado em condições simétricas de K⁺ transmembranar, isto é, utilizando uma concentração de K⁺ (150 mM) na solução extracelular (solução **G**, ver **Tabela 2.4** em Material e Métodos) quase igual à concentração de K⁺ na solução que enche a pipeta (153,8

mM, solução intracelular **D**). Nesta solução o Ca^{2+} intracelular livre foi tamponizado em $19 \mu\text{M}$, de forma a permitir a ativação dos canais IK.

Tal como se ilustra na **Figura 6.7 (A)**, a aplicação à célula de um comando de voltagem em rampa resultou no desenvolvimento de uma corrente (corrente de entrada) que se tornou progressivamente menos negativa até sofrer reversão a aproximadamente 0 mV (traço cinzento). Este potencial de reversão é consistente com o previsto pela equação de Nernst para uma membrana permeável a K^+ (- 0,6 mV), sugerindo identidade com uma corrente de K^+ . Depois de ultrapassado o potencial de reversão, o aumento da força electromotriz gerada pela rampa produziu uma corrente progressivamente mais positiva (corrente de saída).

A corrente variou de uma forma não linear com a voltagem, sendo os incrementos menos acentuados na zona mais positiva da rampa. O fato de as correntes de entrada variarem mais acentuadamente com a voltagem denota características de retificação de entrada, típicas das correntes IK (Jensen *et al.*, 1998; Jager *et al.*, 2004).

A microperfusão das células com TRAM-34 só foi iniciada depois de se ter verificado estabilização das correntes. O aumento observado na fase inicial das experiências foi atribuído ao incremento dos níveis de Ca^{2+} associados à troca da solução intracelular pela solução da pipeta.

Pode verificar-se na **Figura 6.7 (A)** que $2,5 \mu\text{M}$ TRAM-34 reduziu acentuadamente a corrente ao longo de todo o intervalo de voltagens, isto é, tornou menos negativas as correntes de entrada e menos positivas as correntes de saída (traço negro). Nesta experiência o fármaco inibiu a corrente de entrada a - 100 mV em 76 % e a corrente de saída a + 60 mV em 43 %. Inibições acentuadas das correntes por TRAM-34 foram observadas em 4 experiências, realizadas de acordo com um protocolo similar.

Eletrofisiologia de um bloqueador dos canais IK

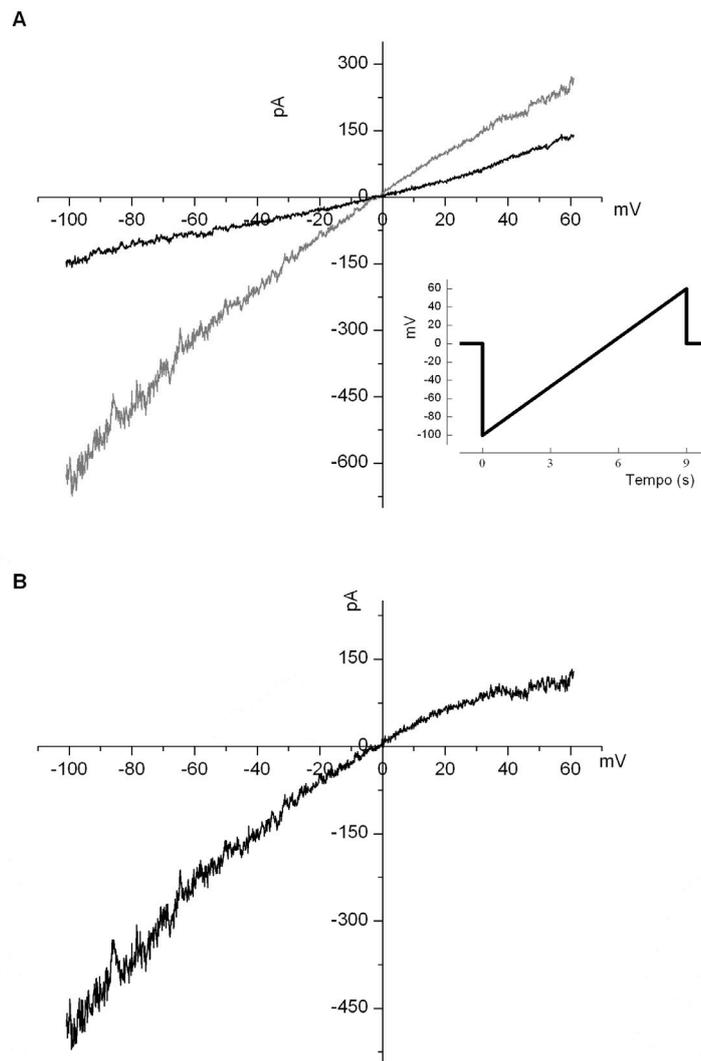


Figura 6.7: Efeito de TRAM-34 nas correntes de K^+ em condições simétricas de K^+ transmembranar. **(A)** Corrente observada em resposta a uma rampa de voltagens entre - 100 mV e + 60 mV (9 s, detalhe), na ausência (registro a cinzento) e na presença de 2,5 μ M TRAM-34 (3 minutos, registro a negro). A corrente foi registrada por *patch-clamp* no modo de *whole-cell* (V_h antes da aplicação das rampas de voltagem: 0 mV). A célula foi continuamente exposta a 200 nM TTX, 500 μ M tolbutamida e 20 mM TEA⁺. Concentrações de K^+ nas soluções extracelular e intracelular (pipeta): 150 e 153,8 mM, respectivamente. Concentração de Ca^{2+} intracelular livre na solução intracelular: 19 μ M; **(B)** Relação corrente-voltagem para a diferença entre as correntes registradas na ausência e presença de TRAM-34.

É de salientar que o tempo máximo de registo na presença de TRAM-34 (tipicamente entre 3 e 11 minutos) foi determinado pela estabilidade da selagem. Esta foi monitorizada por observação da resistência de acesso e da constante de tempo da membrana através da aplicação regular de pulsos hiperpolarizantes de 10 mV a partir de um V_h de 0 mV.

A corrente resultante da subtração da corrente registada na presença de TRAM-34 à registada na sua ausência representa mais fielmente as características de retificação da corrente I_K , sendo apresentada na **Figura 6.7 (B)**. Foi feita uma estimativa da condutância de entrada por regressão linear da relação corrente-voltagem entre - 100 e - 60 mV, tendo-se obtido o valor de 6 nS. De acordo com o esperado para um retificador de entrada, aquele valor é largamente superior ao valor homólogo para a condutância de saída, avaliado entre + 30 e + 60 mV (1 nS).

A **Figura 6.8 (A)** ilustra o efeito do ativador DCEBIO (100 μ M) na corrente gerada pela rampa de voltagens, mantendo as condições experimentais descritas acima. Pode verificar-se que o fármaco aumentou acentuadamente tanto as correntes de entrada como de saída. Foram observados aumentos acentuados das correntes por DCEBIO em 3 experiências, realizadas de acordo com um protocolo similar.

Eletrofisiologia de um bloqueador dos canais IK

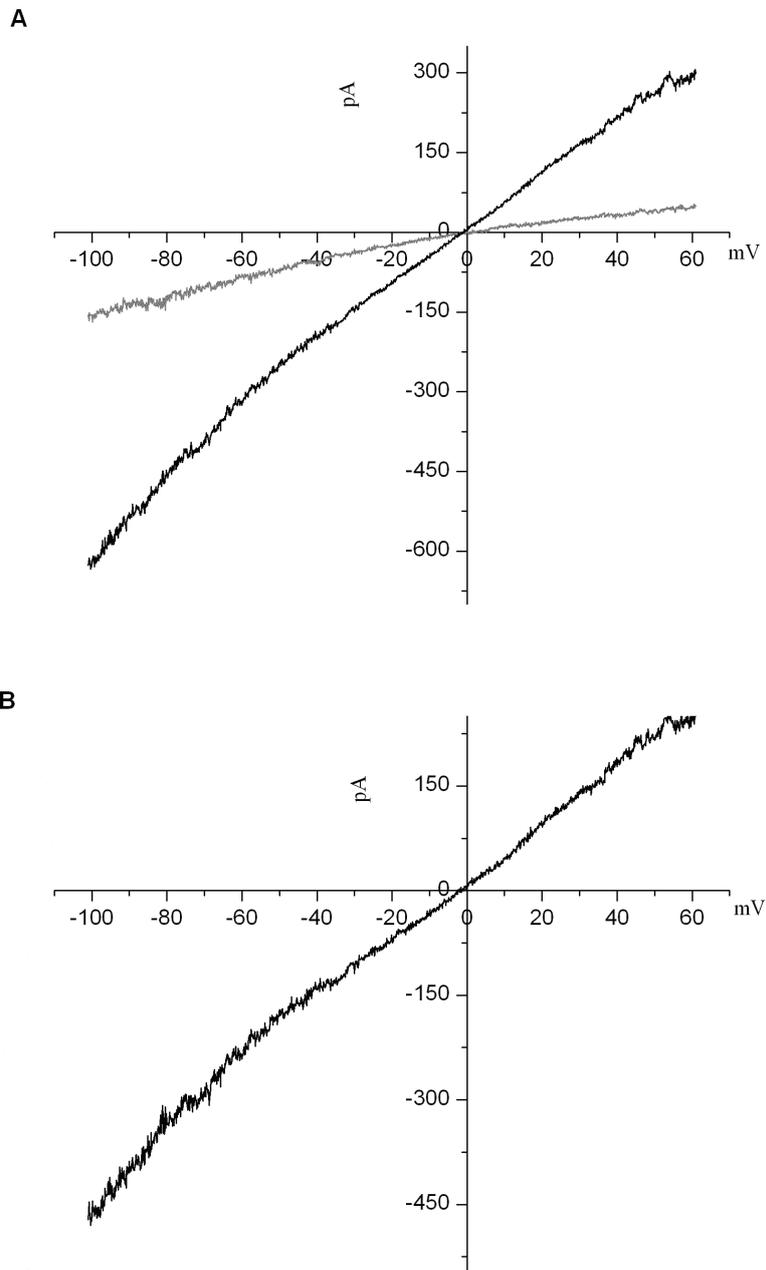


Figura 6.8: Efeito de DCEBIO nas correntes de K⁺ em condições simétricas de K⁺ transmembranar. **(A)** Corrente observada em resposta a uma rampa de voltagens (ver legenda da **Figura 6.7**), na ausência (registro a cinzento) e na presença de 100 μM DCEBIO (11 minutos, registro a negro). A corrente foi registrada por *patch-clamp* no modo de *whole-cell* segundo um protocolo idêntico ao da experiência ilustrada na **Figura 6.7**; **(B)** Relação corrente-voltagem para a diferença entre as correntes registradas na presença e ausência de DCEBIO.

A corrente resultante da subtração da corrente registada na ausência de DCEBIO à registada na sua presença é apresentada na **Figura 6.8 (B)**. A corrente exibe um potencial de reversão próximo de 0 mV e apresenta características de retificação de entrada. De facto, a condutância de entrada (6 nS, estimada por regressão linear da relação corrente-voltagem entre - 100 e - 60 mV) é superior à condutância de saída (4 nS, estimada no intervalo entre + 30 e + 60 mV).

6.3.2 Registo de correntes em condições fisiológicas de K⁺ transmembranar

Na série seguinte de experiências o registo de correntes foi realizado em condições fisiológicas de K⁺ transmembranar, de forma a avaliar possíveis implicações na relação corrente-voltagem da corrente IK e na ação inibidora de TRAM-34.

As experiências foram realizadas utilizando 5 mM K⁺ na solução extracelular (solução **F**, ver **Tabela 2.4** em Material e Métodos), mantendo elevada a concentração de K⁺ na solução que enche a pipeta (153,8 mM, solução intracelular **D**). A concentração de Ca²⁺ intracelular livre foi mantida em 19 µM, assegurando-se assim a ativação dos canais IK.

Tal como se pode verificar na **Figura 6.9 (A)**, a aplicação da rampa de voltagens produziu uma corrente com um potencial de reversão de cerca de - 80 mV, isto é, próximo do potencial de equilíbrio de K⁺ calculado para aquelas concentrações de K⁺ (- 88 mV).

Eletrofisiologia de um bloqueador dos canais IK

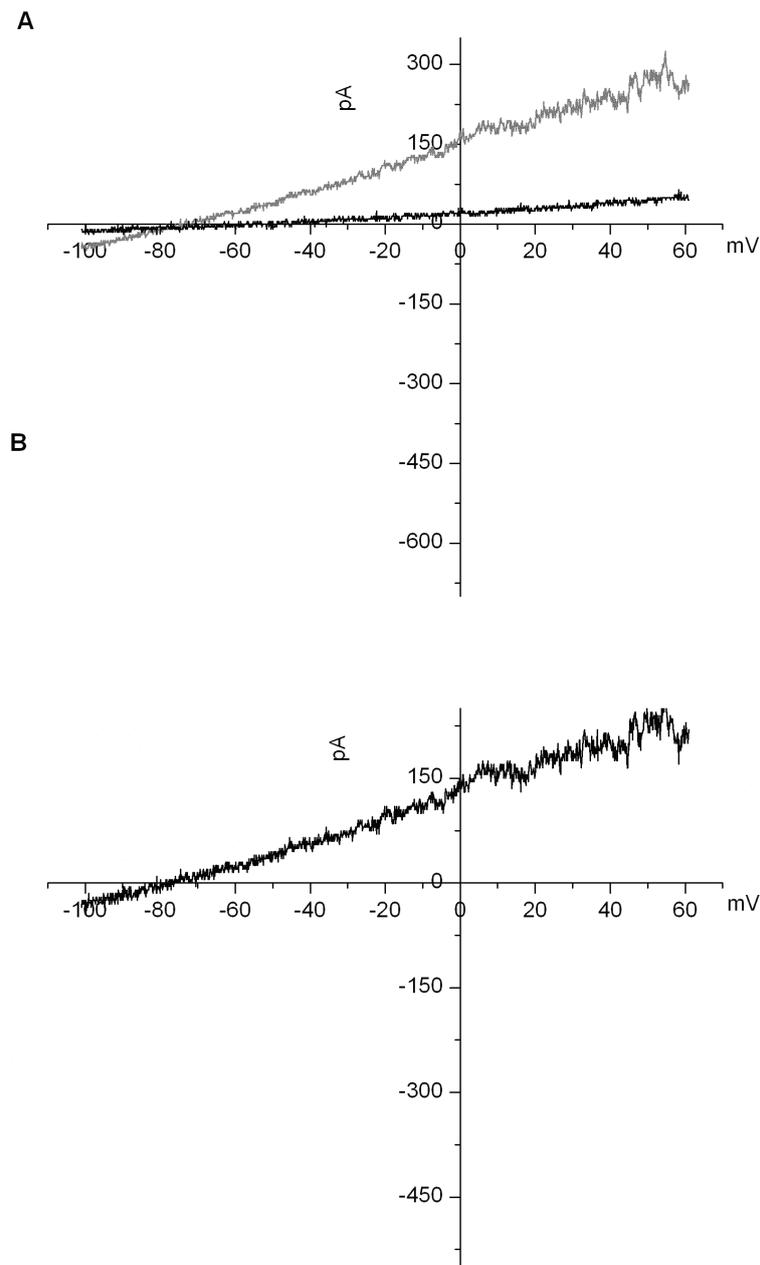


Figura 6.9: Efeito de TRAM-34 nas correntes de K^+ em condições fisiológicas de K^+ transmembranar. **(A)** Corrente observada em resposta a uma rampa de voltagens (ver legenda da **Figura 6.7**), na ausência (registro a cinzento) e na presença de $2,5 \mu\text{M}$ TRAM-34 (4 minutos, registro a negro). A corrente foi registada por *patch-clamp* no modo de *whole-cell* segundo um protocolo idêntico ao da experiência ilustrada na **Figura 6.7**, excepto que V_h (antes da aplicação das rampas) foi -70 mV e a concentração de K^+ na solução extracelular foi 5 mM ; **(B)** Relação corrente-voltagem para a diferença entre as correntes registadas na ausência e presença de TRAM-34.

Ao contrário das experiências realizadas em condições simétricas de K^+ transmembrantar, as experiências realizadas nas presentes condições de K^+ extracelular e intracelular revelam relações corrente-voltagem com características de retificação de saída (as correntes de saída variam mais acentuadamente com a voltagem do que as correntes de entrada). Este fenómeno está relacionado com a dependência da condutância de canal único da concentração dos iões K^+ nas soluções adjacentes aos canais (soluções diluídas estão normalmente associadas a condutâncias menores) (Aidley & Stanfield, 1996).

A **Figura 6.9 (A)** ilustra o efeito de 2,5 μ M TRAM-34 na corrente gerada pela rampa. Pode verificar-se que o fármaco inibiu acentuadamente tanto as correntes de entrada como de saída (em 82 % e 80 % a - 100 mV e + 60 mV, respectivamente). Foram observadas inibições acentuadas das correntes por TRAM-34 em 4 experiências, realizadas de acordo com um protocolo similar. A corrente resultante da subtração da corrente registada na presença de TRAM-34 à registada na sua ausência, apresentada na **Figura 6.9 (B)**, confirma as características de retificação de saída atrás descritas.

Na experiência descrita na **Figura 6.10** o registo de correntes foi realizado em baixo Ca^{2+} intracelular (88 nM) de forma a testar o efeito de Ca^{2+} na ativação das correntes IK, mantendo embora elevado o gradiente de K^+ transmembrantar imposto às células.

Eletrofisiologia de um bloqueador dos canais IK

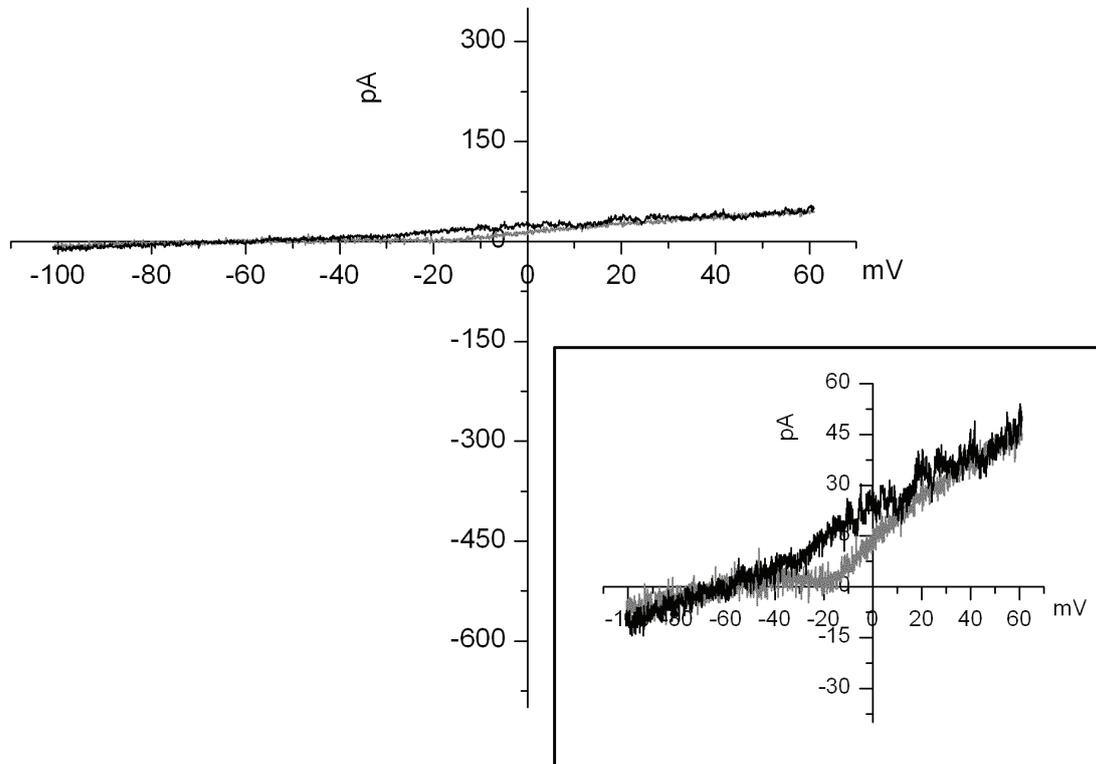


Figura 6.10: Ausência de efeito de DCEBIO nas correntes de K⁺ em condições de baixo Ca²⁺ intracelular. Corrente observada em resposta a uma rampa de voltagens (ver legenda da **Figura 6.7**), na ausência (registro a cinzento) e na presença de 100 μM DCEBIO (4 minutos, registro a negro). A corrente foi registada por *patch-clamp* no modo de *whole-cell* segundo um protocolo idêntico ao da experiência ilustrada na **Figura 6.9**, com a diferença que se dializou o interior da célula com uma solução contendo 88 nM Ca²⁺. A caixa mostra os mesmos registos numa escala aumentada (ver texto principal).

Nestas condições a aplicação da rampa de voltagens continuou a produzir correntes com características de retificação de saída, em consonância com a experiência reportada na **Figura 6.9**. Estas evidenciaram ainda depressões no intervalo entre - 40 e 0 mV (ver caixa na **Figura 6.10**), iniciando contaminação com correntes de Ca^{2+} sensíveis à voltagem cuja ativação é particularmente pronunciada naquela zona de potenciais. As correntes de Ca^{2+} são observadas quase sempre logo após a abertura do *patch* e a entrada em *whole-cell*, desaparecendo ao fim de algum tempo devido a *rundown* das correntes quando o interior celular é dializado pelo conteúdo da pipeta. Efetivamente a corrente registada mais tarde na presença de DCEBIO já não evidenciou a depressão acima mencionada.

Em condições de baixo Ca^{2+} intracelular DCEBIO não aumentou as correntes, tal como se pode observar na **Figura 6.10** (ausência de efeito a - 100 mV e + 60 mV). Esta observação é consistente com o fato de DCEBIO requerer concentrações fisiológicas de Ca^{2+} intracelular para ativar canais IK (Pedersen *et al.*, 1999).

Discussão

Discussão

Uma das primeiras hipóteses que se avançaram para esclarecer o mecanismo do *burst* envolveu canais BK (Atwater *et al.*, 1983; Chay, 1986). Segundo esta hipótese, o aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelular ao longo do *burst*, resultante do disparo de potenciais de ação, atingiria um nível crítico para a ativação dos canais, fazendo terminar o *burst* e promovendo a hiperpolarização para a fase silenciosa. Esperar-se-ia portanto que o bloqueio farmacológico dos canais tivesse pelo menos a consequência de prolongar o disparo dos potenciais de ação, aumentando a duração do *burst*.

Esta hipótese pareceu ser contraditada por um estudo em que se avaliou o efeito de caribdotoxina na atividade elétrica registada em ilhéus intactos (Kukuljan *et al.*, 1991), segundo o qual o bloqueador BK não afetou quer as características temporais dos *bursts* quer as características dos potenciais de ação, bem como pela ideia inicial de que o perfil de ativação dos canais BK pela voltagem não seria compatível com o seu envolvimento na geração dos potenciais de ação (Smith *et al.*, 1990). No entanto, num estudo mais recente (Houamed *et al.*, 2010), verificou-se que o bloqueador BK não peptídico paxilina aumentou claramente a amplitude dos potenciais de ação. As dúvidas quanto ao possível efeito dos bloqueadores BK na dinâmica do *burst* persistiram, já que os mesmos autores, surpreendentemente, reportaram que paxilina não afectava a duração dos *bursts*. Deve salientar-se que os *bursts* registados neste estudo não apresentavam as transições tipicamente observadas entre patamares despolarizados e fases silenciosas, tendo sido registados por pipetas de *patch* no modo de *current-clamp* (Houamed *et al.*, 2010).

Canais BK na célula β -pancreática: reguladores da regularidade das oscilações elétricas

Recorrendo a técnicas de registo intracelular com a finalidade de monitorizar o potencial de membrana da célula β -pancreática no seu ambiente nativo (ilhéus intactos microdissecados), demonstrou-se nesta dissertação (Capítulo 3) que o bloqueio dos canais BK com caribdotoxina e com o agente não peptídico penitrem A afetou drasticamente a atividade elétrica em vários aspectos principais, não observados anteriormente: (i) Hiperpolarizou acentuadamente o patamar do *burst*. Apesar de este efeito ter sido variável de ilhéu para ilhéu atingiu normalmente o seu

Discussão

máximo com penitrem A, o que provavelmente reflecte a elevada difusibilidade desta molécula e a sua capacidade de penetração no tecido; (ii) Reduziu consideravelmente a duração média do *burst*, contrastando assim com o estudo acima mencionado de Houamed e colegas (Houamed *et al.*, 2010). Verificou-se, consistentemente, que ambos os bloqueadores reduziram também acentuadamente a duração das oscilações da $[Ca^{2+}]_i$; (iii) Afectou a regularidade com que os *bursts* ocorreram, causando frequentemente um padrão de *bursting* "caótico".

O fato de caribdotoxina ter exercido estas ações, em acentuado contraste com o observado por Kukuljan e colegas (Kukuljan *et al.*, 1991) tal como foi mencionado acima, deve-se com toda a probabilidade ao fato de, no presente estudo, os registos terem sido efectuados em células β -pancreáticas localizadas nas camadas mais periféricas dos ilhéus, aumentando assim a acessibilidade média da toxina às células a partir da solução extracelular. O registo em células β -pancreáticas periféricas é extremamente exigente do ponto de vista técnico o que, juntamente com considerações económicas, fornece argumentos importantes para a utilização de bloqueadores não peptídicos com capacidade aumentada de penetração no tecido devido a dimensões reduzidas e características hidrofóbicas, tais como a micotoxina tremorgénica penitrem A (Asano *et al.*, 2012). Esta molécula foi testada como bloqueador de uma corrente mediada por canais BK no Capítulo 4.

Tanto a caribdotoxina como penitrem A hiperpolarizaram o patamar dos *bursts* e aumentaram (isto é, tornaram mais positivo) o potencial de membrana no pico dos potenciais de ação, aumentando assim acentuadamente a sua amplitude. O aumento de amplitude associado a alterações do potencial no pico dos potenciais de ação é consistente com o reportado para outros bloqueadores de canais BK e com a ideia de que estes canais, tal como em neurónios, podem desempenhar um papel coadjuvante na repolarização dos potenciais de acção na célula β -pancreática (Jacobson *et al.*, 2007 Braun *et al.*, 2008; Houamed *et al.* 2010). Paradoxalmente, contudo, ambos os bloqueadores aceleraram a repolarização dos potenciais de ação e aumentaram a hiperpolarização pós-potencial (AHP).

Stojilkovic e colegas propuseram um modelo para descrever o envolvimento de canais BK na atividade eléctrica espontânea exibida por somatotrofos e lactotrofos da glândula pituitária (Van Goor *et al.*, 2001; Stojilkovic *et al.*, 2005) (ver também (Tabak *et al.*, 2011)), que tem uma semelhança notável com a atividade eléctrica oscilatória da célula β -pancreática estimulada com glicose. Este modelo pode proporcionar uma interpretação plausível para o efeito paradoxal dos bloqueadores BK na velocidade de repolarização dos potenciais de acção e na AHP, atrás referido.

Especificamente, de acordo com o modelo, a activação rápida de canais BK pelos aumentos de Ca^{2+} focalizados que ocorrem ao longo da fase ascendente de um potencial de ação, mediados por canais Ca_v , imporá restrições à ativação adicional de canais Ca_v , truncaria o potencial de ação e limitaria a activação de canais K_v ; seguir-se-ia a dissipação de Ca^{2+} destes microdomínios e a concomitante desativação de canais BK, sendo a corrente de saída necessária para repolarizar o potencial de ação maioritariamente assegurada por ativação de canais K_v (que no entanto ocorreria em menor extensão do que se esperaria se estes canais não sofressem a limitação pelos canais BK atrás descrita). Esperar-se-ia, assim, que o bloqueio dos canais BK com caribdotoxina ou penitrem A aumentasse a velocidade de despolarização ao longo da fase ascendente do potencial de acção e aumentasse a altura deste, com a consequência adicional de acentuar a activação dos canais K_v , acelerar a repolarização dos potenciais de ação e aumentar a AHP. Importa sublinhar que todos estes efeitos foram de fato observados no presente estudo e que Houamed e colegas reportaram aumentos na amplitude dos potenciais de ação (em resposta a paxilina) e aumentos de correntes K_v (em resposta a potenciais-comando com a forma de potenciais de ação) (Houamed *et al.*, 2010), embora tenham reportado efeitos negativos nas velocidades de despolarização e repolarização, bem como na AHP. Um ponto importante, não explicitamente assumido pelo modelo de Stojilkovic, é que o limiar de voltagem para o disparo de um potencial de ação tenderia a diminuir (isto é, a corrente Ca_v mínima necessária para desencadear um potencial de ação tenderia a diminuir) em células sujeitas à ação de bloqueadores BK, gerando patamares hiperpolarizados, tal como foi observado no presente estudo e em estudos em que se testou o efeito de TEA⁺ à concentração de poucos mM (Atwater *et al.*, 1979; Henquin, 1990). É interessante constatar que somatotrofos e lactotrofos expressam canais BK e exibem *bursting*, ao contrário de gonadotrofos da glândula pituitária (cuja expressão de canais BK é residual) ou de somatotrofos / lactotrofos que foram transformados por ablação farmacológica de canais BK (Van Goor *et al.*, 2001; Stojilkovic *et al.*, 2005; Tabak *et al.*, 2011). De fato, estas últimas células exibem um padrão de atividade elétrica caracterizado pelo disparo de potenciais de ação de elevada amplitude a partir de patamares muito hiperpolarizados (ou mesmo de potenciais de ação isolados), tal como se observou no presente estudo em células em que se verificaram os efeitos mais intensos dos bloqueadores BK.

O modelo de Stojilkovic pressupõe que os canais BK exibem uma cinética de ativação muito mais rápida do que os canais K_v e que são activados por voltagens com relevância fisiológica (isto é, voltagens percorridas pelos potenciais de ação em

Discussão

condições fisiológicas). Ambos os pressupostos são satisfeitos no caso da célula β -pancreática (Findlay *et al.*, 1985; Braun *et al.*, 2008; Houamed *et al.*, 2010). Quanto ao primeiro pressuposto, importa ainda sublinhar que a corrente de K^+ sensível a penitrem A, caracterizada na presente dissertação (Capítulo 4), é claramente mais rapidamente ativada pela despolarização do que a corrente mediada por canais K_V .

O modelo alargado acima delineado encara os canais BK e Cav como determinantes críticos para a existência de um patamar no *burst* em células β -pancreáticas, muito embora não faça qualquer previsão quanto à natureza da corrente marca-passo que determina a terminação do *burst* (bem como a sua duração). Uma corrente de K^+ de desenvolvimento lento (K_{slow}), possivelmente constituída por duas componentes principais (isto é, uma corrente mediada por canais K_{ATP} (Kanno *et al.*, 2002) e uma corrente de K^+ sensível a Ca^{2+} mediada por canais SK e/ou IK (Zhang *et al.*, 2005; Dufer *et al.*, 2009)), é correntemente aceite como a corrente marca-passo da célula β -pancreática. Esperar-se-ia que uma diminuição da magnitude do sinal de Ca^{2+} subjacente a K_{slow} causasse um aumento da duração do *burst*, devido à sensibilidade a Ca^{2+} (direta ou indireta) das componentes de K_{slow} atrás referidas. Verificou-se que tanto a caribdotoxina como penitrem A reduziram a amplitude das oscilações da $[Ca^{2+}]_i$ em aproximadamente 25 %. No entanto, e contrariamente à previsão, cada um dos bloqueadores reduziu tanto a duração média dos *bursts* como a duração média das oscilações subjacentes da $[Ca^{2+}]_i$. Uma interpretação plausível desta aparente discrepância é que, sob a influência de um bloqueador BK, a corrente despolarizante que sustém o patamar do *burst* possa ser significativamente reduzida (ver acima), passando-se a necessitar de menos corrente de saída para hiperpolarizar a membrana e terminar o *burst*.

O maior efeito na duração média dos *bursts* ocorreu em experiências em que a aplicação dos bloqueadores BK causou um padrão "caótico" de *bursting*, caracterizado pelo aparecimento errático de eventos despolarizantes com duração variável (incluindo potenciais de ação isolados). É provável que, em condições extremas de bloqueio de canais BK, a abertura aleatória de canais não bloqueados afete profundamente a duração dos *bursts*, originando um padrão de *bursting* altamente irregular. Desta forma, os resultados sugerem que uma atividade de *bursting* regular pressupõe a existência de uma densidade crítica de canais BK funcionais.

Canais SK na célula β -pancreática: reguladores da regularidade de disparo dos potenciais de ação

Os canais SK desempenham um papel fundamental na gênese da AHP de duração média (mAHP) e na regulação da excitabilidade em neurónios (Bond *et al.*, 2005; Adelman *et al.*, 2012). No Capítulo 5 foi testada a hipótese de que o bloqueio de canais SK afetasse a AHP e outros parâmetros dos potenciais de ação, medidos em condições “isopotenciais” do limiar de disparo. Verificou-se de fato que tanto a apamina como UCL 1684 aumentaram modestamente a amplitude e duração do potencial de ação, ao mesmo tempo que diminuíram acentuadamente a AHP. Estes resultados sugerem que os canais SK são ativados pela entrada de Ca^{2+} durante um potencial de ação e que estão envolvidos na sua repolarização. A contribuição de canais SK sensíveis a apamina para a formação da AHP foi também demonstrada num insulínoma de rato (células INS-1), muito embora só em condições de absoluta privação de glicose (Andres *et al.*, 2009).

Poder-se-ia esperar, portanto, que o bloqueio de canais SK diminuísse o intervalo entre potenciais de ação e aumentasse a frequência de disparo, tal como de fato foi observado em células com disparo tónico de potenciais de ação sujeitas a *patch-clamp* em modo de *current-clamp* (Zhang *et al.*, 2005). No presente estudo foi também observado um aumento da frequência instantânea numa população considerável de ilhéus, em particular na fase inicial do *burst*. Nesta fase a frequência é tão elevada que o efeito de bloqueadores SK no padrão de disparo pode ser francamente disruptivo, originando a aglomeração de potenciais de ação com repolarizações incompletas a que normalmente se segue um período hiperpolarizado de duração variável. Este processo pode replicar-se ao longo do *burst*, originando um padrão de “picos-e-vaes”. É interessante constatar que as oscilações da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ registadas em ilhéus expostos a apamina ou UCL 1684 também exibem este padrão e que a amplitude dos “picos” tende a ser maior que a amplitude das oscilações de controlo (Figueiredo, 2010). É pois plausível que, na presença de bloqueadores SK, os “vaes” ao longo do *burst* sejam causados por uma corrente hiperpolarizante, ativada pelo aumento dos níveis de Ca^{2+} durante os “picos”. Sendo uma corrente de ativação lenta por Ca^{2+} , a corrente IK teria as características adequadas para mediar aquele processo (ver texto mais à frente).

Resulta da discussão anterior que os canais SK, através do controlo que exercem da AHP, parecem determinar a regularidade e precisão de disparo de potenciais de ação, tal como ocorre em certos neurónios (Hallworth *et al.*, 2003; Vatanparast & Janahmadi, 2009).

Discussão

O conceito de que a corrente K_{slow} subjacente ao *burst* representa provavelmente um "mosaico" de correntes de etiologia diversa, direta ou indiretamente sensíveis a Ca^{2+} , despertou desde cedo o interesse pela hipótese de que a corrente mediada por canais SK pudesse constituir uma das componentes de K_{slow} . Vários autores recorreram a apamina para testar aquela hipótese, tendo demonstrado completa insensibilidade de K_{slow} à toxina, pelo menos em células β -pancreáticas de murganho (Gopel *et al.*, 1999; Goforth *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2005). Estes resultados são concordantes com a aparente insensibilidade da atividade elétrica oscilatória a apamina reportada por Lebrun e colaboradores (Lebrun *et al.*, 1983), muito embora como se viu antes a ação de agentes peptídicos em ilhéus intactos possa ser complicada por problemas de penetração no tecido.

Contudo, no mesmo estudo em que relataram a insensibilidade de K_{slow} a apamina, Zhang e colegas mostraram que aquela corrente era fortemente inibida pelo bloqueador não peptídico de canais SK UCL 1684 (Zhang *et al.*, 2005), relançando assim o interesse pelo possível envolvimento destes canais em K_{slow} . Este interesse foi reforçado pela observação de que UCL 1684 (Zhang *et al.*, 2005) e apamina (Tamarina *et al.*, 2003) afetavam os níveis de Ca^{2+} intracelular medidos em ilhéus intactos, muito embora não fosse possível discernir se os efeitos observados incidiam sobre as oscilações rápidas (relacionadas com os *bursts* de potenciais de ação) ou sobre as oscilações lentas de cálcio (relacionadas com oscilações glicolíticas). Em nenhum destes estudos foi investigada a ação de UCL 1684 ou apamina na atividade elétrica oscilatória.

No presente estudo verificou-se que ambos os bloqueadores diminuíram a duração dos *bursts*, muito embora os efeitos fossem variáveis de ilhéu para ilhéu e frequentemente de baixa intensidade. Este resultado é o oposto do que seria de esperar do efeito inibidor de UCL 1684 em K_{slow} (Zhang *et al.*, 2005), o que suscita dúvidas sobre a possibilidade de o efeito em K_{slow} representar um artefato associado à metodologia da medição. De fato, a determinação do efeito em K_{slow} de um fármaco profundamente disruptivo do padrão de disparo deveria utilizar como controlo, não a corrente gerada pelo comando de voltagem habitual, mas sim uma corrente gerada pelo comando de voltagem que imitasse o padrão de disparo observado na presença do fármaco. A aparente diferença de sensibilidade de K_{slow} a UCL 1684 e apamina poderia teoricamente ser explicada pela menor sensibilidade à toxina de canais resultantes da associação heteromérica de subunidades SK. No entanto, esta alteração da sensibilidade à apamina não foi reportada em sistemas nativos.

Uma hipótese para as diminuições mais pronunciadas da duração do *burst*, observadas na presença de apamina ou UCL 1684, é que a ativação adicional da corrente IK, atrás admitida, possa aumentar K_{slow} e precipitar a terminação do *burst*.

Canais IK na célula β -pancreática: reguladores da adaptação de disparo de potenciais de ação ao longo do *burst*

Verificou-se no presente estudo (Capítulo 6), pela primeira vez, que TRAM-34 inibiu fortemente uma corrente de K^+ na célula β -pancreática de murganho com características idênticas às de correntes IK, designadamente: (i) ter propriedades de retificação de entrada para condições simétricas de K^+ transmembranar (Jensen *et al.*, 1998; Jager *et al.*, 2004); (ii) ser activada por DCEBIO (Pedarzani & Stocker, 2008; Wulff *et al.*, 2007) desde que os níveis de Ca^{2+} intracelular livre não sejam demasiado baixos (Pedersen *et al.*, 1999). É pois provável que a identidade da corrente sensível a TRAM-34 aqui descrita seja coincidente com a da corrente descrita por Kozak e colaboradores na linha celular β TC-3 e em células β porcinas (Kozak *et al.*, 1998), que pelas suas propriedades biofísicas e farmacológicas (sensibilidade a clotrimazol) também deverá constituir uma corrente IK.

Um dos efeitos mais salientes do bloqueador de canais IK utilizado no presente estudo (TRAM-34, Capítulo 6) foi o fato de o bloqueador se opor ao decaimento da frequência e amplitude dos potenciais de ação ao longo do *burst*. Este processo é semelhante ao processo de adaptação da frequência de disparo de potenciais de ação em neurónios, mediado por uma AHP de duração longa (sAHP) (Madison & Nicoll, 1982, 1984; Andrade *et al.*, 2012). Os canais responsáveis pela sAHP permanecem essencialmente desconhecidos, muito embora se admita que possam ter uma expressão diferenciada em diferentes tipos de células (Andrade *et al.*, 2012) e que os canais IK possam estar envolvidos, pelo menos em neurónios entéricos (Neylon *et al.*, 2006; Nguyen *et al.*, 2007).

Atendendo a que existe evidência para a corrente IK constituir uma componente de K_{slow} (TRAM-34 inibe K_{slow}) (Dufer *et al.*, 2009) e que esta última é uma corrente de desenvolvimento lento activada por Ca^{2+} , parece plausível associar K_{slow} a uma sAHP na célula β -pancreática. Assim sendo esta sAHP manifestar-se-ia na hiperpolarização observada após terminação do *burst* (isto é, no aparecimento da fase silenciosa), tornando expectável que o bloqueio de canais IK reduzisse a duração da fase silenciosa, tal como de fato foi observado. O modelo permitiria ainda prever que o bloqueio de canais IK aumentasse a duração do *burst*, o que também foi observado, muito embora somente numa fração das experiências. O

Discussão

modelo acima delineado implicaria a consideração de um processo adicional para explicar o fato de, na restante fração das experiências, se observar uma redução da duração do *burst* após aplicação de TRAM-34. Este processo pode ser a ativação de uma corrente hiperpolarizante (distinta da corrente IK) pelo aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelular que previsivelmente estariam associados à inibição do processo de adaptação de disparo de potenciais de ação, atrás descrito. Não é difícil imaginar que este processo possa de fato ocorrer, atendendo a que K_{slow} é uma corrente "mosaico" que aparentemente inclui pelo menos uma corrente distinta da corrente IK.

É de salientar que, em qualquer um dos casos, ocorreu um aumento da fração de tempo na fase ativa tal como acontece quando se aumenta a concentração de glicose. Para esse aumento foi decisiva a diminuição da duração da fase silenciosa.

É importante salientar que TRAM-34 não afetou as características dos potenciais de ação registados no início dos *bursts*, sugerindo que os canais IK não contribuem para a repolarização dos potenciais de ação em condições fisiológicas pelo fato de os aumentos da $[Ca^{2+}]_i$ correspondentes não serem suficientemente intensos e prolongados para ativar significativamente os canais. (Os canais IK são insensíveis à voltagem e, contrariamente aos canais BK e SK, não parecem ser ativados por aumentos da $[Ca^{2+}]_i$ causados por co-localização com fontes de Ca^{2+} em microdomínios, sendo antes sensíveis a aumentos da $[Ca^{2+}]_i$ globais que ocorrem a uma maior distância da fonte (Wulff *et al.*, 2007). As experiências em que se aplicou TRAM-34 na presença de tolbutamida (ver Figura 6.6) são indicativas quanto à janela de tempo em que os aumentos da $[Ca^{2+}]_i$ podem ser efetivos em ativar os canais IK. De fato, na presença da sulfonilureia, a duração dos potenciais de ação (> 100 ms) é sensivelmente maior relativamente ao controlo (10-20 ms). Naquelas condições os canais IK poderão ser ativados durante a repolarização, causando o seu bloqueio com TRAM-34 um aumento da duração e amplitude dos potenciais de ação, à semelhança do relatado para a contribuição dos canais BK nos potenciais de ação em células Purkinje (Edgerton & Reinhart, 2003).

Finalmente, deve salientar-se que os canais IK são inibidos por fosforilação dependente de AMP cíclico (Jensen *et al.*, 2001; Wulff *et al.*, 2007), tornando plausível a possibilidade de agentes que aumentam os níveis deste nucleótido na célula β -pancreática (como por exemplo a própria glicose (Sharp, 1979)) exercerem uma ação semelhante a TRAM-34 na distribuição e características dos potenciais de ação ao longo do *burst*. Esta acção foi de fato observada (Santos, 1985).

Bibliografia

Bibliografia

- Adelman JP, Maylie J & Sah P. (2012). Small-Conductance Ca^{2+} -Activated K^+ Channels: Form and Function. *Annual Review of Physiology* 74, 245-269.
- Aidley DJ & Stanfield PR. (1996). *Ion Channels-Molecules in action*. Cambridge University Press.
- Andrade R, Foehring RC & Tzingounis AV. (2012). The Calcium-Activated Slow AHP: Cutting Through the Gordian Knot. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 6.
- Andres MA, Baptista NC, Efird JT, Ogata KK, Bellinger FP & Zeyda T. (2009). Depletion of SK1 channel subunits leads to constitutive insulin secretion. *Febs Letters* 583, 369-376.
- Antunes CM, Salgado AP, Rosário LM & Santos RM. (2000). Differential patterns of glucose-induced electrical activity and intracellular calcium responses in single mouse and rat pancreatic islets. *Diabetes* 49, 2028-2038.
- Asano S, Bratz IN, Berwick ZC, Fanher IS, Tune JD & Dick GM. (2012). Penitrem A as a Tool for Understanding the Role of Large Conductance Ca^{2+} /Voltage-Sensitive K^+ Channels in Vascular Function. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 342, 453-460.
- Ashcroft FM, Harrison DE & Ashcroft SJH. (1984). Glucose Induces Closure of Single Potassium Channels in Isolated Rat Pancreatic β -Cells. *Nature* 312, 446-448.
- Ashcroft FM. (1988). Adenosine 5'-Triphosphate-Sensitive Potassium Channels. *Annual Review of Neuroscience* 11, 97-118.
- Ashcroft FM, Ashcroft SJ & Harrison DE. (1988). Properties of single potassium channels modulated by glucose in rat pancreatic beta-cells. *The Journal of Physiology* 400, 501-527.
- Ashcroft FM. (2000). *Ion Channels and Disease- Channelopathies*. Academic Press.
- Atwater I, Dawson CM, Ribalet B & Rojas E. (1979). Potassium permeability activated by intracellular calcium ion concentration in the pancreatic β -cell. *The Journal of Physiology* 288, 575-588.
- Atwater I, Ribalet B & Rojas E. (1979). Mouse pancreatic β -cells: tetraethylammonium blockage of the potassium permeability increase induced by depolarization. *The Journal of Physiology* 288, 561-574.
- Atwater I, Rosario L & Rojas E. (1983). Properties of the Ca-Activated K^+ Channel in Pancreatic β -Cells. *Cell Calcium* 4, 451-461.

Bibliografia

- Barbosa RM, Silva AM, Tomé AR, Stamford JA, Santos RM, Rosário L.M. (1996). Real Time Electrochemical Detection of 5-HT/Insulin Secretion from Single Pancreatic Islets: Effect of Glucose and K⁺ Depolarization. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 228, 100-104.
- Barbosa RM, Silva AM, Tome AR, Stamford JA, Santos RM & Rosario LM. (1998). Control of pulsatile 5-MT/insulin secretion from single mouse pancreatic islets by intracellular calcium dynamics. *Journal of Physiology-London* 510, 135-143.
- Barg S, Ma X, Eliasson L, Galvanovskis J, Gv̄dpel SO, Oberm̄v̄oller S, Platzer J, Renstr̄vm E, Trus M, Atlas D, Striessnig Jr & Rorsman P. (2001). Fast Exocytosis with Few Ca²⁺ Channels in Insulin-Secreting Mouse Pancreatic B Cells. *Biophysical Journal* 81, 3308-3323.
- Bergsten P, Grapengiesser E, Gylfe E, Tengholm A & Hellman B. (1994). Synchronous oscillations of cytoplasmic Ca²⁺ and insulin release in glucose-stimulated pancreatic islets. *J Biol Chem* 269, 8749-8753.
- Blatz AL & Magleby KL. (1986). Single Apamin-Blocked Ca-Activated K⁺ Channels of Small Conductance in Cultured Rat Skeletal-Muscle. *Nature* 323, 718-720.
- Bond CT, Maylie J & Adelman JP. (1999). Small-conductance calcium-activated potassium channels. In *Molecular and Functional Diversity of Ion Channels and Receptors*, pp. 370-378.
- Bond CT, Maylie J & Adelman JP. (2005). SK channels in excitability, pacemaking and synaptic integration. *Current Opinion in Neurobiology* 15, 305-311.
- Bonner-Weir S. (1991). Anatomy of the Islet of Langerhans In: Samol E (ed) *The Endocrine Pancreas*. Raven Press, New York, pp 15-27.
- Bokvist K, Rorsman P & Smith PA. (1990a). Block of ATP-regulated and Ca²⁺-activated K⁺ channels in mouse pancreatic β -cells by external tetraethylammonium and quinine. *The Journal of Physiology* 423, 327-342.
- Bokvist K, Rorsman P & Smith PA. (1990b). Effects of external tetraethylammonium ions and quinine on delayed rectifying K⁺ channels in mouse pancreatic β -cells. *The Journal of Physiology* 423, 311-325.
- Bokvist K, Eliasson L, Ammala C, Renstrom E & Rorsman P. (1995). Co-localization of L-type Ca²⁺ channels and insulin-containing secretory granules and its significance for the initiation of exocytosis in mouse pancreatic B-cells. *Embo J* 14, 50-57.
- Braun M, Ramracheya R, Bengtsson M, Zhang Q, Karanauskaite J, Partridge C, Johnson PR & Rorsman P. (2008). Voltage-Gated Ion Channels in Human Pancreatic β -Cells: Electrophysiological Characterization and Role in Insulin Secretion. *Diabetes* 57, 1618-1628.
- Chay TR. (1986). On the effect of the intracellular calcium-sensitive K⁺ channel in the bursting pancreatic β -cell. *Biophysical Journal* 50, 765-777.

- Cook DL & Hales CN. (1984). Intracellular ATP Directly Blocks K⁺ Channels in Pancreatic β -Cells. *Nature* 311, 271-273.
- Cook DL, Ikeuchi M & Fujimoto WY. (1984). Lowering of pHi Inhibits Ca²⁺-Activated K⁺ Channels in Pancreatic β -Cells. *Nature* 311, 269-271.
- Cui J, Yang H & Lee US. (2009). Molecular mechanisms of BK channel activation. *Cellular and Molecular Life Sciences* 66, 852-875.
- Dean PM & Matthews EK. (1970a). Electrical activity in pancreatic islet cells: effect of ions. *J Physiol* 210, 265-275.
- Dean PM & Matthews EK. (1970b). Glucose-induced electrical activity in pancreatic islet cells. *J Physiol* 210, 255-264.
- Detimary P, Gilon P & Henquin JC. (1998). Interplay between cytoplasmic Ca²⁺ and the ATP/ADP ratio: a feedback control mechanism in mouse pancreatic islets. *Biochem J* 333 (Pt 2), 269-274.
- Ding JP, Li ZW & Lingle CJ. (1998). Inactivating BK channels in rat chromaffin cells may arise from heteromultimeric assembly of distinct inactivation-competent and noninactivating subunits. *Biophys J* 74, 268-289.
- Dufer M, Gier B, Wolpers D, Krippeit-Drews P, Ruth P & Drews G. (2009). Enhanced Glucose Tolerance by SK4 Channel Inhibition in Pancreatic β -Cells. *Diabetes* 58, 1835-1843.
- Düfer M, Neye Y, Hörth K, Krippeit-Drews P, Hennige A, Widmer H, McClafferty H, Shipston M, Häring HU, Ruth P & Drews G. (2011). BK channels affect glucose homeostasis and cell viability of murine pancreatic β -cells. *Diabetologia*, 1-10.
- Dunn PM. (1999). UCL1684: a potent blocker of Ca²⁺-activated K⁺ channels in rat adrenal chromaffin cells in culture. *European Journal of Pharmacology* 368, 119-123.
- Dunne MJ & Petersen OH. (1986). Intracellular ADP Activates K⁺ Channels That Are Inhibited by ATP in an Insulin-Secreting Cell-Line. *Febs Letters* 208, 59-62.
- Edgerton JR & Reinhart PH. (2003). Distinct contributions of small and large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels to rat Purkinje neuron function. *Journal of Physiology-London* 548, 53-69.
- Elayat AA, Elnaggar MM & Tahir M. (1995). An Immunocytochemical and Morphometric Study of the Rat Pancreatic-Islets. *Journal of Anatomy* 186, 629-637.
- Engbers JDT, Anderson D, Asmara H, Rehak R, Mehaffey WH, Hameed S, McKay BE, Kruskic M, Zamponi GW & Turner RW. (2012). Intermediate conductance calcium-activated potassium channels modulate summation of parallel fiber input in cerebellar Purkinje cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 2601-2606.

Bibliografia

- Escoubas P, Diochot S, Celerier ML, Nakajima T & Lazdunski M. (2002). Novel tarantula toxins for subtypes of voltage-dependent potassium channels in the Kv2 and Kv4 subfamilies. *Molecular Pharmacology* 62, 48-57.
- Faber ESL. (2009). Functions and Modulation of Neuronal SK Channels. *Cell Biochemistry and Biophysics* 55, 127-139.
- Fanger CM, Ghanshani S, Logsdon NJ, Rauer H, Kalman K, Zhou J, Beckingham K, Chandy KG, Cahalan MD & Aiyar J. (1999). Calmodulin Mediates Calcium-dependent Activation of the Intermediate Conductance Channel, IKCa1. *J Biol Chem* 274, 5746-5754.
- Fakler B & Adelman JP. (2008). Control of K(Ca) channels by calcium nano/microdomains. *Neuron* 59, 873-881.
- Figueiredo H. (2010). Modulação das Oscilações de Cálcio Intracelular por Inibidores de Canais de Potássio Sensíveis a Cálcio em Ilhéus Pancreáticos. Vol Mestrado, Universidade de Coimbra, Portugal.
- Findlay I & Dunne MJ. (1985). Voltage-Activated Ca²⁺ Currents in Insulin-Secreting Cells. *Febs Letters* 189, 281-285.
- Findlay I, Dunne MJ & Petersen OH. (1985a). ATP-Sensitive Inward Rectifier and Voltage-Activated and Calcium-Activated K⁺ Channels in Cultured Pancreatic-Islet Cells. *Journal of Membrane Biology* 88, 165-172.
- Findlay I, Dunne MJ & Petersen OH. (1985b). High-Conductance K⁺ Channel in Pancreatic-Islet Cells Can Be Activated and Inactivated by Internal Calcium. *Journal of Membrane Biology* 83, 169-175.
- Flockerzi V, Nilius B, Jacobson DA & Philipson LH. (2007). TRP Channels of the Pancreatic Beta Cell. In *Transient Receptor Potential (TRP) Channels*, pp. 409-424. Springer Berlin Heidelberg.
- Galvez A, Gimenezgallego G, Reuben JP, Roycontancin L, Feigenbaum P, Kaczorowski GJ & Garcia ML. (1990). Purification and Characterization of a Unique, Potent, Peptidyl Probe for the High Conductance Calcium-Activated Potassium Channel from Venom of the Scorpion *Buthus-Tamulus*. *Journal of Biological Chemistry* 265, 11083-11090.
- Gembal M, Gilon P & Henquin JC. (1992). Evidence That Glucose Can Control Insulin Release Independently from Its Action on ATP-Sensitive K⁺ Channels in Mouse β -Cells. *Journal of Clinical Investigation* 89, 1288-1295.
- Ghatta S, Nimmagadda D, Xu X & O'Rourke ST. (2006). Large-conductance, calcium-activated potassium channels: Structural and functional implications. *Pharmacology & Therapeutics* 110, 103-116.
- Goforth PB, Bertram R, Khan FA, Zhang M, Sherman A & Satin LS. (2002). Calcium-activated K⁺ Channels of Mouse β -cells are Controlled by Both Store and Cytoplasmic Ca²⁺: Experimental and Theoretical Studies. *J Gen Physiol* 120, 307-322.

- Gopel S, Kanno T, Barg S, Galvanovskis J & Rorsman P. (1999a). Voltage-gated and resting membrane currents recorded from B-cells in intact mouse pancreatic islets. *Journal of Physiology-London* 521, 717-728.
- Gopel SO, Kanno T, Barg S, Eliasson L, Galvanovskis J, Renstrom E & Rorsman P. (1999b). Activation of Ca²⁺-dependent K⁺ Channels Contributes to Rhythmic Firing of Action Potentials in Mouse Pancreatic {beta} Cells. *J Gen Physiol* 114, 759-770.
- Grodsky GM, Batts AA, Bennett LL, Vcella C, McWilliams NB & Smith DF. (1963). Effects of carbohydrates on secretion of insulin from isolated rat pancreas. *American Journal of Physiology -- Legacy Content* 205, 638-644.
- Grynkiewicz G, Poenie M & Tsien RY. (1985). A New Generation of Ca²⁺ Indicators with Greatly Improved Fluorescence Properties. *Journal of Biological Chemistry* 260, 3440-3450.
- Hallworth NE, Wilson CJ & Bevan MD. (2003). Apamin-Sensitive Small Conductance Calcium-Activated Potassium Channels, through their Selective Coupling to Voltage-Gated Calcium Channels, Are Critical Determinants of the Precision, Pace, and Pattern of Action Potential Generation in Rat Subthalamic Nucleus Neurons In Vitro. *The Journal of Neuroscience* 23, 7525-7542.
- Hamid M, McCluskey JT, McClenaghan NH & Flatt PR. (2002). Comparison of the secretory properties of four insulin-secreting cell lines. *Endocrine Research* 28, 35-47.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B & Sigworth FJ. (1981). Improved Patch-Clamp Techniques for High-Resolution Current Recording from Cells and Cell-Free Membrane Patches. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology* 391, 85-100.
- Hanner M, Vianna-Jorge R, Kamassah A, Schmalhofer WA, Knaus H-Gn, Kaczorowski GJ & Garcia ML. (1998). The β Subunit of the High Conductance Calcium-activated Potassium Channel. *Journal of Biological Chemistry* 273, 16289-16296.
- Henquin JC & Meissner HP. (1984). Significance of Ionic Fluxes and Changes in Membrane-Potential for Stimulus-Secretion Coupling in Pancreatic β -Cells. *Experientia* 40, 1043-1052.
- Henquin JC. (1990). Role of Voltage-Dependent and Ca²⁺-Dependent K⁺ Channels in the Control of Glucose-Induced Electrical-Activity in Pancreatic B-Cells. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology* 416, 568-572.
- Henquin J-C. (2011). The dual control of insulin secretion by glucose involves triggering and amplifying pathways in β -cells. *Diabetes Research and Clinical Practice* 93, S27-S31.
- Hille B. (1992). *Ionic Channels of Excitable Membranes*. Sunderland, Ma, Sinauer.

Bibliografia

- Hiriart M & Matteson DR. (1988). Na⁺ Channels and 2 Types of Ca²⁺ Channels in Rat Pancreatic β -Cells Identified with the Reverse Hemolytic Plaques-Assay. *Journal of General Physiology* 91, 617-639.
- Hoffman JF, Joiner W, Nehrke K, Potapova O, Foye K & Wickrema A. (2003). The hSK4 (KCNN4) isoform is the Ca²⁺-activated K⁺ channel (Gardos channel) in human red blood cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 7366-7371.
- Horrigan FT & Aldrich RW. (2002). Coupling between Voltage Sensor Activation, Ca²⁺ Binding and Channel Opening in Large Conductance (BK) Potassium Channels. *The Journal of General Physiology* 120, 267-305.
- Houamed KM, Sweet IR & Satin LS. (2010). BK channels mediate a novel ionic mechanism that regulates glucose-dependent electrical activity and insulin secretion in mouse pancreatic β -cells. *The Journal of Physiology* 588, 3511-3523.
- Ishii TM, Maylie J & Adelman JP. (1997a). Determinants of apamin and d-tubocurarine block in SK potassium channels. *Journal of Biological Chemistry* 272, 23195-23200.
- Ishii TM, Silvia C, Hirschberg B, Bond CT, Adelman JP & Maylie J. (1997b). A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 11651-11656.
- Jacobson DA, Mendez F, Thompson M, Torres J, Cochet O & Philipson LH (2010). Calcium-activated and voltage-gated potassium channels of the pancreatic islet impart distinct and complementary roles during secretagogue induced electrical responses. *The Journal of Physiology* 588, 3525-3537.
- Jacobson DA, Kuznetsov A, Lopez JP, Kash S, Ammala CE & Philipson LH. (2007). Kv2.1 Ablation Alters Glucose-Induced Islet Electrical Activity, Enhancing Insulin Secretion. *Cell Metabolism* 6, 229-235.
- Jager H, Dreker T, Buck A, Giehl K, Gress T & Grissmer S. (2004). Blockage of Intermediate-Conductance Ca²⁺-Activated K⁺ Channels Inhibit Human Pancreatic Cancer Cell Growth in Vitro. *Mol Pharmacol* 65, 630-638.
- Jensen BS, Strobak D, Christophersen P, Jorgensen TD, Hansen C, Silahatoglu A, Olesen S-P & Ahring PK. (1998). Characterization of the cloned human intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel. *Am J Physiol Cell Physiol* 275, C848-856.
- Joiner WJ, Wang L-Y, Tang MD & Kaczmarek LK. (1997). hSK4, a member of a novel subfamily of calcium-activated potassium channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 11013-11018.
- Jones PM & Persaud SJ. (2010). Islet Function and Insulin Secretion. In *Textbook of Diabetes*, pp. 85-103. Wiley-Blackwell.

- Kanno T, Rorsman P & Gopel SO. (2002). Glucose-dependent regulation of rhythmic action potential firing in pancreatic β -cells by K(ATP)-channel modulation. *The Journal of Physiology* 545, 501-507.
- Takei M, Kelly RP, Ashcroft SJH & Ashcroft FM. (1986). The ATP-Sensitivity of K⁺ Channels in Rat Pancreatic β -Cells Is Modulated by ADP. *Febs Letters* 208, 63-66.
- Knaus HG, McManus OB, Lee SH, Schmalhofer WA, Garciacalvo M, Helms LMH, Sanchez M, Giangiacomo K, Reuben JP, Smith AB, Kaczorowski GJ & Garcia ML. (1994). Tremorgenic Indole Alkaloids Potently Inhibit Smooth-Muscle High-Conductance Calcium-Activated Potassium Channels. *Biochemistry* 33, 5819-5828.
- Kozak JA, Misler S & Logothetis DE. (1998). Characterization of a Ca²⁺-activated K⁺ current in insulin-secreting murine β TC-3 cells. *Journal of Physiology-London* 509, 355-370.
- Kukuljan M, Goncalves AA & Atwater I. (1991). Charybdotoxin-sensitive K(Ca) channel is not involved in glucose-induced electrical activity in pancreatic β -cells. *Journal of Membrane Biology* 119, 187-195.
- Lacy P & Kostianovsky M. (1967). Method for the isolation of intact Islets of Langerhans from rat pancreas. *Diabetes* 16, 39-39.
- Lebrun P, Atwater I, Claret M, Malaisse WJ & Herchuelz A. (1983). Resistance to Apamin of the Ca²⁺-Activated K⁺ Permeability in Pancreatic β -Cells. *Febs Letters* 161, 41-44.
- Lee US & Cui J. (2010). BK channel activation: structural and functional insights. *Trends in Neurosciences* 33, 415-423.
- Lenzen S & Tiedge M. (1994). Regulation of pancreatic Beta-cell glucokinase and GLUT2 glucose transporter gene expression. *Biochem Soc Trans* 22, 1-6.
- Li ZW, Ding JP, Kalyanaraman V & Lingle CJ. (1999). RINm5f cells express inactivating BK channels whereas HIT cells express noninactivating BK channels. *Journal of Neurophysiology* 81, 611-624.
- Logsdon NJ, Kang J, Togo JA, Christian EP & Aiyar J. (1997). A Novel Gene, hKCa4, Encodes the Calcium-activated Potassium Channel in Human T Lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry* 272, 32723-32726.
- MacDonald PE, Ha XF, Wang J, Smukler SR, Sun AM, Gaisano HY, Salapatek AMF, Backx PH & Wheeler MB. (2001). Members of the Kv1 and Kv2 Voltage-Dependent K⁺ Channel Families Regulate Insulin Secretion. *Molecular Endocrinology* 15, 1423-1435.
- MacDonald PE, Salapatek AMF & Wheeler MB. (2003). Temperature and redox state dependence of native Kv2.1 currents in rat pancreatic beta-cells. *The Journal of Physiology* 546, 647-653.

Bibliografia

- MacDonald PE & Wheeler MB. (2003). Voltage-dependent K⁺ channels in pancreatic beta cells: Role, regulation and potential as therapeutic targets. *Diabetologia* 46, 1046-1062.
- Madison DV & Nicoll RA. (1982). Noradrenaline blocks accommodation of pyramidal cell discharge in the hippocampus. *Nature* 299, 636-638.
- Madison DV & Nicoll RA. (1984). Control of the repetitive discharge of rat CA 1 pyramidal neurones in vitro. *J Physiol* 354, 319-331.
- Marty A. (1981). Ca²⁺-Dependent K⁺-Channels with Large Unitary Conductance in Chromaffin Cell-Membranes. *Nature* 291, 497-500.
- McClenaghan NH, Elsner M, Tiedge M & Lenzen S. (1998). Molecular characterization of the glucose-sensing mechanism in the clonal insulin-secreting BRIN-BD11 cell line. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 242, 262-266.
- McClenaghan NH & Flatt PR. (1999). Engineering cultured insulin-secreting pancreatic β -cell lines. *Journal of Molecular Medicine-Jmm* 77, 235-243.
- McManus OB, Helms LMH, Pallanck L, Ganetzky B, Swanson R & Leonard RJ. (1995). Functional role of the β subunit of high conductance calcium-activated potassium channels. *Neuron* 14, 645-650.
- Meda P, Orci L, Atwater I, Bangham A, Rojas E & Gonçalves A. (1984). THE TOPOGRAPHY OF ELECTRICAL SYNCHRONY AMONG β -CELLS IN THE MOUSE ISLET OF LANGERHANS. *Experimental Physiology* 69, 716-735.
- Meda P, Santos RM & Atwater I. (1986). Direct identification of electrophysiologically monitored cells within intact mouse islets of Langerhans. *Diabetes* 35, 232-236.
- Meissner HP, Henquin JC & Preissler M. (1978). Potassium Dependence of Membrane-Potential of Pancreatic β -Cells. *Febs Letters* 94, 87-89.
- Miller C, Moczydlowski E, Latorre R & Phillips M. (1985). Charybdotoxin, a Protein Inhibitor of Single Ca²⁺-Activated K⁺ Channels from Mammalian Skeletal-Muscle. *Nature* 313, 316-318.
- Milner RD & Hales CN. (1967). The role of calcium and magnesium in insulin secretion from rabbit pancreas studied in vitro. *Diabetologia* 3, 47-49.
- Mouhat S, Andreotti N, Jouirou B & Sabatier JM. (2008). Animal toxins acting on voltage-gated potassium channels. *Curr Pharm Des* 14, 2503-2518.
- Nesher R & Cerasi E. (2002). Section 2: Biphasic insulin release: Pools and signal modulation - Modeling phasic insulin release - Immediate and time-dependent effects of glucose. *Diabetes* 51, S53-S59.
- Neylon CB, Fowler CJ & Furness JB. (2006). Regulation of the slow afterhyperpolarization in enteric neurons by protein kinase A. *Autonomic neuroscience : basic & clinical* 126, 258-263.

- Nguyen TV, Matsuyama H, Baell J, Hunne B, Fowler CJ, Smith JE, Nurgali K & Furness JB. (2007). Effects of Compounds That Influence IK (KCNN4) Channels on Afterhyperpolarizing Potentials, and Determination of IK Channel Sequence, in Guinea Pig Enteric Neurons. *Journal of Neurophysiology* 97, 2024-2031.
- O'Rahilly S, Wainscoat JS & Turner RC. (1988). Type-2 (Non-Insulin-Dependent) Diabetes-Mellitus - New Genetics for Old Nightmares. *Diabetologia* 31, 407-414.
- Ostenson CG, Khan A, Abdelhalim SM, Guenifi A, Suzuki K, Goto Y & Efendic S. (1993). Abnormal Insulin-Secretion and Glucose-Metabolism in Pancreatic-Islets from the Spontaneously Diabetic Gk Rat. *Diabetologia* 36, 3-8.
- Paredes RM, Etzler JC, Watts LT, Zheng W & Lechleiter JD. (2008). Chemical calcium indicators. *Methods* 46, 143-151.
- Pedarzani P & Stocker M. (2008). Molecular and cellular basis of small- and intermediate-conductance, calcium-activated potassium channel function in the brain. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65, 3196-3217.
- Pedersen KA, Schroder RL, Skaaning-Jensen B, Strobaek D, Olesen Sr-P & Christophersen P. (1999). Activation of the human intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel by 1-ethyl-2-benzimidazolinone is strongly Ca^{2+} -dependent. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1420, 231-240.
- Perez-Armendariz E, Atwater I & Rojas E. (1985). Glucose-induced oscillatory changes in extracellular ionized potassium concentration in mouse islets of Langerhans. *Biophysical Journal* 48, 741-749.
- Perez-Armendariz M, Roy C, Spray DC & Bennett MV. (1991). Biophysical properties of gap junctions between freshly dispersed pairs of mouse pancreatic beta cells. *Biophysical Journal* 59, 76-92.
- Petkova-Kirova P, Gagov H, Krien U, Duridanova D, Noack T & Schubert R. (2000). 4-Aminopyridine affects rat arterial smooth muscle BKCa currents by changing intracellular pH. *British Journal of Pharmacology* 131, 1643-1650.
- Plant TD. (1988). Properties and Calcium-Dependent Inactivation of Calcium Currents in Cultured Mouse Pancreatic β -Cells. *Journal of Physiology-London* 404, 731-747.
- Porte D, Jr. (1991). Banting lecture 1990. β -cells in type II diabetes mellitus. *SO - Diabetes* 1991 Feb;40(2):166-80.
- Ravier MA, Nenquin M, Miki T, Seino S & Henquin J-C. (2009). Glucose Controls Cytosolic Ca^{2+} and Insulin Secretion in Mouse Islets Lacking Adenosine Triphosphate-Sensitive K^+ Channels Owing to a Knockout of the Pore-Forming Subunit Kir6.2. *Endocrinology* 150, 33-45.
- Ribalet B & Beigelman PM. (1979). Cyclic Variation of K^+ Conductance in Pancreatic β -Cells - Ca^{2+} and Voltage Dependence. *American Journal of Physiology* 237, C137-C146.

Bibliografia

- Ribalet B, Eddlestone GT & Ciani S. (1988). Metabolic-Regulation of the K(ATP) and a Maxi-K(V) Channel in the Insulin-Secreting Rinm5f Cell. *Journal of General Physiology* 92, 219-237.
- Rorsman P & Trube G. (1986). Calcium and delayed potassium currents in mouse pancreatic β -cells under voltage-clamp conditions. *The Journal of Physiology* 374, 531-550.
- Rorsman P & Renstrom E. (2003). Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 46, 1029-1045.
- Rorsman P, Eliasson L, Kanno T, Zhang Q & Gopel S. (2011). Electrophysiology of pancreatic beta-cells in intact mouse islets of Langerhans. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 107, 224-235.
- Rorsman P, Braun M & Zhang Q. (2012). Regulation of calcium in pancreatic alpha- and beta-cells in health and disease. *Cell Calcium* 51, 300-308.
- Rosa JC, Galanakis D, Ganellin CR, Dunn PM & Jenkinson DH. (1998). Bis-Quinolinium Cyclophanes: 6,10-Diaza-3(1,3),8(1,4)-dibenzena-1,5(1,4)-diquinolincyclodecaphane (UCL 1684), the First Nanomolar, Non-Peptidic Blocker of the Apamin-Sensitive Ca^{2+} -Activated K^+ Channel. *Journal of Medicinal Chemistry* 41, 2-5.
- Rosario LM, Atwater I & Scott AM. (1986). Pulsatile insulin release and electrical activity from single ob/ob mouse islets of Langerhans. *Adv Exp Med Biol* 211, 413-425.
- Rosario LM, Barbosa RM, Antunes CM, Silva AM, Abrunhosa AJ & Santos RM. (1993). Bursting Electrical-Activity in Pancreatic β -Cells - Evidence That the Channel Underlying the Burst Is Sensitive to Ca^{2+} Influx through L-Type Ca^{2+} Channels. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology* 424, 439-447.
- Rosario LM, Barbosa RM, Antunes CM, Baldeiras IE, Silva AM, Tome AR & Santos RM. (2008). Regulation by glucose of oscillatory electrical activity and 5-HT/insulin release from single mouse pancreatic islets in absence of functional K-ATP channels. *Endocrine Journal* 55, 639-650.
- Sah P & Louise Faber ES. (2002). Channels underlying neuronal calcium-activated potassium currents. *Progress in Neurobiology* 66, 345-353.
- Salgado AP, Pereira FC, Seica RM, Fernandes AP, Flatt PR, Santos RM, Rosario LM & Ramasamy R. (1999). Modulation of glucose-induced insulin secretion by cytosolic redox state in clonal beta-cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 154, 79-88.
- Salgado AP, Santos RM, Fernandes AP, Tome AR, Flatt PR & Rosario LM. (2000). Glucose-mediated Ca^{2+} signalling in single clonal insulin-secreting cells: evidence for a mixed model of cellular activation. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 32, 557-569.
- Samols E, Stagner JI, Ewart RBL & Marks V. (1988). The Order of Islet Microvascular Cellular Perfusion Is B-a-D in the Perfused Rat Pancreas. *Journal of Clinical Investigation* 82, 350-353.

- Santos RM. (1985). Modulation of glucose-induced electrical activity by second messengers in mouse pancreatic β -cells. PhD Thesis, Norwich, England, UK.
- Santos RM, Rosario LM, Nadal A, Garciasancho J, Soria B & Valdeolmillos M. (1991). Widespread Synchronous $[Ca^{2+}]_i$ Oscillations Due to Bursting Electrical-Activity in Single Pancreatic-Islets. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology* 418, 417-422.
- Schreiber M & Salkoff L. (1997). A novel calcium-sensing domain in the BK channel. *Biophysical Journal* 73, 1355-1363.
- Schulla V, Renstrom E, Feil R, Feil S, Franklin I, Gjinovci A, Jing XJ, Laux D, Lundquist I, Magnuson MA, Obermuller S, Olofsson CS, Salehi A, Wendt A, Klugbauer N, Wollheim CB, Rorsman P & Hofmann F. (2003). Impaired insulin secretion and glucose tolerance in beta cell-selective Ca(V)1.2 Ca²⁺ channel null mice. *Embo Journal* 22, 3844-3854.
- Scott AM, Atwater I & Rojas E. (1981). A method for the simultaneous measurement of insulin release and B cell membrane potential in single mouse islets of Langerhans. *Diabetologia* 21, 470-475.
- Sharp GW. (1979). The adenylate cyclase-cyclic AMP system in islets of Langerhans and its role in the control of insulin release. *Diabetologia* 16, 287-296.
- Sherman A, Carroll PB, Santos RM & Atwater I. (1990). Glucose dose response of pancreatic β -cells: Experimental and Theoretical results In: *Transduction in biological systems*; Chapter 8; pag. 123-141.
- Shi J & Cui J. (2001). Intracellular Mg²⁺ Enhances the Function of Bk-Type Ca²⁺-Activated K⁺ Channels. *The Journal of General Physiology* 118, 589-606.
- Smith C, Phillips M & Miller C. (1986). Purification of charybdotoxin, a specific inhibitor of the high-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel. *Journal of Biological Chemistry* 261, 14607-14613.
- Smith PA, Bokvist K & Rorsman P. (1989). Demonstration of A-Currents in Pancreatic-Islet Cells. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology* 413, 441-443.
- Smith PA, Bokvist K, Arkhammar P, Berggren PO & Rorsman P. (1990). Delayed Rectifying and Calcium-Activated K⁺ Channels and Their Significance for Action-Potential Repolarization in Mouse Pancreatic β -Cells. *Journal of General Physiology* 95, 1041-1059.
- Solaro CR & Lingle CJ. (1992). Trypsin-sensitive, rapid inactivation of a calcium-activated potassium channel. *Science* 257, 1694-1698.
- Stocker M. (2004). Ca²⁺-activated K⁺ channels: Molecular determinants and function of the SK family. *Nature Reviews Neuroscience* 5, 758-770.

Bibliografia

- Stojilkovic SS, Zemkova H & Van Goor F. (2005). Biophysical basis of pituitary cell type-specific Ca^{2+} signaling secretion coupling. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 16, 152-159.
- Tabak J, Tomaiuolo M, Gonzalez-Iglesias AE, Milesco LS & Bertram R. (2011). Fast-Activating Voltage- and Calcium-Dependent Potassium (BK) Conductance Promotes Bursting in Pituitary Cells: A Dynamic Clamp Study. *The Journal of Neuroscience* 31, 16855-16863.
- Tabcharani JA & Mislser S. (1989). Ca^{2+} -Activated K^{+} -Channel in Rat Pancreatic-Islet β -Cells - Permeation, Gating and Blockade by Cations. *Biochimica Et Biophysica Acta* 982, 62-72.
- Tamarina NA, Kuznetsov A, Fridlyand LE & Philipson LH. (2005). Delayed-rectifier (KV2.1) regulation of pancreatic β -cell calcium responses to glucose: inhibitor specificity and modeling. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289, E578-585.
- Tamarina NA, Wang Y, Mariotto L, Kuznetsov A, Bond C, Adelman J & Philipson LH. (2003). Small-conductance calcium-activated K^{+} channels are expressed in pancreatic islets and regulate glucose responses. *Diabetes* 52, 2000-2006.
- Trimble ER, Halban PA, Wollheim CB & Renold AE. (1982). Functional Differences between Rat Islets of Ventral and Dorsal Pancreatic Origin. *Journal of Clinical Investigation* 69, 405-413.
- Trube G, Rorsman P & Ohnohosaku T. (1986). Opposite Effects of Tolbutamide and Diazoxide on the ATP-Dependent K^{+} Channel in Mouse Pancreatic β -Cells. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology* 407, 493-499.
- Valdeolmillos M, Santos RM, Contreras D, Soria B & Rosario LM. (1989). Glucose-induced oscillations of intracellular Ca^{2+} concentration resembling bursting electrical activity in single mouse islets of Langerhans. *Febs Letters* 259, 19-23.
- Van Goor F, Li Y-X & Stojilkovic SS. (2001). Paradoxical Role of Large-Conductance Calcium-Activated K^{+} (BK) Channels in Controlling Action Potential-Driven Ca^{2+} Entry in Anterior Pituitary Cells. *The Journal of Neuroscience* 21, 5902-5915.
- Vatanparast J & Janahmadi M. (2009). Contribution of apamin-sensitive SK channels to the firing precision but not to the slow afterhyperpolarization and spike frequency adaptation in snail neurons. *Brain Research* 1255, 57-66.
- Venkatachalam K & Montell C. (2007). TRP channels. In *Annual Review of Biochemistry*, pp. 387-417.
- Vignali S, Leiss V, Karl R, Hofmann F & Welling A. (2006). Characterization of voltage-dependent sodium and calcium channels in mouse pancreatic A- and B-cells. *Journal of Physiology-London* 572, 691-706.

- von Hahn T, Thiele I, Zingaro L, Hamm K, Garcia-Alzamora M, Kottgen M, Bleich M & Warth R. (2001). Characterisation of the rat SK4/IK1 K⁺ channel. *Cellular Physiology and Biochemistry* 11, 219-230.
- Wallner M, Meera P & Toro L. (1996). Determinant for β -subunit regulation in high-conductance voltage-activated and Ca²⁺-sensitive K⁺ channels: An additional transmembrane region at the N-terminus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 14922-14927.
- Wallner M, Meera P & Toro L. (1999). Molecular basis of fast inactivation in voltage and Ca²⁺-activated K⁺ channels: A transmembrane β -subunit homolog. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 4137-4142.
- Wulff H, Miller MJ, Hansel W, Grissmer S, Cahalan MD & Chandy KG. (2000). Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel, IKCa1: A potential immunosuppressant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 8151-8156.
- Wulff H, Gutman GA, Cahalan MD & Chandy KG. (2001). Delineation of the Clotrimazole/TRAM-34 Binding Site on the Intermediate Conductance Calcium-activated Potassium Channel, IKCa1. *J Biol Chem* 276, 32040-32045.
- Wulff H, Kolski-Andreaco A, Sankaranarayanan A, Sabatier JM & Shakkottai V. (2007). Modulators of small- and intermediate-conductance calcium-activated potassium channels and their therapeutic indications. *Curr Med Chem* 14, 1437-1457.
- Xia XM, Fakler B, Rivard A, Wayman G, Johnson-Pais T, Keen JE, Ishii T, Hirschberg B, Bond CT, Lutsenko S, Maylie J & Adelman JP. (1998). Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature* 395, 503-507.
- Xia XM, Ding JP & Lingle CJ. (1999). Molecular Basis for the Inactivation of Ca²⁺- and Voltage-Dependent BK Channels in Adrenal Chromaffin Cells and Rat Insulinoma Tumor Cells. *The Journal of Neuroscience* 19, 5255-5264.
- Xia XM, Zeng XH & Lingle CJ. (2002). Multiple regulatory sites in large-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature* 418, 880-884.
- Yang H, Hu L, Shi J, Delaloye K, Horrigan FT & Cui J. (2007). Mg²⁺ mediates interaction between the voltage sensor and cytosolic domain to activate BK channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 18270-18275.
- Zawalich WS, Yamazaki H & Zawalich KC. (2008). Biphasic insulin secretion from freshly isolated or cultured, perfused rodent islets: comparative studies with rats and mice. *Metabolism-Clinical and Experimental* 57, 30-39.
- Zhang X, Solaro CR & Lingle CJ. (2001). Allosteric Regulation of BK Channel Gating by Ca²⁺ and Mg²⁺ through a Nonselective, Low Affinity Divalent Cation Site. *The Journal of General Physiology* 118, 607-636.

Bibliografia

- Zhang M, Houamed K, Kupersmidt S, Roden D & Satin LS. (2005). Pharmacological properties and functional role of K-slow current in mouse pancreatic β -cells: SK channels contribute to K-slow tail current and modulate insulin secretion. *Journal of General Physiology* 126, 353-363.
- Zhang Q, Galvanovskis J, Abdulkader F, Partridge CJ, Gopel SO, Eliasson L & Rorsman P. (2008). Cell coupling in mouse pancreatic beta-cells measured in intact islets of Langerhans. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 366, 3503-3523.