



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Influxo de Ca^{2+} mediado por canais TRP em células secretoras de insulina

Bruno Miguel Ferreira Santos Melo

2011



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Influxo de Ca^{2+} mediado por canais TRP em células secretoras de insulina

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob orientação do Professor Doutor Luís Manuel de Oliveira Martinho do Rosário (Universidade de Coimbra) e co-orientação da Professora Doutora Rosa Maria Moreira Alves dos Santos (Universidade de Coimbra).

Bruno Miguel Ferreira Santos Melo

2011

Agradecimentos

Gostaria de expressar todo o agradecimento ao Professor Doutor Luís Manuel de Oliveira Martinho do Rosário e à Professora Doutora Rosa Maria Moreira Alves dos Santos pela orientação, motivação, ensinamentos e apoio que disponibilizaram, indispensáveis à realização desta dissertação.

Um agradecimento especial à Joana Real e ao Hugo Figueiredo por todo o acompanhamento, ajuda, bom ambiente que proporcionaram no laboratório e paciência que tiveram comigo.

Agradeço a todos os meus amigos, que sempre pude contar com eles através da sua amizade, apoio e compreensão ao longo de todos estes anos académicos, em especial Ana Alves, Cátia Santa, Diogo Comprido, Eduardo Melo, Francisco Gonçalves, Henrique Carvalho, João Jerónimo, Luís Gomes, Marta Barata, Pedro Rio, Rui Carvalho, Rute Cardoso, Tiago Xavier e Vera Vieira.

Por último quero deixar um enorme obrigado a toda a minha família pela dedicação e força que sempre me deram, em especial à minha Mãe, Avó, Tio e Irmã pelo apoio incondicional e por ser a pessoa que sou hoje, sem eles não conseguiria alcançar todos os meus objectivos, aos quatro, um grande obrigado.

Bruno Miguel Ferreira Santos Melo

Índice

Abreviaturas	I
Resumo	III
Abstract	V
Capítulo 1 – Introdução	1
1.1) A célula- β e os ilhéus de Langerhans.....	2
1.2) A secreção de insulina.....	4
1.3) O influxo de Ca^{2+} na célula- β	7
1.4) Os canais TRP.....	10
1.5) A linha celular BRIN-BD11 como modelo da célula- β	13
1.6) Objectivos.....	16
Capítulo 2 – Materiais e Métodos	17
2.1) Soluções.....	18
2.1.1) Preparação do meio de cultura.....	19
2.1.2) Preparação do meio de lavagem.....	19
2.1.3) Preparação da solução de versénio.....	19
2.1.4) Preparação da solução salina de bicarbonato.....	19
2.2) Reagentes e materiais.....	20
2.2.1) Preparação dos fármacos.....	20
2.3) Cultura de linhas celulares.....	21
2.3.1) Descongelamento das células BRIN-BD11.....	21
2.3.2) Passagem das células.....	21
2.3.3) Colocação de células em lamelas.....	22
2.4) Isolamento e cultura de ilhéus de Langerhans.....	23
2.4.1) Remoção e selecção dos ilhéus.....	23
2.4.2) Cultura dos ilhéus de Langerhans.....	26

2.5)	Medição da $[Ca^{2+}]$ intracelular por microscopia de fluorescência	27
2.5.1)	Incorporação celular de FURA-2/AM.....	27
2.5.1.1)	FURA-2 como sonda fluorescente de Ca^{2+}	28
2.5.2)	Sistema de microfluorescência.....	30
2.5.3)	Sistema de perfusão.....	32
2.5.4)	Aquisição do sinal de fluorescência	33
2.5.5)	Calibração dos sinais de fluorescência.....	34
2.6)	Análise estatística.....	36
Capítulo 3 – Resultados e Discussão		37
3.1)	Estudos em células BRIN-BD11.....	38
3.1.1)	Decaimento da fluorescência de FURA-2.....	38
3.1.2)	Resposta a secretagogos metabolizáveis e não metabolizáveis.....	40
3.1.3)	Resposta a aumentos da $[Ca^{2+}]_o$	45
3.2)	Estudos em ilhéus de Langerhans	48
3.2.1)	Respostas a aumentos da $[Ca^{2+}]_o$	48
3.2.2)	Efeito de nifedipina na resposta a aumentos da $[Ca^{2+}]_o$	56
3.2.3)	Efeitos de difenilamina-2-carboxilato e ácido mefenâmico na resposta a aumentos da $[Ca^{2+}]_o$	60
3.3)	Considerações finais.....	68
Capítulo 4 – Conclusões Gerais		71
Capítulo 5 – Referências Bibliográficas		73

Abreviaturas

[Ca²⁺]_i	Concentração de cálcio intracelular	F₄₁₀	Fluorescência emitida por excitação com radiação a 410 nm
[Ca²⁺]_o	Concentração de cálcio extracelular	F₄₈₀	Fluorescência emitida por excitação com radiação a 480 nm
θ	% inibição	FB	Fura-2 complexado com o cálcio
λ	Comprimento de onda	Fura-2	Ácido 1-[2-(5-carbóxi-oxanol-2-il)-6-aminobenzofurano-5-oxil]-2(2- ^o amino-5 ^o metilfenóxi)-etano-N,N,N',N'-tetra-acético
A	Valor mínimo de θ	Fura-2/AM	Estér acetoximetilado de Fura-2
Ach	Acetilcolina	G1	Glicose 1 mM
ADP	Adenosina difosfato	G3	Glicose 3 mM
ATP	Adenosina trifosfato	G6	Glicose 6 mM
B	Valor máximo de θ	G11	Glicose 11 mM
BSA	Albumina de soro bovino	G17	Glicose 17 mM
Ca²⁺	Ião cálcio	G30	Glicose 30 mM
CaCl₂	Cloreto de cálcio	GLP-1	<i>Glucagon-like peptide-1</i>
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico	GLUT-2	Transportador de glucose 2
Ca_v	Canal de cálcio sensível à voltagem	H₂O₂	Peróxido de hidrogénio
CO₂	Dióxido de carbono	HCl	Ácido clorídrico
D-600	Metoxiverapamil	HEPES	Ácido N-2-ácido
DMSO	Dimetilsulfóxido		Hidroxi-etilpiperazina-N'-2'-Etanossulfônico
DNA	Ácido desoxirribonucleico	IC₅₀	Concentração que induz 50% de inibição máxima
DPC	Difenilamina-2-carboxilato	INS 1,4,5-P3	Inositol-1,4,5-trifosfato
DZ	Diazóxido	IP₃	Inositol trifosfato
EC₅₀	Concentração que induz 50% do efeito máximo	IRP	<i>Immediately releasable pool</i>
ECaC1	Ver TRPV5	K	Constante de dissociação aparente ou IC ₅₀
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético	K⁺	Ião potássio
EGTA	Ácido glicol-bis(2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetra-acético	K_{ATP}	Canal de potássio sensível a ATP
F₃₄₀	Fluorescência emitida por excitação com radiação a 340 nm	KCl	Cloreto de potássio
F₃₈₀	Fluorescência emitida por excitação com radiação a 380 nm	K_d	Constante de dissociação

KH₂PO₄	Di-hidrogenofosfato de potássio	PBS	Solução salina tamponizada com fosfato
K_m	Concentração de substrato necessária para induzir 50% da velocidade máxima de uma reação enzimática	pH	-log (atividade química de H ⁺)
K_v	Canal de potássio sensível à voltagem	PLC	Fosfolipase C
M1	Monocromador de excitação 1	R	Razão de fluorescência
M2	Monocromador de excitação 2	RINm5F	<i>Rat insulinoma cell</i>
Mg²⁺	Ião magnésio	R_{máx}	Razão de fluorescência com fura-2:Ca ²⁺ saturado
MgCl₂	Cloreto de magnésio	R_{min}	Razão de fluorescência com fura não ligado a cálcio
min	Minutos	S_{B2}	Intensidade de fluorescência a 380 nm FURA-2:Ca ²⁺ saturado
Mn²⁺	Ião manganésio	S.D.	Desvio padrão
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico	S_{F2}	Intensidade de fluorescência a 380 nm com fura não ligado a cálcio
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro	SNARE	<i>Soluble NSF attachment receptor</i>
n	Coefficiente de Hill	SOC	<i>Store-operated channel</i>
Na⁺	Sódio	STIM1	<i>Stromal interaction molecule</i>
NaCl	Cloreto de sódio	SV40	<i>Simian vacuolating virus</i>
β-NAD⁺	Nicotinamida Adenina Nucleótido beta	TRP	<i>Transient receptor potencia</i>
Na₂HPO₄	Hidrogenofosfato de di-sódio	TRPA	TRP ancirina
NaH₂PO₄	Di-hidrogenofosfato de sódio	TRPC	TRP canônico
NaHCO₃	Hidrogenocarbonato de sódio	TRPM	TRP melastatina
NaOH	Hidróxido de sódio	TRPML	TRP mucopolina
NB	Fura-2 não complexado com cálcio	TRPP	TRP policistina
Ni²⁺	Ião níquel	TRPV	TRP vanilóide
O₂	Oxigênio	VDCC	Canal de Ca ²⁺ sensível à voltagem
Orai1/CRA	Canal de cálcio ativado pela libertação de cálcio	α	Concentração de ligando
C	libertação de cálcio	Zn²⁺	Ião zinco
p	Probabilidade		
P₂X	Receptores purinérgicos ionotrópicos		

Resumo

A célula- β está equipada com um mecanismo de influxo de Ca^{2+} distinto do mediado por canais Ca_V . Pretendeu-se neste trabalho identificar este mecanismo, recorrendo a técnicas de microscopia quantitativa de fluorescência para monitorizar a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ em ilhéus únicos de ratinho. A estimulação do influxo de Ca^{2+} foi efectuada, na maior parte dos casos, aumentando a $[\text{Ca}^{2+}]_o$ para 7 mM (doravante designada como ‘pulso de Ca^{2+} ’). A aplicação de um pulso de Ca^{2+} na presença de 3 mM glicose aumentou a $[\text{Ca}^{2+}]_i$. O efeito não foi afectado por hiperpolarização com o agonista de canais K_{ATP} diazóxido (100 μM), mas foi muito potenciado pelo bloqueador de canais $\text{Ca}_V1.0$ nifedipina (10 μM). Nifedipina aumentou a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e acelerou o *quenching* da fluorescência de FURA-2 por Mn^{2+} no ponto isobéctico do indicador.

Os efeitos dos pulsos de Ca^{2+} na presença de nifedipina foram bloqueados por dois fenamatos, difenilamina-2-carboxilato (DPC, 500 μM) e ácido mefenâmico (3-80 μM ; $\text{IC}_{50}=10.3$ μM). O ácido mefenâmico é um inibidor aparentemente selectivo de canais TRPM3, uma sub-classe de canais TRP activada pelo esteróide neuroactivo pregnenolona. DPC aumentou a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ acentuadamente na ausência de nifedipina, pondo em evidência acções colaterais indesejáveis noutros transportadores de Ca^{2+} ; o efeito correspondente de ácido mefenâmico foi negligenciável. O ácido mefenâmico não afectou os aumentos da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induzidos por pulsos de Ca^{2+} na ausência de nifedipina, indicando que os canais subjacentes são diferentes dos canais TRPM3.

Também foram avaliados os efeitos de pulsos de Ca^{2+} utilizando células BRIN-BD11 únicas. Os pulsos de Ca^{2+} induziram respostas compostas por vários aumentos rápidos e transitórios, com latências variáveis, um padrão que era notoriamente diferente do registado em ilhéus. Esta observação sugere que, em células BRIN-BD11, o mecanismo subjacente ao efeito dos pulsos de Ca^{2+} é manifestamente diferente do que ocorre em ilhéus.

Conclui-se que as células- β de ratinho estão equipadas com canais TRPM3 sensíveis a pregnenolona, nifedipina e ácido mefenâmico. Sendo estes canais permeáveis a outros catiões divalentes, é provável que sejam responsáveis por

recapturar iões Zn^{2+} , que são necessários para a estabilização da insulina nos grânulos da célula- β .

Palavras-chave: Ilhéus de Langerhans; secreção de insulina; influxo de Ca^{2+} ; TRP; ácido mefenâmico.

Abstract

There is evidence for the operation of a Ca^{2+} influx pathway distinct from Ca_V channels in pancreatic beta cells. I aimed at identifying this pathway, using quantitative FURA-2 fluorescence microscopy to monitor global $[\text{Ca}^{2+}]_i$ from single mouse islets. Stimulation of Ca^{2+} influx was effected mostly by raising $[\text{Ca}^{2+}]_o$ to 7 mM (henceforth designated as a ‘ Ca^{2+} pulse’). Applying a Ca^{2+} pulse in presence of 3 mM glucose raised the $[\text{Ca}^{2+}]_i$. The effect was insensitive to further hyperpolarization with the K_{ATP} channel opener diazoxide (100 μM) but was greatly enhanced by the $\text{Ca}_V1.0$ blocker nifedipine (10 μM). Nifedipine itself raised the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and accelerated Mn^{2+} quenching of FURA-2 fluorescence at the dye’s isosbestic point.

The effects of Ca^{2+} pulses in presence of nifedipine were blocked by two fenamates, diphenylamine-2-carboxylate (DPC, 500 μM) and mefenamic acid (3-80 μM ; IC_{50} : 10.3 μM). Mefenamic acid is a seemingly selective inhibitor of TRPM3 channels, a TRP channel sub-class activated by the neuroactive steroid pregnenolone. DPC raised the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ markedly in absence of nifedipine, highlighting unwanted actions of the drug on Ca^{2+} transport mechanisms unrelated to TRPM3 channels; the corresponding effect of mefenamic acid was negligible. Mefenamic acid did not affect the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rises evoked by Ca^{2+} pulses in absence of nifedipine, indicating that the underlying channels are distinct from TRPM3 channels.

I have also assessed the effects of Ca^{2+} pulses using single insulin-secreting BRIN-BD11 cells. Ca^{2+} pulses elicited multi-spike responses with variable lag-times, a pattern that contrasted markedly with that in islets, suggesting that the underlying mechanism is different.

It is concluded that mouse beta-cells are equipped with pregnenolone-, nifedipine- and mefenamic acid-sensitive TRPM3 channels. Since these channels are permeant to other divalent cations, they may provide the re-uptake of Zn^{2+} ions, required to stabilize insulin in the beta-cell granules.

Keywords: Islet of Langerhans; insulin secretion; Ca^{2+} influx; TRP; mefenamic acid.

Capítulo 1 – Introdução

1.1) A célula- β e os ilhéus de Langerhans

O pâncreas endócrino é constituído por agregados celulares com morfologia bem definida, denominados ilhéus de Langerhans. Os ilhéus encontram-se dispersos pelo tecido exócrino do pâncreas, apresentando dimensões muito variadas (40 – 400 μ M) dependendo do número de células que os constituem.

Os ilhéus são compostos maioritariamente por quatro tipos de células: Células- β secretoras de insulina, que representam o tipo predominante (60 – 80 % das células); Células- α secretoras de glucagão; Células- δ secretoras de somatostatina; Células PP secretoras de polipéptido pancreático (Kitsou-Mylona et al., 2008). Estes aglomerados de células encontram-se perfeitamente individualizados, sendo rodeados por uma camada simples de fibroblastos e colagénio (Pipeleers, 1992).

A arquitectura das células no ilhéu obedece a um padrão bem definido, em que as células- β ocupam maioritariamente uma posição central no núcleo do ilhéu, sendo rodeadas por uma massa periférica constituída por uma mistura de células- β com os restantes tipos celulares.

Os ilhéus possuem um sistema microcirculatório muito extenso, composto por inúmeros capilares provenientes de arteríolas que se dirigem directamente para o núcleo do ilhéu, capilares esses que coalescem nas vénulas na periferia do ilhéu (ou já mesmo fora deste) (Bonner-Weir and Orci, 1982; Ohtani, 1983). Esta microanatomia do sistema circulatório evidencia uma direcionalidade do centro para a periferia, o que pressupõe um reconhecimento imediato dos níveis de glicose sanguínea pela célula- β através da estrutura fenestrada dos capilares e a consequente libertação de insulina para a corrente sanguínea. Esta hormona pode portanto vir a influenciar a secreção dos outros tipos celulares localizados a jusante, na periferia do ilhéu.

A síntese e libertação de insulina pela célula- β desempenham assim um papel central e primário na resposta à elevação dos níveis de glicose sanguínea (Rutter, 2001). Esta hormona promove a captura de glicose por parte das células do fígado e músculo e o seu armazenamento na forma de glicogénio, desempenhando também funções muito importantes noutras células do organismo, nomeadamente os adipócitos durante o processo da lipogénese.

A diabetes tipo 2, a forma mais comum da diabetes *mellitus*, é caracterizada por um desequilíbrio na homeostasia da glicose com intolerância à glicose e hiperglicemia, resultante não só de uma resistência periférica à insulina como também de uma deficiência progressiva na capacidade secretora da célula- β .

1.2) A secreção de insulina

O processo de estimulação da secreção de insulina pela glicose é de natureza metabólica, ou seja, depende criticamente do metabolismo da hexose pela célula- β . Tal como é ilustrado na Figura 1.1, a célula- β apresenta na sua membrana plasmática uma isoforma do transportador de glicose (GLUT-2) com um elevado K_m e uma elevada velocidade máxima de transporte, conseguindo assim aproximar rapidamente a concentração citoplasmática à concentração extracelular (Henquin et al., 2002; Rutter, 2001). Simplificadamente, a glicose é depois metabolizada pelos processos da glicólise e ciclo de Krebs, dando origem a nucleótidos de piridina e, por via da cadeia respiratória mitocondrial, à produção de ATP (Straub and Sharp, 2004).

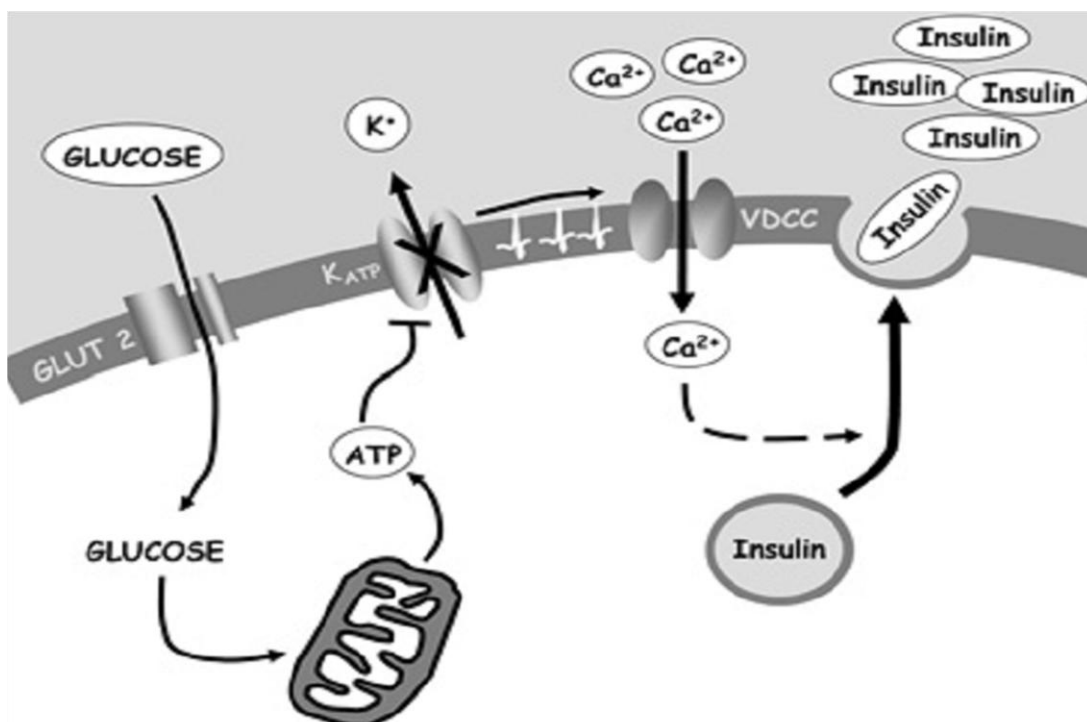


Figura 1.1: Visão abreviada do processo de acoplamento estímulo-secreção na célula- β pancreática. GLUT-2: transportador de glicose tipo 2; K_{ATP} : canal de K^+ sensível a ATP; VDCC: canal de Ca^{2+} sensível à voltagem. Consultar o texto principal para uma explicação dos passos principais. Figura adaptada de Persaud et al., (2008).

O aumento subsequente da razão ATP/ADP induz o fecho dos canais de K^+ sensíveis a ATP (K_{ATP}), responsáveis pelo potencial de membrana da célula- β na ausência de estímulo (Tengholm and Gylfe, 2009). A despolarização membranar que se

segue activa canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem (canais Ca_V), promovendo o influxo de Ca^{2+} e aumentos da concentração de Ca^{2+} na região sub-membranar, sem dúvida essenciais para a activação do processo exocitótico (Henquin, 2000; Henquin et al., 2002). Este envolve proteínas específicas que participam no transporte, acoplamento e fusão dos grânulos secretores com a membrana plasmática (proteínas SNARE) (Bratanova-Tochkova et al., 2002; Rorsman and Renstrom, 2003).

A activação de canais iónicos sensíveis à voltagem (incluindo canais Ca_V e canais de K_V) dá origem ao disparo de potenciais de acção, que apresenta uma distribuição fásica (*bursts*; ver Figura 1.2). Este padrão de disparo causa oscilações da concentração de Ca^{2+} livre citossólica [Ca^{2+}]_i; ver Figura 1.2), o que por sua vez se traduz na secreção de insulina com características pulsáteis (Santos et al., 1991). É de salientar que estas características se perdem nas etapas iniciais do desenvolvimento da diabetes tipo 2.

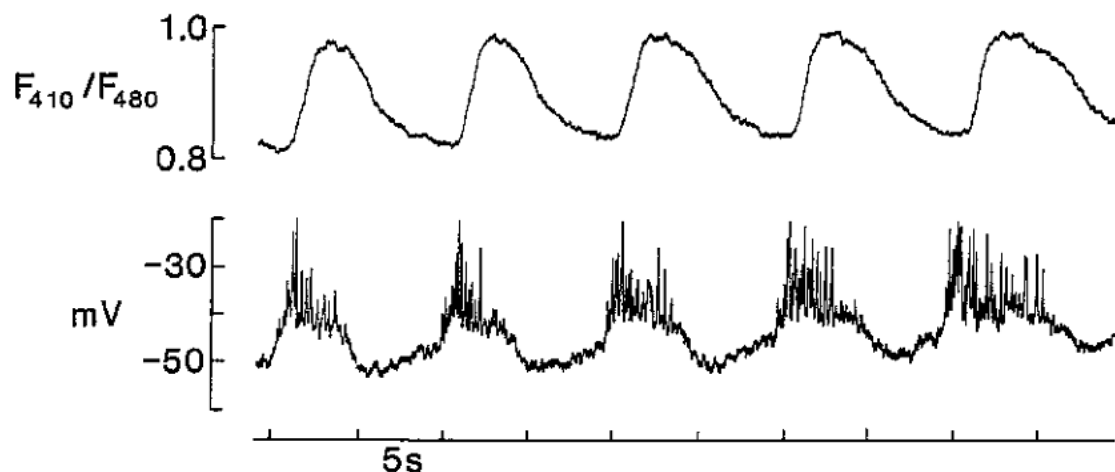


Figura 1.2: Sincronização da actividade eléctrica oscilatória (*bursts*) com as oscilações da [Ca^{2+}]_i, registadas em ilhéu único. O potencial de membrana (registo inferior) foi registado com um microeléctrodo de alta resistência. A [Ca^{2+}]_i foi determinada por microscopia de fluorescência ratiométrica, através do registo simultâneo da fluorescência do indicador de Ca^{2+} Indo-1 a dois comprimentos de onda (F_{410} e F_{480} ; registo superior). Figura extraída de Santos e tal., (1991).

A secreção de insulina, induzida pela transição de uma concentração baixa de glicose (condição em que a célula se encontra hiperpolarizada) para uma concentração média-alta da hexose, apresenta um padrão bifásico: (1) Uma primeira fase com duração aproximada de 10 minutos, caracterizada por um rápido aumento da secreção para um pico em cerca de 2 – 3 minutos e por um decréscimo subsequente para valores próximos dos valores basais; (2) Uma segunda fase em que a taxa de secreção aumenta para um

patamar durante cerca de 1 hora, mantendo-se essencialmente inalterada durante 3 a 4 horas. É durante a segunda fase que se observam oscilações no padrão secretor.

A primeira fase da secreção tem sido explicada pela existência de um grupo de vesículas secretoras, ancoradas à membrana plasmática e previamente activadas (a IRP, “*immediately releasable pool*”), cuja libertação dependeria exclusivamente do influxo de Ca^{2+} . Estas vesículas seriam também libertadas por estímulos não metabólicos. O outro conjunto de vesículas secretoras já parece requerer energia metabólica para a sua ancoragem à membrana. Para esta segunda fase da secreção contribui também um mecanismo potenciador (“via de amplificação”), relacionado com a activação pelo metabolismo da glicose de sistemas de segundos mensageiros interligados com as mitocôndrias (Henquin, 2000; Ravier et al., 1999).

A secreção de insulina é ainda modulada positiva ou negativamente por diversas hormonas e neurotransmissores, nomeadamente o glucagão, GLP-1 e acetilcolina (com acções potenciadoras da secreção) e a somatostatina, galanina e adrenalina (com acções inibidoras da secreção induzida por glicose).

1.3) O influxo de Ca^{2+} na célula- β

Os canais Ca_v tipo L ($\text{Ca}_v1.0$) têm um papel preponderante no processo de influxo de Ca^{2+} através da membrana, activado pela despolarização da célula- β com glicose. De facto, a incubação das células com bloqueadores como as di-hidropiridinas (ex: nifedipina) suprime os potenciais de acção, diminui a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e inibe a secreção de insulina (Benninger et al., 2008).

Em roedores, ao contrário da célula- β humana onde prevalecem os canais de Ca^{2+} tipo L $\text{Ca}_v1.3$ (α_{1D}), a exocitose é mediada pelos canais $\text{Ca}_v1.2$ (α_{1C}). Estes últimos apresentam um limiar de activação pela voltagem menos negativo e são altamente sensíveis às di-hidropiridinas.

É de referir ainda que a célula- β de murganhos apresenta, para além de canais tipo L, canais Ca_v tipo P/Q (canais $\text{Ca}_v2.1$ sensíveis a ω -agatoxina IVA), que apresentam um limiar de activação ainda menos negativo que os canais $\text{Ca}_v1.2$ (cerca de -20 mV), e canais tipo R ($\text{Ca}_v2.3$), que apresentam um limiar mais negativo (cerca de -50 mV). Estes últimos parecem desempenhar um papel mais preponderante na segunda fase da secreção, ao passo que os canais $\text{Ca}_v2.1$ parecem estar fortemente acoplados aos fenómenos de exocitose dos grânulos secretores do grupo IRP.

A par deste mecanismo de influxo de Ca^{2+} em resposta à glicose, foi demonstrado que o aumento da concentração de Ca^{2+} extracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_o$) induz aumentos da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ na presença de D-600, um bloqueador de canais Ca_v (Nilsson et al., 1987). Esta permeabilidade basal é comum em células especializadas na sensibilidade a $[\text{Ca}^{2+}]_o$, como os osteoclastos ou células da paratiróide, cujo sensor se encontra aparentemente acoplado à libertação de Ca^{2+} de depósitos intracelulares e ao influxo de Ca^{2+} . A maior parte das outras células apresentam alterações da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ muito pequenas em resposta a aumentos da $[\text{Ca}^{2+}]_o$, sugerindo uma permeabilidade membranar baixa ao Ca^{2+} ou uma capacidade muito elevada dos mecanismos de extrusão do Ca^{2+} do citoplasma.

A exposição a aumentos da $[\text{Ca}^{2+}]_o$ de células- β isoladas, bem como de grupos de ilhéus de Langerhans isolados ou de pâncreas perfundidos, induz secreção de insulina na ausência de outros secretagogos, sugerindo um papel relevante dos

correspondentes aumentos da $[Ca^{2+}]_i$ na homeostasia da glicose sanguínea. Este mecanismo de influxo de Ca^{2+} , independente de canais Ca_v , foi já objecto de estudo (Silva et al., 1994) no laboratório onde o presente trabalho foi realizado. Neste estudo, onde ilhéus únicos foram expostos a aumentos da $[Ca^{2+}]_o$ na presença de nifedipina, verificaram-se aumentos dose-dependentes da $[Ca^{2+}]_i$. Foi ainda verificado que estes aumentos não eram dependentes do metabolismo da glicose, já que não eram inibidos pelo inibidor glicolítico mano-heptulose. Testou-se ainda a hipótese de os aumentos da $[Ca^{2+}]_i$ provirem de reservatórios intracelulares, nomeadamente os sensíveis a inositol-1,4,5-trifosfato (Ins 1,4,5-P3). Na célula- β a acetilcolina induz aumentos da $[Ca^{2+}]_i$ por libertação de Ca^{2+} a partir de reservatórios sensíveis a Ins 1,4,5-P3, processo que envolve a activação de canais permeáveis a Na^+ e consequente despolarização da membrana. No entanto, recorrendo a um protocolo em que o esvaziamento daqueles reservatórios era conseguido por exposição a pulsos sucessivos de acetilcolina, verificou-se que o neurotransmissor não inibiu os aumentos da $[Ca^{2+}]_i$ causados por aumentos da $[Ca^{2+}]_o$ (ver Figura 1.3).

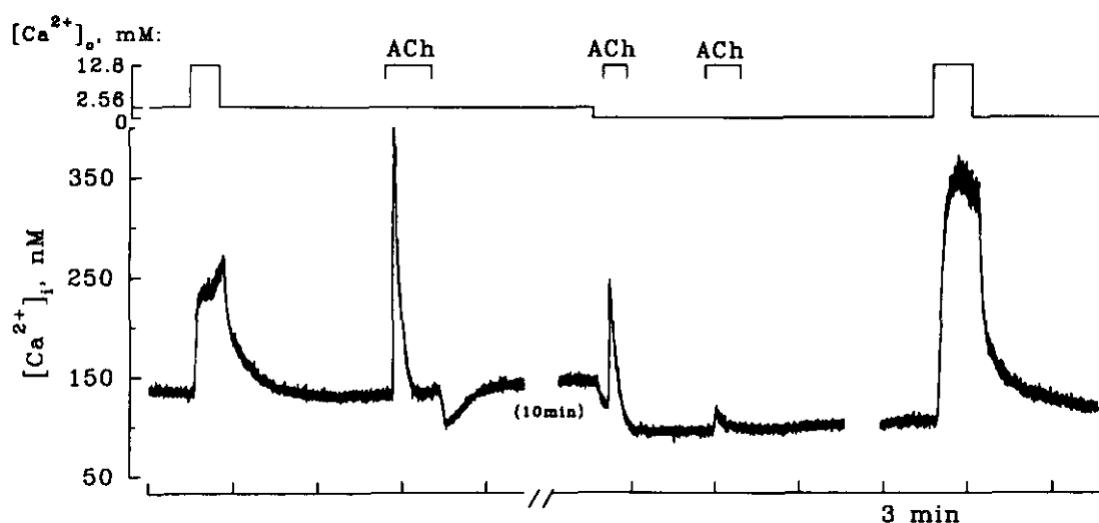


Figura 1.3: Efeito de aumentos da $[Ca^{2+}]_o$ na $[Ca^{2+}]_i$ e sua modulação por esvaziamento de reservatórios de Ca^{2+} . A $[Ca^{2+}]_i$ foi determinada a partir de um ilhéu de ratinho, exposto continuamente a 3 mM glicose e 10 μ M nifedipina. A $[Ca^{2+}]_o$ foi alterada tal como é indicado pelas barras superiores. O esvaziamento dos reservatórios de Ca^{2+} foi induzido por pulsos sucessivos de acetilcolina (ACh), o primeiro na presença 2,56 mM de Ca^{2+} , e os dois subsequentes na presença de uma solução sem Ca^{2+} adicionado e suplementado com EGTA. Figura extraída de Silva e tal. (1994).

O trabalho de Silva et al. (1994) põs em evidência um processo de influxo de Ca^{2+} não mediado por canais Ca_v , susceptível de inibição por Ni^{2+} e por difenilamina-2-

carboxilato (DPC), bloqueadores conhecidos de canais catiónicos não selectivos noutras células. Estas observações sugeriam que, conjuntamente com os canais $Ca_v1.0$, os “novos” canais poderiam desempenhar um papel relevante no influxo de Ca^{2+} necessário à libertação de insulina.

Uma via de influxo de Ca^{2+} insensível à voltagem, descrita em diferentes tipos celulares, encontra-se directamente acoplada ao esvaziamento de depósitos intracelulares de Ca^{2+} sensíveis a Ins-1,4,5-P3 (Thore et al., 2005). É o chamado “*store operated Ca²⁺ entry*”, cujo mecanismo ainda não foi claramente identificado. Uma molécula presente no retículo endoplasmático (“*stromal interaction molecule*” ou STIM1) parece ter um papel determinante. Esta molécula tem um domínio “*EF hand*” que actua como um sensor de Ca^{2+} , sendo libertada com o esvaziamento do retículo endoplasmático para a região próxima da membrana plasmática (Tamarina et al., 2008). Esta molécula entrará em contacto com um canal permeável a Ca^{2+} . Um destes canais é o Orai1 / CRAC (Prakriya et al., 2006). Os canais TRP (“*transient receptor potential*”) também têm sido apontados como alvos da molécula STIM1 (Kim et al., 2009).

1.4) Os canais TRP

Estes canais foram reportados pela primeira vez em 1989 durante a descrição de uma mutação de *Drosophila melanogaster*, cujos fotoreceptores eram incapazes de manter uma resposta persistente à estimulação pela luz. Desde essa altura muitos outros canais TRP foram descritos, encontrando-se todos eles associados a funções sensoriais (visão, audição, olfacto, tacto, gosto), bem como à percepção de alterações no meio que rodeia as células, tais como alterações térmicas e osmóticas (Huang, 2004; Kraft and Harteneck, 2005).

Os canais TRP são constituídos por domínios que apresentam 6 segmentos transmembranares, com os terminais amínicos e carboxílicos localizados intracelularmente, que se associam como homo ou hetero-tetrâmeros para formar um canal iónico. O *loop* entre o 5º e o 6º segmento (*loop P*) forma o poro do canal com selectividade a catiões (Venkatachalam and Montell, 2007) (ver Figura 1.4).

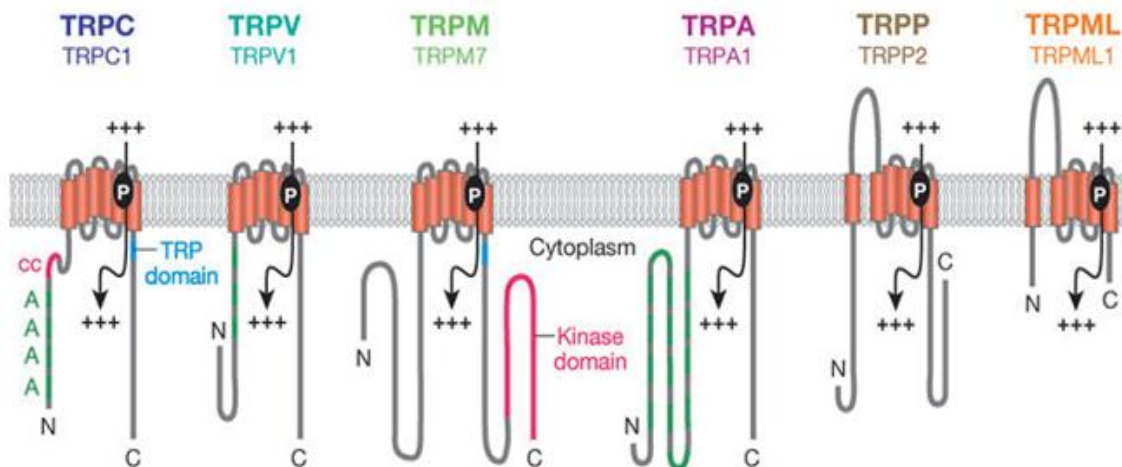


Figura 1.4: A superfamília de canais TRP. Ver texto principal para uma explicação detalhada. Figura adaptada de Venkatachalam and Montell, (2007).

Esta família de canais tem sido dividida em seis sub-famílias (Nilius et al., 2007), cujos nomes seguem em geral o nome de um activador para cada sub-família: TRPC (canónicos ou clássicos, primeiro identificados em *Drosophila*), TRPV (vanilóides), TRPM (melastatina), TRPP (policistina), TRPML (mucolipina) e TRPA (ancirina).

Dentro de cada uma destas sub-famílias, os canais TRP são ainda classificados de acordo com as suas características. Assim, em mamíferos os TRPC apresentam sete tipos diferentes (TRPC1-7), os TRPM oito tipos (TRPM1-8) e os TRPV seis tipos (TRPV1-6). Os TRPA só apresentam para já um tipo (TRPA1), os TRPP três tipos (TRPP2,3,5) e os TRPML três tipos (TRPML1-3). Os canais TRP permeiam Na^+ e Ca^{2+} com diferenças muito significativas entre os diferentes tipos, desde os canais TRPV5 e TRPV6 que são cerca de 100 vezes mais permeáveis a Ca^{2+} do que a Na^+ , até aos canais TRPM4 e TRPM5, que são impermeáveis a Ca^{2+} .

Em células secretoras de insulina os canais permeáveis a Ca^{2+} da sub-família C são os TRPC1 e TRPC4, estando o C1 presente em murganho e o C4 presente em rato. São canais igualmente permeáveis a Na^+ e a Ca^{2+} . Estes canais têm sido implicados em interacções com STIM1 e com receptores G_q/PLC , podendo pois estar associados ao esvaziamento de reservatórios intracelulares sensíveis a Ins-1,4,5-P3, processo também já descrito em células secretoras de insulina (Tamarina et al., 2008).

Na sub-família V já foram identificados quatro canais (TRPV1, TRPV2, TRPV4 e TRPV5). Apesar dos canais TRPV1 já terem sido identificados em células secretoras de insulina RIN e INS-1, bem como em células- β de rato, a sua presença em murganhos não é clara. Os canais TRPV2 são activados em geral por estímulos físicos como altas temperaturas, estiramento membranar ou alterações osmóticas. Na célula- β verificou-se que estes canais são sensíveis a insulina e altas concentrações de glicose (Hisanaga et al., 2009). Os canais TRPV2 apresentam uma selectividade superior a Ca^{2+} (vs. Na^+), podendo deste modo contribuir para o influxo de Ca^{2+} e potenciar a secreção de insulina. Podem também contribuir para a despolarização da membrana após estimulação com glicose. Os canais TRPV4 apresentam-se na célula- β como sensores mecânicos e osmóticos. São mais selectivos a Ca^{2+} (vs. Na^+), parecendo estar associados a fenómenos de apoptose (Casas et al., 2008). Os canais TRPV5 (anteriormente conhecidos como ECaC1), altamente selectivos a Ca^{2+} , foram descritos na célula- β como fazendo parte da membrana dos grânulos secretores (Janssen et al., 2002).

Na sub-família M foram identificados dois canais permeáveis a Ca^{2+} (TRPM2 e TRPM3). Os canais TRPM2 são activados principalmente por Ca^{2+} mas também por ADP ribose, $\beta\text{-NAD}^+$, óxido nítrico, radicais livres e H_2O_2 . Ao estarem também presentes na membrana de lisossomas, estes canais parecem estar envolvidos na eliminação de células- β danificadas por *stress* oxidativo (Scharenberg, 2009). O gene

trpm3 codifica muitos canais TRPM3 diferentes por *splicing* alternativo. Por exemplo, os canais TRPM3 α 1 têm um poro longo e pouco permeável a catiões divalentes como Ca²⁺ e Mg²⁺. Outro exemplo é constituído pelos canais TRPM3 α 2, com um poro curto e muito permeável a Ca²⁺; são estes os canais TRPM3 presentes na célula- β (Nilius et al., 2007; Wagner et al., 2010). É importante sublinhar que são activados pelo esteróide endógeno pregnenolona e que são também permeáveis a Zn²⁺, catião que forma complexos com insulina nos grânulos secretores e que é libertado para o meio extracelular durante o processo excitatório. Dada a sua permeabilidade a Zn²⁺, mesmo para níveis baixos e na presença de concentrações fisiológicas de Ca²⁺ e Mg²⁺, os canais TRPM3 α 2 podem constituir veículos de recaptação de Zn²⁺ pela célula- β (Wagner et al., 2010).

1.5) A linha celular BRIN-BD11 como modelo da célula- β

A heterogeneidade das células que constituem os ilhéus de Langerhans, bem como o número limitado de células que são isoladas a partir de cada roedor e o tempo limitado durante o qual estas células se mantêm viáveis, realçam a necessidade de serem utilizadas em muitos estudos linhas celulares secretoras de insulina. Estão correntemente disponíveis várias destas linhas, com características distintas (Hamid et al., 2002; McClenaghan et al., 1998).

As linhas originais e clássicas são as células RINm5F, derivadas de rato por incidência de raios X, e as células HIT-T15, derivadas de hamster por injeção do vírus SV40 em animais recém-nascidos (Hamid et al., 2002). Estas linhas apresentam, uma sensibilidade à glicose alterada. Esta alteração está principalmente relacionada com deficiências no transporte de glicose e na sua fosforilação. Uma linha celular produzida posteriormente, as células INS-1, já respondem à glicose no intervalo de concentrações fisiológicas devido a uma maior expressão de GLUT-2 e glucocinase, muito embora tenham a desvantagem de requerer mercaptoetanol para efeitos de proliferação em cultura.

A introdução de tecnologias de transfecção permitiu a produção de novas linhas celulares, com destaque para as células β TC-3 e MIN-6. As primeiras, embora respondam a um leque variado de secretagogos das células primárias, têm uma sensibilidade muito maior a concentrações sub-fisiológicas de glicose. As células MIN-6, derivadas de murganhos C57BL/6 transgênicos, já exibem uma sensibilidade adequada à glicose na região fisiológica, embora com um perfil inapropriado de dose-resposta. A utilização de técnicas de fusão de células *in vitro* proporcionou uma outra aproximação ao problema. Assim, as células BRIN-BD11 foram produzidas por electrofusão de células- β de rato com a linha celular RINm5F (Kamagate et al., 2008). Esperar-se-ia, portanto, que as células produzidas por este método tivessem a capacidade de ser estáveis durante um longo período (cerca de 50 passagens), exibindo ao mesmo tempo um perfil de secreção mais próximo do das células nativas (Rasschaert et al., 1996).

As células BRIN-BD11 expressam mais GLUT-2 nas suas membranas quando comparadas com as células RINm5F, o que aumenta claramente a sua capacidade de transporte de glicose. Por outro lado, nas células BRIN-BD11 a glucocinase representa cerca de 70 % da capacidade de fosforilação da glicose, ou seja, as células apresentam uma razão glucocinase:hexocinase comparável à das células- β de rato (McClenaghan et al., 1998; McClenaghan and Flatt, 1999). As células BRIN-BD11 apresentam ainda um conteúdo em insulina muito superior ao das células RINm5F, segregando comparativamente maiores quantidades da hormona (nanogramas vs. picogramas). No entanto, a característica mais apelativa daquelas células é o facto de apresentarem um perfil gradativo de secreção de insulina em resposta a aumentos da concentração de glicose, propriedade inexistente ou claramente limitada noutras linhas celulares (ver Figura 1.5). A dose-dependência exibida pelas células BRIN-BD11 tem características sigmoidais no intervalo de concentrações de glicose 1-16,7 mM, sendo o limiar próximo de 4 mM (Salgado et al., 2000).

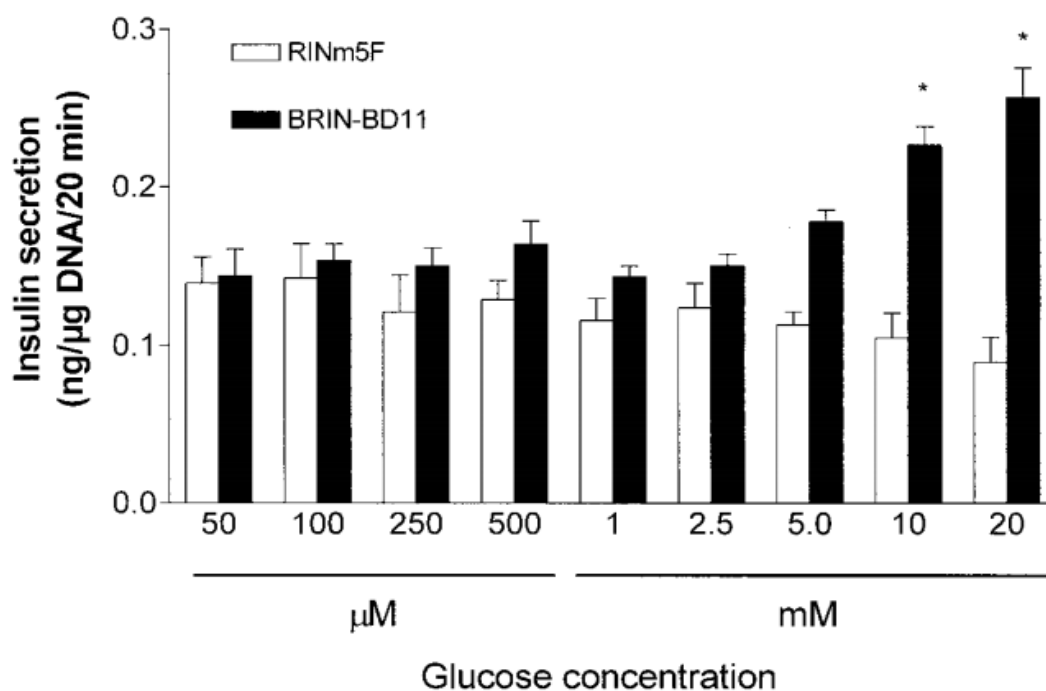


Figura 1.5: Perfil da secreção de insulina em resposta à glicose em duas linhas celulares, RINm5F e BRIN-BD11. Ver texto principal para a comparação entre os dois tipos celulares. Figura extraída de McClenaghan et al., (1998).

O laboratório onde o presente trabalho foi realizado tem experiência documentada no uso de células BRIN-BD11 para o estudo de vários problemas do

acoplamento estímulo-resposta. Estas células provaram ser um modelo celular adequado para estudos de secreção de insulina, envolvendo secretagogos metabolizáveis e não-metabolizáveis (Salgado et al., 1999). Mostraram ainda reter adequadamente o indicador fluorescente de Ca^{2+} FURA-2, proporcionando a realização de estudos da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ em células individuais (Salgado et al., 2000). Em particular, muito embora se tivesse constatado que a população celular respondia de forma heterogénea à glicose, verificou-se que aumentava marcadamente a proporção de células com resposta positiva em função da concentração da hexose e, por outro lado, que a resposta era gradativa quando examinada ao nível de uma só célula (Salgado et al., 2000).

As características das células BRIN-BD11, atrás sublinhadas, justificaram a sua utilização na primeira fase do presente trabalho.

1.6) Objectivos

Estudos anteriores, levados a cabo no laboratório, demonstraram a existência na célula- β de uma via de influxo de Ca^{2+} distinta dos canais Ca_V . Esta via permaneceu por identificar até ao momento da realização do presente trabalho. Pretendeu-se, neste, proceder a uma caracterização farmacológica e biofísica com vista à sua identificação e enquadramento fisiológico, colocando a hipótese de o mecanismo envolver canais TRP e recorrendo a técnicas de microscopia quantitativa de fluorescência para a monitorização da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ em célula- β pancreática e ilhéu isolado.

*Capítulo 2 – Materiais e
Métodos*

2.1) Soluções

As soluções utilizadas foram sempre preparadas com água ultra-pura ou água miliQ (resistência superior a 18,2 MΩ) e o pH foi mantido constante pelo uso de soluções tampão apropriadas. Todo o material usado na câmara de fluxo laminar para a cultura de linhas celulares ou cultura primária estava previamente esterilizado para evitar contaminações. As soluções foram esterilizadas por filtração com filtros de poro 0,2 μm. As soluções utilizadas ao longo deste trabalho laboratorial encontram-se referenciadas na tabela 2.1.

Tabela 2.1: Composição das diferentes soluções utilizadas neste trabalho.

<u>Solução</u>	<u>Composição</u> (em mM, quando não é especificado)
A – Meio de cultura	8,4 g/L RPMI-1640, 25 NaHCO ₃ , 11,1 Glicose, ajustado o pH a 7,3 com HCl 1 M e suplementado com 10% (v/v) Soro Fetal Bovino, 100 μg/ml penicilina e 100 U/ml estreptomicina.
B – Solução de PBS	136,9 NaCl, 2,7 KCl, 10,1 Na ₂ HPO ₄ , 1,8 KH ₂ PO ₄ ajustado o pH a 7,4 com NaOH 2 M.
C – Solução de versénio	135 NaCl, 8 Na ₂ HPO ₄ , 1,5 KH ₂ PO ₄ , 2,5 KCl, 0,5 EDTA, ajustado o pH a 7,3 com NaOH 2 M e suplementado com 0,0002% Fenol Red.
D – Solução salina de bicarbonato	120 NaCl, 5 KCl, 25 NaHCO ₃ , 1,1 MgCl ₂ , 2,56 CaCl ₂ , gaseificada com 95% O ₂ / 5% CO ₂ para manter o pH a 7,4.
E – Solução salina de calibração dos sinais de fluorescência	10 NaCl, 100 KCl, 1 MgCl ₂ , 10 MOPS, 2 μM FURA-2 ácido, 2 CaCl ₂ ou 2 EGTA, pH ajustado a 7,0 com NaOH 2 M.
F – Solução de isolamento de ilhéus de Langerhans	115 NaCl, 5 KCl, 10 NaHCO ₃ , 1,2 NaH ₂ PO ₄ , 25 HEPES ácido, 1,1 MgCl ₂ , 2,56 CaCl ₂ , pH ajustado a 7,4 com NaOH 2 M.
G – Solução salina HEPES ácido (transporte de células)	120 NaCl, 5 KCl, 25 HEPES ácido, 1,12 MgCl ₂ , 2,56 CaCl ₂ , 1 Glicose, pH ajustado a 7,3 com NaOH 2 M.

2.1.1) Preparação do meio de cultura

O meio de cultura (solução A) foi preparado adicionando ao meio (RPMI-1640 sem glicose e bicarbonato, numa concentração de 8,4 g/L) 25 mM NaHCO₃, e 11,1 mM glicose ajustando o pH para 7,3 com HCl 1 M. Na câmara de fluxo laminar, e após esterilização, adicionou-se soro fetal bovino (10% v/v) e antibióticos (100 µg/ml de penicilina e 100 U/ml de estreptomicina). Tanto os antibióticos como o soro fetal bovino foram previamente aliquotados em condições estéreis.

2.1.2) Preparação do meio de lavagem

A solução B referida na tabela 2.1 era usada para a lavagem das células. Esta solução de PBS (solução salina tamponizada com fosfato) era constituída por 136,9 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10,1 mM Na₂HPO₄ e 1,8 mM KH₂PO₄ ajustando o pH a 7,4 com NaOH 2 M. Esta solução era esterilizada por filtração na câmara de fluxo laminar.

2.1.3) Preparação da solução de versénio

A solução de versénio (solução C) tem como principal função destacar as células dos frascos de cultura. É constituída por 135 mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, 2,5 mM KCl e 0,5 mM EDTA ajustando o pH a 7,3 com NaOH 2 M e ao qual era suplementado 0,0002% de Fenol Red. Esta solução era esterilizada por filtração na câmara de fluxo laminar.

2.1.4) Preparação da solução salina de bicarbonato

A solução D era preparada recorrendo a *stocks* 10X concentrados de NaCl, KCl e NaHCO₃. Esta solução era então gaseificada com carbogénio para baixar o pH antes da adição de MgCl₂ e CaCl₂ de forma a evitar a formação de precipitados de carbonato de cálcio ou magnésio.

2.2) Reagentes e materiais

Os reagentes usados em geral durante este trabalho laboratorial, como sais utilizados na preparação de soluções, possuíam pureza analítica e eram provenientes da Merck KGaA (Darmstad, Alemanha) e Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO, EUA). A Liberase TL foi obtida da Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Alemanha). O FURA-2/AM foi adquirido à Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, EUA). Diazóxido, nifedipina, difenilamina-2-carboxilato (DPC), ácido mefenâmico, tolbutamida, sulfato de pregnenolona e adenosina trifosfato (ATP) foram adquiridos à Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO, EUA).

O material utilizado na cultura da linha celular e cultura primária foi obtido da Sarstedt AG&Co. (Nümbrecht, Alemanha), VWR International (West Chester, PA, EUA) e Costar Corporation (Cambridge, MA, EUA).

2.2.1) Preparação dos fármacos

Os fármacos utilizados foram previamente aliquotados em *stocks* concentrados. Nifedipina, DPC e ácido mefenâmico e o esteróide sulfato de pregnenolona foram preparados em DMSO (dimetilsulfóxido). O ATP foi preparado em água miliQ e o diazóxido e a tolbutamida em água miliQ e NaOH.

2.3) Cultura de linhas celulares

A linha celular utilizada neste trabalho, células BRIN-BD11 obtidas por electrofusão de células RINm5F com células de ilhéus pancreáticos de ratos, foi gentilmente cedida pelo Doutor Peter Flatt, *University of Ulster*, Irlanda do Norte.

Estas células encontravam-se congeladas no nosso laboratório em nitrogénio líquido.

2.3.1) Descongelamento das células BRIN-BD11

Os *vials* de congelamento continham células na passagem 19 criopreservadas num meio composto de 70% RPMI 1640, 20% Soro Fetal Bovino e 10% de DMSO. O DMSO é colocado nos meios de congelação para evitar a ruptura das células, com a formação de cristais.

O *vial* foi aquecido rapidamente a 37°C num banho termostaticado e a suspensão celular, uma vez descongelada, foi transferida para um frasco de cultura de 75 cm² que continha 15 ml de meio e colocado numa incubadora a 37°C, 90% de humidade e 5% de CO₂.

Quando observadas ao microscópio, estas células apresentavam um aspecto brilhante e redondo.

2.3.2) Passagem das células

Ao longo do trabalho realizaram-se várias passagens das células sempre que estas se apresentavam muito confluentes. O meio de cultura utilizado está referenciado na tabela 2.1 (solução A) e era mudado a cada 48 horas. As células eram cultivadas com uma densidade de 2×10^5 células por frasco de cultura de 75 cm². As diversas experiências que se realizaram utilizaram células entre as passagens 21 e 44.

Este processo foi realizado sempre que era necessário colocar células em lamelas para posterior utilização em experiências ou quando as células se encontravam muito confluentes nos frascos de cultura, em geral uma vez por semana. Inicialmente o meio era removido e o frasco de cultura lavado com PBS (solução B). De seguida era removida esta solução de lavagem e adicionada a solução de versénio (solução C) para destacar as células do frasco. O tempo de incubação desta solução era determinado por visualização directa das células ao microscópio. O destacamento das células era também facilitado por pequenas vibrações mecânicas efectuadas com a mão na parede do frasco. No final desta incubação era adicionado 5 ml de meio de cultura, procedendo-se à contagem das células num hemocitómetro e à determinação da viabilidade celular pelo método de exclusão com *Trypan Blue*. Posteriormente calculava-se o volume necessário de células a passar para os novos frascos de cultura de 75 cm² de modo obter uma densidade celular de 2×10^5 células. Os novos frascos eram colocados na incubadora a 37°C, com 95% ar / 5% CO₂ com humidade controlada.

2.3.3) Colocação de células em lamelas

As células utilizadas para experiências eram colocadas em lamelas. As lamelas eram previamente revestidas com poli-L-lisina (0,1 mg/ml poli-L-lisina, 0,15 M ácido bórico, pH 8,0 ajustado com NaOH). Lamelas lavadas em água e etanol e secas em papel absorvente eram colocadas a flutuar na solução de poli-L-lisina durante pelo menos 4 horas. No final eram lavadas em água para remover o excesso de poli-L-lisina e depositadas em caixa de Petri com a face revestida voltada para cima. Todo este processo era realizado em condições assépticas na câmara de fluxo laminar.

O volume de células colocado em cada lamela dependia não só da densidade de células que se pretendia, como da densidade celular calculada na contagem de células. As lamelas com a gota de suspensão celular eram deixadas durante 2 horas na incubadora para aderirem, após o que se adicionava 2 ml de meio de cultura. As lamelas eram então mantidas na mesma incubadora que os frascos de cultura.

2.4) Isolamento e cultura de ilhéus de Langerhans

Neste trabalho foram também utilizados ilhéus pancreáticos de murganho, do género feminino, da estirpe CD1 provenientes da *Charles River Laboratories España*, SA (Barcelona, Espanha). Os animais foram mantidos no biotério da Faculdade de Medicina / Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra e foram alimentados *ad libitum*, com acesso livre a água e sujeitos a ciclos alternados luz/escuro de 12 h. Os animais utilizados tinham entre 9 e 24 semanas de idade e um peso compreendido entre as 21 e 30 g.

O procedimento utilizado no isolamento de ilhéus neste trabalho tem por base o uso de Liberase TL, uma *pool* de enzimas (colagenase A e B) que, por digestão enzimática do tecido pancreático permite que os ilhéus se separem totalmente do tecido exócrino mantendo, ao mesmo tempo, ilhéus em elevado número e viáveis (Yesil et al., 2009).

2.4.1) Isolamento e selecção dos ilhéus

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical de acordo com as recomendações da *Federation for European Laboratory Animal Science Associations* (FELASA) e de acordo com a portaria nº 1005792 de 23 de Outubro do Estado Português. O sacrifício do animal por deslocamento cervical é vantajoso relativamente à decapitação pois, além de evitar o enxaguamento do animal, não leva a uma descoloração do pâncreas que impede uma boa visualização do órgão durante a remoção.

Os murganhos depois de sacrificados, eram pesados e lavados para que os pêlos não contaminem a preparação durante a pancreotectomia. A extracção do pâncreas deve ser relativamente rápida (menos de 30 min) para que as células não entrem em hipoxia. O animal era então colocado numa mesa cirúrgica, em posição dorsal.

Com a ajuda de uma tesoura e uma pinça era feita uma incisão longitudinal na pele desde a púbis até ao pescoço. De seguida nova incisão longitudinal era feita desde a púbis até ao apêndice xifóide cortando a parede abdominal (musculatura e peritoneu). Papel absorvente era colocado nas margens da incisão para evitar contaminação nos órgãos por pêlos. O apêndice xifóide era removido permitindo que o fígado fosse deslocado para cima do tórax facilitando a exposição do colédoco.

Uma vez expostos os órgãos era muito importante ir humedecendo os tecidos com solução de isolamento suplementada com 11 mM de glicose sem BSA, arrefecida a 4°C. Este passo evita a desidratação e provoca o arrefecimento dos tecidos de modo a manter uma actividade reduzida da Liberase TL durante a injeção desta no pâncreas e durante a fase de dissecação do mesmo.

O duodeno era então deslocado de modo a colocar o colédoco numa posição rectilínea e, sob observação de uma lupa (Nikon SMZ-2T) e de material cirúrgico adequado, obstruía-se a terminação do colédoco no duodeno com um nó feito com fio de sutura, de modo a impedir a passagem para o intestino da solução enzimática a injectar posteriormente. A outra extremidade do colédoco, na posição após a coalescência das ramificações hepáticas foi rodeada com fio de sutura com um nó solto. Imediatamente acima deste nó era feito um pequeno corte transversal e não total no colédoco para permitir a inserção de uma pequena cânula, que era imobilizada quando o nó era apertado. Era de seguida injectado no colédoco um volume entre 1 – 2 mL de solução de Liberase TL com uma actividade de 1,083 Wu/mL suplementada com 3 mM de glicose e arrefecida a 4 °C, que levava a distensão completa do pâncreas.

Depois de distendido, o pâncreas era cuidadosamente dissecado e separado do resto dos órgãos, começando a separação pelo intestino, seguido pelo baço e finalmente pelo estômago. O pâncreas era recolhido e lavado com solução de isolamento sem BSA e com 11 mM de glicose e colocado num tubo de *falcon* de 15 mL para se proceder à digestão.

A digestão enzimática era feita a 37 °C por imersão do tubo de *falcon* na posição horizontal num banho termostático e oscilando muito suavemente para evitar a desagregação do pâncreas por choque contra as paredes do tubo. O tempo de digestão está dependente de vários factores como a idade ou o peso do animal, ou a quantidade de volume injectado e a consequente distensão do pâncreas. Assim são usados critérios visuais para parar a reacção. Esses critérios têm como base o aumento da turbidez da

solução e a ligeira fragmentação do tecido pancreático. O tempo da digestão variou entre os 3 min e os 4 min e 20 s.

A paragem da reacção enzimática era feita através da colocação do tubo em gelo, enchendo-o de imediato com solução fria (4 °C) de isolamento suplementada com 11 mM de glicose e 3 % BSA. A inibição da enzima é feita pela acção do frio, pela diluição da enzima e pela acção da BSA. O tubo era então agitado fortemente para que ocorresse uma disrupção mecânica do pâncreas, seguido da sedimentação do seu conteúdo. O sobrenadante era removido por aspiração com uma pipeta de Pasteur plástica. Neste passo era também removida alguma gordura que possa ter ficado inicialmente agarrada ao tecido pancreático. Este passo de remoção da enzima por diluições sucessivas é repetido mais três vezes com soluções sucessivamente mais próximas da temperatura ambiente.

Após a adição da última solução ao tubo (9 mL de solução de isolamento 11 mM glicose com 3 % BSA à temperatura ambiente) a suspensão era homogeneizada com uma pipeta de plástico descartável para separar completamente os ilhéus do tecido exócrino, tendo o cuidado de não introduzir ar na suspensão. O homogeneizado era então transferido para uma placa de Petri de plástico (92 mm diâmetro).

A placa de Petri contendo os ilhéus era então colocada sobre uma base negra com iluminação lateral e, com recurso a uma lupa estereoscópica, os ilhéus eram visualizados. Os ilhéus eram seleccionados por inspecção visual e transferidos, com a ajuda de uma micropipeta Gylson (P20), para uma nova caixa de Petri (35 mm de diâmetro) contendo solução de isolamento com 3 % BSA. A selecção dos ilhéus baseou-se sempre na sua forma arredondada, coloração branca e rebordos lisos. Este processo de selecção e transferência de ilhéus foi repetido diversas vezes até estes não se encontrarem contaminados com tecido exócrino. O número de ilhéus obtidos por isolamento situou-se entre os 50 – 200 ilhéus.

Após a selecção de ilhéus, estes eram deixados a recuperar (\approx 1 hora) numa caixa de Petri contendo solução salina de bicarbonato, suplementada com 17 mM de glicose e 3 % BSA até ao momento da preparação destes para cultura.

2.4.2) Cultura dos ilhéus de Langerhans

Todos os passos de preparação para a cultura dos ilhéus eram efectuados numa câmara de fluxo laminar para manter condições de assepsia.

O meio de cultura utilizado foi o mesmo que o usado para a cultura das células BRIN-BD11 (preparação referenciada no ponto 2.1.1).

Os ilhéus foram esterilizados por sucessivas passagens (3 vezes) para caixas de Petri (35 mm diâmetro) contendo meio de cultura estéril sendo no final distribuídos por novas caixas de Petri, contendo em média 6 a 9 ilhéus por caixa, para cultura. Estas caixas eram então mantidas até 54 h numa incubadora com 5 % CO₂ / 95 % ar, humidade aproximada de 90 %, a 37 °C.

2.5) Medição da $[Ca^{2+}]$ intracelular por microscopia de fluorescência

Neste trabalho pretendeu-se analisar mudanças significativas na $[Ca^{2+}]$ intracelular quando aplicados certos estímulos metabólicos ou fármacos. Para isso utilizou-se um sistema de microfluorescência e o indicador fluorescente FURA-2 (derivado do precursor acetoximetilado FURA-2/AM) (Silva et al., 1994).

2.5.1) Incorporação celular de FURA-2/AM

As células BRIN-BD11 eram colocadas em lamelas revestidas com poli-L-lisina 0,1 mg/ml e mantidas em meio de cultura em caixas de Petri de 35 mm de diâmetro como referido no ponto 2.3.3. Na altura da incorporação da sonda fluorescente nas células as lamelas eram transferidas para placas *multiwell* com 12 poços onde eram incubadas durante 45 – 55 min. As células eram incubadas a 37 °C e gaseificadas com carbogénio (95 % O₂ / 5 % CO₂). A solução usada para o carregamento era uma solução salina de bicarbonato suplementada com 1 mM glicose, 1 % BSA e 4 μM FURA-2/AM. A densidade celular usada era entre 1.4×10^4 e 2×10^4 células por lamela. No final do tempo de incubação as células eram transportadas e mantidas na solução salina HEPES ácido (solução G) desde a incubadora até ao momento de colocar as lamelas na câmara de perfusão associada ao sistema de microfluorescência.

No que diz respeito aos ilhéus, estes eram incubados numa solução salina de bicarbonato com 3 mM glicose, 3 % BSA e uma concentração da sonda de 4 μM. Os ilhéus eram colocados numa placa *multiwell* com 4 poços na incubadora a 37 °C durante 45 – 55 min (2 a 4 ilhéus por poço). De seguida eram transferidos para o sistema de perfusão acoplado ao sistema de microfluorescência que continha uma lamela revestida com poli-L-lisina 0,1 mg/ml. Os ilhéus eram deixados durante 10 min a interagir com a lamela, de modo a promover interações electrostáticas entre a lamela e as células.

O FURA-2/AM era preparado por diluição, em ambos os casos, a partir de uma solução *stock* concentrada de FURA-2/AM 1 mM em DMSO.

O revestimento de uma das faces das lamelas com poli-L-lisina foi feito numa câmara de fluxo com material esterilizado. O revestimento resultava do contacto com uma solução de poli-L-lisina (0.1 mg/mL, preparada a partir de um stock concentrado de 10 mg/mL) em tampão borato (150 mM borato de sódio a pH 8.4) durante pelo menos 4 horas. Estas lamelas eram no final lavadas com água destilada e esterilizada, sendo depois de secas, colocadas em caixas de Petri para serem guardadas no congelador.

2.5.1.1) FURA-2 como sonda fluorescente de Ca^{2+}

O FURA-2 (figura 2.1) é uma sonda fluorescente com elevada afinidade a Ca^{2+} . Esta molécula deriva do EGTA, um quelante também com grande afinidade ao Ca^{2+} , ao qual se adicionou um fluoróforo de estilbeno. Desta forma, a sonda forma complexos 1:1 com o catião, permitindo a detecção quantitativa de variações da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ na ordem de grandeza dos sub- μM . A constante de dissociação (K_d) do complexo FURA-2/ Ca^{2+} é de cerca de 150 – 250 nM (Grynkiewicz et al., 1985; Van den Bergh et al., 1995).

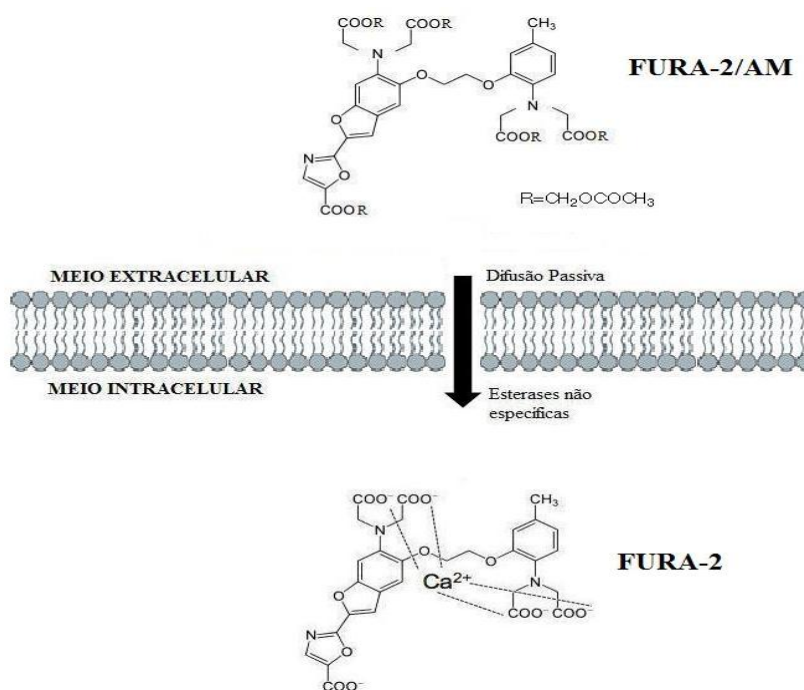


Figura 2.1: Estruturas químicas de FURA-2/AM e do FURA-2 e representação da incorporação desta sonda nas células. O FURA-2/AM entra por difusão passiva nas células e, por acção de esterases não específicas, ocorre a hidrólise das ligações éster levando à formação do penta-anião FURA-2, que tem elevada afinidade a Ca^{2+} .

O FURA-2 é uma sonda que não permeia a membrana celular devido às suas cargas negativas a pH fisiológico, daí que seja gerada intercelularmente a partir do precursor acetoximetilado FURA-2/AM (figura 2.1). Esta molécula é muito hidrofóbica e pouco fluorescente, conseguindo passar a membrana plasmática por difusão passiva. Ao chegar ao citoplasma, as ligações acetoximetil-éster são hidrolisadas por esterases não específicas, originando assim FURA-2, que já emite fluorescência (Paredes et al., 2008).

O espectro de excitação de FURA-2 está representado na figura 2.2, tendo sido determinado para as concentrações de cálcio assinaladas. É possível verificar que à medida que se aumenta a concentração de cálcio ocorre um aumento e diminuição de fluorescência à esquerda e à direita do ponto isobéstico (cerca de 360 nm), respectivamente. As mudanças mais significativas verificam-se para uma excitação na região dos 340 nm e dos 380 nm, sendo estes comprimentos de onda usados para monitorizar o cálcio intracelular. Um modo mais rigoroso para medir alterações de cálcio intracelular é utilizar a razão de fluorescência F_{340}/F_{380} , uma vez que os valores obtidos são independentes da concentração intracelular do indicador e da sensibilidade do sistema de deteção.

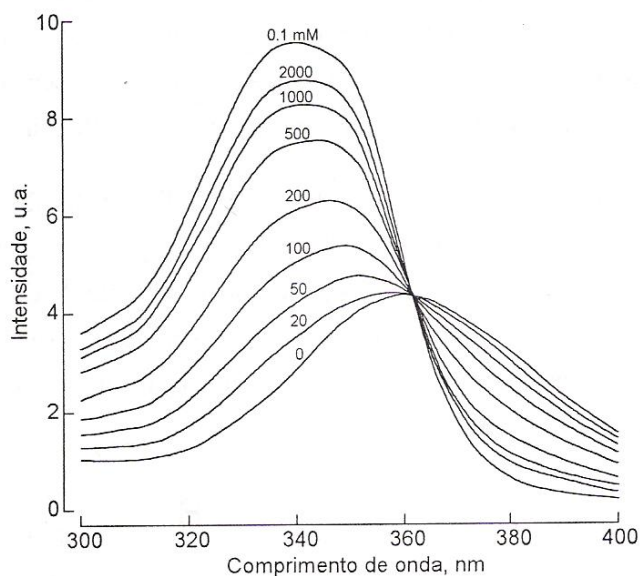


Figura 2.2: Espectros de excitação de FURA-2 em função da concentração de Ca^{2+} no meio. Com uma exceção, as concentrações são expressas em nM. Adaptado de Figueiredo, (2010).

2.5.2) Sistema de microfluorescência

As medições dos níveis de fluorescência nas células e ilhéus foram feitas recorrendo a um sistema de microfluorescência de dupla excitação (Deltascan; PTI, Birmingham, NJ, EUA) associado a um microscópio invertido (Nikon Diaphot, Tokio, Japão). Este sistema pode ser dividido em quatro sub-sistemas: 1) produção e selecção da radiação de excitação; 2) microscópio de fluorescência; 3) detecção da radiação emitida e amplificação do sinal; e 4) aquisição do sinal. O sistema encontra-se representado esquematicamente descrito na figura 2.3.

1) A excitação é proporcionada por uma lâmpada de xénon de 75 W. A radiação emitida pela fonte de luz é conduzida por um diafragma até um espelho rotativo. Existe no entanto um obturador posicionado antes do diafragma, que possui a capacidade de bloquear o trajecto óptico da radiação, evitando deste modo a fotodegradação da sonda durante os períodos em que o registo é interrompido. No espelho rotativo circular a radiação é dividida em dois feixes: um deles passa pelas falhas do disco em direcção ao monocromador 2, sendo o outro reflectido em direcção ao monocromador 1. Ambos os monocromadores permitem seleccionar os comprimentos de onda de excitação e, simultaneamente, fixar a largura da banda da radiação de excitação, regulando deste modo a intensidade do feixe. Neste trabalho os comprimentos de onda desejados foram quase sempre 340 nm e 380 nm, fixando-se excepcionalmente o monocromador 1 em 358 nm para estudos de *quenching* de fluorescência. A radiação emergente dos monocromadores é conduzida por uma fibra óptica até ao microscópio de fluorescência.

2) O elemento central do microscópio invertido de fluorescência é um espelho dicróico posicionado a 45°, que intercepta o feixe de excitação antes de este atingir a amostra em estudo. O espelho possui um revestimento especial que faz com que transmita toda a radiação acima dos 420 nm (cerca de 50% de transmitância a 400 nm e 90% a 420 nm), ao mesmo tempo que reflecte a excitação de interesse (normalmente centrada a 340 e a 380 nm) em direcção à objectiva de quartzo (40X, de imersão em óleo) e por esta via, à amostra. A fluorescência emitida pela amostra é depois transmitida através da objectiva e do espelho dicróico até ao filtro de interferência centrado a 510 nm, permitindo a detenção da fluorescência de interesse pelo fotomultiplicador com um mínimo de interferência por radiação espúria.

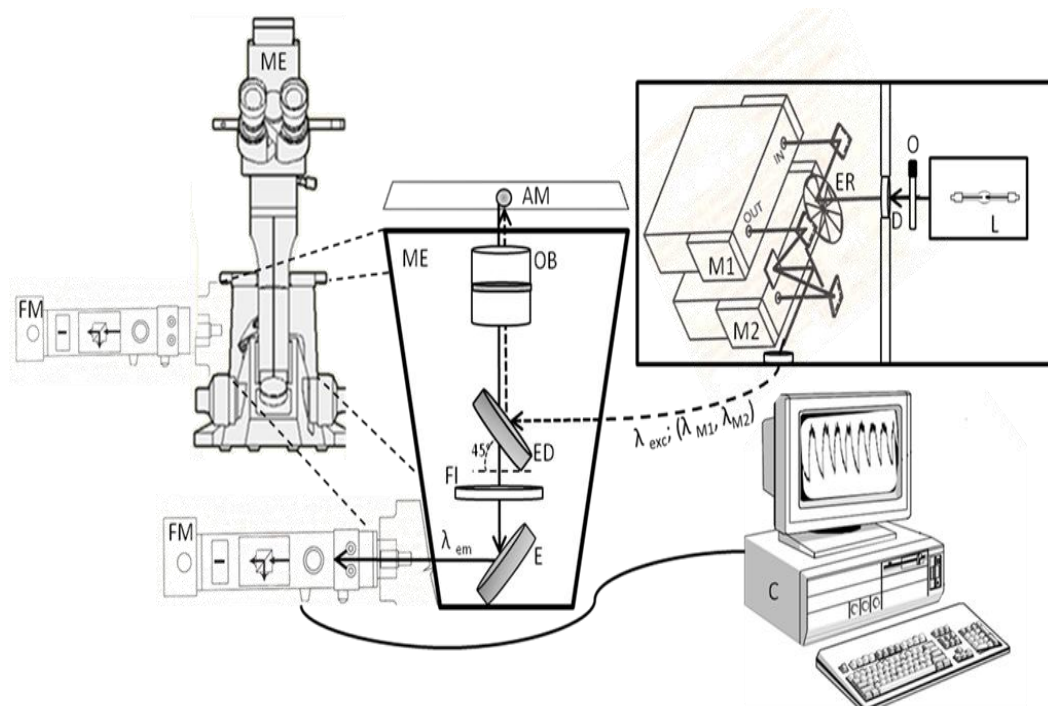


Figura 2.3: Esquema representativo do sistema de microfluorescência usado: L – lâmpada de xénon de 75 W; O – obturador; D – diafragma; ER – espelho rotativo; M1 – monocromador de excitação 1 (340 nm ou 358 nm); M2 – monocromador de excitação 2 (380 nm); λ_{exc} – feixe de radiação com comprimentos de onda de excitação provenientes dos monocromadores M1 (λ_{M1}) e M2 (λ_{M2}); ME – microscópio de fluorescência; ED – espelho dicróico; OB – objectiva (40x); AM – amostra; FI – filtro de interferência (selector de comprimento de onda – 510 nm); E – espelho; λ_{em} – radiação com comprimento de onda de emissão; FM – fotomultiplicador; C – computador (figura gentilmente cedida pelo Mestre Hugo Figueiredo (Figueiredo, 2010)).

3) A fluorescência é detectada por um fotomultiplicador digital, operado no modo *single photon counting*. A voltagem aplicada (750 V) faz com que seja aumentada a eficácia do fotocátodo, superfície fotossensível do fotomultiplicador, onde é libertado um electrão primário por cada fóton incidente. Estes electrões são acelerados de encontro a diversos emissores de electrão, os dínodos, dispostos em série e submetidos a uma voltagem crescente. É neste ponto que ocorre uma multiplicação exponencial dos electrões secundários produzidos. No final, por cada fóton incidente no fotocátodo são produzidos $10^6 - 10^8$ electrões. A voltagem aplicada ao fotomultiplicador tem de ser controlada, não podendo ser excessiva para que a resposta do fotomultiplicador se mantenha constante.

4) O sub-sistema aquisição é composto pelo computador e respectiva placa de interface. Para além de outras funções, o computador permite ajustar os comprimentos de onda dos monocromadores, bem como proceder à abertura ou fecho do obturador. O

processamento do sinal eléctrico gerado pelo fotomultiplicado é efectuado por *software* dedicado (DeltaScan, PTI).

2.5.3) Sistema de perfusão

Depois da incubação com FURA-2/AM as células ou ilhéus eram transferidos para o sistema de perfusão (figura 2.4).

Este sistema tem como núcleo principal uma câmara de perspex com um orifício na parte central (volume aproximado de 40 μ l). É neste orifício que as lamelas eram colocadas, na parte inferior da câmara, de modo a que as amostras em estudo ficassem dentro do orifício. As lamelas eram montadas com a ajuda de gordura de vácuo. A câmara de perfusão assim preparada era então colocada sobre a platina do microscópio, fixada e ligada ao sistema de perfusão através de um pequeno tubo de teflon, como se ilustra na figura 2.4. Na câmara de perfusão também se encontra um poço para o qual flui a solução, antes de ser aspirada para um kitasato.

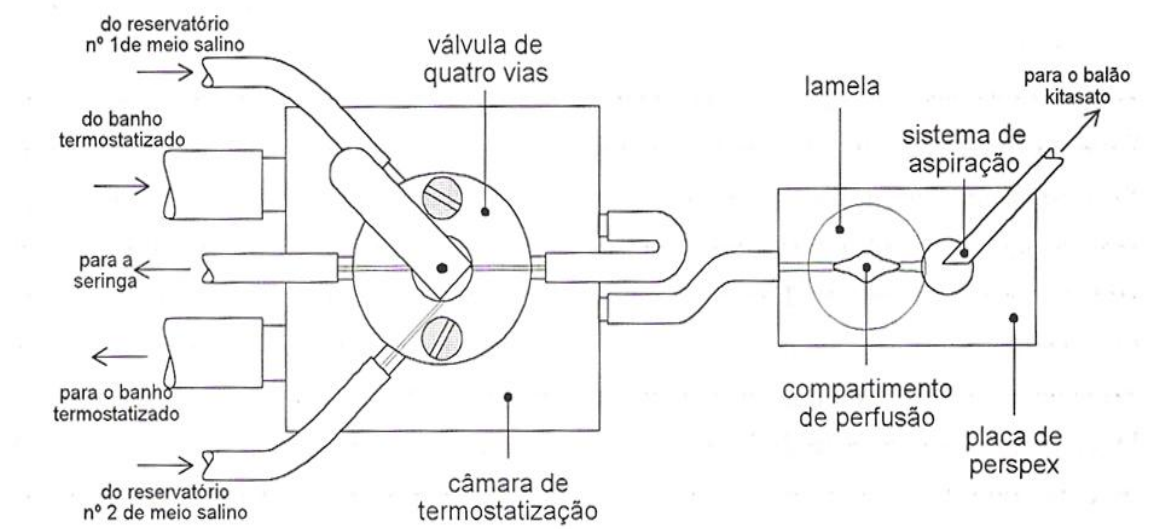


Figura 2.4: Esquema do sistema de perfusão que foi usado nas experiências. A via que se encontra a perfundir é indicada pela posição do comutador da válvula de quatro vias (figura gentilmente cedida pelo Doutor Ângelo Tomé (Tomé, 1996)).

Todas as variáveis experimentais do sistema de perfusão (ex: velocidade do fluxo e temperatura da solução) eram controladas ao máximo de forma a minimizar a ocorrência de artefactos experimentais.

As soluções que eram usadas para a perfusão das células partiam de um banho termostatizado a 38 °C onde eram continuamente gaseificadas com carbogénio (95 % O₂ / 5 % CO₂) de modo a evitar alcalinização e conseqüente precipitação do cálcio na forma de carbonato. As soluções eram conduzidas por tubos de teflon até a uma válvula de comutação de quatro vias, sob acção da gravidade. A válvula de comutação era constituída por duas vias de entrada e duas vias de saída e estava localizada antes da câmara de perfusão, o que permitia uma troca rápida das soluções. Em relação às vias de saída, uma servia como via de transporte da solução para o esgoto e a outra para a câmara de perfusão, forçando a solução a passar por uma câmara de pré-aquecimento. Nesta câmara a solução passava por uma serpentina de teflon, sendo aquecida por contacto com água proveniente de outro banho termostatizado através de um circuito fechado (figura 2.4). O aquecimento adequado das soluções nesta câmara, juntamente com a preocupação de manter um fluxo constante (1 – 2 ml/min), criava as condições para se controlar eficazmente a temperatura no centro do compartimento da perfusão (≈ 37 °C), o que se revelou essencial para assegurar bom estado metabólico das células ou ilhéus.

A perfusão das células era sempre iniciada com uma solução salina suplementada com 1 mM glicose (condição basal das BRIN-BD11) ou com 3mM glicose (condição basal dos ilhéus), deixando durante alguns minutos que a célula estabilizasse para que se pudesse realizar o protocolo experimental desejado.

2.5.4) Aquisição do sinal de fluorescência

Já iniciada a perfusão com a solução referida anteriormente, era seleccionada uma célula pouco granulada com o rebordo bem definido e com níveis de fluorescência tão elevado quanto possível. No caso dos ilhéus, era escolhido o que apresentava dimensões mais reduzidas e rebordo bem definido.

A célula ou ilhéu era então centrada no campo de visão do microscópio a fim de ser definida uma região adequada para registo da fluorescência. Esta operação foi efectuada utilizando um diafragma rectangular. A célula era então focada da combinação do ajuste micrométrico do microscópio e da optimização da fluorescência detectada.

A fluorescência foi monitorizada visualizando a evolução temporal da razão F_{340}/F_{380} , demorando tipicamente entre 20 e 70 min. Devido à grande perda de sinal que se registava para as células BRIN-BD11 ao longo de cada experiência (ver secção 3.1.1), os registos efectuados com células BRIN-BD11 eram sempre significativamente mais curtos do que os registos com ilhéus.

Nas experiências era sempre subtraído à fluorescência total o sinal de fundo, medido no início de cada registo através do desvio do campo delimitado pelo diafragma rectangular. Os registos corrigidos eram guardados para análise *off-line*. Finalizados todos os protocolos experimentais, realizava-se a calibração dos sinais de fluorescência para que fosse possível calcular os níveis de cálcio intracelular.

2.5.5) Calibração dos sinais de fluorescência

Os sinais de fluorescência da sonda FURA-2 foram calibrados *in vitro* de modo a que fosse possível calcular a $[Ca^{2+}]_i$ pela seguinte equação (Grynkiewicz et al., 1985):

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

em que K_d é a constante de dissociação do complexo FURA-2/ Ca^{2+} , R a razão de fluorescência aos dois comprimentos de onda usados (F_{340}/F_{380}), R_{min} o valor de R para FURA-2 não complexado com o 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} ; F=free) e do indicador ligado (S_{B2} ; b=bound), com emissão a 380 nm. Estes parâmetros foram obtidos regularmente a partir de espectros de excitação de soluções contendo FURA-2 livre e completamente complexado, obtidos nas mesmas condições para as quais foram realizadas as experiências (numa mesma voltagem do fotomultiplicador, abertura do diafragma e tamanho do campo) (figura 2.5).

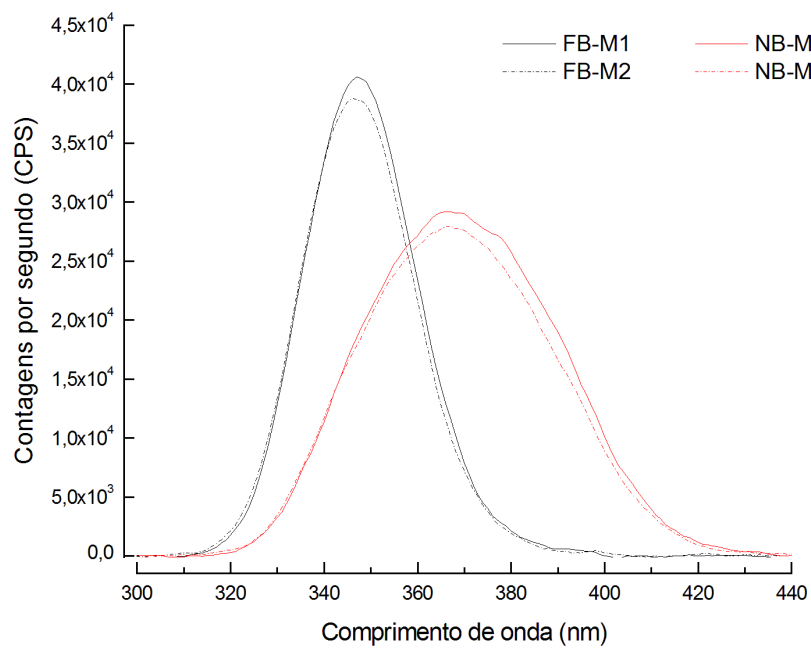


Figura 2.5: Espectros de excitação de FURA-2 nas duas soluções de calibração usadas, uma tendo a sonda totalmente complexada com cálcio (FB-M1 e FB-M2; “FB”=*fully bound*) e outra com a sonda completamente livre (NB-M1 e NB-M2; “NB”=*non bound*). A cada solução correspondem dois espectros de excitação devido à utilização de radiação proveniente de dois monocromadores (M1 centrado a 340 nm e M2 centrado a 380 nm). A determinação dos espectros envolve a deposição de gotículas de 10 μ L sobre uma lamela, simulando as condições de excitação das células no microscópio.

2.6) Análise estatística

A análise estatística e produção de imagens apresentadas no decorrer deste trabalho foram realizadas utilizando *software* adequado (Microcal Origin).

A avaliação estatística das diferenças entre médias foi realizada pelo Teste *t* de Student (emparelhado ou desemparelhado consoante os casos), adoptando um nível de significância 95%.

*Capítulo 3 – Resultados e
Discussão*

3.1) Estudos em células BRIN-BD11

Nesta secção foi avaliada a possibilidade de se utilizar uma linha celular secretora de insulina (células BRIN-BD11) como modelo da célula- β pancreática, de forma a permitir o estudo dos efeitos da variação da $[Ca^{2+}]_o$.

3.1.1) Decaimento da fluorescência de FURA-2

A Figura 3.1A ilustra a variação espontânea da fluorescência excitada a 340 (F_{340}) e 380 nm (F_{380}), observada ao longo de um período de 60 min. Durante todo este período a célula foi exposta a 1 mM glicose. Verificou-se uma diminuição acentuada das fluorescências individuais ao longo do tempo, o que teoricamente poderia ser causado por um dos seguintes factores (ou por ambos):

(1) Fotodecomposição (*photobleaching*) de FURA-2;

(2) Fuga (*leakage*) de FURA-2. Suspeitava-se que a primeira hipótese pudesse ser a mais determinante, dado o facto de, por contraposição ao trabalho com ilhéus, o trabalho com células individuais requerer maiores níveis de excitação (obtidos aumentando as fendas de entrada e/ou saída dos monocromadores) para valores comparáveis da fluorescência registada.

A Figura 3.1B ilustra o resultado de uma experiência destinada a testar aquelas hipóteses. Nesta experiência a célula, diferente da utilizada em 3.1A mas igualmente exposta a 1 mM glicose de forma continuada, foi excitada durante dois breves períodos, um no início e o outro no fim do período de observação. Verificou-se uma diminuição acentuada das fluorescências individuais, quantitativamente semelhante à observada em condições de “excitação contínua”. Este resultado indica que o decaimento espontâneo da fluorescência não é devido a fotodecomposição do indicador, sugerindo que o processo dominante é a fuga de FURA-2 das células.

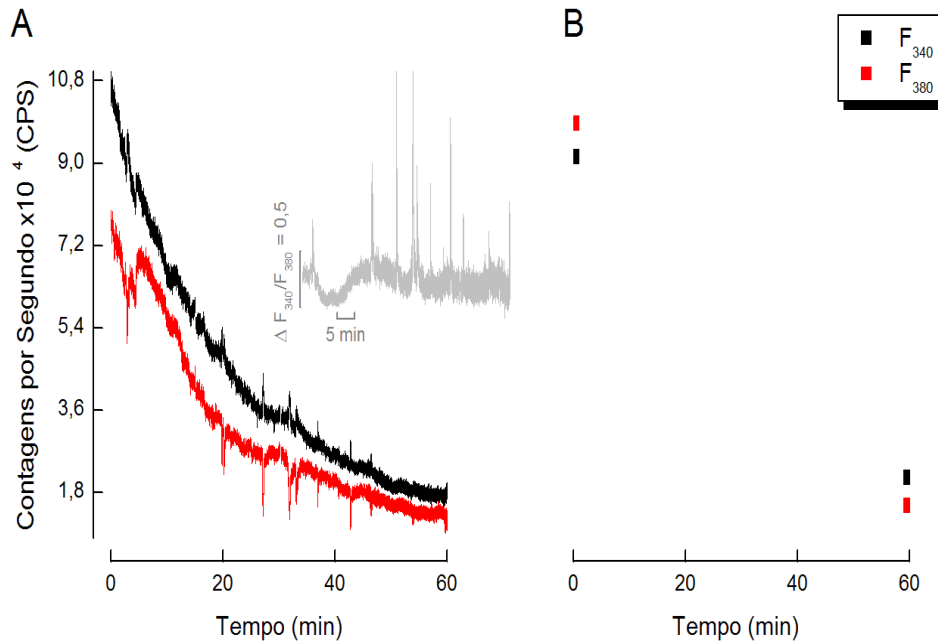


Figura 3.1: Diminuição espontânea da fluorescência de FURA-2 em células BRIN-BD11 expostas a 1 mM glicose. **A:** Uma célula foi “continuamente excitada” a 340 e 380 nm ao longo de um período de 60 min, permitindo a obtenção de dois registos “contínuos” de fluorescência. O registo inserido representa a variação de F_{340}/F_{380} ao longo do mesmo período. A célula exibiu oscilações espontâneas da $[Ca^{2+}]_i$ em 1 mM glicose; **B:** Uma célula diferente foi excitada durante dois breves períodos (10 s) muito espaçados no tempo, permitindo a observação de valores substancialmente mais elevados de fluorescência no início da experiência (denotados por símbolos, correspondentes às médias dos valores observados). A excitação foi interrompida ao longo de todo o período intermédio por manipulação do obturador de excitação. Linha ou símbolos a preto: excitação a 340 nm; linha ou símbolos a vermelho: excitação a 380 nm.

Neste trabalho optou-se por restringir o período de observação experimental das células BRIN-BD11 em condições de “excitação contínua”, em vez de se manipular (farmacologicamente ou por diminuição de temperatura) o transportador aniónico considerado responsável pela fuga do indicador (Mitsui et al., 1993). Houve assim a preocupação de limitar a duração das experiências a cerca de 20 min. O registo inserido na Figura 3.1A indica que a linha de base da razão de fluorescências F_{340}/F_{380} não sofreu alterações significativas durante o período de excitação, validando a metodologia utilizada (é visível no entanto um aumento progressivo do ruído basal daquela razão, principalmente a partir dos 30 – 40 min de registo).

3.1.2) Resposta a secretagogos metabolizáveis e não metabolizáveis

Neste trabalho foram utilizadas células expandidas a partir de amostras congeladas durante períodos apreciáveis. Importando verificar a sua viabilidade funcional, foram realizadas experiências em que as células foram estimuladas com secretagogos metabolizáveis e não metabolizáveis.

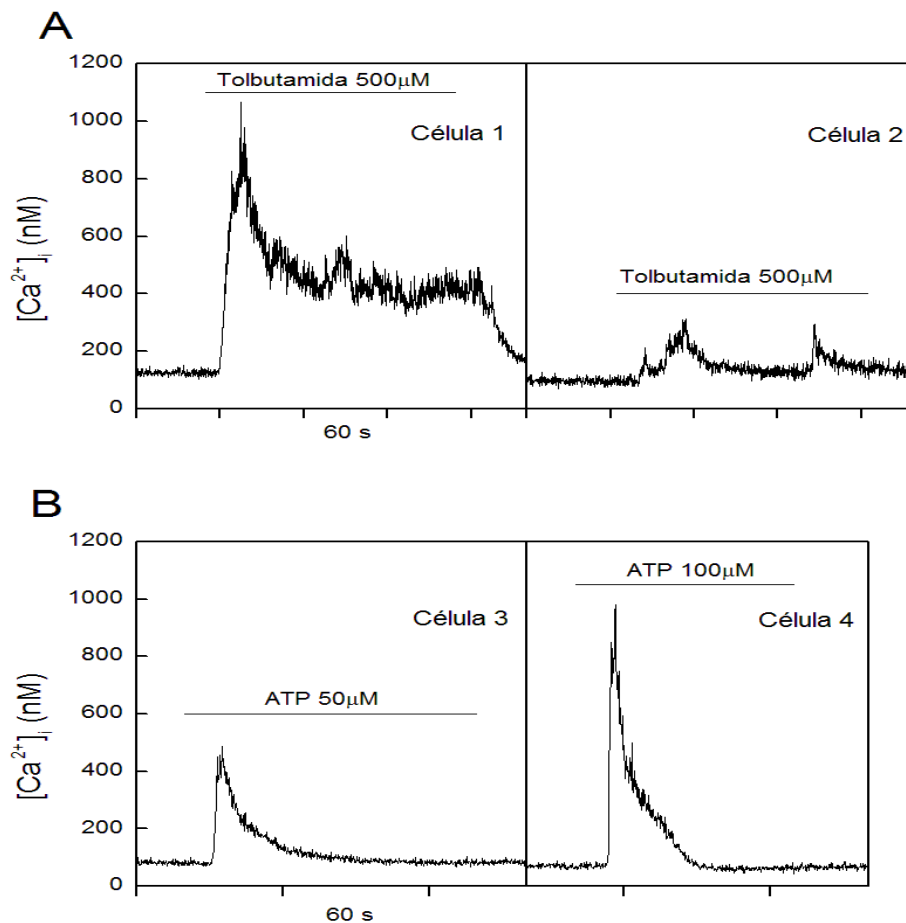


Figura 3.2: Efeitos de secretagogos não metabolizáveis na $[Ca^{2+}]_i$ em células BRIN-BD11. **A:** Duas células foram estimuladas com 500 μ M tolbutamida na presença de 1 mM glicose. Foram observadas respostas a tolbutamida em 3 células diferentes; **B:** Duas células foram estimuladas com 50 ou 100 μ M ATP na presença de 1 mM glicose. Foram observadas respostas a 50-100 μ M ATP em 3 células diferentes. Os secretagogos foram aplicados durante os períodos delimitados pelas barras horizontais.

As células BRIN-BD11 respondem a aumentos da concentração de K^+ extracelular com aumentos da $[Ca^{2+}]_i$ (Salgado et al., 1999), um efeito que também se observou neste trabalho em experiências preliminares (não ilustrado). Uma forma alternativa de despolarizar farmacologicamente as células- β consiste em expô-las a

sulfonilureias (ex: tolbutamida), isto é, fármacos inibidores dos canais K_{ATP} . A Figura 3.2A mostra que as células respondem a 500 μ M tolbutamida, muito embora com amplitudes e padrões variáveis. De facto, nalguns casos (ex: célula 1) a $[Ca^{2+}]_i$ aumenta rapidamente e atinge um pico, a que se segue um processo de relaxamento para um patamar; noutros casos (ex: célula 2) ocorrem oscilações secundárias da $[Ca^{2+}]_i$. Este último padrão já foi observado anteriormente, embora para concentrações muito inferiores do fármaco (Salgado et al., 1999).

A estimulação de células- β com ATP extracelular resulta na activação de receptores purinérgicos ionotrópicos (isto é, P_2X) (Silva et al., 2008) e metabotrópicos (isto é, P_2Y) (Petit et al., 2009), ambos susceptíveis de aumentar a $[Ca^{2+}]_i$. A Figura 3.2B mostra que os receptores purinérgicos se encontram também presentes em células BRIN-BD11. De facto, as células respondem com picos pronunciados da $[Ca^{2+}]_i$, a que se segue um decaimento para valores próximos da linha de base. Muito embora o número de experiências seja limitado, o efeito parece ser dose-dependente.

A glicose constituiu o principal secretagogo metabolizável utilizado no presente trabalho. Na fase inicial do trabalho, a incubação com FURA-2 era realizada num meio suplementado com 3 mM glicose e, com o propósito de minimizar a perturbação metabólica das células, os registos da $[Ca^{2+}]_i$ eram tipicamente iniciados àquela concentração.

As experiências rapidamente mostraram, no entanto, que 3 mM estava longe de ser a concentração basal de glicose mais apropriada, já que várias células exibiam oscilações pronunciadas da $[Ca^{2+}]_i$, tal como se ilustra nas Figuras 3.3 (célula 2) e 3.4. Significativamente, parecia haver uma dessensibilização da resposta a concentrações elevadas de glicose (ex: 17 mM) pela pré-incubação em 3 mM glicose, principalmente em células que se revelavam particularmente activas nesta condição (ex: célula 2 na Figura 3.3). A consequência destes estudos preliminares foi a adopção de 1 mM como concentração basal padrão de glicose, tanto durante as experiências como na fase de incubação das células com FURA-2.

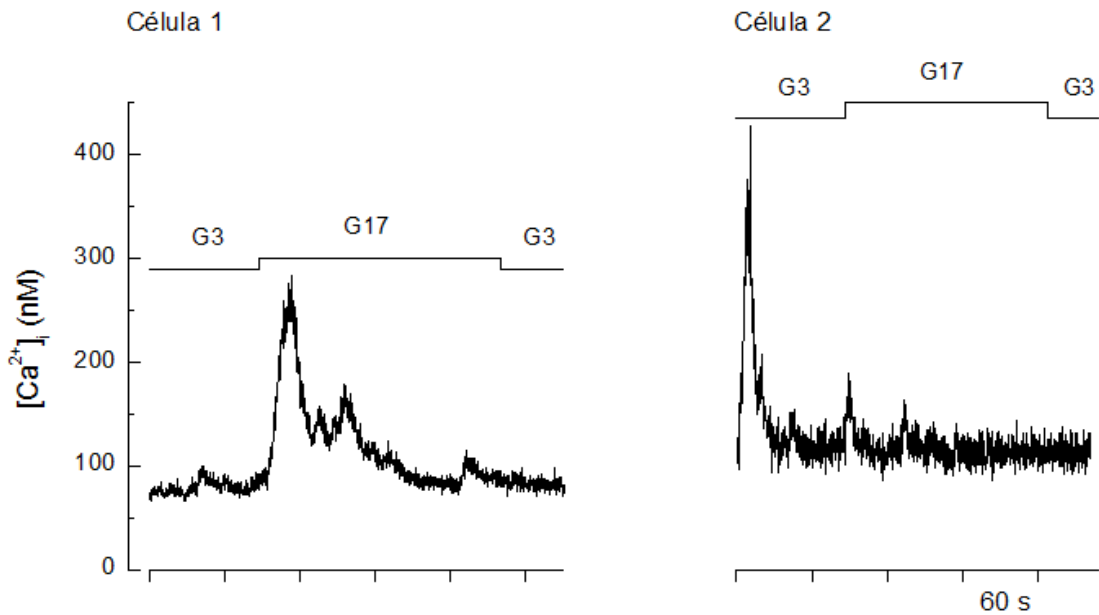


Figura 3.3: Oscilações da $[Ca^{2+}]_i$ em células BRIN-BD11 expostas a 17 mM glicose e pré-condicionadas em 3 mM glicose. As células, inicialmente incubadas com 3 mM glicose (G3), foram expostas a 17 mM glicose (G17) tal como é indicado pelas barras horizontais. Foram realizadas experiências com um protocolo idêntico em 3 células diferentes. De notar que a célula que exibiu maior actividade oscilatória em G3 foi a que responde menos intensamente a G17.

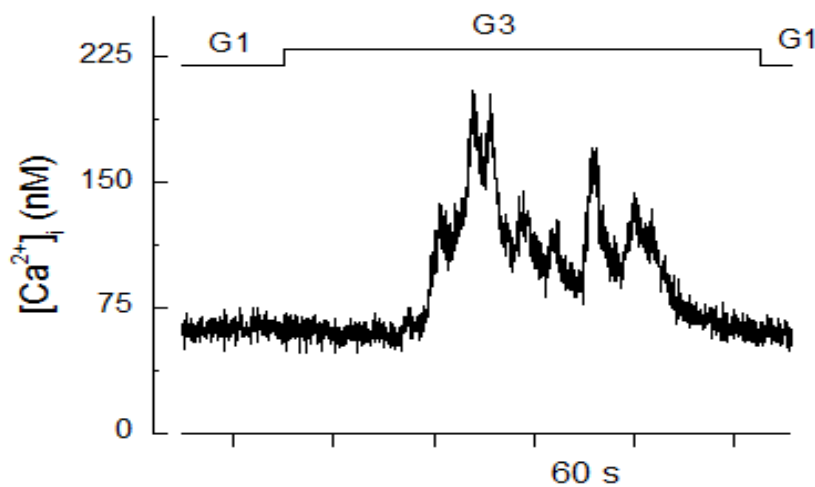


Figura 3.4: Oscilações da $[Ca^{2+}]_i$ em células BRIN-BD11 expostas a 3 mM glicose. A célula, inicialmente incubada com 1 mM glicose (G1), foi exposta a 3 mM glicose (G3) tal como é indicado pelas barras horizontais. A franca actividade em G3 após condicionamento metabólico em G1 é representativa de 4 experiências.

Tendo sido realizado um elevado número de experiências em que se expuseram as células inicialmente a 1 mM glicose, foi possível determinar a percentagem de células que exibiram oscilações da $[Ca^{2+}]_i$ mais ou menos pronunciadas durante um período de 30 s (o maior denominador comum do tempo de registo em 1 mM glicose

nas várias experiências): aproximadamente 7% (isto é, 5 em 68 células). Este valor é próximo do determinado anteriormente utilizando técnicas de imagiologia de fluorescência (aproximadamente 11%); (Salgado et al., 2000). Ou seja, para todos os efeitos práticos pode considerar-se 1 mM como uma concentração de glicose sub-estimulatória para a população global de células BRIN-BD11 utilizadas no presente trabalho. Em consonância, não foram visíveis oscilações da $[Ca^{2+}]_i$ nos segmentos dos registos correspondentes a 1 mM glicose da maior parte das figuras apresentadas na presente secção (a Figura 3.1A ilustra no entanto uma célula com comportamento oscilatório em 1 mM glicose).

A Figura 3.5 mostra que a estimulação das células com 11 mM glicose (concentração supra-estimulatória no intervalo médio-alto em células- β pancreáticas) produziu resultados variáveis, tanto em termos da magnitude e outras características das oscilações da $[Ca^{2+}]_i$ como em termos do tempo que foi necessário para o aparecimento da primeira oscilação (latência). Tal como no caso da célula- β (Grapengiesser et al., 1988) a fase inicial da resposta a 11 mM glicose (“fase 0”) consistiu geralmente numa ligeira diminuição da $[Ca^{2+}]_i$ sem oscilações, a que se seguiu um ténue aumento até ao aparecimento da primeira oscilação. A “fase 0” tem sido associada à activação rápida pelo metabolismo de glicose de mecanismos de extrusão / sequestração de Ca^{2+} , por exemplo a bomba de Ca^{2+} da membrana plasmática (Chow et al., 1995).

Nalguns casos (ex: célula 4) o tempo de exposição a 11 mM glicose não foi suficiente para induzir uma resposta enquanto as células estavam sujeitas àquela condição, produzindo-se no entanto uma resposta oscilatória pouco tempo após o retorno à condição controlo (1 mM glicose); a observação deste “efeito *off*” sugere que se desenvolve um efeito de “memória molecular” em células BRIN-BD11 e que células aparentemente inactivas em glicose média-alta representam de facto aquelas cujo tempo de estimulação com glicose não foi suficiente para ultrapassar a “fase 0”.

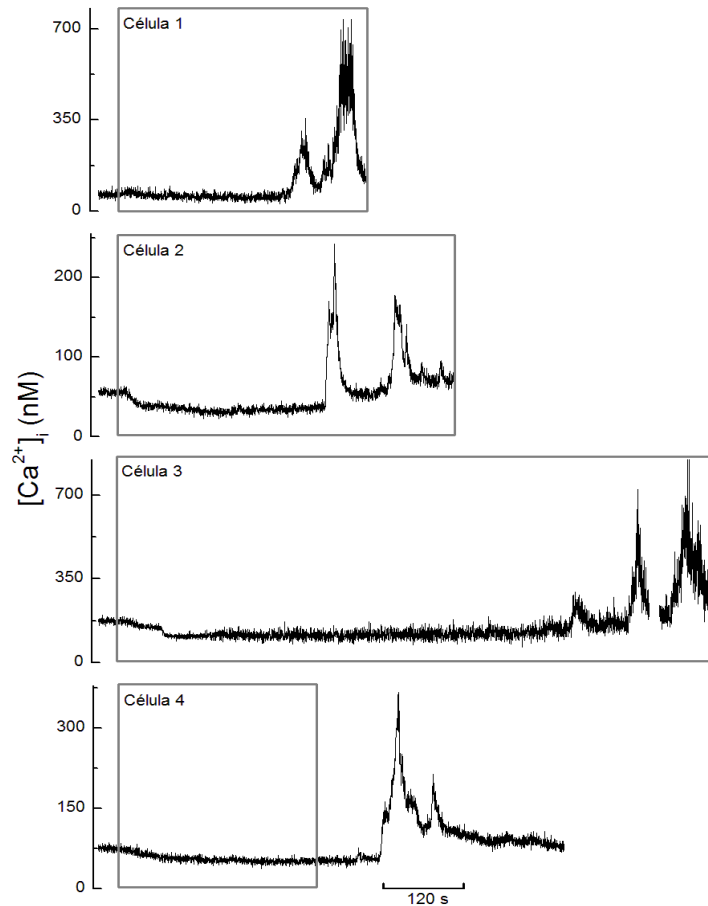


Figura 3.5: Variabilidade da resposta oscilatória da $[Ca^{2+}]_i$ em células BRIN-BD11 expostas a 11 mM glicose e pré-condicionadas em 1 mM glicose. As várias células, inicialmente incubadas com 1 mM glicose, foram expostas a 11 mM glicose tal como é delimitado pelos rectângulos. Na célula 4 o tempo de exposição a 11 mM glicose não foi suficientemente para ultrapassar a “fase 0”, produzindo-se uma “resposta *off*” (ver texto principal).

Os valores da latência da resposta oscilatória em 11 mM glicose variam acentuadamente de célula para célula, tal como se ilustra na Figura 3.6. Pode verificar-se que 75% das células examinadas exibiram valores da latência entre 240 s e 360 s. Este comportamento contrasta com o descrito num estudo anterior (Salgado et al., 2000), em que 94% das células exibiram oscilações durante tempos de exposição a 11 mM glicose iguais ou inferiores a 200 s. Pode portanto deprender-se que as células utilizadas no presente trabalho responderam mais lentamente à estimulação do metabolismo de glicose. Isto pode dever-se ao facto de, ao contrário do estudo anterior, neste trabalho as células terem sido expostas a níveis muito baixos de glicose durante o período de *loading* de FURA-2 e manuseamento subsequente, afectando o processo de “memória molecular”.

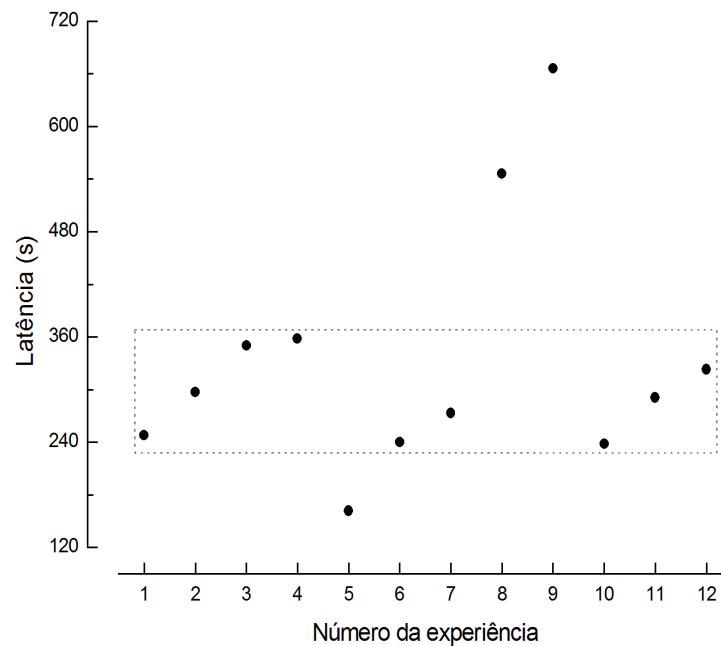


Figura 3.6: Valores da latência (tempo necessário para o aparecimento da primeira oscilação da $[Ca^{2+}]_i$) para as 3 primeiras experiências ilustradas na Figura 3.5 e mais 9 experiências com o mesmo protocolo (exposição a 11 mM glicose após pré-condicionamento em 1 mM glicose). A abcissa representa o número de ordem atribuído a cada experiência. A caixa delimita as experiências em que a latência estava compreendida entre 240 e 360 s (75% das experiências).

3.1.3) Resposta a aumentos da $[Ca^{2+}]_o$

As células- β de ilhéus intactos de ratinho são muito sensíveis ao aumento da $[Ca^{2+}]_o$, verificando-se um aumento pronunciado da $[Ca^{2+}]_i$ logo que a solução com a $[Ca^{2+}]_o$ aumentada (normalmente 5 – 12,8 mM) atinge a câmara de perfusão (Silva et al., 1994). No sistema de perfusão utilizado no presente trabalho o tempo de comutação de soluções é aproximadamente 14 s, antecipando-se a observação de aumentos da $[Ca^{2+}]_i$ na mesma escala de tempo.

Surpreendentemente, tal como se ilustra na Figura 3.7, a estimulação de células BRIN-BD11 com 5 mM Ca^{2+} (isto é, aumentando a $[Ca^{2+}]_o$ de 2,56 para 5 mM) produziu aumentos da $[Ca^{2+}]_i$ com magnitudes e latências muito variáveis de célula para célula. Nestas experiências as latências determinadas caíram no intervalo 30 – 175 s (3 células em 5; ex: célula 1, cuja latência foi 175 s). Em duas células (ex: célula 2) não se verificaram aumentos da $[Ca^{2+}]_i$ durante o período de estimulação, muito embora se

tenha observado um aumento progressivo muito ténue da $[Ca^{2+}]_i$ ao longo daquele período; ambas as células (ex: célula 2) exibiram “respostas *off*” semelhantes à observada nas experiências com glicose ilustradas na Figura 3.5 (célula 4). Foram também realizadas cinco experiências em que as células foram estimuladas aumentando a $[Ca^{2+}]_o$ de 2,56 mM para 7 mM, com resultados semelhantes (não ilustradas). Foi evitada a estimulação das células com concentrações superiores de Ca^{2+} extracelular, a fim de minimizar a precipitação de Ca^{2+} nas soluções.

É de notar ainda que as respostas tiveram sempre um carácter oscilatório, o que de novo contrasta com o padrão de resposta reportado por Silva e colaboradores, tanto em ilhéus intactos (Silva et al., 1994) como em células- β isoladas de ratinho (Silva et al., 1995; Silva, 1995): respostas essencialmente monofásicas (aumento da $[Ca^{2+}]_i$ para um patamar) ou bifásicas (pico e subsequente evolução para um patamar).

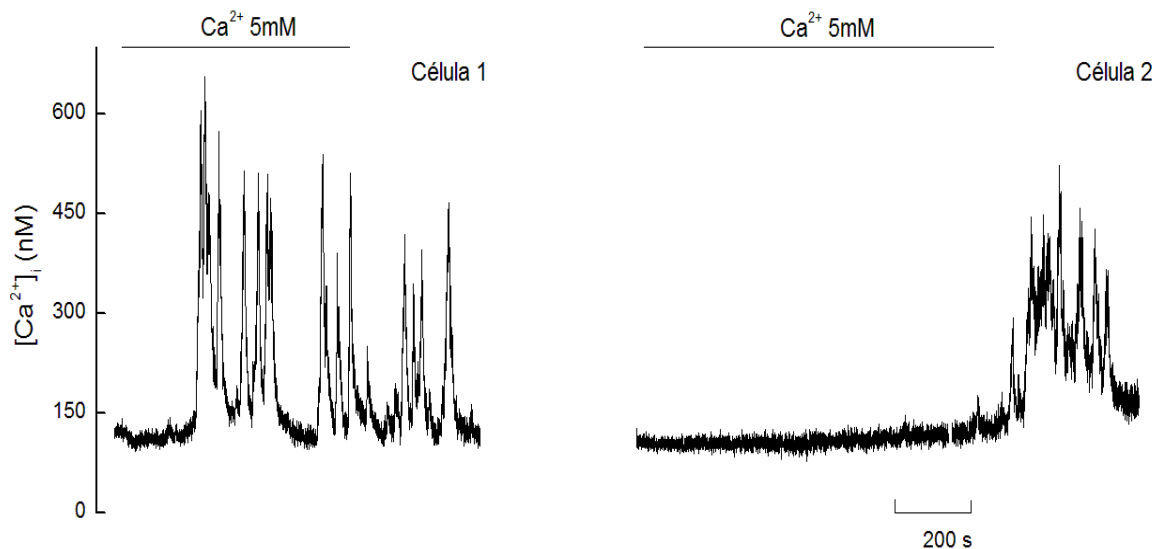


Figura 3.7: Variabilidade e latência da resposta da $[Ca^{2+}]_i$ a aumentos da $[Ca^{2+}]_o$ em células BRIN-BD11. A $[Ca^{2+}]_o$ foi aumentada de 2,56 para 5 mM tal como é indicado pelas barras horizontais. Na célula 2 o tempo de exposição a 5 mM Ca^{2+} não foi suficiente para activar a célula durante o período de aplicação, produzindo-se uma “resposta *off*”. Foram realizadas experiências com um protocolo idêntico em 5 células diferentes (ver texto principal). Concentração de glicose ao longo das experiências: 1 mM.

As seguintes observações são compatíveis com a hipótese de que os efeitos reportados nesta secção podem ser devidos à potenciação das respostas metabólicas à glicose por Ca^{2+} extracelular, e não à entrada imediata de Ca^{2+} por canais como resultado directo dos aumentos da $[Ca^{2+}]_o$:

- (1) Ao contrário de células BRIN-BD11, no caso de ilhéus ou células- β isoladas as latências são da ordem de grandeza do tempo de troca das soluções;
- (2) Ao contrário do que sucede em ilhéus intactos ou células- β isoladas de ratinho, em células BRIN-BD11 os padrões de resposta à glicose e a aumentos da $[Ca^{2+}]_o$ são essencialmente idênticos (respostas oscilatórias com picos rápidos);
- (3) Em células BRIN-BD11 observam-se efeitos (“respostas *off*”) que parecem reflectir processos de “memória molecular” associados à estimulação do metabolismo da glicose.

É interessante notar, neste contexto, que as células- β , bem como outras linhas celulares secretoras de insulina, expressam uma classe de receptores membranares acoplados a proteínas G e activados por Ca^{2+} extracelular (Gray et al., 2006; Jones et al., 2007), possivelmente implicados na coordenação da comunicação intercelular no ilhéu (Hodgkin et al., 2008; Kitsou-Mylona et al., 2008). O sistema de transdução destes receptores de Ca^{2+} pode incluir a via de sinalização fosfolipase C / inositol-1,4,5-trifosfato (Breitwieser, 2008), uma via clássica para a indução da libertação de Ca^{2+} de reservatórios intracelulares na célula- β e para a potenciação da secreção de insulina induzida por glicose (Graves and Hinkle, 2003)

3.2) Estudos em ilhéus de Langerhans

A natureza aparentemente diferente dos mecanismos envolvidos na resposta a aumentos da $[Ca^{2+}]_o$ (células BRIN-BD11 vs. células- β) fez com que se optasse pelo redireccionamento das experiências para ilhéus intactos, deixando-se para estudo posterior algumas das questões suscitadas pelo trabalho efectuado com células BRIN-BD11.

3.2.1) Respostas a aumentos da $[Ca^{2+}]_o$

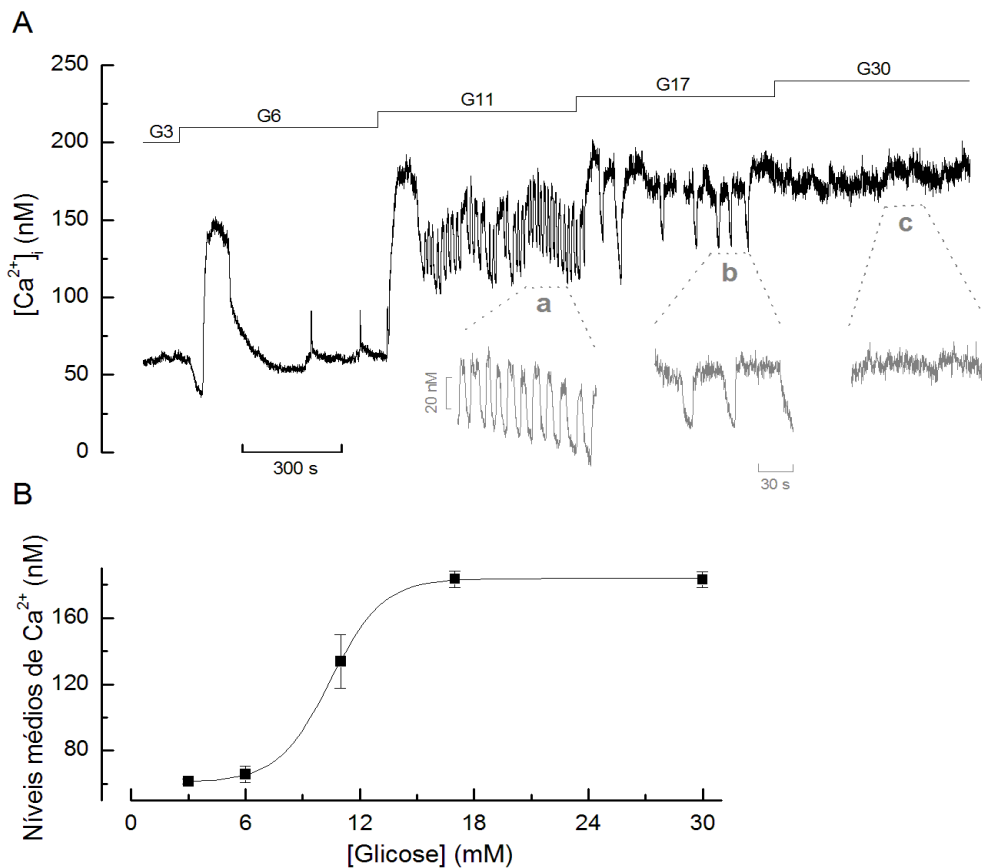


Figura 3.8: Modulação da $[Ca^{2+}]_i$ por glicose em ilhéus pancreáticos intactos. **A:** Um ilhéu foi estimulado com concentrações crescentes de glicose no intervalo 6-30 mM (G6 – G30), tal como é indicado pela escada de barras horizontais (concentração basal: 3 mM). Os registos **a**, **b** e **c** correspondem a expansões temporais do registo principal nas regiões indicadas; **B:** Variação dose-dependente dos valores médios \pm S.D. da $[Ca^{2+}]_i$, determinados durante 60 s próximos do final da aplicação de cada uma das concentrações de glicose que estão ilustradas no painel A.

Os resultados apresentados na Figura 3.8A indicam que os ilhéus utilizados neste trabalho respondem de uma forma previsível a diferentes concentrações de glicose (Antunes et al., 2000):

(1) $[Ca^{2+}]_i$ baixa (aproximadamente 60 nM) e estacionária em glicose basal (3 mM), reflectindo uma taxa reduzida do metabolismo de glicose, uma razão ATP/ADP baixa, uma actividade conseqüentemente elevada dos canais K_{ATP} , uma membrana da célula- β fortemente hiperpolarizada e um influxo diminuto de Ca^{2+} através de canais sensíveis à voltagem (Ca_v) presentes nestas células (Rorsman et al., 2011);

(2) Aumento essencialmente transitório da $[Ca^{2+}]_i$ quando o ilhéu é estimulado com uma concentração de glicose próxima do limiar de indução de actividade eléctrica (6 mM), reflectindo uma despolarização temporária da membrana e o conseqüente disparo temporário de potenciais de acção dependentes de cálcio. É de sublinhar que o aumento inicial da $[Ca^{2+}]_i$ é precedido de uma “fase 0” mais proeminente do que em células BRIN-BD11;

(3) Aumento substancial da $[Ca^{2+}]_i$ quando o ilhéu é estimulado com uma concentração de glicose acima do referido limiar (11 mM), de natureza bifásica. De facto, a um pico inicial segue-se um período de actividade oscilatória (ver oscilações expandidas), que se sabe estar correlacionada com a actividade eléctrica oscilatória (*bursting*) exibida pela célula- β do ilhéu (Santos et al., 1991);

(4) Aumento da duração das oscilações da $[Ca^{2+}]_i$ para uma concentração mais elevada de glicose (17 mM), reflectindo o aumento da duração dos patamares dos *bursts* de actividade eléctrica;

(5) Estabilização da $[Ca^{2+}]_i$ num nível próximo do pico das oscilações (registadas em 16 mM glicose) quando o ilhéu é estimulado com uma concentração supra-estimulatória de glicose (30 mM), reflectindo a transição do padrão de actividade eléctrica de oscilatório para contínuo.

Foi determinada a média dos valores da $[Ca^{2+}]_i$ correspondentes a um intervalo de 60 s perto do final da aplicação das diferentes concentrações de glicose. A correlação

é apresentada na Figura 3.8B, sendo o efeito dose-dependente (EC_{50} aparente aproximado: 10 mM).

Tal como é ilustrado na Figura 3.9, a estimulação sequencial com 7 e 15,8 mM Ca^{2+} (isto é, aumentando a $[Ca^{2+}]_o$ de 2,56 para 7 ou 15,8 mM) produziu aumentos da $[Ca^{2+}]_i$ em ilhéus incubados em 3 mM glicose (condição basal), sendo o efeito aparentemente dose-dependente em concordância com Silva et al., (1994). No caso específico da Figura 3.9, as respostas foram essencialmente monofásicas (aumento lento para um patamar). Em todas as demais experiências procedeu-se a uma estimulação com $[Ca^{2+}]_o = 7$ mM, evitando-se concentrações superiores de forma a minimizar a possibilidade de precipitação de Ca^{2+} na forma de carbonato.

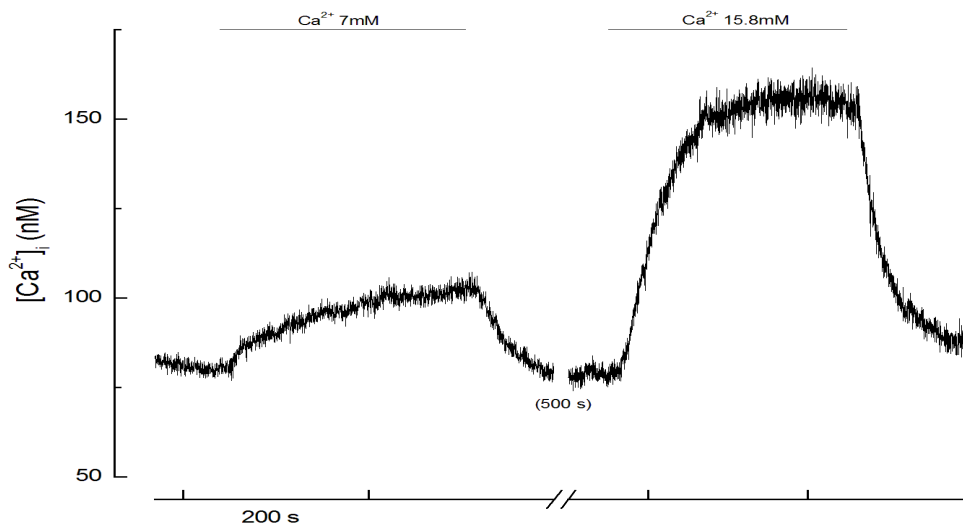


Figura 3.9: Efeito de aumentos da $[Ca^{2+}]_o$ na $[Ca^{2+}]_i$ em ilhéus intactos. O ilhéu foi sujeito a um pulso de Ca^{2+} extracelular de 7 mM e, alguns minutos depois, de 15,8 mM ($[Ca^{2+}]_o$ basal: 2,56 mM), tal como é indicado pelas barras horizontais. Concentração de glicose ao longo da experiência: 3 mM. Aumentos da $[Ca^{2+}]_i$ em resposta a pulsos de Ca^{2+} de 7 mM foram observados em 18 ilhéus diferentes. A parte da experiência com 15,8 mM Ca^{2+} não foi repetida.

No grupo seguinte de experiências, ilustradas na Figura 3.10, os pulsos de Ca^{2+} extracelular de 7 mM (doravante designados simplesmente “pulsos de Ca^{2+} ”) foram aplicados a partir de uma concentração extracelular de Ca^{2+} basal de 0,5 mM, em distintas condições metabólicas e farmacológicas. Especificamente pretendeu-se:

(1) Averiguar se um valor mais baixo do Ca^{2+} basal aumenta a amplitude da resposta, de acordo com a informação disponível em Silva et al., (1994);

(2) Forçar a hiperpolarização das células- β nos ilhéus, de forma a garantir a não activação de nenhum canal de Ca^{2+} sensível à voltagem (Figura 3.10B e análise na Figura 3.11). Para tal aplicaram-se pulsos de Ca^{2+} na presença de 100 μM diazóxido, um agonista dos canais K_{ATP} (Trube et al., 1986);

(3) Averiguar se a estimulação do metabolismo da glicose em condições de potencial de membrana controlado diminui a amplitude da resposta, tomando em conta que a estimulação metabólica das células- β aumenta os níveis celulares de ATP e, portanto, acelera a extrusão / sequestração de Ca^{2+} por mecanismos de transporte activo (Kamagate et al., 2000). Para tal aplicaram-se pulsos de Ca^{2+} na presença de 11 mM glicose e 100 μM diazóxido (Figura 3.10C e análise na Figura 3.11).

Em todas as experiências deste trabalho foi sempre aplicado um pulso inicial de 11 mM glicose, de forma a avaliar o estado fisiológico do ilhéu. Este pulso, ilustrado no início de cada registo da Figura 3.10, será omitido nas figuras a partir da Figura 3.14 para efeitos de simplificação. Pode verificar-se que, em baixo Ca^{2+} basal (0,5 mM), a estimulação com glicose induz quase invariavelmente aumentos da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ para um patamar sem que ocorram oscilações (comparar com o efeito ilustrado na Figura 3.8A-a, em que o Ca^{2+} basal era 2,56 mM). Pode no entanto observar-se um aumento pronunciado do ruído do sinal, provavelmente indicativo da ocorrência de um estado de actividade eléctrica contínua e da sincronização de potenciais de acção nas zonas do ilhéu em que os registos foram efectuados. De facto, em condições de baixo Ca^{2+} basal não se observam *bursts* de actividade eléctrica (Ribalet and Beigelman, 1980).

Na experiência ilustrada na Figura 3.10A a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ baixou para níveis basais na sequência de re-perfusão com 3 mM glicose, após o que se aplicou um pulso de Ca^{2+} . A magnitude média da resposta a estes pulsos controlo, determinada em várias experiências idênticas como a diferença entre a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ média durante os últimos 30 s dos pulsos de 300 s e a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ média antes da aplicação dos pulsos, foi de 22 ± 10 nM (\pm S.D., $n = 3$ ilhéus), encontrando-se representada graficamente na Figura 3.11 juntamente com os valores individuais.

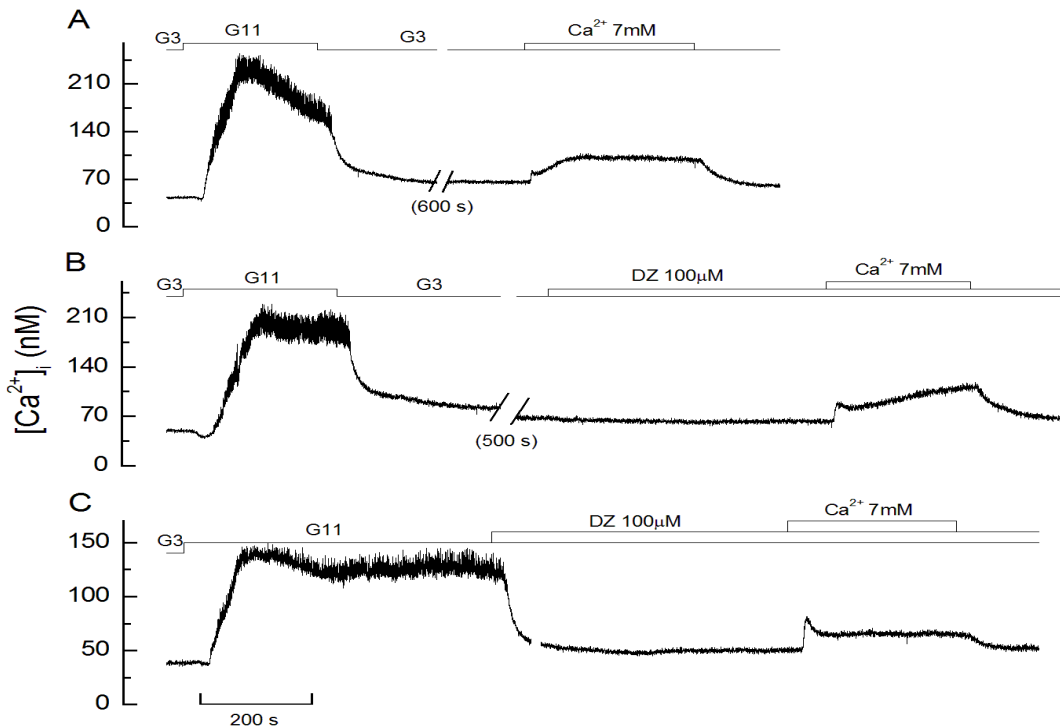


Figura 3.10: Efeito de aumentos da $[Ca^{2+}]_o$ de 0,5 para 7 mM na $[Ca^{2+}]_i$ em ilhéus intactos submetidos a distintas condições metabólicas e farmacológicas. **A:** O ilhéu, inicialmente incubado em 3 mM glicose (G3), foi sujeito a um pulso de 11 mM glicose (G11), re-perfundido em 3 mM glicose e posteriormente sujeito a um pulso de 7 mM Ca^{2+} , tal como é indicado pelas barras horizontais; **B:** O mesmo que em A, com a diferença de que 100 μ M diazóxido (DZ) foi aplicado na presença de 3 mM glicose, tendo o pulso de Ca^{2+} sido aplicado na presença do fármaco; **C:** O ilhéu foi exposto a 11 mM glicose e a 100 μ M diazóxido na presença de glicose, tendo o pulso de Ca^{2+} sido aplicado na presença do fármaco. Experiências representativas de 3 (A), 4 (B) e 3 (C) experiências com protocolos idênticos.

Na experiência ilustrada na Figura 3.10B pode verificar-se que a exposição do ilhéu a diazóxido não afectou a $[Ca^{2+}]_i$ em 3 mM glicose e que a aplicação do pulso de Ca^{2+} , na presença de diazóxido, não pareceu produzir uma resposta muito diferente da anterior. De facto a magnitude média da resposta a estes pulsos (23 ± 15 nM, $n=4$ ilhéus; Figura 3.11) não foi significativamente diferente da magnitude média da resposta aos pulsos controlo ($p=0,95$).

Na experiência ilustrada na Figura 3.10C pode verificar-se que a aplicação de diazóxido na presença de 11 mM glicose fez baixar drasticamente a $[Ca^{2+}]_i$ para valores quase basais. Muito embora a aplicação do pulso de Ca^{2+} , na presença de diazóxido e 11 mM glicose, tivesse produzido um aumento da $[Ca^{2+}]_i$ qualitativamente distinto dos observados em 3.10A e 3.10B (aumento rápido seguido de decaimento para um patamar), verificou-se, tomando em conta o conjunto das experiências, que este padrão também ocorreu nas outras condições experimentais. A magnitude média da resposta a

estes pulsos ($12 \pm 4,4$ nM, $n=3$ ilhéus; Figura 3.11) não foi significativamente diferente quer da magnitude média da resposta aos pulsos controlo ($p=0,16$) quer da obtida na presença de 3 mM glicose e diazóxido ($p=0,29$).

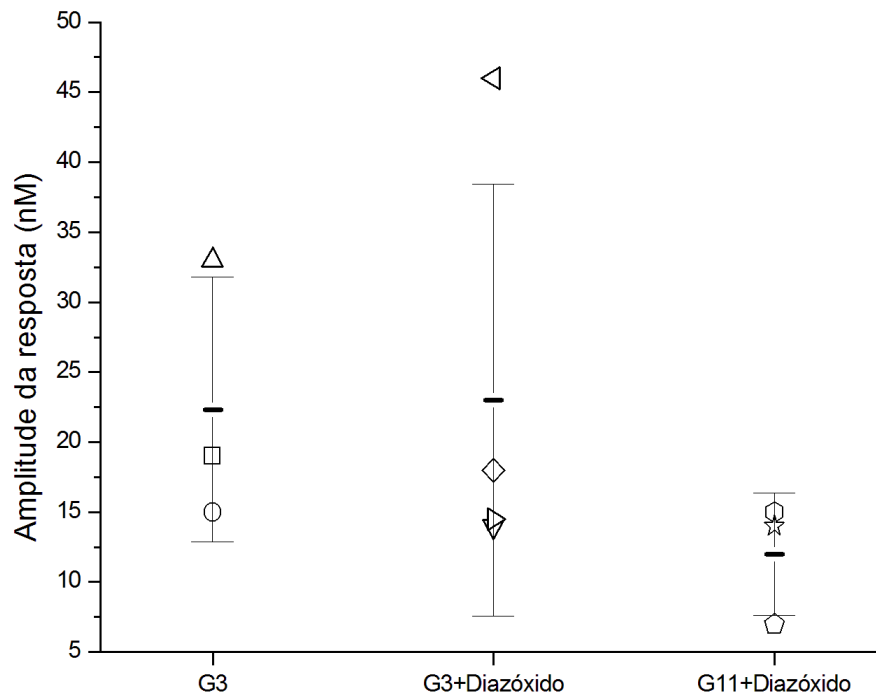


Figura 3.11: Análise da magnitude média da resposta aos pulsos de Ca^{2+} efectuados nas experiências ilustradas na Figura 3.10 e em experiências similares, nas várias condições experimentais em que estas foram realizadas: na presença de 3 mM glicose (G3; ver Figura 3.10A), na presença de 3 mM glicose e 100 μM diazóxido (“G3+Diazóxido”; ver Figura 3.10B) e na presença de 11 mM glicose e 100 μM diazóxido (“G11+Diazóxido”; ver Figura 3.10C). Os valores são apresentados como média \pm S.D. (barras), juntamente com os valores individuais.

No grupo seguinte de experiências, ilustradas na Figura 3.12, foram realizadas experiências idênticas às ilustradas na Figura 3.10, com a diferença de que os pulsos de Ca^{2+} foram aplicados a partir de um Ca^{2+} basal de 2,56 mM. Pretendeu-se não só reforçar a informação anterior, como avaliar o efeito do Ca^{2+} basal na amplitude das respostas.

Pode verificar-se que, em contraste com o verificado na Figura 3.10 mas em concordância com os resultados da Figura 3.8, a estimulação inicial dos ilhéus com 11 mM glicose induziu um padrão de oscilações características de “baixa frequência”. A aplicação de pulsos de Ca^{2+} nas várias condições (painel A: 3 mM glicose ou controlo; painel B: 3 mM glicose + diazóxido; painel C: 11 mM glicose + diazóxido) produziu em

todos os casos respostas de baixa amplitude, cuja quantificação é apresentada na Figura 3.13.

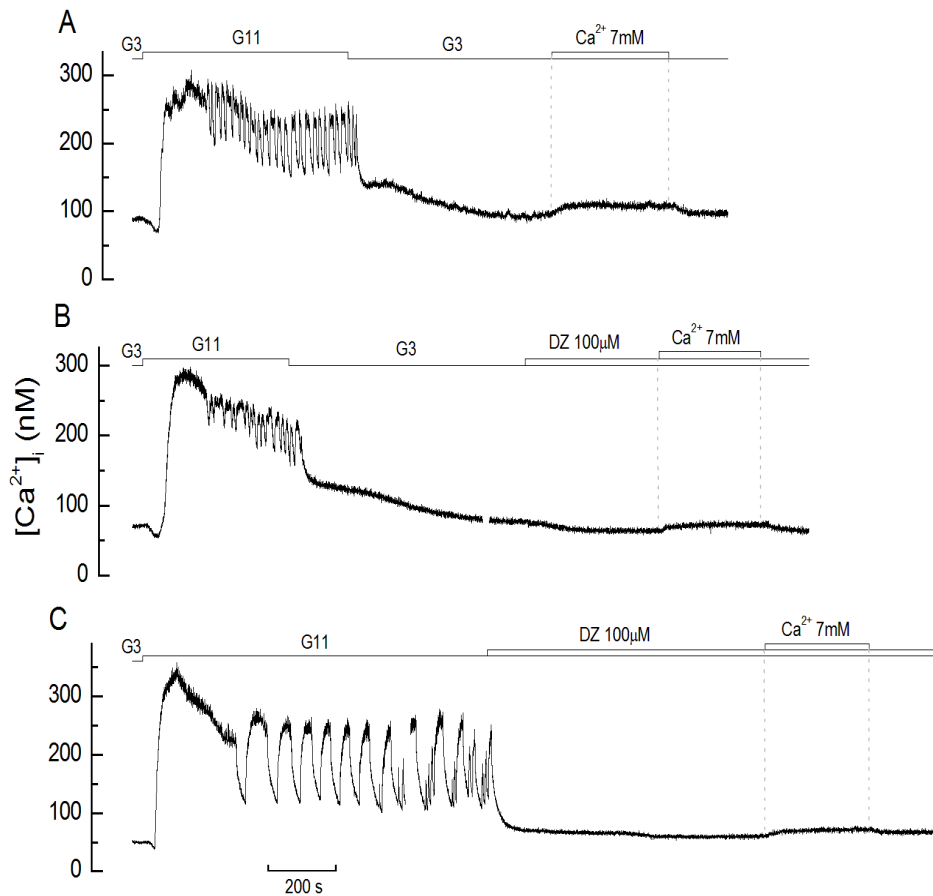


Figura 3.12: Efeito de aumentos da $[Ca^{2+}]_o$ de 2,56 para 7 mM na $[Ca^{2+}]_i$ em ilhéus intactos submetidos às mesmas condições da Figura 3.10. **A:** O ilhéu, inicialmente incubado em 3 mM glicose (G3), foi sujeito a um pulso de 11 mM glicose (G11), re-perfundido em 3 mM glicose e posteriormente sujeito a um pulso de 7 mM Ca^{2+} , tal como é indicado pelas barras horizontais; **B:** O mesmo que em A, com a diferença de que 100 μ M diazóxido (DZ) foi aplicado na presença de 3 mM glicose, tendo o pulso de Ca^{2+} sido aplicado na presença do fármaco; **C:** O ilhéu foi exposto a 11 mM glicose e a 100 μ M diazóxido na presença de glicose, tendo o pulso de Ca^{2+} sido aplicado na presença do fármaco. Experiências representativas de 10 (A), 4 (B) e 4 (C) experiências com protocolos idênticos.

A análise destes resultados permite chegar a conclusões semelhantes às anteriores, baseadas na análise das experiências em que o Ca^{2+} basal era 0,5 mM:

(1) A exposição dos ilhéus a diazóxido não afectou a resposta em 3 mM glicose, já que a magnitude média da resposta aos pulsos na presença do fármaco foi 14 ± 3 nM ($n=4$ ilhéus), ou seja, não significativamente diferente da resposta aos pulsos controlo (12 ± 6 nM, $n=10$ ilhéus; $p=0,62$). Tendo em conta que, em baixa glicose e na presença de

diazóxido, a actividade dos canais K_{ATP} é máxima e a célula- β se encontra maximamente hiperpolarizada (Henquin, 2000), este resultado implica que a resposta aos pulsos de Ca^{2+} extracelular não é mediada por canais sensíveis à voltagem (incluindo os canais Ca_v);

(2) A estimulação do metabolismo da glicose não diminuiu a resposta, já que a magnitude média da resposta aos pulsos na presença de 11 mM glicose + diazóxido foi 9 ± 3 nM ($n= 4$ ilhéus), ou seja, não significativamente diferente da resposta aos pulsos aplicados em 3 mM glicose + diazóxido ($p= 0,07$). Aparentemente, pois, o mecanismo de transporte de Ca^{2+} subjacente às respostas aos pulsos de Ca^{2+} extracelular não é modulado pelo metabolismo de glicose.

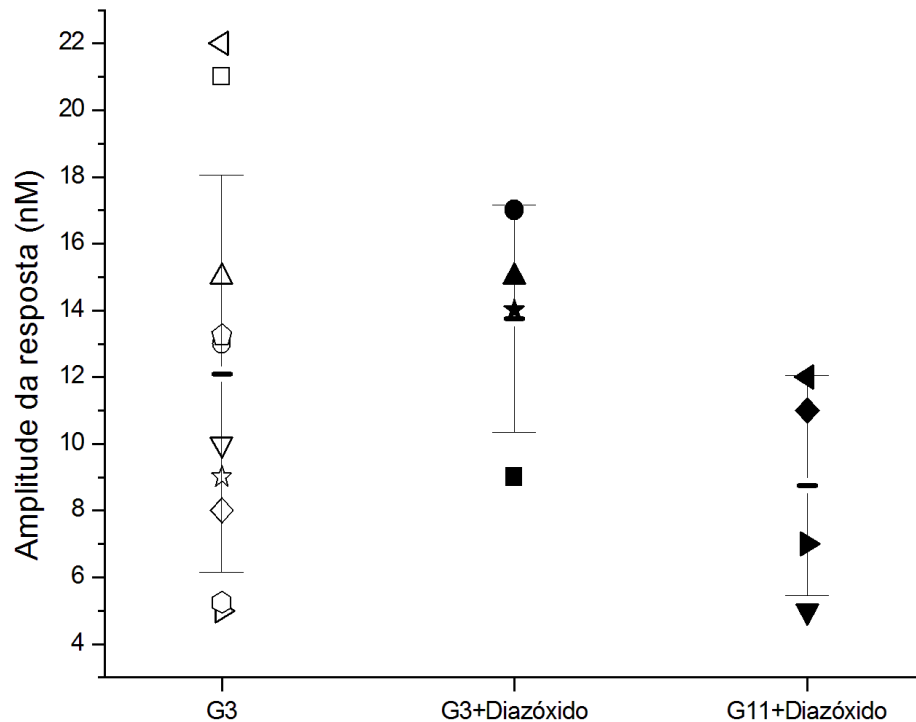


Figura 3.13: Análise da magnitude média da resposta aos pulsos de Ca^{2+} efectuados nas experiências ilustradas na Figura 3.12 e em experiências similares, nas várias condições experimentais em que estas foram realizadas: na presença de 3 mM glicose (“G3”; ver Figura 3.12A), na presença de 3 mM glicose e 100 μ M diazóxido (“G3+Diazóxido”; ver Figura 3.12B) e na presença de 11 mM glicose e 100 μ M diazóxido (“G11+Diazóxido”; ver Figura 3.12C). Os valores são apresentados como média \pm S.D. (barras), juntamente com os valores individuais.

Comparando os valores médios das experiências controlo apresentados na Figura 3.13 com os valores homólogos da Figura 3.11 (colunas assinaladas com “G3”), pode

ainda concluir-se que a diminuição do Ca^{2+} basal para 0,5 mM potenciou a resposta aos pulsos de Ca^{2+} ($p < 0,05$).

3.2.2) Efeito de nifedipina na respostas a aumentos da $[\text{Ca}^{2+}]_o$

Tendo sido concluído que a activação de canais Ca_V não medeia as respostas aos pulsos de Ca^{2+} , algumas experiências foram realizadas na presença de nifedipina, uma di-hidropiridina altamente eficaz em inibir os canais de Ca^{2+} tipo L ($\text{Ca}_V1.0$) na célula- β (Rorsman et al., 1992). É de referir que os canais $\text{Ca}_V1.0$ constituem a isoforma de canais Ca_V que mais contribui para os potenciais de acção nestas células (Rosario et al., 1993).

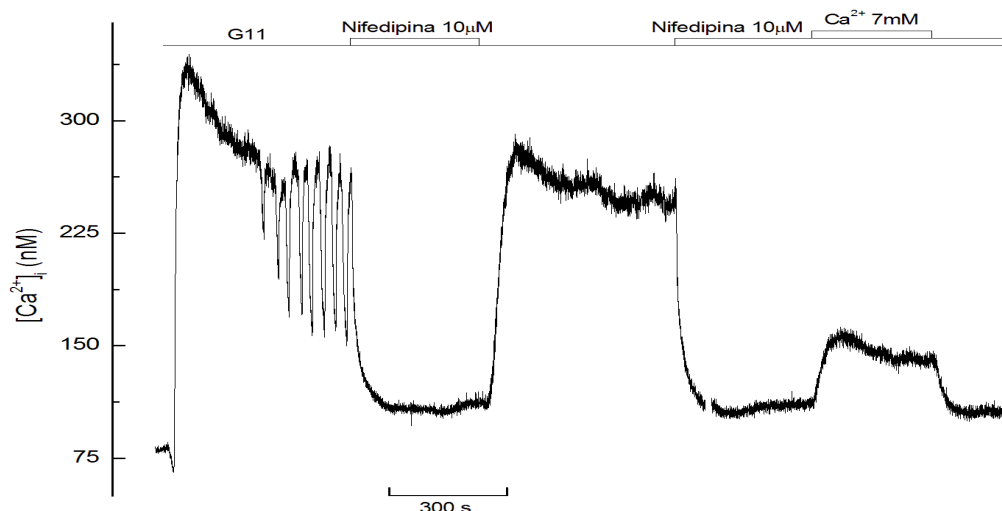


Figura 3.14: Efeito de um aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_o$ de 2,56 para 7 mM na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ num ilhéu intacto exposto a nifedipina. O ilhéu, inicialmente incubado em 3 mM glicose, foi exposto a 11 mM glicose (G11) durante toda a experiência. Nifedipina (10 μM) foi aplicada duas vezes, tendo o ilhéu sido sujeito a um pulso de Ca^{2+} durante a segunda aplicação. A nifedipina foi aplicada a partir de uma solução *stock* concentrada em DMSO, razão por que foi adicionado DMSO (0,04%) a todas as soluções que não continham o fármaco.

A Figura 3.14 mostra que 10 μM nifedipina, aplicada na presença de 11 mM glicose, suprimiu as oscilações da $[\text{Ca}^{2+}]_i$, reduzindo esta última para valores pouco acima do nível basal registado em 3 mM glicose. Esta observação indica que o tratamento com nifedipina suprime quase totalmente o influxo de Ca^{2+} induzido por glicose. A retirada do fármaco fez aumentar a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ para valores próximos do pico das

oscilações registadas no controlo. Contudo as oscilações não reapareceram, sugerindo que a nifedipina teve um efeito só parcialmente reversível. Surpreendentemente, sujeitando o ilhéu a um pulso de Ca^{2+} durante uma segunda aplicação de nifedipina produziu uma resposta com uma magnitude pelo menos três vezes superior à observada na ausência do fármaco (comparar com os efeitos nas Figuras 3.10C e 3.12C).

Esta observação fez com que se comparasse o efeito dos pulsos de Ca^{2+} no mesmo ilhéu, na presença e ausência de nifedipina.

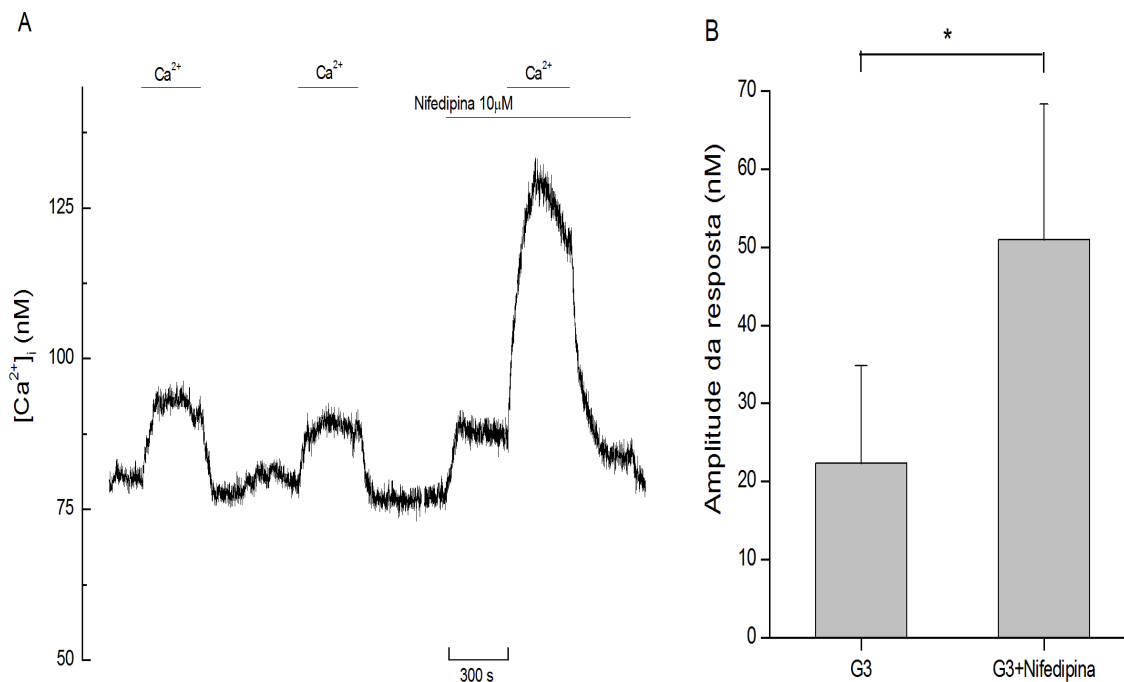


Figura 3.15: Efeito de aumentos da $[\text{Ca}^{2+}]_o$ de 2,56 para 7 mM na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ num ilhéu intacto, na presença e ausência de nifedipina. **A:** O ilhéu foi exposto a três pulsos de Ca^{2+} , dois na ausência (primeiro e segundo pulso) e um na presença de 10 μM nifedipina. Concentração de glicose ao longo da experiência: 3 mM. Foi adicionado DMSO (0,04%) às soluções que não continham nifedipina; **B:** Magnitudes das respostas aos pulsos de Ca^{2+} , apresentadas como média \pm S.D. ($n=3$ ilhéus). Dados recolhidos da experiência ilustrada no painel A e de outras duas experiências com idêntico protocolo. Coluna assinalada com “G3”: pulso em 3 mM glicose e ausência de nifedipina; coluna assinalada com “G3+nifedipina”: pulso em 3 mM glicose + 10 μM nifedipina. *: significativamente diferente ($p < 0,05$).

A Figura 3.15A ilustra uma experiência em que se sujeitou um ilhéu, incubado em 3 mM glicose, a três pulsos de Ca^{2+} , dois na ausência e um na presença de 10 μM nifedipina. A análise da magnitude das respostas é apresentada no painel B. Verificou-se que a aplicação de pulsos sucessivos de Ca^{2+} , nas mesmas condições experimentais, produziu respostas com amplitudes semelhantes. As experiências confirmam, por outro lado, que a aplicação de nifedipina potencia o efeito dos pulsos de Ca^{2+} , sugerindo que o

influxo de Ca^{2+} na presença do fármaco é aproximadamente 2 vezes superior ao observado na sua ausência ($p < 0,05$, $n = 3$ ilhéus). É de sublinhar que praticamente todas as experiências reportadas no trabalho anterior do laboratório (Silva et al., 1994) foram levadas a cabo na presença de nifedipina.

A nifedipina teve outro efeito surpreendente nestas experiências: aumentou a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ em cerca de 15 nM (Figura 3.15A). Este resultado não se deveu a um artefacto (o fármaco não interferiu com a fluorescência de FURA-2 a qualquer dos dois comprimentos de onda de excitação).

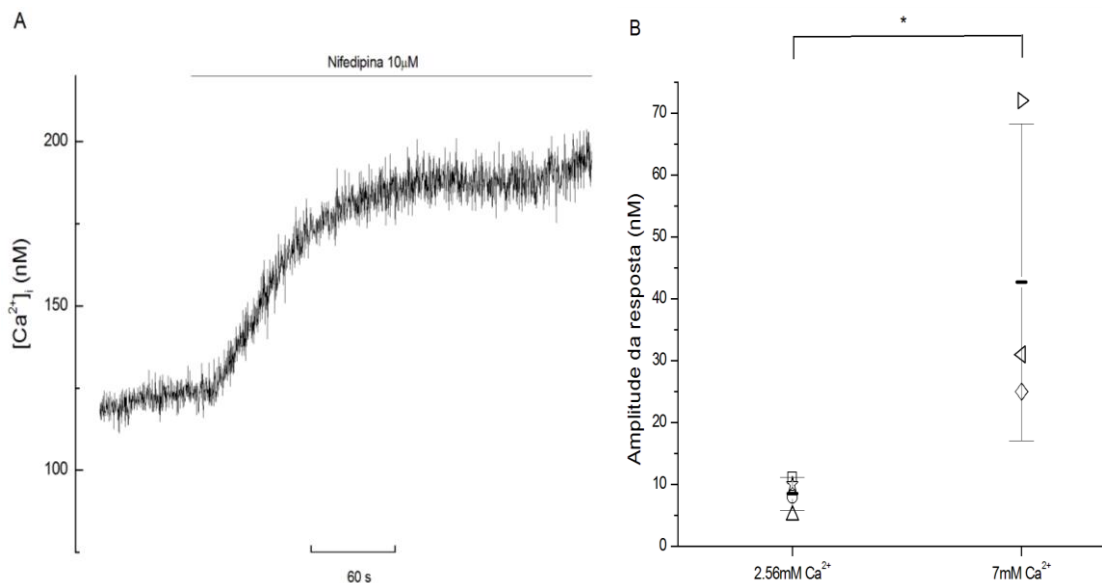


Figura 3.16: Aumentos da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induzidos por nifedipina na presença de 2,56 e 7 mM Ca^{2+} extracelular. **A:** O ilhéu foi exposto a 10 μM nifedipina na presença de 3 mM glicose e 7 mM Ca^{2+} extracelular. Foi adicionado DMSO (0,04%) à solução que não continha nifedipina; **B:** Magnitudes das respostas a nifedipina, apresentadas como média \pm S.D., juntamente com os valores individuais ($n = 3 - 4$ ilhéus). Dados recolhidos da experiência ilustrada no painel A e de outras experiências com idêntico protocolo, realizadas na presença de 7 ou 2,56 mM Ca^{2+} extracelular.

A magnitude do aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induzido pelo fármaco foi maior na presença de uma concentração mais elevada de Ca^{2+} extracelular, tal como se ilustra na Figura 3.16. De facto, a magnitude média da resposta a 10 μM nifedipina registada na presença de 7 mM Ca^{2+} extracelular foi cerca de 5 vezes superior à registada em 2,56 mM Ca^{2+} ($p < 0,05$, $n = 3-4$ ilhéus; Figura 3.16B). A hipótese de nifedipina estar a activar uma via de influxo de Ca^{2+} foi testada em experiências de influxo de Mn^{2+} . Este catião provoca a supressão (*quenching*) da fluorescência de FURA-2, podendo ser utilizado como traçador do influxo de Ca^{2+} desde que o indicador seja excitado no ponto isobéptico

(aproximadamente 358 nm) (Grynkiewicz et al., 1985). Nas experiências ilustradas na Figura 3.17 foi testada a hipótese de que a velocidade de influxo de Mn^{2+} é aumentada pelo tratamento dos ilhéus com nifedipina.

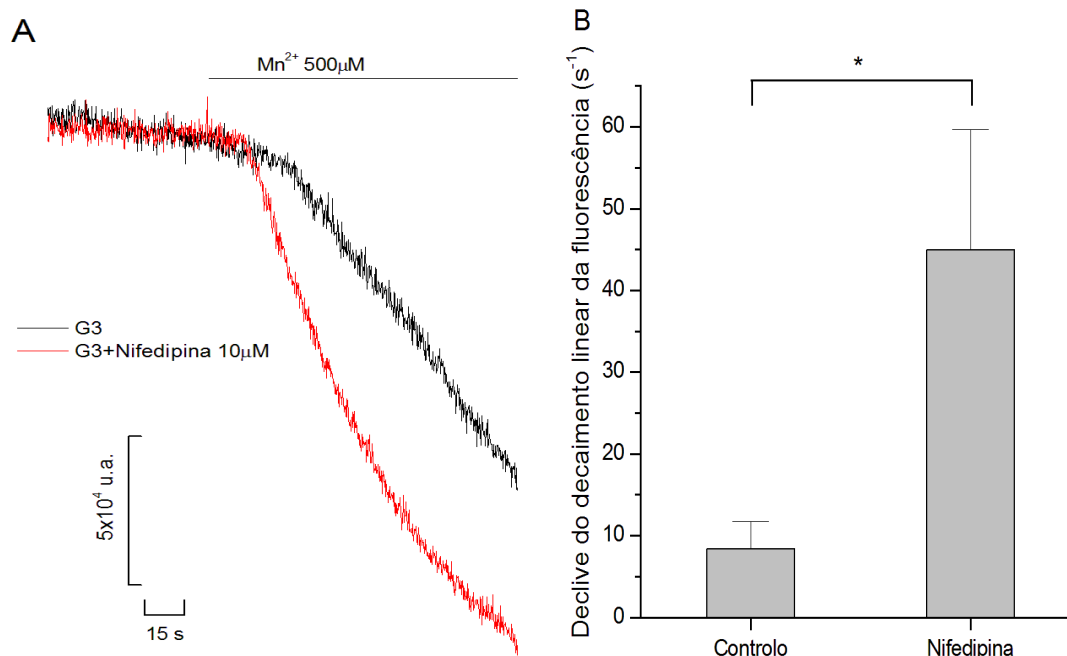


Figura 3.17: Efeito de nifedipina no influxo de Mn^{2+} em ilhéus intactos, medido pela supressão da fluorescência de FURA-2. **A:** A fluorescência foi excitada a 358 nm (ponto isosbético de FURA-2). Dois ilhéus distintos foram expostos a 500 μM Mn^{2+} , tal como é indicado pela barra horizontal. Um dos ilhéus foi incubado em 10 μM nifedipina e exposto a Mn^{2+} na presença do fármaco (traço vermelho), enquanto o outro (traço preto) se manteve sempre na ausência do fármaco. **B:** Razão dos declives dos decaimentos lineares da fluorescência na presença e na ausência de Mn^{2+} (ver texto principal), apresentada como média \pm S.D. para a situação controlo (experiência ilustrada no painel A a preto e outras duas experiência semelhantes) e para a situação na presença de nifedipina (experiência ilustrada no painel A a vermelho e outras duas experiências semelhantes). Concentração de glicose e Ca^{2+} extracelular em todas as experiências: 3 mM e 2,56 mM, respectivamente. *:significativamente diferente ($p < 0,05$).

Na ausência do fármaco, a adição de 500 μM Mn^{2+} ao meio extracelular traduziu-se num acentuado aumento da velocidade de decaimento da fluorescência medida no ponto isosbético (Figura 3.17A). Este fenómeno sugere que o Mn^{2+} atravessa a membrana por canais, causando a supressão do FURA-2 retido no interior das células. O efeito não foi visível durante os primeiros 10 – 30 s da aplicação de Mn^{2+} , devido às características do sistema de troca de soluções. Pode ainda verificar-se que o decaimento da fluorescência foi aproximadamente linear durante os 40 – 60 s subsequentes, o que provavelmente reflecte o facto de a concentração extracelular de Mn^{2+} se ter mantido constante e de, portanto, a cinética do processo de influxo poder ser

tratada como um processo de “ordem zero” (velocidade constante) durante aquele período inicial.

Na presença de nifedipina o decaimento de fluorescência foi muito mais rápido (Figura 3.17A). Calculando o declive na fase linear de cada decaimento, e dividindo-o pelo declive do decaimento basal (isto é, antes da adição de Mn^{2+}), obtém-se uma estimativa normalizada da velocidade de influxo do *quencher*. O resultado desta análise, aplicada às experiências ilustradas no painel A e a outras experiências realizadas com um protocolo idêntico, é apresentado na Figura 3.17B. Pode concluir-se que a velocidade de influxo de Mn^{2+} foi aproximadamente 5 vezes maior na presença de nifedipina ($p < 0,05$, $n = 3$ ilhéus), reforçando a ideia de que o fármaco estimula uma via de influxo de Ca^{2+} na célula- β . Tendo-se admitido a hipótese de que o efeito possa ser devido à activação de um canal catiónico permeável a Ca^{2+} , pesquisou-se a literatura em maior profundidade e constatou-se que o canal TRPM3 presente na célula- β de ratinho é activado por nifedipina com um EC_{50} de 30 μM (Wagner et al., 2008). Os canais TRPM3 são altamente permeáveis a vários catiões divalentes, incluindo Mn^{2+} (Wagner et al., 2010).

3.2.3) Efeitos de difenilamina-2-carboxilato e ácido mefenâmico na resposta a aumentos da $[Ca^{2+}]_o$

Silva et al. (1994) reportaram que difenilamina-2-carboxilato (DPC) inibe as respostas a pulsos de Ca^{2+} com um IC_{50} aparente de 145 μM . DPC pertence à classe dos fenamatos, derivados do ácido antranílico clinicamente utilizados como fármacos anti-inflamatórios não esteróides que foram estabelecidos como inibidores de canais catiónicos não selectivos.

A Figura 3.18 mostra o efeito de 500 μM DPC na resposta a pulsos de Ca^{2+} (aumentos da $[Ca^{2+}]_o$ de 2,56 para 7 mM), utilizando dois protocolos experimentais diferentes em que se reverteu a ordem de aplicação de Ca^{2+} e do fármaco. As experiências foram realizadas na presença de 3 mM glicose e 10 μM nifedipina.

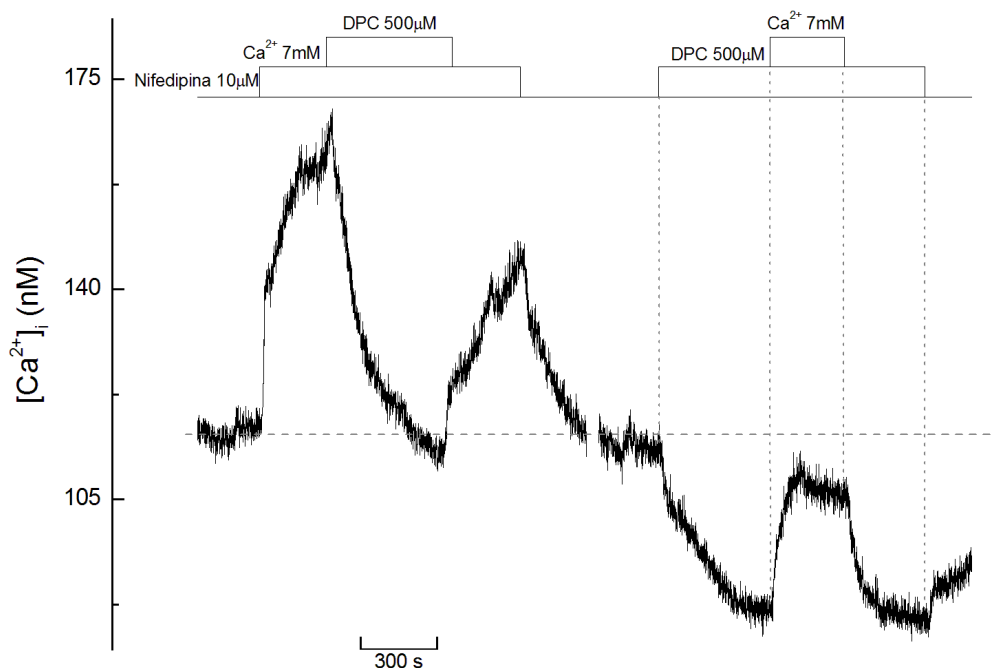


Figura 3.18: Modulação da resposta a pulsos de Ca^{2+} por difenilamina-2-carboxilato (DPC) em ilhéus intactos expostos a nifedipina. Um ilhéu, continuamente exposto a 3 mM glicose e 10 μM nifedipina, foi sujeito a um pulso de Ca^{2+} (aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_o$ de 2,56 para 7 mM) e, durante a sua aplicação, a 500 μM DPC. Findo o pulso o ilhéu foi de novo sujeito a DPC e, na presença deste, a um segundo pulso de Ca^{2+} . Efeitos representativos de duas experiências com idêntico protocolo. A linha horizontal a tracejado representa a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal no início da experiência, destinando-se a melhorar a percepção dos efeitos. A nifedipina e o DPC foram aplicados a partir de uma solução *stock* concentrada em DMSO, razão por que foi adicionado DMSO (0,1%) a todas as soluções que não continham o fármaco.

A aplicação de DPC na presença de 7 mM Ca^{2+} inibiu a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ acentuadamente, efeito que se revelou reversível (ver também (Silva et al., 1994)). O final do pulso de Ca^{2+} repôs os níveis controlo da $[\text{Ca}^{2+}]_i$, após o que se aplicou DPC pela segunda vez. O fármaco diminuiu lenta mas acentuadamente a $[\text{Ca}^{2+}]_i$, revelando a existência em condições basais de uma significativa componente de influxo de Ca^{2+} sensível a DPC. Quando se aplicou um novo pulso de Ca^{2+} , verificou-se que DPC não suprimiu a resposta embora tenha produzido um sinal de magnitude inferior à magnitude da resposta ao primeiro pulso, mas ainda considerável, sugerindo a contribuição de uma componente do influxo de Ca^{2+} significativa, insensível ao fármaco.

O efeito inibidor de DPC foi também observado em experiências em que o fármaco foi aplicado como na primeira fase da experiência ilustrada na Figura 3.18, mas em que se inverteu a ordem de aplicação de nifedipina e do pulso de Ca^{2+} (Figura 3.19). DPC diminuiu a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ para níveis idênticos aos observados no controlo (7 mM Ca^{2+} sem nifedipina).

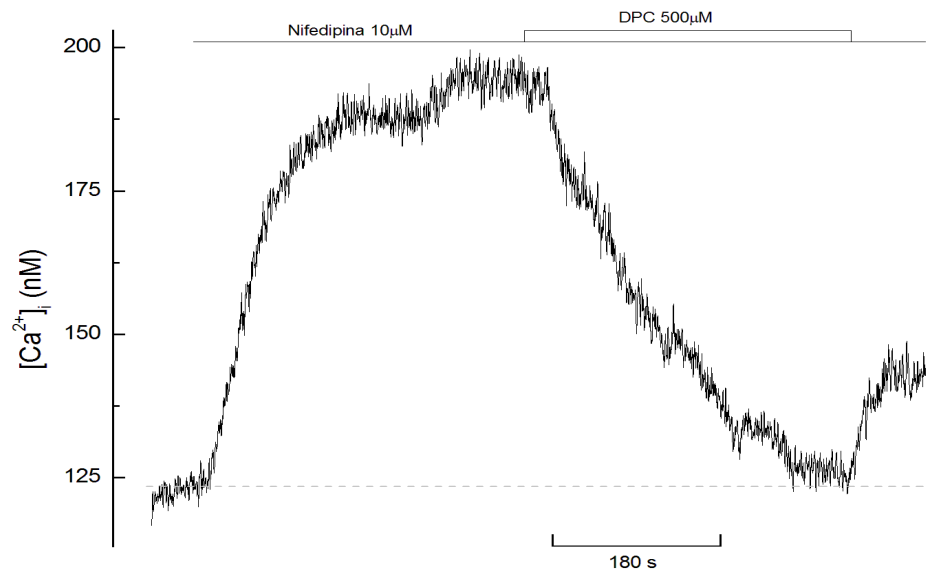


Figura 3.19: Efeito de difenilamina-2-carboxilato (DPC) em ilhéus intactos expostos a 7 mM Ca^{2+} e nifedipina. Um ilhéu, continuamente exposto a 3 mM glicose, foi sequencialmente exposto a 7 mM Ca^{2+} , 10 μM nifedipina e 500 μM DPC (na presença de 7 mM Ca^{2+} e nifedipina). Efeitos representativos de duas experiências com idêntico protocolo. Concentração de DMSO nas soluções: 0,1%. A linha horizontal a tracejado representa a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal no início da experiência, destinando-se a melhorar a percepção dos efeitos.

Surpreendentemente, tal como é ilustrado na Figura 3.20, o efeito inibidor de DPC anteriormente observado na presença de nifedipina não foi observado na ausência deste último fármaco. Pelo contrário, observou-se um aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de cerca de 20 nM após adição de 500 μM DPC, quer na ausência (painel A) quer na presença (painel B) de 100 μM diazóxido. É possível que este aumento se deva a um efeito secundário despolarizante do fenamato, susceptível de obscurecer as consequências da acção inibidora sobre os canais TRP.

Tendo em conta a possível existência de efeitos secundários indesejáveis, investigou-se a acção de outro fenamato (ácido mefenâmico), que entretanto foi apresentado como um inibidor selectivo de canais TRPM3 com um IC_{50} substancialmente mais reduzido (aproximadamente 7 μM (Klose et al., 2011)).

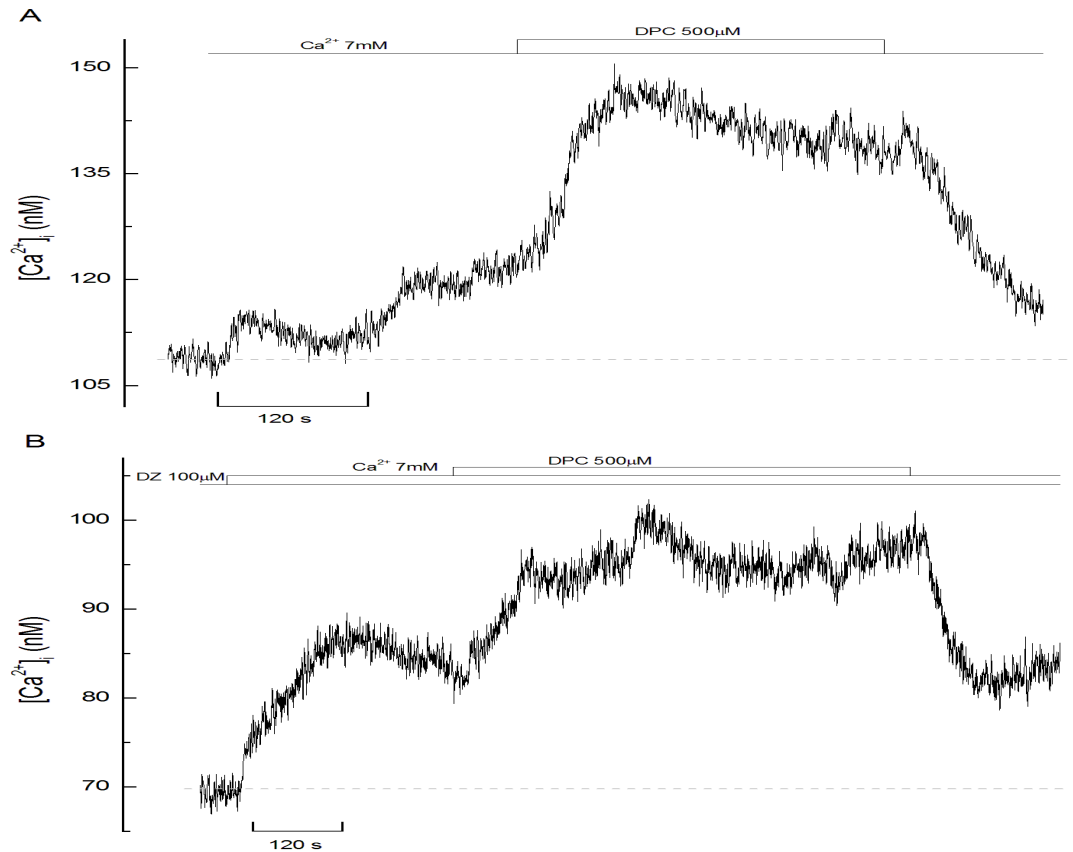


Figura 3.20: Efeito de difenilamina-2-carboxilato (DPC) em ilhéus intactos expostos a 7 mM Ca^{2+} na ausência de nifedipina. **A:** Um ilhéu foi sujeito a um pulso de 7 mM Ca^{2+} (isto é, um aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_o$ de 2,56 mM para 7 mM) e, na presença deste, a 500 μM DPC, tal como é indicado pelas barras horizontais; **B:** Um ilhéu, continuamente exposto a 100 μM diazóxido (DZ), foi sujeito a um pulso de 7 mM Ca^{2+} e, na presença deste, a 500 μM DPC. Concentração de glicose em ambas as experiências: 3 mM. Efeitos representativos de quatro experiências (painel A) e duas experiências (painel B) com idênticos protocolos. As linhas horizontais a tracejado no painel A e B, representam a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal no início da experiência, destinando-se a melhorar a percepção dos efeitos. A concentração presente de DMSO nas soluções foi de 0,05%.

Verificou-se em primeiro lugar, tal como é ilustrado na Figura 3.21, que a aplicação de 30 μM ácido mefenâmico, na presença de 10 μM nifedipina e 7 mM Ca^{2+} extracelular, teve um efeito inibitório semelhante a DPC (ver Figura 3.19).

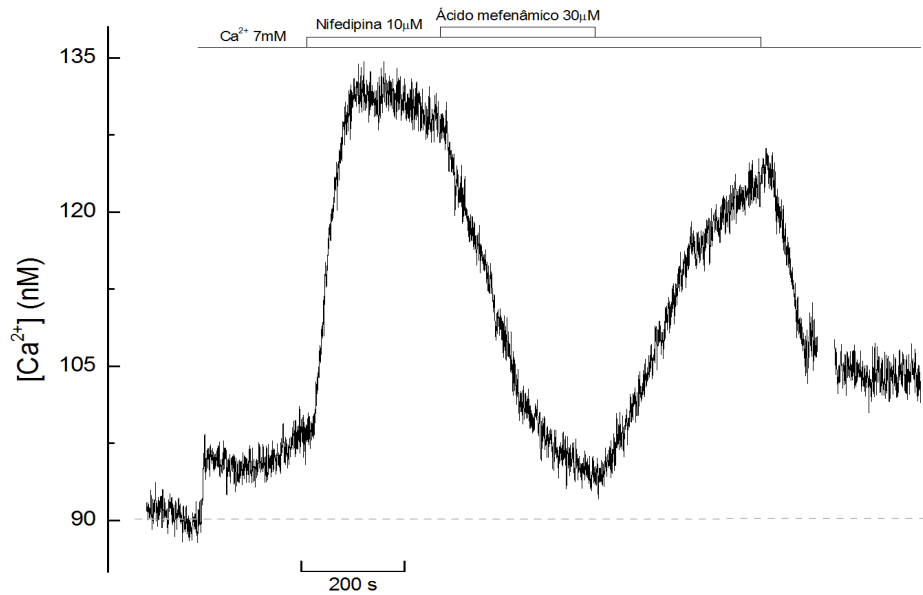


Figura 3.21: Efeito de ácido mefenâmico em ilhéus intactos expostos a 7 mM Ca^{2+} e nifedipina. Um ilhéu, continuamente exposto a 3 mM glicose, foi sequencialmente exposto a 7 mM Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_o$ inicial 2,56 mM), 10 μM nifedipina e 30 μM ácido mefenâmico (na presença de 7 mM Ca^{2+} e nifedipina). Efeitos representativos de três experiências com idêntico protocolo. A linha horizontal a tracejado representam a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal no início da experiência, destinando-se a melhorar a percepção dos efeitos. A nifedipina e o ácido mefenâmico foram aplicados a partir de uma solução *stock* concentrada em DMSO, razão por que foi adicionado DMSO (0,07%) a todas as soluções que não continham o fármaco.

A Figura 3.22A ilustra o efeito de concentrações crescentes de ácido mefenâmico, aplicadas na presença de 2,56 mM Ca^{2+} , 3 mM glicose e de uma concentração de nifedipina (50 μM) cinco vezes superior à concentração utilizada nas experiências anteriores, de forma a aumentar a amplitude do sinal. A aplicação de 50 μM nifedipina, aumentou a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ para valores muito superiores aos observados com 10 μM nifedipina de acordo com o valor de $\text{EC}_{50} = 30 \mu\text{M}$ já referido por (Wagner et al., 2010). Aumentando a concentração de ácido mefenâmico em vários passos, no intervalo 3-80 μM , reduziu a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de uma forma dose-dependente até que se atingiram valores próximos dos níveis basais (isto é, na presença de 2,56 mM Ca^{2+} e ausência de nifedipina). A análise das três experiências realizadas com este protocolo, apresentada na Figura 3.22B recorrendo a uma equação de Hill modificada (ver legenda), indica que o efeito inibidor do ácido mefenâmico é caracterizado por um IC_{50} de 10,3 μM , isto é, da mesma ordem de grandeza do valor apresentado para os canais expressos por Klose (2011) (Klose et al., 2011).

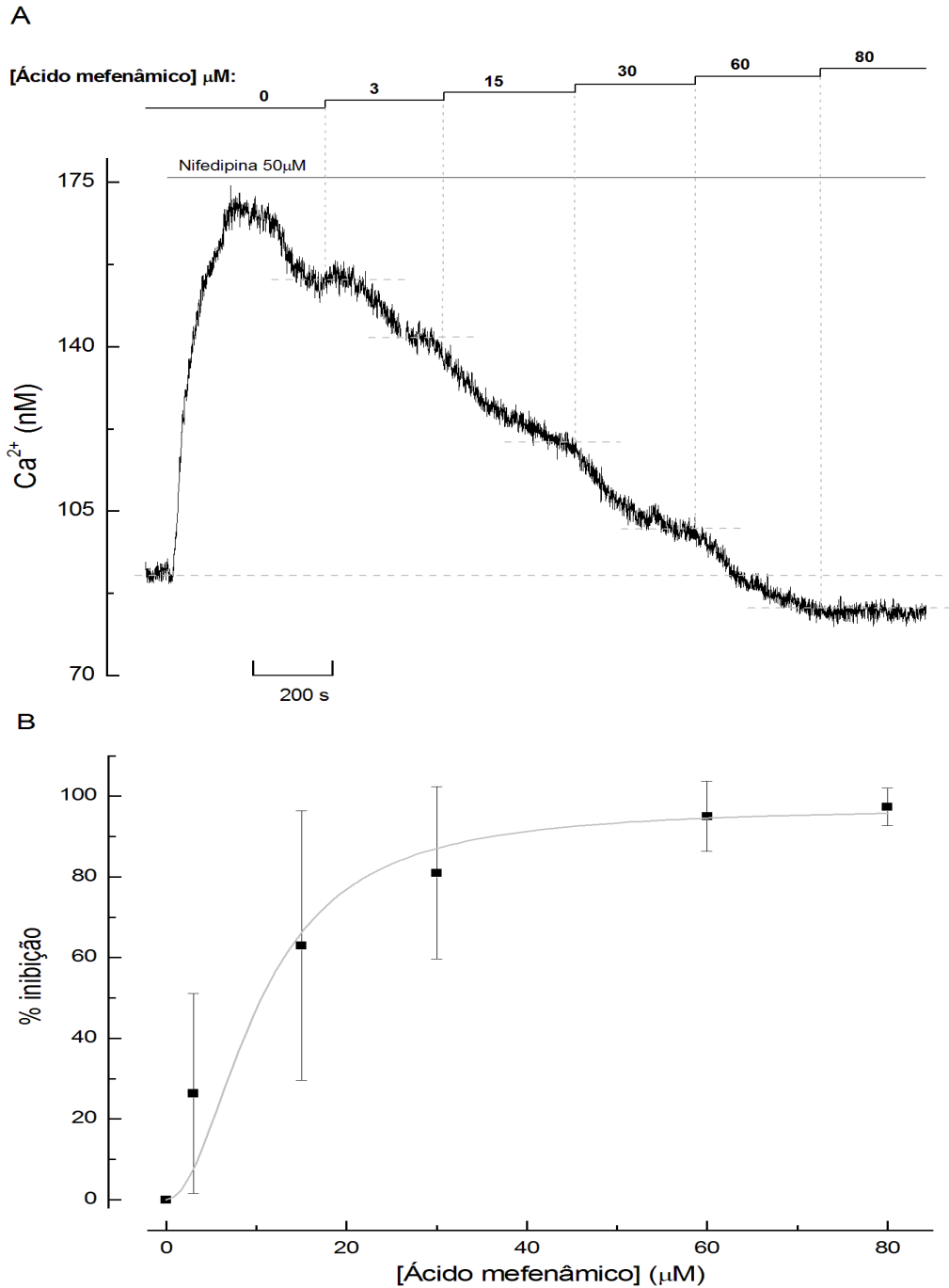


Figura 3.22: Efeito de várias concentrações de ácido mefenâmico em ilhéus intactos expostos a 2,56 mM Ca^{2+} e nifedipina. **A:** Um ilhéu, continuamente exposto a 3 mM glicose e 2,56 mM Ca^{2+} , foi exposto a 50 μM nifedipina e, na sua presença, a várias concentrações de ácido mefenâmico no intervalo 3 – 80 μM . Efeitos representativos de três experiências com idêntico protocolo. A concentração de DMSO foi de 0,07% em todas as soluções; **B:** Para cada experiência o efeito de cada aplicação de ácido mefenâmico (diferença entre a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ antes da experiência de 3 μM e a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ média no fim da aplicação) foi expresso em porcentagem da resposta a nifedipina (diferença entre a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ máxima registada em nifedipina e a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal). Para cada concentração de ácido mefenâmico esta “% de inibição” foi apresentada como média \pm S.D. ($n=3$ ilhéus). A curva representa o melhor ajuste de uma função de Hill modificada aos dados experimentais. Função utilizada: $\theta = A + (B - A) \frac{\kappa^n}{K^n + \kappa^n}$, em que A representa o valor mínimo de θ , B o valor máximo, κ a concentração de ligando, K a constante de dissociação aparente ou IC_{50} e n o coeficiente de Hill aparente. Parâmetros obtidos: $K=10,3 \mu\text{M}$ e $n=2$.

A aplicação de ácido mefenâmico na presença de 7 mM Ca^{2+} e ausência de nifedipina, utilizando uma concentração cerca de três vezes superior ao valor determinado de IC_{50} , revelou um efeito muito diferente do de DPC (comparar os efeitos ilustrados na Figura 3.23 com os da Figura 3.20A). De facto, o fármaco pareceu exercer uma acção inibitória lenta mas pequena na $[\text{Ca}^{2+}]_i$, eventualmente precedida de um aumento transitório ligeiro. Foi também observado um efeito parecido na presença de 2,56 mM Ca^{2+} (ver o segmento inicial do registo na Figura 3.24).

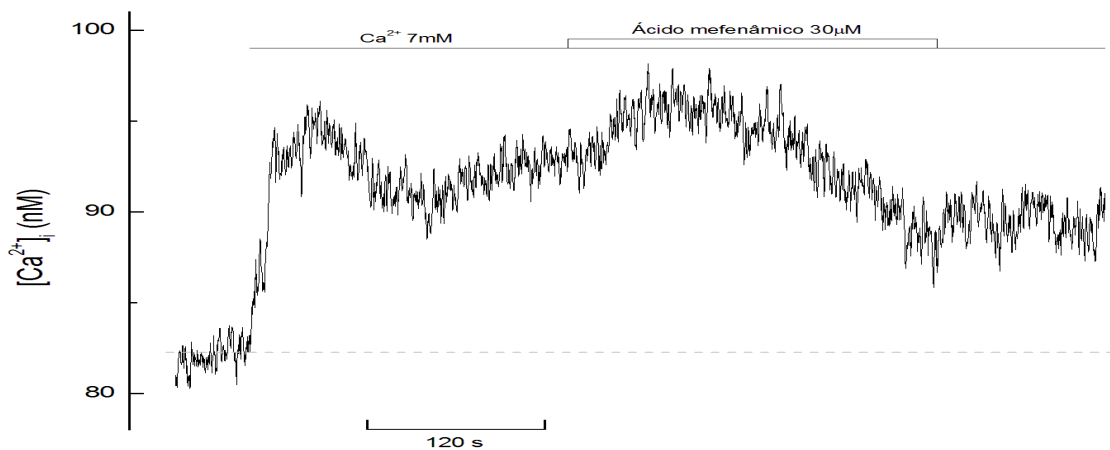


Figura 3.23: Efeito do ácido mefenâmico em ilhéus intactos expostos a 7 mM Ca^{2+} na ausência de nifedipina. Os ilhéus foram continuamente expostos a 3mM de glicose e foram sujeitos a um pulso de cálcio 7 mM Ca^{2+} (isto é, um aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_o$ de 2,56 mM para 7 mM) e na presença deste a 30 μM de ácido mefenâmico. Efeitos representativos de quatro experiências com idêntico protocolo.

Um efeito inibitório pequeno do ácido mefenâmico é compatível com a possibilidade de os canais TRPM3 poderem desempenhar um papel limitado no influxo de Ca^{2+} que ocorre em condições fisiológicas. De facto, a experiência ilustrada na Figura 3.24 parece indicar que a incubação com o fármaco não afectou a resposta a pulsos de Ca^{2+} (amplitude média: 10 ± 3 nM, $n=3$ ilhéus; comparar com as respostas controlo a pulsos de Ca^{2+} ilustradas na Figura 3.13).

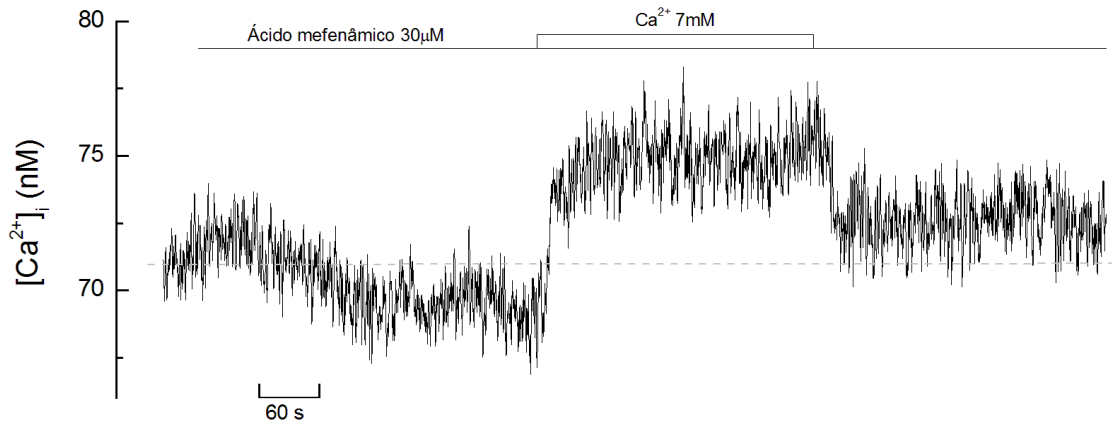


Figura 3.24: Efeito de um aumento $[Ca^{2+}]_o$ de 2,56 mM para 7 mM na presença de ácido mefenâmico na ausência de nifedipina. Os ilhéus foram continuamente expostos a 3 mM de glicose e foram sujeitos a 30 μ M de ácido mefenâmico e na presença deste a um pulso de 7 mM Ca^{2+} (isto é, um aumento da $[Ca^{2+}]_o$ de 2,56 mM para 7 mM). Efeitos representativos de três experiências com idêntico protocolo.

Sabe-se que os canais TRPM3 são activados por sulfato de pregnenolona (Wagner et al., 2008). A experiência ilustrada na figura 3.25, muito embora seja única por limitações temporais na recta final deste trabalho, mostra que a hormona esteróide aumenta acentuadamente a $[Ca^{2+}]_i$ na presença de 3 mM glicose e 2,56 mM Ca^{2+} extracelular.

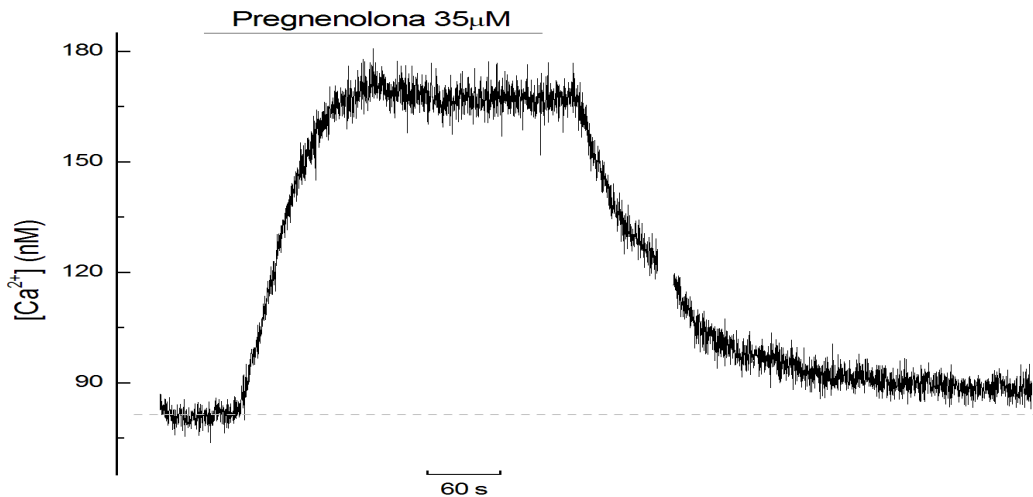


Figura 3.25: Efeito de sulfato de pregnenolona. Um ilhéu, continuamente incubado em 3 mM glicose e 2,56 mM Ca^{2+} , foi exposto a 35 μ M sulfato de pregnenolona tal como é indicado pela barra horizontal. Concentração de DMSO no meio: 0,07%.

3.3) Considerações finais

Dois resultados principais consubstanciam a hipótese de que os aumentos da $[Ca^{2+}]_i$, induzidos por pulsos de Ca^{2+} extracelular, são mediados pelo menos em parte por canais TRPM3, pertencentes a uma sub-família de canais catiónicos não selectivos da família dos canais TRP:

(1) Os sinais são muito aumentados por nifedipina, di-hidropiridina que, ao contrário de outras, activa canais TRPM3 (Wagner et al., 2008). Por outro lado, a aplicação de nifedipina aumenta acentuadamente a $[Ca^{2+}]_i$ e acelera o influxo de Mn^{2+} (estimado pela técnica de *quenching* de fluorescência no ponto isobéptico de FURA-2);

(2) Na presença de nifedipina, os sinais são fortemente inibidos por ácido mefenâmico, um fenamato que diferencia os canais TRPM3 de canais TRP de outras sub-famílias (Klose et al., 2011). Tanto a nifedipina como o ácido mefenâmico actuam em intervalos de concentrações compatíveis com os reportados nos estudos referidos. Os estudos de supressão da fluorescência de FURA-2 por Mn^{2+} , realizados no presente trabalho, indicam que esta via de influxo de cálcio é permeável a Mn^{2+} e, possivelmente, a outros catiões divalentes, reforçando a ideia de um envolvimento de um canal TRPM3. Foi sugerido, em conformidade, que os canais TRPM3 possam constituir uma via privilegiada de captação de Zn^{2+} pela célula- β , essencial para a formação dos complexos insulina / Zn^{2+} / Ca^{2+} nos grânulos secretores (Wagner et al., 2010). Dado o facto de os canais TRPM3 serem potentemente activados pelo esteróide neuroactivo pregnenolona (sulfato) (Wagner et al., 2008), é também possível que o influxo de Ca^{2+} através daqueles canais constitua um aspecto essencial do mecanismo de transdução de sinais da hormona.

Num estudo anterior do laboratório (Silva et al., 1994), foi utilizado o fenamato difenilamina-2-carboxilato (DPC) como inibidor dos aumentos da $[Ca^{2+}]_i$ induzidos por pulsos de Ca^{2+} . Os efeitos de DPC reportados no presente trabalho sugerem que o fármaco tenha a capacidade de inibir canais TRPM3, muito embora seja desconhecida a sua especificidade dentro da família de canais TRP. De qualquer forma, para ser

efectivo o fármaco tem que ser utilizado a elevadas concentrações (centenas de micromolar), o que levanta a possibilidade de serem exercidos efeitos laterais noutros transportadores relacionados com a homeostasia do Ca^{2+} . Verificou-se, de facto, que DPC aumenta a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ na ausência de nifedipina, efeito que não ocorre (ou ocorre transitoriamente com efeitos negligenciáveis) no caso do ácido mefenâmico. Pode concluir-se, desta forma, que este último tem um perfil farmacológico muito mais adequado como inibidor do influxo de Ca^{2+} mediado por canais TRPM3.

Muito embora devam ser realizadas experiências adicionais, o presente estudo sugere que as respostas obtidas na ausência de nifedipina não reflectem influxo de Ca^{2+} por canais TRPM3. De facto, estas respostas não foram suprimidas por ácido mefenâmico (ao contrário do que sucedeu na presença de nifedipina, em que as respostas parecem ter sido completamente suprimidas de uma forma dose-dependente). Um candidato possível é o canal TRPV2, cuja presença numa linha celular secretora de insulina foi recentemente descrita (Hisanaga et al., 2009). Deve no entanto sublinhar-se que a translocação destes canais para a membrana é inibida por diazóxido (Hisanaga et al., 2009), agente utilizado em algumas experiências do presente trabalho.

Num número limitado de experiências do estudo anterior do laboratório (Silva et al., 1994), verificou-se que pulsos de Ca^{2+} aplicados na ausência de nifedipina produziam aumentos da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ com uma amplitude comparável à dos sinais produzidos na presença do fármaco. Esta observação não foi duplicada no presente trabalho (na ausência de nifedipina os sinais tiveram invariavelmente uma amplitude muito inferior). Pode suceder, no entanto, que o condicionamento metabólico a longo prazo da célula- β por exposição a elevados níveis de glicose (11 mM no estudo de Silva et al. (1994), presente em todas as fases de manuseamento dos ilhéus, incluindo o período de carregamento da sonda FURA-2) aumente a expressão e/ou a translocação para a membrana dos canais TRPV2. Elevadas concentrações de glicose induzem a translocação dos canais TRPV2 (Hisanaga et al., 2009). É de sublinhar que, no presente trabalho, o carregamento durante aproximadamente 50 min com FURA-2 foi realizado com 3 mM glicose. A reduzida amplitude dos sinais, observada na ausência de nifedipina no presente trabalho, pode pois denotar uma baixa expressão / translocação de canais TRPV2 ou o envolvimento de outras vias de influxo de Ca^{2+} (diferentes de qualquer modo de canais Ca_V , dado que estes se encontram quase totalmente desactivados em condições de forte hiperpolarização da membrana).

O presente trabalho não endereçou questões relativas ao possível envolvimento dos canais TRPM3 no controlo do potencial de membrana da célula- β . Sabe-se, no entanto, que concentrações elevadas de DPC suprimem os *bursts* de actividade eléctrica e hiperpolarizam a membrana da célula- β (Santos et al., 1997). É pois possível que aqueles canais, quando activos na célula- β em condições fisiológicas, tenham um potencial de reversão da ordem de grandeza (ou mesmo mais positivo) do que o potencial de patamar dos *bursts* (cerca de -40 mV). Os valores publicados dos potenciais de reversão dos canais TRPM3 (Wagner et al., 2010) são compatíveis com esta hipótese. O possível envolvimento destes canais no controlo do potencial de membrana é também sugerido pelas observações de que:

(1) Na presença de 11 mM glicose e tolbutamida, 10 μ M nifedipina hiperpolariza inicialmente a célula- β e suprime os potenciais de acção, após o que, significativamente, induz uma acentuada despolarização. Aumentando a $[Ca^{2+}]_o$ nestas condições despolariza fortemente a membrana (Rosario et al., 1993);

(2) Idênticos efeitos despolarizantes do Ca^{2+} extracelular foram registados em células permanentemente despolarizadas por exposição a tolbutamida e nifedipina (Rosa M. Santos et al., 1994).

Os efeitos acima mencionados em (1) e (2) não foram cabalmente explicados nos estudos referidos, muito embora se tenha sugerido a operação na célula- β de um mecanismo novo de influxo de Ca^{2+} distinto dos canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem.

O presente trabalho abre caminho a uma investigação electrofisiológica dos canais TRPM3 (e possivelmente também TRPV2) na célula- β , destinado a esclarecer o seu possível envolvimento na regulação fisiológica do potencial de membrana (incluindo os *bursts* de actividade eléctrica, cujo mecanismo iónico permanece incerto).

Capítulo 4 – Conclusões

Gerais

- ✓ Células BRIN-BD11 secretoras de insulina respondem a pulsos de Ca^{2+} extracelular com um padrão totalmente diferente do exibido por ilhéus, sugerindo a operação de mecanismos de influxo de Ca^{2+} distintos dos da célula- β .

- ✓ A célula- β está equipada com um mecanismo de influxo de Ca^{2+} distinto do mediado por canais Ca_V , insensível ao condicionamento metabólico agudo por glicose.

- ✓ A potenciação do influxo de Ca^{2+} por nifedipina e o seu bloqueio por ácido mefenâmico, na presença do fármaco, é compatível com a mediação por canais TRPM3, sensíveis ao esteróide pregnenolona.

- ✓ Ao contrário de difenilamina-2-carboxilato (DPC), que também parece bloquear aqueles canais embora a concentrações muito superiores, o ácido mefenâmico não parece exercer acções colaterais indesejáveis noutros transportadores de Ca^{2+} .

- ✓ Na ausência de nifedipina o mecanismo de influxo de Ca^{2+} é mediado por canais diferentes dos TRPM3 (possivelmente TRPV2), aparentemente sujeitos a condicionamento negativo por ausência prolongada de estímulo metabólico.

- ✓ Os canais TRPM3 podem constituir uma via importante de captação de Zn^{2+} pela célula- β , essencial para a estabilização de insulina nos grânulos secretores

***Capítulo 5 – Referências
Bibliográficas***

- Antunes, C.M., A.P. Salgado, L.M. Rosario, and R.M. Santos. (2000) "Differential patterns of glucose-induced electrical activity and intracellular calcium responses in single mouse and rat pancreatic islets". *Diabetes*. 49:2028-2038.
- Benninger, R.K., M. Zhang, W.S. Head, L.S. Satin, and D.W. Piston. (2008) "Gap junction coupling and calcium waves in the pancreatic islet". *Biophys J*. 95:5048-5061.
- Bonner-Weir, S., and L. Orci. (1982) "New perspectives on the microvasculature of the islets of Langerhans in the rat". *Diabetes*. 31:883-889.
- Bratanova-Tochkova, T.K., H. Cheng, S. Daniel, S. Gunawardana, Y.J. Liu, J. Mulvaney-Musa, T. Schermerhorn, S.G. Straub, H. Yajima, and G.W. Sharp. (2002) "Triggering and augmentation mechanisms, granule pools, and biphasic insulin secretion". *Diabetes*. 51 Suppl 1:S83-90.
- Breitwieser, G.E. (2008) "Extracellular calcium as an integrator of tissue function". *Int J Biochem Cell Biol*. 40:1467-1480.
- Casas, S., A. Novials, F. Reimann, R. Gomis, and F.M. Gribble. (2008) "Calcium elevation in mouse pancreatic beta cells evoked by extracellular human islet amyloid polypeptide involves activation of the mechanosensitive ion channel TRPV4". *Diabetologia*. 51:2252-2262.
- Chow, R.H., P.E. Lund, S. Loser, U. Panten, and E. Gylfe. (1995) "Coincidence of early glucose-induced depolarization with lowering of cytoplasmic Ca²⁺ in mouse pancreatic beta-cells". *J Physiol*. 485 (Pt 3):607-617.
- Figueiredo, H.J.A. (2010) "Modulação das Oscilações de Cálcio Intracelular por Inibidores de Canais de Potássio Sensíveis a Cálcio em Ilhéus Pancreáticos." Mestre. Universidade de Coimbra.
- Grapengiesser, E., E. Gylfe, and B. Hellman. (1988) "Glucose-induced oscillations of cytoplasmic Ca²⁺ in the pancreatic beta-cell". *Biochem Biophys Res Commun*. 151:1299-1304.
- Graves, T.K., and P.M. Hinkle. (2003) "Ca(2+)-induced Ca(2+) release in the pancreatic beta-cell: direct evidence of endoplasmic reticulum Ca(2+) release". *Endocrinology*. 144:3565-3574.
- Gray, E., D. Muller, P.E. Squires, H. Asare-Anane, G.C. Huang, S. Amiel, S.J. Persaud, and P.M. Jones. (2006) "Activation of the extracellular calcium-sensing receptor initiates insulin secretion from human islets of Langerhans: involvement of protein kinases". *J Endocrinol*. 190:703-710.
- Grynkiewicz, G., M. Poenie, and R.Y. Tsien. (1985) "A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties". *J Biol Chem*. 260:3440-3450.
- Hamid, M., J.T. McCluskey, N.H. McClenaghan, and P.R. Flatt. (2002) "Comparison of the secretory properties of four insulin-secreting cell lines". *Endocr Res*. 28:35-47.
- Henquin, J.C. (2000) "Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose". *Diabetes*. 49:1751-1760.
- Henquin, J.C., N. Ishiyama, M. Nenquin, M.A. Ravier, and J.C. Jonas. (2002) "Signals and pools underlying biphasic insulin secretion". *Diabetes*. 51 Suppl 1:S60-67.
- Hisanaga, E., M. Nagasawa, K. Ueki, R.N. Kulkarni, M. Mori, and I. Kojima. (2009) "Regulation of calcium-permeable TRPV2 channel by insulin in pancreatic beta-cells". *Diabetes*. 58:174-184.
- Hodgkin, M.N., C.E. Hills, and P.E. Squires. (2008) "The calcium-sensing receptor and insulin secretion: a role outside systemic control 15 years on". *J Endocrinol*. 199:1-4.

- Huang, C.L. (2004) "The transient receptor potential superfamily of ion channels". *J Am Soc Nephrol*. 15:1690-1699.
- Janssen, S.W., J.G. Hoenderop, A.R. Hermus, F.C. Sweep, G.J. Martens, and R.J. Bindels. (2002) "Expression of the novel epithelial Ca²⁺ channel ECaC1 in rat pancreatic islets". *J Histochem Cytochem*. 50:789-798.
- Jones, P.M., I. Kitsou-Mylona, E. Gray, P.E. Squires, and S.J. Persaud. (2007) "Expression and function of the extracellular calcium-sensing receptor in pancreatic beta-cells". *Arch Physiol Biochem*. 113:98-103.
- Kamagate, A., A. Herchuelz, A. Bollen, and F. Van Eylen. (2000) "Expression of multiple plasma membrane Ca(2+)-ATPases in rat pancreatic islet cells". *Cell Calcium*. 27:231-246.
- Kamagate, A., A. Sener, P. Courtois, W.J. Malaisse, and A. Herchuelz. (2008) "Effects of plasma membrane Ca(2+)-ATPase overexpression upon D-glucose metabolism in insulin-producing BRIN-BD11 cells". *Biosci Rep*. 28:251-258.
- Kim, M.S., W. Zeng, J.P. Yuan, D.M. Shin, P.F. Worley, and S. Muallem. (2009) "Native Store-operated Ca²⁺ Influx Requires the Channel Function of Orai1 and TRPC1". *J Biol Chem*. 284:9733-9741.
- Kitsou-Mylona, I., C.J. Burns, P.E. Squires, S.J. Persaud, and P.M. Jones. (2008) "A role for the extracellular calcium-sensing receptor in cell-cell communication in pancreatic islets of langerhans". *Cell Physiol Biochem*. 22:557-566.
- Klose, C., I. Straub, M. Riehle, F. Ranta, D. Krautwurst, S. Ullrich, W. Meyerhof, and C. Harteneck. (2011) "Fenamates as TRP channel blockers: mefenamic acid selectively blocks TRPM3". *Br J Pharmacol*. 162:1757-1769.
- Kraft, R., and C. Harteneck. (2005) "The mammalian melastatin-related transient receptor potential cation channels: an overview". *Pflugers Arch*. 451:204-211.
- McClenaghan, N.H., M. Elsner, M. Tiedge, and S. Lenzen. (1998) "Molecular characterization of the glucose-sensing mechanism in the clonal insulin-secreting BRIN-BD11 cell line". *Biochem Biophys Res Commun*. 242:262-266.
- McClenaghan, N.H., and P.R. Flatt. (1999) "Engineering cultured insulin-secreting pancreatic B-cell lines". *J Mol Med (Berl)*. 77:235-243.
- Mitsui, M., A. Abe, M. Tajimi, and H. Karaki. (1993) "Leakage of the fluorescent Ca²⁺ indicator fura-2 in smooth muscle". *Jpn J Pharmacol*. 61:165-170.
- Nilius, B., G. Owsianik, T. Voets, and J.A. Peters. (2007) "Transient receptor potential cation channels in disease". *Physiol Rev*. 87:165-217.
- Nilsson, T., P.O. Berggren, and B. Hellman. (1987) "Cadmium-induced insulin release does not involve changes in intracellular handling of calcium". *Biochim Biophys Acta*. 929:81-87.
- Ohtani, O. (1983) "Microcirculation of the pancreas: a correlative study of intravital microscopy with scanning electron microscopy of vascular corrosion casts". *Arch Histol Jpn*. 46:315-325.
- Paredes, R.M., J.C. Etzler, L.T. Watts, W. Zheng, and J.D. Lechleiter. (2008) "Chemical calcium indicators". *Methods*. 46:143-151.
- Petit, P., A.D. Lajoix, and R. Gross. (2009) "P2 purinergic signalling in the pancreatic beta-cell: control of insulin secretion and pharmacology". *Eur J Pharm Sci*. 37:67-75.
- Pipeleers, D.G. (1992) "Heterogeneity in pancreatic beta-cell population". *Diabetes*. 41:777-781.
- Prakriya, M., S. Feske, Y. Gwack, S. Srikanth, A. Rao, and P.G. Hogan. (2006) "Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel". *Nature*. 443:230-233.

- Rasschaert, J., P.R. Flatt, C.R. Barnett, N.H. McClenaghan, and W.J. Malaisse. (1996) "D-glucose metabolism in BRIN-BD11 islet cells". *Biochem Mol Med.* 57:97-105.
- Ravier, M.A., P. Gilon, and J.C. Henquin. (1999) "Oscillations of insulin secretion can be triggered by imposed oscillations of cytoplasmic Ca²⁺ or metabolism in normal mouse islets". *Diabetes.* 48:2374-2382.
- Ribalet, B., and P.M. Beigelman. (1980) "Calcium action potentials and potassium permeability activation in pancreatic beta-cells". *Am J Physiol.* 239:C124-133.
- Rorsman, P., C. Ammala, P.O. Berggren, K. Bokvist, and O. Larsson. (1992) "Cytoplasmic calcium transients due to single action potentials and voltage-clamp depolarizations in mouse pancreatic B-cells". *EMBO J.* 11:2877-2884.
- Rorsman, P., L. Eliasson, T. Kanno, Q. Zhang, and S. Gopel. (2011) "Electrophysiology of pancreatic beta-cells in intact mouse islets of Langerhans". *Prog Biophys Mol Biol.*
- Rorsman, P., and E. Renstrom. (2003) "Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells". *Diabetologia.* 46:1029-1045.
- Rosa M. Santos, Rui M. Barbosa, Amélia M. silva, Célia M. antunes, and L.M. Rosário. (1994) "[Ca²⁺]_i-sensitive conductance in the regulation of pancreatic β-cell bursting". In [Ca²⁺]_i-sensitive conductance in the regulation. Insulin secretion and pancreatic β-cell research. 181-185.
- Rosario, L.M., R.M. Barbosa, C.M. Antunes, A.M. Silva, A.J. Abrunhosa, and R.M. Santos. (1993) "Bursting electrical activity in pancreatic beta-cells: evidence that the channel underlying the burst is sensitive to Ca²⁺ influx through L-type Ca²⁺ channels". *Pflugers Arch.* 424:439-447.
- Rutter, G.A. (2001) "Nutrient-secretion coupling in the pancreatic islet beta-cell: recent advances". *Mol Aspects Med.* 22:247-284.
- Salgado, A.P., F.C. Pereira, R.M. Seica, A.P. Fernandes, P.R. Flatt, R.M. Santos, L.M. Rosario, and R. Ramasamy. (1999) "Modulation of glucose-induced insulin secretion by cytosolic redox state in clonal beta-cells". *Mol Cell Endocrinol.* 154:79-88.
- Salgado, A.P., R.M. Santos, A.P. Fernandes, A.R. Tome, P.R. Flatt, and L.M. Rosario. (2000) "Glucose-mediated Ca(2+) signalling in single clonal insulin-secreting cells: evidence for a mixed model of cellular activation". *Int J Biochem Cell Biol.* 32:557-569.
- Santos, R.M., R.M. Barbosa, C.M. Antunes, A.M. Silva, A.P. Salgado, A.J. Abrunhosa, F.C. Pereira, R.M. Seica, and L.M. Rosario. (1997) "Bursting electrical activity generated in the presence of KATP channel blockers. Pharmacology, sensitivity to intracellular pH and modulation by glucose metabolism". *Adv Exp Med Biol.* 426:33-41.
- Santos, R.M., L.M. Rosario, A. Nadal, J. Garcia-Sancho, B. Soria, and M. Valdeolmillos. (1991) "Widespread synchronous [Ca²⁺]_i oscillations due to bursting electrical activity in single pancreatic islets". *Pflugers Arch.* 418:417-422.
- Scharenberg, A.M. (2009) "TRPM2 and pancreatic beta-cell responses to oxidative stress". *Islets.* 1:165-166.
- Silva, A.M., R.M. Barbosa, L.M. Rosário, and R.M. santos. (1995) "Control of Ca²⁺ and membrane potencial by a Ni²⁺-and DPC-sensitive non-selective cation channel in pancreatic β-cells". In 2ª Reunião Sociedade Portuguesa de Neurociências, Lisbon.

- Silva, A.M., R.J. Rodrigues, A.R. Tome, R.A. Cunha, S. Misler, L.M. Rosario, and R.M. Santos. (2008) "Electrophysiological and immunocytochemical evidence for P2X purinergic receptors in pancreatic beta cells". *Pancreas*. 36:279-283.
- Silva, A.M., L.M. Rosario, and R.M. Santos. (1994) "Background Ca²⁺ influx mediated by a dihydropyridine- and voltage-insensitive channel in pancreatic beta-cells. Modulation by Ni²⁺, diphenylamine-2-carboxylate, and glucose metabolism". *J Biol Chem*. 269:17095-17103.
- Silva, A.M.L.D.d. (1995) "Via de influxo de Ca²⁺ insensível às di-hidropiridinas na célula β pancreática". Vol. Mestrado. Universidade de Coimbra.
- Straub, S.G., and G.W. Sharp. (2004) "Hypothesis: one rate-limiting step controls the magnitude of both phases of glucose-stimulated insulin secretion". *Am J Physiol Cell Physiol*. 287:C565-571.
- Tamarina, N.A., A. Kuznetsov, and L.H. Philipson. (2008) "Reversible translocation of EYFP-tagged STIM1 is coupled to calcium influx in insulin secreting beta-cells". *Cell Calcium*. 44:533-544.
- Tengholm, A., and E. Gylfe. (2009) "Oscillatory control of insulin secretion". *Mol Cell Endocrinol*. 297:58-72.
- Thore, S., O. Dyachok, E. Gylfe, and A. Tengholm. (2005) "Feedback activation of phospholipase C via intracellular mobilization and store-operated influx of Ca²⁺ in insulin-secreting beta-cells". *J Cell Sci*. 118:4463-4471.
- Tomé, A.J.R. (1996) "Homeostasia do Cálcio Intracelular em Células Cromafins: Regulação por Activação de Canais Iónicos e Receptores Purinérgicos.". Vol. Mestre. Universidade de Coimbra. 131.
- Trube, G., P. Rorsman, and T. Ohno-Shosaku. (1986) "Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on the ATP-dependent K⁺ channel in mouse pancreatic beta-cells". *Pflugers Arch*. 407:493-499.
- Van den Bergh, V., N. Boens, F.C. De Schryver, M. Ameloot, P. Steels, J. Gally, M. Vincent, and A. Kowalczyk. (1995) "Photophysics of the fluorescent Ca²⁺ indicator Fura-2". *Biophys J*. 68:1110-1119.
- Venkatachalam, K., and C. Montell. (2007) "TRP channels". *Annu Rev Biochem*. 76:387-417.
- Wagner, T.F., A. Drews, S. Loch, F. Mohr, S.E. Philipp, S. Lambert, and J. Oberwinkler. (2010) "TRPM3 channels provide a regulated influx pathway for zinc in pancreatic beta cells". *Pflugers Arch*. 460:755-765.
- Wagner, T.F., S. Loch, S. Lambert, I. Straub, S. Mannebach, I. Mathar, M. Dufer, A. Lis, V. Flockerzi, S.E. Philipp, and J. Oberwinkler. (2008) "Transient receptor potential M3 channels are ionotropic steroid receptors in pancreatic beta cells". *Nat Cell Biol*. 10:1421-1430.
- Yesil, P., M. Michel, K. Chwalek, S. Pedack, C. Jany, B. Ludwig, S.R. Bornstein, and E. Lammert. (2009) "A new collagenase blend increases the number of islets isolated from mouse pancreas". *Islets*. 1:185-190.