



**UNICAMP**

**Instituto de Biologia**

**MECANISMOS IÔNICOS ENVOLVIDOS NA REGULAÇÃO  
DA SECREÇÃO DE INSULINA POR AGONISTAS  
MUSCARÍNICOS**

**SILVANA A. BORDIN SILVA**

**Campinas, 1995**

**Si38m**

**27446/BC**



Universidade Estadual de Campinas  
Instituto de Biologia  
Departamento de Fisiologia e Biofísica



# MECANISMOS IÔNICOS ENVOLVIDOS NA REGULAÇÃO DA SECREÇÃO DE INSULINA POR AGONISTAS MUSCARÍNICOS

por

SILVANA A. BORDIN SILVA

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da  
Universidade Estadual de Campinas para a  
obtenção do título de Doutor em Ciências  
Biológicas, área de Fisiologia e Biofísica

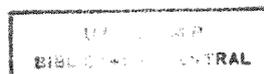
Esse exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato(a)  
*Silvana A. Bordin Silva*  
*Bordin de Silva*  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

09/06/95

Orientador: **Prof. Antônio Carlos Boschero**  
Co-orientador: **Prof. Antônio Ari Gonçalves**

*Boschero*

Campinas, 1995



Este trabalho foi realizado no Laboratório de Pâncreas Endócrino do Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, e no Laboratório de Biologia Celular e Genética, National Institute of Diabetes, Digestive and Kidney Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EUA. Sua execução teve apoio financeiro da Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e da Coordenação do Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

# CONTEÚDO

Abreviaturas, símbolos e simplificações .....	iii
<b>I. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
I.1. CONTROLE NERVOSO DA SECREÇÃO DE INSULINA .....	1
I.2. ESTIMULAÇÃO MUSCARÍNICA NA CÉLULA $\beta$ PANCREÁTICA....	3
I.3. FARMACOLOGIA DOS RECEPTORES MUSCARÍNICOS .....	7
I.4. CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DOS mAChRs .....	10
I.5. CANAIS DE POTÁSSIO NA CÉLULA $\beta$ PANCREÁTICA.....	13
I.6. MANUSEIO DO CÁLCIO .....	16
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
<b>III. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
III.A - MATERIAL .....	21
A.1 - Animais.....	21
A.2 - Aparelhagem.....	21
2.1. Sistema de Perfusão para medidas de secreção e fluxos iônicos.....	21
2.2. Sistema de perfusão para o registro eletrofisiológico.....	22
2.3. Sistema para medida do $Ca^{2+}$ citoplasmático.....	24
A.3 - Soluções.....	25
3.1. Solução para isolamento das ilhotas.....	25
3.2. Solução para incubação e perfusão das ilhotas.....	25
3.3. Solução para isolamento das células.....	25
3.4. Soluções para cultura, incubação e perfusão das células.....	26
A.4 - Reagentes.....	26
III.B - MÉTODOS .....	27
B.1 - Isolamento das ilhotas.....	27
1.1. Isolamento de ilhotas de camundongo por digestão enzimática.....	27
1.2. Isolamento de ilhotas de rato por digestão enzimática.....	27
1.3. Isolamento e cultura das células.....	28
1.4. Microdissecção de ilhotas de camundongo.....	29
B.2 - Secreção de insulina.....	29
2.1. Secreção estática de insulina.....	29
2.2. Secreção dinâmica de insulina.....	30
2.3. Radioimunoensaio.....	30
B.3 - Efluxo de radioisótopos.....	31
3.1. Marcação das ilhotas.....	31
3.1. Perfusão.....	31

B.4 - Estudo eletrofisiológico.....	32
4.1. Confeção dos microeletrodos.....	32
4.2. Registro eletrofisiológico.....	33
B.5 - Medidas do Ca <sup>2+</sup> citoplasmático.....	34
5.1. Incorporação do corante nas células.....	34
5.2. Microfluorimetria.....	34
B.6 - Expressão dos mAChRs.....	34
6.1. Extração de RNA total.....	34
6.2. Síntese do cDNA.....	35
6.3. Amplificação do cDNA por PCR.....	35
6.4. Detecção do produto da amplificação.....	36
B.7 - Análise dos Resultados.....	36
7.1. Cálculo do coeficiente de permeabilidade ao K <sup>+</sup> (P <sub>K</sub> ).....	36
7.2. Tratamento estatístico.....	37
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>39</b>
IV.1. ANÁLISE FARMACOLÓGICA.....	39
Resposta secretória de ilhotas de roedores a agonistas colinérgicos muscarínicos.....	39
IV.2. ANÁLISE FUNCIONAL.....	57
Dependência da glicose para a resposta estimulatória da OXO-M de ilhotas de roedores.....	57
Dependência do Ca <sup>2+</sup> extracelular.....	66
IV.3. ANÁLISE ELETROFISIOLÓGICA.....	77
IV.4. APÊNDICE.....	87
4.1. Expressão dos mAChRs.....	87
4.2. Medição do Ca <sup>2+</sup> citoplasmático.....	89
<b>V. DISCUSSÃO.....</b>	<b>93</b>
<b>VI. RESUMO E CONCLUSÕES.....</b>	<b>105</b>
<b>VII. SUMMARY.....</b>	<b>109</b>
<b>VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>113</b>

## ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIMPLIFICAÇÕES

ACh	— acetilcolina
AFDX 116	— [[2-[dietilaminometil]-1-piperidil]acetil]-5,11-dihidro-6H-pirido[2,3- <i>b</i> ][1,4]benzodiazepina-6-um
antisense	— sentido 5'-3' da fita (-) de DNA
ATP	— adenosina trifosfato
burst	— surtos de potenciais de ação
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	— concentração intracelular de cálcio
<sup>45</sup> Ca	— isótopo radiativo do <sup>40</sup> Ca <sup>2+</sup>
cAMP	— adenosina monofosfato cíclica
cDNA	— DNA complementar
ChTX	— caribdotoxina
CICR	— liberação de cálcio induzida por cálcio
CIF	— fator de influxo de cálcio
cpm	— contagens por minuto
CRAC	— corrente ativada pela liberação de cálcio
4-DAMP	— 4-difenilacetoxi-N-metilpiperidina metiodida
despolarização	— termo utilizado nas reduções do potencial de membrana da célula
DG	— diacilglicerol
dNTP	— deoxiribonucleotídeos
DTT	— DL-ditiotreitol
EGTA	— ácido etilenoglicol-bis (β-amietil eter) N,N,N',N' tetra-acético
F	— fluorescência
GLUT2	— transportador facilitativo de glicose tipo 2
Hepes	— ácido (N-[2-hidroxietil] piperazina-N'-[2-etanosulfônico])
indo-1/AM	— indo-1 acetoximetil éster
IP3	— trifosfato de inositol
K <sub>ATP</sub>	— canal de potássio sensível ao ATP
K <sub>Ca</sub>	— canal de potássio ativado por cálcio
M(1 a 4)	— subtipos de receptores muscarínicos caracterizados farmacologicamente
m(1 a 5)	— sub-espécies de proteínas identificadas e caracterizadas como pertencentes à família dos receptores muscarínicos
mAChR	— receptor muscarínico colinérgico

McN-A-343	— (M-clorofenilcarbamoiloxi)-2-cloreto de butiniltrimetilamonio
MMLV	— vírus de mieloleucemia de rato
mRNA	— RNA mensageiro
OXO-M	— oxotremorina-m
<i>p</i> -F-HHSiD	— <i>para</i> -fluor-hexahidro-sila-difenidol
PCR	— reação em cadeia da polimerase
PI	— fosfatidil inositol
$P_K$	— coeficiente de permeabilidade ao potássio
PKC	— proteína quinase C
PLC	— fosfolipase C
primer	— oligonucleotídeo que pareia com uma fita de DNA e delimita e inicia a reação em cadeia da polimerase
PTX	— toxina pertussis
$^{86}\text{Rb}$	— isótopo radioativo do $^{85}\text{Rb}^+$ , utilizado como substituto do $\text{K}^+$
sense	— sentido 5'-3' da fita (+) de DNA
SiHC	— hexa-hidro-sila-difenidol
spike	— pico isolado de voltagem, caracterizado como potencial de ação
TEA	— tetraetilamônio
Tris	— tris(hidroximetil) aminometano
VDCC	— canais de cálcio dependentes da voltagem

## I. INTRODUÇÃO

---

# I. INTRODUÇÃO

Dentre as diversas funções da insulina, certamente a mais importante consiste na regulação dos níveis plasmáticos de nutrientes, em especial da glicose. Por sua vez, a secreção de insulina pelas células  $\beta$  pancreáticas é diretamente controlada pelos sinais provenientes do metabolismo da glicose. Esta interdependência permite o ajuste, dentro de limites aceitáveis, das concentrações circulantes de nutrientes e do hormônio em questão. O sistema básico glicose-insulina pode ser modulado, dentre outros fatores, pela apropriada interação entre sinais metabólicos e neurais. O sistema neurovegetativo, através de sua divisão parassimpática, desempenha papel fundamental na regulação da secreção de insulina induzida por nutrientes.

## I.1. CONTROLE NERVOSO DA SECREÇÃO DE INSULINA

Há muito se sabe que a administração oral de glicose é um estímulo mais efetivo para a secreção de insulina do que a administração intra-venosa. A ingestão de carboidratos promove um aumento imediato no nível de insulina, que antecede o aumento nos níveis de glicose arterial (LOUIS-SYLVESTRE, 1976). A liberação de insulina no período pré-absortivo parece ser mediada por sinais conduzidos pela divisão parassimpática do Sistema Nervoso Central. Experimentos conduzidos em ratos demonstraram que uma dose única de glicose induz a atividade secretória de insulina, independentemente do estímulo metabólico pós-absortivo - denominada primeira fase da secreção (LOUIS-SYLVESTRE, 1978). Esta fase corresponde a um primeiro pico de secreção de latência muito curta, o qual é desencadeado a nível oral, por estímulo reflexo mediado pela ativação direta do nervo vago sobre a célula  $\beta$ . Como consequência da liberação de insulina reflexamente induzida, observa-se uma ligeira diminuição

nos níveis de glicose circulante, ocorrendo em média 1 min após a ingestão de açúcar. Em seguida observa-se um segundo pico - também pré-absortivo -, que só é mantido no caso de enchimento gástrico (LOUIS-SYLVESTRE, 1976), indicando, portanto, ser desencadeado a nível gastrointestinal. De fato, quase 50% da insulina secretada no período pós-prandial imediato (primeiros 6 min) é dependente da estimulação colinérgica (BERTHOUD, 1984). Após a primeira fase, os níveis de insulina plasmática aumentam paralelamente a elevação da concentração de glicose. Utilizando [<sup>14</sup>C] glicose, STEFFENS (1969) comprovou que a segunda fase é devida a absorção de glicose pelo trato gastrointestinal.

A importância fisiológica dos sinais desencadeadores da fase pré-absortiva sobre a atividade da ilhota de Langerhans é promover uma resposta antecipada da secreção, evitando perturbações maiores da concentração de glicose e de outros nutrientes ingeridos, prevenindo assim a hiperglicemia. Se o aumento da concentração de insulina ocorresse somente após a entrada de glicose na circulação, uma quantidade maior de insulina seria necessária para corrigir a grande variação da glicemia resultante da absorção.

Está bem documentado que a ilhota pancreática da maioria dos vertebrados recebe inervação de ambas as divisões do sistema nervoso autônomo (SMITH & PORTE, 1976). Uma grande variedade de modelos experimentais, dentre eles estimulação elétrica central e periférica, administração de drogas, lesões centrais ou secção das vias nervosas pancreáticas apontam o hipotálamo como o centro de regulação homeostática dos níveis de glicose sanguínea (BENZO, 1982; HELMAN et al., 1982). A nível central, o hipotálamo ventro medial se comporta como centro simpático, exercendo tônus inibitório sobre a atividade da célula  $\beta$  via fibras adrenérgicas dos nervos esplâncnicos, enquanto que a área hipotalâmica lateral estimula a secreção de insulina através de fibras colinérgicas do nervo vago, particularmente quando a secreção ocorre em antecipação às refeições.

Os terminais parassimpáticos entram no pâncreas junto com as artérias, terminando nos gânglios intrapancreáticos, originando as fibras pós ganglionares que alcançam as ilhotas (BERTHOLD et al., 1990). Dentro das ilhotas, estruturas semelhantes a sinapses demonstram a existência de uma estreita relação neural com as células da ilhota, tendo como neurotransmissor a acetilcolina (ACh) (ORCI et al., 1973). Em diferentes espécies de mamíferos, a estimulação elétrica do nervo vago produz aumento na concentração plasmática de insulina (MILLER, 1981); a administração de atropina - um bloqueador parassimpático - inibe completamente a secreção de insulina em algumas espécies e parcialmente em outras (AHRÉN et al., 1990), sugerindo que a resposta insulínica vagal pode ter um componente não colinérgico. Entretanto, a estimulação da secreção de insulina após a ativação vagal é evidente em todas as espécies. ACh e carbacol estimulam a secreção de insulina "in vivo" e "in vitro", por um mecanismo que é inibido por antagonistas colinérgicos (MILLER, 1981; BERTHOUD & JEANRENAUD, 1982; OTSUKI et al., 1985). Esta observação sugere que os nervos colinérgicos regulam a secreção de insulina pelo mecanismo "clássico" de estimulação das fibras pós gangliônicas, ativando receptores muscarínicos localizados na membrana da célula alvo.

## **I.2. ESTIMULAÇÃO MUSCARÍNICA NA CÉLULA $\beta$ PANCREÁTICA**

As ilhotas de Langerhans estão equipadas com receptores colinérgicos muscarínicos (mAChRs) que apresentam características de ligação a antagonistas e população de receptores semelhantes aquelas encontradas em tecidos extrapancreáticos (MALAISSE et al., 1985). Estudos funcionais e com radioligantes demonstraram que a estimulação colinérgica potencializa a secreção de insulina através da ativação dos mAChRs, presentes na membrana da célula  $\beta$ . HENQUIN e NENQUIN (1988), utilizando antagonistas inespecífico (atropina) e

específicos para os subtipos M1 e M2 (pirenzepina e AFDX 116, respectivamente), observaram que a atropina é aproximadamente 300 vezes mais potente que a pirenzepina na inibição da resposta secretória induzida pela ACh, concluindo assim que a célula  $\beta$  não possui sítio de ligação para o subtipo M1. Posteriormente, utilizando o radioligante [ $^3$ H]N-metilscolamina (antagonista não seletivo), VERSPOHL e cols (1990) registraram maior afinidade para antagonistas não seletivos (atropina e SiHC) do que para ligantes específicos dos subtipos M1 (pirenzepina) e M2 (metoctramina). Entretanto, a análise das curvas de competição entre diferentes ligantes indica que existem mais de um sítio de ligação muscarínico. Baseados na potência de inibição dos diferentes antagonistas, estes autores sugerem que, dentre os 4 subtipos de mAChRs descritos, somente o subtipo M3 está presente na membrana da célula  $\beta$ .

Qualquer que seja o subtipo de mAChR presente, a estimulação muscarínica exerce ação moduladora sobre a secreção de insulina iniciada pelo estímulo metabólico. O entendimento dos eventos moleculares que mediam a resposta muscarínica requer um conhecimento profundo dos processos celulares envolvidos na estimulação da secreção pela glicose.

Embora o mecanismo sensor da glicose não esteja completamente elucidado, sabe-se que o desencadeamento da secreção é resultante do encadeamento de eventos metabólicos e bioelétricos. As modificações na permeabilidade da membrana ao  $K^+$  são consideradas etapas primordiais no processo insulino-secretório. Em outras palavras, a entrada da glicose na célula  $\beta$ , através do transportador de membrana GLUT2 (BELL et al., 1993), aumenta a pressão de substrato para a cadeia respiratória, elevando a geração de ATP e a relação ATP/ADP. Estudos eletrofisiológicos e com radioisótopos mostraram que o metabolismo da glicose provoca diminuição na permeabilidade da membrana ao  $K^+$  (ATWATER et al., 1982; BOSCHERO et al., 1977), devido ao bloqueio de

canais de  $K^+$  sensíveis ao ATP ( $I_{K(ATP)}$ ), induzindo a despolarização da membrana plasmática (COOK & HALES, 1984; PETERSEN & FINDLAY, 1987; ASHCROFT & RORSMAN, 1989). A despolarização promove a abertura de canais de  $Ca^{2+}$  dependentes da voltagem (VDCCs) (DEAN & MATHEWS, 1968; 1970; ATWATER & BEIGELMAN, 1976; SMITH et al., 1989a), que permite o influxo maciço do íon para o interior da célula. Este influxo eleva a concentração de  $Ca^{2+}$  no citosol ( $[Ca^{2+}]_i$ ), viabilizando assim a participação do cátion em reações intracelulares, inclusive naquelas envolvidas no processo de exocitose dos grânulos secretórios (WOLLHEIM & SHARP, 1981).

Em resumo, a secreção de insulina é estritamente dependente de 2 processos distintos - mas intimamente relacionados - e que são, em última análise, causa e efeito da despolarização celular: (1) o metabolismo da glicose; e (2) o aumento na  $[Ca^{2+}]_i$ . Este modelo explica, embora parcialmente, a estimulação da secreção de insulina induzida por nutrientes.

Alguns aspectos controversos, relativos a dependência de glicose na despolarização celular, permanecem ainda sob intensa investigação. O ponto central da questão é que a alta sensibilidade dos  $K_{ATP}$  é inconsistente com a elevada concentração citosólica de ATP na célula  $\beta$  (RIBALET & CIANI, 1987). Além disso, a glicose é capaz de promover secreção independentemente da despolarização pelo bloqueio dos  $K_{ATP}$  (GEMBAL et al., 1992). Para explicar estas discrepâncias, foi proposto que o metabolismo da glicose gera outros sinais intracelulares, quer a nível citosólico (PRENTKI et al., 1992; CHEN et al., 1994; DUKES et al., 1994), quer a nível mitocondrial (GEMBAL et al., 1994; KELLEY et al., 1994).

A estimulação muscarínica, por sua vez, promove um aumento substancial na  $[Ca^{2+}]_i$ . Esta resposta foi observada em estudos com  $^{45}Ca$  (NENQUIN et al., 1984; MATHIAS et al., 1985a), e por medições diretas no  $Ca^{2+}$  livre com

indicadores fluorescentes (GRAPENGISSER et al., 1989; WANG et al., 1992). Nas células  $\beta$ , a exemplo de outras (BERRIDGE & IRVINE, 1984), a ocupação do receptor muscarínico pode induzir a formação de  $IP_3$ , que age como mensageiro intracelular na mobilização de  $Ca^{2+}$  de estoques não mitocondriais. A estimulação muscarínica poderia satisfazer, neste ponto, o requerimento de  $Ca^{2+}$  para o desencadeamento da secreção de insulina. Entretanto, o efeito insulínico da estimulação muscarínica depende da presença de  $Ca^{2+}$  (e também de glicose) extracelular (WOLLHEIM et al., 1980; GARCIA et al., 1988).

Vários estudos demonstram que a ACh, na presença de concentrações subliminares de glicose, despolariza a membrana da célula  $\beta$  e inicia a atividade elétrica e a secreção de insulina. Em concentrações estimulatórias do açúcar, a ACh prolonga a duração dos surtos de potenciais de ação (*bursts*) e reduz os intervalos silentes - ou seja, aumenta a fração do tempo de atividade elétrica (GAGERMAN et al., 1978; COOK et al., 1981; HENQUIN et al., 1988; SANTOS & ROJAS, 1989). Dependendo da concentração do agonista, usualmente se observa uma rápida e sustentada despolarização, a qual se mantém a nível do platô, com disparos sucessivos de potenciais de ação (GAGERMAN et al., 1978; COOK et al., 1981). Este efeito da ACh sobre a atividade elétrica só foi observado após a despolarização prévia não só pela glicose, como também por uma variedade de agentes estimulatórios (HERMANS et al., 1986; 1987, GILON et al., 1994), indicando assim que a ACh não é capaz de despolarizar a membrana a um nível suficiente para produzir atividade elétrica.

Assim, é consenso geral que a estimulação muscarínica é potencializadora e não iniciadora da secreção de insulina, e que a ação despolarizante da ACh é insuficiente para ativar canais de  $Ca^{2+}$  a partir do potencial de repouso.

Devido a importância da ação potencializadora da estimulação muscarínica sobre a secreção de insulina, alguns grupos têm dirigido a atenção para os

mecanismos iônicos envolvidos na ação despolarizante da ACh. HENQUIN e cols (1988) verificaram que, na ilhota de camundongo, a ausência de  $\text{Na}^+$  extracelular impede a despolarização da membrana da célula  $\beta$ , bem como a captação do  $^{45}\text{Ca}$  induzida por ACh. Na presença de  $\text{Na}^+$  extracelular, a ACh promove a entrada do íon na célula, efeito este observado pela análise da captação de  $^{22}\text{Na}$  (HENQUIN et al., 1988) e por espectrofluorimetria utilizando corante intracelular de  $\text{Na}^+$  (GILON & HENQUIN, 1993). Por sua vez, SANCHEZ-ANDRÉS e cols. (1988), estudando a relevância do  $\text{Ca}^{2+}$  no desenvolvimento da resposta secretória frente a estimulação muscarínica, sugeriram que esta é capaz de induzir a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  na fase estimulatória inicial, cuja importância é fundamental para a ativação do mecanismo de secreção. Finalmente, SANTOS e ROJAS (1989) verificaram que o efeito excitatório da ACh está relacionado ao aumento na resistência da membrana, que poderia refletir uma redução na permeabilidade catiônica da célula. Assim, 3 mecanismos iônicos foram propostos para explicar a despolarização induzida pela estimulação muscarínica: (1) aumento na permeabilidade ao  $\text{Na}^+$  (HENQUIN et al., 1988); aumento na permeabilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  (SANCHEZ-ANDRÉS et al., 1988); e , (3) redução na permeabilidade ao  $\text{K}^+$  (SANTOS & ROJAS, 1989).

Contudo, os estudos farmacológicos e eletrofisiológicos da estimulação muscarínica na célula  $\beta$  não são completamente conclusivos, já que até o momento não foi caracterizado, sob o ponto de vista molecular, o tipo de receptor muscarínico presente, e tampouco a condutância envolvida nas alterações da atividade elétrica.

### **I.3. FARMACOLOGIA DOS RECEPTORES MUSCARÍNICOS**

Em 1914, Sir Henry DALE descreveu a base para a definição clássica dos receptores de ACh muscarínicos e nicotínicos: receptores muscarínicos são

seletivamente ativados por muscarina e bloqueados por atropina, enquanto que receptores nicotínicos são ativados por nicotina e bloqueados por curare. Hoje, sabe-se que a classificação dos receptores colinérgicos não é tão simples. Existem múltiplas variantes dos receptores muscarínicos e nicotínicos pertencentes a superfamílias distintas de genes, e a única propriedade que compartilham é a ativação pelo mesmo ligante, o neurotransmissor ACh.

Um grande número de ações da acetilcolina é mediada por receptores sensíveis ao alcalóide muscarina. Estudos em diferentes tecidos revelaram que estes receptores estão envolvidos na regulação de uma série de respostas fisiológicas - inibitórias ou excitatórias-, mediadas pela ativação de proteínas ligadas ao nucleotídeo guanina ( proteínas G) (GILMAN, 1987).

Os subtipos de receptores muscarínicos foram inicialmente identificados pelas propriedades de ligação ao antagonista pirenzepina. Baseando-se na afinidade por este antagonista, HAMMER e cols. (1980) classificaram em receptores de alta afinidade (M1) e baixa afinidade (M2). O subtipo M2 foi posteriormente subdividido em M2 cardíaco (M2 $\alpha$ ) e M2 glandular (M2 $\beta$  ou M3), respectivamente de acordo com as características de ligação aos antagonistas AF-DX116 (DOODS et al., 1986; GIACHETTI et al., 1986) e *p*-F-HHSiD (LAMBRECHT et al., 1988). Atualmente, são reconhecidos 4 subtipos farmacologicamente distintos de mAChRs (vide Tabela I). Entretanto, algumas características intrínsecas destes receptores complicam a interpretação direta dos estudos farmacológicos e funcionais. Primeiro, as diferenças de afinidade dos vários subtipos para um antagonista seletivo é muito pequena, quando comparada a outros tipos de receptores de membrana (WATSON & GIRDLESTONE, 1993). Além disto, não são conhecidos agonistas muscarínicos que atuem com alto grau de seletividade sobre um subtipo particular de mAChR. Segundo, a seletividade de um antagonista parece ser diferente para os vários tecidos estudados

(MITCHELSON, 1988), os quais geralmente possuem mais de um subtipo de mAChR (MAEDA et al., 1988). Terceiro, a ligação de um antagonista competitivo ao mAChR pode ser modificada por moduladores alostéricos, que possuem potências de inibição distintas para cada subtipo (LEE & EL-FAKAHANY, 1991). Por último, estudos funcionais indicam que a ocupação do receptor por agonistas é dependente da formação do complexo: agonista - mAChR - proteína G - GTP, que determina o grau de afinidade do agonista pelo receptor (HULME et al., 1990).

Tabela I. Classificação dos mAChRs (WATSON & GIRDLESTONE, 1994)

<b>Nomenclatura</b>	<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>	<b>M4</b>
Agonistas seletivos	-	-	-	-
Antagonistas seletivos	pirenzepina telenzepina	metoctramina AFDX116	HHSiD p-F-HHSiD	tropicamida
Efetores Predominantes	IP <sub>3</sub> /DG	cAMP (↓) canal de K <sup>+</sup>	IP <sub>3</sub> /DG	cAMP (↓)
Gene	m1	m2	m3	m4

Considerando estes aspectos, a caracterização farmacológica e funcional dos mAChRs tem se mostrado bastante confusa. A definição dos subtipos desta família de receptores baseada somente no sistema de sinalização intracelular também é problemática, já que um único subtipo pode acoplar-se a diferentes proteínas G (SCHIMERLIK, 1990). A elucidação das estruturas moleculares dos mAChRs, através de técnicas de DNA recombinante, tornou mais fácil o entendimento da heterogeneidade farmacológica e funcional dos receptores muscarínicos.

#### **I.4. CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DOS mAChRs**

Até o momento, foram clonados 5 sub-espécies diferentes de mAChRs (HULME et al., 1990; WESS, J., 1993). As formas farmacologicamente distintas desta família de receptores foram classificadas nos subtipos M1, M2, M3 e M4, baseadas nas diferenças de afinidade por antagonistas (BONNER, 1989).

As estruturas primárias das sub-espécies de mAChRs, designadas como m1, m2, m3, m4 e m5 foram elucidadas pela clonagem e análise das sequências de DNA genômico e de cDNA. As sub-espécies m1, m2, m3 e m4 correspondem respectivamente aos receptores definidos como M1, M2, M3 e M4, expressos no cérebro e tecidos periféricos (HULME et al., 1990). A sub-espécie m5 não foi até o momento reconhecida como subtipo farmacológico, embora tenha sido identificada e caracterizada pela clonagem de biblioteca de cDNA de tecido cerebral (BONNER et al., 1988).

São duas as respostas celulares mais importantes relacionadas a estimulação muscarínica: a hidrólise de fosfatidil inositol (PI) e a inibição da adenilato ciclase. Estudos com linhagens celulares transfectadas com genes codificadores dos mAChRs revelaram que os AChRs estão acoplados a proteínas G sensíveis ou insensíveis a toxina pertussis (PTX). As proteínas G sensíveis a PTX podem acoplar indiscriminadamente com qualquer um dos subtipos muscarínicos, e são pouco eficientes na estimulação da hidrólise de PI. Ao contrário, proteínas G insensíveis a PTX acoplam somente às espécies m1, m3 e m5. Assim, sob o ponto de vista funcional, é razoável dividir os receptores muscarínicos em 2 grupos. As espécies m1, m3 e m5 são agrupadas pelo acoplamento preferencial a proteínas G insensíveis a PTX, mediadoras do metabolismo de fosfolípides pela estimulação da fosfolipase C. As espécies m2 e m4 pertencem ao grupo de receptores que possuem relativa seletividade a

proteínas G sensíveis a PTX, inibitórias da adenilato ciclase (ASHKENASI et al., 1989).

O receptor muscarínico, assim como a grande maioria das proteínas de membrana, apresenta dificuldades experimentais para a determinação direta da sua estrutura tridimensional. Modelos computacionais, baseados na analogia de proteínas com arranjo espacial já conhecido, permitiram a predição das estruturas secundária e terciária da proteína, a partir de sua sequência de aminoácidos (HULME et al., 1991; BRANN et al. 1993). Este tipo de análise indicou que os receptores de membrana ligados a proteínas G - dentre eles os AChRs - poderiam eventualmente adotar uma topologia na membrana composta por 7 segmentos transmembrana em  $\alpha$  hélice, ligados por 3 alças citoplasmáticas (i1, i2 e i3) e 3 alças extracelulares, com sequência N-terminal extracelular e cauda C-terminal intracelular (i4) (HENDERSON & UNWIN, 1975; HENDERSON et al., 1990).

Dentre os 4 domínios intracelulares propostos (i1 a i4), as alças i1 e i2 são moderadamente bem conservadas, enquanto que a alça i3 é estruturalmente única para cada subtipo de receptor. A região i4 (C-terminal) é bastante similar entre os subtipos m2 e m4 ou m1 e m3. A análise das sequências dos 5 subtipos de mAChRs, particularmente as 2a. e 3a. alças intracelulares, permitiu correlacionar diferenças nas sequências primárias com a especificidade à proteínas G (HULME et al., 1990). É interessante notar que os 18 primeiros aminoácidos da alça i3 dos receptores m2 e m4 compartilham alto grau de homologia, enquanto que esta mesma região nos subtipos m1, m3 e m5 é praticamente idêntica nas 3 proteínas (HULME et al., 1990). Com base nestas observações, foi proposto que, nos receptores m1, m2 e m3, a identidade desta região é necessária para a interação específica com a proteína G insensível a PTX, enquanto que qualquer grau de homologia menor que a idêntica determinará a interação com o sistema da adenilato ciclase. A construção de receptores quiméricos indicou que a alça i3 é

suficiente para determinar a seletividade ao sistema de transdução intracelular, mas não as propriedades de ligação aos antagonistas (KUBO et al., 1988).

Com relação a este aspecto, acredita-se que drogas que interagem com os mAChRs têm seu sítio de ligação localizado em regiões hidrofóbicas transmembrana. Baseando-se no fato de que estas drogas têm carga positiva, é provável que uma parte importante da energia de interação do ligante ao receptor seja proveniente do pareamento iônico com um resíduo aniônico. De fato, os mAChRs contêm vários resíduos conservados de ácido aspártico nos 2º e 3º domínios transmembrana, que são, portanto, participantes potenciais na ligação de grupos catiônicos dos agonistas e antagonistas muscarínicos (HULME et al., 1991; WESS, 1993). Além disto, mutações de ponto realizadas em outros resíduos dos segmentos transmembrana (p.e., substituição dos aminoácidos tirosina e treonina) resultaram em efeitos diferenciados sobre o acoplamento de ligantes, indicando assim que diferentes sub-sítios estão envolvidos na ligação de agonistas ou antagonistas (WESS et al., 1991).

Os subtipos de mAChRs não diferem somente em suas estruturas moleculares, mas também nos processos aos quais se acoplam para o desencadeamento da resposta celular. A excitabilidade celular é um dos eventos que pode ser modulado pela ativação dos mAChRs, por ação direta de proteínas G sobre canais iônicos, ou indireta, através da modulação de enzimas envolvidas na síntese de 2º mensageiros. Exemplos de modulação incluem a ativação de condutâncias de K<sup>+</sup> retificadoras, diretamente via proteínas G (KRAPIVINSKY et al., 1995) ou indiretamente, pela redução do cAMP celular (RUDY, 1988; INOUE & YOSHII, 1992). Teoricamente, os subtipos m1, m3 e m5 poderiam inibir estas correntes de K<sup>+</sup>, por um mecanismo indireto envolvendo aumento do Ca<sup>2+</sup> livre intracelular, ativação da proteína quinase C (PKC) e consequente fosforilação destes canais (JONES, 1993).

Outro efeito dos mAChRs mediado por 2º mensageiro é a ativação de condutâncias ao  $K^+$  dependentes de  $Ca^{2+}$ , como os  $I_{BK(Ca)}$ . Estas condutâncias são ativadas indiretamente pela estimulação da fosfolipase C (PLC), que hidrolisa fosfolípides de membrana formando trifosfato de inositol ( $IP_3$ ) e diacilglicerol (DG).  $IP_3$  promove liberação de  $Ca^{2+}$  de estoques intracelulares, enquanto que DG transloca e ativa proteínas quinase presentes no citosol. Os subtipos m1, m3 e m5 são candidatos óbvios para esta resposta, devido às suas características de estimuladores do metabolismo de fosfolípides de membrana (INOUE & YOSHII, 1992).

Outras correntes iônicas reguladas pelos receptores muscarínicos são ainda objeto de investigação. Evidências experimentais indicam que o subtipo m2 pode inibir condutâncias ao  $Ca^{2+}$  sensíveis a voltagem, e ativar a corrente de  $K^+$  retificadora anômala ( $I_{KV}$ ) (INOUE & YOSHII, 1992; JONES, 1993) presentes na membrana das células cardíacas. Os receptores m1 e m3 foram descritos como inibitórios da corrente muscarínica de  $K^+$  ( $I_M$ ) (BROWN et al., 1989), enquanto que o subtipo m4 parece mediar a atividade de uma corrente catiônica não seletiva, por um mecanismo ainda não elucidado (JONES, 1993).

## **I.5. CANAIS DE POTÁSSIO NA CÉLULA $\beta$ PANCREÁTICA**

Durante os últimos 20 anos, os estudos eletrofisiológicos convencionais utilizando eletrodos intracelulares forneceram fundamentação experimental sólida para as teorias de fluxo de corrente através da membrana, durante o repouso e a atividade celular. Na célula  $\beta$  pancreática, tanto o potencial de membrana como a atividade elétrica são determinados pela distribuição do íon  $K^+$  entre os meios intra e extracelular (MEISSNER et al., 1978; ATWATER et al., 1978). Na ausência de glicose, a célula  $\beta$  é eletricamente inativa, e o potencial de repouso é determinado principalmente pela condutância ao  $K^+$  sensível ao ATP (RORSMAN

& TRUBE, 1985; ASHCROFT & RORSMAN, 1989). Outras condutâncias, entretanto, participam na regulação das várias fases da atividade elétrica: despolarização, geração dos potenciais de ação, repolarização e duração dos *bursts* e da fase silente. A técnica de registro eletrofisiológico com eletrodo intracelular é bastante eficiente para a definição das correntes iônicas macroscópicas mas, por suas características intrínsecas, é incapaz de fornecer informações diretas sobre as permeabilidades envolvidas nos eventos a nível microscópico. Com o advento da técnica do *patch clamp*, os estudos da atividade de canais iônicos isolados permitiram a identificação e caracterização de diferentes tipos de condutâncias na membrana da célula  $\beta$ .

*Delayed rectifier K<sup>+</sup> channel* ( $I_{KV}$ ): Foram descritas correntes retificadoras de saída, seletivas ao  $K^+$ , em células  $\beta$  de diferentes espécies de mamíferos e linhagens de células secretoras de insulina (ASHCROFT & RORSMAN, 1989).  $I_{KV}$  se ativa com certo atraso após a despolarização da membrana. A inativação pode ser lenta ou ocorrer somente após a repolarização da membrana. TEA, quinina e *forskolin* bloqueiam a atividade dos  $I_{KV}$ . Acredita-se que a ativação destes canais é responsável - ao menos em parte - pela repolarização dos potenciais de ação (RUDY, 1988).

*A channel (transient outward current)* ( $I_A$ ): A corrente  $I_A$  é ativada pela despolarização da membrana consecutiva a um período de hiperpolarização. Difere dos  $I_{KV}$  quanto a cinética de ativação e inativação; no entanto, estes dois tipos são funcional e estruturalmente relacionados, podendo coexistir numa mesma célula (RUDY, 1988). SMITH e cols. (1989b) descreveram pela primeira vez estes canais na célula  $\beta$ , sugerindo uma possível contribuição do bloqueio destes canais no componente lento

da despolarização que se segue a repolarização ao final de cada *burst*, assim como no potencial limiar para a atividade de *bursts*.

***ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel*** ( $K_{ATP}$  ou  $I_{K(ATP)}$ ): O aumento na concentração intracelular de ATP inibe a abertura deste canal, dependendo da razão entre  $[ATP]_i : [ADP]_i$ . Pode ser regulado por  $Mg^{2+}$ , nucleotídeos de piridina e pelo pH intracelular. Os bloqueadores seletivos mais conhecidos são as sulfoniluréias tolbutamida e glibenclamida; outros, não seletivos, incluem quinina, TEA e anestésicos locais. O ativador mais efetivo do  $K_{ATP}$  é a diazoxida. Estes canais constituem o elo entre o metabolismo e a excitabilidade celular. Na célula  $\beta$ , os  $K_{ATP}$  abertos determinam o potencial de repouso; a elevação no nível de ATP, resultante do metabolismo da glicose, conduz a despolarização da membrana, comprovando assim a participação destes canais também na atividade elétrica celular (COOK & HALES, 1984; PETERSEN & FILDLAY, 1987; ASHCROFT & RORSMAN, 1989).

***High conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel*** ( $K_{Ca}$ ,  $I_{BK(Ca)}$  ou maxi-K): Na célula  $\beta$ , os  $K_{Ca}$  têm propriedades semelhantes àqueles descritos em outros tecidos, ou seja, se apresentam fechados em potenciais de membrana negativos, e se abrem durante a despolarização. A probabilidade de abertura dos maxi-K é aumentada pela elevação na concentração citosólica de  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_i$  entre 0,1 e 10  $\mu M$ ) ou pela despolarização da membrana celular, em condições de  $[Ca^{2+}]_i$  constante. Devido a sua alta sensibilidade ao  $Ca^{2+}$ , postulou-se que o  $K_{Ca}$  funciona como um mecanismo de *feedback* negativo no acoplamento estímulo-secreção, onde sua ativação tende a repolarizar a membrana, promovendo assim o fechamento dos VDCCs (ATWATER, et al., 1983). Entretanto, foi demonstrado recentemente que o bloqueio seletivo desta permeabilidade

não altera o padrão de atividade elétrica característica da estimulação pela glicose, colocando em dúvida a participação dos  $K_{Ca}$  na repolarização da membrana ao final dos *bursts* (KUKULJAN et al., 1991).

## I.6. MANUSEIO DO CÁLCIO

A secreção de insulina pela célula  $\beta$  pancreática é um processo essencialmente regulado pelo íon  $Ca^{2+}$ . Um grande número de evidências, predominantemente baseadas em medições de fluxo de  $^{45}Ca$  e atividade elétrica, apoiam a teoria da secreção dependente da atividade do  $Ca^{2+}$  citosólico (WOLLHEIM & SHARP, 1981). Observações iniciais mostraram que a atividade secretória requer a presença de  $Ca^{2+}$  externo; em presença de glicose a célula  $\beta$  é capaz de reter  $^{45}Ca$  na ilhota pancreática (CURRY et al., 1968; MALAISSE-LAGAE & MALAISSE, 1971). Este efeito é inibido pelos bloqueadores de canais de  $Ca^{2+}$  (HERMANS & HENQUIN, 1989). A captação de  $^{45}Ca$  é aumentada não somente por secretagogos nutrientes, como também por outros estimuladores da secreção - p.e., ACh (WOLLHEIM & SHARP, 1981).

A entrada de  $Ca^{2+}$  no citosol depende de alterações na permeabilidade da membrana celular. Em presença de glicose a célula  $\beta$  produz *bursts* característicos de potenciais de ação (*spikes*), após a despolarização da membrana a -40 mV (DEAN & MATHEWS, 1968; ATWATER et al., 1980). Estes *spikes*, observados durante o platô de despolarização (denominado fase ativa), representam potenciais de ação de  $Ca^{2+}$  decorrentes do influxo do íon através dos VDCCs (RORSMAN et al., 1988). O término dos potenciais de ação ocorre após a inativação destas correntes de  $Ca^{2+}$ , mediada pelo potencial de membrana e, principalmente, pela  $[Ca^{2+}]_i$  (RIBALET & BEIGELMAN, 1890; PLANT, 1988).

O influxo de  $Ca^{2+}$  parece ser a fonte principal do íon para o aumento da atividade citosólica de  $Ca^{2+}$ . Entretanto, a liberação de  $Ca^{2+}$  por frações

subcelulares - essencialmente o retículo endoplasmático - também tem papel importante na atividade secretória da célula  $\beta$ . A estimulação muscarínica mobiliza  $\text{Ca}^{2+}$  estocado através da ativação de receptores intracelulares sensíveis ao  $\text{IP}_3$  (WOLLHEIM & BIDEN, 1986), gerado na hidrólise de fosfolípides da membrana. A saída de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo induzida por agentes colinérgicos não é, entretanto, suficiente para estimular a exocitose dos grânulos de insulina, visto que a secreção é abolida na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (WOLLHEIM & SHARP, 1980).

A glicose também é capaz de mobilizar  $\text{Ca}^{2+}$  de estoques intracelulares, porém de forma distinta daquela regulada pelo  $\text{IP}_3$ . Um novo mecanismo, recentemente proposto por ROE e cols (1994), prediz que a liberação intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  induzida por glicose é dependente da despolarização da membrana plasmática, mediada pelo influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Na}^+$ , e que provavelmente envolve o sistema CICR (*Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release*), bastante conhecido em outros tecidos (PUTNEY, 1986; 1990) e também descrito na célula  $\beta$  (ISLAM et al., 1992).

A extrusão do  $\text{Ca}^{2+}$  do citosol é basicamente regulada pela atividade de 3 sistemas carreadores: (1) a enzima  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -adenosina trifosfatase ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, ou SERCA), presente no retículo endoplasmático (WOLF et al., 1988; ROE et al., 1994); (2) a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase sensível a calmodulina (PMCA), presente na membrana citoplasmática (PERSHADSINGH et al., 1980); e, (3) o contratransporte  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  (HERCHUELZ & LEBRUN, 1993), também presente na membrana plasmática. O balanço entre os sistemas responsáveis pelo influxo e efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  do citosol determina a extensão das alterações na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  e, por consequência, a atividade secretória da célula  $\beta$  pancreática.

## **II. OBJETIVOS**

---

## II. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

1. Definir o(s) subtipo(s) de mAChRs presente(s) nas ilhotas pancreáticas utilizando novos agentes farmacológicos, bem como técnicas de Biologia Molecular.
2. Estudar os mecanismos celulares - em particular os movimentos de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{K}^+$  - envolvidos na estimulação da atividade elétrica e secretória de células  $\beta$  pelo agonista muscarínico oxotremorina-M (OXO-M).

### **III. MATERIAL E MÉTODOS**

---

## **III. MATERIAL E MÉTODOS**

### **III.A - MATERIAL**

#### **A.1. - Animais.**

Para o estudo eletrofisiológico foram utilizados camundongos com idade de 6 a 20 semanas, cepa SHD, provenientes do biotério do "National Institutes of Health" (Bethesda, Maryland, USA). Nos experimentos de efluxo de radioisótopos foram utilizados camundongos da cepa Swiss, provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (Campinas, SP). Para as análises do cálcio citoplasmático e de expressão dos mAChRs foram utilizados ratos albinos com idade de 10 a 16 semanas, cepa Wistar, provenientes do biotério do "National Institutes of Health". A secreção de insulina foi analisada utilizando-se ilhotas de camundongos e ratos, provenientes de ambos biotérios.

Antes de sua utilização, os animais foram mantidos em regime claro-escuro (12:12 hs), com água e ração fornecidas "ad libitum".

#### **A.2. - Aparelhagem.**

##### **2.1. - Sistema de Perfusão para medidas de secreção e fluxos iônicos.**

O sistema de perfusão consistiu de (1) um banho-maria, mantido a temperatura constante por meio de um termostato; (2) uma bomba peristáltica de 4 canais, e; (3) 4 câmaras de perfusão. O banho-maria, mantido a 37°C, continha os frascos com as soluções e as câmaras de perfusão. As soluções foram continuamente borbulhadas com carbogênio (95% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub>), para manutenção

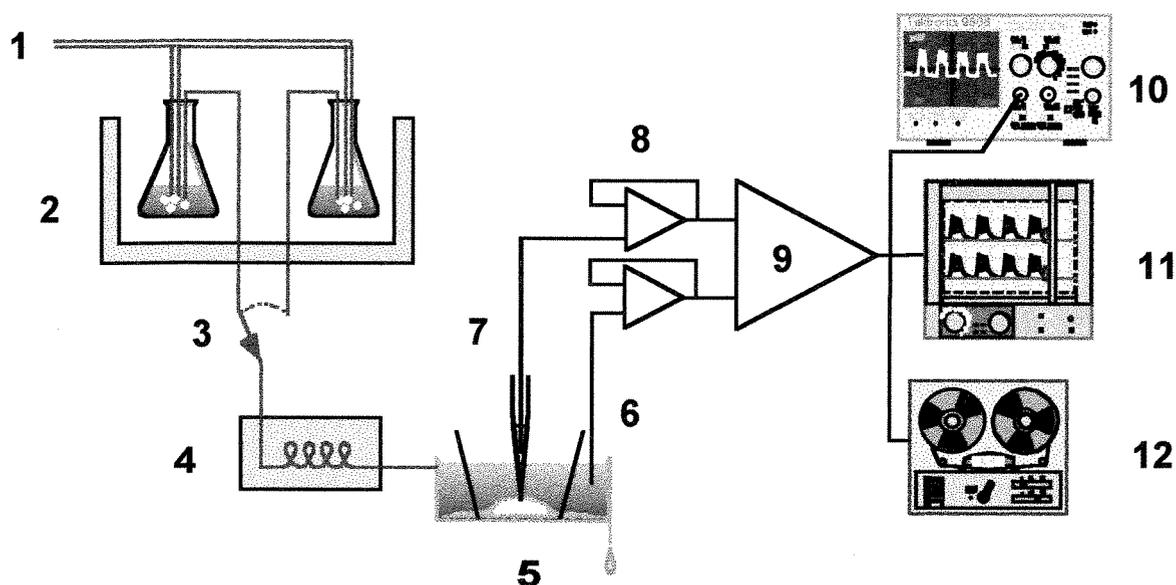
do pH em 7,4. A bomba peristáltica foi conectada às soluções e às câmaras de perfusão por meio de tubos *Tygon*, de dimensões tais que permitiram manter a taxa de fluxo em 1,2 ml/min e 1,8 ml/min, respectivamente para os experimentos de secreção e de efluxo de radioisótopos. A base das câmaras foi forrada com filtros de acetato de celulose (SCWPO1300, 8  $\mu$ m, Millipore, França), sobre os quais as ilhotas foram depositadas. Válvulas de 2 vias permitiram alterar a procedência das soluções perfusoras, provenientes dos diferentes recipientes. O espaço morto entre as válvulas e a extremidade das câmaras foi devidamente computado na apresentação dos resultados.

## **2.2. - Sistema de perfusão para o registro eletrofisiológico.**

A figura 1 ilustra o sistema de perfusão utilizado nos registros eletrofisiológicos. Os frascos contendo o perfusato foram mantidos em banho maria a 39 °C e ligados à câmara de perfusão por tubos de polietileno. A perfusão da solução foi feita por gravidade, equivalendo a uma taxa de efluxo de 1,5 ml/min. Uma válvula de três vias, montada próxima a entrada da câmara de perfusão, permitiu a pré lavagem do sistema antes da troca de soluções na câmara, reduzindo-se assim o espaço morto a 175  $\mu$ l. A válvula foi conectada à câmara de perfusão com um tubo de polietileno, inserido em um bloco de alumínio aquecido, cuja temperatura foi controlada por amplificador de controle (Peltier), em contato elétrico com o bloco de alumínio e um termistor. Este sistema de re-aquecimento do líquido perfusor permitiu a manutenção da temperatura no interior da câmara em  $37 \pm 0,2$  °C.

A câmara de perfusão, de 40  $\mu$ l, foi confeccionada em um bloco compacto de acrílico, e seu fundo revestido por um pequeno pedaço de borracha macia. O perfusato foi removido da câmara por escoamento por capilaridade, através de um tubo de vidro colado à parte lateral da câmara. A válvula de 3 vias, o bloco de

alumínio para o aquecimento da solução perfusora, a câmara de perfusão e um micromanipulador tridimensional (para a movimentação dos microeletrodos) foram montados sobre uma mesa antivibratória com suspensão pneumática. O sistema de perfusão, com exceção do banho maria, foi instalado no interior de uma gaiola de Faraday.



**Figura 1.** Representação esquemática do sistema de perfusão utilizado no registro da atividade elétrica de células  $\beta$  de camundongo.

1. sistema de distribuição de carbogênio
2. banho-maria e frascos de solução perfusora
3. válvula
4. câmara trocadora de calor
5. câmara de perfusão contendo uma ilhota microdissecada
6. eletrodo de referência
7. eletrodo intracelular
8. amplificadores operacionais de alta impedância de entrada
9. unidade de amplificação
10. osciloscópio
11. registrador x-t
12. registrador magnético

### 2.3. - Sistema para medida do $\text{Ca}^{2+}$ citoplasmático.

As medidas de concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) de células  $\beta$  de rato cultivadas foram feitas utilizando-se um microscópio invertido de fluorescência (Diaphot-TMD, Nikon Corp. Japão), equipado com 2 espelhos dicróicos. Um espelho foi utilizado para direcionar o feixe de luz de excitação ( $355 \pm 10$  nm) sobre as células, e a fluorescência emitida pelo corante indo-1 contido nas células ( $> 400$  nm) para o 2º espelho. Este foi utilizado para dividir a fluorescência em 2 feixes de luz, centrados em 410 e 485 nm ( $\pm 5$  nm), respectivamente. A intensidade de luz em cada comprimento de onda foi medida continuamente utilizando-se 2 fotômetros (Photometer P1, Nikon Corp, Japão). Para a aquisição dos dados, os fotômetros foram ligados a um computador com 2 portas seriais (Compaq 386, 25 MHz); estes dados representavam a fluorescência normalizada (F) emitida a 410 e 485 nm (0-100%). A razão  $F_{410\text{nm}}/F_{485\text{nm}}$  e a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  foi calculada a partir de uma curva de calibração, utilizando-se um programa que fornecia o decurso temporal de  $F_{410\text{nm}}$ ,  $F_{485\text{nm}}$  e da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Para a confecção da curva de calibração foram utilizadas soluções com várias concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$ , preparadas adicionando-se diferentes quantidades de  $\text{CaCl}_2$  na solução tampão (em mM: Na-EGTA, 5; KCl, 140; e Na-Hepes; 10; pH 7,0). A concentração final de  $\text{Ca}^{2+}$  destas soluções foi medida utilizando-se um eletrodo de  $\text{Ca}^{2+}$  (CAL-1, W-P Instruments Inc., New Haven, CO, EUA). Os valores de  $F_{410\text{nm}}$  e  $F_{485\text{nm}}$ , necessários para calcular a razão  $F_{410\text{nm}}/F_{485\text{nm}}$  em cada concentração definida de  $\text{Ca}^{2+}$ , foram realizados na mesma câmara utilizada nos experimentos. Estas soluções continham 2,5% (v/v) de indo-1, diluído em etanol a 25%.

### **A.3. - Soluções.**

#### **3.1. - Solução para isolamento das ilhotas.**

Utilizou-se para o isolamento das ilhotas uma solução de Hanks com a seguinte composição (em mM): NaCl, 135; KCl, 5,48; CaCl<sub>2</sub>, 1,3; MgSO<sub>4</sub>, 0,8; NaHCO<sub>3</sub>, 4,2; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,3; MgSO<sub>4</sub>, 0,8; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,4. O pH da solução foi ajustado em 7,4 com carbogênio (HANKS e WALLACE, 1949). No isolamento de ilhotas destinadas ao cultivo, utilizou-se solução de Hanks assepticamente preparada, acrescida de penicilina (100 U.I. / ml) e estreptomicina (100 µg / ml).

#### **3.2. - Solução para incubação e perfusão das ilhotas.**

A solução utilizada para incubação e perfusão das ilhotas de Langerhans consistiu basicamente de solução de Krebs composta de (em mM): NaCl, 115; KCl, 5,0; CaCl<sub>2</sub>, 2,6; MgCl<sub>2</sub>, 1,0; NaHCO<sub>3</sub>, 24,0 (KREBS e HENSELEIT, 1932). A fim de melhorar a captação do <sup>45</sup>Ca durante o período de incubação, optou-se por solução de Krebs modificada, sem a adição de Ca<sup>2+</sup>. Nos experimentos de secreção de insulina, esta solução foi enriquecida com albumina bovina em concentração de 0,5 % (m/v), sendo em seguida equilibrada e mantida em pH 7,4 através do gaseamento com carbogênio.

#### **3.3. - Solução para isolamento das células.**

No processo enzimático utilizado para a dissociação e isolamento das células insulares foi empregado uma solução de Earle tamponada com HEPES-NAOH - denominada solução Earle-HEPES (PIPELLERS et al., 1985), composta de (em mM): NaCl, 115; KCl, 5,4; MgSO<sub>4</sub>, 0,8; NaHCO<sub>3</sub>, 14,3; HEPES, 10,0; glicose, 2,8, e equilibrada em pH 7,4 com NaOH e oxigênio. Ligeiras

modificações nesta solução - utilizadas em determinadas etapas do isolamento - serão indicadas na descrição do método (item 1.4).

### **3.4. - Soluções para cultura, incubação e perfusão das células.**

Após o isolamento, as células foram cultivadas em meio RPMI 1640, suplementado com 0,5% de albumina bovina (v/v), 2,3 mM de glutamina e 11 mM de glicose. Para a incorporação do corante fluorimétrico (utilizado para medir a  $[Ca^{2+}]_i$ ), as células foram incubadas em meio contendo (em mM): NaCl, 125; KCl, 5;  $CaCl_2$ , 2,6;  $MgCl_2$ , 1; Na-Hepes, 10;  $NaHCO_3$ , 5, glicose 5,6. No momento da sua utilização, foi adicionado 2  $\mu$ M do corante indo-1/AM. Para a perfusão das células foi utilizada a mesma solução sem o corante.

### **A.4. - Reagentes.**

Todos os sais, bem como a D-glicose e demais substâncias adicionadas às soluções possuíam grau analítico de pureza (PA). Albumina bovina fração V e dispase foram obtidas da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA), e colagenase da Boehringer Mannheim (Alemanha). Penicilina, estreptomicina, glutamina e o meio RPMI 1640 foram obtidos da Gibco-BRL (Gaithersburg, MD, EUA). Os agonistas OXO-M, ACh e McN-A-343 e os antagonistas pirenzepina, 4-DAMP, p-F-HHSiD e metoctramina foram procedentes da RBI (Bethesda, MD, EUA). Indo-1/AM foi obtido da Molecular Probes (EUA) e ChTX da Latoxan (Rosans, França). Empregou-se os radioisótopos  $^{45}Ca$  ( $^{45}CaCl_2$ ),  $^{86}Rb$  ( $^{86}RbCl$ ) e  $^{125}I$  ( $^{125}I$ -insulina) provenientes da Amersham (Inglaterra).

## **III.B - MÉTODOS**

### **B.1 - Isolamento das ilhotas.**

#### **1.1 - Isolamento de ilhotas de camundongo por digestão enzimática.**

Após sacrifício por decapitação e posterior incisão abdominal, injetou-se no pâncreas aproximadamente 1 ml de solução de Hanks contendo 3 mg de colagenase. Em seguida, o pâncreas foi excisado, cortado com tesoura em pedaços de aproximadamente 0,5 mm<sup>3</sup> e transferido para um tubo de ensaio. O tubo contendo o tecido foi mantido em banho-maria a 37°C, com seu conteúdo agitado continuamente pelo borbulhamento com mistura carbogênica por um período de 20 min. Após este período, o tubo foi agitado manualmente por aproximadamente 1 min ou até a obtenção de uma mistura de viscosidade homogênea. O conteúdo foi em seguida transferido para um bequer e diluído com solução de Hanks contendo 0,5% de albumina bovina. As ilhotas foram lavadas várias vezes com solução de Hanks, parcialmente separadas por sedimentações sucessivas e finalmente coletadas individualmente sob lupa, com auxílio de uma pipeta Pasteur estirada e previamente siliconizada. Para cada experimento foram utilizados em média 3 pâncreas.

#### **1.2 - Isolamento de ilhotas de rato por digestão enzimática.**

Os animais foram sacrificados por decapitação e, após incisão abdominal, a extremidade duodenal do ducto biliar comum foi ocluída, seguida da inserção de um cateter através de uma pequena incisão na parte proximal (hepática) do ducto. Através de uma seringa conectada ao cateter, aproximadamente 8 ml de solução de Hanks foram injetados no pâncreas, até que este se encontrasse suficientemente

intumescido, sendo então excisado e transferido para placa de Petri contendo solução de Hanks. Nesta placa, o pâncreas foi dissecado de gorduras, da maioria do tecido vascular e dos gânglios linfáticos. A seguir, os pâncreas foram cortados, lavados com solução de Hanks e transferidos para um tubo de ensaio contendo 8 mg de colagenase/pâncreas. Para a obtenção das ilhotas, seguiu-se o mesmo procedimento de digestão a 37°C, utilizado para camundongos. Para cada experimento foram usados, em média, 4 pâncreas.

### **1.3 - Isolamento e cultura das células.**

Para as medidas de  $[Ca^{2+}]_i$  foram utilizadas células  $\beta$  isoladas. Para isto, ao final do isolamento das ilhotas, foi realizada a digestão enzimática do tecido até a obtenção de células isoladas. Grupos de 800 a 1000 ilhotas foram lavados com solução de Earle-Hepes, e em seguida mantidos em 0,8 ml desta solução contendo 1 mM de EGTA, por um período de 30 min a temperatura ambiente. Após este período, as ilhotas foram resuspensas por aproximadamente 20 vezes, com auxílio de uma pipeta semi-automática de 1 ml (Gilson Medical Electronics, França). A seguir, o tecido foi transferido para um tubo de ensaio contendo 1 ml da mesma solução, acrescida de 18 mg de dispase. Nesta solução, as ilhotas foram resuspensas durante 1,5 min. O grau de dissociação foi verificado pela observação ao microscópio de uma amostra da suspensão. Caso as células não se encontrassem completamente separadas, o processo de resuspensão com dispase era repetido por mais alguns segundos. Em seguida, as células foram lavadas por centrifugação (500 x g) em solução Earle-Hepes, enriquecida com 4% de albumina bovina. Findo o isolamento, as células foram lavadas com meio de cultura e transferidas para laminulas de vidro, acondicionadas em placas de Petri de 25 mm de diâmetro. Cada placa continha aproximadamente 20 a 30 mil células. As placas foram mantidas em câmara de incubação com ambiente controlado (37°C,

umidificado e com 5% de CO<sub>2</sub>) por um período de 2 a 5 dias. Ocorrendo alteração no pH do meio (verificado pela alteração na coloração), este era removido por aspiração e repostado por solução nova.

#### **1.4 - Microdissecção de ilhotas de camundongo.**

Os animais foram sacrificados por decapitação e, após a abertura da cavidade abdominal, o pâncreas e o baço foram excisados e fixados com alfinetes em placa de Petri revestida com cera, contendo solução de Krebs. Uma ilhota de Langerhans, parcialmente rodeada por tecido exócrino, foi removida sob lupa, com auxílio de pinça e tesoura de iridectomia. O fragmento recém dissecado foi imediatamente transferido para a câmara de perfusão e fixado ao fundo da mesma pela sua porção exócrina, por meio de alfinetes entomológicos (fig. 1).

### **B.2 - Secreção de insulina.**

#### **2.1. Secreção estática de insulina.**

As ilhotas, uma vez isoladas, foram coletadas uma a uma, com o auxílio de uma pipeta Pasteur estirada e transferidas para placas de cultura com 24 reservatórios contendo 1,0 ml de solução de incubação, suplementada com 0,5% de albumina bovina (m/v). Em todos os experimentos, 5 ou 8 ilhotas foram coletadas em cada reservatório. A seguir, as placas foram acondicionadas em banho-maria a 37°C, e mantidas em ambiente umidificado e gaseado com carbogênio. O pH da solução foi ajustado em 7,4 através da injeção desse gás. Inicialmente, as ilhotas foram pré-incubadas por 1h; a solução foi em seguida rapidamente removida e repostada por 1 ml de nova solução de incubação, modificada para cada condição experimental. As alterações na solução de

incubação estão especificadas nos Resultados. A seguir, as ilhotas foram mantidas em incubação por 30, 60 ou 90 min.

Terminada a incubação, as placas foram resfriadas em banho de gelo, e o sobrenadante removido, transferido para tubo de ensaio e estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para posterior dosagem da insulina por do radioimunoensaio. Em alguns experimentos, a insulina contida nas ilhotas foi extraída mantendo-se as mesmas em solução de ácido-álcool (etanol 70% e HCl 0,2N) por um período de 18 a 24 hs.

## **2.2. Secreção dinâmica de insulina.**

Para cada experimento, foram coletados 4 grupos de 30 ilhotas de ratos, em frascos de 1,5 ml. Após a coleta, as ilhotas foram transferidas para as câmaras de perfusão e conectadas ao sistema, quando teve início a perfusão.

Um período inicial de 30 min, denominado período de equilíbrio, precedeu a coleta do efluente das câmaras. A seguir, iniciou-se a coleta, min a min, em tubos de ensaio mantidos em banho de água e gelo. As mudanças na composição das soluções perfusoras estão indicadas nos Resultados. Ao final da perfusão, as amostras coletadas foram congeladas e mantidas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para posterior dosagem de insulina.

## **2.3. Radioimunoensaio.**

O conteúdo de insulina de cada amostra foi medido por radioimunoensaio, pelo método de separação com carvão ativado (SCOTT et al., 1981). A curva padrão foi realizada utilizando-se insulina murina, em concentração de 0,02 a 5,0 ng/ml.

## **B.3 - Efluxo de radioisótopos.**

### **3.1. Marcação das ilhotas.**

Após o isolamento, as ilhotas de camundongos foram distribuídas em 2 grupos de 60 ilhotas cada, e transferidas para frascos de 1,5 ml. O sobrenadante foi removido e substituído por 125  $\mu\text{l}$  de meio de incubação contendo 100  $\mu\text{Ci/ml}$  de  $^{86}\text{RbCl}$  ou 200  $\mu\text{Ci/ml}$  de  $^{45}\text{CaCl}_2$ . Nos experimentos de efluxo do  $^{45}\text{Ca}$  omitiu-se o  $\text{CaCl}_2$  na solução de incubação, a fim de aumentar a incorporação do isótopo.

Os frascos contendo as ilhotas foram incubados na presença de cada radioisótopo durante 90 min em banho-maria a  $37^\circ\text{C}$ , e gaseados com carbogênio. Ao fim deste período, as ilhotas foram lavadas 4 vezes com solução de incubação não-radioativa, transferidas para as respectivas câmaras e conectadas ao sistema de perfusão.

### **3.1. Perfusão.**

Após um período de equilíbrio (30 min), iniciou-se a coleta do efluente, a cada 20 segundos, em frascos de cintilação. O meio provindo de um primeiro reservatório perfundiu as ilhotas até o  $35^\circ$  min, e o de um segundo até o  $45^\circ$  min, quando a perfusão foi interrompida. Ao final da perfusão, os filtros que continham as ilhotas foram também transferidos para frascos de cintilação. Em cada frasco adicionou-se 5 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  ou de líquido de cintilação, respectivamente para a leitura de  $^{86}\text{Rb}$  e  $^{45}\text{Ca}$ ; a radioatividade dos frascos foi avaliada em contador beta de cintilação líquida (Beckman LS 6000TA). As alterações na composição das soluções de perfusão estão indicadas no capítulo Resultados.

A taxa de efluxo,  $\Phi_j(\%)$ , correspondente a  $j$ -ésima leitura de radioatividade,  $\text{cpm}_j$ , foi calculada utilizando-se a equação:

$$\Phi_j(\%) = 100 \times \frac{cpm_j - bg}{CPM - bg + \sum_{n=j}^N (cpm_n - bg)},$$

onde,  $bg$  é a radioatividade de fundo,  $N$  é o número total de amostras colhidas e  $CPM$  é a radioatividade restante nas ilhotas ao final do experimento.

## B.4 - Estudo eletrofisiológico.

### 4.1. Confeção dos microeletrodos.

Com o auxílio de um estirador vertical, foram construídas micropipetas de vidro a partir de capilares (de 5 cm de comprimento, 2,0 mm de diâmetro externo e 0,7 mm de diâmetro interno). Imediatamente após o estiramento, as micropipetas foram preenchidas com mistura (1:1) de citrato de potássio (3M) e cloreto de potássio (1M). As micropipetas preparadas foram utilizadas imediatamente ou armazenadas a 4°C por um período de até uma semana.

Para a realização dos registros eletrofisiológicos, uma micropipeta foi fixada a um micromanipulador e um eletrodo de prata, recoberto por uma camada de AgCl depositada eletroliticamente, foi introduzido no seu interior. Um eletrodo de referência (Ag-AgCl) foi mergulhado na solução perfusora, próximo à ilhota. Os dois eletrodos foram ligados às duas unidades de ganho de alta impedância de entrada ( $10^{14} \Omega$ ), cuja saída foi ligada de modo convencional a um osciloscópio (Tektronix, Oregon, USA), a um registrador de armazenamento magnético e a um registrador potenciométrico de dois canais, para o acompanhamento gráfico do experimento. Antes de cada experimento, foi medida a resistência elétrica de cada microeletrodo, sendo utilizados apenas aqueles que apresentavam resistência da ordem de 150 a 250 M $\Omega$ .

#### 4.2. Registro eletrofisiológico.

O reconhecimento da célula  $\beta$  foi realizado pelo aparecimento (no osciloscópio ou em registrador potenciométrico) da atividade elétrica característica em presença de 11 mM de glicose, observada logo após a penetração da micropipeta em uma célula no interior da ilhota. Uma vez reconhecida a célula, iniciava-se a experimentação, sempre precedida por um período de estabilização do potencial de membrana (geralmente de 5 a 10 min).

As medidas de resistência elétrica foram realizadas pela injeção de pulsos de corrente de -0,1 nA e 0,9 segundos de duração, através do microeletrodo utilizado para o registro do potencial de membrana. Os valores de resistência foram calculados a partir da variação do potencial de membrana (V) induzida pelos pulsos hiperpolarizantes (I), de modo que  $R = V/I$ . Para medir o potencial de membrana foi utilizado um registro expandido do experimento. Antes do impalamento da célula  $\beta$ , com os dois eletrodos mergulhados na solução perfusora da câmara, foram aplicados pulsos de corrente. A eventual diferença de potencial registrada foi anulada por meio de um circuito eletrônico (ponte de balanceamento), acoplado ao amplificador. Assim, uma vez impalada a célula, a deflexão do potencial de membrana, devido à aplicação dos pulsos, foi diretamente proporcional à resistência de membrana à entrada de corrente (*input resistance*). Ao final do experimento, com os eletrodos mergulhados novamente na solução perfusora, o programa de pulsos de corrente foi repetido. Quando ocorriam pequenas deflexões de potencial, estes valores foram subtraídos ou adicionados (conforme o sentido da deflexão) aos valores registrados na célula.

## **B.5 - Medidas do Ca<sup>2+</sup> citoplasmático.**

### **5.1. Incorporação do corante nas células.**

As células foram carregadas com o corante indo-1/AM à temperatura ambiente por um período de 1 a 2 h, em solução de incubação contendo 2 µM de indo-1/AM e 0,02% (v/v) de ácido plurônico (JAIMOVICH & ROJAS, 1994).

### **5.2. Microfluorimetria**

Após o período de incubação, a lamínula de vidro que continha as células foi removida da placa de Petri e lavada com solução de incubação. Em seguida, esta foi rapidamente montada na câmara de perfusão, acoplada ao microscópio. As células foram continuamente perfundidas por gravidade (fluxo de 0,2 ml/s) com solução de mesma composição, acrescida de diferentes substâncias (indicadas nas figs.). As células monitoradas foram reconhecidas visualmente como células β pelo tamanho, e confirmadas pela resposta induzida pela glicose.

## **B.6 - Expressão dos mAChRs.**

### **6.1. Extração de RNA total.**

O RNA total foi extraído de ilhotas de rato pelo método de extração com ácido guanidino isotiocianato e fenol/clorofórmio (CHOMCZYNSKI & SACCHI, 1986; RNA Isolation Kit, Stratagene, La Jolla, CA, USA). Para isto, aproximadamente 1000 ilhotas foram lisadas com solução contendo guanidina tiocianato (4M), citrato de sódio (20mM, pH 7) e sarcosil (0,5%), contendo β-mercaptoetanol (0,1M) para inibição de endonucleases. A seguir, o RNA foi separado das proteínas e demais componentes do homogenato por centrifugação, em solução contendo acetato de sódio (2M, pH 4), fenol saturado e mistura de

clorofórmio - álcool isoamílico (49:1, v/v). Para a precipitação do RNA, a fase aquosa foi transferida para outro tubo e acrescida de isopropanol a 4°C. O RNA foi a seguir re-suspenso em H<sub>2</sub>O desionizada estéril, e estocado a -70°C. O RNA extraído foi quantificado por densitometria óptica em comprimento de onda de 260 nm.

## **6.2. Síntese do cDNA.**

A síntese do híbrido RNA/cDNA foi realizada pela transcrição do mRNA, catalisada com a enzima transcritase reversa MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus, Perkin-Elmer, CA, EUA), e extensão a partir de oligômeros de timidina (oligo dT) utilizados como iniciador. Em cada reação de transcrição foram utilizados aproximadamente 10 µg de RNA total para a síntese de cDNA. Para isto, uma alíquota de RNA foi incubada a 42°C por 1 h, com volume final de 20 µl, contendo 1 mM de cada deoxinucleotídeo (dNTPs: dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 50 mM de NaCl, 34 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 5 mM de DTT, 2,5 µM de oligo d(T), 2 U de inibidor de RNases (RNasin) e 2 U de MMLV (GeneAmp RNA PCR kit, Perkin-Elmer, CA, EUA).

## **6.3. Amplificação do cDNA por PCR.**

O cDNA foi amplificado diretamente através da reação em cadeia da polimerase (PCR), segundo o método descrito por SAIKI e cols (1988), com algumas modificações. A amplificação foi realizada utilizando-se um ciclador de temperatura (DNA Thermal Cycler, Perkin-Elmer Cetus Instruments, CA, EUA), em reações contendo 10 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,01% de gelatina, 200 µM de cada dNTP, 10 µM de cada iniciador (*primer*) e 2 U de Taq DNA polimerase. Ao volume final (100 µl) foram adicionados 30 µl de óleo mineral (Sigma Chemical Co., EUA). As condições da

reação consistiram em desnaturação inicial a 95°C por 2 min, seguida de 35 ciclos que compreendiam desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 60°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min. O último ciclo teve o período de extensão prolongado por 10 min. Os *primers* utilizados na amplificação foram:

Receptor	Primer	Sequência	Posição
M1	sense	5' - GAGACACCAGGCAAAGGTGGT	827
M1	antisense	3' - CCTCTTGACTGTATTTGGGGA	1106
M3	sense	5' - CCCAGTGCCGAGCAGATGGAC	1011
M3	antisense	3' - GGTGATCTGACTTCTGGTCTT	1455

#### 6.4. Detecção do produto da amplificação.

Os produtos da reação foram separados em gel de agarose (2%), corado com de brometo de etídio para visualização pela iluminação com luz UV.

### B.7 - Análise dos Resultados.

#### 7.1. Cálculo do coeficiente de permeabilidade ao K<sup>+</sup> (P<sub>K</sub>).

O coeficiente de permeabilidade ao K<sup>+</sup> (P<sub>K</sub>) foi calculado a partir dos valores obtidos nos experimentos de efluxo de <sup>86</sup>Rb e nos registros eletrofisiológicos. Conhecendo-se a razão entre os efluxos de <sup>86</sup>Rb e K<sup>+</sup> (CROGHAN et al., 1986), os valores de  $\Phi(K)$  foram estimados pela relação:

$$\Phi(K) = 0,8 \Phi(Rb)$$

onde  $\Phi(K)$  e  $\Phi(Rb)$  são o efluxo de K<sup>+</sup> e de <sup>86</sup>Rb, respectivamente.

Para o cálculo de  $\Phi(K)$  na condição controle e estado estacionário, foi utilizada a média dos 5 últimos valores de  $\Phi(Rb)$ , respectivamente antes e após a mudança de solução de perfusão. Na condição de estímulo por OXO-M foram utilizados aqueles valores que corresponderam a resposta máxima de efluxo de  $^{86}\text{Rb}$ . Para o cálculo de  $P_K$  utilizou-se a equação (DAWSON et al., 1983):

$$P_K = \Phi(K) \frac{V}{A} \left( \frac{1 - e^{-aE}}{aE} \right)$$

onde  $V$  é o volume e  $A$  a área média de uma célula  $\beta$ ,  $E$  é o potencial de membrana registrado e o coeficiente  $a$  é definido por

$$a = zF / RT$$

onde  $z$  é a valência do íon,  $F$  a constante de Faraday,  $R$  a constante dos gases ideais e  $T$  a temperatura absoluta.

## 7.2. Tratamento estatístico.

Os resultados foram expressos pelos valores médios e seus respectivos erros padrão das médias (EPM). A análise estatística foi realizada empregando-se o teste  $t$  de Student para amostras não pareadas, considerando-se significativos os valores de  $p$  menores que 0,05.

## **IV. RESULTADOS**

---

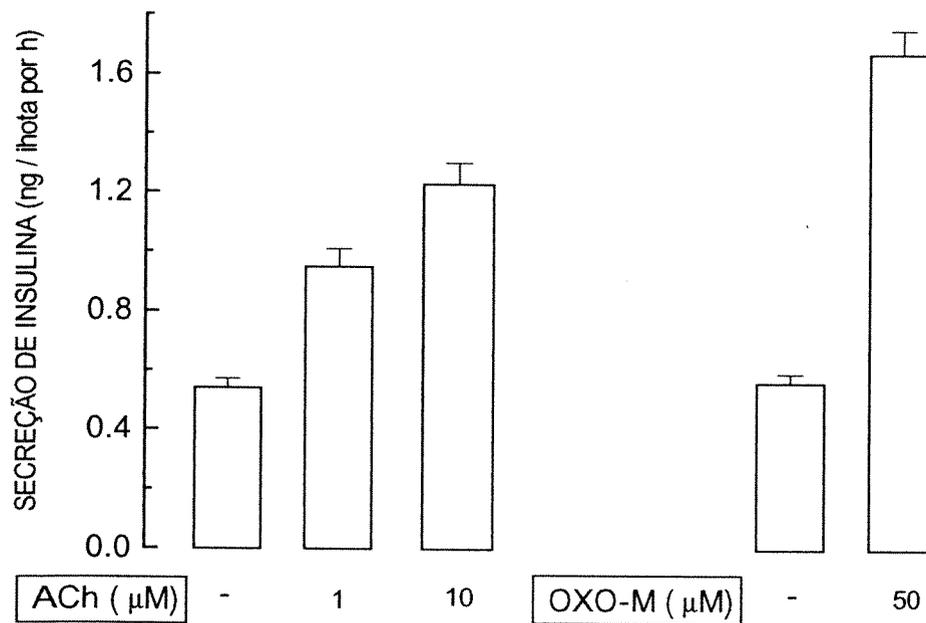
## IV. RESULTADOS

### IV.1. ANÁLISE FARMACOLÓGICA

#### **Resposta secretória de ilhotas de roedores a agonistas colinérgicos muscarínicos.**

Para a caracterização farmacológica do subtipo de receptor muscarínico presente na célula  $\beta$  pancreática, foi estudada a resposta secretória, estática e dinâmica, frente a diferentes agonistas e antagonistas muscarínicos.

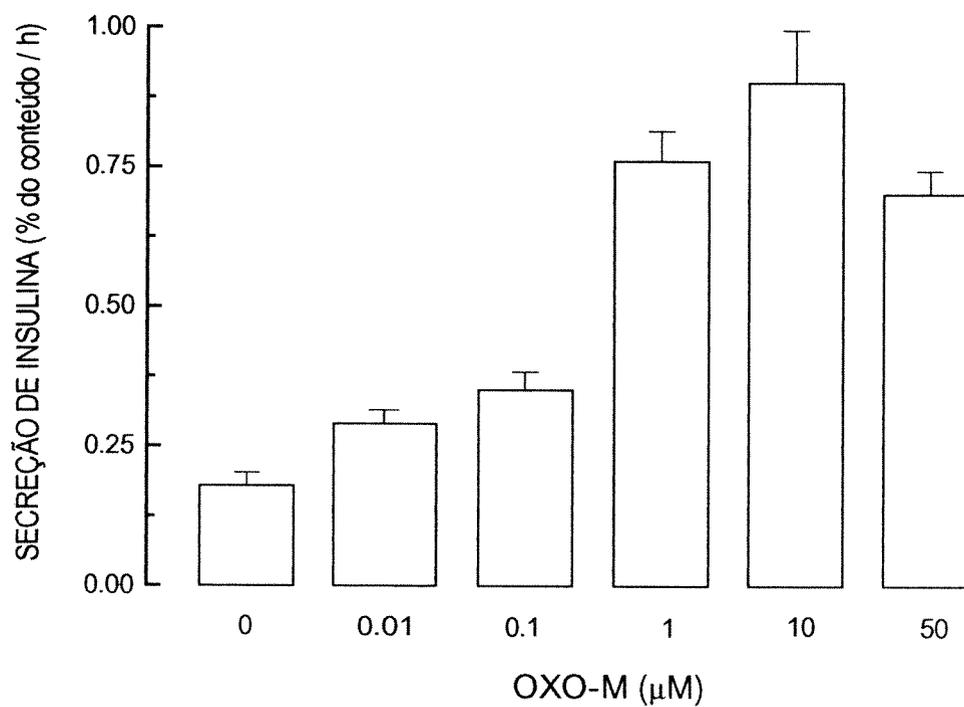
Como primeira etapa deste trabalho foi analisada a viabilidade da preparação experimental para o estudo da ativação dos receptores de membrana. Para isto, ilhotas de Langerhans isoladas de rato foram incubadas durante 1 h em meio contendo 5,6 mM de glicose, na ausência ou presença dos agonistas muscarínicos acetilcolina (ACh) e oxotremorina-m (OXO-M). A figura 1 compara os efeitos de ACh e OXO-M sobre a secreção estática de insulina. Na ausência de ACh (condição controle) a secreção de insulina foi de  $0,54 \pm 0,03$  ng/ilhota por h ( $n = 59$ ), enquanto que na presença de ACh (1 e 10  $\mu$ M) foi de  $0,95 \pm 0,06$  ( $n = 34$ ) e  $1,23 \pm 0,07$  ng/ilhota por h ( $n = 31$ ), respectivamente ( $p < 0,001$ ). OXO-M, por sua vez, também potencializou a resposta secretória por ilhotas isoladas. Nesta condição, os valores médios observados foram de  $1,67 \pm 0,08$  ng/ilhota por h ( $n = 45$ ), significativamente maiores que aqueles observados na ausência do agonista ( $0,56 \pm 0,04$ ,  $n = 43$ ;  $p < 0,001$ ).



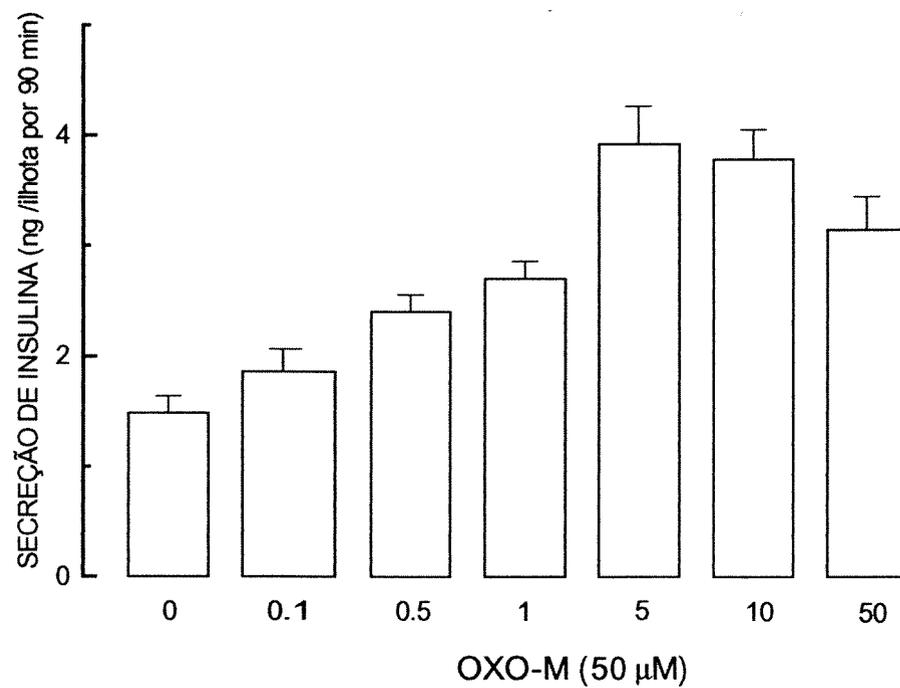
**Figura 1** - Efeitos de 1 e 10  $\mu\text{M}$  de ACh ou de 50  $\mu\text{M}$  de OXO-M sobre a secreção de insulina por ilhotas de rato, na presença de 5,6 mM de glicose. Os valores médios ( $\pm\text{EPM}$ ) foram obtidos a partir de 31 a 59 experimentos individuais, e expressos em nanogramas de insulina secretada por h. Cada experimento corresponde a incubação de 8 ilhotas.

Uma vez demonstrada a eficácia da OXO-M em estimular a secreção de insulina, foi realizada a curva dose-resposta a este agonista em ilhotas de camundongo, para posterior comparação com o estudo eletrofisiológico. A figura 2 representa a resposta secretória percentual (relativa ao conteúdo de insulina) frente a concentrações crescentes de OXO-M, quando incubadas por 1 h na presença de 11,2 mM de glicose. Na ausência de OXO-M, a secreção basal acumulada correspondeu a  $0.18 \pm 0,02\%$  do conteúdo total de insulina de cada ilhota ( $n = 8$ ). Concentrações nanomolares (10 e 100 nM) de OXO-M não provocaram incrementos significativos quando comparados a secreção basal. Estes foram de  $0,29 \pm 0,02\%$  e  $0,35 \pm 0,03\%$  por h, respectivamente ( $p > 0,05$ , em ambos os casos). Por sua vez, concentrações micromolares do agonista aumentaram a resposta secretória. A secreção de insulina estimulada por 1  $\mu\text{M}$  de OXO-M foi de  $0,76 \pm 0,05\%$  por h ( $n = 8$ ); em presença de 10 e 50  $\mu\text{M}$ , atingiu valores de  $0,90 \pm 0,09$  e  $0,70 \pm 0,04\%$  por h, respectivamente ( $p < 0,001$  para 1, 10 e 50  $\mu\text{M}$ ). Desta forma, doses estimulatórias de OXO-M provocaram incremento na secreção 4 a 5 vezes maior em relação ao basal.

O estudo da resposta secretória de ilhotas de rato mostrou que, a exemplo dos efeitos observados em ilhotas de camundongo, OXO-M agiu como potencializador da secreção de insulina. A figura 3 mostra o aumento na secreção de insulina por ilhotas incubadas durante 90 min em meio contendo 5,6 mM de glicose, em resposta a doses crescentes de OXO-M. Ilhotas controle apresentaram secreção de  $1,48 \pm 0,15$  ng/ilhota por 90 min ( $n = 19$ ). A adição de OXO-M ao meio de incubação provocou aumento dose-dependente na secreção de insulina, significativamente diferente do basal a partir de 0,5  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,001$ ). Os valores máximos de secreção, obtidos na presença de 5  $\mu\text{M}$  do agonista ( $3,92 \pm 0,34$  ng/ilhota por 90 min;  $n=20$ ), foram 2,7 vezes maiores que os valores basais ( $p < 0,001$ ).

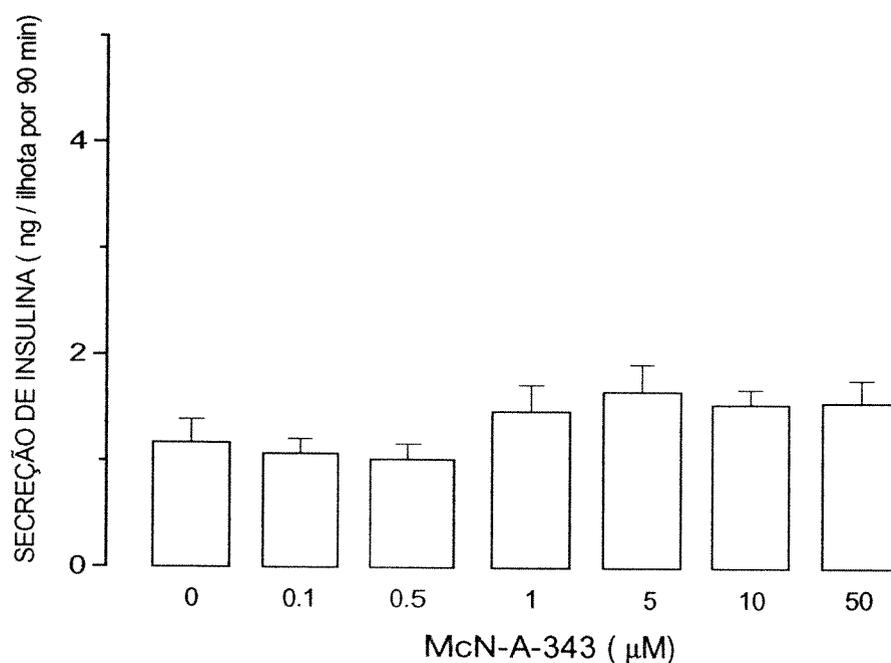


**Figura 2** - Efeito de concentrações crescentes de OXO-M sobre a secreção estática de insulina por ilhotas de camundongo incubadas em meio contendo 11,2 mM de glicose. Os valores médios ( $\pm$ EPM) foram obtidos a partir de 8 a 14 experimentos, e expressos como a fração do conteúdo total de insulina de cada experimento, secretada em 1 h. Cada experimento corresponde ao valor observado em incubação de 5 ilhotas.



**Figura 3** - Efeitos de concentrações crescentes de OXO-M sobre a secreção estática de insulina por ilhotas de rato incubadas em meio contendo 5,6 mM de glicose. Os valores médios ( $\pm$ EPM) foram obtidos a partir de 19 ou 20 experimentos, expressos em nanogramas de insulina secretada por ilhota em 90 min. Cada experimento corresponde ao valor observado em incubação de 8 ilhotas.

A fim de analisar a seletividade do receptor muscarínico envolvido na resposta secretória, experimentos de secreção estática foram conduzidos na presença de McN-A-343, agonista preferencial do subtipo de receptores muscarínicos M1. A curva dose-resposta ao McN-A-343 mostra que ilhotas não responderam a este agonista (fig 4). Na ausência do agonista, a secreção basal observada foi  $1,17 \pm 0,22$  ng/ilhota por 90 min ( $n = 10$ ). Na presença de McN-A-343 (0,1 a 50  $\mu$ M), estes valores não se alteraram significativamente. A maior variação na secreção, provocada por 5  $\mu$ M de McN-A-343 ( $1,66 \pm 0,25$  ng/ilhota por 90 min;  $n = 13$ ), não foi diferente daquela observada na ausência do agonista ( $p > 0,1$ ).

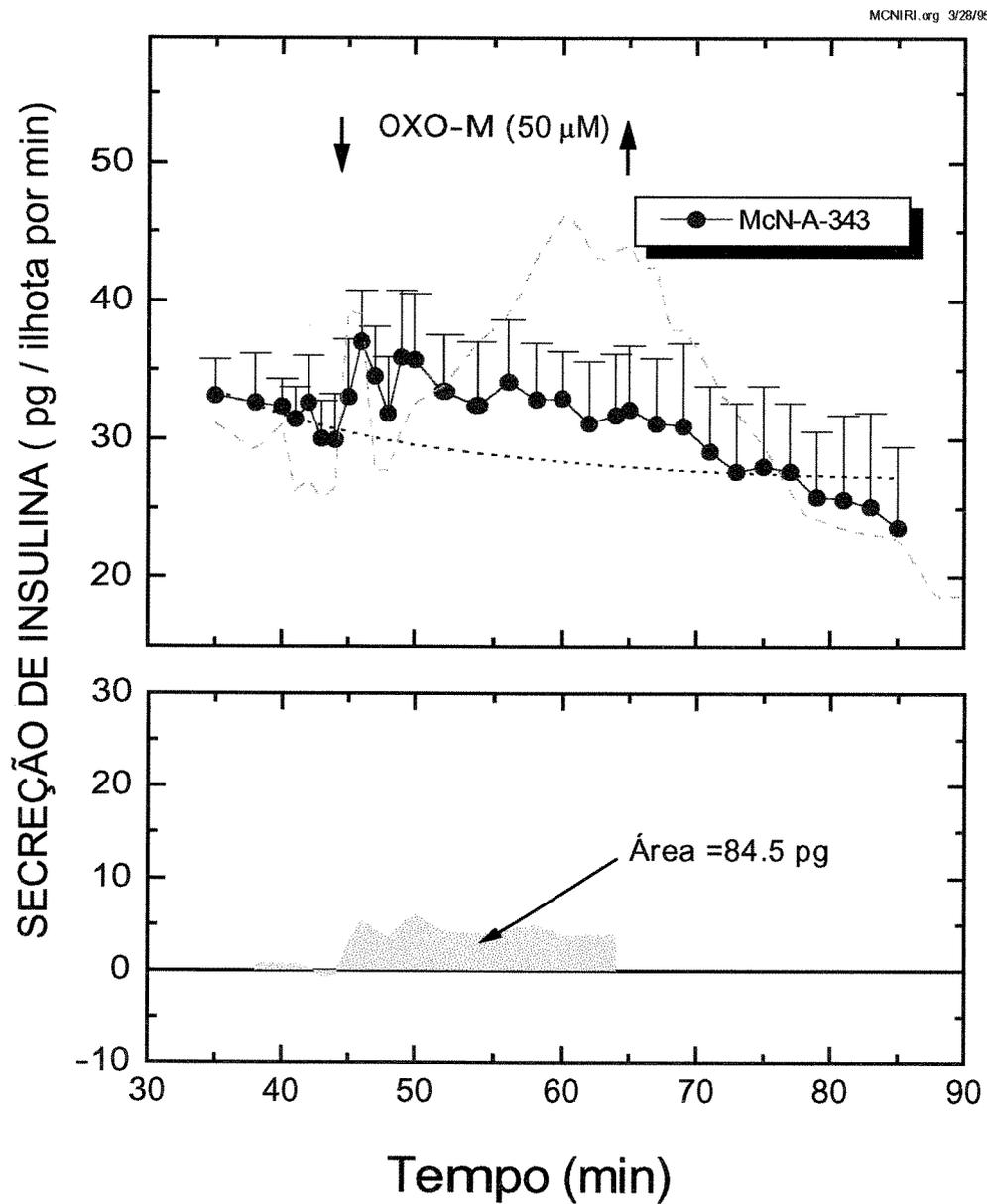


**Figura 4** - Efeitos de concentrações crescentes de McN-A-343 sobre a secreção estática de insulina por ilhotas de rato incubadas em meio contendo 5,6 mM de glicose. Os valores médios ( $\pm$ EPM) foram obtidos a partir de 10 ou 13 experimentos, expressos em nanogramas de insulina secretada por ilhota em 90 min. Cada experimento corresponde ao valor observado em incubação de 8 ilhotas.

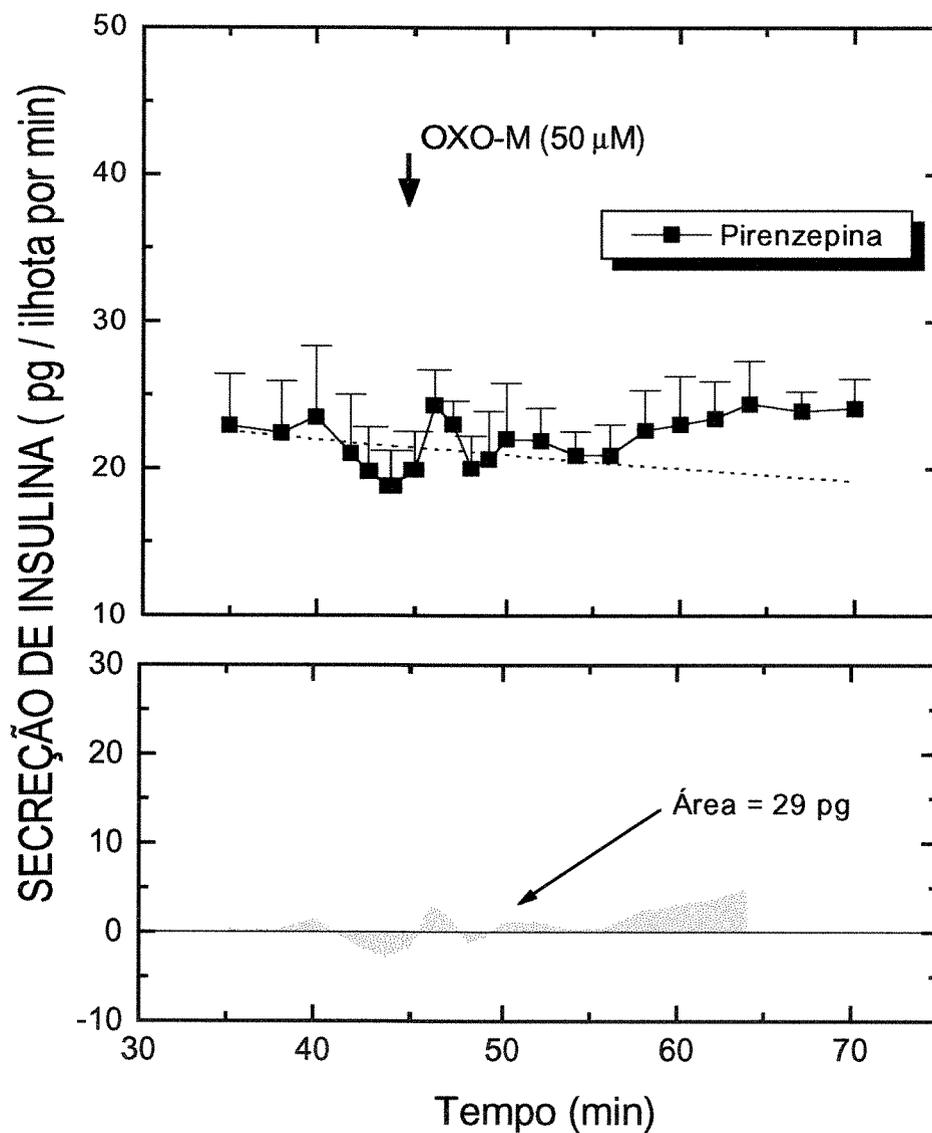
Considerando a ausência de resposta secretória na presença do agonista M1, o próximo passo foi verificar se o(s) sítio(s) de ligação dos agonistas McN-A-343 e OXO-M se encontram no mesmo tipo de receptor.

A figura 5 representa a resposta secretória de ilhotas estimuladas por OXO-M (50 $\mu$ M), na presença de igual concentração de McN-A-343. Durante o período basal - min 40° a 44°-, a secreção média de insulina foi 30,98  $\pm$  2,92 pg/ilhota por min (n = 4). A estimulação da liberação de insulina pela OXO-M foi bastante reduzida na presença do agonista McN-A-343, quando comparada à curva controle (linha tracejada, correspondente a fig 13). Nesta condição, o valor médio registrado entre os min 46° e 50° foi 35,00  $\pm$  4,20 pg/ilhota por min. Este efeito inibitório pode ser também observado em ilhotas perfundidas em solução contendo o antagonista pirenzepina (fig 6). Nesta série de experimentos, as ilhotas secretaram 20,78  $\pm$  4,18 pg/ilhota por min no período controle e 21,98  $\pm$  3,50 pg/ilhota por min após a adição de OXO-M no meio perfusor (n = 4).

Observa-se que, uma vez ocupado o receptor - quer por um agonista ou um antagonista muscarínico-, a ação estimulatória da OXO-M foi praticamente abolida.



**Figura 5** - Efeitos de 50  $\mu$ M de OXO-M sobre a secreção dinâmica de insulina por ilhotas perfundidas em solução contendo 5,6 mM de glicose e 50  $\mu$ M de McN-A-343, presentes na solução durante todo o período de perfusão. A adição e remoção de OXO-M estão indicadas pelas setas. Os valores médios ( $\pm$  EPM) representam 4 experimentos individuais com 20 ilhotas isoladas, e foram expressos em picogramas de insulina secretada por ilhota em cada min.



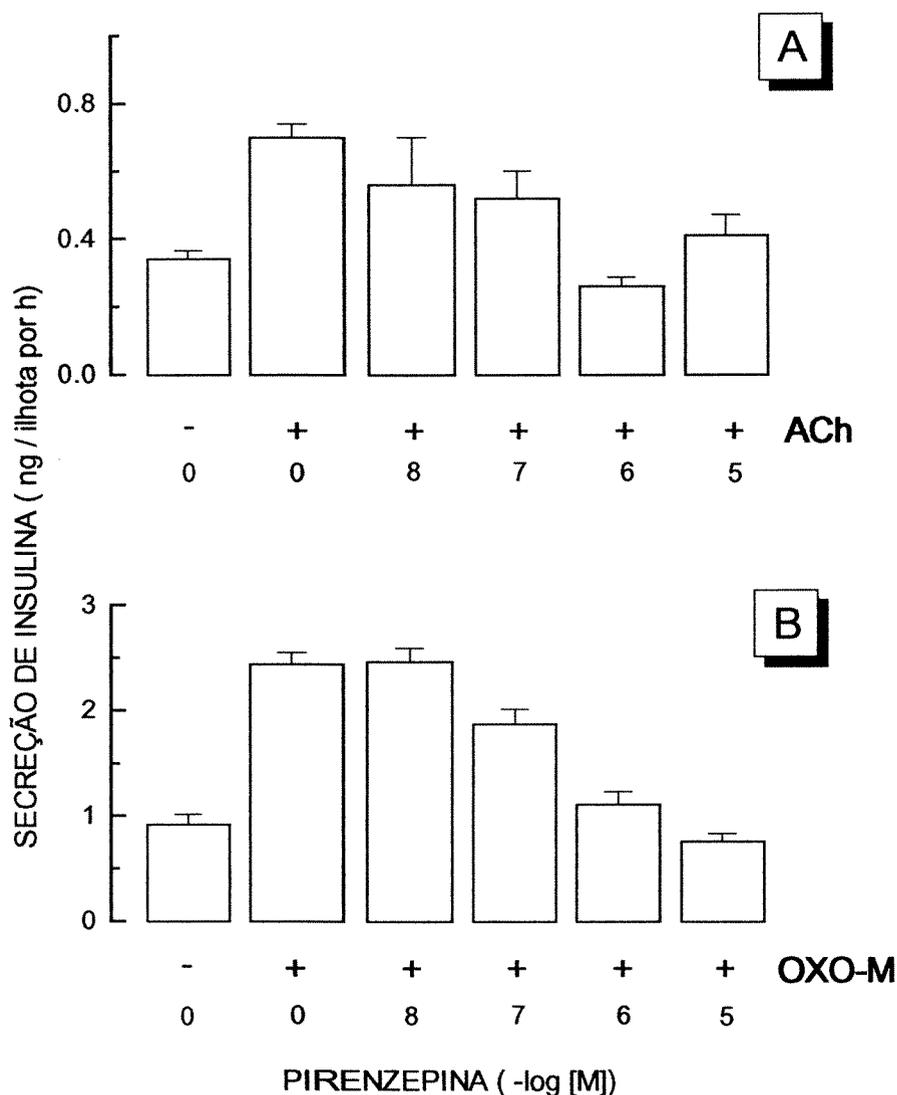
**Figura 6** - Efeitos de 50  $\mu\text{M}$  de OXO-M sobre a secreção dinâmica de insulina por ilhotas perfundidas na presença de 5,6 mM de glicose e 1  $\mu\text{M}$  de pirenzepina. O antagonista esteve presente na solução durante todo período de perfusão. Os valores médios ( $\pm$  EPM) representam 4 experimentos com 20 ilhotas, e foram expressos em picogramas de insulina secretada por ilhota em cada min.

Numa série posterior de experimentos, foi estudada a seletividade e a potência inibitória de diferentes antagonistas muscarínicos, mediante estimulação por ACh e OXO-M. As figuras 7 e 9 representam os efeitos de concentrações crescentes de pirenzepina (antagonista preferencial M1; fig 7) e 4-DAMP (antagonista preferencial M3; fig 9) sobre a resposta secretória de ilhotas incubadas por 1 h, em meio contendo concentração fixa de ACh (figs 7-A e 9-A) ou OXO-M (figs 7-B e 9-B). Observa-se que ambos os antagonistas bloquearam o efeito estimulatório de ACh e OXO-M. Entretanto, a seletividade e a potência da pirenzepina e do 4-DAMP foram bastante distintas. Quando estimuladas por ACh, ilhotas apresentaram resposta máxima de  $0,70 \pm 0,04$  ng/ilhota por h (1  $\mu$ M de ACh, n = 10, fig 7-A) e  $1,33 \pm 0,08$  ng/ilhota por h (10  $\mu$ M de ACh, n = 22, fig 7-B). A presença de pirenzepina no meio de incubação teve efeito inibitório máximo em 1  $\mu$ M ( $0,26 \pm 0,03$  ng/ilhota por h, n = 6), ao passo que em presença de 4-DAMP este efeito foi observado em concentração de 10  $\mu$ M do antagonista ( $0,90 \pm 0,05$  ng/ilhota por h, n = 12).

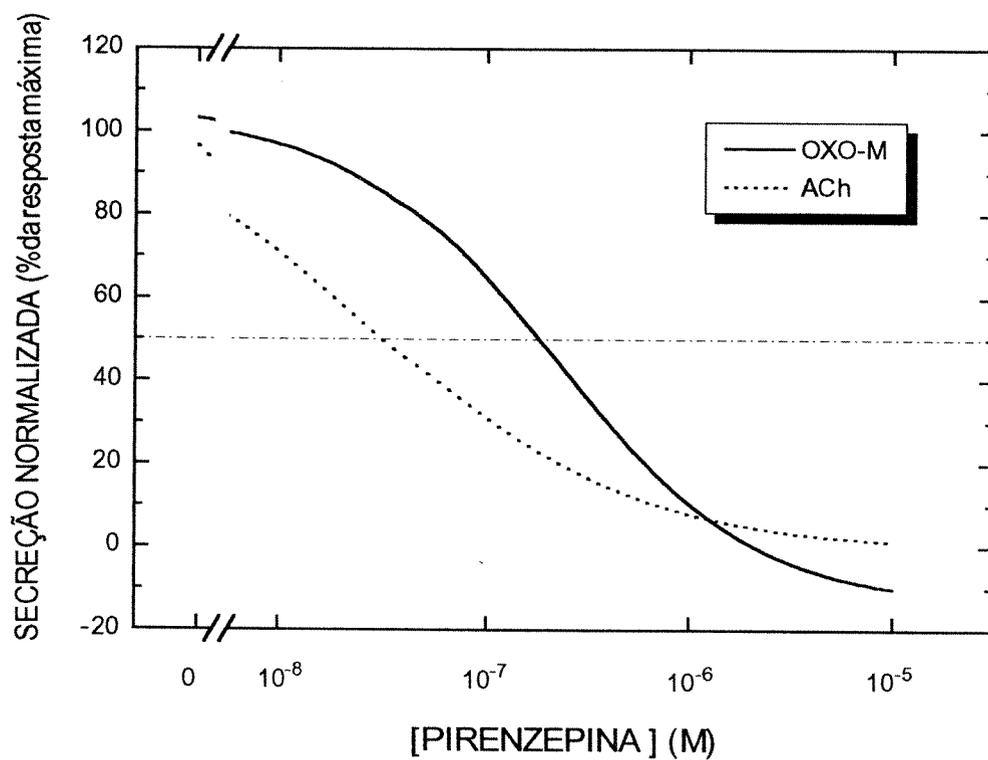
Por outro lado, frente a estimulação por 50  $\mu$ M de OXO-M, a ação bloqueadora destes antagonistas se mostrou oposta àquela observada para ACh. Em concentração de 10  $\mu$ M, pirenzepina reduziu a resposta secretória de  $2,44 \pm 0,11$  ng/ilhota por h (n = 10) para  $0,76 \pm 0,07$  ng/ilhota por h (n = 10), enquanto que para o 4-DAMP foram necessárias apenas doses de 10 nM para provocar ação semelhante ( $1,57 \pm 0,10$ , e  $0,90 \pm 0,06$  ng/ilhota por h, n = 10, respectivamente).

Para melhor visualização dos efeitos destes antagonistas, estão representados nas figuras 8 e 10 os ajustes sigmoidais das curvas normalizadas, calculadas a partir dos valores médios obtidos nas diferentes condições (descritas nas figs 7 e 9, respectivamente). Pode-se notar claramente que a inibição pela pirenzepina foi maior em ilhotas estimuladas por ACh do que por OXO-M (aproximadamente na ordem de 10 vezes) (fig 8). Por sua vez, 4-DAMP é inibidor

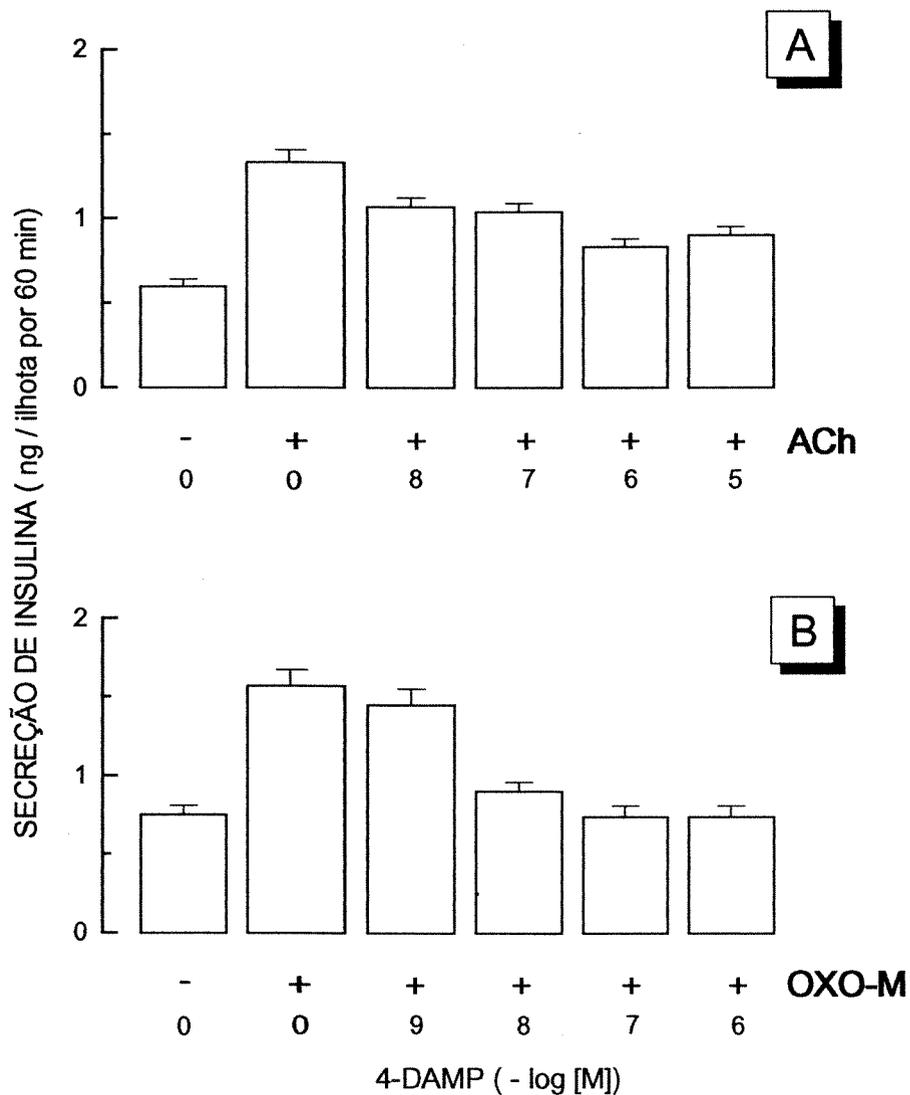
mais potente (na ordem de 100 vezes) da resposta estimulada por OXO-M do que por ACh (fig 10).



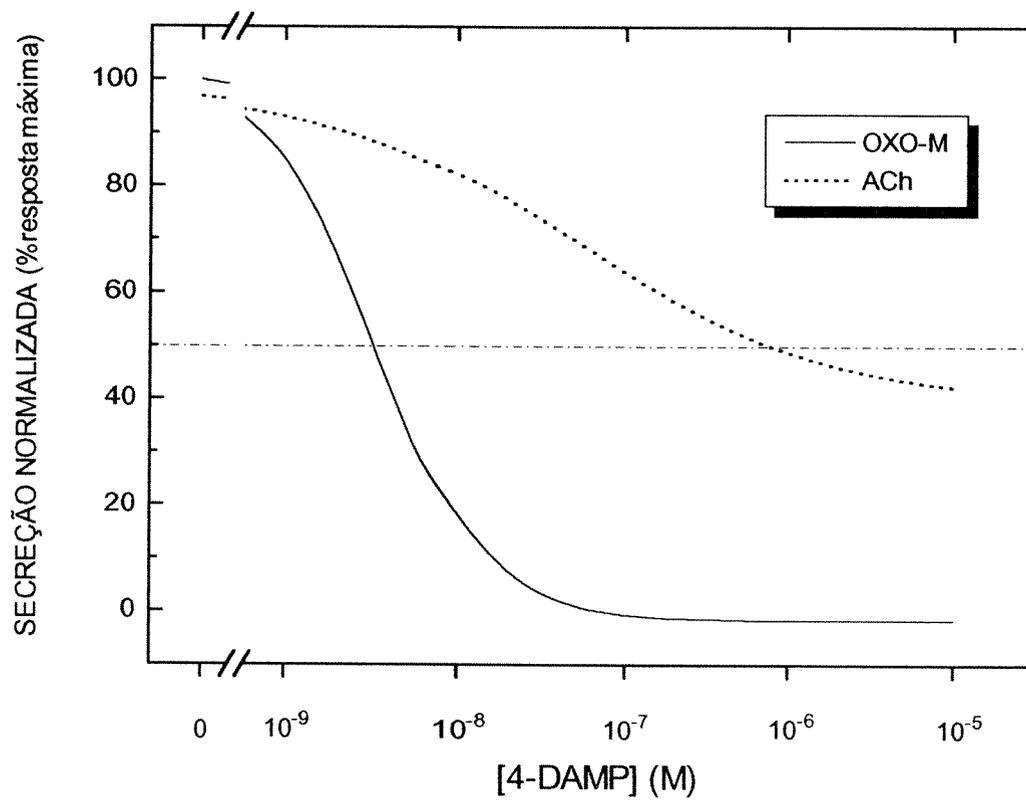
**Figura 7** - Efeitos do antagonista muscarínico pirenzepina sobre a estimulação da secreção de insulina provocada por 1  $\mu$ M de ACh (A) ou 50  $\mu$ M de OXO-M (B), por ilhotas de rato incubadas em meio contendo 5,6 mM de glicose. Os valores médios ( $\pm$ EPM) foram obtidos a partir de 6 a 10 experimentos, e expressos em nanogramas de insulina secretada por ilhota durante 1 h. Cada experimento corresponde ao valor observado em incubação de 5 ilhotas.



**Figura 8** - Inibição da secreção de insulina pelo antagonista pirenzepina. As ilhotas foram estimuladas por 50  $\mu$ M de OXO-M ou 1  $\mu$ M de ACh, na presença de 5,6 mM de glicose. As curvas foram obtidas pelo ajuste sigmoidal dos valores normalizados, representados nas figs 7-A e 7-B.



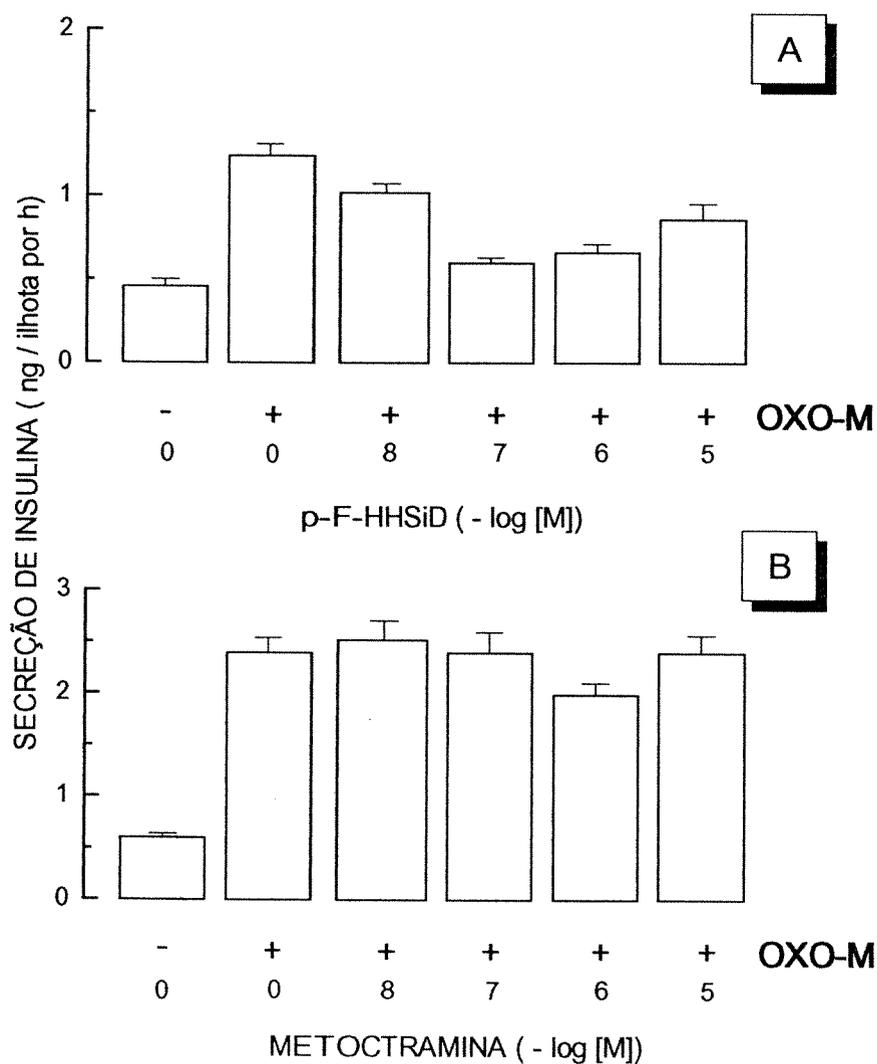
**Figura 9** - Efeitos do antagonista muscarínico 4-DAMP sobre a estimulação da secreção de insulina produzida por 10  $\mu\text{M}$  de ACh (A) ou 50  $\mu\text{M}$  de OXO-M (B) por ilhotas de rato incubadas em meio contendo 5,6 mM de glicose. Os valores médios ( $\pm\text{EPM}$ ) foram obtidos a partir de 10 a 22 experimentos, expressos em nanogramas de insulina secretada por ilhota em 1 h. Cada experimento corresponde ao valor observado em incubação de 5 ilhotas.



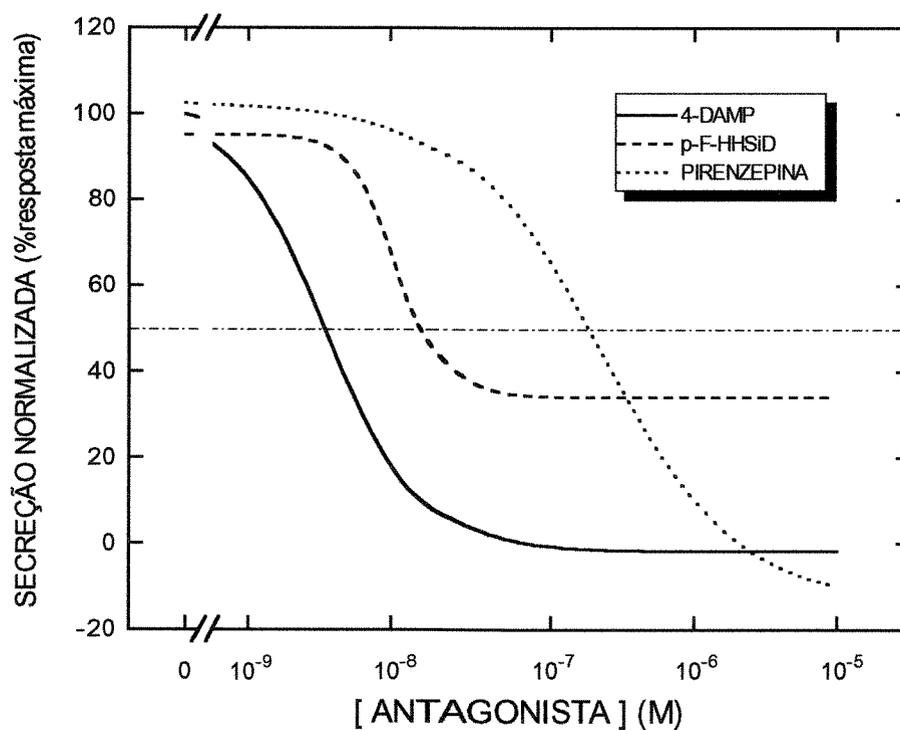
**Figura 10** - Inibição da secreção de insulina pelo antagonista pirenzepina. As ilhotas foram estimuladas por 50  $\mu$ M de OXO-M ou 10  $\mu$ M de ACh, na presença de 5,6 mM de glicose. As curvas foram obtidas pelo ajuste sigmoidal dos valores normalizados, representados nas figs 9-A e 9-B.

Complementando o estudo farmacológico dos receptores muscarínicos da célula  $\beta$ , foram também utilizados os antagonistas *p*-F-HHSiD (com seletividade  $M3 > M1 > M2$ ) e metoctramina (preferencialmente  $M2$ ). A secreção registrada em 1 h de incubação com 50  $\mu$ M de OXO-M ( $1,24 \pm 0,07$  ng/ilhota por h,  $n = 12$ ) foi reduzida a valores de  $0,60 \pm 0,03$  ng/ilhota por h ( $n = 12$ ) com 0,1  $\mu$ M de *p*-F-HHSiD (fig 11-A). Com relação a metoctramina, a figura 11-B mostra que, mesmo em concentração de 10  $\mu$ M (i.e., doses 1000 vezes maiores do que 4-DAMP), não ocorreu inibição significativa da secreção de insulina.

Nota-se que antagonistas com predominância para receptores do subtipo  $M3$  (4-DAMP e *p*-F-HHSiD) inibiram a secreção induzida por OXO-M, em concentrações menores que aquelas observadas para pirenzepina ( $M1$ ). Na presença de 10 nM de 4-DAMP e 50  $\mu$ M de OXO-M a secreção de insulina não foi diferente da secreção basal, obtida na ausência de ambas as drogas. Foram necessárias concentrações 100 vezes maiores de pirenzepina para a obtenção do mesmo efeito. Os ajustes das curvas de inibição dos diferentes antagonistas estão representados na figura 12. Os valores numéricos das curvas de inibição estão resumidos na Tabela I.



**Figura 11** - Efeitos dos antagonistas muscarínicos p-F-HHSiD (A) e metoctramina (B) sobre a secreção de insulina estimulada por 50  $\mu$ M de OXO-M em ilhotas de rato incubadas em meio contendo 5,6 m de glicose. Os valores médios ( $\pm$ SEM) foram obtidos a partir de 12 experimentos, expressos em nanogramas de insulina secretada por ilhota por h. Cada experimento corresponde ao valor observado em incubação de 5 ilhotas.



**Figura 12** - Inibição da secreção de insulina pelos antagonistas pirenzepina, 4-DAMP e p-F-HHSiD. As ilhotas foram estimuladas por 50  $\mu$ M de OXO-M, na presença de 5,6 mM de glicose. As curvas foram obtidas pelo ajuste sigmoidal dos valores normalizados, representados nas figs 7-B, 9-B e 11-A.

**Tabela I** - Inibição da secreção de insulina por diferentes antagonistas. As ilhotas foram estimuladas por 50  $\mu$ M de OXO-M, na presença de 5,6 mM de glicose.

Antagonista	Secreção controle *	R. máxima *	Inibição †	IC <sub>50</sub> †	n †
	(ng/ilhota/h)	(ng/ilhota/h)	(ng/ilhota/h)	(nM)	
Pirenzepina	0,92 $\pm$ 0,09	2,44 $\pm$ 0,11	0,76 $\pm$ 0,07	18,8 $\pm$ 3,8	10
4-DAMP	0,75 $\pm$ 0,06	1,57 $\pm$ 0,10	0,74 $\pm$ 0,07	5,4 $\pm$ 1,3	10
p-F-HHSiD	0,46 $\pm$ 0,04	1,24 $\pm$ 0,07	0,60 $\pm$ 0,03	337 $\pm$ 138	12
Metocramina	0,60 $\pm$ 0,04	2,40 $\pm$ 0,14	1,99 $\pm$ 0,11	-	12

\* secreção observada na ausência de OXO-M e presença dos antagonistas

‡ secreção observada na presença de 50  $\mu$ M de OXO-M e ausência dos antagonistas.

† inibição máxima produzida pelos antagonistas, na presença de 50  $\mu$ M de OXO-M.

‡ concentração de antagonista que determinou a inibição de 50% da resposta máxima.

† número de experimentos

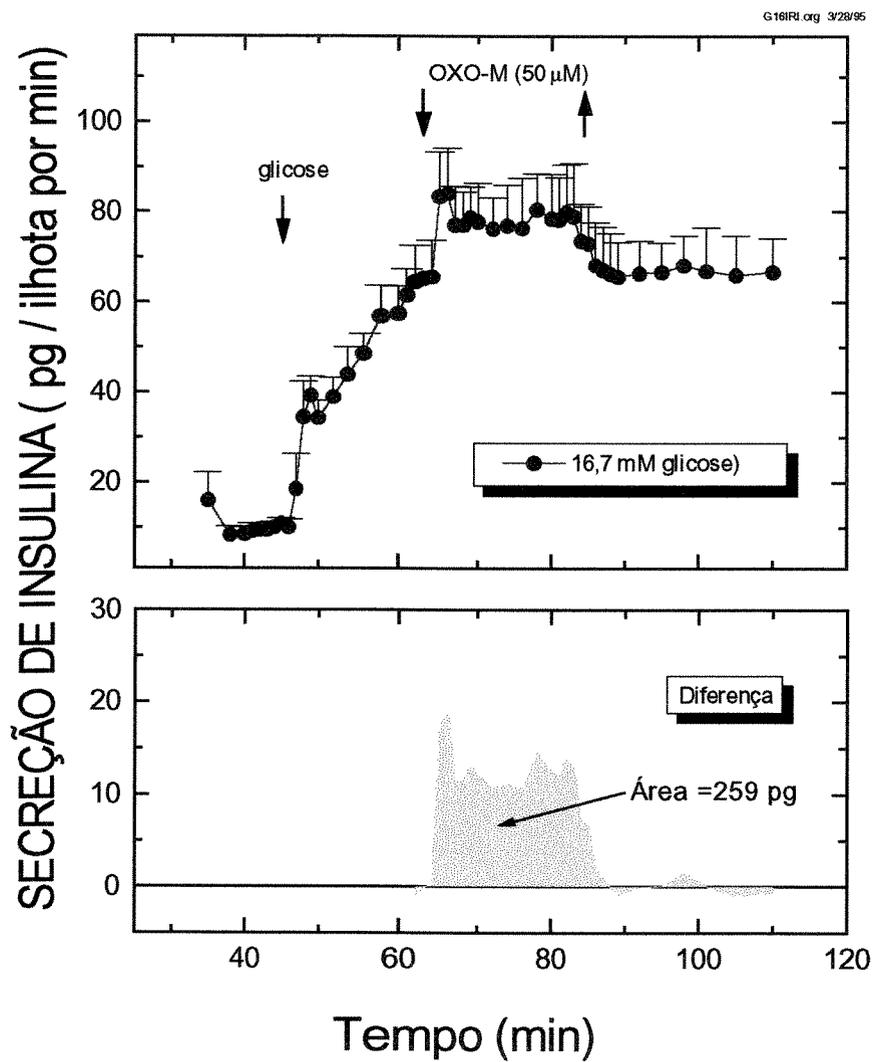
## IV.2. ANÁLISE FUNCIONAL

### **Dependência da glicose para a resposta estimulatória da OXO-M de ilhotas de roedores.**

No intuito de verificar se a ação estimulatória da OXO-M é dependente da presença de glicose, considerada secretagogo natural da insulina, foram realizados experimentos na presença de diferentes concentrações do açúcar. As figuras 12, 13 e 14 evidenciam os efeitos da OXO-M sobre a secreção de insulina por ilhotas de rato, induzida pela glicose.

Na ausência de glicose (fig 12), a secreção basal (min 35° a 44°) foi em média  $10,18 \pm 1,02$  pg/ilhota por min ( $n = 4$ ). A adição de 16,7 mM de glicose ao meio perfusor (min 45°) provocou o aumento bifásico da secreção, alcançando valores médios de  $64,28 \pm 3,54$  pg/ilhota por min, ao final de 20 min de estimulação (média calculada entre os minutos 61° a 64°;  $p < 0,001$ , em relação ao basal). Na presença de glicose, OXO-M induziu aumento adicional na secreção de insulina. Durante os 20 minutos de estimulação (minutos 65° a 84°), a secreção média foi de  $78,54 \pm 2,12$  pg/ilhota por min. O total de insulina secretado durante todo o período de estimulação alcançou 339 pg por ilhota (fig 13, painel inferior).

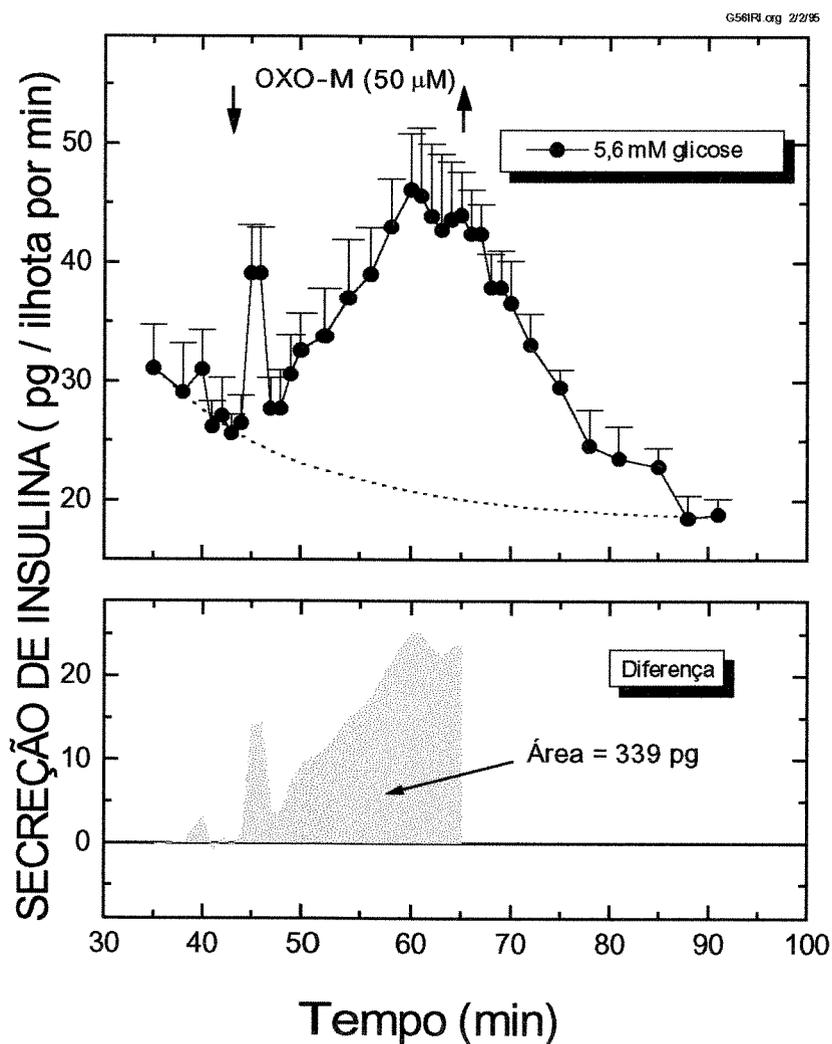
Após a remoção do agonista da solução perfusora, a resposta secretória a glicose retornou a valores semelhantes aos observados antes da adição de OXO-M, ou seja,  $66,81 \pm 2,87$  pg/ilhota por min, medidos entre os min 92° e 110° de perfusão ( $p > 0,5$ ).



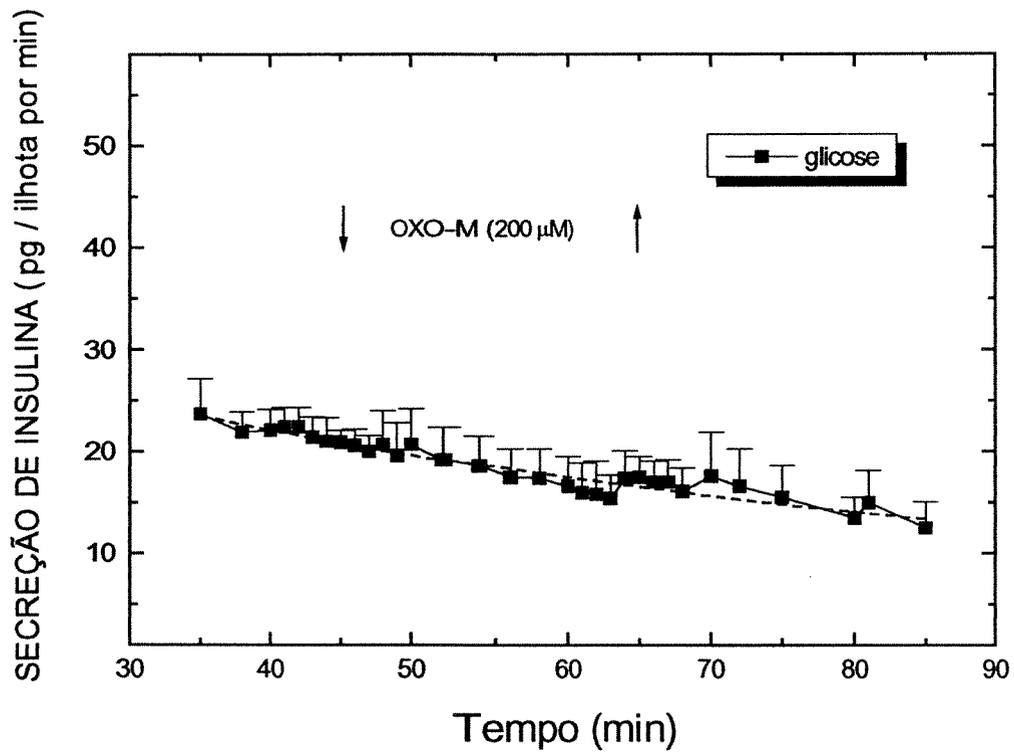
**Figura 12** - Efeito de 50  $\mu$ M de OXO-M sobre a secreção dinâmica de insulina por ilhotas de rato, perfundidas inicialmente na ausência e posteriormente na presença de 16,7 mM de glicose (a partir do min 45 °). Os valores médios ( $\pm$ EPM), expressos em picogramas por ilhota por min, correspondem a 4 experimentos individuais realizados com grupos de 20 ilhotas.

A figura 13 ilustra os efeitos de 50  $\mu$ M de OXO-M sobre a secreção de insulina por ilhotas perfundidas com 5,6 mM de glicose. Na ausência de OXO-M, a secreção basal (min 40°-44°) foi de  $26,95 \pm 1,09$  pg/ilhota por min ( $n = 4$ ). A adição do agonista provocou resposta secretória de aspecto bifásico, caracterizada por um pico inicial transitório (min 45°-46°), seguido de aumento progressivo da secreção (min 47°-64°) e, finalmente, diminuição gradual após a retirada do agonista da solução perfusora. A secreção de insulina atingiu um primeiro pico de  $39,19 \pm 2,73$  pg/ilhota por min ( $p < 0,001$ ), enquanto que a máxima observada (min 60°-64°) foi de  $44,38 \pm 2,31$  pg/ilhota por min ( $p < 0,005$ ). Após correção do correspondente a secreção basal, o total de insulina secretado durante todo o período de estimulação alcançou 339 pg por ilhota (fig 13, painel inferior).

Na ausência de glicose (fig 14), OXO-M não provocou alteração na secreção de insulina. Entre os min 35° e 44° de perfusão, a secreção média obtida foi de  $21,91 \pm 0,76$  pg/ilhota por min ( $n = 4$ ). Comparada a curva teórica obtida a partir destes pontos, nota-se que, na ausência de glicose, a presença do agonista (mesmo em concentração supra-estimulatória) não foi suficiente para produzir variação na resposta secretória.



**Figura 13** - Efeito de 50  $\mu\text{M}$  de OXO-M sobre a secreção de insulina por ilhotas de rato perfundidas em meio contendo 5,6 mM de glicose. Os valores médios ( $\pm\text{EPM}$ ) se referem a 4 experimentos de perfusão, cada um correspondendo a secreção, em picogramas por ilhota por min, obtida em grupos de 20 ilhotas.



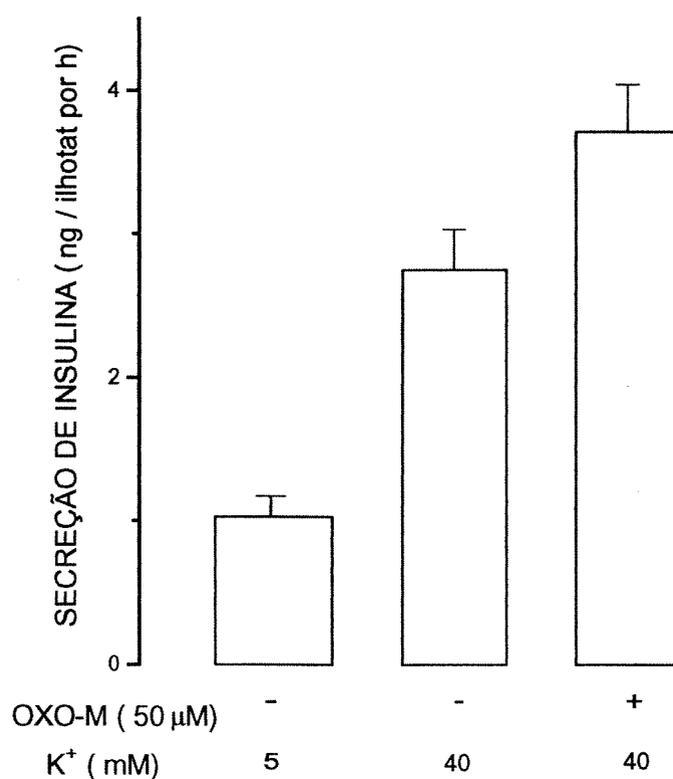
**Figura 14** - Efeito da adição de 200  $\mu$ M de OXO-M sobre a secreção de insulina por ilhotas de rato perfundidas na ausência de glicose no meio extracelular. Os valores médios ( $\pm$ EPM) representam a secreção em picogramas por ilhota por min de perfusão, e correspondem a 4 experimentos individuais com grupos de 20 ilhotas.

Sabe-se que a secreção de insulina induzida pela glicose decorre da despolarização da membrana das células  $\beta$  provocada pelo açúcar após sua metabolização. Com o objetivo de averiguar se a despolarização "per se" é condição suficiente para a potencialização da secreção pela OXO-M, foram realizados experimentos utilizando concentração despolarizante de  $K^+$  extracelular (40 mM; fig 15).

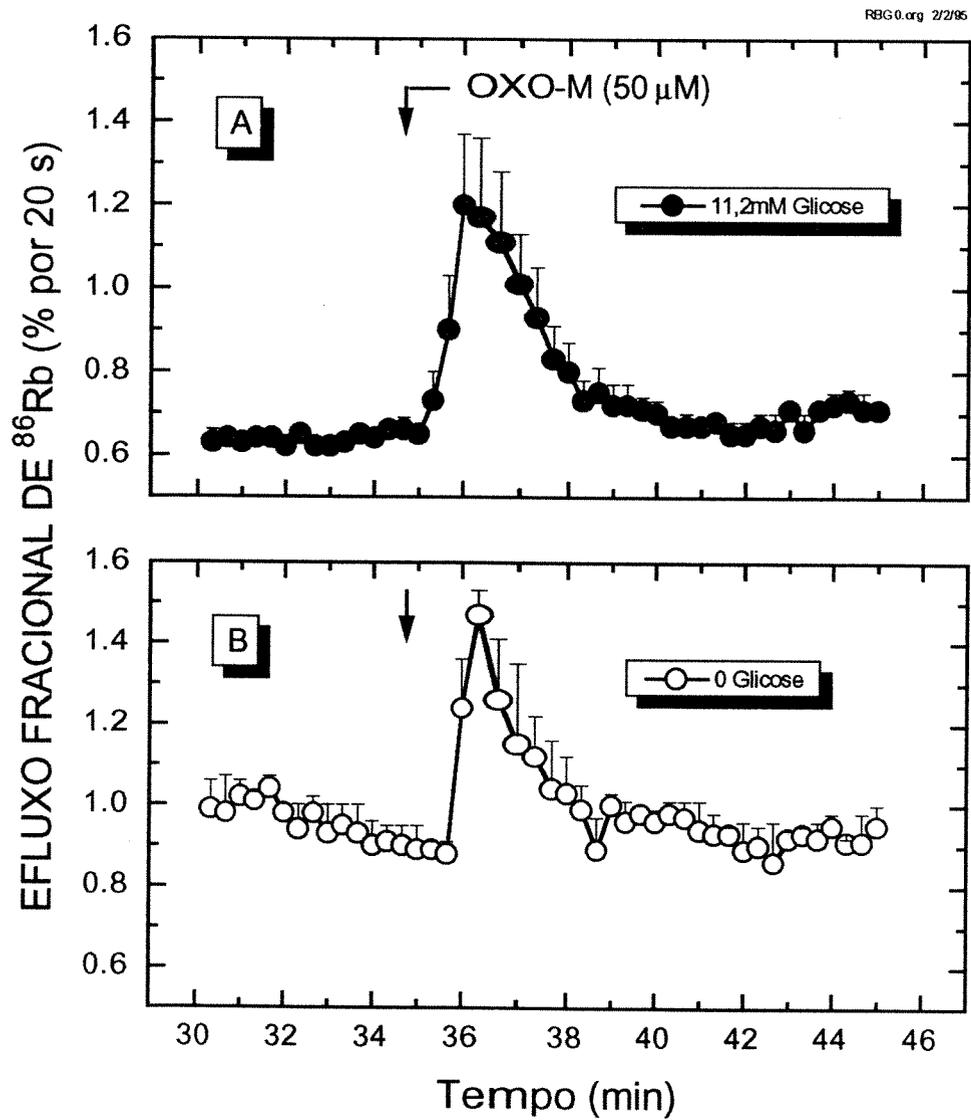
Em condições basais - isto é, 5 mM de  $K^+$  e ausência de glicose e do agonista, a secreção de insulina foi de  $1,03 \pm 0,14$  ng/ilhota por h ( $n = 12$ ). Na presença de 40 mM de  $K^+$ , a secreção atingiu  $2,75 \pm 0,28$  ng/ilhota por h ( $n = 12$ ;  $p < 0,05$ ). A adição de 50  $\mu$ M de OXO-M ao meio contendo alto  $K^+$  promoveu aumento suplementar na secreção, que atingiu  $3,71 \pm 0,33$  ng/ilhota por h, ou seja, 35 % maior que aquela registrada com concentração despolarizante de  $K^+$  ( $n = 12$ ;  $p < 0,05$ ).

As alterações na resposta secretória das células  $\beta$  são geralmente precedidas por mudanças da permeabilidade da membrana a determinados íons. Neste sentido, a análise dos fluxos de radioisótopos permite conhecer a natureza dos movimentos iônicos envolvidos no processo de secreção. A figura 16 representa o efeito da adição de 50  $\mu$ M de OXO-M sobre o efluxo de  $^{86}\text{Rb}$  - utilizado como substituto do  $K^+$  - de ilhotas de camundongo na ausência (fig 16-B) ou em presença de 11,2 mM de glicose (fig 16-A). Antes da adição do agonista (min 30° a 34°), a taxa basal de efluxo do  $^{86}\text{Rb}$  foi de  $0,92 \pm 0,01$  ( $n = 4$ ) e de  $0,64 \pm 0,01$  % por 20 s ( $n = 4$ ), respectivamente na ausência e na presença de 11,2 mM de glicose. Comparados entre si, observa-se uma redução na taxa de efluxo do isótopo na presença de glicose ( $p < 0,01$ ), devida ao conhecido bloqueio dos canais de  $K^+$  regulados pelo ATP (COOK & HALES, 1984). A adição de 50  $\mu$ M de OXO-M (min 35°) resultou no aumento imediato do efluxo de  $^{86}\text{Rb}$ , tanto na presença como na ausência de glicose, atingindo valores máximos em 1,5 min de

estimulação. Neste instante os valores observados foram de  $1,47 \pm 0,06$  e  $1,20 \pm 0,17$  % por 20 s, respectivamente na ausência e na presença de glicose. Em seguida, a taxa de efluxo decaiu gradativamente em ambos os grupos, atingindo valores próximos ao basal em aproximadamente 6 min.

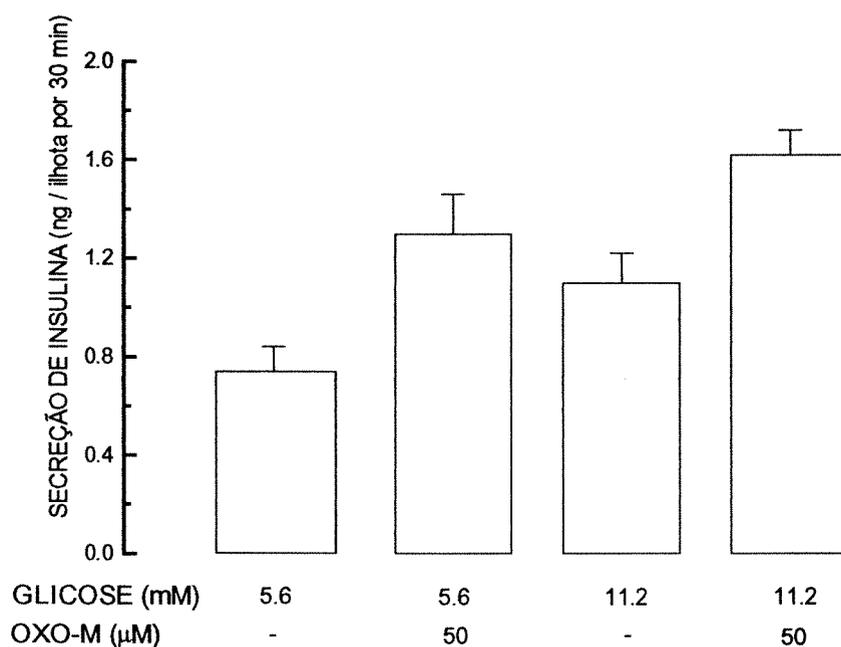


**Figura 15** - Efeitos do aumento na concentração de K<sup>+</sup> (40mM) e de OXO-M (50 µM) sobre a secreção de insulina por ilhotas de rato incubadas na ausência de glicose. A osmolaridade da solução contendo 40 mM de K<sup>+</sup> foi corrigida reduzindo-se a concentração de Na<sup>+</sup>. Os valores médios ( $\pm$ EPM) foram obtidos a partir de 12 experimentos, expressos em nanogramas de insulina secretada por ilhota por h. Cada experimento corresponde ao valor observado em incubação de 5 ilhotas.



**Figura 16** - Efeitos de OXO-M ( $50\ \mu\text{M}$ ) sobre a taxa de efluxo fracional do  $^{86}\text{Rb}$  de ilhotas de camundongo perfundidas na ausência (B) ou presença de 11,2 mM de glicose (A). São indicados na figura os valores médios ( $\pm\text{EPM}$ ) correspondentes a 4 experimentos para cada condição experimental.

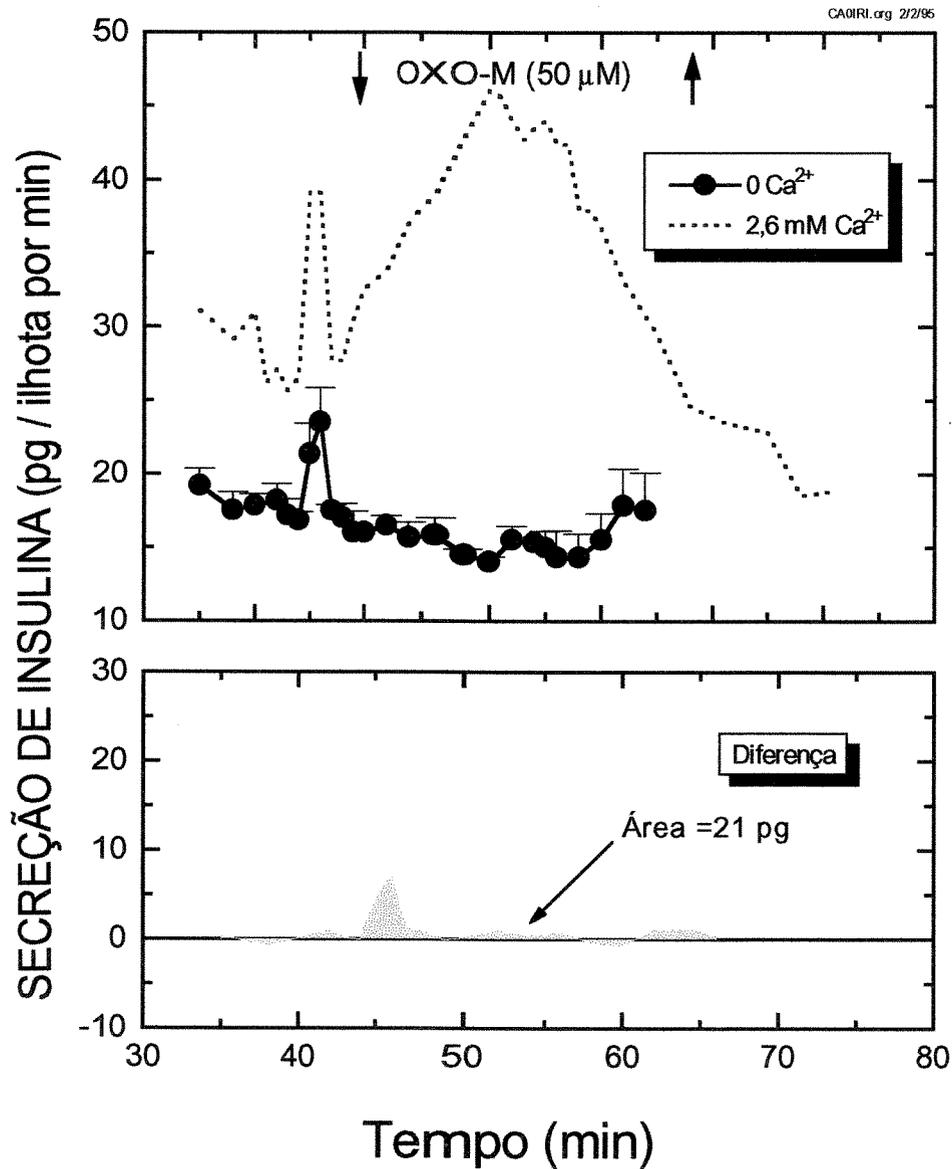
A figura 17 ilustra o efeito da OXO-M sobre a secreção de insulina por ilhotas de camundongo incubadas na presença de diferentes concentrações de glicose. Após 30 min de incubação, a secreção de insulina atingiu  $0,74 \pm 0,11$  ng/ilhota na presença 5,6 mM de glicose ( $n = 9$ ). O aumento da concentração de glicose para 11,2 mM elevou a resposta secretória a  $1,10 \pm 0,12$  ng/ilhota por 30 min ( $n = 9$ ). A adição do agonista OXO-M ( $50 \mu\text{M}$ ) na solução de incubação promoveu aumento na secreção de insulina em ambas as concentrações de glicose, tendo sido obtidos valores de  $1,30 \pm 0,16$  ( $p < 0,02$ ) e  $1,62 \pm 0,12$  ( $p < 0,01$ ;  $n = 12$ ) respectivamente com 5,6 e 11,2 mM de glicose.



**Figura 17** - Efeitos de  $50 \mu\text{M}$  de OXO-M sobre a secreção de insulina por ilhotas de camundongo incubadas por 30 min, na presença de 5,6 ou 11,1 mM de glicose. Os valores médios ( $\pm\text{EPM}$ ) foram obtidos a partir de 9 a 12 experimentos, cada um correspondendo a secreção, em nanogramas por ilhota por 30 min, obtida em incubação de 8 ilhotas.

### **Dependência do $\text{Ca}^{2+}$ extracelular**

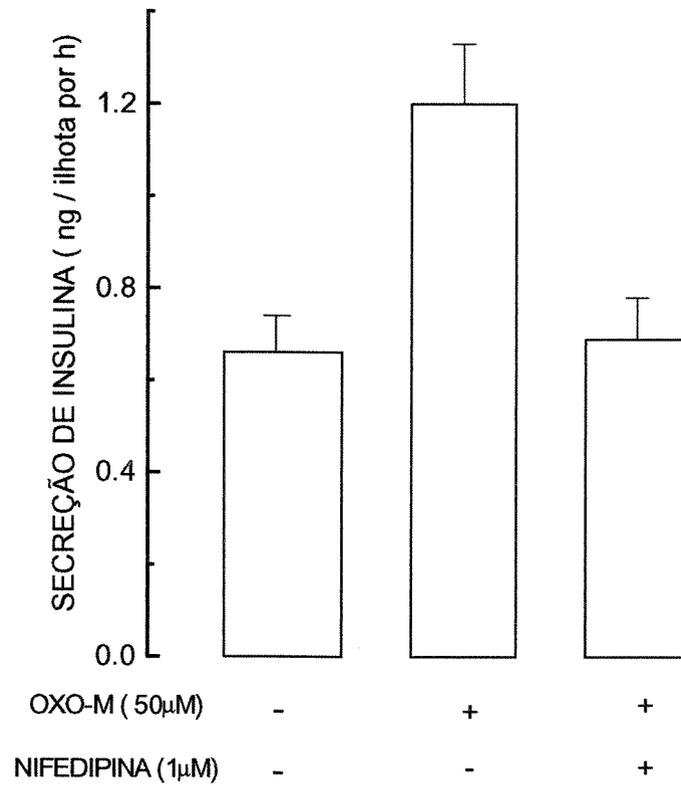
Outro aspecto analisado foi a dependência do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular para a resposta estimulatória da OXO-M. Como primeira abordagem foi avaliado o efeito da presença do íon cálcio no meio extracelular sobre a secreção dinâmica de insulina de ilhotas estimuladas por 50  $\mu\text{M}$  de OXO-M (fig.18). Em meio perfusor sem a adição de  $\text{Ca}^{2+}$ , a secreção basal (min 40° a 44°) foi em média  $17,63 \pm 0,87$  pg/ilhota por min (n = 4). O efeito estimulatório da OXO-M, observado quando da presença de 2,6 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ , foi drasticamente suprimido. Na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, o pico de secreção, observado no minuto 46°, foi de  $23,50 \pm 2,32$  pg/ilhota por min. Embora diferente da secreção basal ( $p < 0,05$ ), o total de insulina secretada em resposta ao agonista, nesta condição experimental, foi apenas 6,2 % daquela observada em presença de 2,6 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  no meio perfusor (linha pontilhada representando os valores mostrados na fig. 13).



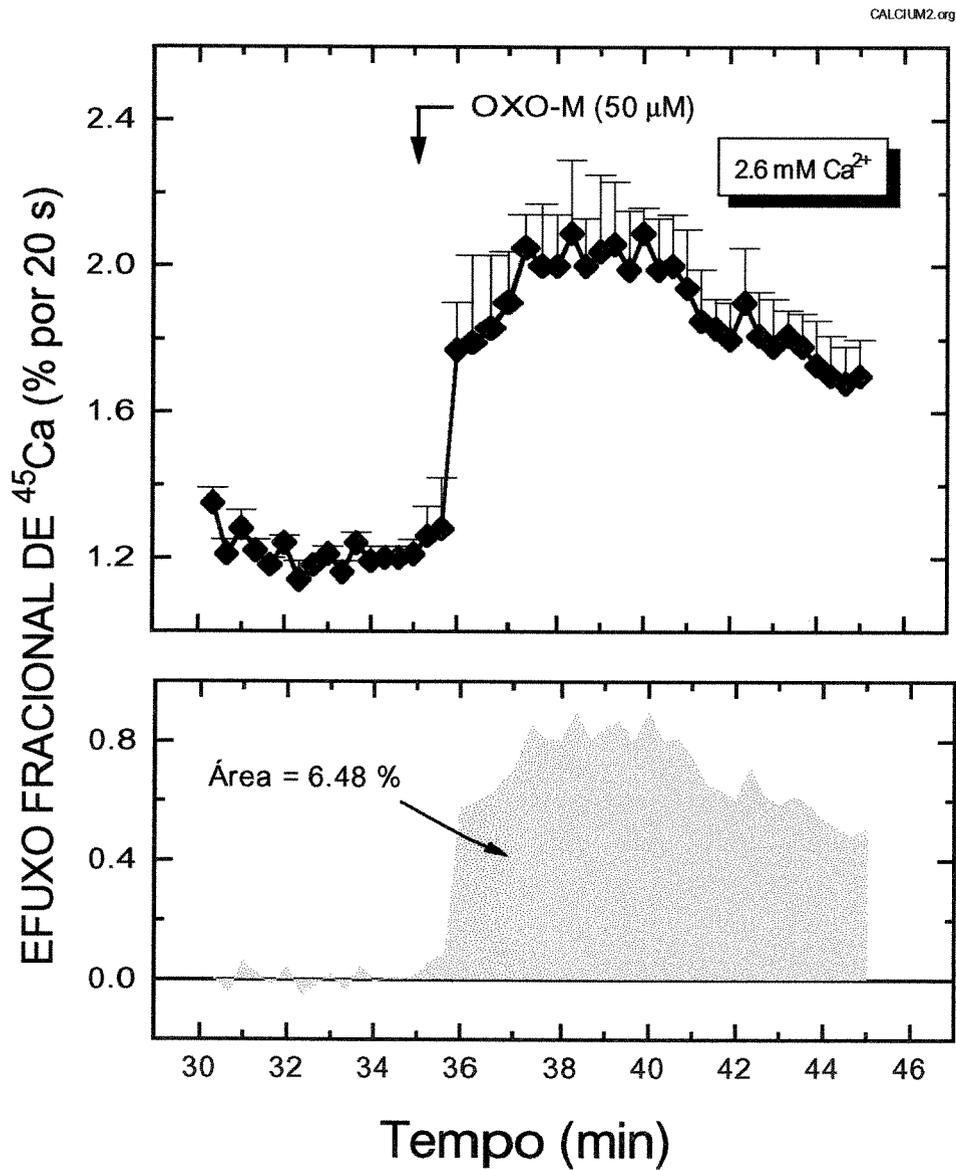
**Figura 18** - Efeitos da omissão do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular sobre a secreção de insulina por ilhotas de rato estimuladas por  $50 \mu\text{M}$  de OXO-M, perfundidas na presença de  $5,6 \text{ mM}$  de glicose. As médias ( $\pm\text{EPM}$ ) indicadas na figura são representativas de 4 experimentos de perfusão, cada um contendo 20 ilhotas. A linha pontilhada representa os valores de secreção observados na presença de  $2,6 \text{ mM}$  de  $\text{Ca}^{2+}$ , mostrados na fig 13 e repetidos para comparação.

Uma outra estratégia utilizada para o estudo da dependência do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular foi aplicada com o uso do bloqueador de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  nifedipina. Observa-se na figura 19 que o aumento na resposta provocado pela OXO-M, de  $0,66 \pm 0,08$  para  $1,20 \pm 0,13$  ng/ilhota por h ( $n = 12$  e  $10$ , respectivamente), foi completamente inibido quando a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  nas células foi bloqueada pelo antagonista ( $0,69 \pm 0,09$  ng/ilhota por h,  $n = 10$ ).

Com base nas alterações da concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  provocadas pela OXO-M, e no intuito de estudar sua proveniência (extra ou intracelular) e estabelecer a correlação com o aumento no efluxo de  $^{86}\text{Rb}$ , foram realizados experimentos de perfusão utilizando-se  $^{45}\text{Ca}$  como traçador do  $\text{Ca}^{2+}$ . A figura 20 ilustra os efeitos da adição de  $50 \mu\text{M}$  de OXO-M sobre o efluxo do  $^{45}\text{Ca}$  por ilhotas perfundidas na presença de glicose, em solução contendo  $2,6 \text{ mM}$  de  $\text{Ca}^{2+}$ . Antes da introdução do agonista no meio perfusor, o efluxo médio foi de  $1,20 \pm 0,01$  % por 20 s ( $n = 3$ ). Na presença de OXO-M, observou-se rápido aumento no efluxo do isótopo, que atingiu  $1,77 \pm 0,13$  % por 20 s no 1º min de estimulação. Após 6 min, a taxa de efluxo decaiu gradativamente, mantendo-se porém em níveis maiores que os basais até o final do experimento (min 45º,  $1,70 \pm 0,10$  % por 20 s;  $p < 0,001$ ). O montante de  $^{45}\text{Ca}$  liberado pelas ilhotas durante todo o período de estimulação foi  $6,48$  % do conteúdo total, calculado após subtração da curva traçada a partir do período basal (minutos 30º a 34º).



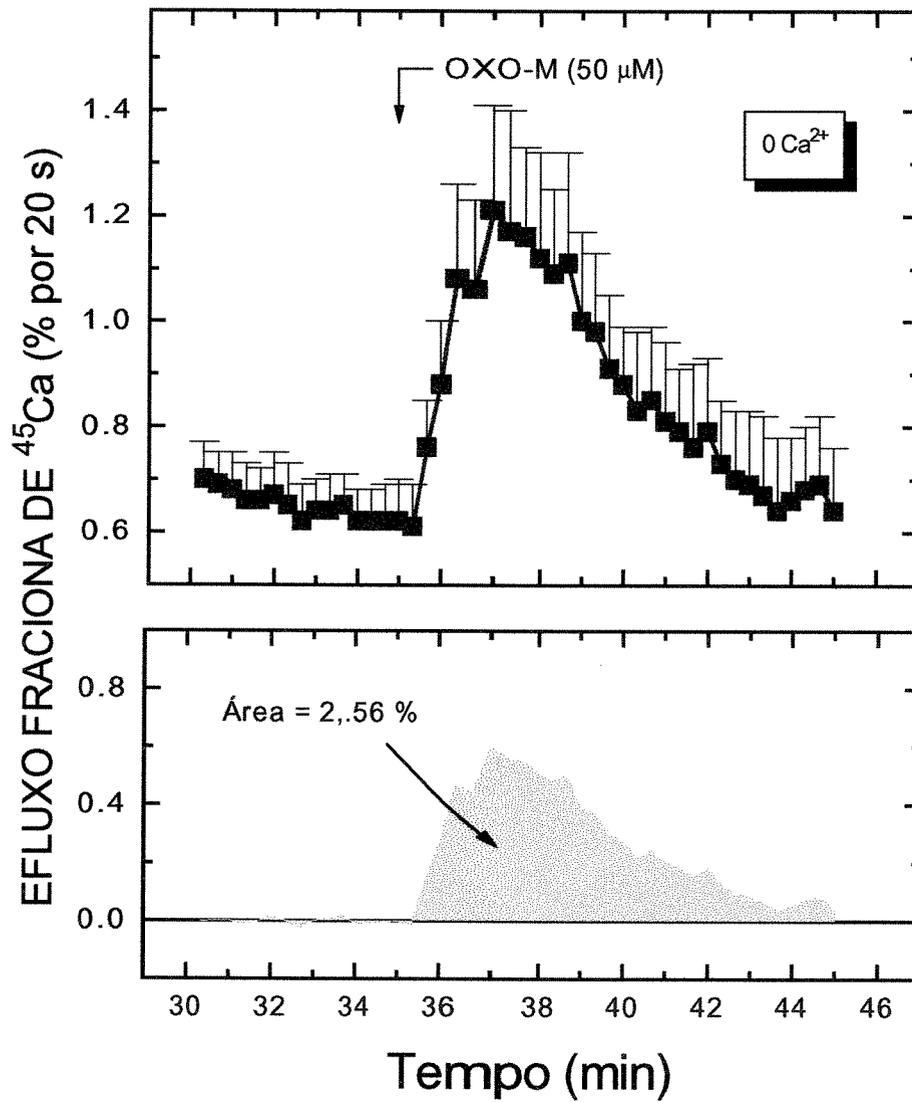
**Figura 19** - Efeitos da nifedipina sobre a secreção de insulina estimulada por OXO-M em ilhotas de rato, incubadas na presença de 5,6 mM de glicose. OS valores médios ( $\pm$ EPM) foram obtidos a partir de 10 a 12 experimentos individuais, expressos em nanogramas de insulina secretada por ilhota por h. Cada experimento corresponde a incubação de 5 ilhotas.



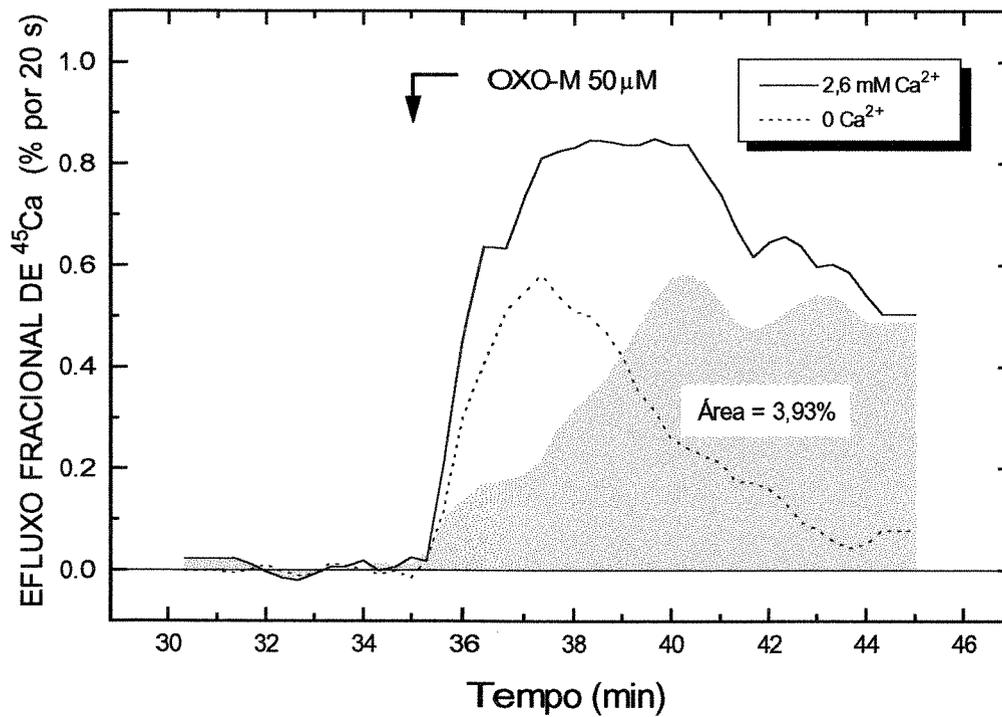
**Figura 20** - Efeitos de OXO-M ( $50\ \mu\text{M}$ ) sobre a taxa de efluxo fracional do  $^{45}\text{Ca}$  de ilhotas de camundongo perfundidas na presença de  $11,2\ \text{mM}$  de glicose e  $2,6\ \text{mM}$  de  $\text{Ca}^{2+}$ . Estão representados na figura os valores médios ( $\pm\text{EPM}$ ), correspondentes a 3 experimentos.

Utilizando a técnica de efluxo foi possível também estudar o fluxo unidirecional de  $\text{Ca}^{2+}$  através da membrana plasmática. Para este tipo de análise é necessário perfundir as ilhotas com solução desprovida de  $\text{Ca}^{2+}$ , evitando-se assim a troca  $^{45}\text{Ca} - ^{40}\text{Ca}$  entre os meios intra e extracelular (HERCHUELZ et al., 1980). A figura 21 representa o efeito da OXO-M sobre o efluxo de  $^{45}\text{Ca}$  de ilhotas perfundidas na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. A adição do agonista ao meio provocou aumento significativo no efluxo do isótopo, variando de  $0,62 \pm 0,07$  para o período basal a  $1,21 \pm 0,20$  % por 20 s para o valor máximo ( $n = 4$ ;  $p < 0,02$ ), atingido 2 min após o início da estimulação. A seguir, a taxa de efluxo decaiu gradativamente, retornando a valores próximos do basal em aproximadamente 6 min. Em 15 min de estimulação, o total de  $^{45}\text{Ca}$  perdido pelas ilhotas foi de 2,56 %, em relação ao conteúdo inicial do isótopo das ilhotas.

Na figura 22 foram novamente representadas as áreas equivalentes ao efluxo de  $^{45}\text{Ca}$ , obtidas nos experimentos contendo (fig 20) ou não (fig 21)  $\text{Ca}^{2+}$  no meio extracelular, bem como a diferença entre elas. Esta diferença corresponde ao efluxo dependente do componente extracelular. Observa-se que o componente rápido de efluxo, com valores máximos no 37° min de perfusão (linha pontilhada), deve-se a participação do  $\text{Ca}^{2+}$  liberado de compartimentos intracelulares. Por sua vez, o componente extracelular (representado pela área preenchida sob a curva) aparece tardiamente, apresentando elevação gradativa da taxa de efluxo até o valor máximo no min. 40° (portanto 3 min após o pico de  $\text{Ca}^{2+}$  proveniente do intracelular). Além disso, o componente extracelular foi mantido até o final da perfusão, enquanto que o intracelular decaiu progressivamente, retornando a valores próximos dos basais.



**Figura 21** - Efeitos de OXO-M (50μM) sobre a taxa de efluxo fracional do <sup>45</sup>Ca de ilhotas de camundongo perfundidas na presença de 11,2 mM de glicose e ausência de Ca<sup>2+</sup>. Estão representados na figura os valores médios ( $\pm$ EPM), correspondentes a 4 experimentos.

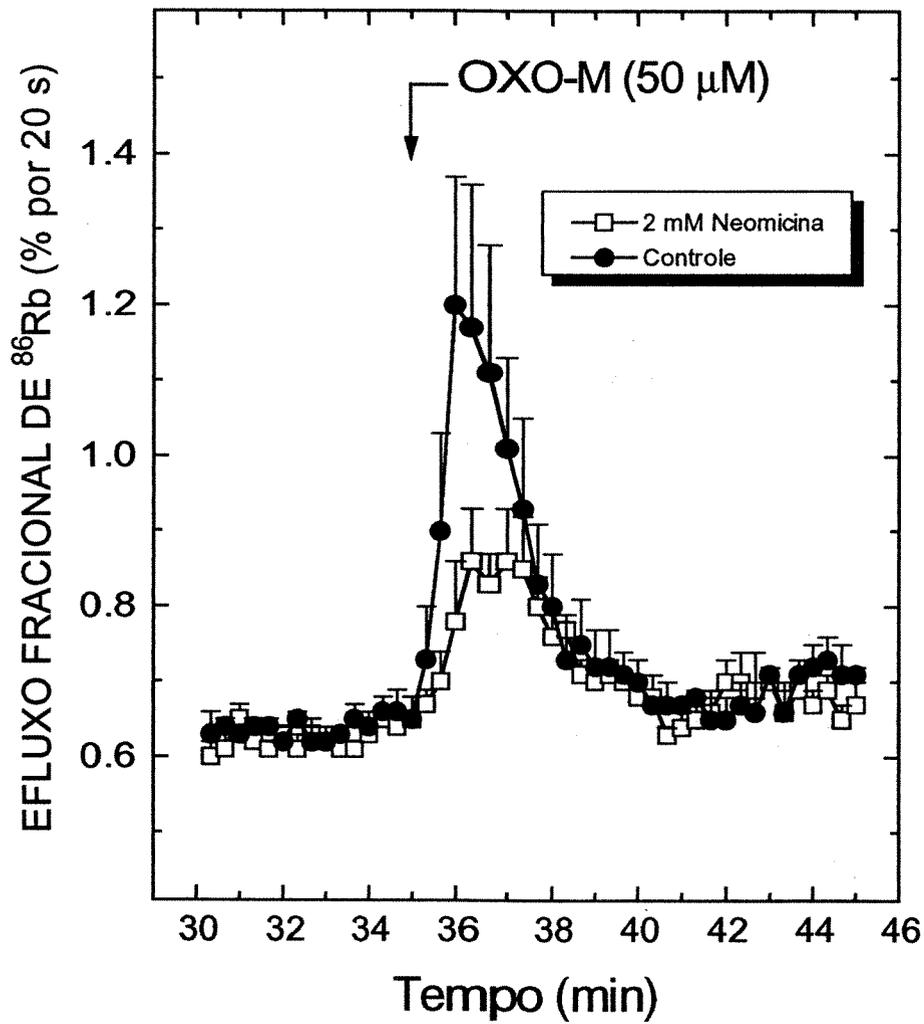


**Figura 22** - Efeitos de OXO-M (50 $\mu\text{M}$ ) sobre a taxa de efluxo fracional do  $^{45}\text{Ca}$  de ilhotas perfundidas na ausência (linha pontilhada) ou presença de 2,6 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  (linha tracejada). A área destacada representa a diferença do efluxo entre as duas condições experimentais, calculada pelas curvas atenuadas obtidas a partir dos dados representados nas figs 20 e 21.

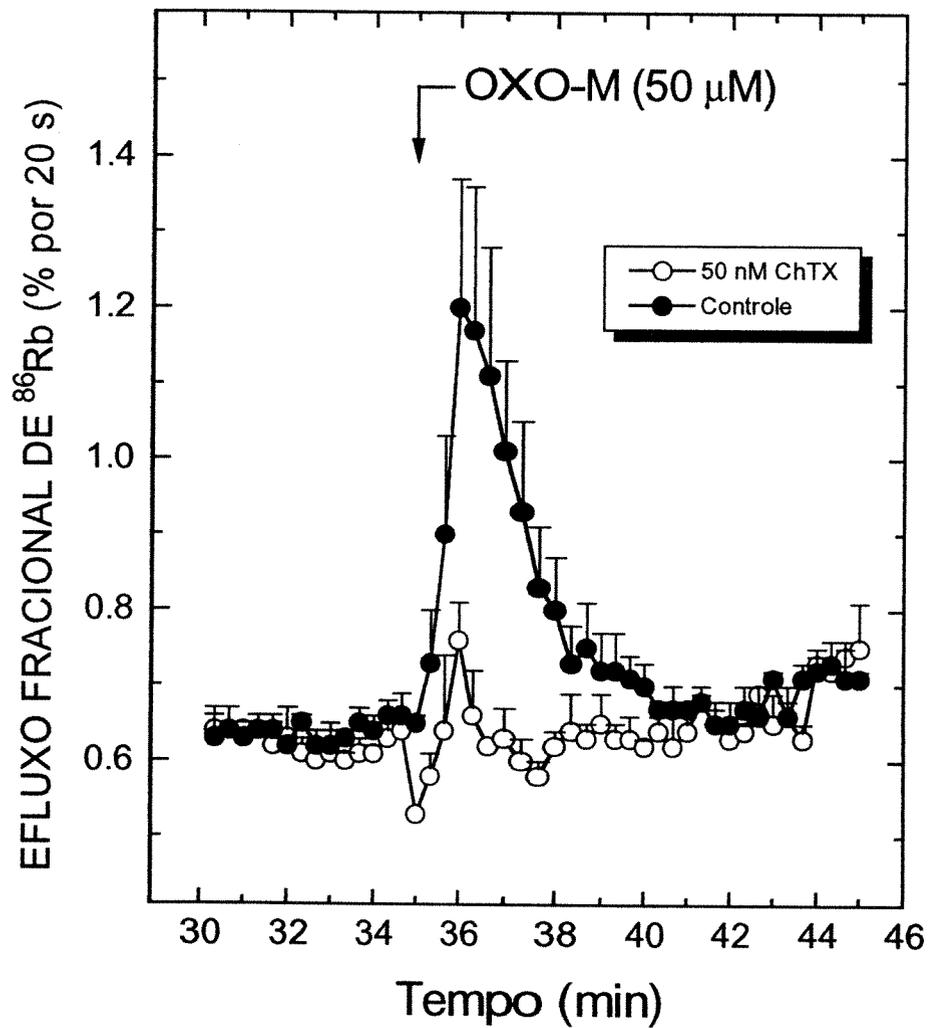
Como demonstrado anteriormente (fig 16), a adição de OXO-M no meio perfusor promoveu aumento no efluxo do  $^{86}\text{Rb}$  (utilizado como traçador do  $\text{K}^+$ ). A fim de estudar a via de saída de  $\text{K}^+$  das células, o mesmo protocolo experimental representado na fig 16 foi repetido na presença de um inibidor da síntese de  $\text{IP}_3$  (neomicina; fig 23) ou de um bloqueador específico dos  $\text{K}_{\text{Ca}}$  (caribdotoxina; fig 24).

Em ilhotas perfundidas com meio contendo neomicina, o efluxo médio basal foi de  $0,63 \pm 0,01$  % por 20 s ( $n = 4$ ), valores estes idênticos ao controle ( $p > 0,3$ ). A adição de  $50 \mu\text{M}$  de OXO-M resultou num pequeno aumento na taxa fracional de efluxo do  $^{86}\text{Rb}$ , com máximo de  $0,85 \pm 0,03$  % por 20 s, observado entre os min  $36^\circ$  e  $37^\circ$ . Este aumento foi muito menor que aquele observado na ausência de neomicina, durante o mesmo intervalo de tempo ( $p < 0,001$ ). Comparado ao controle, neomicina inibiu em 50 % a resposta produzida pela OXO-M.

Por sua vez, ChTX inibiu completamente o efeito da OXO-M sobre a saída de  $^{86}\text{Rb}$  das células insulares. O efluxo basal não foi alterado pelo bloqueador dos  $\text{K}_{\text{Ca}}$ , uma vez que os valores médios observados ( $0,61 \pm 0,02$  % por 20 s,  $n = 2$ ) foram semelhantes nos 2 grupos ( $p > 0,05$ ). Na presença de OXO-M, o efluxo médio foi de  $0,67 \pm 0,02$  % por 20 s entre os min  $36^\circ$  e  $37^\circ$ , valores estes diferentes da resposta ao agonista observada na ausência do bloqueador ( $1,20 \pm 0,17$  % por 20 s;  $p < 0,001$ ).



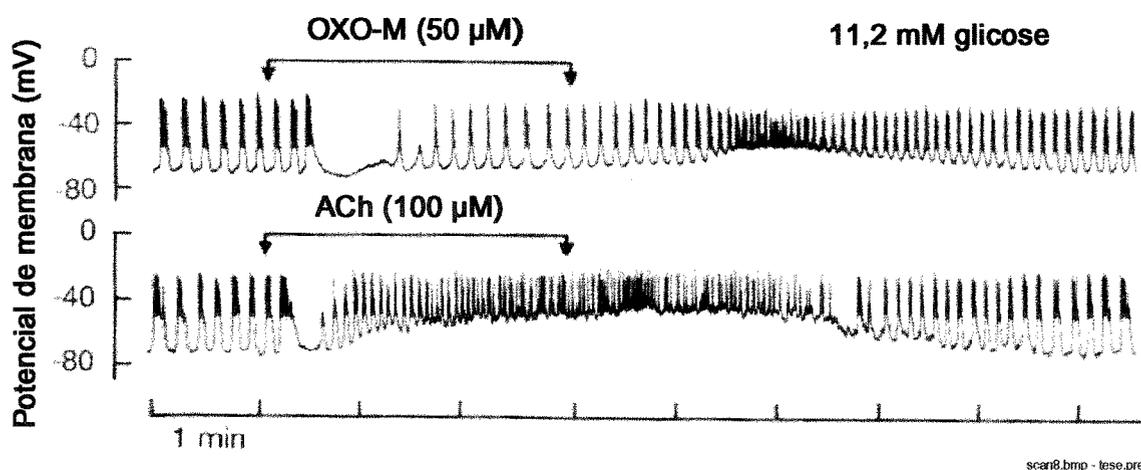
**Figura 23** - Efeitos de OXO-M (50mM) sobre a taxa de efluxo fracional do  $^{86}\text{Rb}$  de ilhotas de camundongo perfundidas na presença de 11,2 mM de glicose e 2 mM de neomicina. Estão representados na figura os valores médios ( $\pm\text{EPM}$ ), correspondentes a 4 experimentos.



**Figura 24** - Efeitos de OXO-M (50mM) sobre a taxa de efluxo fracional do  $^{86}\text{Rb}$  de ilhotas de camundongo perfundidas na presença de 11,2 mM de glicose e 50 nM de caribdotoxina (ChTX). Estão representados na figura os valores médios ( $\pm\text{EPM}$ ), correspondentes a 2 experimentos.

### IV.3. ANÁLISE ELETROFISIOLÓGICA

A atividade elétrica de células  $\beta$  provocada pela presença de concentrações intermediárias de glicose consiste de uma sucessão regular de oscilações no potencial de membrana, compostas por períodos de despolarização (*bursts*), superpostos por disparos contínuos de potenciais de ação (*spikes*), e por períodos de repolarização da membrana. A presença de ACh ou OXO-M no meio de perfusão produziu profundas modificações no padrão típico de atividade elétrica induzido por 11,2 mM de glicose (fig. 25). Ambos os agonistas induziram uma resposta trifásica, composta por um aumento inicial na frequência de *spikes*, seguida por um período de hiperpolarização, retornando a seguir a atividade de *bursts*.



**Figura 25.** Efeitos dos agonistas OXO-M e ACh sobre a atividade elétrica de células  $\beta$  de camundongo. Os agonistas foram adicionados e removidos, como indicado pelas setas, em meio de perfusão contendo 11,2 mM de glicose.

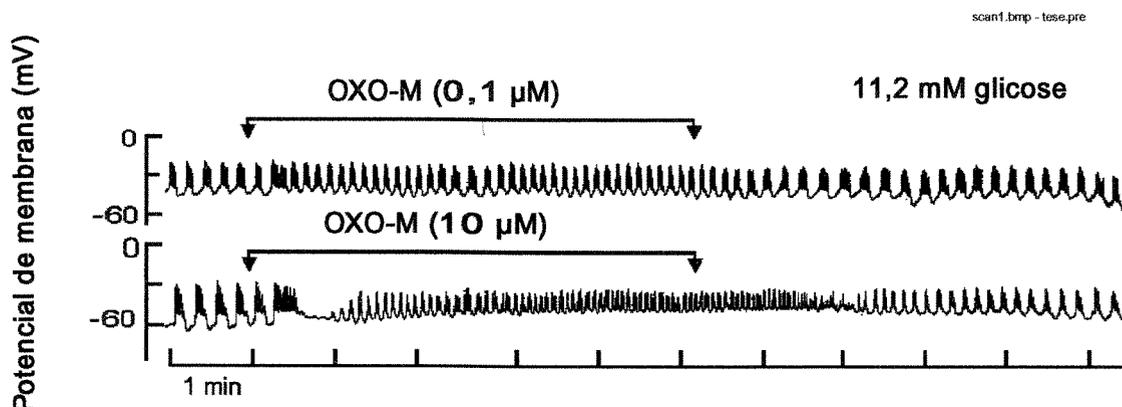
Com 50  $\mu\text{M}$  de OXO-M, o componente hiperpolarizante foi maior que aquele provocado por 100  $\mu\text{M}$  de ACh, ao passo que a despolarização (período estacionário) foi maior na presença de ACh. A remoção dos agonistas provocou o aumento transitório na atividade elétrica, que retomou o padrão inicial após 5 min.

A figura 26 ilustra os efeitos de 0,1 e 10  $\mu\text{M}$  de OXO-M sobre a atividade elétrica induzida por 11,2 mM de glicose. A adição de OXO-M no meio de perfusão promoveu alterações no padrão de *bursts* de forma dose dependente. Na presença de concentrações nanomolares, OXO-M aumentou a frequência de *bursts*, mas não a fração da fase ativa (período de atividade elétrica onde aparecem potenciais de ação). Entretanto, altas concentrações de OXO-M ( $\geq 1$   $\mu\text{M}$ ) induziram alterações multifásicas no padrão de atividade elétrica: inicialmente um período de atividade constante, seguido pela supressão transiente da fase ativa e, finalmente, retomada da atividade de *bursts* com frequência mais alta. Nesta condição, a frequência de *bursts* foi 2 vezes maior daquela observada na ausência do agonista. Os resultados ilustrados na Figura 26 estão representados numericamente na Tabela II.

**Tabela II.** Efeitos da OXO-M (0,01 a 50 $\mu\text{M}$ ) sobre diferentes parâmetros da atividade elétrica induzida por 11,2 mM de glicose.

[OXO-M] ( $\mu\text{M}$ )	0	0,01	0,1	1	10	50
Potencial de membrana (mV)	$-43,5 \pm 3$	$-41 \pm 4,4$	$-39,8 \pm 4,5$	$-36 \pm 5,7$	$-38 \pm 7$	$-37,4 \pm 3.1$
Despolarização (mV)	0	$2,5 \pm 5,3$	$3,7 \pm 5,4$	$7,5 \pm 6,4$	$5,5 \pm 7,6$	$6,1 \pm 4,3$
Frequência ( <i>bursts</i> /min)	$4,3 \pm 0,3$	$4,7 \pm 0,8$	$5,7 \pm 0,5$	$9,4 \pm 1,1$	$10,5 \pm 3$	$8,5 \pm 0,9$
Fase ativa (%)	$46 \pm 2$	$50 \pm 4$	$51 \pm 5$	$53 \pm 2$	$64 \pm 2$	$45 \pm 2$
<i>n</i>	14	4	5	4	2	9

*n* = número de experimentos



**Figura 26.** Efeitos da OXO-M (0,1 e 10  $\mu\text{M}$ ) sobre a atividade elétrica de células  $\beta$  de camundongo. O agonista foi adicionado e removido, como indicado pelas setas, em meio contendo 11,2 mM de glicose.

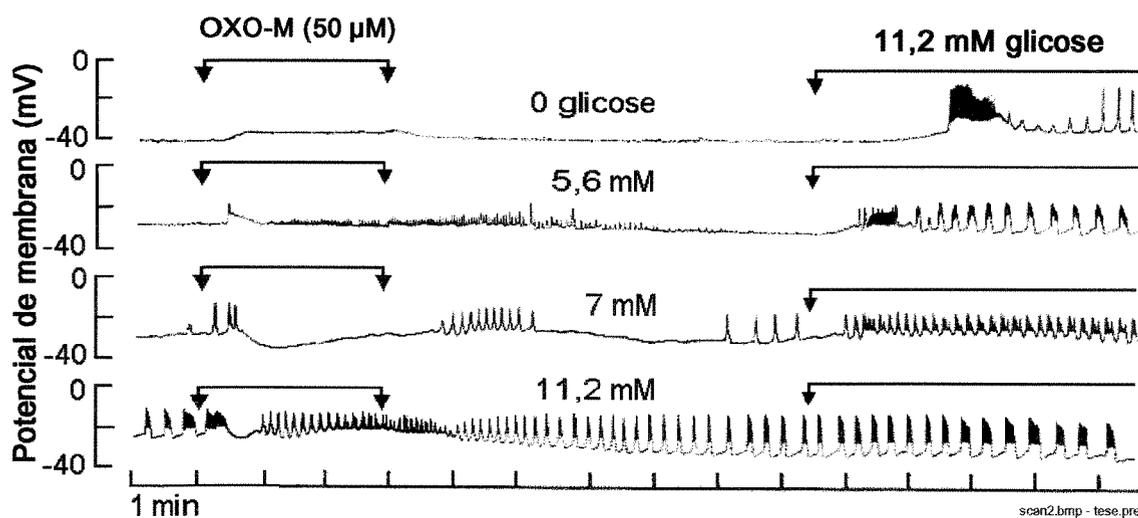
Para melhor caracterizar as alterações elétricas promovidas por altas concentrações de OXO-M, foram realizados experimentos na presença de concentrações crescentes de glicose (fig 27). Na ausência de glicose e OXO-M, o potencial de membrana variou de  $-70,7 \pm 6,4$  mV a  $-64,3 \pm 3,8$  mV na presença de 50  $\mu\text{M}$  de OXO-M ( $n = 3$ ). Na presença de 5,6 mM de glicose, OXO-M provocou despolarização rápida e transiente ( $14,5 \pm 1,3$  mV,  $n = 4$ ), seguida de oscilações no potencial de membrana diferentes do padrão típico de atividade elétrica produzido pela glicose. No estado estacionário (i.e., período de equilíbrio após a estimulação), os valores médios do potencial de membrana não variaram significativamente (Tabela III). Aumentando a concentração de glicose para 7 mM, OXO-M causou inicialmente despolarização da membrana ao nível do platô, com aparecimento transiente de potenciais de ação. A seguir, a atividade elétrica foi abolida, mesmo na presença do agonista. Esta fase se caracterizou por hiperpolarização inicial de  $-7,7 \pm 2,2$  mV ( $n = 3$ ), com o potencial de membrana retornando a seguir aos valores próximos aos basais. Em células perfundidas com 11,2 mM de glicose, OXO-M (50  $\mu\text{M}$ ) modificou o padrão de atividade elétrica de maneira semelhante ao observado com 10  $\mu\text{M}$  do agonista (vide fig. 26). Após 3

min de estimulação, registrou-se uma pequena redução no potencial de membrana (Tabela III).

**Tabela III.** Efeitos de OXO-M (50  $\mu$ M) sobre o potencial de membrana de células perfundidas na presença de 5,6 ou 11,2 mM de glicose. Os valores médios ( $\pm$ EPM) foram obtidos a partir de 5 a 9 células distintas.

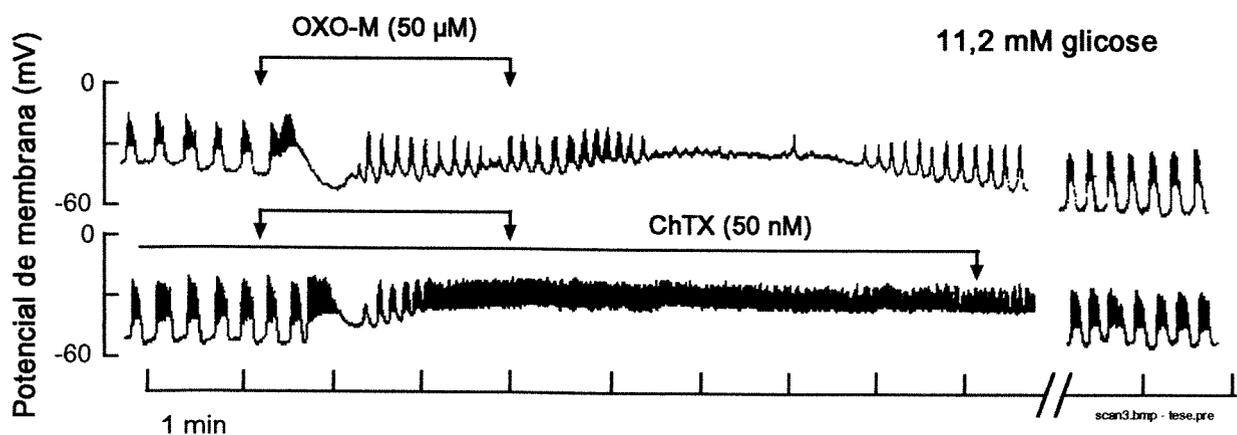
Glucose (mM)	Potencial de Membrana (mV)			n
	Controle	OXO-M estacionário	Varição	
5.6	-51,8 $\pm$ 3,4	-48,8 $\pm$ 4,5*	3 $\pm$ 5,6	5
11	-43.5 $\pm$ 3,0	-37,4 $\pm$ 3,1**	6,1 $\pm$ 4,3	9

n = número de experimentos



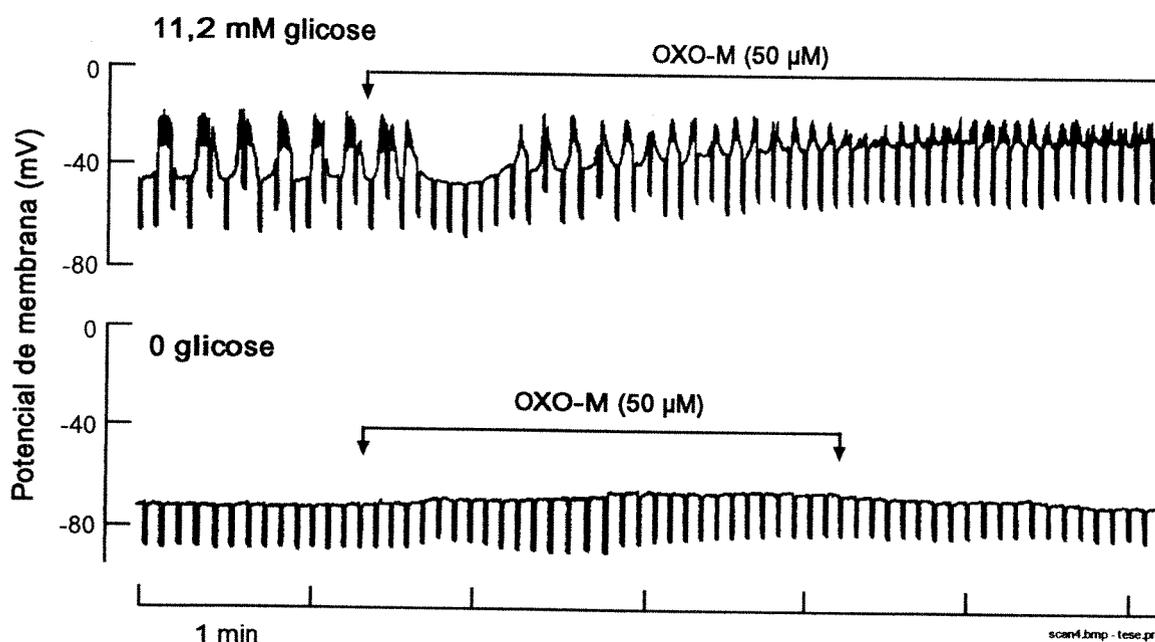
**Figura 27.** Efeitos de 50  $\mu$ M de OXO-M sobre a atividade elétrica de células  $\beta$  de camundongo, perfundidas em meio contendo diferentes concentrações de glicose. As setas indicam o momento da adição e remoção de OXO-M ou de glicose. Os registros foram obtidos em experimentos realizados em diferentes células.

No intuito de estudar a possível participação dos  $K_{Ca}$  na resposta polarizante da OXO-M, alguns experimentos foram repetidos na presença de caribdotoxina (ChTX), um bloqueador específico destes canais. Na presença de ChTX, os efeitos de 50  $\mu$ M de OXO-M sobre a atividade elétrica induzida pela glicose foram drasticamente alterados (fig 28). Após a atividade inicial em *spike*, observou-se que a fase silente foi reduzida em sua duração, acompanhada por despolarização de 15 mV, seguindo-se por período de atividade elétrica contínua. Nenhuma hiperpolarização foi observada com ChTX, embora a supressão transiente da atividade ainda estivesse presente. Em concordância com resultados previamente descritos (KUKULJAN et al, 1991), ChTX não alterou o padrão de atividade elétrica evocado pela glicose.



**Figura 28.** Efeitos de ChTX (50 nM) sobre a atividade elétrica estimulada por 50  $\mu$ M de OXO-M. OXO-M e ChTX foram adicionadas e/ou removidas, como indicado pelas setas, em meio de perfusão contendo 11,2 mM de glicose.

Numa série posterior de experimentos, a resistência da membrana à entrada de corrente foi analisada através da técnica de injeção de corrente. A tabela IV mostra os valores de resistência obtidos na estimulação por OXO-M, na ausência e presença de 11,2 mM de glicose. Tanto na ausência como na presença da glicose, OXO-M promoveu aumento médio de 27% na resistência da membrana, observado após o período de supressão da atividade elétrica (i.e., 40 s após o início da estimulação). Os valores registrados (Tabela IV) foram semelhantes aos descritos para a ACh (SANTOS & ROJAS, 1989).



**Figura 29.** Efeitos de 50  $\mu\text{M}$  de OXO-M sobre a resistência da membrana. Durante o registro elétrico, foram injetados na célula pulsos curtos de corrente hiperpolarizante (0,9 seg, -0,1 nA), através do mesmo eletrodo utilizado para medida do potencial de membrana. OXO-M foi adicionada e removida (como indicado pelas setas), na presença ou ausência de glicose.

**Tabela IV.** Efeitos de OXO-M (50  $\mu$ M) sobre a resistência da membrana de células perfundidas na ausência e presença de 11,2 mM de glicose. Os valores representados foram calculados a partir dos registros realizados em 5 células distintas.

Glicose (mM)	Célula n°	Controle (M $\Omega$ )	OXO-M (M $\Omega$ )	Variação (%)
0	1	107	167	56
0	2	153	175	14
0	3	73	90	23
11,2	1	127	159	25
11,2	2	238	274	15

A partir dos valores médios de potencial de membrana e efluxo de  $^{86}\text{Rb}$  observados na ausência e presença de 11,2 mM de glicose (fig. 16), foram calculadas as permeabilidades ao  $\text{K}^+$  ( $P_{\text{K}}$ ), bem como suas variações provocadas pela adição de 50 mM de OXO-M. Os resultados, apresentados na Tabela V, demonstram que a elevação na taxa de efluxo de  $^{86}\text{Rb}$  está associada a um aumento na  $P_{\text{K}}$ . Entretanto, após este efeito inicial (observado no 1° min da estimulação), tanto na ausência como presença do açúcar, os valores de  $P_{\text{K}}$  retornaram aos valores observados na condição controle (ausência do agonista), indicando assim que o efeito despolarizante é mediado por um mecanismo independente de variações na  $P_{\text{K}}$ .

**Tabela V.** Efeitos de OXO-M (50  $\mu\text{M}$ ) sobre a permeabilidade ao  $\text{K}^+$  por ilhotas de camundongos, perfundidas na ausência ou presença de 11,2 mM de glicose.

		<b>E (mV)</b>	<b><math>K_k (10^{-4} \text{ s}^{-1})</math></b>	<b><math>P_k (10^{-9} \text{ m/s})</math></b>
<b>Glicose 0</b>	Controle	-70,7	5,75	2,84
	<b>OXO-M: inicial</b>	-64,3	9,19	3,85
	<b>OXO-M: estacionário</b>	-64,3	5,81	2,43
<b>Glicose 11,2 mM</b>	Controle	-43,5	4,00	1,00
	<b>OXO-M: inicial</b>	-49,1	7,50	2,15
	<b>OXO-M: estacionário</b>	-37,4	4,50	0,98

E = Potencial de membrana médio, extraído da Tabela II.

$K_K$  = Constante de efluxo do  $\text{K}^+$ , calculada a partir dos valores médios de efluxo do  $^{86}\text{Rb}$  (fig. 16).

$P_K$  = Constante de permeabilidade do  $\text{K}^+$ , calculada pela equação descrita no capítulo Material e Métodos.

Por último, a resposta secretória de ilhotas de camundongo, estimulada por concentrações crescentes de glicose (fig. 2), foi comparada com a resposta elétrica, representada separadamente em 2 parâmetros: frequência de *bursts* (fig. 30-A) e porcentagem da fase ativa (fig. 30-B). Observa-se que o aumento na concentração de OXO-M produziu variação na frequência de *bursts* paralela ao aumento na secreção e insulina. Por sua vez, a fase ativa não apresentou correlação com a resposta secretória estimulada pela OXO-M.

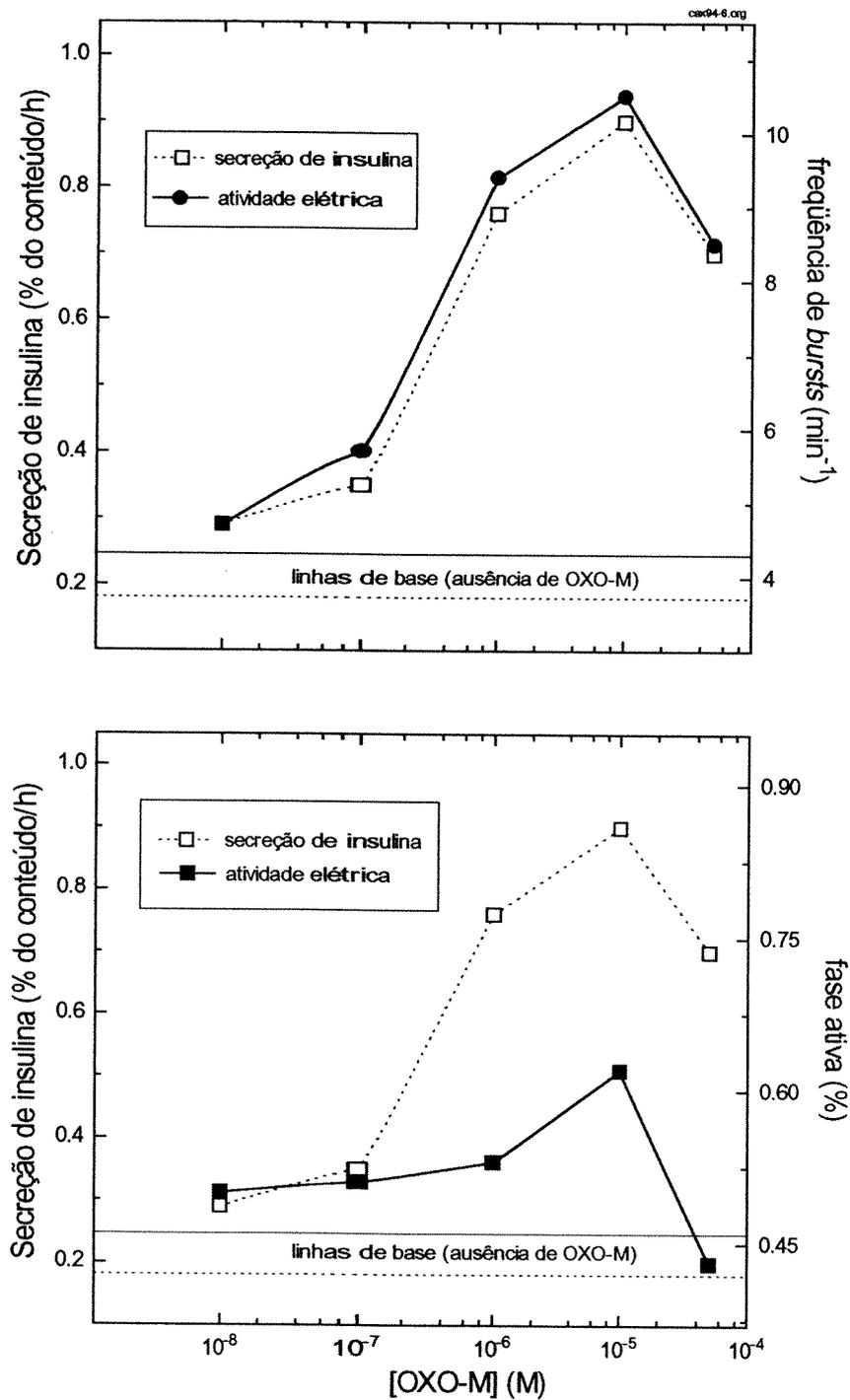


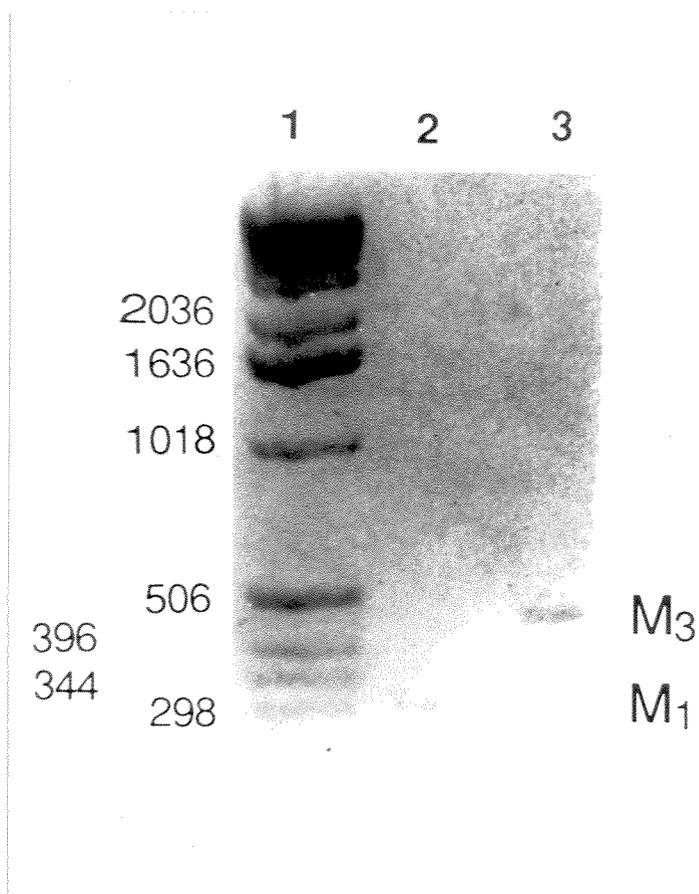
Figura 31. Relação entre frequência de *bursts* (A) e fração da fase ativa (B) e secreção de insulina (linhas tracejadas). Os dados foram extraídos das fig. 2 e tabela II.

## IV.4. APÊNDICE

Os resultados descritos a seguir ilustram alguns experimentos realizados em colaboração com os Drs. Eduardo Rojas e Mirta Szpak-Glasman.

### 4.1. Expressão dos mAChRs.

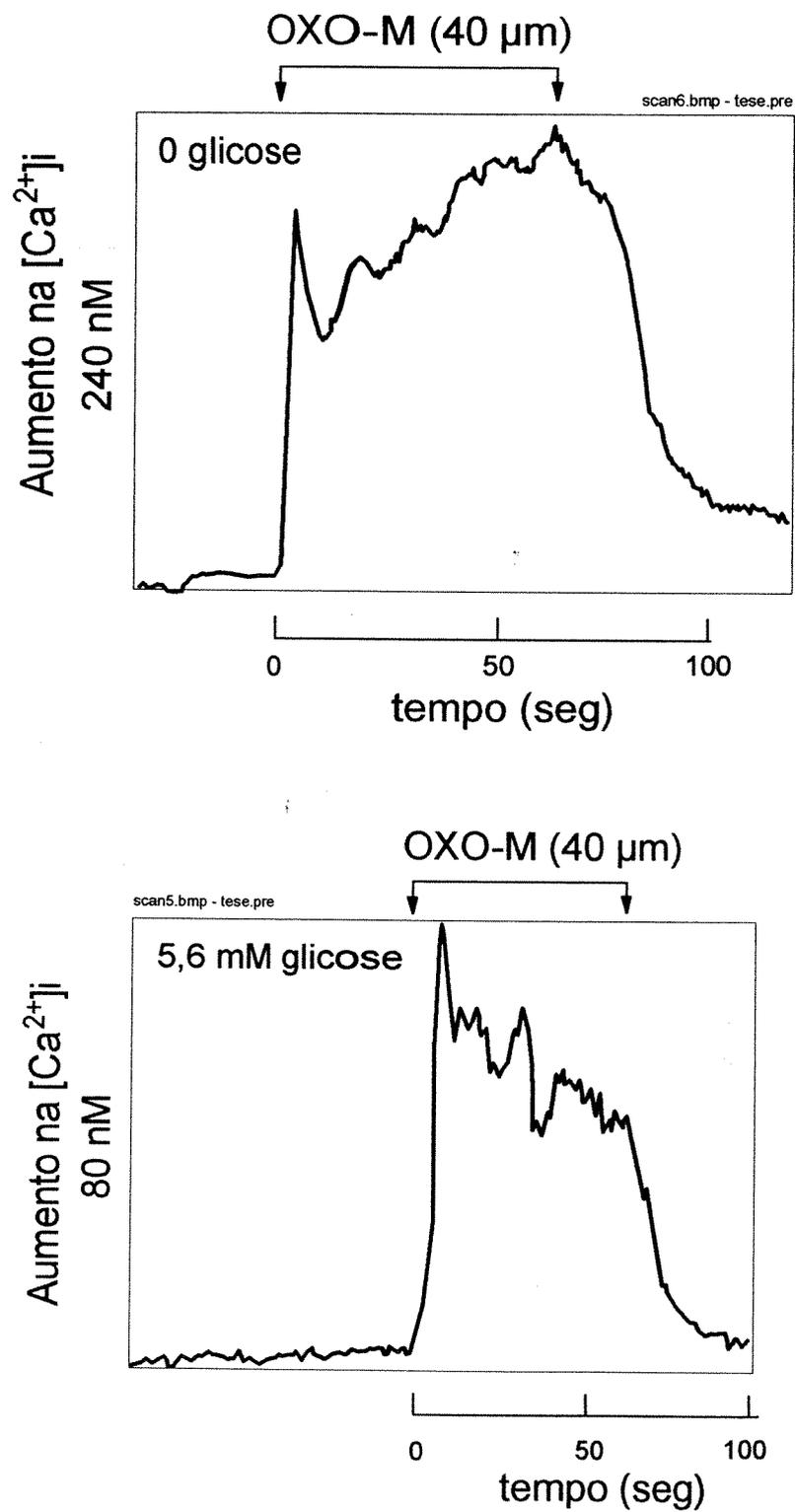
A figura 32 representa a visualização dos fragmentos de cDNA amplificados e submetidos a eletroforese. Observa-se que a amplificação com os *primers* M1 (linha 2) gerou um fragmento de 300 pares de bases. Por sua vez, na reação com os *primers* M3 (linha 3) o fragmento obtido continha aproximadamente 450 pares de bases. Na medida em que os fragmentos esperados nas reações delimitadas pelos primers M1 e M3 eram de, respectivamente 300 e 465 pares de bases, estes resultados sugerem que ambos os subtipos de mAChRs são expressos nas ilhotas de ratos.



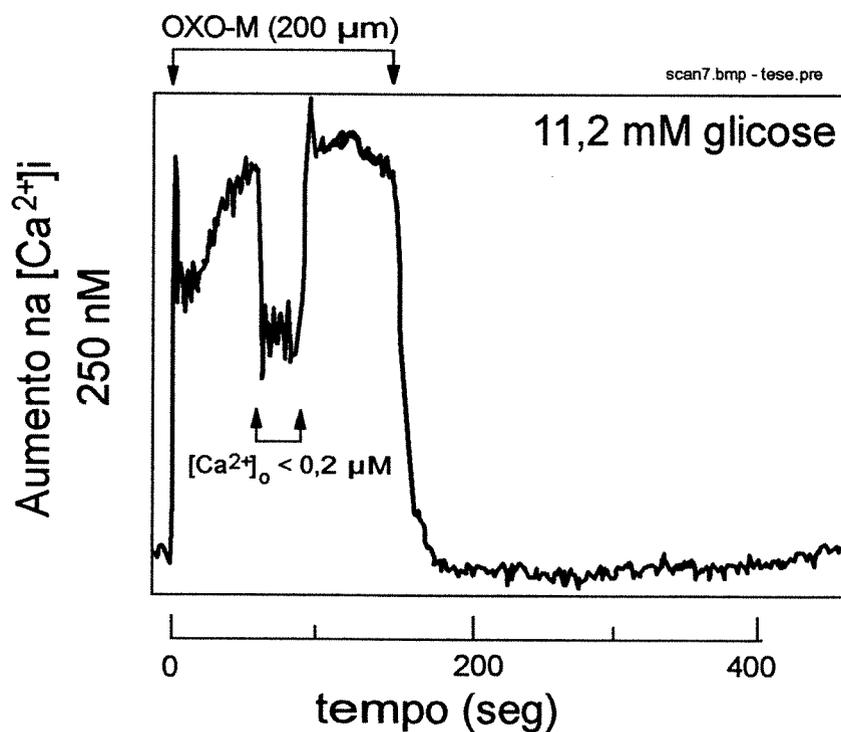
**Figura 32.** Eletroforese em gel de agarose (2%) dos fragmentos amplificados a partir do cDNA transcrito de ilhotas. Linha 1: marcador de peso molecular. Linha 2: fragmento que representa um segmento de 300 pares de bases, correspondente ao receptor M1. Linha 3: fragmento que representa um segmento de 465 pares de bases, equivalente ao receptor M3.

## 4.2. Medição do $\text{Ca}^{2+}$ citoplasmático

A análise direta da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  pela técnica de microfluorimetria com corante de  $\text{Ca}^{2+}$  revela que células  $\beta$  isoladas de rato responderam de forma substancial a estimulação por OXO-M. A figura 33 ilustra os efeitos de 40  $\mu\text{M}$  de OXO-M sobre a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  de células perfundidas na ausência de glicose, com meio contendo 2,6 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ . A adição do agonista promoveu um aumento rápido e sustentado na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ; resposta semelhante foi observada na presença de glicose (5,6 e 11,2 mM, respectivamente figs. 33 e 34), indicando que as variações na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induzidas por OXO-M independem de processos celulares regulados pelo metabolismo da glicose. A adição do quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  EGTA (fig. 35) provocou a redução na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , que se manteve em níveis acima do basal. Neste tipo de preparação, a viabilidade das células foi testada pela adição de glicose no meio de perfusão. Os valores médios de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  registrados em diferentes experimentos foram:  $113,3 \pm 6,1$  nM em 2,8 mM de glicose (n=8),  $150 \pm 4,6$  nM em 5,6 mM de glicose (n=13), e  $186,5 \pm 9,2$  nM em 22 a 27,8 mM de glicose (n=13).



**Figura 34.** Efeitos de OXO-M (40 μM) sobre a  $[Ca^{2+}]_i$  de células β perfundidas na ausência e presença de 5,6 mM de glicose.



**Figura 34.** Efeitos da adição de EGTA sobre a  $[Ca^{2+}]_i$  de células  $\beta$  estimuladas por 200  $\mu$ M de OXO-M, na presença de 11,2 mM de glicose.

## **V. DISCUSSÃO**

---

## V. DISCUSSÃO

A estimulação parassimpática desempenha papel importante na modulação da secreção de insulina induzida pelos estímulos metabólicos. Os sinais neurais desencadeados na fase pré-absortiva promovem a resposta antecipatória da secreção, resposta esta que previne alterações bruscas na concentração de nutrientes circulantes. Assim, a estimulação muscarínica representa, na célula  $\beta$  pancreática, o ajuste fino da regulação glicêmica, especialmente nas fases iniciais relativas ao período alimentar.

O presente projeto teve como objetivo ampliar os estudos sobre a participação dos receptores muscarínicos (subtipos M1 e M3) na potencialização da secreção de insulina induzida pela glicose. A motivação deste trabalho teve duas conotações distintas, porém não excludentes. A primeira fundamenta-se na importância, sob o ponto de vista clínico, do controle que o sistema nervoso parassimpático exerce sobre a secreção de insulina durante o período alimentar. A segunda, de caráter geral, está calcada na enorme quantidade de novas informações relativas a estrutura e função dos diferentes subtipos de receptores muscarínicos, obtidas pela Farmacologia e especialmente pela Biologia Molecular. Em relação ao primeiro aspecto mencionado, algumas observações provenientes tanto da clínica quanto da experimentação em laboratório demonstram que, durante a instalação do diabetes no adulto (tipo II), a fase rápida da secreção de insulina - dependente em grande parte do controle parassimpático - é a primeira a desaparecer. Também, ratos do deserto da espécie *Acomys cahyrinus*, os quais apresentam pouca inervação insular, desenvolvem diabetes quando alimentados com dietas ricas, usualmente ministradas a outras espécies de animais de laboratório (ORCI et al., 1970; IONESCU & JEANRENAUD, 1988). Por fim, indivíduos diabéticos transplantados com ilhotas de Langerhans, quando

submetidos a teste de tolerância a glicose endovenoso, apresentam perfil de secreção de insulina sem o pico inicial, característico de um indivíduo normal.

Por outro lado, os recentes avanços das técnicas de DNA recombinante, bem como seu vasto campo de aplicações, têm motivado novas abordagens sobre importantes questões fisiológicas. Neste sentido, a clonagem e caracterização de 5 subtipos diferentes de receptores (HULME et al., 1990), e os estudos farmacológicos de novos agonistas e antagonistas muscarínicos propiciaram novas ferramentas para dirimir dúvidas quanto ao subtipo de receptor muscarínico envolvido nos processos celulares.

Sabe-se que, nos diferentes tecidos, a ativação dos receptores muscarínicos (mAChR) pode ter caráter excitatório ou inibitório, dependendo do sistema de sinalização intracelular acoplado ao subtipo de receptor presente na célula (ASHKENAZI et al., 1989). Na célula  $\beta$ , a estimulação do mAChR é eminentemente excitatória da atividade celular (MALAISSE, 1986), efeito este relacionado a geração de  $IP_3$  na hidrólise de fosfolípidos de membrana (MATHIAS et al, 1985b).

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que oxotremorina-m (OXO-M) é um potente agonista muscarínico (BOSCHERO et al., 1995), e produz efeitos semelhantes a acetilcolina (ACh) sobre a atividade secretória da célula  $\beta$  pancreática de roedores (fig. 1). Ilhotas isoladas de rato e camungongo se mostraram bastante sensíveis a OXO-M, que produziu resposta significativa entre 0,5 e 1  $\mu$ M, e secreção máxima na faixa de 5 a 10  $\mu$ M (figs. 2 e 3). Estes valores são muito semelhantes aos previamente descritos para o neurotransmissor ACh (GAGERMAN et al., 1978; GARCIA et al. 1988), confirmando assim a potencialidade do uso do agonista exógeno no estudo da função celular. Além disso, OXO-M tem a vantagem de não ser substrato para a ação da acetilcolinesterase, presente nas terminações nervosas parassimpáticas.

A ação estimulatória da OXO-M sobre a célula  $\beta$  é condizente com o mecanismo clássico de ligação de um agonista ao seu receptor de membrana. Observa-se que o efeito da OXO-M sobre a secreção de insulina se apresenta de forma dose dependente (figs. 2 e 3), e pode ser bloqueado pela ocupação prévia do receptor por um agonista (figs. 4 e 5) ou antagonistas (figs. 6 a 12). Por sua vez, a caracterização do subtipo de receptor presente, por meio da análise farmacológica, mostrou ser bastante complexa. Semelhante a outros tecidos (MITCHELSON, 1988), a diferença de seletividade observada entre os diferentes antagonistas é bastante pequena, exceto para o antagonista M2 (Tabela I). Neste experimento, a secreção estática estimulada por de 50 $\mu$ M de OXO-M foi realizada em presença de concentrações crescentes de pirenzepina (M1), *p*-F-HHSiD (M3>M1>M2), 4-DAMP (M3) e metoctramina (M2). A análise das curvas de inibição revela claramente que a ordem de potência inibitória dos diferentes antagonistas foi 4-DAMP>*p*-F-HHSiD>pirenzepina>metoctramina, resultado este que indica a presença dos subtipos M1 e, principalmente, M3 na membrana da célula  $\beta$  (EGLIN et al., 1990; THOMAS et al., 1993). Entretanto, estes resultados devem ser tomados com certa cautela, visto que a capacidade de inibição de um antagonista pode refletir principalmente sua potência como bloqueador, e não necessariamente sua capacidade de discriminar subtipos diferentes. Porém, nossos dados estão de acordo com os resultados obtidos por HENQUIN e NENQUIN (1988) e VERSPOHL e cols. (1990), os quais chegaram a conclusões semelhantes utilizando diferentes antagonistas.

A análise a nível molecular (fig 32, Apêndice), realizada pela técnica da transcrição reversa de mRNA extraído de tecido insular comprova que os subtipos M1 e M3 são expressos na ilhota pancreática. O fragmento de cDNA amplificado corresponde a uma seqüência de aminoácidos específica para cada subtipo, ou seja, aos resíduos 227 a 348 para o subtipo M1 e 269 a 463 para o subtipo M3,

contidos na alça citosólica  $i_3$  do receptor (WESS, 1993). Pela eletroforese do produto amplificado observa-se bandas de tamanho igual ao previsto, ou seja, com o mesmo número de pares de bases da região delimitada pelos *primers*. Como as células  $\beta$  correspondem a mais de 70% do total de células existentes nas ilhotas, é muito provável que ambos os receptores estejam presentes nas células secretoras de insulina.

Nossos estudos farmacológico e molecular, associados às informações de que a estimulação muscarínica induz a produção de  $IP_3$  (MATHIAS et al., 1985b), e não altera a concentração citosólica de cAMP (GAGERMAN et al., 1978; DUNLOP et al., 1988) são fortes evidências de que a célula  $\beta$  possui os subtipos M1 ou M3, ou ambos. Considerando que o agonista M1 McN-A-343 não produziu aumento na resposta secretória (figs. 4 e 5), é provável que o receptor funcionalmente ativo seja do subtipo M3. É importante ressaltar que ACh, OXO-M e carbacol são considerados agonistas plenos para a hidrólise de fosfolípidos, enquanto que McN-A-343 é praticamente inativo para este tipo de resposta (FISCHER et al., 1984; FREEDMAN et al., 1988; EGLIN et al., 1993). Contudo, os efeitos inibitórios dos antagonistas pirenzepina e 4-DAMP sobre a resposta estimulatória por ACh ou OXO-M mostram diferenças na potência de inibição destes antagonistas. Pirenzepina (figs. 7 e 8) é mais eficaz em bloquear os efeitos estimulatórios da ACh que da OXO-M. Inversamente, 4-DAMP (figs. 9 e 10) é muito mais potente em inibir os efeitos da OXO-M que os da ACh. OTSUKI e cols. (1985), utilizando atropina e pirenzepina, sugeriram que as diferenças de potência entre estes antagonistas é decorrente da presença de sítios de alta e baixa afinidade nas ilhotas pancreáticas. Em vista da diversidade de respostas observada em nossos resultados, é razoável propor que os receptores muscarínicos possuem mais de um sítio de ligação para agonistas, da mesma forma que possuem para antagonistas.

Os secretagogos de insulina podem ser didaticamente divididos em 2 grandes grupos: iniciadores e potencializadores da secreção. Os iniciadores são capazes de estimular, "per se", a liberação de insulina; incluem nutrientes que são metabolizados na célula  $\beta$  (p.e., glicose e leucina), intermediários do metabolismo de substratos endógenos (gliceraldeído, cetoisocaproato) e certos agentes farmacológicos (sulfoniluréias). Está bem estabelecido que a geração de ATP, decorrente do metabolismo dos nutrientes, promove a despolarização da membrana pelo bloqueio dos  $K_{ATP}$ . Da mesma forma, drogas como as sulfoniluréias bloqueiam diretamente estes canais (para revisão vide ASHCROFT & RORSMAN, 1989).

Os potencializadores da secreção de insulina - como hormônios, neurotransmissores e alguns agentes farmacológicos - requerem a presença de um iniciador, pelo menos em quantidade sub-estimulatória, para o desencadeamento da atividade secretória. A maioria dos potencializadores aumentam a atividade elétrica da célula  $\beta$ , por um mecanismo ainda não completamente esclarecido.

Nossos resultados demonstram que OXO-M enquadra-se perfeitamente na categoria de potencializador da atividade elétrica e secretória da célula  $\beta$ , na medida em que o aumento na resposta celular é dependente da presença de glicose (figs. 12, 13, 14 e 27). Considerando que a glicose tem como principal efeito a despolarização celular, é provável que o efeito despolarizante da OXO-M não seja suficiente para manter o influxo de  $Ca^{2+}$ , necessário para ativação da maquinaria secretória. O aumento na secreção produzida pela presença de  $K^+$  extracelular em concentração despolarizante (fig. 15) confirma a hipótese que a estimulação da secreção por agonistas muscarínicos é dependente da despolarização prévia da membrana, e não de possíveis outros efeitos da glicose.

Independentemente do tipo de secretagogo utilizado, se iniciador ou potencializador, sabe-se que a secreção de insulina ocorre somente na presença de

concentração mínima de  $\text{Ca}^{2+}$  no meio extracelular (JONES et al., 1985). Corroborando este fato, a figura 18 mostra que, na presença de 5,6 mM de glicose e ausência de  $\text{Ca}^{2+}$ , OXO-M não estimulou a secreção de insulina. Da mesma forma, na presença de nifedipina - um bloqueador dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes da voltagem - o efeito estimulatório da OXO-M foi suprimido (fig. 19). Embora o agonista induza a produção de  $\text{IP}_3$  (EGLIN et al., 1993) e consequente mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  de organelas intracelulares, a potencialização da secreção só acontece em presença de  $\text{Ca}^{2+}$  no meio extracelular.

Na verdade, OXO-M produziu diferentes alterações nos movimentos de  $\text{Ca}^{2+}$  da célula  $\beta$ . A análise dos efeitos da OXO-M sobre os fluxos de  $^{45}\text{Ca}$  revela que, na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, o agonista provocou um aumento no efluxo do  $^{45}\text{Ca}$  significativamente maior que na ausência do íon (figs. 21 a 23). Na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, o aumento no efluxo do  $^{45}\text{Ca}$  reflete a estimulação da entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , e corresponde a um processo de troca  $^{45}\text{Ca}$  por  $^{40}\text{Ca}$ . Assim, o influxo de  $^{40}\text{Ca}$  na célula desloca o  $^{45}\text{Ca}$  dos sítios ligantes intracelulares, aumentando o efluxo do isótopo (HERCHUELZ et al., 1980; ABRAHAMSSON et al., 1981). Isto indica que o aumento na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , induzido por OXO-M (fig 34, Apêndice), é resultante da mobilização do íon de dois compartimentos distintos: (i) de estoques intracelulares (retículo endoplasmático) e, (ii) do meio extracelular. A liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular é imediata e transitória. O influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  proveniente do meio extracelular aparece tardiamente, porém é o responsável pela manutenção dos níveis estimulatórios de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. As medidas diretas de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  por fluorescência mostram que OXO-M aumentou a concentração citosólica do íon, mesmo quando da adição do quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  EGTA (fig. 34, Apêndice). Concluindo, a estimulação muscarínica aumenta a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  por mobilização intracelular, provavelmente mediada pela geração de  $\text{IP}_3$ , e promove a entrada do cátion por modificações na permeabilidade da membrana.

Quanto às alterações de permeabilidade da membrana produzidas por agonistas muscarínicos, vários autores são unânimes em concluir que os agonistas muscarínicos despolarizam a membrana da célula  $\beta$  pancreática. Nossos resultados de atividade elétrica mostram que OXO-M produz uma pequena despolarização na membrana celular (Tabelas II e V). Contudo, o mecanismo iônico envolvido neste processo ainda não foi esclarecido. SANTOS & ROJAS (1989) propuseram que o efeito despolarizante da muscarina sobre as células  $\beta$  está relacionado a redução da permeabilidade ao  $K^+$ . Por sua vez, SANCHEZ-ANDRÉS e cols. (1988) sugeriram que a despolarização está relacionada a um aumento na permeabilidade ao  $Ca^{2+}$ . Finalmente, HENQUIN e cols. (1988) e HIRIART & RAMIREZ-MENDELES (1993) concluíram que o processo de despolarização é mediado pelo aumento na permeabilidade ao  $Na^+$ . Nossos resultados revelam que, em presença de OXO-M, ocorre um pequeno aumento na resistência da membrana (fig 29, Tabela IV), observação esta que, a princípio, suporta a hipótese proposta por SANTOS & ROJAS (1989).

Contudo, a análise conjunta dos potenciais de membrana e fluxos de  $^{86}Rb$  demonstrou que, no período de equilíbrio (i.e., após 5 a 10 min de estimulação), OXO-M não produz alteração nas permeabilidades ao  $K^+$  (Tabela V). Também, é importante lembrar que o aumento da resistência da membrana pode simplesmente refletir a diminuição da condutância juncional, devido a elevação na  $[Ca^{2+}]_i$  (LOEWESTEIN & ROSE, 1978). Isto nos leva a crer que o efeito despolarizante da OXO-M não está ligado ao bloqueio da permeabilidade ao  $K^+$ , mas sim à ação do agonista sobre canais de  $Na^+$  ou  $Ca^{2+}$ . Com relação ao  $Na^+$ , as evidências descritas na literatura são fortemente questionáveis. Primeiro, o aumento da  $[Na^+]_i$  observado na estimulação por ACh não é inibida pela tetrodotoxina (GILON & HENQUIN, 1993), um bloqueador específico dos canais de  $Na^+$  (WATSON & GIRDLESTONE, 1994). Segundo, as medidas diretas da concentração intracelular de  $Na^+$ , por meio de corantes fluorescentes (GILON &

HENQUIN, 1993) apresentou um *time course* não condizente com a cinética de abertura de canais iônicos (ANDERSEN & KOEPPE II, 1992). Por último, não há, até o momento, nenhuma outra evidência da participação de receptores muscarínicos (subtipos M1 e M3) sobre a permeabilidade ao Na<sup>+</sup>.

Por outro lado, em diferentes tecidos, sabe-se que a estimulação muscarínica promove alterações na permeabilidade ao Ca<sup>2+</sup> (JONES, 1993), pela ativação de canais de Ca<sup>2+</sup> operados por receptor. Além disto, foi recentemente observado, em diferentes tipos de células secretoras, a presença de uma corrente despolarizante, sensível aos níveis de Ca<sup>2+</sup> contido nos estoques intracelulares (RANDRIAMAMPITA & TSIEN, 1993; PAREKH et al., 1993). Desta forma, após a estimulação do receptor muscarínico ocorre um aumento na produção de IP<sub>3</sub>, seguido pela liberação de Ca<sup>2+</sup> do retículo endoplasmático, juntamente com um fator de influxo de Ca<sup>2+</sup> ainda não determinado (CIF), que ativa a entrada de Ca<sup>2+</sup> através de um canal distinto dos canais de Ca<sup>2+</sup> sensíveis a voltagem, denominado CRAC. Evidências da existência da corrente CRAC foi demonstrada em mastócitos (HOTH & PENNER, 1992), linfócitos (ZWEIFACH & LEWIS, 1993), ovócitos de *Xenopus* (PAREKH et al., 1993) e em células pancreáticas acinares (BAHNSON et al., 1993). Na célula β, um modelo teórico recente proposto ressalta a participação dos CRACs na resposta elétrica induzida por CCh (BERTRAM et al., 1995). Além disto, há evidências diretas da existência de um tipo de canal de Ca<sup>2+</sup> insensível a voltagem em células β humanas (ROJAS et al., 1990). Assim, este fator poderia estar agindo sobre a membrana, causando a despolarização prolongada do platô (como nos primeiros 15 segundos de estimulação, figs. 26 e 27).

A análise detalhada dos efeitos da OXO-M sobre o padrão de atividade elétrica mostra que o agonista induz diferentes alterações no potencial de membrana e na atividade de *bursts*. Um aspecto interessante diz respeito a hiperpolarização

transitória registrada em presença de concentrações micromolares do fármaco. A hiperpolarização da membrana, concomitante a um aumento na  $[Ca^{2+}]_i$ , é um tipo de resposta celular característica da ativação dos  $K_{Ca}$ . De fato, o bloqueio deste efeito pela ChTX fortemente indica que os  $K_{Ca}$  estão atuantes nesta condição experimental (fig. 28). A análise do efluxo de  $^{86}Rb$  (ilustrado na fig. 24) confirma que ChTX, um bloqueador específico dos  $K_{Ca}$  (SMITH et al., 1986), inibiu quase que completamente o aumento no efluxo do  $^{86}Rb$  induzido por OXO-M. Além disto, os valores de permeabilidade ao  $K^+$  ( $P_K$ ) (tabela V), estimada a partir dos registros elétricos e de fluxos iônicos, mostram que estes foram maiores na presença de glicose. Cabe aqui ressaltar que o  $K_{Ca}$  pode ser ativado por  $Ca^{2+}$  ou pela despolarização, esta última favorecida pela presença de glicose. Os resultados obtidos com neomicina (fig. 23) - antibiótico que reduz a formação de  $IP_3$  (SLIVKA & INSEL, 1988) -, também suportam a hipótese da participação dos  $K_{Ca}$  nos mecanismos iônicos mediados pela estimulação muscarínica. Na medida em que a supressão inicial da atividade elétrica não foi completamente inibida pela ChTX, não se pode descartar a participação de outro tipo de  $K_{Ca}$  durante o bloqueio transiente dos potenciais de ação. ÄMMÄLLÄ e cols. (1991) demonstraram que dois tipos de  $K_{Ca}$  - um sensível e outro insensível a ChTX - estão presentes na célula  $\beta$ ; os  $K_{Ca}$  insensíveis ao bloqueador parecem ser diretamente ativados por carbamilcolina, um conhecido agonista muscarínico.

Outro aspecto peculiar da resposta elétrica induzida pela OXO-M se refere ao aumento na frequência de *bursts* e sua relação com a atividade secretória de ilhotas de camundongos (Tabela II, fig. 31). Estudos prévios demonstraram que a atividade elétrica de célula  $\beta$  está diretamente relacionada com a secreção de insulina; a elevação na concentração de glicose promove um aumento na fase ativa e no número de potenciais de ação, em paralelo ao aumento da resposta secretória. Experimentalmente, as alterações na frequência de *bursts* e na fase ativa ocorrem juntas. Quando comparadas as respostas secretória e elétrica frente

a concentrações fixa de glicose e crescentes de OXO-M, observa-se a dissociação entre os dois parâmetros elétricos analisados (fig. 31). Desta forma, nosso estudo demonstra, pela primeira vez, uma correlação direta entre frequência de *bursts* e secreção de insulina, independente de alterações na duração da fase ativa.

O modelo que melhor explica as oscilações no potencial de membrana, observadas em concentrações crescentes de OXO-M, envolve dois mecanismos anteriormente descritos: (1) a ativação da corrente de  $\text{Ca}^{2+}$  sensível ao esvaziamento dos estoques intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  (CRAC), e (2) a abertura dos  $\text{K}_{\text{Ca}}$ , decorrente da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  por estes estoques. Estudos sobre a distribuição espacial do  $\text{Ca}^{2+}$  demonstraram que, durante a estimulação muscarínica, o  $\text{Ca}^{2+}$  é liberado de forma pulsátil, formando ondas no citosol que atingem a membrana plasmática (LECHLEITER et al., 1991; THORN et al., 1993; KASAI et al., 1993). A magnitude destas ondas é em parte dependente dos níveis de  $\text{IP}_3$ , que determina a velocidade de propagação do  $\text{Ca}^{2+}$  liberado (ROONEY & THOMAS, 1993). Aplicando estas informações ao nosso modelo, em presença de alta concentração do agonista (1 - 50  $\mu\text{M}$ ), poderia estar ocorrendo liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  em quantidade suficiente para ativar os  $\text{K}_{\text{Ca}}$  e promover inicialmente a hiperpolarização da membrana, seguido pelo aumento na frequência de *bursts*. Os experimentos com ChTX (fig. 28) indicam que os  $\text{K}_{\text{Ca}}$  participam na geração da atividade de *bursts*, observadas no decorrer da exposição a OXO-M (fig. 26). Por sua vez, a depleção dos estoques intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ , frequentemente observada após certos estímulos (PUTNEY, 1990; HOTH & PENNER, 1992; SCHILLING et al., 1992; VACA & KUNZE, 1993), poderia aumentar o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  pela ativação dos CRACs durante a fase silente, contribuindo desta forma para o aumento na frequência de *bursts*.

As alterações na condutância ao  $\text{K}^+$  apresentam uma conotação muito importante, na medida em que a participação dos  $\text{K}_{\text{Ca}}$  nos fenômenos elétricos da

membrana da célula  $\beta$ , induzidos pela glicose, haviam sido descartados (KUKULJAN et al., 1991). Assim, é provável que nos eventos mediados pela estimulação parassimpática, durante a estimulação da secreção no período alimentar, os  $K_{Ca}$  desempenhem papel importante no controle da atividade elétrica. Este controle seria exercido na forma de uma retroalimentação negativa, pela ativação de uma corrente tônica hiperpolarizante. Assim, durante a liberação de  $Ca^{2+}$ , ocorre a ativação dos  $K_{Ca}$ , e conseqüente produção da corrente hiperpolarizante, que supera a relativamente pequena corrente despolarizante (FELDER et al., 1994) ativada por um fator liberado pelo retículo endoplasmático; neste momento, o potencial de membrana se torna mais negativo, e a hiperpolarização resultante bloqueia os potenciais de ação. Na medida em que a  $[Ca^{2+}]_i$  é gradualmente reduzida, o potencial de membrana é determinado pelo balanço entre as correntes geradas pela ativação do CRAC e do  $K_{Ca}$ . O paralelismo entre as curvas de frequência de *bursts* e de secreção de insulina é forte evidência da importância destes canais na modulação parassimpática da atividade secretória da célula  $\beta$  pancreática.

Resta ainda investigar a contribuição dos canais de  $Ca^{2+}$  insensíveis a voltagem, identificados por ROJAS e cols. (1990), nos movimentos intracelulares de  $Ca^{2+}$ , principalmente no que se refere a manutenção dos estoques intracelulares do íon, alvo fundamental da estimulação muscarínica.

## **VI. RESUMO E CONCLUSÕES**

---

## VI. RESUMO E CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como proposta caracterizar o subtipo funcional de mAChR na célula  $\beta$  pancreática, bem como elucidar os mecanismos iônicos envolvidos na estimulação muscarínica. Para isto, foram utilizadas ilhotas de ratos e camundongos, isoladas por digestão enzimática ou microdissecção. A resposta celular frente a estimulação pelo agonista muscarínico OXO-M foi analisada sob diferentes aspectos: (1) secreção de insulina; (2) efluxo de radioisótopos ( $^{45}\text{Ca}$  e  $^{86}\text{Rb}$ ); (3) concentração citoplasmática de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ); (4) atividade elétrica; e (5) expressão dos mAChRs.

Os resultados mostram que OXO-M aumentou, de forma dose-dependente, a secreção de insulina por ilhotas de roedores. Na presença de alta concentração (50  $\mu\text{M}$ ), OXO-M induziu uma resposta bifásica da secreção, tanto na presença de 5,6 quanto de 16,7 mM de glicose. O aumento da secreção induzido pela OXO-M foi drasticamente reduzido pela retirada de  $\text{Ca}^{2+}$  do meio perfusor, e completamente abolido na ausência de glicose. Entretanto, na ausência de glicose mas na presença de  $\text{K}^+$  em concentração despolarizante (40 mM), OXO-M aumentou significativamente a secreção de insulina. O efeito potencializador da OXO-M foi inibido pelos antagonistas 4-DAMP (M3); *p*-F-HHSiD (M3>M1>M2) e pirenzepina (M1) com valores de  $\text{IC}_{50}$  para estes antagonistas de ~ 5, 20 e 340 nM, respectivamente.

A análise molecular do subtipo de mAChR expresso nas ilhotas pancreáticas, realizada pela amplificação do cDNA por PCR, demonstrou a presença dos subtipos M1 e M3 no tecido. Entretanto, o estudo farmacológico indicou que o subtipo M3 representa o receptor muscarínico que medeia a estimulação da célula  $\beta$ .

Em outra série de experimentos, foram estudados os movimentos iônicos envolvidos na estimulação celular induzida pela OXO-M. Na presença de 5,6, 11,2 ou na ausência de glicose, OXO-M aumentou a  $[Ca^{2+}]_i$  de células  $\beta$  isoladas. Este aumento foi parcialmente inibido pela adição de EGTA no meio de perfusão. OXO-M (50  $\mu$ M) também aumentou o efluxo de  $^{45}Ca$  de ilhotas perfundidas, tanto na presença quanto na ausência de  $Ca^{2+}$  no meio extracelular. Entretanto, na ausência de  $Ca^{2+}$  (condição que representa o fluxo unidirecional provindo de compartimentos intracelulares), o aumento no efluxo foi transiente. A curva obtida pela diferença entre os efluxos normalizados, em ambas as condições experimentais, demonstrou a presença de um segundo componente, de aparecimento tardio e provavelmente decorrente da entrada de  $Ca^{2+}$  nas células. Tanto na presença quanto na ausência de glicose, OXO-M aumentou o efluxo do  $^{86}Rb$ . OXO-M também aumentou a atividade elétrica induzida pela glicose. Em 11,2 mM de glicose, OXO-M (0,1 e 10  $\mu$ M) produziu diferentes efeitos sobre a atividade elétrica. Em ambas as concentrações, o agonista provocou o aumento na frequência de *bursts*. Por outro lado, em presença de concentrações micromolares OXO-M induziu alterações multifásicas na atividade elétrica, caracterizada pela inibição transiente da atividade elétrica (i.e., polarização da membrana), seguida pelo aumento na frequência de *bursts* e por uma pequena despolarização da membrana na fase silente. O efeito polarizante da OXO-M foi inibido pela ChTX, um bloqueador dos canais de  $K^+$  ativados por  $Ca^{2+}$  ( $K_{Ca}$ ). A permeabilidade ao  $K^+$ , calculada a partir dos valores de efluxo do  $^{86}Rb$  e de potencial de membrana, aumentou durante a fase de polarização, mas não foi diferente do controle durante o estado estacionário.

Concluindo, o efeito potencializador da OXO-M sobre a secreção de insulina induzida pela glicose depende da ativação dos receptores muscarínicos do subtipo M3, presentes na membrana da célula  $\beta$ . Semelhante ao observado na estimulação por outros agonistas (p.e., ACh e CCh), o aumento na secreção

---

depende da presença de glicose e  $\text{Ca}^{2+}$  no meio extracelular. A polarização transiente induzida por concentrações micromolares de OXO-M representa a ativação dos canais  $\text{K}_{\text{Ca}}$ . Por outro lado, a permeabilidade ao  $\text{K}^+$  no período estacionário indica que a despolarização da membrana não é consequência do bloqueio de canais de  $\text{K}^+$ , mas provavelmente da ativação de uma corrente sensível aos níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  (CRAC). Assim, o balanço entre a ativação dos canais  $\text{K}_{\text{Ca}}$  e CRAC poderiam determinar o grau de despolarização induzida por agonistas muscarínicos, mecanismo este provavelmente importante na modulação da secreção de insulina durante a estimulação colinérgica.

## **VII. SUMMARY**

---

## VII. SUMMARY

The effects of the muscarinic agonist oxotremorine-m (OXO-M) on insulin secretion,  $^{45}\text{Ca}$  and  $^{86}\text{Rb}$  fluxes, cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ), and electrical activity in pancreatic rodent  $\beta$ -cells were studied. In the presence of glucose, OXO-M produced a dose-dependent potentiation of insulin secretion from rat and mouse islets. Higher doses of OXO-M (50  $\mu\text{M}$ ) induced a biphasic insulin response, both at low (5.6 mM) or high (16.7 mM) glucose concentration. In a  $\text{Ca}^{2+}$ -deficient medium containing glucose (5.6 mM), OXO-M evoked only a reduced first phase of insulin secretion. In the absence of glucose, OXO-M (up to 200  $\mu\text{M}$ ) did not effect basal secretion. However, in the absence of glucose, but at a depolarizing  $\text{K}^+$  concentration (40 mM), OXO-M significantly increased insulin release from incubated islets. The potentiating effects of OXO-M were inhibited by the muscarinic receptor antagonists 4-DAMP (M3), *p*-F-HHSiD (M3 > M1 > M2), and pirenzepine (M1) in a dose-dependent manner; half maximal inhibitory concentration values were  $\sim 5$ , 20, and 340 nM, respectively.

cDNAs encoding for M1 and M3 muscarinic acetylcholine receptors (mAChRs) were detected in rat pancreatic islet cells by polymerase chain reaction (PCR) amplification techniques. The PCR products showed bands with the expected base pair number corresponding to M1 and M3 selected sequences.

In other series of experiments, we studied the ionic movements under muscarinic stimulation. At zero, 5.6 or 11.2 mM glucose, OXO-M increased the  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in isolated  $\beta$ -cells. The increment in the  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  was partially inhibited by the addition of EGTA in the perfusion medium. OXO-M (50  $\mu\text{M}$ ) also increased  $^{45}\text{Ca}$  efflux from islets perfused either in the presence or in the absence of  $\text{Ca}^{2+}$ . However, under the latter condition, the efflux (which reflects intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization) was transient. The normalized difference between effluxes revealed

the presence of a delayed and sustained second component, originating from the extracellular space. Either in presence or absence of glucose, OXO-M increased  $^{86}\text{Rb}$  efflux. OXO-M also produced a dose-dependent increase on the glucose-induced electrical activity. At 11.2 mM glucose, OXO-M (0.1 and 10  $\mu\text{M}$ ) had two distinct effects: both concentrations increased the steady-state burst frequency; however, micromolar concentrations of OXO-M induced a multiphasic change in the pattern of electrical activity, including a transient inhibition of electrical activity and then a phase of high burst frequency, which was accompanied by a small depolarization in the membrane during the silent phase. The polarizing effect of OXO-M was almost completely suppressed by charibdotoxin (ChTX), a blocker of the large conductance  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -activated potassium channel ( $\text{K}_{\text{Ca}}$ ).  $\text{K}^+$ -permeability values, calculated from  $^{86}\text{Rb}$  efflux and electrical measurements, increased during the polarizing phase, but was not different from control values (no OXO-M) during the steady state period.

In conclusion, the potentiation of glucose-induced insulin secretion by OXO-M depends on the activation of a muscarinic M3 receptor subtype, present in the  $\beta$ -cell plasma membrane. As already observed for others muscarinic agonists, such as ACh and CCh, OXO-M potentiated-insulin secretion depends on the presence of suitable amount of glucose and  $\text{Ca}^{2+}$  in the extracellular medium. The rapid and transient polarization induced by OXO-M (over 1  $\mu\text{M}$ ) represents the activation of the maxi  $\text{K}^+$ -channel. As OXO-M did not changed  $\text{K}^+$ -permeability during the steady-state period, the depolarizing effect of OXO-M does not reflect a decrease in  $\text{K}^+$ -permeability. Instead, it may be the consequence of activation of a current sensitive to the depletion of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores (CRAC). Thus, the balance between the activation of  $\text{K}_{\text{Ca}}$  channel and CRAC could dictate the degree of depolarization induced by muscarinic agonists. Finally, although the  $\text{K}_{\text{Ca}}$  channel was not implicated in the repolarization of glucose-induced electrical activity in  $\beta$ -cells, our results support the idea that the

maxi K<sup>+</sup>-channel could play a role in the cholinergic modulation of insulin secretion.

## **VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAMSSON, H.; GYLFE, E. & HELLMAN, B. Influence of external calcium ions on labeled calcium efflux from pancreatic B-cell and insulin granules in mice. *J. Physiol.*, 311: 541-550, 1981.
- AHRÉN, B.; KARESSON, S. & LINDSKOG, S. Cholinergic regulation of the endocrine pancreas. *Prog. Brain Res.*, 84: 209-218, 1990.
- ÄMMÄLÄ, C.; LARSSON, O.; BERGGREN, P.O.; BOKVIST, K.; JUNTTI-BERGGREN, L.; KINDMARK, H. & RORSMAN, P. Inositol triphosphate-dependent periodic activation of a  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  conductance in glucose-stimulated pancreatic  $\beta$ -cells. *Nature*, 353: 849-852, 1991.
- ANDERSEN, O.S. & KOEPPE II, R.E. Molecular determinants of channel function. *Physiol. Rev.*, 72: S89-S158, 1992.
- ASHCROFT, F.M. & RORSMAN, P. Electrophysiology of the pancreatic  $\beta$ -cell. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 54: 87-143, 1989.
- ASHKENAZI, A.; PERALTA, E.G.; WINSLOW, J.W.; RAMACHANDRAN, J. & CAPON, D.J. Functional diversity of muscarinic receptor subtypes in cellular signal transduction and growth. *Trends in Pharmacol. Sci.*, 10 (Suppl.): 16-22, 1989.
- ATWATER, I. & BEIGELMAN, P.M. Dynamic characteristics of electrical activity in pancreatic beta cells. *J. Physiol.*, 72: 769-786, 1976.
- ATWATER, I.; DAWSON, C.M.; SCOTT, A.; EDDLESTONE, G. & ROJAS, E. The nature of the oscillatory behavior in electrical activity from pancreatic  $\beta$ -cell. *Horm. Met. Res. Suppl.*, 10: 101-107, 1980.
- ATWATER, I.; GONÇALVES, A.A. & ROJAS, E. Electrophysiological measurement of an oscillatory potassium permeability during glucose-stimulated burst activity in mouse  $\beta$ -cell. *Biomedical Res.*, 3: 645-648, 1982.

- ATWATER, I.; RIBALET, B. & ROJAS, E. Cyclic changes in membrane potential and resistance of the  $\beta$  cell membrane induced by glucose in islets of Langerhans from mouse. *J. Physiol.*, 278: 117-139, 1978.
- ATWATER, I.; ROSÁRIO, L. & ROJAS, E. Properties of the Ca-activated K-channel in pancreatic  $\beta$ -cells. *Cell Calcium*, 4: 451-461, 1983.
- BAHNSON, T.D.; PANDOL, S.J. & DIONNE, V.E. Cyclic GMP modulates depletion-activated  $\text{Ca}^{2+}$  entry in pancreatic acinar cells. *J. Biol. Chem.*, 268: 10808-10812, 1993.
- BELL, G.I.; BURANT, C.F.; TAKEDA, J. & GOULD, G.W. Structure and function of mammalian facilitative sugar transporters. *J. Biol. Chem.*, 268: 19161-19164, 1993.
- BENZO, C.A. The hypothalamus and blood glucose regulation. *Life Sci.*, 32: 2509-2515, 1982.
- BERRIDGE, M.J. & IRVINE, R.F. Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature*, 312: 315-321, 1984.
- BERTHOUD, H.R.; FOX, E.A. & POWLEY, T.L. Localization of vagal preganglionics that stimulate insulin and glucagon secretion. *Am. J. Physiol.*, 258: R160-R168, 1990.
- BERTHOUD, H.R. The relative contribution of the nervous system, hormones, and metabolites to the total insulin response during a meal in the rat. *Metabolism*, 33: 18-25, 1984.
- BERTHOUD, H.R. & JEANRENAUD, B. Sham feeding-induced cephalic phase insulin release in the rat. *Am. J. Physiol.*, 242: 280-285, 1982.
- BERTRAM, R.; SMOLEN, P.; SHERMAN, A.; MEARS, D. ATWATER, I. MARTIN, F. & SORIA, B. A role for calcium release activated current (CRAC) in cholinergic modulation of electrical activity in pancreatic  $\beta$ -cells. *Biophys. J.*, 1995 (no prelo).
- BONNER, T.I.; YOUNG, A.C.; BRANN, M.R. & BUCKLEY, N.J. Cloning and expression of the human and rat m5 muscarinic acetylcholine receptor genes. *Neuron*, 1: 403-410, 1988.

- BONNER, T.I. New subtypes of muscarinic acetylcholine receptors. *Trends in Pharmacol. Sci.*, 10 (Suppl.): 11-15, 1989.
- BOSCHERO, A.C.; KAWASU, S.; DUNCAN, G. & MALAISSE, W.J. Effect of glucose on K<sup>+</sup> handling by pancreatic islets. *FEBS Lett.*, 83: 151-154, 1977.
- BOSCHERO, A.C.; SZPAK-GLASMAN, M.; CARNEIRO, E.M.; BORDIN, S.; PAUL, I.; ROJAS, E. & ATWATER, I. Oxotremorine-m potentiation of glucose-induced insulin release from rat islets involves M3 muscarinic receptors. *Am. J. Physiol.*, 31: E336-E342, 1995.
- BRANN, M.R.; KLIMKOWSKI, V.J. & ELLIS, J. Structure/function relationships of muscarinic acetylcholine receptors. *Life Sci.*, 52: 405-412, 1993.
- BROWN, D.A.; MARRION, N.V. & SMART, T.G. On the transduction mechanism for muscarine-induced inhibition of M-current in cultured rat sympathetic neurones. *J. Physiol.*, 413: 469-488, 1989.
- CHEN, S.; OGAWA, M.; UNGER, R.H.; FOSTER, D.W. & MCGARRY, J.D. More direct evidence for a malonyl-CoA-carnitine palmitoyltransferase I interaction as a key event in pancreatic  $\beta$ -cell signalling. *Diabetes*, 43: 878-883, 1994.
- CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochem.*, 162: 156-159, 1987.
- COOK, D.L.; CRILL, W.E. & PORTE, D. Glucose and acetylcholine have different effects on the pacemaker potential of pancreatic islet cells. *Diabetes*, 30: 558-561, 1981.
- COOK, D.L. & HALES, C.N. Intracellular ATP directly blocks K<sup>+</sup>-channels in pancreatic  $\beta$ -cell. *Nature*, 311: 269-271, 1984.
- CROGHAN, P.C.; DAWSON, C.M.; SCOTT, A.M. & BANGHAM, J.A. Contribution of isotope flux studies to understanding the mechanism of the  $\beta$ -cell membrane. In: ATWATER, I.; ROJAS, E. & SORIA, B. *Advances in Experimental Medicine and Biology vol. 211: Biophysics of the pancreatic  $\beta$ -cell*. New York, Plenum Press, 1986. p. 207-223.

- CURRY, D.L.; BENNET, L.L. & GRODSKY, G.M. Requirement for calcium ion in insulin secretion by the perfused rat pancreas. *Am. J. Physiol.*, 214: 174-178, 1968.
- DALE, H. The action of certain esters and esters of choline, and their relation to muscarine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 6: 147-190, 1914. APUD: SCHIMERLIK, M.I. Structure and function of muscarinic receptors. *Prog. Brain Res.*, 84: 11-19, 1990.
- DAWSON, C.M.; CROGHAN, P.C.; ATWATER, I. & ROJAS, E. Estimation of potassium permeability in mouse islets of Langerhans. *Biochem. Res.*, 4: 389-392, 1983.
- DEAN, P.M. & MATHEWS, E.K. Electrical activity in pancreatic islet cells. *Nature*, 219: 389-390, 1968.
- DOODS, H.N.; DAVIDESKO, D.; MATHY, M.-J.; BATINK, H.D.; DE JONGE, A. & ZWIETEN, P.A. Discrimination by *N*-ethylmaleimide between the chronotropic and inotropic response to muscarinic receptor stimulation in rat atrium. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmac.*, 333: 182-185, 1986.
- DOODS, H.N.; MATHY, M.-J.; DAVIDESKO, D.; vanCHARLDORP, K.J.; deJONGE, A. & vanZWIETEN, P.A. Selectivity of muscarinic antagonists in radioligand and in vivo experiments for the putative M1, M2 and M3 receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 242: 257-262, 1987.
- DUKES, I.D.; McINTYRE, M.S.; MERTZ, R.J.; PHILIPSON, L.H.; ROE, M.W.; SPENCER, B. & WORLEY III, J.F. Dependence on NADH produced during glycolysis for  $\beta$ -cell glucose signaling. *J. Biol. Chem.*, 269: 10979-10982, 1994.
- DUNLOP, M.; SHAW, M.; DIMITRIADIS, E.; GURTLER, V.; WARK, J. & LARKINS, R.G. Evidence that muscarinic receptors in islets cells are not coupled functionally to adenylate cyclase through the inhibitory guanine nucleotide binding protein (Ni). *Horm. Metab. Res.*, 20: 150-153, 1988.
- EGLLEN, R.M.; MICHEL, A.D.; MONTGOMERY, W.W.; KUNYSZ, E.A.; MACHADO, A.C. & WHITING, R.L. The interaction of *para*fluorohexahydrosiladiphenidol at muscarinic receptors *in vitro*. *Br. J. Pharmacol.*, 99: 637-642, 1990.

- EGLÉN, R.M.; SHARIF, N.A. & TO, Z.P. Muscarinic M<sub>3</sub> receptors mediate total inositol phosphates accumulation in murine HSDM1C1 fibrosarcoma cells. *Eur. J. Pharmacol.*, 244: 49-55, 1993.
- FELDER, C.C.; SINGER-LAHAT, D. & MATHES, C. Voltage-independent calcium channels. Regulation by receptors and intracellular calcium stores. *Biochem. Pharmacol.*, 48: 1997-2004, 1994.
- FISHER, S.K.; FIGUEIREDO, J.C. & BARTUS, R.J. Differential stimulation of inositol phospholipid turnover in brain by analogs of Oxotremorine. *J. Neurochem.*, 43: 1171-1179, 1984.
- FREEDMAN, S.B.; HARLEY, E.A. & IVERSEN, L.L. Relative affinities of drugs acting at cholinceptors in displacing agonist and antagonist radioligands: the NMS/OXO-M ratio as an index of efficacy at cortical muscarinic receptors. *Br. J. Pharmacol.*, 93: 437-445, 1988.
- GAGERMAN, E.; IDAHL, L. Å.; MEISSNER, H.P. & TÄLJEDAL, I.-B. Insulin release, cGMP, cAMP, and membrane potential in acetylcholine-stimulated islets. *Am. J. Physiol.*, 235: E493-500, 1978.
- GARCIA, M.-C.; HERMANS, M.P. & HENQUIN, J.C. Glucose-, calcium- and concentration-dependence of acetylcholine stimulation of insulin release and ionic fluxes in mouse islets. *Biochem. J.*, 254: 211-218, 1988.
- GEMBAL, M.; GILON, P. & HENQUIN, J.C. Evidence that glucose can control insulin release independently from its action on ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in mouse B cells. *J. Clin. Invest.*, 89: 1288-1295, 1992.
- GEMBAL, M.; DETIMARY, P.; GILON, P.; GAO, Z.-Y. & HENQUIN, J.C. Mechanisms by which glucose can control insulin release independently from its action on adenosine triphosphate-sensitive K<sup>+</sup> channels in mouse B cells. *J. Clin. Invest.*, 91: 871-880, 1994.
- GIACHETTI, A.; MICHELETTI, R. & MONTAGNA, E. Cardioselective profile of AF-DX 116 a muscarine M<sub>2</sub> receptor antagonist. *Life Sci.*, 38: 1663-1672, 1986.
- GILMAN, A.G. G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu. Rev. Biochem.*, 56: 615-649, 1987.

- GILON, P. & HENQUIN, J.C. Activation of muscarinic receptors increases the concentration of free  $\text{Na}^+$  in mouse pancreatic B-cells. *FEBS Lett.*, 315: 353-356, 1993.
- GILON, P.; NENQUIN, M. & HENQUIN, J.C. Dual effects of Acetylcholine (ACh) on the concentration of cytoplasmic Ca in islets cells. *Diabetes*, 43 (Suppl. 1-Abstr. 584): p.186A, 1994.
- GRAPENGIESSER, E.; GYLFE, E. & HELLMAN, B. Three types of cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations in stimulated pancreatic B-cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, 268: 404-407, 1989.
- HAMMER, R.; BERRIE, C.P.; BIRDSALL, N.J.M.; BURGEN, A.S.V. & HULME, E.C. Pirenzepine distinguishes between different subclasses of muscarinic receptors. *Nature*, 283: 90-92, 1980.
- HANKS, J.H. & WALLACE, R.F. Relation of oxygen and temperature in preservation of tissues by refrigeration. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 71: 200-201, 1949. APUD: Regulation des flux calciques dans les ilots de Langerhans. Bruxelles, 1980. Tese (Professor Adjunto) Université Libre de Bruxelles.
- HELMAN, A.; MARRE, M.; BOBBIONI, E.; POUSSIER, P.L.; REACH, G. & ASSAN, R. The brain-islets axis: the nervous control of the endocrine pancreas. *Diabete & Metabolisme*, 8: 53-64, 1982.
- HENDERSON, R. & UNWIN, P. Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy. *Nature*, 257: 28-33, 1975.
- HENDERSON, R.; BALDWIN, J.M.; CESKA, T.A.; ZEMLIN, F.; BECKMANN, R. & DOWNING, K.H. Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. *J. Mol. Biol.*, 213: 899-920, 1990.
- HENQUIN, J.C. & NENQUIN, M. The muscarinic receptor subtype in mouse pancreatic B-cells. *FEBS Lett.*, 236: 89-92, 1988.
- HENQUIN, J.C.; GARCIA, M.C.; BOZEM, M.; HERMANS, M.P. & NENQUIN, M. Muscarinic control of pancreatic  $\beta$ -cell function involves sodium-

- dependent depolarization and calcium-influx. *Endocrinology*, 122: 2134-2142, 1988.
- HERCHUELZ, A.; COUTURIER, E. & MALAISSE, W.J. Regulation of calcium fluxes in pancreatic islets: glucose-induced calcium-calcium exchange. *Am. J. Physiol.*, 238: E96-E106, 1980.
- HERCHUELZ, A. & LEBRUN, P. A role for Na/Ca exchange in the pancreatic B cell. *Biochem. Pharmacol.*, 45: 7-11, 1993.
- HERMANS, M.P. & HENQUIN, J.C. Relative importance of extracellular and intracellular Ca<sup>2+</sup> for acetylcholine stimulation of insulin release in mouse islets. *Diabetes*, 38: 198-204, 1989.
- HERMANS, M.P.; SCHMEER, W. & HENQUIN, J.C. Why is acetylcholine a potentiator and not an initiator of insulin release? *Diabetologia*, 29: 548A-549A (Abst. 212), 1986.
- HERMANS, M.P.; SCHMEER, W. & HENQUIN, J.C. Modulation of the effect of acetylcholine on insulin release by the membrane potential of B cells. *Endocrinology*, 120: 1765-1773, 1987.
- HIRIART, M. & HAMIREZ-MEDELES, C.M. Muscarinic modulation of insulin secretion by single pancreatic  $\beta$ -cells. *Mol. Cel. Endocrinol.*, 93: 63-69, 1993.
- HOTH, M. & PENNER, R. Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature*, 355: 353-355, 1992.
- HULME, E.C.; BIRDSALL, N.J.M. & BUCKLEY, N.J. Muscarinic receptors subtypes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 30: 633-673, 1990.
- HULME, E.C.; KURTENBACH, E. & CURTIS, C.A.M. Muscarinic acetylcholine receptors: structure and function. *Biochem. Soc. Trans.*, 19: 133-138, 1991.
- INOUE, M. & YOSHII, M. Modulation of ion channels by somatostatin and acetylcholine. *Prog. Neurobiol.*, 38: 203-230, 1992.
- IONESCU, E. & JEANRENAUD, B. Effect of electrical stimulation of the vagus nerve on insulinemia and glycemia in *Acomys cahirinus* mice. *Endocrinology*, 123: 885-890, 1988.

- ISLAM, M.S.; RORSMAN, P. & BERGGREN, P.O.  $Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$  release in insulin-secreting cells. *FEBS Lett.*, 296:287-291, 1992.
- JAIMOVICH E. & ROJAS, E. Intracellular  $Ca^{2+}$  transients induced by high external  $K^+$  and tetracaine in cultured rat myotubes. *Cell Calcium*, 15: 356-368, 1994.
- JONES, S.V.P. Muscarinic receptors subtypes: modulation of ion channels. *Life Sci.*, 52: 454-464, 1993.
- JONES, P.M.; STUTCHFIELD, J. & HOWELL, S.L. Effects of  $Ca^{2+}$  and a phorbol ester on insulin secretion from islets of Langerhans permeabilised by high-voltage discharge. *FEBS Lett.*, 191: 102-106, 1985.
- KASAI, H.; LI, Y.X. & MIYASHITA, Y. Subcellular distribution of  $Ca^{2+}$  release channels underlying  $Ca^{2+}$  waves and oscillations in exocrine pancreas. *Cell*, 74: 669-677, 1993.
- KELLEY, G.G.; ZAWALICH, K.C. & ZAWALICH, W.S. Calcium and mitochondrial signal interact to stimulate phosphoinositide hydrolysis and insulin secretion in rat islets. *Endocrinology*, 134: 1648-1654, 1994.
- KRAPIVINSKY, G.; GORDON, E.A.; WICKMAN, K.; VELIMIROVIC, B., KRAPIVINSKY, L. & CLAPHAM, D.E. The G-protein-gated atrial  $K^+$  channel  $I_{KACH}$  is a heteromultimer of two inwardly rectifying  $K^+$ -channel proteins. *Nature*, 374:135-141, 1995.
- KREBS, H.A. & HENSELEIT, K. Untersuchungen über die Hanstoffbildung im Tierkörper. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol.-Chem.*, 210: 33-66, 1932. APUD: HERCHUELZ, A. Regulation des flux calciques dans les ilots de Langerhans. Bruxelles, 1980. Tese (Professor Adjunto) Université Libre de Bruxelles.
- KUBO, T.; BUJO, H.; AKIBA, I.; NAKAI, J.; MISHINA, M. & NUMA, S. Location of a region of the muscarinic acetylcholine receptor involved in selective effector coupling. *FEBS Lett.*, 241: 119-125, 1988.
- KUKULJAN, M.; GONÇALVES, A. & ATWATER, I. Charibdotoxin-sensitive  $K_{(Ca)}$  channel is not involved in glucose-induced electrical activity in pancreatic B-cells. *J. Membr. Biol.*, 119: 187-195, 1991.

- LAMBRECHT, G.; FEIFEL, R.; FORTH, B.; STOHMANN, C.; TACKE, R. & MUTSCHLER, E. p-Fluoro-hexahydro-sila-difenidol: the first M<sub>2</sub>β-selective muscarinic antagonist. *Eur. J. Pharmacol.*, 152: 193-194, 1988.
- LECHLEITER, J.; GIRARD, S.; PERALTA, E. & CLAPHAM, D. Spiral calcium wave propagation and annihilation in *Xenopus laevis* oocytes. *Science*, 252: 123-126, 1991.
- LEE, N.H. & EL-FAKAHANY, E.E. Allosteric interactions at m1, m2 and m3 muscarinic receptor subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 256: 468-479, 1991.
- LOEWENSTEIN, W.R. & ROSE, B. Calcium in (junctional) intercellular communication and a thought on its behavior in intracellular communication. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 307: 285-305, 1978.
- LOUIS-SYLVESTRE, J. Preabsortive insulin release and hypoglycemia in rats. *Am. J. Physiol.*, 230: 56-60, 1976.
- LOUIS-SYLVESTRE, J. Relationship between two stages of prandial insulin release in rats. *Am. J. Physiol.*, 4: E103-E110, 1978.
- MAEDA, A.; KUBA, T.; MISHINA, M. & NUMA, S. Tissue distribution of mRNAs encoding muscarinic acetylcholine receptor subtypes. *FEBS Lett.*, 239: 339-342, 1988.
- MALAISSSE, W.J.; MAHY, M. & MATHIAS, P.C.F. Binding of [<sup>3</sup>H]-methylscopolamine to rat pancreatic islet. *IRCS Med. Sci.*, 13: 503-504, 1985.
- MALAISSSE, W.J.; BOSCHERO, A.C.; KAWAZU, S. & HUTTON, J.C. The stimulus secretion coupling of glucose-induced insulin release XXVII. Effect of glucose on K<sup>+</sup> fluxes in isolated islets. *Pflügers Arch.*, 373: 237-242, 1978.
- MALAISSSE, W.J. Stimulus-secretion coupling in the pancreatic B-cell. The cholinergic pathway for insulin release. *Diabetes Metabolism Reviews*. Wiley & sons, New York, 1986. Vol. 3, pp. 243-259.

- RIBALET, B. & CIANI, S. Regulation by cell metabolism and adenine nucleotides of a K channel in insulin-secreting  $\beta$  cells (RINm5F). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**: 1721-1725, 1987.
- ROE, M.W.; MERTZ, R.J.; LANCASTER, M.E.; WORLEY III, J.F. & DUKES, I.D. Thapsigargin inhibits the glucose-induced decrease of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in mouse islets of Langerhans. *Am. J. Physiol.*, **266**: E852-E862, 1994.
- ROJAS, E.; HIDALGO, J.; CARROLL, P.B., LI, M.X. & ATWATER, I. A new class of calcium channels activated by glucose in human pancreatic  $\beta$ -cells. *FEBS Lett.*, **261**: 265-270, 1990.
- ROONEY, T.A. & THOMAS, A.P. Intracellular calcium waves generated by  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -dependent mechanisms. *Cell Calcium*, **14**: 674-690, 1993.
- RORSMAN, P.; ASHCROFT, F.M. & TRUBE, G. Single Ca channel currents in mouse pancreatic B-cells. *Pflügers Arch.*, **412**: 597-603, 1988.
- RORSMAN, P. & TRUBE, G. Glucose dependent  $\text{K}^+$ -channels in pancreatic  $\beta$ -cells are regulated by intracellular ATP. *Pflügers Arch.*, **405**: 305-309, 1985.
- RUDY, B. Diversity and ubiquity of K channels. *Neuroscience*, **25**: 729-749, 1988.
- SAIKI, R.K.; GEFAND,, D.H.; STOFFEL,S.; SCHARF, S.J.; HIGUSHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B. & ERLICH, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA thermostable polymerase. *Science*, **239**: 487-491, 1988.
- SANCHEZ-ANDRÉS, J.V.; RIPOLL, C. & SORIA, B. Evidence that muscarinic potentiation of insulin release is initiated by an early transient calcium entry. *FEBS Lett.*, **231**: 143-147, 1988.
- SANTOS, R.M. & ROJAS, E. Muscarinic receptor modulation of glucose-induced electrical activity in mouse pancreatic B-cells. *FEBS Lett.*, **249**: 411-417, 1989.
- SCHILLING, W.P.; CABELLO, O.A. & RAJAN, L. Depletion of the inositol 1,4,5-triphosphate-sensitive intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  store in vascular endothelial

- cells activates the agonist-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$ -influx pathway. *Biochem. J.*, 284: 521-530, 1992.
- SCHIMERLIK, M.I. Structure and function of muscarinic receptors. *Prog. Brain Res.*, 84: 11-19, 1990.
- SCOTT, A.M.; ATWATER, I. & ROJAS, E. A method for the simultaneous measurement of insulin release and B-cell membrane potential in single mouse islets of Langerhans. *Diabetologia*, 21: 470-475, 1981.
- SLIVKA, S.R. & INSEL, P.A. Phorbol ester and neomycin dissociate bradykinin receptor-mediated arachidonic acid release and polyphosphoinositide hydrolysis in Madin-Darby canine kidney cells. *J. Biol. Chem.*, 263: 14640-14617, 1988.
- SMITH, B. & PORTE, D. Neuropharmacology of the pancreatic islets. *Ann. Rev. Pharmacol. and Toxicol.*, 16: 269-285, 1976.
- SMITH, P.A.; RORSMAN, P. & ASHCROFT, F.M. Modulation of dihydropyridine-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  channels by glucose metabolism in mouse pancreatic  $\beta$ -cells. *Nature*, 342: 550-553, 1989a.
- SMITH, P.A.; BOKVIST, K. & RORSMAN, P. Demonstration of A-currents in pancreatic islet cells. *Pflügers Arch.*, 413: 441-443, 1989b.
- SMITH, C.; PHILLIPS, M. & MILLER, C. Purification of charybdotoxin, a specific inhibitor of the high conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channel. *J. Biol. Chem.*, 261: 14607-14613, 1986.
- STEFFENS, A.B. Rapid absorption of glucose in the intestinal tract of the rat after ingestion of a meal. *Physiol. Behavior*, 4: 829-832, 1969.
- THOMAS, E.A.; BAKER, S.A. & EHLERT, F.J. Selective blockage of  $\text{M}_3$  receptor-mediated responses by 4-DAMP mustard. *Life Sci.*, 52 (Abstr. 46): p. 573, 1993.
- THORN, P.; LAWRIE, A.M.; SMITH, P.M.; GALLANDER, D.V. & PETERSEN, O.H. Local and global cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations in exocrine cells evoked by agonists and inositol triphosphate. *Cell*, 74: 661-668, 1993.

- VACA, L. & KUNZE, D.L. Depletion and refilling of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores induce oscillations of  $\text{Ca}^{2+}$  current. *Am. J. Physiol.*, 264: H1319-H1322, 1993.
- VERSPOHL, E.J.; TACKE, R.; MUTSCHLER, E. & LAMBRECHT, G. Muscarinic receptor subtypes in rat pancreatic islets: binding and functional studies. *Eur. J. Pharmacol.*, 178: 303-311, 1990.
- WANG, J.; BAIMBRIDGE, K.G. & BROWN, J. Glucose- and acetylcholine-induced increase in intracellular free  $\text{Ca}^{2+}$  in subpopulations of individual rat pancreatic  $\beta$ -cells. *Endocrinology*, 131: 146-152, 1992.
- WATSON, S. & GIRDLESTONE, D. Receptor nomenclature Supplement-5<sup>th</sup> Ed. *Trends Pharmacol. Sci.* UK, Elsevier Science Ltd., 1994. p.30
- WESS, J. Molecular basis of muscarinic acetylcholine receptor function. *Trends in Pharmacol. Sci.*, 14: 308-313, 1993.
- WESS, J.; GDULA, D. & BRANN, M.R. Site-directed mutagenesis of the m3 muscarinic receptor: identification of a series of threonine and tyrosine residues involved in agonist but not antagonist binding. *EMBO J.*, 10: 3729-3734, 1991.
- WOLF, B.A.; COLCA, J.R.; TURK, J.; FLORHOLMEN, J. & McDANIEL, M.L. Regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis by islet endoplasmic reticulum and its role in insulin secretion. *Am. J. Physiol.*, 254: E121-E136, 1988.
- WOLLHEIM, C.B. & SHARP, G.W.G. Regulation of insulin release by calcium. *Physiol. Rev.*, 61: 919-973, 1981.
- WOLLHEIM, C.B.; SIEGEL, E.G. & SHARP, G.W.G. Dependency of acetylcholine-induced insulin release on  $\text{Ca}^{++}$  uptake by rat pancreatic islets. *Endocrinology*, 107: 924-929, 1980.
- WOLLHEIM, C.B. & BIDEN, T.J. Second messenger function of inositol 1,4,5-triphosphate early stages in inositol phosphates, cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  and insulin release in carbamylcholine-stimulated RINm5F cells. *J. Biol. Chem.*, 261: 8314-8319, 1986.

---

ZEIFACH, A. & LEWIS, R.S. Mitogen-regulated  $\text{Ca}^{2+}$  current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6295-6299, 1993.