



# Regulação da actividade da Na,K-ATPase por glucose em célula $\beta$ -pancreática na ausência e na presença de um estado de intolerância a esta

*Ana Cristina Bugalho Oliveira Rodrigues Costa*

Tese apresentada à Universidade de Évora  
para obtenção do Grau de Doutor em Bioquímica

ORIENTAÇÃO: *Júlio Manuel da Cruz Morais*  
CO-ORIENTAÇÃO: *Célia Maria Miguel Antunes*

ÉVORA, AGOSTO DE 2011





INSTITUTO DE INVESTIGAÇÃO E FORMAÇÃO AVANÇADA - IIFA

**Regulação da actividade da Na,K-ATPase por glucose  
em célula  $\beta$ -pancreática  
na ausência e na presença de um estado de intolerância a esta**

**Ana Cristina Bugalho Oliveira Rodrigues Costa**

Dissertação apresentada à Universidade de Évora para a obtenção do grau de Doutor em Bioquímica

**Orientadores da Tese:** Professor Doutor Júlio Manuel da Cruz Morais

Professora Doutora Célia Maria Miguel Antunes

**ÉVORA**

**2011**



Looking for the answer.

You hunt it,  
you catch it,  
you fool yourself;  
the answer,  
is always,  
a step ahead.

Jens Christian Skou,  
Prémio Nobel em 1997 pelo esclarecimento  
do funcionamento da Na,K-ATPase.



*“Life ultimately depends on the traffic of small ions across the membranes  
that surround cells and organelles.”*

Gadsby et al., 2009, *Phil. Trans. R. Soc. B*, 364, 229-238.



## AGRADECIMENTOS

Gostaria, em primeiro lugar, de agradecer aos meus orientadores, o Professor Doutor Júlio Manuel da Cruz Morais e a Professora Doutora Célia Maria Miguel Antunes, pela forma como contribuíram para a elaboração deste trabalho. Ao Professor Doutor Cruz Morais devo-lhe sobretudo o incentivo e a liberdade para trilhar novos caminhos, mantendo o seu inestimável apoio científico. À Professora Doutora Célia Antunes por ter estado sempre presente desde a conceptualização do trabalho até à elaboração da última experiência, partilhando o saber e o saber-fazer, incentivando sempre o ir mais além, pela amizade.

Em segundo lugar, gostaria de deixar um agradecimento às entidades financiadoras do presente trabalho, sem as quais este não teria sido possível. Começo por enunciar a Fundação Eugénio de Almeida, pelas bolsas de Doutoramento que me concedeu em dois anos consecutivos (anos civis 2008 e 2009). Em seguida o meu agradecimento vai para o Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrâneas (ICAAM), de que sou colaboradora, e que me facultou a utilização de espaços laboratoriais e equipamentos como o Laboratório de Cultura de Tecidos, onde se desenvolveu grande parte deste trabalho, e me apoiou financeiramente com a ração para os animais e com diversos reagentes. O meu agradecimento vai ainda para o Departamento de Química da Universidade de Évora que me apoiou com espaços laboratoriais e múltiplos equipamentos e ainda com a possibilidade de utilização do biotério e, em particular, facilitando funcionárias para a manutenção e limpeza das instalações dos animais. Por último, embora não menos relevante, um agradecimento ao Centro de Neurociências e Biologia Celular (CNC) com o qual estabelecemos uma estreita colaboração, em particular com o Grupo de Biofísica Celular, nas pessoas do Professor Doutor Luís do Rosário e Professora Doutora Rosa Santos, que nos cederam equipamento, reagentes e consumíveis, indispensáveis à realização deste trabalho, particularmente no seu arranque.

Um agradecimento também à minha querida colega Professora Doutora Cristina Barrocas Dias, que me facilitou a utilização de verbas com as quais pudemos efectuar a compra de muitos consumíveis e reagentes para cultura de células, indispensáveis ao estudo que desenvolvemos. O contributo generoso da Professora Cristina Costa foi uma prova de solidariedade académica, resultante de um profundo partilhar das dificuldades sentidas pelas Universidades Portuguesas, para as quais, no momento actual, tem sido muito difícil levar a bom porto trabalhos de doutoramento não abrangidos por projectos de investigação. Esta generosidade comoveu-me, especialmente por não ser vulgar, e espero que este gesto me



torne uma melhor pessoa, também sensível aos problemas dos outros, mesmo quando, aparentemente, eles não me interpelem directamente.

Um agradecimento também muito particular ao Professor Doutor Fernando Capela e Silva, que aceitou com entusiasmo o desafio de nos auxiliar com os estudos de imunohistoquímica e imunocitoquímica, com uma disponibilidade extraordinária na realização das experiências, na captação das fotomicrografias e na sua análise, sempre com uma contagiante boa disposição. Um agradecimento muito sincero também pela revisão deste texto e pelas suas sugestões.

Aos colegas do Departamento de Química que me permitiram gozar as minhas Dispensas de Serviço Docente disponibilizando-se para assegurar um excesso de serviço docente, especialmente àqueles para quem essa disponibilidade passou também por leccionarem disciplinas novas e eventualmente numa área diferente daquela que tem sido a sua área de especialização. Um agradecimento também à assessora Fátima Candeias que, numa altura crucial da realização deste trabalho aceitou a leccionação de aulas práticas, permitindo-me manter a dispensa de serviço docente.

Aos colegas do Departamento de Medicina Veterinária, em particular à Professora Doutora Cristina Queiroga e Professora Doutora Eduarda Potes, que nos acolheram no Serviço de Microbiologia, do qual faz parte o Laboratório de Cultura de Tecidos, facilitando-nos ainda a utilização de equipamento de outros espaços laboratoriais adjacentes, em particular do leitor de micro-placas, microscópio invertido e equipamento de fotomicrografia.

À Doutora Joana Reis, pelo enorme companheirismo demonstrado na elaboração de protocolos de cultura de células e de imunocitoquímica, pela sua enorme generosidade na partilha de materiais e de conhecimentos.

Ao Professor Doutor Helder Cortes, pela cordialidade na partilha do espaço do Laboratório de Cultura de Tecidos, pela disponibilidade para trocar conhecimento, reagentes e materiais descartáveis, o que, em algumas situações, evitou ter que parar o trabalho laboratorial.

À Professora Doutora Cristina Rego do Centro de Neurociências e Biologia Celular por me ter auxiliado nos primeiros passos da técnica do Western *Blot*. Um agradecimento também à Dr.<sup>a</sup> Sandra Almeida que, no laboratório, me acompanhou na aprendizagem dessa técnica.

À Professora Doutora Ana Varela Coelho do Laboratório de Espectrometria de Massa do Instituto de Tecnologia Química e Biológica da Universidade Nova de Lisboa, responsável pelas análises de MALDI-TOF-TOF, pela prontidão na recepção análise das amostras, pela disponibilidade demonstrada na clarificação da técnica e dos dados obtidos, bem como na discussão dos resultados.

À técnica superior Engenheira Luísa Fialho, do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Veterinário da Universidade de Évora, pela valiosíssima ajuda na preparação dos tecidos e de lâminas para imuno-histoquímica.

Às técnicas de laboratório do Departamento de Química Jesuína Mósca e Anabela Cabeça, pela enorme disponibilidade demonstrada na preparação de soluções, lavagem e esterilização de material e manutenção dos espaços laboratoriais.

Às técnicas do laboratório de Microbiologia do Departamento de Medicina Veterinária Esperança Coelho e Guilhermina Pias, pela colaboração prestada na esterilização do material a utilizar na sala de cultura de tecidos.

Ao Dr. Hugo Figueiredo, à Dr.<sup>a</sup> Inês Vieira, à Dr.<sup>a</sup> Cláudia Pereira e ao Dr. André Bonacho, que realizaram os seus trabalhos de estágio e/ou mestrado no nosso laboratório, pelo grande companheirismo e inestimável auxílio nos longos dias de isolamento de ilhéus. Um agradecimento também muito especial à Dr.<sup>a</sup> Joana Real, companheira de longas horas de isolamento de ilhéus e cultura de células, pela sua valiosa contribuição para o estabelecimento do método de determinação da actividade enzimática da Na,K-ATPase em células  $\beta$ -pancreáticas.

Aos meus colegas de departamento Dr. António do Canto, Professora Doutora Rosário Martins, Professora Doutora Ana Teresa Palma e Professora Doutora Dora Teixeira, e às minhas colegas de laboratório Professora Doutora Elsa Lamy e Professora Doutora Ana Ferreira, pelo incentivo, disponibilidade e amizade sempre demonstradas.

Por último, mas não menos importantes para mim, um agradecimento muito sentido à minha família, pais e sogros, pelo valioso auxílio nas tarefas de gestão familiar, à minha irmã Sara, aos meus filhos, por compreenderem o sentido deste enorme esforço partilhado por todos, e ao meu querido Paulo, por estar sempre ao meu lado.



## NOTA INTRODUTÓRIA

A Na,K-ATPase tem sido o alvo da nossa investigação e interesse científico desde 1996, o ano em que realizei o meu estágio de Licenciatura, sob a orientação do Professor Doutor Júlio Cruz Morais, no Departamento de Química da Universidade de Évora, ainda enquanto aluna da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Nesse trabalho, intitulado “Na,K-ATPase em Cérebro de Murganho – Efeitos *in vitro* de alguns xenobióticos”, estudámos as propriedades cinéticas da Na,K-ATPase em fracção sinaptossomal de cérebro de murganho e estudámo-la enquanto ferramenta de avaliação toxicológica, caracterizando alterações *in vitro* à sua actividade observadas na presença de alguns xenobióticos como o cloreto de tributilestanho<sup>1</sup> e o valproato de sódio<sup>2</sup>.

Na realização de Provas de Aptidão Pedagógica e Capacidade Científica na Universidade de Évora, em 2002, também sob a orientação do Professor Doutor Cruz Morais, tornámos a focar a nossa atenção na Na,K-ATPase, tendo sido elaborados o Trabalho de Síntese “Na,K-ATPase, uma perspectiva toxicológica e farmacológica” e o Plano de Aula com o tema “Efeito do cloreto de tributilestanho na actividade enzimática da Na,K-ATPase”. Neste trabalho, continuou a interessar-nos a possibilidade de utilização da bomba como modelo de avaliação toxicológica, possibilitando-nos também a reflexão sobre a sua eventual relevância como alvo farmacológico, não só na patologia cardíaca, mas como potencial alvo terapêutico noutras patologias que também têm associadas alterações ao normal funcionamento da bomba, entre elas, a diabetes.

A admissão a Doutoramento ocorreu em 2005, tendo sido registado o tema “Modulação da actividade da Na,K-ATPase por substâncias exógenas”, sob orientação do Professor Júlio Manuel da Cruz Morais. Nesse sentido, foi desenvolvido trabalho na perspectiva toxicológica, em particular com o composto cloreto de tributilestanho, desta vez *in*

---

<sup>1</sup> Costa, A. R., Candeias F., Cruz-Morais, J., (1997), “Efeito do cloreto de tributil estanho na actividade “*in vitro*” da Na,K-ATPase em cérebro de murganho”, *XI Encontro Galego-Portugués de Química*, 26 a 28 de Novembro de 1997, Ferrol, Espanha, pp. 141-142.

<sup>2</sup> Costa A. R., Candeias, F., Cruz-Morais, J., (2001), “Effect of sodium valproate on Na,K-ATPase activity, *in vitro*, in mice brain”, *27<sup>th</sup> FEBS/PABMB Meeting*, 30 de Junho a 5 de Julho de 2001, Lisboa, Portugal.

vivo e utilizando o rato Wistar como modelo animal. Alguns dos resultados deste trabalho foram apresentados em congressos nacionais e internacionais da especialidade<sup>3</sup>. Os resultados obtidos no decurso deste estudo, bem como a bibliografia, apontavam para uma relação entre a actividade enzimática da Na,K-ATPase e as alterações do metabolismo da glucose.

Tornou-se então necessário delinear um plano de trabalho mais concreto, intitulado “Caracterização da Na,K-ATPase no ilhéu de Langerhans e estudo da sua relevância na fisiopatologia da diabetes *mellitus* tipo 2” e que, em 2007, a Professora Célia Maria Miguel Antunes aceitou co-orientar.

Para levar este trabalho a bom porto tivemos que ultrapassar inúmeras dificuldades, a começar pelo financiamento, passando por encontrar espaços nos quais os novos sistemas pudessem ser montados, pela separação física dos espaços onde este trabalho decorreu. Contudo, contámos também com muitas boas-vontades, que nos surgiram no caminho e que, com o esforço de todos, foram tornando possível ultrapassar as dificuldades e permitir que o trabalho fosse desenvolvido na Universidade de Évora. Ao finalizarmos esta etapa vemos também que do nosso esforço nasceu a possibilidade de poder continuar a desenvolver, nesta instituição, a área da célula  $\beta$ -pancreática e do papel dos sistemas iónicos de membrana na sua fisiologia, desejo esse que acalentamos com esperança.

---

<sup>3</sup> Costa A. R., Branco S. M, Cruz Morais J. M., (2008), “Tributyltin chloride disrupts glucose and lipid homeostasis on Wistar male rats”, *SETAC Europe 18th Annual Meeting*, 25 a 29 de Maio, Varsóvia, Polónia.

Costa A. R., Cruz Morais, J., (2007), “Subacute effects of tributyltin chloride repeated doses on Wistar male rat P450 activities”, *SETAC Europe 17th Annual Meeting*, 20 a 24 de Maio, Porto, Portugal.

Costa A. R., Cruz Morais, J., (2006), “Subacute effects of tributyltin chloride repeated doses on Wistar male rat”, *XVth National Congress of Biochemistry*, 8 a 10 de Dezembro, Aveiro, Portugal.

# Índice

<b>Agradecimentos</b> .....	<b>vii</b>
<b>Nota Introdutória</b> .....	<b>xi</b>
<b>Lista de tabelas</b> .....	<b>xvii</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>xviii</b>
<b>Abreviaturas</b> .....	<b>xxi</b>
<b>Unidades</b> .....	<b>xxv</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>xxvii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>xxix</b>
<b>1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 A Na,K-ATPase</b> .....	<b>3</b>
1.1.1 Estrutura-função da Na,K-ATPase .....	5
1.1.2 Regulação da Na,K-ATPase .....	7
1.1.2.1 A regulação por substratos.....	8
1.1.2.2 A expressão isoenzimática da Na,K-ATPase .....	10
1.1.2.2.1 A especificidade da expressão isoenzimática .....	10
1.1.2.2.2 Estrutura das isoformas das subunidades constituintes da Na,K-ATPase.....	11
1.1.2.2.3 As diferentes propriedades dos isoenzimas.....	13
1.1.2.3 A regulação pelo ambiente lipídico membranar .....	15
1.1.2.4 A regulação por esteróides cardiotónicos .....	16
1.1.2.5 A regulação por fosforilação/desfosforilação.....	19
1.1.2.6 A modulação da Na,K-ATPase por insulina .....	20
1.1.3 Patologias associadas a alterações na Na,K-ATPase.....	22
1.1.3.1 A Na,K-ATPase na Diabetes .....	23
<b>1.2 A secreção de insulina estimulada por glucose</b> .....	<b>27</b>
1.2.1 O pâncreas, o ilhéu de Langerhans e a célula $\beta$ -pancreática.....	27
1.2.2 A biossíntese da insulina .....	29
1.2.3 A exocitose da insulina e o padrão bifásico de secreção.....	31
1.2.4 Acoplamento estímulo-secreção em célula $\beta$ -pancreática .....	35
1.2.4.1 Teoria vigente da secreção de insulina estimulada por glucose .....	35
1.2.4.1.1 O transportador GLUT2.....	36
1.2.4.1.2 A glucocinase .....	37
1.2.4.1.3 A regulação dos níveis intracelulares de nucleótidos .....	38
1.2.4.2 A amplificação metabólica da secreção de insulina .....	39
1.2.4.3 A regulação do metabolismo pela proteína cinase activada por AMP (AMPK) .....	44
1.2.5 Mecanismos iónicos subjacentes à secreção de insulina induzida por glucose .....	48
1.2.5.1 Canais iónicos envolvidos na secreção de insulina .....	51

1.2.5.1.1	O canal K(ATP).....	51
1.2.5.1.2	Os canais de Ca <sup>2+</sup> sensíveis à voltagem e o influxo de Ca <sup>2+</sup> .....	53
1.2.5.1.3	Os canais de K <sup>+</sup> sensíveis à voltagem.....	54
1.2.5.1.4	Os canais de K <sup>+</sup> sensíveis à voltagem e activados por Ca <sup>2+</sup> .....	55
1.2.5.1.5	Canais de Na <sup>+</sup> dependentes de voltagem.....	56
1.2.5.2	Outros sistemas electrogénicos em célula β-pancreática.....	57
1.2.5.2.1	O trocador Na/Ca.....	57
1.2.5.2.2	Ca <sup>2+</sup> -ATPase da membrana plasmática.....	58
1.2.5.2.3	Ca <sup>2+</sup> -ATPase do retículo endoplasmático.....	59
1.2.5.2.4	A Na,K-ATPase em célula-β pancreática.....	61
<b>1.3</b>	<b>A Diabetes Tipo 2.....</b>	<b>65</b>
1.3.1	Fisiopatologia da DT2.....	66
1.3.2	O diagnóstico da diabetes.....	69
1.3.3	Modelos animais da doença.....	71
<b>2</b>	<b>PROBLEMÁTICA E OBJECTIVOS.....</b>	<b>75</b>
<b>3</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>81</b>
<b>3.1</b>	<b>Desenvolvimento de um método para a determinação da actividade enzimática da Na,K-ATPase em células β-pancreáticas em cultura primárias.....</b>	<b>83</b>
3.1.1	Introdução.....	83
3.1.2	Objectivos.....	83
3.1.3	Metodologias.....	84
3.1.3.1	Reagentes.....	85
3.1.3.2	Modelo animal.....	85
3.1.3.3	Isolamento de ilhéus de Langerhans.....	85
3.1.3.4	Dispersão dos ilhéus e cultura de células β-pancreática.....	88
3.1.3.5	Ensaio de actividade enzimática da Na,K-ATPase.....	90
3.1.3.6	Determinação da viabilidade celular.....	91
3.1.3.7	Quantificação da proteína.....	92
3.1.3.8	Protocolo de aplicabilidade do método ao estudo do efeito da glucose na actividade da Na,K-ATPase em célula β-pancreática.....	93
3.1.3.9	Quantificação da insulina segregada por ELISA competitivo.....	94
3.1.3.9.1	Revestimento da fase sólida com anticorpo.....	95
3.1.3.9.2	Lavagem das placas.....	95
3.1.3.9.3	Saturação da placa com BSA.....	95
3.1.3.9.4	Ligação do antigénio e do conjugado.....	96
3.1.3.9.5	Adição do substrato e reacção enzimática.....	96
3.1.3.9.6	Análise dos resultados do método ELISA.....	97
3.1.3.10	Análise estatística.....	98
3.1.4	Resultados e Discussão.....	99
3.1.4.1	Resultados da optimização do método para a determinação da actividade enzimática da Na,K-ATPase em células β-pancreáticas.....	99
3.1.4.2	Aplicação do método ao estudo da modulação da actividade da Na,K-ATPase por glucose em célula β-pancreática e doseamento da secreção de insulina.....	102
3.1.5	Conclusões.....	104

<b>3.2</b>	<b>Estudo do efeito da glucose na actividade enzimática da Na,K-ATPase em célula <math>\beta</math>-pancreática de animais controlo e GIR</b>	<b>105</b>
3.2.1	Introdução	105
3.2.2	Objectivos	106
3.2.3	Metodologias	108
3.2.3.1	Modelos animais	108
3.2.3.2	Determinação de pesos corporais e prova de tolerância à glucose por via oral (PTGO)	108
3.2.3.3	Quantificação da insulinemia do jejum	109
3.2.3.4	Estudo do efeito da glucose na actividade enzimática da Na,K-ATPase em célula $\beta$ -pancreática	110
3.2.3.5	Análise estatística	110
3.2.4	Resultados e Discussão	111
3.2.4.1	Caracterização do modelo GIR	111
3.2.4.2	Secreção de insulina em células- $\beta$ pancreáticas de animais controlo e GIR	113
3.2.4.3	Determinação da actividade enzimática da Na,K-ATPase em culturas primárias de células $\beta$ -pancreáticas de animais controlo e GIR	115
3.2.5	Conclusões	123
<b>3.3</b>	<b>Estudo da expressão isoenzimática da Na,K-ATPase em ilhéus de Langerhans de animais controlo e GIR</b>	<b>125</b>
3.3.1	Introdução	125
3.3.2	Objectivos	126
3.3.3	Metodologias	127
3.3.3.1	Reagentes	127
3.3.3.2	Modelos Animais	127
3.3.3.3	Preparação das secções de tecido pancreático	128
3.3.3.4	Imuno-histoquímica de tecido pancreático	128
3.3.3.4.1	Imuno-marcação simples	128
3.3.3.4.2	Imuno-marcação dupla	129
3.3.3.5	Captação e análise das fotomicrografias	131
3.3.3.6	Análise estatística	131
3.3.4	Resultados e Discussão	132
3.3.5	Conclusões	141
<b>3.4</b>	<b>Estudo do envolvimento da AMPK e da PKC na regulação da Na,K-ATPase por glucose em célula <math>\beta</math>-pancreática</b>	<b>143</b>
3.4.1	Introdução	143
3.4.2	Objectivos	145
3.4.3	Metodologias	146
3.4.3.1	Reagentes	146
3.4.3.2	Modelos Animais	146
3.4.3.3	Determinação da actividade enzimática da Na,K-ATPase em células $\beta$ -pancreática mantidas em culturas primárias	146
3.4.3.4	Análise por <i>Western Blot</i>	147
3.4.3.5	Análise por MALDI-TOF-TOF	149
3.4.3.5.1	Fundamento da técnica de MALDI-TOF-TOF	149
3.4.3.5.2	Preparação das amostras	150
3.4.3.5.3	MALDI-TOF-TOF	150
3.4.3.6	Análise por Imunocitoquímica	151
3.4.3.7	Análise estatística	152



3.4.4	Resultados e Discussão.....	153
3.4.4.1	Participação da AMPK na regulação da actividade da Na,K-ATPase por glucose .....	153
3.4.4.2	Estudo do envolvimento da PKC na regulação da actividade da Na,K-ATPase por glucose, em célula $\beta$ -pancreática .....	157
3.4.4.2.1	Optimização do procedimento para <i>Western Blot</i> .....	157
3.4.4.2.2	Análise da banda proteica de ~65 kDa por MALDI-TOF-TOF .....	159
3.4.4.2.3	Análise da banda de ~100 kDa por <i>Western Blot</i> .....	163
3.4.4.2.4	Estudo imunocitoquímico da marcação para a subunidade $\alpha_1$ -Na,K-ATPase fosforilada na posição Ser-23 .....	165
3.4.5	Conclusões.....	169
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>171</b>
	<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>177</b>
	<b>Anexo A .....</b>	<b>187</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resumo dos efeitos provocados pela diabetes na actividade ou expressão da Na,K-ATPase em diferentes tecidos ou órgãos .....	24
Tabela 2 - Modelos animais da DT2, espontâneos ou derivados geneticamente .....	73
Tabela 3 - Massas obtidas para a digestão teórica da subunidade $\alpha_1$ da Na,K-ATPase .....	162
Tabela 4 - Resultados de MALDI-TOF-TOF identificativos da amostra 1 .....	162
Tabela 5 - Resultados de MALDI-TOF-TOF identificativos da amostra 2 .....	163

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modelo Albers-Post para o funcionamento da Na,K-ATPase .....	4
Figura 2- Esquema da distribuição das subunidades $\alpha$ e $\beta$ da Na,K-ATPase na membrana plasmática .....	5
Figura 3 - Ilhéu de Langerhans .....	28
Figura 4 - Esquema representativo das etapas fundamentais da síntese da insulina .....	30
Figura 5 - Esquema representativo da exocitose da insulina .....	31
Figura 6 - Secreção bifásica de insulina. ....	33
Figura 7 – Esquema das etapas constituintes do acoplamento estímulo-secreção em célula $\beta$ -pancreática .....	36
Figura 8 - Interação entre a glucose e o metabolismo lipídico no acoplamento estímulo-secreção .....	43
Figura 9 - Registo de actividade eléctrica de célula $\beta$ -pancreática de rato .....	48
Figura 10 - Diagrama esquemático das correntes e fluxos iónicos na célula $\beta$ -pancreática .....	50
Figura 11 - Esquema da constituição do canal K(ATP).....	51
Figura 12 – Provas de tolerância à glucose por via oral em humanos e em ratos .....	71
Figura 13 - Isolamento de ilhéus de rato.....	86
Figura 14 - Fotomicrografia de células $\beta$ -pancreáticas durante o teste de exclusão do azul de tripano ...	91
Figura 15 - Exemplo de curva de calibração para quantificação de proteína pelo método BCA .....	92
Figura 16 - Esquema de um ELISA competitivo .....	94
Figura 17 - Exemplo de curva de calibração para ELISA de insulina .....	97
Figura 18 - Estudos de optimização do método de determinação enzimática da Na,K-ATPase em células $\beta$ -pancreáticas mantidas em cultura .....	100
Figura 19 - Estudo sequencial da secreção de insulina e do efeito da concentração de glucose na actividade enzimática da Na,K-ATPase.....	103
Figura 20 - Curvas de tolerância à glucose de fêmeas e machos de ratos controlo e GIR .....	111
Figura 21 - Insulinemia do jejum de ratos controlo e GIR .....	113
Figura 22 - Secreção de insulina de células de ratos controlo e GIR .....	114
Figura 23 - Efeito do período de incubação na actividade enzimática da Na,K-ATPase em resposta a diferentes concentrações de glucose .....	116
Figura 24 - Cinética do efeito da glucose (8,4 mM) na actividade enzimática da Na,K-ATPase.....	118
Figura 25 - Estudo dose-resposta do efeito da concentração de glucose na actividade da Na,K-ATPase	119

Figura 26 - Análise qualitativa e semi-quantitativa da expressão nos ilhéus de Langerhans das isoformas $\alpha_1$ , $\alpha_3$ e $\beta_2$ da Na,K-ATPase, em secções de pâncreas de ratos controlo e GIR, analisadas por imuno-histoquímica.....	133
Figura 27 - Quantificação da expressão da subunidade $\alpha_2$ -Na,K-ATPase, em secções de tecido pancreático de ratos controlo e GIR, por análise das áreas marcadas em imuno-histoquímica .....	135
Figura 28 - Fotomicrografias e gráfico da análise quantitativa da dupla marcação insulina/glucagina... 137	
Figura 29 - Fotomicrografias da marcação dupla insulina / $\alpha_2$ - Na,K-ATPase .....	139
Figura 30 - Efeito do AICAR e do Composto C na actividade enzimática da Na,K-ATPase em células $\beta$ -pancreáticas de ratos controlo .....	154
Figura 31 - Efeito do AICAR e do Composto C na actividade enzimática da Na,K-ATPase em células $\beta$ -pancreáticas de ratos GIR.....	155
Figura 32 - Membrana de <i>Western Blot</i> obtida por aplicação em separado da fracção de lisado de ilhéus de Langerhans solúvel em Triton-X100 da insolúvel nesse detergente .....	159
Figura 33 - Imagem digitalizada do gel de SDS-PAGE a partir do qual foram extraídas as duas bandas a analisar por MALDI-TOF-TOF .....	160
Figura 34 - Espectros de massa correspondentes à análise por MALDI-TOF das proteínas com massa molecular $\sim 65$ KDa extraídas do gel de SDS-PAGE .....	161
Figura 35 - Análise da intensidade relativa das bandas obtidas por <i>Western Blot</i> para a imunomarcação da subunidade $\alpha_1$ da Na,K-ATPase fosforilada na posição Ser-23 .....	164
Figura 36 – Identificação de células $\beta$ -pancreáticas em imunocitoquímica.....	166
Figura 37 – Análise da intensidade de fosforilação de $\alpha_1$ -Na,K-ATPase no resíduo Ser-23 por imunocitoquímica.....	167
Figura 38 – Esquema elucidativo de algumas etapas do processo de regulação da Na,K-ATPase induzido por glucose .....	174



## ABREVIATURAS

### Abreviaturas, acrónimos, estrangeirismos e respectiva tradução.

<b>ADP</b>	<i>Adenosine Diphosphate</i> – 5'-Difosfato de adenosina
<b>AICAR</b>	<i>Aminoimidazole carboxamide ribonucleotide</i> – Ribonucleótido de aminoimidazolo carbamida
<b>Akt</b>	Proteína cinase B
<b>AMPK</b>	Proteína cinase activada por AMP
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>ATP</b>	<i>Adenosine Triphosphate</i> – 5'-Trifosfato de adenosina
<b>BSA</b>	<i>Bovine serum albumin</i> – Albumina de soro bovino
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Íon cálcio
<b>Ca-L</b>	Canal de cálcio sensível à voltagem tipo L
<b>cAMP</b>	<i>Cyclic adenosine monophosphate</i> – 5'-Monofosfato de adenosina cíclica
<b>CGRP</b>	<i>Calcitonin-gene-related peptide</i> – Peptídeo geneticamente relacionado com a calcitonina
<b>CTS</b>	<i>Cardiotonic steroids</i> – Esteróides cardiotónicos
<b>DAB</b>	Diaminobenzidina
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	<i>Desoxiribonucleic acid</i> – Ácido desoxirribonucleico
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino-tetra-acético
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme Linked immuno-Sorbent Assay</i>
<b>Erk1/2</b>	<i>Extracellular-signal-regulated kinase 1/2</i> – Cinase regulada por sinais extracelulares 1/2
<b>FHM2</b>	Enxaqueca familiar hemiplégica de tipo 2

<b>FXYP</b>	Família de pequenas proteínas de membrana que têm em comum uma sequência de 35 amino-ácidos que se inicia com a sequência PFXYP e que contém 7 amino-ácidos invariantes e 6 muito conservados
<b>GDP</b>	<i>Guanosine Diphosphate</i> – Difosfato de guanosina
<b>GIR</b>	<i>Glucose intolerant rats</i> – Ratos com intolerância à glucose
<b>GLP-1</b>	<i>Glucagon-like polipeptide I</i> – Polipeptídeo I do tipo glucagina
<b>GLUT-2</b>	<i>Glucose transporter</i> – Transportador de tipo 2 de glicose
<b>GLUT-4</b>	<i>Glucose transporter</i> – Transportador de tipo 4 de glicose
<b>GTP</b>	<i>Guanosine Triphosphate</i> – Trifosfato de guanosina
<b>HRP</b>	<i>Horseradish peroxidase</i> – Peroxidase de rábano
<b>HEPES</b>	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i> – Ácido N-[2-hidroxietil] piperazina-N'-[2-etanossulfónico]
<b>Housekeeping</b>	Corresponde ao desempenho de funções constitutivas
<b>I</b>	Intensidade de corrente eléctrica
<b>I<sub>CRAN</sub></b>	<i>Calcium release activated non-selective cation current</i> – Corrente catiónica não selectiva activada pelo esvaziamento dos depósitos internos
<b>IP<sub>3</sub></b>	<i>1,4,5 -Inositol triphosphate</i> – 1,4,5 Trifosfato de inositol
<b>IP<sub>3</sub>R</b>	Receptor de IP <sub>3</sub>
<b>K<sup>+</sup></b>	ião potássio
<b>K(ATP)</b>	Canal de potássio dependente de ATP
<b>K(Ca)</b>	Canal de potássio sensível a Ca <sup>2+</sup> e à voltagem
<b>K<sub>DR</sub></b>	<i>Delayed Rectifier K<sup>+</sup> channel</i> – Canal de potássio rectificador tardio
<b>loop</b>	Zona da sequência peptídica sem estrutura secundária definida que liga segmentos com estrutura secundária definida
<b>MALDI-TOF</b>	<i>Matrix-assisted laser desorption ionization - Time-of-flight mass spectrometer</i>
<b>MAPK</b>	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i> – Cinase de proteínas activada por mitogénio
<b>Mg-ADP</b>	Complexo de magnésio (II) e ADP
<b>Mg-ATP</b>	Complexo de magnésio (II) e ATP
<b>mGDH</b>	Glicerol-3-fosfato desidrogenase ligada a FAD (mitocondrial)

<b>MM</b>	Massa molar
<b>Na<sup>+</sup></b>	ião sódio
<b>Na,K-ATPase</b>	Adenosina trifosfatase estimulada por Na <sup>+</sup> e K <sup>+</sup>
<b>NAD<sup>+</sup></b>	<i>Oxidized form of nicotinamide adenine dinucleotide</i> – Dinucleótido de adenina nicotinamida oxidado
<b>NADH</b>	<i>Reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide</i> – Dinucleótido de adenina nicotinamida reduzido
<b>NCX1</b>	Trocador Na/Ca
<b>NMG</b>	<i>N-methyl-D-glucamine</i> – N-metil-D-glucamina
<b>NF-KB</b>	<i>Factor nuclear kappa B</i> – Factor nuclear KB
<b>DT1</b>	Diabetes Tipo 1
<b>DT2</b>	Diabetes Tipo 2
<b>PBS</b>	Tampão de fosfatos salino
<b>PI3K</b>	<i>Phosphoinositide 3-kinases</i> – Fosfoinositídeo-3-cinase
<b>PIP<sub>2</sub></b>	<i>Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i> – 1-Fosfatidil-4,5-bisfosfato de inositol
<b>PKA</b>	<i>Protein kinase A</i> - Proteína cinase A
<b>PKC</b>	<i>Protein kinase C</i> - Proteína cinase C
<b>PKG</b>	<i>Protein kinase G</i> - Proteína cinase G
<b>PP</b>	Polipeptídeo pancreático
<b>PTGO</b>	Prova de tolerância à glucose por via oral
<b>Ratos GK</b>	Ratos Goto-Kakizaki
<b>Ratos Neo-STZ</b>	Ratos com diabetes induzida por estreptozotocina administrada em período neonatal
<b>RE</b>	Retículo endoplasmático
<b>RyR</b>	Receptores de rianodina
<b>SDS-PAGE</b>	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> – Electroforese em gel de poliacrilamida com duodecil sulfato de sódio
<b>SERCA</b>	<i>Sarcoplasmic reticulum calcium pump</i> – Adenosina trifosfatase transportadora de Ca <sup>2+</sup> do retículo sarcoplasmático
<b>Ser</b>	Serina
<b>SNARE</b>	<i>Soluble N-ethylmaleimida sensitive factor Attachment protein Receptors</i> – Receptores do factor sensível a N-etilmaleimida



<b>Splicing</b>	Termo que descreve a excisão de intrões durante o processamento do mRNA
<b>STZ</b>	Estreptozotocina
<b>SUR</b>	<i>Sulphonylurea Receptor</i> – Receptor das sulfonilureias
<b>TEA</b>	Tetraetilamónio
<b>TMB</b>	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
<b>TOF</b>	<i>Time-of-flight mass spectrometer</i> – Espectrómetro de massa por tempo de voo
<b>TTX</b>	Tetrodotoxina
<b>t-SNARE</b>	<i>Target membrane SNARE</i> – SNARE da membrana plasmática
<b>VAMP</b>	<i>Vesicular Protein synaptobrevin</i> – Proteína sinaptobrevina
<b>VIP</b>	<i>Vasoactive intestinal polipeptide</i> – Polipeptídeo intestinal vaso-activo
<b>v-SNARE</b>	<i>Vesicular membrane SNARE</i> – SNARE da membrana vesicular

## UNIDADES

Algumas unidades e grandezas utilizadas:

<b>g; <math>\mu</math>g; ng; kg</b>	Gramas; micrograma, $10^{-6}$ g; nanograma, $10^{-9}$ g; quilograma, $10^3$ g
<b>M; mM; <math>\mu</math>M</b>	Molar, mole*dm <sup>-3</sup> ; milimolar, $10^{-3}$ M; micromolar, $10^{-6}$ M
<b>s, ms</b>	Segundo; milissegundo, $10^{-3}$ segundo;
<b>min</b>	Minuto
<b>V; mV</b>	Volt; mili-Volt, $10^{-3}$ Volt
<b>nmol; pmol</b>	Nanomol, $10^{-9}$ mole; picomole, $10^{-12}$ mole
<b>A, pA</b>	Ampere; picoampere, $10^{-12}$ ampere
<b>MM</b>	Massa molecular
<b>Da, kDa</b>	Dalton; quilo-Dalton, $10^3$ Dalton



## RESUMO

### **Regulação da actividade da Na,K-ATPase por glucose em célula $\beta$ -pancreática na ausência e na presença de um estado de intolerância a esta**

A Na,K-ATPase é responsável pela manutenção dos gradientes transmembranares de iões  $K^+$  e  $Na^+$ . Porém, o papel fisiológico da Na,K-ATPase em célula  $\beta$ -pancreática não está esclarecido. Já foi sugerido que a glucose contribui para uma regulação da Na,K-ATPase nestas células, embora os efeitos não estejam esclarecidos e se desconheçam os mecanismos subjacentes ou a sua relevância fisiológica.

Foi objectivo deste trabalho estudar a acção da glucose na regulação da actividade enzimática da Na,K-ATPase em célula  $\beta$ -pancreática, na presença e ausência de intolerância à glucose.

Concluiu-se que, em controlos, a glucose induziu uma inibição da actividade da Na,K-ATPase e que a AMPK e a PKC parecem participar na cascata de sinais intracelulares subjacente a esta regulação. Em intolerantes registou-se uma atenuação/abolição do efeito da glucose na actividade da Na,K-ATPase. Para estas diferenças contribuíram a expressão isoenzimática diferencial da Na,K-ATPase e alterações na cascata de eventos responsáveis pela regulação.



## ABSTRACT

### **Glucose-induced Regulation of Na,K-ATPase activity in pancreatic $\beta$ -cells in the presence and absence of intolerance to the nutrient**

Na,K-ATPase is responsible for the maintenance of plasma membrane gradients of  $K^+$  and  $Na^+$ . It has been suggested that glucose contributes to the regulation of Na,K-ATPase activity in pancreatic  $\beta$ -cell. However, the physiological role of glucose-induced regulation of Na,K-ATPase activity and the mechanisms underlying its effect have not been clarified yet.

The main objective of this work was to investigate the effect of glucose on Na,K-ATPase activity in pancreatic  $\beta$ -cell, in the presence and absence of intolerance to glucose.

It was concluded that, in control rats, glucose induced an inhibition of Na,K-ATPase activity and that AMPK and PKC may play a role in the cascade of events underlying glucose-evoked regulation of the pump. In intolerant rats glucose-induced Na,K-ATPase activity regulation was impaired. Moreover, a differential pattern of isoenzymatic distribution and dysfunctions of the cascade of events evoked by glucose in pancreatic  $\beta$ -cell from intolerant rats are both contributing for this impairment.

# 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A adenosina trifosfatase estimulada pelos iões  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  (Na,K-ATPase, ou bomba de sódio) é um sistema enzimático de membrana, responsável pelo transporte activo de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  através da membrana plasmática, contra os seus gradientes de concentração. O presente trabalho desenvolver-se-á em torno deste sistema e da sua relevância para a fisiologia da célula  $\beta$ -pancreática.

A célula  $\beta$ -pancreática é o único tipo celular no organismo capaz de produzir e segregar insulina, hormona responsável pela homeostasia da glucose. Alterações ao nível da função da célula  $\beta$ -pancreática estão na origem da patologia Diabetes Tipo 2 (DT2), de forma que este trabalho se inscreve também no âmbito mais alargado do estudo da fisiopatologia da DT2.

Nesta revisão bibliográfica, abordaremos a Na,K-ATPase de forma genérica, dando particular destaque às especificidades da regulação da sua actividade, salientando o contributo particular desta bomba na fisiologia da célula  $\beta$ -pancreática, e apresentaremos as alterações ao seu normal funcionamento já conhecidas na diabetes. Abordaremos ainda os aspectos conhecidos do papel da glucose para o funcionamento da Na,K-ATPase na célula  $\beta$ -pancreática. Por último abordaremos as características da patologia DT2 e dos modelos animais mais utilizados para o seu estudo.





## 1.1 A Na,K-ATPASE

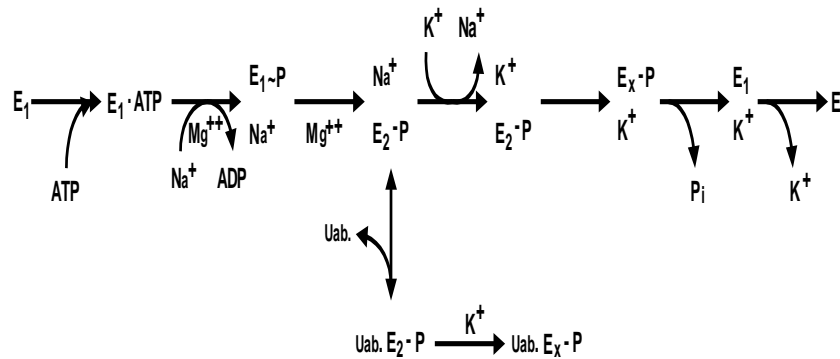
*“In view of the critical importance of Na,K-ATPase in numerous processes of physiological and pathophysiological relevance, elucidating the regulatory mechanisms that govern Na,K-ATPase activity becomes an important issue.”*

Beguín, et al., 1994, JBC, 39, 24437-24445

A adenosina trifosfatase estimulada pelos iões  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  (Na,K-ATPase; bomba de sódio e potássio; EC 3.6.1.37) é um enzima de membrana presente na maioria das células de eucariotas, bastante conservada do ponto de vista evolutivo. A descrição do seu funcionamento valeu um Prémio Nobel da Química a Jens C. Skou, em 1997, pelos seus trabalhos desenvolvidos, quarenta anos antes, em nervo ciático de caranguejo (Skou, 1998).

Em termos funcionais, a Na,K-ATPase permite o transporte de três iões  $\text{Na}^+$  do interior da célula para o meio extracelular, enquanto transporta dois iões  $\text{K}^+$  no sentido inverso, necessitando este transporte de um gasto energético, para contrariar o gradiente de concentração destes dois iões, correspondente à hidrólise de uma molécula de ATP (Skou, 1998).

A Na,K-ATPase pertence a uma família de proteínas designada ATPases tipo-P, que se caracteriza pela formação de um intermediário fosforilado durante o ciclo catalítico. O modelo de Albers-Post (ver Figura 1) descreve o ciclo de transições conformacionais sofridos pela Na,K-ATPase num ciclo catalítico (Akerá & Brody, 1977).



**FIGURA 1 - Modelo Albers-Post para o funcionamento da Na,K-ATPase**

O modelo Albers-Post representa a sequência de reacções da Na,K-ATPase e ligação da ouabaína. Os estados  $E_1$  e  $E_2$  representam diferentes conformações do enzima.  $E_x$  poderá ser semelhante a  $E_1$ . Na conformação  $E_1$  o local para ligação de catiões está aberto para o lado citoplasmático. Assim que os três íões  $Na^+$  entram no seu local de ligação, o  $\gamma$ -fosfato de ATP é transferido para um resíduo conservado de aspartato, numa região que fecha a entrada citoplasmática. Os íões  $Na^+$  ficam então em oclusão na conformação  $E_1P$ . O relaxamento para o estado  $E_2P$  permite a abertura extracelular, libertando-se os íões  $Na^+$  e permitindo a ligação dos dois íões  $K^+$ , desencadeando-se a desfosforilação do aspartil fosfato e consequente abertura do lado citoplasmático para libertação do  $K^+$ . (P, fosfato; Pi, pirofosfato; Uab., ouabaína). Adaptado de (Aker & Brody, 1977; Gadsby *et al*, 2009).

O modelo Albers-Post representa a sequência de reacções da Na,K-ATPase e ligação da ouabaína. Os estados  $E_1$  e  $E_2$  representam diferentes conformações do enzima.  $E_x$  poderá ser semelhante a  $E_1$ . Na conformação  $E_1$  o local para ligação de catiões está aberto para o lado citoplasmático. Assim que os três íões  $Na^+$  entram no seu local de ligação, o  $\gamma$ -fosfato de ATP é transferido para um resíduo conservado de aspartato, numa região que fecha a entrada citoplasmática. Os íões  $Na^+$  ficam então em oclusão na conformação  $E_1P$ . O relaxamento para o estado  $E_2P$  permite a abertura extracelular, libertando-se os íões  $Na^+$  e permitindo a ligação dos dois íões  $K^+$ , desencadeando-se a desfosforilação do aspartil fosfato e consequente abertura do lado citoplasmático para libertação do  $K^+$ .

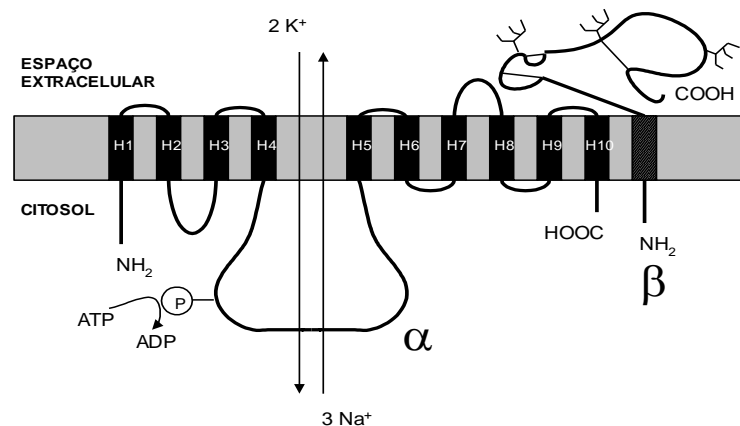
O processo de transporte acima descrito, aparentemente simples, é de uma importância vital para a célula, pois permite manter um baixo nível de  $Na^+$  intracelular e um baixo nível de  $K^+$  extracelular, gerando assim um gradiente de concentrações electrogénico que contribui fortemente para a diferença de potencial que se estabelece através da membrana. Nas células excitáveis ou contrácteis, a acção da Na,K-ATPase permite também a reposição das condições de repouso. O gradiente electroquímico gerado permite ainda o transporte de metabolitos, nutrientes e íões, maioritariamente acoplados ao transporte de sódio. A diferença de potencial estabelecida através da membrana é também essencial para o funcionamento regular de uma enorme quantidade de transportadores e canais membranares, responsáveis pela manutenção

do balanço iónico na célula de que resulta, por exemplo, a regulação do pH e da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Aker & Brody, 1977).

### 1.1.1 Estrutura-função da Na,K-ATPase

A Na,K-ATPase contém uma subunidade catalítica designada  $\alpha$  e uma subunidade glicoproteica auxiliar designada  $\beta$ . A unidade funcional mínima é o heterodímero formado pelas subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ . Nalguns tecidos pode ainda ser co-expressa uma subunidade reguladora da família FXYD, inicialmente designada como subunidade  $\gamma$  (Jorgensen *et al*, 2003).

A subunidade  $\alpha$ , da qual estão descritas actualmente quatro isoformas ( $\alpha_1$ - $\alpha_4$ ), tem uma massa molecular média de cerca de 110 kDa. A sua função é predominantemente catalítica. Contém todos os centros de ligação para ligandos conhecidos que estimulam ou inibem o enzima, como é o caso da ouabaína. O modelo topológico hoje aceite, de forma generalizada, para a subunidade  $\alpha$  da Na,K-ATPase, que é comum à subunidade  $\alpha$  da H,K-ATPase e da Ca-ATPase do retículo (SERCA), comporta 10 segmentos transmembranares (H1-H10), estando os terminais carboxilo e amina localizados no citoplasma (ver Figura 2).



**FIGURA 2- Esquema da distribuição das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  da Na,K-ATPase na membrana plasmática**

A subunidade  $\alpha$  da Na,K-ATPase é constituída por 10 segmentos transmembranares (H1-H10), estando os terminais amina e carboxilo no citoplasma. Entre os segmentos H4 e H5 existe um grande “loop” citoplasmático, onde se localizam os locais de ligação do ATP e de fosforilação. A subunidade  $\beta$  tem apenas um segmento transmembranar e é fortemente glicosilada. (Adaptado de Fambrough *et al*, 1994).

Entre os segmentos H4 e H5 existe um grande “loop” citoplasmático, onde se localizam os locais de ligação do ATP e de fosforilação. Os locais de oclusão para cátions estão localizados nas zonas transmembranares, estando acessíveis a partir do espaço extracelular na conformação fosforilada ( $E_2P$ ) e a partir do citoplasma na conformação desfosforilada ( $E_1$ ). Na translocação dos cátions foram implicados H1, H2, H4 e H6 (Takeuchi *et al*, 2009).

A subunidade  $\beta$  tem uma massa molecular de cerca de 55 kDa, com uma única região transmembranar. São actualmente conhecidas três isoformas desta subunidade ( $\beta_1$ - $\beta_3$ ). O terminal amina é citosólico enquanto que o carboxílico é extracelular. No domínio extracelular existem três ligações persulfureto e existem motivos de consenso para N-glicosilações (Kaplan, 2002). A função da subunidade  $\beta$  há mais tempo descrita é a de auxiliar a distribuição e correcta inserção na membrana da subunidade  $\alpha$  (McDonough *et al*, 1990). Estudos mais recentes têm demonstrado que a subunidade  $\beta$  tem outras funções que lhe são inerentes, independentes da acção da bomba, que podem estar implicadas na adesão célula-célula e na supressão da motilidade celular (Geering, 2008).

Relativamente à terceira subunidade da bomba, subunidade  $\gamma$ , esta pertence à família de genes que codificam para as proteínas FXYP (família de pequenas proteínas de membrana que têm em comum uma sequência de 35 aminoácidos, iniciada com a sequência PFXYP e contendo 7 amino-ácidos invariantes e 6 muito conservados), sendo identificada actualmente como FXYP2. Tem uma massa molecular de 12 kDa e uma só região transmembranar. Em tecido renal são já conhecidas duas isoformas,  $\gamma_a$  e  $\gamma_b$ , que diferem no terminal amina e que apresentam propriedades reguladoras da bomba distintas e distribuição diferencial ao longo do nefrónio (Arystarkhova *et al.*, 2002). Também em tecido pancreático humano foram identificadas duas variantes de *splicing* da FXYP2. A subunidade FXYP2 $\gamma_a$  foi detectada selectivamente em célula  $\beta$ -pancreática (Flamez *et al*, 2010). Um outro membro da família FXYP, o fosfolemano ou FXYP1, também apresenta propriedades reguladoras da Na,K-ATPase, surgindo particularmente associado à subunidade  $\alpha_1$  em tecido cerebral, cardíaco e esquelético (Bibert *et al*, 2008).

### 1.1.2 Regulação da Na,K-ATPase

*“A noticeable fact in these studies is that involvement of protein-protein interactions rather than the pumping activity alone contributes to the regulatory effects of the Na,K-ATPase on cellular functions.”*

Tian & Xie, 2008, *Physiology*, 23:205-211

São diversos os mecanismos responsáveis pela regulação da Na,K-ATPase de forma a adaptar a sua actividade ou expressão às necessidades fisiológicas celulares, permitindo-lhe desempenhar funções de *housekeeping*, mas também funções em tecidos especializados, particularmente os que necessitam de respostas adaptativas após um estímulo, quer este seja um impulso nervoso, exercício ou modificações no Na<sup>+</sup> ou no K<sup>+</sup> oriundos da dieta (Rose & Valdes, Jr., 1994).

A regulação da actividade da Na,K-ATPase pode ser conseguida a diferentes níveis, sendo um deles o da regulação da transcrição, outro o da acção sobre o tráfego intracelular da bomba, facto que pode influenciar o número de unidades da bomba activas na membrana ou o seu tempo de meia-vida, e outro nível de regulação é o da possibilidade de acção directa sobre o enzima funcional na membrana. Neste último, incluem-se a regulação pela disponibilidade de substratos, a acção de moléculas reguladoras, endógenas ou exógenas, ou ainda por fosforilação/desfosforilação (Clausen, 1998).

A concentração de Na,K-ATPase varia enormemente nos diferentes tecidos, podendo estimar-se uma diferença de 160.000 vezes entre a menor (eritrócitos) e a maior concentração (córtex cerebral) (Clausen, 1998). A regulação celular da expressão da bomba pode ser mediada pela velocidade de síntese e distribuição na membrana. Factores hormonais e ambientais podem aumentar a actividade da bomba por célula por três diferentes mecanismos: 1) aumento do *turnover* da bomba já existente na membrana – regulação a curto termo; 2) inserção de mais unidades da bomba na membrana a partir de um reservatório intracelular pré-existente; 3) incremento da síntese de novas unidades da bomba (transcrição

e tradução) – regulação a longo-termo. O mecanismo 2) ocorrerá numa escala temporal intermédia entre os acontecimentos de curto e os de longo termo (Ewart & Klip, 1995).

A regulação a curto-termo pode ocorrer numa escala de minutos ou de horas. Neste processo, o transporte de iões pela bomba pode ser acelerado ou retardado por modulação da velocidade de *turnover* da bomba, o que pode ocorrer por fosforilação via proteína cinase A (PKA), proteína cinase C (PKC) ou proteína cinase G (PKG) em resíduos de serina ou treonina da subunidade  $\alpha$ . Condições que levem a um aumento do  $\text{Na}^+$  intracelular ou a estimulação por hormonas ou factores de crescimento podem aumentar o *turnover* da bomba (Ewart & Klip, 1995).

A regulação a longo-termo define a regulação transcricional ou traducional da expressão da bomba e decorre num registo temporal de dias. A utilização de agentes que inibam a função da bomba, como a ouabaína ou ionóforos para o  $\text{Na}^+$ , levam muitas vezes a que a célula responda com um aumento ao nível da expressão, de forma a eliminar o excesso de  $\text{Na}^+$  intracelular. Hormonas que induzam um aumento de  $\text{Na}^+$  intracelular, para além das suas cascatas de sinalização específicas, exercem um tipo de estímulo sobre a bomba semelhante ao anteriormente descrito. A maioria das hormonas exerce sobre a bomba um efeito positivo ao nível da actividade por aumento da expressão das subunidades  $\alpha$  ou  $\beta$ , sendo a resposta celular mediada pela interacção do complexo hormona-receptor sobre elementos de resposta específicos para a hormona nos promotores genómicos para as subunidades  $\alpha$  ou  $\beta$  (Ewart & Klip, 1995).

O processo de translocação dos reservatórios intracelulares para a membrana plasmática é muito mais rápido quando comparado com a transcrição ou tradução, mas não está tão bem descrito. Alguns estudos sugerem a existência dum reservatório intracelular com elementos da bomba prontos a ser inseridos na membrana. Parece que a fosforilação pela PKC pode ser um sinal para desencadear o processo de translocação (Pedemonte *et al*, 2005).

#### 1.1.2.1 A REGULAÇÃO POR SUBSTRATOS

O nível de regulação da bomba mais directo e simples é o da disponibilidade de substratos. O funcionamento da Na,K-ATPase ao nível celular está sujeito às características do

próprio ambiente celular, em especial à disponibilidade iónica proporcionada pela compartimentalização da célula. É assim de pensar que as concentrações intracelular de  $\text{Na}^+$  e extracelular de  $\text{K}^+$  sejam as primeiras determinantes da actividade enzimática. No entanto, a determinação da concentração de  $\text{K}^+$  que conduz a metade da máxima actividade do enzima ( $K_M$ ) origina valores inferiores a 1mM, uma concentração substancialmente inferior à concentração de potássio extracelular, que varia na ordem de 5 a 6 mM. Assim sendo, na célula intacta, a concentração intracelular de  $\text{Na}^+$  parece ser o factor regulador de actividade da Na,K-ATPase (Aker & Brody, 1977).

Relativamente ao ATP, o  $K_M$  aparente da Na,K-ATPase para este substrato tem uma magnitude entre 300 e 800  $\mu\text{M}$ . Assim sendo, a concentração de ATP na maioria das células é saturante para o enzima. Logo, não é de prever que variações nos níveis de ATP sejam fisiologicamente relevantes na regulação da actividade da bomba, na maioria dos tecidos (Therien & Blostein, 2000). No entanto, como em célula  $\beta$ -pancreática estão descritas variações consideráveis da concentração intracelulares de ATP em resposta ao estímulo de glucose (Detimary *et al*, 1996b), não é de desconsiderar a hipótese de a concentração deste substrato poder afectar a actividade da Na,K-ATPase neste tipo celular.

É ainda importante lembrar que a sensibilidade para cada um dos substratos varia de acordo com as formas isoenzimáticas expressas (Blanco & Mercer, 1998), sendo este um importantíssimo mecanismo de regulação da actividade da Na,K-ATPase.

### 1.1.2.2 A EXPRESSÃO ISOENZIMÁTICA DA Na,K-ATPASE

*“A central question in the comprehensive physiology of active Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> transport is the nature of the complex regulation of the expression of these isozymes and the variety of systems for posttranslational modification and short-term regulation.”*

Jorgensen, et al., 2003, *Annu. Rev. Physiol.*, 65:817-49.

A Na,K-ATPase apresenta um enorme potencial de expressão isoenzimática uma vez que, quer a subunidade  $\alpha$ , quer a  $\beta$ , apresentam várias isoformas, as quais podem ser expressas em diversas combinações. As várias isoformas são o produto da expressão de diferentes genes e apresentam diferentes propriedades catalíticas e de regulação. A expressão isoenzimática constitui assim um importantíssimo mecanismo que permite à Na,K-ATPase especializar o seu funcionamento.

#### 1.1.2.2.1 A ESPECIFICIDADE DA EXPRESSÃO ISOENZIMÁTICA

Os padrões de expressão das isoformas são específicos para cada tecido. A subunidade  $\alpha_1$  parece existir em todos os tecidos, bem como a associação  $\alpha_1\beta_1$ . No tecido renal  $\alpha_1\beta_1$  é a forma isoenzimática com mais expressão, apesar de também terem sido detectadas as  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$ . Em contraste com a ampla distribuição nos vários tecidos de  $\alpha_1$  e  $\beta_1$ , os outros polipéptidos de  $\alpha$  e de  $\beta$  são mais restritos na sua expressão. A isoforma  $\alpha_4$  é específica do testículo, a  $\alpha_2$  encontra-se predominantemente em músculo, coração e cérebro, bem com em tecido adiposo e a  $\alpha_3$  parece associada principalmente ao tecido nervoso. A isoforma  $\beta_2$  encontra-se predominantemente em músculo esquelético, glândula pineal e tecido nervoso, enquanto que a  $\beta_3$  está presente nos testículos, retina, fígado e pulmões (Blanco & Mercer, 1998).

A especificidade das isoformas estende-se até às linhagens celulares dentro dum mesmo tecido, o que é particularmente evidente ao nível do sistema nervoso. As células neuronais podem expressar um só isoenzima, ou múltiplos, consistindo estes em várias combinações  $\alpha\beta$ . Enquanto que os neurónios são a principal fonte de  $\alpha_3$ , as células gliais expressam preferencialmente  $\alpha_2$ . A subunidade  $\alpha_1$  localiza-se principalmente nas células não neuronais do



cérebro (astrócitos), enquanto que a  $\alpha_2$  se localiza principalmente no axolema dos axónios mielinizados da zona mais interna do cérebro (Sweadner, 1979). Estudos em rim evidenciam também esta especificidade das linhas celulares, mostrando que a proporção relativa das isoformas de  $\alpha$  varia com as zonas em estudo, córtex ou medula (Feraille *et al*, 1995a; Lucking *et al*, 1996). A expressão das isoformas  $\beta$  parece também ser específica de certos tipos celulares; em tecido nervoso, por exemplo a isoforma  $\beta_1$  surge maioritariamente associada a neurónios,  $\beta_2$  às células da glia, enquanto as células granulares apresentam ambas as isoformas (Peng *et al*, 1997).

Os padrões de expressão da Na,K-ATPase estão também sujeitos ao estado de desenvolvimento, estando por exemplo descrito que  $\alpha_1$  é mais abundante no rim fetal que no adulto (Herrera *et al*, 1987; Shamraj *et al*, 1991).

#### 1.1.2.2.2 ESTRUTURA DAS ISOFORMAS DAS SUBUNIDADES CONSTITUINTES DA Na,K-ATPASE

A produção das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  resulta de diferentes genes. Os mecanismos envolvidos na geração das isoformas destas subunidades da Na,K-ATPase consistem em processos de *splicing* alternativo e de clivagem nos terminais amina ou carboxilo (Blanco & Mercer, 1998).

As subunidades  $\alpha$  de rato variam ligeiramente no seu tamanho. A isoforma  $\alpha_1$  é constituída por 1024 resíduos de aminoácidos, a  $\alpha_2$  por 1021, a  $\alpha_3$  por 1014 (a subunidade mais pequena) e a  $\alpha_4$  por 1028, sendo esta a maior. A massa molecular destas subunidades é cerca de 100 kDa. Entre espécies, o grau de identidade para  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  é de cerca de 92%, enquanto que para  $\alpha_3$  é acima de 96%. Há também um elevado grau de homologia, cerca de 87%, entre as isoformas  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$ . A isoforma  $\alpha_4$  é a mais divergente, partilhando 78% de identidade com  $\alpha_1$  (Blanco & Mercer, 1998).

As zonas da cadeia polipeptídica das subunidades  $\alpha$  onde ocorre maior variabilidade estrutural são o terminal amina, o local de ligação extracelular da ouabaína, entre os segmentos transmembranares H1 e H2, e a região citoplasmática entre os aminoácidos 403 e 503. As maiores similaridades ocorrem na região central citoplasmática, onde se localizam os centros de ligação do ATP e de fosforilação, as regiões hidrofóbicas transmembranares, e a região do terminal carboxilo (Blanco & Mercer, 1998).

Medford *et al.* referem ainda a existência de uma isoforma  $\alpha 1$ -truncada ( $\alpha 1$ -T), produzida por *slicing* alternativo do RNA, com massa molecular de  $\sim 65$  kDa. A análise do mRNA e da estrutura proteica da isoforma  $\alpha 1$ -T revelam que ela codifica para os 554 resíduos de aminoácidos iniciais de  $\alpha 1$ , e que termina com 27 resíduos de aminoácidos de uma sequência intrão. Apesar de lhe faltar cerca de 40% da sequência correspondente ao terminal carboxilo, o que se traduz na falta de 4 domínios transmembranares, o local de ligação do ATP é reconhecível em  $\alpha 1$ -T, embora não tenham sido feitos estudos que lhe reconheçam acção catalítica. Estes autores estudaram tecidos da musculatura vascular lisa, tendo concluído que em alguns destes tecidos a isoforma  $\alpha 1$ -T surge na ausência da  $\alpha 1$ , como é o caso de tecido de pequenas veias ou em veia safena, ou pode surgir com  $\alpha 1$ , como é o caso do tecido aórtico (Medford *et al.*, 1991).

No rato, a isoforma  $\beta_1$  tem 304 resíduos de aminoácidos, a  $\beta_2$  tem 290 e a  $\beta_3$  tem 279. Todas as subunidades  $\beta$  partilham a mesma estrutura comum. A percentagem de homologia entre  $\beta_1$  e  $\beta_2$ , entre as espécies de mamífero, é de cerca de 95%. Este valor decresce para 60% quando se incluem na comparação espécies de não mamíferos. A homologia encontrada entre as várias subunidades  $\beta$  é menor que na subunidade catalítica. Comparando com  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  apresenta 58% de similaridade, enquanto que  $\beta_3$  apresenta 68% de homologia, com uma identidade de 39%. As similaridades entre  $\beta_2$  e  $\beta_3$  atingem os 61%, com 49% dos resíduos conservados (Blanco & Mercer, 1998). O domínio transmembranar da subunidade  $\beta$  é a região mais conservada entre isoformas de várias espécies.

Todas as subunidades  $\beta$  são fortemente glicosiladas. A subunidade  $\beta_1$  de mamíferos tem três locais com *N*-glicosilações. A subunidade  $\beta_2$  tem um número variável de *N*-glicosilações, que varia de espécie para espécie. Encontram-se, por exemplo, quatro potenciais locais de ligação em galinha, sete em rato, oito em humanos e nove em ratinho. Não se sabe, contudo, se todos estes locais sofrem, efectivamente, glicosilações. Pensa-se que as glicosilações desempenhem um papel no estabelecimento da estrutura terciária e quaternária da proteína (Blanco & Mercer, 1998).

Outra característica importante na subunidade  $\beta$  é a presença de três ligações persulfureto, que nos polipéptidos de rato ocorrem entre Cys<sup>125</sup>-Cys<sup>148</sup>, Cys<sup>158</sup>-Cys<sup>174</sup> e Cys<sup>212</sup>-Cys<sup>275</sup>. Todas as cisteínas estão conservadas nas isoformas  $\beta_2$  e  $\beta_3$ , o que sugere similaridades na estrutura terciária dos polipéptidos, apesar de não serem mantidas as suas posições na cadeia polipeptídica (Blanco & Mercer, 1998).

## 1.1.2.2.3 AS DIFERENTES PROPRIEDADES DOS ISOENZIMAS

As diferentes propriedades catalíticas dos isoenzimas individuais podem explicar a complexa diversidade molecular que caracteriza a Na,K-ATPase. No entanto, a caracterização das propriedades funcionais das diferentes combinações de polipéptidos  $\alpha$  e  $\beta$  não tem sido tarefa fácil. A maior dificuldade advém do facto de, frequentemente, a mesma célula exprimir mais do que uma isoforma. O isoenzima  $\alpha_1\beta_1$  é aquele no qual as propriedades funcionais estão mais extensivamente estudadas, pelo facto de ser maioritário e praticamente unitário em rim. O rim, com uma actividade da Na,K-ATPase elevada, tem tido então um papel precioso no conhecimento da estrutura, mecanismo da reacção e propriedades cinéticas desta combinação isoenzimática. A falta de fontes naturais para as outras combinações tem dificultado a sua caracterização (Blanco & Mercer, 1998).

A sensibilidade à ouabaína foi a primeira característica que permitiu diferenciar as subunidades  $\alpha$  em roedores. A subunidade  $\alpha_1$  apresenta cerca de 100x menos sensibilidade à ouabaína que as outras isoformas (inicialmente agrupadas conjuntamente e designadas de isoforma  $\alpha+$ ). Sabe-se actualmente que a  $\alpha_3$  é a isoforma que apresenta maior afinidade para a ouabaína. Noutras espécies, incluindo a humana, suínos e canídeos, as diferenças de sensibilidade à ouabaína entre as isoformas  $\alpha$  não são tão evidentes, principalmente porque a afinidade da subunidade  $\alpha_1$  por este esteróide cardiotónico é muito maior do que em roedores (Blanco & Mercer, 1998).

Uma estratégia experimental recorrente para o estudo das características individuais dos isoenzimas é a transfecção de linhas celulares com vírus recombinantes. A linha de células de insecto Sf-9 e os oócitos do anfíbio *Xenopus*, por exemplo, têm-se revelado bons modelos para estes estudos, uma vez que são competentes para expressar proteínas de mamífero, com a vantagem de apresentarem uma produção abundante das proteínas de interesse, de permitirem a acoplagem correcta entre as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  em diferentes associações e ainda de apresentarem níveis comparativamente baixos de Na,K-ATPase endógena. Estudos com estes modelos têm permitido o estudo cinético de várias combinações isoenzimáticas (Blanco & Mercer, 1998). Uma vez que o sistema celular não é o nativo, sendo provavelmente diferentes muitos dos factores que ao nível celular regulam a actividade da bomba, inclusivamente o ambiente lipídico em que esta se insere, esta estratégia constitui apenas uma aproximação. Contudo, tem contribuído para clarificar as diferentes características cinéticas e de regulação das várias combinações isoenzimáticas

Assim, em rato, tem sido estabelecido que:

- A sensibilidade à ouabaína varia da seguinte forma:

$$\alpha_3\beta_1 > \alpha_3\beta_2 \gg \alpha_2\beta_2 > \alpha_2\beta_1 \gg \alpha_1\beta_1$$

- A afinidade aparente para o Na<sup>+</sup> varia da seguinte forma:

$$\alpha_2\beta_2 > \alpha_2\beta_1 > \alpha_1\beta_1 = \alpha_3\beta_2 > \alpha_3\beta_1$$

- A afinidade para o K<sup>+</sup> varia da seguinte forma:

$$\alpha_1\beta_1 > \alpha_2\beta_1 = \alpha_2\beta_2 > \alpha_3\beta_1 = \alpha_3\beta_2$$

- A sensibilidade ao Ca<sup>2+</sup> varia da seguinte forma:

$$\alpha_2\beta > \alpha_3\beta > \alpha_1\beta$$

- Na activação por ATP, os enzimas compostos pela isoformas  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$  apresentam valores de  $K_M$  equivalentes, os quais são cerca de quatro vezes inferiores aos de  $\alpha_1\beta$  (Blanco & Mercer, 1998).

Estas observações estão em concordância com as propriedades cinéticas dos isoenzimas  $\alpha_1\beta$ ,  $\alpha_2\beta$  e  $\alpha_3\beta$  expressas em células HeLa, uma linha celular de mamífero. A única diferença refere-se à afinidade para o K<sup>+</sup> da isoforma  $\alpha_3$ , que poderá dever-se às diferenças do ambiente lipídico membranar entre as células de invertebrado e as de mamífero. Estes resultados, analisados na sua globalidade, indicam que as maiores diferenças cinéticas ocorrem entre os isoenzimas da Na,K-ATPase, que diferem na composição da subunidade  $\alpha$ . Contudo, a subunidade  $\beta$  influencia a sensibilidade do enzima para o Na<sup>+</sup> e tem sido também demonstrado o envolvimento da subunidade  $\beta$  na estabilização do complexo de oclusão do K<sup>+</sup> (Blanco & Mercer, 1998).

As propriedades de cada combinação  $\alpha\beta$  de humanos foram também estudadas por expressão em oócitos de *Xenopus*. A análise das propriedades de cada combinação  $\alpha\beta$  relativamente às suas propriedades de transporte e de resposta à ouabaína mostram que:

- Relativamente à ligação da ouabaína e à medição da corrente activada por K<sup>+</sup> gerada pela bomba, todos os isoenzimas humanos se mostraram funcionais, com velocidades de *turnover* dependentes da isoforma  $\alpha$ .

- As variações na activação por  $K^+$  extracelular parecem determinadas por um mecanismo de interacção cooperativo entre as isoformas das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ , apresentando os complexos  $\alpha_2\beta_2$  a afinidade aparente mais baixa para o  $K^+$ .
- As isoformas da subunidade  $\alpha$  influenciam a afinidade aparente para o  $Na^+$  intracelular, pela ordem:  $\alpha_1 > \alpha_2 > \alpha_3$  e a dependência da voltagem pela ordem:  $\alpha_2 > \alpha_1 > \alpha_3$ .
- A afinidade para a ouabaína é equivalente e elevada em todos os isoenzimas humanos da Na,K-ATPase. Contudo, as combinações  $\alpha_2\beta$  apresentam velocidades de associação e dissociação à ouabaína mais rápidas que as combinações  $\alpha_1\beta$  e  $\alpha_3\beta$ .
- Encontram-se ainda diferenças no antagonismo  $K^+$ /ouabaína. Níveis fisiológicos de  $K^+$  podem proteger os isoenzimas constituídos por  $\alpha_1$ , mas não por  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$ , da inibição por este esteróide cardiotónico.

Há várias diferenças a considerar, relativamente aos isoenzimas humanos e de roedores, sendo a mais relevante a da sensibilidade das subunidade  $\alpha$  à ouabaína (Crambert *et al*, 2000).

### 1.1.2.3 A REGULAÇÃO PELO AMBIENTE LIPÍDICO MEMBRANAR

A Na,K-ATPase, sendo transmembranar, é regulada também pelo ambiente lipídico em que se insere. Em geral, lípidos que promovem a formação de bicamada com espessura fisiológica e que aumentem a fluidez tendem a favorecer a actividade óptima da Na,K-ATPase, como é o caso dos lípidos carregados negativamente fosfatidilserina e fosfatidilglicerol ou do colesterol. Já os ácidos gordos livres, presentes nas membranas ou produto da acção de fosfolipases e eicosanóides, tendem a ter efeitos regulatórios na actividade da bomba (Jack-Hays *et al*, 1996).

#### 1.1.2.4 A REGULAÇÃO POR ESTERÓIDES CARDIOTÓNICOS

Um outro nível de regulação é o que diz respeito à acção dos esteróides cardiotónicos (CTS). A Na,K-ATPase é o alvo farmacológico desta família de compostos, que são há muito conhecidos como inibidores da bomba, sendo produzidos por plantas e animais. Os esteróides cardiotónicos de origem vegetal têm sido utilizados quer na clínica, no tratamento de insuficiência cardíaca congestiva (especialmente a digoxina), quer na investigação, como ferramentas farmacológicas capazes de inibir selectivamente a Na,K-ATPase em trabalhos experimentais (especialmente a ouabaína, devido à sua maior solubilidade em água).

A acção ionotrópica positiva dos CTS ao nível do músculo cardíaco tem sido interpretada como resultante da inibição da Na,K-ATPase, que leva a um aumento transitório da concentração intracelular de Na<sup>+</sup> sendo conseqüentemente diminuído o gradiente de Na<sup>+</sup> através da membrana. Em consequência do aumento da concentração intracelular de Na<sup>+</sup>, o trocador Na/Ca da membrana funcionará então no sentido inverso, importando Ca<sup>2+</sup>, o que leva a um aumento da concentração intracelular deste ião, activando a contracção muscular (Somberg *et al*, 1981).

Em termos estruturais, os CTS são esteróides C<sub>23</sub> com um ou mais resíduos glucídicos em C<sub>3</sub> e um anel de lactona de cinco membros em C<sub>17</sub> (Rose & Valdes, Jr., 1994).

A ligação dos CTS à bomba faz-se pelo lado extracelular, sendo a conformação preferencial a E<sub>2</sub>P (Figura 1). Pensa-se que uma molécula de CTS se liga a um dímero αβ, o que tem permitido utilizar a [<sup>3</sup>H]-ouabaína para quantificação das unidades da bomba em homogeneizados, células e tecidos (Clausen, 1998).

O local de ligação dos CTS é muito conservado entre as várias espécies, sendo a sensibilidade determinada pela isoforma α. Como já referimos no capítulo 1.1.2.2.3, o rato (e também o murganho) apresenta uma isoforma α praticamente insensível à ouabaína, o que não acontece na maioria das espécies e em particular na humana (Lingrel, 2010). O local de ligação aos CTS, na Na,K-ATPase, é também muito conservado evolutivamente, desde a hidra aos humanos, o que sugere que desempenhe um importante papel fisiológico (Dostanic-Larson *et al*, 2006).

Os resíduos de aminoácidos que influenciam a sensibilidade à ouabaína situam-se em várias regiões da Na,K-ATPase. Contudo, são particularmente importantes dois resíduos localizados no primeiro domínio extracelular. Estes dois resíduos são responsáveis pelas diferenças de sensibilidade à ouabaína observados em rato e murganho. Em rato, na isoforma

$\alpha_2$  (a mais sensível a ouabaína), as posições 111 e 122 são ocupadas por glicina e asparagina, respectivamente, enquanto que na isoforma  $\alpha_1$  (a menos sensível a ouabaína), as mesmas posições são ocupadas por arginina e aspartato. Em geral, as isoformas mais sensíveis à ouabaína têm aminoácidos sem carga nessas posições enquanto que as menos sensíveis têm aminoácidos com carga (Lingrel, 2010).

Sabe-se actualmente que são também produzidos CTS endogenamente em mamíferos e a sua função fisiológica parece ser a regulação da actividade da Na,K-ATPase. Hamlyn *et al.* foram os primeiros a demonstrar que um inibidor endógeno da bomba circulava no plasma sanguíneo e que a sua concentração se correlacionava com a pressão arterial dos dadores (Hamlyn *et al.*, 1982). Os CTS endógenos constituem assim um novo grupo de hormonas esteróides, sintetizadas na glândula adrenal, pertencentes à família dos cardenólidos (de que fazem parte, para além de outros, a ouabaína e a digoxina) e dos bufadienólidos (de que fazem parte a marinobufagenina e a telocinobufagenina), que têm como receptor a Na,K-ATPase.

A ligação da ouabaína à Na,K-ATPase desencadeia uma cascata de sinais que, de forma semelhante à acção de outras hormonas esteróides, desencadeia efeitos genómicos e não genómicos (Schoner & Scheiner-Bobis, 2007). Foram propostos dois mecanismos de transdução de sinal para explicar os efeitos subsequentes da ligação dos CTS à bomba. O primeiro mecanismo proposto, designado *hipótese "Na<sup>+</sup>-lag"*, permite descrever o efeito resultante da acção da ouabaína endógena na pressão arterial e na actividade cardíaca, e corresponde ao mecanismo já acima descrito em que a inibição da bomba pelos CTS se traduz num aumento da força contráctil. Esta hipótese permite explicar os efeitos a curto-termo e a acção ionotrópica dos CTS (Schoner & Scheiner-Bobis, 2007).

A acção terapêutica dos CTS, nomeadamente dos digitálicos, não reside exclusivamente na acção ionotrópica positiva, mas há ainda a considerar efeitos ao nível dos sistemas neuroendócrino e do sistema renina-angiotensina (que indirectamente também afectam a insuficiência cardíaca). Estas alterações, que passam por acções ao nível da expressão genética, são melhor explicadas pelo segundo mecanismo proposto, a *hipótese do signalossoma*. Esta hipótese descreve a interacção dos CTS com a Na,K-ATPase como o primeiro passo de várias vias de sinalização, por meio de interacções proteína-proteína, intermembranares e citosólicas. Estas vias, que podem ser activadas simultaneamente ou selectivamente, levam a um aumento do Ca<sup>2+</sup> intracelular, activando as vias das cinases Scr e

ERK1/2, activando a fosfoinosítídeo 3-cinase (PI3K) e a proteína cinase B (Akt), factor nuclear kB (NF-kB) e espécies reactivas de oxigénio (Schoner & Scheiner-Bobis, 2007).

A hipótese do signalossoma suporta a possibilidade do efeito ionotrópico dos CTS não implicar necessariamente a inibição da bomba, permitindo explicar de que forma concentrações nano- e subnanomolares destes compostos, endógenos ou exógenos, podem levar a uma ionotropia aumentada do músculo cardíaco, a hipertensão, a proliferação ou a diferenciação celulares. Segundo esta hipótese, a informação da ligação dos CTS à Na,K-ATPase é enviada ao interior celular e ao núcleo. O signalossoma está localizado nas estruturas caveolares, podendo transferir sinais ao interior da célula, afectando a reciclagem membranar e o tráfego intracelular, bem como interações célula-célula (Schoner & Scheiner-Bobis, 2007; Xie & Cai, 2003).

As estruturas caveolares estão associadas a moléculas cruciais para a regulação do  $\text{Ca}^{2+}$ . Contêm proteínas como a óxido nítrico sintase, o trocador Na/Ca (NCX1), a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase da membrana plasmática e canais de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo-L, interagindo com proteínas da periferia do retículo sarcoplasmático. Foi já demonstrada a existência de um complexo entre a fosfolipase C, o receptor  $\text{IP}_3$  do retículo endoplasmático e o terminal amina da subunidade  $\alpha$  da Na,K-ATPase. A subunidade  $\alpha$  tem também locais de ligação para caveolina, anquirina e PI3K. A proteína anquirina também interage com o trocador Na/Ca, com o canal de  $\text{Na}^+$  sensível à voltagem, bem como com os receptores de rianodina (RyR) e de  $\text{IP}_3$  ( $\text{IP}_3\text{R}$ ). A interacção da bomba com proteínas do citosqueleto, como a anquirina, parece ser essencial para a localização apropriada da bomba nas células polarizadas, bem como para o tráfego da Na,K-ATPase do aparelho de Golgi para a superfície celular (Schoner & Scheiner-Bobis, 2007; Xie & Cai, 2003).

É ainda possível que a sinalização entre as superfícies extra- e intra-celulares e as proteínas que constituem o signalossoma difiram com base na natureza do esteróide que se liga na bomba, aumentando ainda mais a complexidade dos mecanismos envolvidos. Contudo, este modelo mais complexo permitiria explicar o motivo pelo qual a aplicação crónica de ouabaína em ratos induz hipertensão, apesar de tal não acontecer com a utilização de digoxina, por exemplo (Schoner & Scheiner-Bobis, 2007). De facto, percebe-se pelos trabalhos até aqui apresentados que a resposta da Na,K-ATPase aos CTS é complexa e que apenas se começam a clarificar algumas das vias de transdução envolvidas nesses processos de sinalização.



### 1.1.2.5 A REGULAÇÃO POR FOSFORILAÇÃO/DESFOSFORILAÇÃO

Os mecanismos de fosforilação/desfosforilação parecem desempenhar um papel fundamental na regulação da actividade da bomba a vários níveis. A activação de cinases que actuam sobre a bomba pode ser desencadeada como parte da cascata de transdução de sinal após a ligação de uma hormona a um receptor, mas também por resposta a um estímulo como hipóxia ou aumento de glucose. De facto, tem sido referida a actuação de cinases em processos de regulação a curto-termo e a longo-termo, bem como nos processos de translocação para a membrana, identificados como processos com duração intermédia entre uns e outros (Therien & Blostein, 2000).

Estudos de Logvinenko *et al.* em tecido renal mostram que os locais para fosforilação da subunidade- $\alpha$  da Na,K-ATPase pela proteína cinase C (PKC) ocorrem no terminal amina, sendo os locais mais prováveis os resíduos de Ser-11 e Ser-18, particularmente o Ser-18 por se encontrar num motivo de consenso para fosforilação pela PKC (Logvinenko *et al.*, 1996; Feschenko & Sweadner, 1995). A subunidade catalítica da Na,K-ATPase pode ainda ser fosforilada pela proteína cinase A (PKA) no resíduo Ser-943, no terminal carboxilo (Beguin *et al.*, 1994).

Tem sido descrito que as fosforilações estão associadas a alterações da actividade enzimática da Na,K-ATPase. Tal pode dever-se a alterações no tráfego intracelular da bomba, já referidas, estando descrito que a fosforilação do resíduo Ser-18 da subunidade- $\alpha$  da bomba é o sinal para a remoção das unidades da bomba da membrana por endocitose para os compartimentos intracelulares (Chibalin *et al.*, 1998; Dada *et al.*, 2003). Mais controversa tem sido a hipótese de as fosforilações da subunidade  $\alpha$  da bomba estarem relacionadas com alterações directas no comportamento cinético da mesma. Embora alguns estudos descrevam um decréscimo da afinidade para o  $K^+$  após fosforilação do resíduo de Ser-23 (que corresponde, na proteína maturada por clivagem, ao resíduo Ser-18) pela PKC (Logvinenko *et al.*, 1996), outros sugerem que o facto de a bomba ser fosforilada no mesmo resíduo não tem implicações cinéticas (Feschenko & Sweadner, 1997) enquanto que outros ainda associam essa fosforilação a um aumento da actividade (Fekete *et al.*, 2008). Cheng *et al.* avançam com a hipótese de as diferenças observadas na acção da PKC e da PKA na actividade da Na,K-ATPase poderem residir na sua dependência do  $Ca^{2+}$  intracelular (Cheng *et al.*, 1999). Owada *et al.* referem que a fosforilação da subunidade  $\alpha$  da Na,K-ATPase pela PKC resulta numa redução da

actividade da mesma, sendo este o provável mecanismo pelo qual a glucose participa na regulação da actividade da bomba em células  $\beta$ -pancreática (Owada *et al*, 1999).

Uma outra cinase à qual têm sido atribuídas funções na regulação da actividade da Na,K-ATPase é a proteína cinase dependente de AMP (AMPK), embora esta não actue directamente sobre a bomba. Trabalhos de Vadasz *et al*. em células epiteliais alveolares mostram que níveis elevados de CO<sub>2</sub> promovem endocitose da Na,K-ATPase num processo mediado pela AMPK e pela PKC, estando a activação da PKC a jusante da activação da AMPK (Vadasz *et al*, 2008).

Apesar de a desfosforilação da bomba estar menos estudada, tem sido também proposta a acção de proteínas fosfatases durante o tráfego intracelular das unidades da bomba, nomeadamente da fosfatase A2, cuja acção parece ser necessária para o recrutamento da bomba para a membrana plasmática em células alveolares epiteliais (Lecuona *et al*, 2006).

#### 1.1.2.6 A MODULAÇÃO DA Na,K-ATPASE POR INSULINA

Um dos primeiros efeitos da administração de insulina é um decréscimo da concentração plasmática de K<sup>+</sup>. Pensa-se que este efeito se deve a uma rápida estimulação da Na,K-ATPase, que ocorre em todo o organismo, embora o músculo, o fígado e o rim desempenhem os papéis mais relevantes na captação do K<sup>+</sup>. São vários os mecanismos subjacentes a esta acção rápida da insulina sobre a Na,K-ATPase, podendo passar por aumentar a concentração de Na<sup>+</sup> intracelular, por activar a desfosforilação da bomba (o que se traduz em torná-la mais activa), por aumentar a translocação de unidades da bomba dos reservatórios intracelulares para a membrana plasmática, ou ainda por aumentar a afinidade da bomba para o Na<sup>+</sup> (Ewart & Klip, 1995).

Em alguns tecidos, a activação da actividade da bomba é desencadeada por um aumento da concentração intracelular de Na<sup>+</sup>, devido a uma estimulação do trocador Na/H. Este mecanismo foi detectado em linhas celulares de tecidos musculares (Rosic *et al*, 1985) e de hepatócitos de rato (Fehlmann & Freychet, 1981), bem como em túbulos corticais renais ((Feraille *et al*, 1994; Feraille *et al*, 1995b).

Um outro mecanismo de regulação da actividade da Na,K-ATPase por insulina, identificado em hepatócitos de rato, consiste numa acção da hormona sobre as propriedades cinéticas da bomba, designadamente aumentando a afinidade para o Na<sup>+</sup>. A insulina não afecta na mesma intensidade os vários isoenzimas da Na,K-ATPase, sendo a afinidade para o Na<sup>+</sup> mais afectada nos isoenzimas constituídos pela isoforma  $\alpha_2$  da subunidade  $\alpha$  (McGill & Guidotti, 1991).

Um terceiro mecanismo já descrito para a acção da insulina sobre a actividade da Na,K-ATPase consiste na estimulação da translocação de unidades da bomba dos reservatórios intracelulares para a membrana. Este mecanismo foi descrito em músculo esquelético e ocorre num intervalo de tempo entre 15-30 min (Erlj & Grinstein, 1976).

Os mecanismos subjacentes à rápida acção da insulina sobre a actividade da Na,K-ATPase são ainda desconhecidos. Contudo, devem estar implicados elementos da cascata de sinais desencadeados pela ligação da insulina ao seu receptor. Foi sugerida a participação da proteína cinase A ou da proteína cinase C (Sampson *et al*, 1994), a participação de uma fosfatase de tirosina (Feraille *et al*, 1999) e ainda da via ERK1/2, em particular na translocação de unidades da bomba para a membrana (Al-Khalili *et al*, 2004). Um trabalho recente, realizado em culturas de células endoteliais da córnea, propõe ainda a acção conjunta da PKC e das proteínas fosfatase 1 e 2A, em que a PKC actuaría a montante da acção das fosfatases, o que resultaria na activação da bomba por desfosforilação da subunidade  $\alpha_1$  (Hatou *et al*, 2010).

Os efeitos crónicos da insulina também afectam a Na,K-ATPase. Estudos em linhas celulares apontam para uma acção da insulina sobre a expressão da Na,K-ATPase, que pode passar por induzir selectivamente a expressão da subunidade  $\alpha_1$ , como revela um estudo em culturas de astrócitos de rato (Matsuda *et al*, 1993), ou por induzir selectivamente a expressão de  $\alpha_2$ , como descreve um trabalho em culturas de células musculares vasculares (Tirupattur *et al*, 1993). Provavelmente pode ainda ser atribuída à acção da insulina a alteração na expressão isoenzimática da Na,K-ATPase observada em alguns modelos animais de diabetes (Gerbi *et al*, 1999).

### 1.1.3 Patologias associadas a alterações na Na,K-ATPase

A Na,K-ATPase desempenha um importante papel fisiológico nos tecidos, sendo de prever que disfunções da sua actividade tenham consequências fisiopatológicas.

Recentemente, foram identificadas mutações que causam disfunções na Na,K-ATPase associadas a doenças genéticas:

- Foram relacionadas com a patologia enxaqueca familiar hemiplégica de tipo 2 (FHM2) quatro diferentes mutações no gene ATP1A2, que codifica a subunidade  $\alpha_2$  da Na,K-ATPase, e que causam perda de função da bomba (Capendeguy & Horisberger, 2004).
- Foram identificadas mutações no gene que codifica para a subunidade  $\alpha_3$  da Na,K-ATPase que causam a patologia distonia-parkinsonismo de desencadeamento rápido (de Carvalho *et al*, 2004).

Outras disfunções da Na,K-ATPase têm sido correlacionadas com diversas desordens, de natureza cardiovascular, neurológica, renal ou metabólica. Contudo permanece incerta a ligação entre a função alterada da bomba e o defeito na regulação, bem como se as alterações observadas na Na,K-ATPase são causa ou consequência fisiopatológica.

Ao nível da função renal, a Na,K-ATPase desempenha um papel complexo, diferenciado ao longo do nefrónio mas, de uma forma simplificada, é da responsabilidade da Na,K-ATPase grande parte da absorção de  $\text{Na}^+$  que ocorre ao longo do nefrónio (Arystarkhova *et al*, 2002). Em diversas situações patológicas nas quais se verificam disfunções renais, tais como na hipertensão, são observadas alterações na actividade da Na,K-ATPase (Hamlyn *et al*, 1982).

Ao nível da função neurológica, a Na,K-ATPase desempenha um papel importante na propagação do impulso nervoso, tendo uma acção essencial na repolarização de uma célula excitável. Situações patológicas que afectem esta função têm sido associadas a disfunções na Na,K-ATPase (Rose & Valdes, Jr., 1994; Clausen, 1998).

Ao nível da função muscular, a Na,K-ATPase é responsável pela reposição do potencial de membrana no repouso e restabelecimento dos gradientes iónicos essenciais ao bom funcionamento do tecido muscular. Tal como nas funções acima enunciadas, também em

situações patológicas do foro muscular, nomeadamente patologias cardíacas e patologias associadas ao músculo esquelético, têm sido descritas alterações na Na,K-ATPase que podem consistir em aumento ou diminuição da actividade da bomba e/ou alterações da sua expressão (Clausen, 1998).

Um outro grupo de patologias às quais têm sido associadas alterações da Na,K-ATPase é o das patologias diabéticas, em particular a diabetes tipo 1 (DT1) e a diabetes tipo 2 (DT2). Nestas patologias ocorrem disfunções fisiológicas em diferentes tecidos, parecendo ter associadas alterações da Na,K-ATPase, como se descreve com mais detalhe na secção seguinte.

#### 1.1.3.1 A Na,K-ATPASE NA DIABETES

Têm sido descritas diversas alterações ao funcionamento da Na,K-ATPase na diabetes quer na DT1, quer na DT2. As alterações na actividade e expressão da Na,K-ATPase têm sido associadas às complicações clínicas secundárias à diabetes, designadamente à hipertensão, à neuropatia e à nefropatia diabéticas.

Estão registados diferentes tipos de alterações na Na,K-ATPase associadas à diabetes, nomeadamente, alterações de actividade, alterações do grau de expressão e/ou alterações no número de unidades da bomba na membrana (Chibalin, 2007). Para as alterações de actividade observadas podem contribuir níveis de expressão alterados, quer do número de unidades de bomba, quer da sua distribuição isoenzimática, o número de unidades de bomba funcionais na membrana, ou alterações dos processos subjacentes à regulação da mesma. A Tabela 1 apresenta um resumo das diferenças observadas na actividade ou expressão da Na,K-ATPase em modelos diabéticos, em diferentes tecidos ou órgãos.

Analisando os dados constituintes da Tabela 1, podem agrupar-se os tecidos estudados de acordo com o tipo de efeitos observados sobre a actividade da bomba nos modelos da diabetes utilizados pelos autores: um primeiro grupo, no qual a diabetes induz um decréscimo na actividade da Na,K-ATPase e que inclui nervo ciático, lente ocular, coração e eritrócito; um segundo grupo, em que a diabetes causa um aumento na actividade da bomba, incluindo mucosa do intestino delgado, e um terceiro grupo, caracterizado por não serem causadas

diferenças na actividade da Na,K-ATPase pela diabetes ou por essas diferenças nos diferentes estudos serem inconsistentes e que inclui o cérebro e o rim.

**TABELA 1 - Resumo dos efeitos provocados pela diabetes na actividade ou expressão da Na,K-ATPase em diferentes tecidos ou órgãos**

<b>Tecido</b>	<b>Efeito na Na,K-ATPase</b>	<b>Modelo de diabetes utilizado</b>	<b>Ref.</b>
Nervo ciático	Diminuição da actividade	Ratos +estreptozotocina	(Das <i>et al</i> , 1976)
	Diminuição da actividade	Ratos + estreptozotocina	(Greene & Lattimer, 1983)
	Diminuição da actividade	Biopsias em humanos com DT2 ou DT1	(Scarpini <i>et al</i> , 1993)
	Decréscimo da expressão de $\alpha_2$ e aumento da expressão de $\beta_2$	Ratos + estreptozotocina	(Gerbi <i>et al</i> , 1999)
	Diminuição da actividade	Ratos + estreptozotocina	(Cameron <i>et al</i> , 1999)
	Diminuição da actividade	Ratos GK	(Wada <i>et al</i> , 1999)
Nervo periférico	Diminuição da actividade	Ratos + estreptozotocina	(Kjeldsen <i>et al</i> , 1987)
Lente ocular	Diminuição da actividade	Ratos + Aloxano	(Ahmad <i>et al</i> , 1985)
Epitélio pigmentado da retina	Diminuição da actividade	Coelhos+Aloxano	(MacGregor & Matschinsky, 1986)
Cérebro	Diminuição da actividade: hipocampo, córtex, tálamo, hipotálamo e tronco cerebral; Não varia a actividade: estriado e cerebelo.	Ratos +estreptozotocina	(Leong & Leung, 1991)
Fígado	Aumento da actividade Aumento da expressão de $\beta_1$	Ratos + estreptozotocina	(Sennoune <i>et al</i> , 1999;Sennoune <i>et al</i> , 2000)
Coração	Diminuição da actividade Diminuição da expressão da $\alpha_2$	Ratos + estreptozotocina	(Ng <i>et al</i> , 1993)
	Diminuição da actividade	Ratos + estreptozotocina	(Pierce & Dhalla, 1983)
	Diminuição da actividade	Ratos + estreptozotocina	(Kjeldsen <i>et al</i> , 1987)
Muscular esquelético	Não varia a actividade; Aumento da expressão da $\alpha_1$ e $\alpha_2$	Ratos + estreptozotocina	(Ng <i>et al</i> , 1993)
	Diminuição do nº unidades bomba na membrana	Ratos + estreptozotocina	(Kjeldsen <i>et al</i> , 1987)
Rim	Aumento da actividade Aumento da expressão de $\alpha_1$ e $\beta_1$	Ratos + estreptozotocina	(Ng <i>et al</i> , 1993)
Rim - Ansa de Henle ascendente	Diminuição da actividade Diminuição da expressão da $\alpha_1$	Ratos +estreptozotocina	(Tsimaratos <i>et al</i> , 2001)
Mucosa intestinal	Aumento da actividade na membrana basolateral. Sem alteração na membrana com microvilosidades.	Ratos + estreptozotocina e ratos + aloxano	(Luppa & Muller, 1982;Luppa & Muller, 1986)
Eritrócito	Diminuição da actividade em pacientes de DT2, mas apenas nos que sofriam também de microalbuminúria.	Pacientes de DT2	(Mimura <i>et al</i> , 1994)
	Diminuição da actividade	Ratos + Aloxano	(Agarwal <i>et al</i> , 1985)
	Diminuição da actividade em pacientes de DT1, mas sem alteração nos de DT2.	Pacientes de DT1 e de DT2	(De La Tour <i>et al</i> , 1998)

A grande maioria dos modelos utilizados nos estudos atrás referidos corresponde a modelos de diabetes quimicamente induzida, sendo mais adequados para a DT1 do que para a DT2. Seria portanto relevante realizar estudos em modelos animais que, em termos fisiopatológicos, se aproximem mais duma condição semelhante à DT2.

Nas situações em que são comparados dados de pacientes de DT1 e DT2, nem sempre os resultados obtidos para ambas as patologias são convergentes (De La Tour *et al*, 1998; Mimura *et al*, 1994), o que leva a especular sobre o facto de as alterações observadas não se deverem à hiperglicemia, estando antes associadas à etiologia de cada uma das patologias.

As complicações associadas à diabetes, como a neuropatia, a retinopatia, a nefropatia e as desordens cardiovasculares têm também associadas alterações na actividade na Na,K-ATPase (Chibalin, 2007). Por exemplo, estudos de Fekete *et al*. mostram que, num modelo de diabetes induzido por estreptozotocina (DT1), em tecido renal, há um aumento da expressão do mRNA da subunidade  $\alpha$  da Na,K-ATPase, da fosforilação de resíduo de Ser-23 e ainda da actividade da bomba neste tecido (Fekete *et al*, 2008).

Alguns autores sugerem também que as alterações do funcionamento da bomba observadas na diabetes estarão relacionadas com uma acção inadequada da insulina sobre a mesma. A insulina é um potente regulador da actividade da bomba, como já foi anteriormente referido, e alterações nos níveis de insulina surgem associadas a qualquer uma das patologias diabéticas. Para além disso, foi observado que a administração de insulina ou de peptídeo-C podem reverter algumas das alterações registadas na actividade da Na,K-ATPase associadas a complicações da diabetes (Chibalin, 2007), o que levanta a hipótese de a Na,K-ATPase poder constituir um alvo terapêutico a avaliar em estudos futuros, nestas patologias.

A dúvida fundamental que subsiste a estes estudos é a de saber se as alterações da actividade da Na,K-ATPase são uma consequência das disfunções nos vários tecidos nos indivíduos diabéticos, ou se fazem parte da causa que origina essas mesmas disfunções.

Embora existam alguns estudos sobre a actividade da Na,K-ATPase e o seu contributo para a fisiologia da célula  $\beta$ -pancreática (Elmi *et al*, 2000a; Owada *et al*, 1999), não existem actualmente quaisquer estudos sobre eventuais alterações da actividade ou expressão da Na,K-ATPase em ilhéus de Langerhans, desconhecendo-se o contributo que a bomba pode ter para as alterações da secreção de insulina característica da DT2.





## 1.2 A SECREÇÃO DE INSULINA ESTIMULADA POR GLUCOSE

*“All current models of stimulus-secretion coupling rightly feature beta cells as electrically excitable fuel sensors under hormonal and neural control.”*

Henquin, 2009, *Diabetologia*, 52:739-751

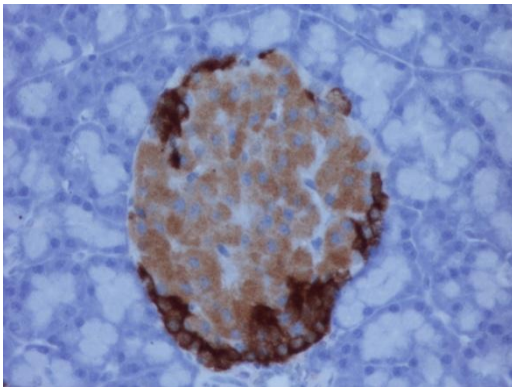
### 1.2.1 O pâncreas, o ilhéu de Langerhans e a célula $\beta$ -pancreática

O pâncreas é uma glândula mista, endócrina e exócrina, que produz hormonas e enzimas digestivos. O pâncreas exócrino é constituído pelas glândulas acinares. O pâncreas endócrino é constituído pelos ilhéus de Langerhans, pequenas massas de tecido compacto, esféricas ou ovóides, embebidas no pâncreas exócrino. A maioria destes ilhéus tem 100-200  $\mu\text{m}$  de diâmetro e contêm centenas de células, podendo existir alguns mais pequenos apenas com algumas células. No pâncreas humano, por exemplo, existe mais de um milhão de ilhéus de Langerhans, sendo a zona mais enriquecida a cauda do pâncreas. Os ilhéus representam apenas uma pequena porção do volume total do pâncreas, entre 1-2% do seu volume (Mescher, 2010).

Quando se observam cortes em microscopia óptica corados com hematoxilina-eosina, observa-se que uma fina camada de células reticulares rodeia cada ilhéu. As células que constituem o ilhéu são poligonais ou redondas, mais pequenas e menos coradas que as acinares. Dispõem-se em cordas, separadas por uma rede de capilares fenestrados. Observa-se também que algumas fibras nervosas do sistema nervoso autónomo contactam com as células endócrinas e com os vasos sanguíneos (Mescher, 2010).

Os principais tipos de células dos ilhéus de Langerhans, identificados e estudados por imuno-histoquímica, são:

- Células  $\alpha$  – Segregam principalmente glucagina, constituem cerca de 15-20% das células dos ilhéus de Langerhans e situam-se predominantemente na sua periferia (ver Figura 3);
- Células  $\beta$  – Segregam insulina e são o tipo celular mais abundante (50-90%) no ilhéu, dispendo-se centralmente neste (ver Figura 3);
- Células  $\delta$  – Segregam somatostatina, são menos abundantes (3-10%) e aparecem dispersas no ilhéu;
- Células F ou PP – Existem em particular em ilhéus situados na cabeça do pâncreas e representam cerca de 1% das células do ilhéu. Segregam polipeptídeo pancreático;
- Células enterocromafins – Surgem escassas. São semelhantes às do sistema gastrointestinal e segregam outras hormonas polipeptídicas (Jones & Persaud, 2010).



**FIGURA 3 - Ilhéu de Langerhans**

Ilhéu de Langerhans marcado por imuno-histoquímica para insulina (rosa) e glucagina (castanho), evidenciando assim as células  $\beta$  e  $\alpha$ , respectivamente (original 200x).

---

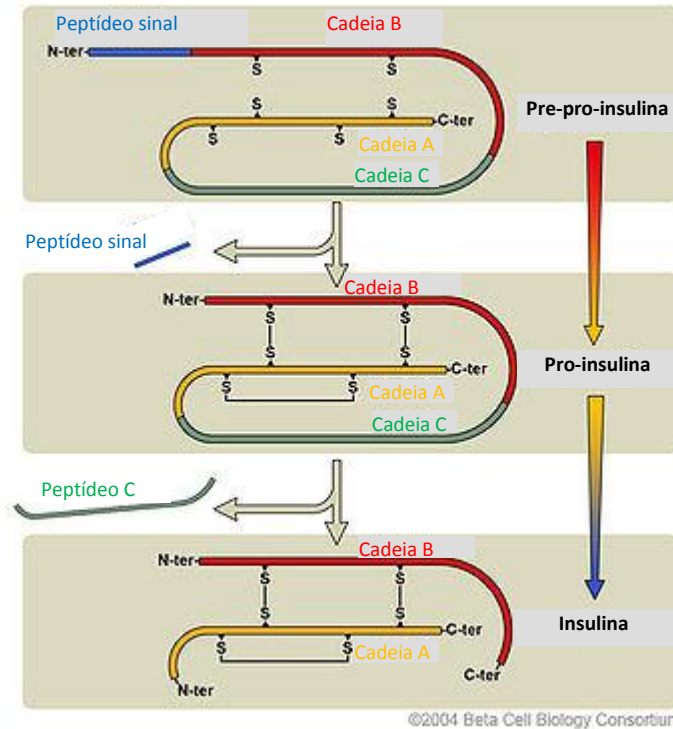
A actividade dos dois tipos celulares mais abundantes no ilhéu, as células  $\alpha$  e  $\beta$ , é regulada pelo nível de glucose no sangue. As hormonas segregadas por estes tipos celulares, glucagina e insulina respectivamente, têm uma acção essencialmente endócrina mas apresentam também uma acção parácrina, afectando a libertação de outras hormonas ao nível do ilhéu bem como a actividade dos ácinos vizinhos (Mescher, 2010).

Os ilhéus são altamente vascularizados. Apesar de contabilizarem apenas 2-3% da massa total do pâncreas, recebem cerca de 15% do fluxo sanguíneo pancreático. Cada ilhéu recebe sangue arteriolar que penetra no ilhéu através de uma rede de capilares (Jones & Persaud, 2010).

A morfologia do ilhéu tem uma influência profunda na sua capacidade de reconhecer e responder a sinais fisiológicos, pois as suas células estão interligadas por uma rede de junções *gap*. Este contacto célula-célula ocorre por moléculas de adesão de superfície, como a conexina 36, e constitui um mecanismo de comunicação, mediado por E-caderina ou efrina, mecanismo este que tem sido considerado relevante na regulação da função da célula  $\beta$ -pancreática. Um outro nível de controlo é exercido por acção parácrina ou autócrina das substâncias segregadas pelo próprio ilhéu. Por este último mecanismo, a comunicação intra-ilhéus pode ocorrer através das hormonas insulina, glucagina e somatostatina, as quais actuam em células adjacentes ou por acção doutras substâncias também co-segregadas, como neurotransmissores ou nucleótidos de adenina ou ainda iões divalentes, tendo também sido consideradas outras substâncias nesta coordenação metabólica intra-ilhéus, como o óxido nítrico ou o monóxido de carbono. Todos estes níveis de regulação intra-ilhéu reflectem a necessidade de uma resposta secretora altamente coordenada que permita gerar o padrão de secreção apropriado às condições fisiológicas (Jones & Persaud, 2010).

### 1.2.2 A biossíntese da insulina

A insulina é produzida nas células  $\beta$ -pancreáticas dos ilhéus de Langerhans a partir de um péptido precursor, a pre-pro-insulina, que consiste num polipeptídeo de 11,5 kDa. À medida que vai sendo transcrita, é inserida no lúmen do retículo endoplasmático rugoso, onde é clivada por enzimas proteolíticas, libertando-se o peptídeo sinal, gerando a pro-insulina. A pro-insulina é um péptido com 9 kDa, contendo as cadeias A e B que constituirão mais tarde a molécula de insulina (com 21 e 30 resíduos de aminoácidos, respectivamente) unidas pelo peptídeo C (30-35 resíduos de aminoácidos). A conformação estrutural da pro-insulina e da insulina são muito semelhantes, sendo a principal função do peptídeo C a de alinhar as ligações persulfureto que ligam a cadeia A à B, de forma a que a molécula se apresente na posição apropriada para a clivagem (Jones & Persaud, 2010) (ver Figura 4).



**FIGURA 4 - Esquema representativo das etapas fundamentais da síntese da insulina**

Na figura representam-se as etapas fundamentais da síntese da insulina. A insulina, à medida que vai sendo transcrita (como pre-pro-insulina), é inserida no lúmen do retículo endoplasmático, onde é clivada por enzimas proteolíticas, libertando-se o peptídeo sinal e gerando a pro-insulina. Esta é depois transportada em microvesículas para o Golgi, onde sairá organizada em vesículas secretoras, nas quais ocorrerá a clivagem dos dois dipeptídeos de ligação e do peptídeo C. (Adaptado de [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/7/7a/Insulin\\_Maturation.jpg/350px-Insulin\\_Maturation.jpg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/7/7a/Insulin_Maturation.jpg/350px-Insulin_Maturation.jpg))

A pro-insulina é depois transportada em microvesículas para o aparelho de Golgi, donde sairá, organizada em vesículas secretoras. A conversão da pro-insulina em insulina continua ao nível das vesículas secretoras, pela acção de endopeptidases (pro-hormona convertase 2 e 3) e da carboxipeptidase H, que remove o peptídeo C, libertando dois dipeptídeos de ligação e, finalmente, a insulina (Jones & Persaud, 2010).

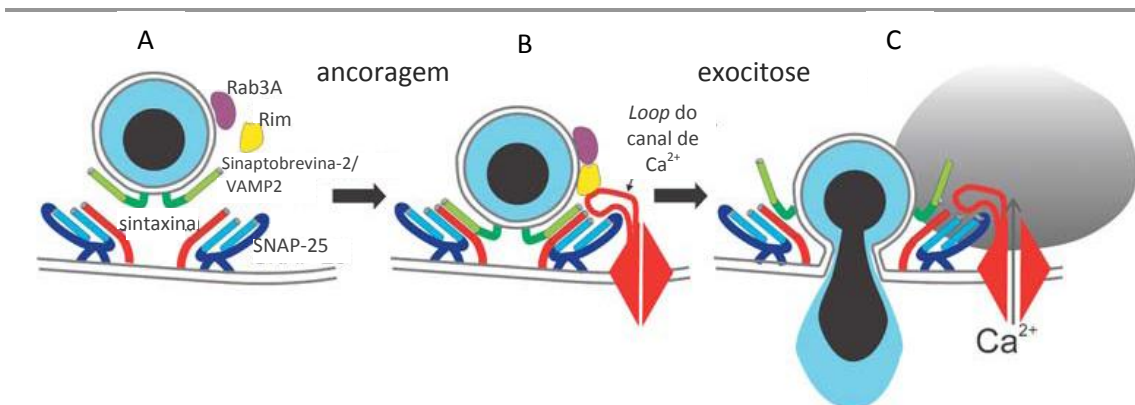
A insulina e o peptídeo C são armazenados conjuntamente nas vesículas secretoras, sendo libertados por exocitose em quantidades equimolares. Em condições normais, uma quantidade superior a 95% do produto segregado é insulina (e peptídeo C) e apenas a restante percentagem de pro-insulina. Em alguns pacientes de DT2, a percentagem de processamento dos precursores da insulina é inferior, surgindo a taxa de excreção de pro-insulina aumentada (Jones & Persaud, 2010).

A célula  $\beta$ -pancreática responde ao aumento dos nutrientes circulantes não só aumentando a taxa de libertação de insulina, mas também aumentando a síntese e produção da mesma, de forma a manter os níveis armazenados desta hormona (Jones & Persaud, 2010).

### 1.2.3 A exocitose da insulina e o padrão bifásico de secreção

A secreção de insulina ocorre quase exclusivamente por exocitose que, como acontece noutros tipos celulares, é um processo dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  e da acção de vários tipos de proteínas específicas envolvidas no transporte, acoplamento e fusão das vesículas secretoras com a membrana plasmática (Rorsman & Renstrom, 2003).

As proteínas SNARE desempenham um importante papel na fusão das vesículas de insulina com a membrana. Estas proteínas associam-se em complexos que se ligam às membranas e podem eventualmente fundir-se nelas, incluindo as proteínas da membrana plasmática syntaxina e SNAP-25, bem como a proteína vesicular sinaptobrevina, também conhecida como VAMP. O modelo actualmente aceite postula que as proteínas SNARE facilitam a exocitose por permitirem ancorar a vesícula secretora na proximidade da membrana plasmática. As alterações conformacionais que ocorrem durante o processo fornecem a energia necessária ao processo de fusão (Rorsman & Renstrom, 2003) (ver Figura 5).



**FIGURA 5 - Esquema representativo da exocitose da insulina**

Durante a ancoragem (A), as vesículas de insulina aproximam-se da membrana e as proteínas vesiculares sinaptobrevina e VAMP ligam-se às proteínas da membrana plasmática syntaxina e SNAP-25, originando um complexo que permite a aproximação da vesícula à membrana plasmática e, em células  $\beta$ -pancreáticas, também aos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  (B). Ocorrerá então a fusão das membranas, em consequência de uma entrada localizada de  $\text{Ca}^{2+}$ , após abertura dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  (C). Estão ainda representadas na figura as proteínas Rab3 e RIM. Esta última possui não só a capacidade de ligação à anterior, como também a de se ligar ao *loop* do canal de  $\text{Ca}^{2+}$ , à proteína SNAP-25 e à sinaptotagmina (não representada na figura), que funciona como um sensor de  $\text{Ca}^{2+}$ . (Adaptado de Rorsman & Renstrom, 2003)

As proteínas SNARE não permitem justificar a acção rápida do  $\text{Ca}^{2+}$  na exocitose. Pensa-se serem as sinaptotagminas as responsáveis pela sensibilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  do processo excitatório. Estas constituem uma família de proteínas da qual são já conhecidas 13

representantes, com diferentes afinidades para o  $\text{Ca}^{2+}$ . As sinaptotagminas envolvidas na exocitose da insulina são a V e a VII e têm uma elevada sensibilidade a  $\text{Ca}^{2+}$ , contribuindo para o papel deste íon na regulação da exocitose de insulina (Rorsman & Renstrom, 2003).

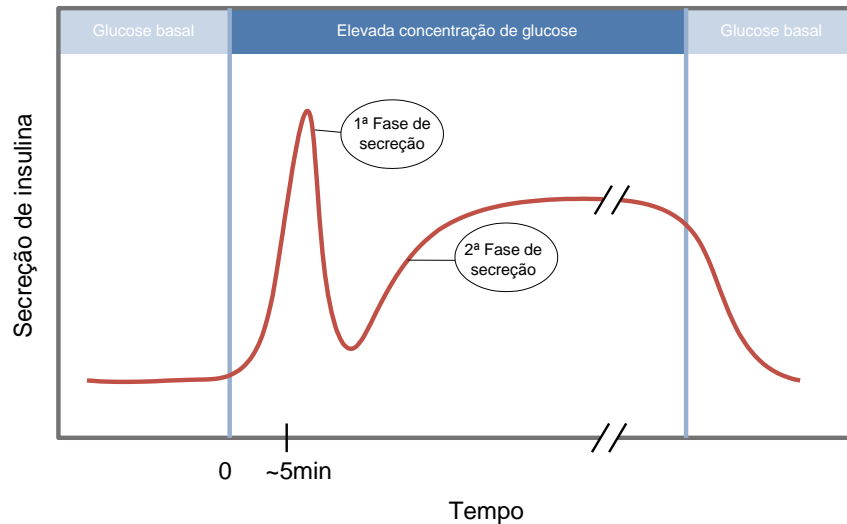
As proteínas SNARE não desempenham apenas um papel na ancoragem das vesículas à membrana, mas também asseguram que essa mesma ancoragem ocorra estritamente na proximidade dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$ . O canal de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L, cujas características abordaremos com mais detalhe na página 53, possui um *loop* intracelular que liga o segundo e terceiro domínios transmembranares, *loop* esse que se liga à syntaxina, à SNAP-25 e à sinaptotagmina, ancorando o canal de  $\text{Ca}^{2+}$  à vesícula secretora (Rorsman & Renstrom, 2003) (ver Figura 5).

Existem outras proteínas envolvidas na regulação da exocitose, como as Rab, pequenas proteínas que ligam GTP. São conhecidas várias isoformas desta proteína, sendo a mais estudada a Rab3A. Esta proteína pode apresentar-se numa forma associada às vesículas, quando ligada a GTP, ou numa forma citoplasmática após a exocitose e hidrólise de GTP a GDP. Na célula  $\beta$ -pancreática a proteína Rab3A localiza-se na face citoplasmática das vesículas secretoras, parecendo exercer uma acção inibitória sobre a exocitose, limitando assim a secreção de insulina. Existem ainda proteínas que interagem com a Rab3A e que lhe permitem exercer distintas acções de controle sobre a libertação de insulina, como é o caso das proteínas RIM (*Rab3-interacting molecule*) e RIM2 (uma isoforma da anterior), que estão presentes na célula  $\beta$ -pancreática e participam na secreção de insulina mediada por glucose. As proteínas RIM interagem com outras proteínas, nomeadamente das vias de transdução dependentes de cAMP (Rorsman & Renstrom, 2003).

A exposição de células- $\beta$  pancreáticas isoladas a um estímulo de glucose resulta num padrão de secreção de insulina bifásico. A resposta inicial à glucose caracteriza-se por um rápido aumento da secreção de insulina, seguindo-se um declínio para valores próximos dos basais. Esta resposta aguda, que demora 1-5 min, tem sido designada por primeira fase da secreção (ver Figura 6) (Jones & Persaud, 2010).

A exposição continuada à glucose leva a uma segunda fase, lenta, de secreção de insulina, que pode manter-se por várias horas (ver Figura 6). Pensa-se que a primeira fase corresponde à libertação das vesículas secretoras maduras ancoradas à membrana plasmática, enquanto que a segunda fase da secreção de insulina resulta da mobilização para a membrana

das vesículas secretoras armazenadas, bem como à síntese *de novo* de insulina (Pratley & Weyer, 2001).



**FIGURA 6 - Secreção bifásica de insulina.**

A figura representa o perfil de secreção de insulina de um pâncreas perfundido, em resposta a um aumento da concentração de glicose. (Adaptado de Jones & Persaud, 2010).

As vesículas secretoras de insulina, à semelhança do que acontece noutros tipos celulares, existem no interior da célula em diferentes reservatórios. Estes incluem uma reserva intracelular de cerca de 90%, um reservatório ancorado na membrana com cerca de 10%, e um reservatório pronto a ser libertado, quimicamente marcado para esse fim, que pode constituir 0,3-2,2% do total. É o tamanho deste reservatório pronto a ser libertado o principal determinante da magnitude da resposta secretora inicial (primeira fase; Figura 6). Estes reservatórios podem de imediato ser reabastecidos a partir dos reservatórios ancorados na membrana, após marcação destes, e apenas por último serão recrutadas as vesículas dos reservatórios intracelulares (Barg *et al*, 2002; Pratley & Weyer, 2001).

A primeira fase da secreção de insulina é determinante na rápida alteração dos processos metabólicos do estado de jejum para o estado pós-prandial. Durante o jejum, a concentração de insulina em circulação é baixa, a lipólise e o nível de ácidos gordos não esterificados são elevados e os requisitos de glicose pelo cérebro e pelos outros tecidos são satisfeitos pela produção hepática de glicose. O aumento inicial de glicose plasmática, após uma refeição, estimula a primeira fase da secreção de insulina que permite um aumento óptimo da concentração intersticial da hormona. O efeito anti-lipolítico da insulina nos

adipócitos causa um rápido decréscimo nos ácidos gordos não esterificados e a inibição da produção de glucose endógena. Em apenas alguns minutos, o estado metabólico é eficientemente mudado da produção para o armazenamento de glucose (Pratley & Weyer, 2001).

Esta primeira fase de secreção é quase exclusivamente dependente da actividade eléctrica desencadeada na sequência de um estímulo e que, em célula  $\beta$ -pancreática, serve o propósito de permitir a exocitose dos grânulos de insulina. A distribuição e as competências excitóticas das vesículas de insulina deverão ser bem controladas, de forma a assegurar uma resposta fisiológica apropriada. A resposta excitótica inicial, ou de primeira fase, pode ser replicada por qualquer estímulo que induza um aumento intracelular da concentração de  $Ca^{2+}$ , desencadeando o processo de fusão das vesículas secretoras com a membrana plasmática (Pratley & Weyer, 2001).

A segunda fase da secreção, contudo, apenas pode ser desencadeada por segretagogos metabolizáveis, nomeadamente glúcidos, dos quais a glucose constitui o estímulo mais importante. Os sinais que derivam da metabolização da glucose são importantes na promoção da mobilização dos grânulos de insulina a partir dos reservatórios mais internos e, logo, na manutenção da secreção (MacDonald *et al*, 2005). Este efeito potenciador da secreção parece ter o contributo de dois mecanismos distintos, um dependente de  $Ca^{2+}$  (Gembal *et al*, 1992; Gembal *et al*, 1993) e outro independente deste ião, mas que apresenta uma elevada sensibilidade ao GTP (Komatsu *et al*, 1995).

O perfil temporal da secreção de insulina surge modificado na DT2, observando-se uma atenuação ou mesmo uma abolição da primeira fase acompanhada de um atraso e atenuação da segunda fase de secreção de insulina, em resposta à glucose (Ceíça, 1998; Portha *et al*, 1991; Pratley & Weyer, 2001). Como a primeira fase da secreção de insulina desempenha um importante papel na supressão da produção de glucose endógena, a perda deste padrão na secreção de insulina contribui para a hiperglicemia pós-prandial observada em pacientes com diabetes (Pratley & Weyer, 2001).



#### 1.2.4 Acoplamento estímulo-secreção em célula $\beta$ -pancreática

A resposta secretora da célula  $\beta$ -pancreática a uma alteração no seu ambiente, de que será exemplo um aumento na concentração extracelular de glucose, é mediada por um conjunto coordenado de eventos celulares. Esta sequência de eventos pode ser vista como o processo de acoplamento entre estímulo e secreção e inclui o reconhecimento do estímulo e a transdução de sinal por um mecanismo acoplado que resulta na eventual modificação da taxa de libertação de insulina.

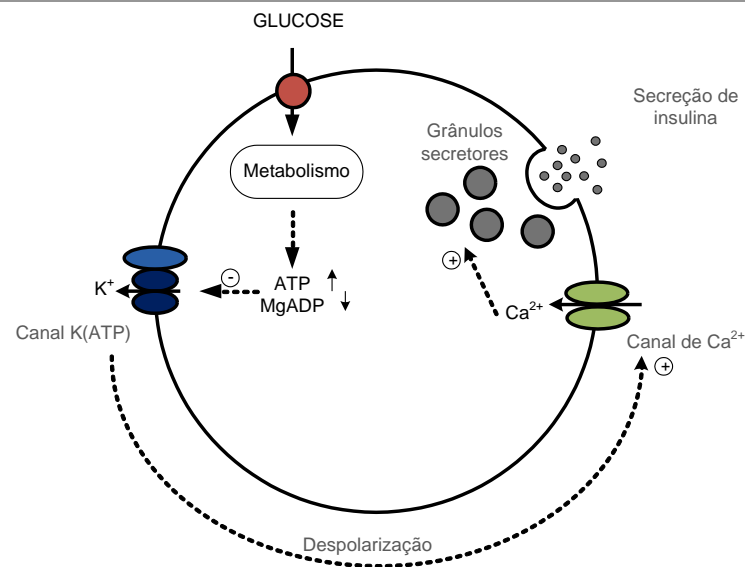
A glucose é um iniciador da secreção de insulina apresentando uma dose-resposta sigmóide. Existe assim uma concentração de glucose limiar necessária para induzir secreção de insulina e também uma concentração de glucose a partir da qual não é possível estimular a secreção. A gama de concentrações em que é possível definir a sigmóide não é a mesma entre espécies. Em rato, por exemplo, o valor limiar para se iniciar a secreção é de cerca de 4 mM, o  $EC_{50}$  é cerca de 8 mM, atingindo-se um valor máximo aproximadamente entre 16 e 20 mM de glucose (Henquin, 1978).

Nos capítulos seguintes descrever-se-á a teoria vigente da secreção de insulina estimulado por glucose, que permite explicar a sequência de eventos iónicos iniciais subjacentes ao acoplamento estímulo-secreção e ainda algumas das mais importantes vias de amplificação metabólica da secreção de insulina.

##### 1.2.4.1 TEORIA VIGENTE DA SECREÇÃO DE INSULINA ESTIMULADA POR GLUCOSE

O mecanismo da secreção de insulina induzido por glucose não está ainda completamente esclarecido. A teoria actual (ver Figura 7) aponta para que a glucose seja transportada para o interior da célula  $\beta$ -pancreática pelo transportador GLUT-2, sendo subsequentemente metabolizada, pela via da glucocinase, o que leva a alterações nos níveis intracelulares de ATP, da razão ATP/ADP e dos nucleótidos piridínicos (Aizawa *et al*, 1994; Rorsman & Renstrom, 2003). Os sinais resultantes da metabolização da glucose conduzem ao fechamento dos canais de  $K^+$  sensíveis a ATP (K(ATP)). Reduz-se então o fluxo de

saída do  $K^+$  através da membrana plasmática, o que resulta na despolarização da mesma. Consequentemente, ocorre a abertura dos canais de  $Ca^{2+}$  tipo L, dependentes de voltagem, ocorrendo influxo de  $Ca^{2+}$  e aumento da concentração intracelular deste íon, que desencadeia o processo de exocitose da insulina (Aizawa *et al*, 1994; Rorsman & Renstrom, 2003).



**FIGURA 7 – Esquema das etapas constituintes do acoplamento estímulo-secreção em célula β-pancreática**

Com baixa concentração de glucose, os canais K(ATP) estão abertos e a sua actividade determina o potencial de repouso da célula β-pancreática num nível hiperpolarizado. Quando a glucose plasmática aumenta, inicia-se a sua captação e metabolização pela célula-β. Os produtos do metabolismo da glucose, provavelmente as variações nos nucleótidos de adenina, causam o fechamento dos canais K(ATP), de que resulta despolarização, conseqüente abertura dos canais de  $Ca^{2+}$  dependentes de voltagem e aumento da concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular, o que desencadeia a exocitose dos grânulos secretórios contendo insulina. (Adaptado de Ashcroft, 2000).

#### 1.2.4.1.1 O TRANSPORTADOR GLUT2

O transportador de glucose GLUT-2, de baixa afinidade, e o enzima fosforilador da glucose, a glucocinase, também ele de baixa afinidade, são estruturas de primordial importância na forma como a glucose é reconhecida pela célula-β, permitindo que variações na concentração deste segretagogo, na ordem milimolar, tenham correspondentes variações na taxa de fluxo metabólico.

O transportador transmembranar de glucose GLUT-2 apresenta um elevado  $K_M$  de 17 mM. Esta característica permite-lhe que a captação de glucose para o interior da célula-β

esteja ajustada à concentração de glucose no sangue, na gama milimolar (Tiedge & Lenzen, 1994). É um membro da família dos transportadores de glucose de mamífero. O gene do transportador GLUT-2 está expresso em elevado número em célula  $\beta$ -pancreática, em fígado e, em menor extensão, no intestino delgado e em rim (Tiedge & Lenzen, 1994).

Estudos com modelos animais da diabetes mostram que perturbações na expressão do gene do GLUT-2, quer ao nível transcricional, quer ao nível pós-transcricional, podem contribuir para a patogénese da doença. Contudo, estudos realizados em humanos com DT2 familiar e em humanos de grupos étnicos com elevada prevalência da doença não permitiram demonstrar uma correlação com o locus do gene do GLUT-2 (Tiedge & Lenzen, 1994), não podendo este constituir uma causa exclusiva do desenvolvimento da patologia. No entanto, está descrita uma ligeira diminuição da actividade do transportador num modelo animal da DT2 (Ohneda *et al*, 1993).

#### 1.2.4.1.2 A GLUCOCINASE

Uma vez transportada para a célula  $\beta$ -pancreática através do GLUT2, a fosforilação da glucose via glucocinase é o principal passo limitante para a regulação da velocidade do fluxo glicolítico. Assim, a regulação da actividade da glucocinase é de central importância na manutenção da flexibilidade da resposta à glucose em célula  $\beta$ -pancreática (Tiedge & Lenzen, 1994).

A clonagem molecular do cDNA de glucocinase de rato revelou a expressão específica do enzima em célula  $\beta$ -pancreática e em fígado. O gene da glucocinase é regulado de forma mais complexa que o do GLUT-2, por *splicing* que é específico para o tipo de tecido e por possíveis modificações pós-transcricionais. A heterogeneidade da expressão da glucocinase entre células é um aspecto adicional da regulação da sensibilidade individual da célula  $\beta$ -pancreática à glucose (Tiedge & Lenzen, 1994).

A actividade da glucocinase e da glucose-6-fosfatase são controladas maioritariamente pela concentração de substrato. Os seus valores de  $K_M$  excedem as concentrações celulares fisiológicas, quer de glucose, quer de glucose-6-fosfato. Assim, o  $K_M$  para a glucose-6-fosfatase é 2-4 mM e a concentração de glucose-6-fosfato no citoplasma é 0,1-0,3 mM. O  $K_M$  da glucocinase relativamente à glucose é de aproximadamente 10 mM, sendo este valor superior

à concentração de glucose registada no sangue, que varia habitualmente entre 4-7 mM (Khan *et al*, 1994).

#### 1.2.4.1.3 A REGULAÇÃO DOS NÍVEIS INTRACELULARES DE NUCLEÓTIDOS

Os nucleótidos de adenina têm vários alvos moleculares na célula  $\beta$ -pancreática, podendo desempenhar diversas acções de modulação, por exemplo, ao nível da regulação de canais (Ashcroft *et al*, 1984), da exocitose dos grânulos de insulina (Pratley & Weyer, 2001) e na regulação de cinases (Ramanadham *et al*, 1994), que se repercutem na secreção de insulina.

Em vista do relevante papel dos nucleótidos de adenina como segundos mensageiros na regulação metabólica de diversos sistemas celulares, tem-se procurado conhecer como variam os seus níveis. Trabalhos de Detimary *et al*. (1996) mostram que os nucleótidos de adenina se encontram compartimentados na célula  $\beta$ -pancreática. Observaram que quando as células são incubadas com baixa glucose, 68% do ATP, 45% do ADP e 52% do AMP estão no citoplasma, por difundirem das células após permeabilização destas. O conteúdo em nucleótidos que permanece nas células após permeabilização estará maioritariamente associado aos grânulos secretores de insulina, havendo ainda a considerar um outro reservatório de nucleótidos de adenina, provavelmente mitocondrial. Estes autores observaram ainda que a estimulação das células  $\beta$ -pancreáticas por glucose induz variações significativas na razão ATP/ADP do reservatório citoplasmático, e que essa variação se deve principalmente a um decréscimo do ADP (Detimary *et al*, 1996a). Estudos com ilhéus de ratinho mostram que os níveis de ATP aumentam de 9 pmol/ilhéu para 20 pmol/ilhéu quando sujeitos a um aumento da concentração de glucose de 0 para 10 mM. A razão ATP/ADP correspondente aumenta de 2,5 vezes para 10 vezes. Embora um aumento subsequente da concentração de glucose de 10 para 20 mM não provoque uma aumento significativo da concentração ATP, a razão ATP/ADP continua a aumentar proporcionalmente devido ao decréscimo progressivo da concentração de ADP (Detimary *et al*, 1996a).

Também os nucleótidos de guanina parecem desempenhar um papel importante na regulação da secreção de insulina induzida por glucose. A incubação de ilhéus de Langerhans com glucose leva a um aumento progressivo e dependente da concentração de GTP e a um

decréscimo de GDP, o que leva a um progressivo aumento na razão GTP/GDP (Detimary *et al*, 1996b).

Existe uma correlação positiva entre a secreção de insulina e as razões ATP/ADP e GTP/GDP (Detimary *et al*, 1996b), o que indica que, quer os nucleótidos de adenina, quer os de guanina, são bons candidatos a participar no acoplamento estímulo-secreção em célula  $\beta$ -pancreática.

Alterações nos níveis de nucleótidos durante as etapas iniciais do processo estímulo-secreção podem ter influência nesse mesmo processo. Dado que a Na,K-ATPase é um sistema que consome cerca de 75-80 % do ATP produzido pela célula (Malaisse, 1996), esta poderá afectar os níveis intracelulares deste nucleótido. De facto, estudos de Grapengiesser *et al*. mostram, por exemplo, que a inibição da actividade da Na,K-ATPase, utilizando ouabaína, em células  $\beta$ -pancreáticas, leva a um aumento da concentração de ATP submembranar, reduzindo a probabilidade de abertura dos canais K(ATP), afectando a amplitude das oscilações de  $Ca^{2+}$  (Grapengiesser *et al*, 1993). É assim muito relevante o estudo de sistemas de membrana que possam afectar os níveis de nucleótidos de adenina durante as etapas iniciais do processo de estímulo-secreção, nomeadamente a Na,K-ATPase.

#### 1.2.4.2 A AMPLIFICAÇÃO METABÓLICA DA SECREÇÃO DE INSULINA

Em célula  $\beta$ -pancreática, a secreção de insulina ocorre como resposta ao catabolismo de nutrientes, sendo essencial para a manutenção da homeostasia da glucose plasmática. O aumento da razão ATP/ADP, induzido por glucose, desempenha, como já descrito, um importante papel no desencadear da secreção de insulina, cuja etapa inicial consiste no fechamento dos canais K(ATP). Contudo, múltiplos resultados experimentais apontam para que o mecanismo de secreção de insulina dependente do K(ATP) não descreva totalmente o perfil de resposta à glucose do ilhéu. Com efeito:

- Mostrou-se que a estimulação por 15 mM de glucose induz uma taxa de secreção de insulina superior que a combinação entre 10 mM de glucose e 5  $\mu$ M de tolbutamida, embora ambas as condições produzam actividade eléctrica semelhante, o que levanta a hipótese de a glucose desencadear efeitos não electrogénicos (Henquin, 1988);
- Observou-se que, na presença da quantidade de sulfonilureia necessária para fechar os canais K(ATP), a glucose leva a um aumento da secreção de insulina, o que sugere que a glucose tenha outros alvos moleculares (Panten *et al*, 1988);
- Foi também demonstrado que, na situação em que os canais K(ATP) são mantidos farmacologicamente abertos pela presença de diazóxido, a estimulação por glucose em células- $\beta$  despolarizadas pela adição de KCl leva a um aumento da secreção de insulina. Mostrou-se ainda que este efeito da glucose é dependente do metabolismo e que ocorre um aumento da concentração intracelular de  $Ca^{2+}$ , mostrando que a glucose pode influenciar a secreção de insulina independentemente do K(ATP) (Gembal *et al*, 1992; Gembal *et al*, 1993; Sato *et al*, 1992).

Existem assim outros sinais metabólicos, independentes da razão ATP/ADP, também importantes na regulação da secreção de insulina estimulada por glucose. O mecanismo dependente dos canais K(ATP) parece ser particularmente importante na primeira fase da secreção, desencadeando a exocitose da pequena quantidade de vesículas de insulina que se encontram prontas para ser libertadas, nos primeiros 10 min após a estimulação (Barg *et al*, 2002). Em contraste, na segunda fase, a regulação do K(ATP) não parece explicar a amplificação da secreção de insulina que ocorre a partir dos 15 min após a estimulação por glucose. Estima-se que esta fase de amplificação do sinal contribui com cerca de 70% para a secreção de insulina estimulada por glucose. Nesta fase, são mobilizadas, como referido atrás, as vesículas ancoradas, rapidamente utilizáveis, e as vesículas recrutadas *de novo* dos reservatórios intracelulares (Jensen *et al*, 2008).

Os estudos que têm procurado clarificar estas vias de regulação da secreção de insulina estimuladas por glucose independentes do K(ATP) e da razão ATP/ADP têm-se focado no estudos das vias mitocondriais (Jensen *et al*, 2008) e na avaliação da participação de outros segundos mensageiros que não o ATP, nomeadamente derivados de lípidos (diacilglicerol e  $IP_3$ ) (Nolan *et al*, 2006) e cAMP (Straub & Sharp, 2002), conducentes à activação de diversas

proteínas cinases. Estas desencadeiam processos de fosforilação/desfosforilação que contribuem para a amplificação da secreção, nomeadamente via sensibilização da maquinaria excitotónica ao ião  $\text{Ca}^{2+}$  (Rorsman & Renstrom, 2003).

O AMP cíclico (cAMP) é uma das moléculas que tem sido implicada na regulação da secreção de insulina, dado que se observa um aumento deste segundo mensageiro após estimulação com glucose. O seu efeito sobre a secreção de insulina parece decorrer de duas acções complementares. Por um lado, parece ter um efeito rápido que resulta do aumento da probabilidade de libertação das vesículas de insulina imediatamente utilizáveis devido à acção directa do cAMP. Por outro lado, parece ter também um efeito mais tardio, mediado pela activação da PKA pelo cAMP, provavelmente por promover o aumento da taxa de re-enchimento do reservatório intracelular de vesículas (Rorsman & Renstrom, 2003; Straub & Sharp, 2002).

A PKC é outro dos sistemas ao qual tem sido atribuído um papel relevante nos processos conducentes à amplificação da secreção de insulina. Já está descrita na literatura a activação de algumas isoformas da PKC por glucose (Williams & Schrier, 1993; Lee *et al*, 1989), designadamente  $\alpha$ ,  $\varepsilon$ ,  $\zeta$  e  $\theta$ , entre as já identificadas em célula  $\beta$ -pancreática (Warwar *et al*, 2006). A dinâmica da activação por translocação das diferentes isoformas da PKC é diferencial. As isoformas  $\alpha$ ,  $\varepsilon$ ,  $\zeta$  e  $\theta$  parecem ser activadas imediatamente após o estímulo com glucose. Na sequência desta activação, a PKC $\alpha$  e a PKC $\varepsilon$  co-localizam-se maioritariamente com as vesículas de insulina, podendo assim desempenhar um papel importante na primeira fase da secreção. Posteriormente, sofrem uma segunda fase de activação, 15 min após o estímulo com glucose, passando a co-localizar-se novamente com os grânulos de insulina, o que sugere que também desempenhem um papel relevante na segunda fase da secreção de insulina por acção sobre o processo excitotónico (Warwar *et al*, 2006).

Embora também sofram translocação para a membrana na sequência da sua activação por glucose, as isoformas  $\zeta$  e  $\theta$  não se co-localizam com as vesículas secretoras (Warwar *et al*, 2006), sugerindo que desempenhem outros papéis relevantes que podem consistir na fosforilação de proteínas de membrana que participem no processo de acoplamento estímulo-secreção.

Em ratos GK, observou-se que a PKC $\alpha$  foi tardiamente activada e que as isoenzimas PKC $\varepsilon$  e a PKC $\zeta$  não sofreram activação. Em substituição, foi activada na primeira fase uma outra isoenzima, a PKC $\delta$ , que, embora exista em controlos, não é activada por glucose (Warwar *et al*, 2006). Estas observações levantam a hipótese de estas isoenzimas da PKC

desempenharem um papel preponderante no mecanismo de acoplamento estímulo-secreção, que está comprometido na diabetes, contribuindo assim para a atenuação ou abolição da secreção de insulina que se observa na patologia.

Para além disso, estão descritas interações sinérgicas entre o metabolismo da glucose e dos ácidos gordos e a geração de moléculas de sinalização lipídicas. As moléculas lipídicas, em particular os ácidos gordos livres, em concentrações fisiológicas, não desencadeiam a secreção de insulina na ausência de glucose, mas exercem uma acção potenciadora (Nolan *et al*, 2006).

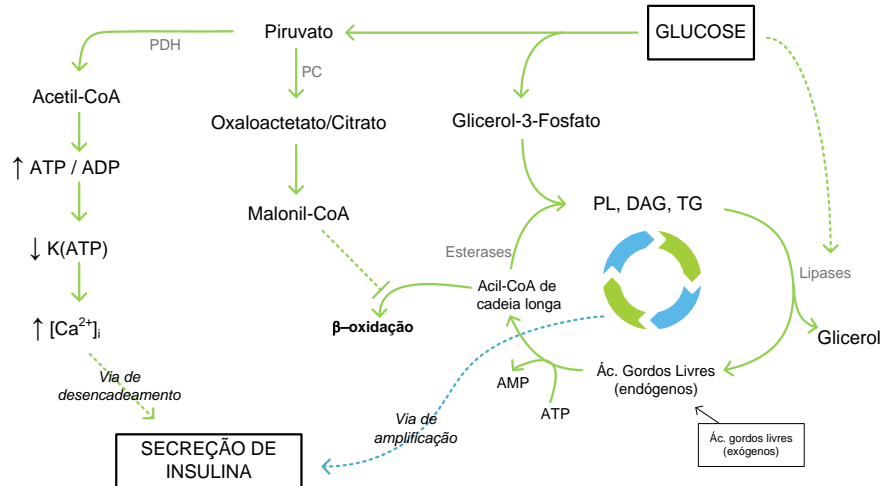
As células  $\beta$ -pancreáticas expressam abundantemente piruvato carboxilase (PC) e piruvato desidrogenase (PDH) e, num estado fisiológico pós-prandial, o piruvato flui pelas vias metabólicas mitocondriais em proporções aproximadamente equivalentes pelos pontos de entrada nas vias anapleróticas (via PC) e oxidativa (via PDH). Em hepatócitos, o maior propósito da via do PC é participar com o fosfoenolpiruvato carboxicinase (PEPCK) no início da gluconeogénese. Contudo, as células  $\beta$ -pancreáticas não expressam PEPCK, apresentando também níveis de expressão do enzima ácido-gordo sintase e velocidade de lipogénese relativamente baixos, o que sugere que, em célula- $\beta$ , a via anaplerótica mediada por PC desempenha uma outra função de sinalização, não tendo como principal função a de contribuir para a gluconeogénese ou para a lipogénese (Jensen *et al*, 2008).

A glucose dá origem ao piruvato que, se for conduzido para a metabolização, via piruvato desidrogenase (PDH), contribui para a indução da secreção de insulina pela via dependente da produção de ATP e do K(ATP). Alternativamente, se o piruvato for metabolizado via piruvato carboxilase (PC), pela via anaplerótica/cataplerótica, leva a um aumento do malonil-CoA, que bloqueia a  $\beta$ -oxidação por inibir o enzima carnitina-palmitoil transferase (Figura 8). Assim, a disponibilidade de ácidos gordos depende dos fluxos metabólicos relativos entre a síntese lipídica e a  $\beta$ -oxidação.

Em célula  $\beta$ -pancreática, os processos de esterificação e de lipólise são sensíveis a glucose. O malonil-CoA, derivado do metabolismo da glucose por meio do ciclo piruvato/citrato, impede a  $\beta$ -oxidação por inibição alostérica do enzima carnitina-palmitoil transferase, aumentando assim a disponibilidade de ácidos gordos para a sinalização lipídica. Parece ainda promover a condução de ácidos gordos livres para as vias de esterificação, favorecendo a formação de diacilglicerol, triacilgliceróis ou fosfolípidos (Nolan *et al*, 2006). Os resultados no seu conjunto apontam para a existência de um ciclo triacilgliceróis/ácidos gordos livres (ver Figura 8) em que um aumento da glucose conduz ao aumento de todos os elementos



do ciclo, incluindo o acil-CoA de cadeia longa, o diacilglicerol, os fosfolípidos e os ácidos gordos livres.



**FIGURA 8 - Interação entre a glicose e o metabolismo lipídico no acoplamento estímulo-secreção**

Este modelo ilustra as interações sinérgicas entre o metabolismo da glicose e dos ácidos gordos e a geração de moléculas de sinalização lipídicas que amplificam a secreção de insulina estimulada por glicose. A glicose dá origem ao piruvato que, se for conduzido para a metabolização via piruvato desidrogenase (PDH), contribui para a indução da secreção de insulina pela via dependente da produção de ATP e do K(ATP). Alternativamente, se o piruvato for metabolizado via piruvato carboxilase (PC), pela via anaplerótica/cataplerótica, leva a um aumento do malonil-CoA, que bloqueia a β-oxidação por inibir o enzima carnitina-palmitoil transferase. A inibição da oxidação de ácidos gordos, por seu lado, leva à acumulação de ésteres de acil-CoA de cadeia longa no citosol. Estes podem ser o resultado da esterificação de ácidos gordos livres fornecidos externamente ou produzidos por lipólise a partir dos triacilgliceróis (TG) endógenos. Os acil-CoA de cadeia longa podem ainda esterificar com o glicerol-3-fosfato para formar lípidos complexos como triacilgliceróis, diacilglicerol (DAG) ou fosfolípidos (PL). A glicose também activa a lipólise, favorecendo o ciclo lipídico a partir dos lípidos endógenos. (Adaptado de Nolan *et al*, 2006).

A inibição da oxidação de ácidos gordos, por seu lado, leva à acumulação de ésteres de acil-CoA de cadeia longa no citosol. Estes podem ser o resultado da esterificação de ácidos gordos livres fornecidos externamente ou produzidos por lipólise a partir dos triacilgliceróis (TG) endógenos. Os acil-CoA de cadeia longa podem ainda esterificar com o glicerol-3-fosfato para formar lípidos complexos como triacilgliceróis, diacilglicerol (DAG) ou fosfolípidos (PL). A glicose também activa a lipólise, favorecendo o ciclo lipídico a partir dos lípidos endógenos (Nolan *et al*, 2006).

Não é ainda claro o mecanismo através do qual este ciclo contribui para a amplificação da secreção de insulina estimulada por glicose, mas uma hipótese consiste na activação da PKC pelas moléculas lipídicas, designadamente o diacilglicerol. Este lípido é um agente regulador de algumas das isoformas da PKC identificadas na célula β-pancreática (Straub &

Sharp, 2002), tendo sido observado que várias dessas isoformas sofrem translocação na sequência de um estímulo com glucose, acetilcolina, GLP-1 ou ácidos gordos (Warwar *et al*, 2006). Do conjunto de isoformas da PKC sensíveis a diacilglicerol, as isoformas PKC $\alpha$ , PKC $\epsilon$ , PKC $\theta$  e PKC $\delta$  são translocadas para a membrana quando activadas. Para além disso, as isoformas PKC $\alpha$ , PKC $\epsilon$  co-localizam-se com as vesículas de secreção (Warwar *et al*, 2006), onde poderão actuar sobre a maquinaria excitotónica, enquanto que as isoformas PKC $\theta$  e PKC $\xi$  actuam provavelmente noutros alvos na membrana, podendo contribuir para a amplificação da secreção mediada pela estimulação do metabolismo lipídico.

Assim, o conhecimento destas vias de sinalização é fisiologicamente muito relevante em célula  $\beta$ -pancreática visto constituírem vias de amplificação da secreção de insulina, pelo que alterações na sua activação poderão contribuir para a atenuação da secreção de insulina observada na DT2.

#### 1.2.4.3 A REGULAÇÃO DO METABOLISMO PELA PROTEÍNA CINASE ACTIVADA POR AMP (AMPK)

A AMPK é um enzima heterotrimérico com uma subunidade- $\alpha$ , com função catalítica, e duas subunidades com função reguladora,  $-\beta$  e  $-\gamma$ . Os genes que codificam as suas subunidades são altamente conservados entre espécies eucariotas, evolutiva e filogeneticamente (Viollet *et al*, 2007). Existem dois ou três genes que codificam cada subunidade, dando origem a doze combinações heterotriméricas, que podem ainda apresentar variantes de *splicing*.

A proteína cinase activada por AMP (AMPK) tem sido descrita como um sistema integrador dos sinais regulatórios, monitorizando o estado energético celular. A AMPK é uma cinase de serina/treonina e está na base de uma cascata de transdução de sinal. O AMP actua na cinase a montante, a AMPKK, promovendo a fosforilação num resíduo Thr-172 da subunidade  $\alpha$  da AMPK, activando-a. Adicionalmente, o AMP, ao ligar-se directamente na AMPK, exerce uma regulação alostérica, promovendo por um lado o aumento da actividade por cooperatividade positiva e, por outro, tornando-a menos sensível à desfosforilação. Este complexo sistema de regulação torna a AMPK muito sensível a variações de AMP. A AMPK

também apresenta um local de ligação para o ATP, que antagoniza os efeitos do AMP, tornando-a sensível à razão AMP:ATP. De facto, a reacção catalisada pela adenilato cinase ( $2ADP \rightarrow AMP + ATP$ ), que funciona próxima do equilíbrio em qualquer situação, faz com que a razão AMP:ATP varie aproximadamente com o quadrado da razão ADP:ATP, tornando a primeira um indicador muito sensível do estado energético celular e ao qual a AMPK é sensível (Towler & Hardie, 2007).

A AMPK é um enzima ubíquo no organismo, desempenhando um papel central na regulação do metabolismo do músculo, fígado, tecido adiposo, miocárdio, entre outros. De uma forma geral, a AMPK nestes tecidos serve como interruptor metabólico de forma que, quando activada, estimula os processos catabólicos produtores de ATP (glicólise,  $\beta$ -oxidação e biogénese mitocondrial) e inibe os processos anabólicos de consumo de ATP (gluconeogénese e síntese de glicogénio, de ácidos gordos e de proteínas), restaurando assim a razão AMP:ATP (Lim *et al*, 2010).

A sua acção foi inicialmente relacionada com efeitos ao nível do metabolismo lipídico, inactivando os enzimas acetil-CoA carboxilase (ACC) e 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase (HMG-CoA redutase), enzimas chave das vias metabólicas dos ácidos gordos e do colesterol, e só mais tarde se descreveu o seu papel ao nível do metabolismo dos glúcidos e das proteínas, da regulação do ciclo celular e da biogénese mitocondrial (Lim *et al*, 2010).

A AMPK tem também sido indicada como elemento importante no acoplamento entre sistemas de transportes de membrana e o metabolismo celular, intervindo ao nível do tráfego intracelular proteico. Um exemplo é o estímulo da translocação do transportador de glucose GLUT4 do sarcolema para a membrana, em músculo esquelético e cardíaco (Russell, III *et al*, 1999).

Na célula  $\beta$ -pancreática ocorrem variações consideráveis dos níveis de ATP (e consequentemente de AMP) intracelulares, ao contrário do que acontece no fígado e nos outros tecidos periféricos, onde as variações nos níveis intracelulares dos nucleótidos de adenina são normalmente pequenas ou não existentes. Tal deve-se ao metabolismo oxidativo da glucose, que gera elevadas concentrações de ATP livre. Estas variações da concentração de ATP e, em particular, da razão  $[ATP]/[ADP]$ , constituem um processo chave na regulação da secreção de insulina induzida por glucose, pelo que a AMPK deve ser um sistema a considerar na regulação da actividade secretora nestas células (Rutter *et al*, 2003).

Para concentrações de glucose sub-estimulatórias, em que as células- $\beta$  se encontram num estado de repouso, tanto a captação como a fosforilação da glucose apresentam níveis mínimos de actividade. Pelo contrário, quando a concentração de glucose no sangue aumenta, atingindo concentrações estimulatórias, o metabolismo oxidativo da célula- $\beta$  é desencadeado, aumentando tanto as concentrações de ATP total como livre, nos diversos compartimentos celulares (no citoplasma, no mitocôndrio ou na região sub-membranar plasmática), observando-se ainda os correspondentes decréscimos nas concentrações totais de ADP e AMP (da Silva *et al*, 2003). Existem observações experimentais de que um aumento de glucose no intervalo de concentrações fisiológico promove uma diminuição acentuada da actividade da AMPK, quer em linhas clonais de células  $\beta$  quer em ilhéus. Este decréscimo de actividade está associado a uma progressiva e quase completa desfosforilação da AMPK no resíduo Thr-172, à medida que a concentração de glucose aumenta (da Silva *et al*, 2003). Adicionalmente, também a activação farmacológica da AMPK pelo AICAR, um análogo do AMP, tem um efeito inibitório sobre a secreção de insulina, não estando os mecanismos subjacentes a este feito esclarecidos (Rutter *et al*, 2003).

O estudo da AMPK em célula  $\beta$ -pancreática tem permitido estabelecer inúmeras relações entre o metabolismo e funções celulares dele dependentes. Foi possível, por exemplo, associar a actividade da AMPK ao nível da expressão genética de vários enzimas, sendo um exemplo o gene que codifica para a piruvato cinase (da Silva *et al*, 2003), mas também ao nível da regulação metabólica de canais, como é um exemplo a regulação exercida pela AMPK ao nível do tráfego intracelular de canais K(ATP) (Lim *et al*, 2009).

A AMPK parece ainda exercer um efeito negativo sobre o recrutamento de grânulos de insulina e também sobre o estímulo da transcrição do gene da pre-pro-insulina, supondo-se assim que desempenhe um papel relevante na segunda fase da secreção de insulina (da Silva *et al*, 2003; Tsuboi *et al*, 2003). Não está ainda perfeitamente esclarecido o mecanismo subjacente a esta regulação negativa sobre a secreção de insulina, mas supõe-se que esta possa ser mediada pela interacção deste sistema com as vias de sinalização lipídicas, descritas na secção anterior, e que se devem ao facto de a AMPK regular o nível de malonil-CoA. A AMPK fosforila os enzimas acetil-CoA carboxilase e malonil descarboxilase, os enzimas que catalisam, respectivamente, a síntese e a degradação de malonil-CoA, sendo o efeito resultante o decréscimo de concentração deste metabolito, favorecendo assim as vias de produção de energia, nomeadamente, a  $\beta$ -oxidação, e desfavorecendo a disponibilidade de ácidos gordos livres para a sinalização celular (Nolan *et al*, 2006). Como os lípidos são conhecidos potenciadores da secreção de insulina, que actuam principalmente por activação

das isoformas PKC $\alpha$ , PKC $\epsilon$ , PKC $\theta$  e PKC $\delta$  (Warwar *et al*, 2006), uma diminuição destas moléculas de sinalização poderá contribuir para o efeito negativo na secreção de insulina mediado pela AMPK.

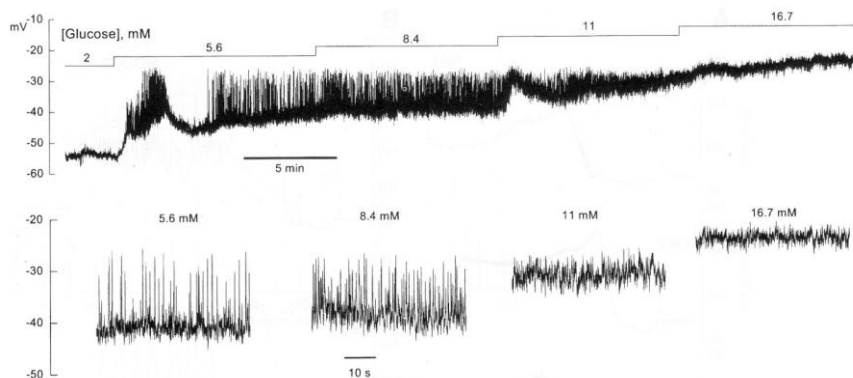
Embora os trabalhos realizados na última década sobre a acção da AMPK na célula  $\beta$ -pancreática lhe atribuam um papel central na regulação do metabolismo e conseqüentemente no processo de acoplamento estímulo-secreção, não se sabe se este sistema enzimático contribui para as alterações observadas em célula- $\beta$  na DT2.

### 1.2.5 Mecanismos iónicos subjacentes à secreção de insulina induzida por glucose

A regulação do potencial de membrana nas células  $\beta$ -pancreáticas é o componente central do processo de acoplamento estímulo-secreção. As alterações no potencial de membrana são reguladas por alterações na actividade de canais iónicos e outros sistemas electrogénicos, dependentes do metabolismo (Drews *et al*, 2010).

A geração de actividade eléctrica é um passo fundamental para a secreção de insulina mediada por glucose. O registo de actividade eléctrica com micro-eléctrodo tem permitido o estudo das propriedades da actividade eléctrica induzida por glucose e tem sido feita maioritariamente em ilhéus micro-dissecados de ratinho, mas também em ilhéus isolados de ratinho e de rato.

Estudos de Antunes *et al*. evidenciaram que a actividade eléctrica em rato se caracteriza por um potencial de repouso de -50 mV, ocorrendo rápida despolarização da membrana em resposta à glucose (ver Figura 9) (Antunes *et al*, 2000).



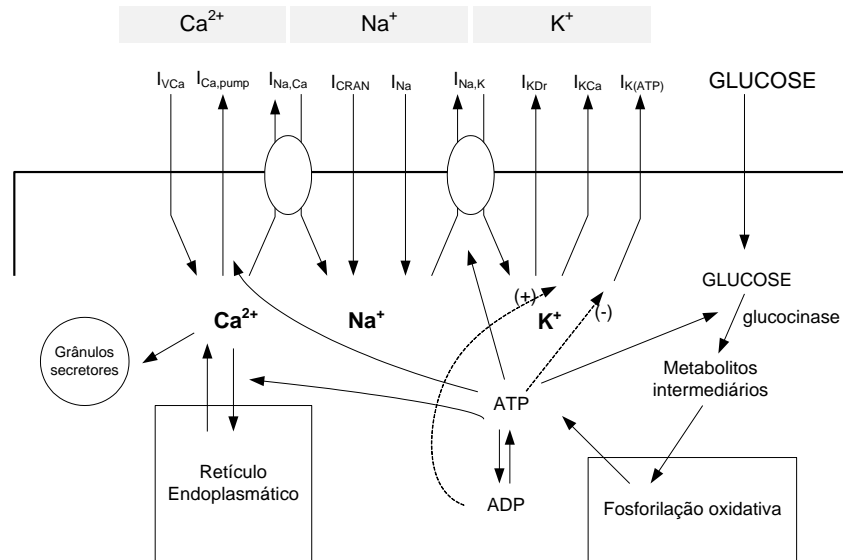
**FIGURA 9 - Registo de actividade eléctrica de célula  $\beta$ -pancreática de rato**

Registo de actividade eléctrica em que é feito o estudo dose-resposta relativamente à glucose na gama entre 2-16,7 mM. O aumento de glucose de 2 para 5,6 mM desencadeou uma resposta multifásica, caracterizada por uma despolarização inicial e concomitante aparecimento de “spikes”, a que se segue uma ligeira hiperpolarização sem actividade de potenciais de acção. Alguns minutos depois, a célula despolariza para um nível 10 mV acima do potencial de repouso, com actividade de potenciais de acção. Os aumentos da concentração de glucose subsequentes (para 8,4, 11,2 e 16,7) desencadeiam despolarizações de membrana lentas e progressivas, levando o potencial de membrana, medido na base dos potenciais de acção, de -40 a -25 mV. Consequentemente, a amplitude dos potenciais de acção decresce progressivamente, tornando-se residual na concentração de glucose 16,7 mM. É ainda possível observar um aumento na frequência de potenciais de acção em cada passo (Adaptado de Antunes *et al*, 2000).

Os potenciais de acção são desencadeados a partir de um potencial de membrana em patamar. Pode ainda observar-se que a glucose despolariza a membrana na base dos potenciais de acção, de uma forma dose-dependente (ver Figura 9)(Antunes *et al*, 2000; Antunes, 2004). O aumento de glucose de 2 para 5,6 mM desencadeou uma resposta multifásica, caracterizada por uma despolarização inicial e concomitante aparecimento de potenciais de acção, a que se segue uma ligeira hiperpolarização sem actividade de potenciais de acção. Alguns minutos depois, a célula despolariza para um nível 10 mV acima do potencial de repouso, com actividade de potenciais de acção. Os aumentos da concentração de glucose subsequentes (para 8,4, 11,2 e 16,7 mM) desencadeiam despolarizações de membrana lentas e progressivas, levando o potencial de membrana, medido na base dos potenciais de acção, de -40 a -25 mV. Consequentemente, a amplitude dos potenciais de acção decresce progressivamente, tornando-se residual na concentração de glucose 16,7 mM. É ainda possível observar um aumento na frequência de potenciais de acção em cada passo (Antunes *et al*, 2000).

Estes eventos iónicos são muito importantes para o controlo da secreção de insulina e já foram identificadas alterações a eles associadas em célula  $\beta$ -pancreática de ratos GK. Estas alterações caracterizam-se por um atraso significativo na despolarização da membrana e no disparo de potenciais de acção, com cinéticas 5 e 10 vezes mais lentas relativamente aos controlos. Para além disso, quer a frequência de disparo de potenciais de acção quer a sua amplitude apresentam uma diminuição para cerca de metade. Observa-se ainda um  $EC_{50}$  para a glucose aumentado (Antunes *et al*, 2002;Antunes, 2004). Estes dados são acompanhados de uma diminuição do influxo de  $Ca^{2+}$  (Santos *et al*, 1997;Zaitsev *et al*, 1997) da qual resultam a abolição da secreção de insulina induzida por glucose registada nos ilhéus destes animais (Seiça *et al*, 2004).

A actividade eléctrica é o resultado da acção concertada entre os vários sistemas de transporte iónico existentes na membrana celular, canais, bombas e transportadores, responsáveis por inúmeras correntes, que se potenciam ou se antagonizam em função dos estímulos que recebem e da regulação a que estão sujeitos (ver Figura 10).



**FIGURA 10 - Diagrama esquemático das correntes e fluxos iónicos na célula β-pancreática**

O diagrama apresenta uma visão simplificada dos fluxos iónicos e correntes existentes na membrana plasmática e no retículo endoplasmática de uma célula β-pancreática. São ainda apresentados alguns mecanismos de regulação dos nucleótidos de adenina.  $I_{VCa}$  - corrente de  $Ca^{2+}$  dependente da voltagem;  $I_{Ca(pump)}$  - corrente da bomba de  $Ca^{2+}$ ;  $I_{Na,Ca}$  - Corrente do trocador Na/Ca;  $I_{CRAN}$  - corrente catiónica não selectiva activada por  $Ca^{2+}$ ;  $I_{Na}$  - corrente de  $Na^+$ ;  $I_{Na,K}$  - corrente da Na,K-ATPase;  $I_{KDr}$  - corrente do canal de  $K^+$  "delayed rectifying";  $I_{KCa}$  - corrente de  $Ca^{2+}$  de pequena condutância independente da voltagem e activada por  $K^+$ ;  $I_{K(ATP)}$  - Corrente de  $K^+$  activada por ATP. (Adaptado de Fridlyand *et al*, 2005)

Serão descritos nas secções seguintes as características estruturais e funcionais dos sistemas iónicos mais relevantes e o seu contributo para a actividade eléctrica em célula β-pancreática.

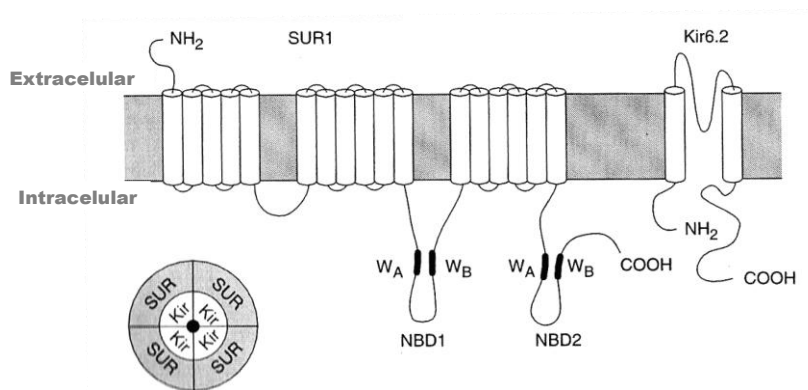


### 1.2.5.1 CANAIS IÓNICOS ENVOLVIDOS NA SECREÇÃO DE INSULINA

#### 1.2.5.1.1 O CANAL K(ATP)

O canal de  $K^+$  sensível a ATP, K(ATP), é o principal responsável pelo potencial de membrana de repouso em célula  $\beta$ -pancreática. A actividade do K(ATP) permite um fluxo de saída de  $K^+$  em condições de repouso. Assim, o potencial de membrana, que é determinado pelo potencial de equilíbrio para o  $K^+$ , é de cerca de  $-70\text{mV}$  (Ashcroft *et al*, 1984).

O K(ATP) é constituído por quatro subunidades Kir6.2, que formam o poro, e por quatro subunidades reguladoras do receptor da sulfunilureia (SUR1). Na Figura 11 pode visualizar-se um esquema da disposição dos elementos destas subunidades na membrana.



**FIGURA 11 - Esquema da constituição do canal K(ATP)**

O canal K(ATP) é um complexo octamérico de quatro subunidades Kir6.2, que formam o poro, e por quatro subunidades do receptor da sulfunilureia (SUR1), com função reguladora. Análises de hidropatia revelam que o Kir6.2 se dispõe de acordo com a topologia transmembranar usual dos canais Kir. A subunidade SUR1 contém múltiplos domínios transmembranares e dois domínios de ligação nucleotídica citosólicos (NBDs), cada um dos quais contendo um motivo Walker A ( $W_A$ ) e Walker B ( $W_B$ ), motivos estes envolvidos na activação do canal K(ATP) por MgADP. (Adaptado de Ashcroft, 2000).

Duas classes de compostos farmacológicos modulam a secreção de insulina por interagirem com a subunidade SUR1 do canal K(ATP): Por um lado, as sulfonilureias, tais como a glibenclamida, que inibem o canal, daí serem utilizadas na estimulação da secreção de

insulina em pacientes com DT2; por outro lado também o composto com capacidade para abrir canais de  $K^+$ , o diazóxido, que activa os canais K(ATP), hiperpolarizando a membrana da célula  $\beta$ -pancreática e prevenindo a secreção de insulina. A redução da actividade do canal K(ATP) resulta na estimulação da secreção de insulina causando hipoglicemia e, inversamente, o aumento da actividade do canal leva a uma diminuição da secreção, causando hiperglicemia (Ashcroft, 2000).

Desempenhando o K(ATP) um tão importante papel na secreção de insulina induzida por glucose, não é de surpreender que genes que codifiquem o canal ou que codifiquem proteínas envolvidas na regulação da actividade do K(ATP) afectem a secreção de insulina. Tem sido crescente o número de mutações identificadas como responsáveis por alterações na função do K(ATP), quer no sentido de estimular a sua actividade, o que conduz a uma redução patológica na secreção de insulina, como é o caso da diabetes neonatal, quer no sentido de decrescer a actividade do canal, o que leva a uma secreção de insulina excessiva, como é o caso do hiperinsulinismo congénito. Foi ainda detectada uma variante em Kir6.2 designada E23K que se demonstrou estar associada a uma secreção de insulina reduzida e que pode contribuir para a etiologia da DT2 (Remedi & Koster, 2010).

O modelo actual prevê que existam dois locais de ligação, incluindo o previamente descrito local de ligação para o ATP, que pode ligar tanto ATP como ADP e que diminui a abertura do canal e um novo local de ligação para MgADP, que aumenta a probabilidade de abertura do canal (Tarasov *et al*, 2004). Esta interacção pode explicar porque é que, sendo a concentração intracelular de ATP da ordem dos mM, e sendo o canal bloqueado por concentrações micromolares de ATP, este se encontre aberto em condições de repouso, nas células  $\beta$ -pancreáticas.

O canal K(ATP) não pode ser visto como um complexo proteico isolado, mas como fazendo parte de uma rede proteica que regula a actividade do canal. Assim, a actividade do canal K(ATP) é regulada não só por ATP e ADP, mas também por lípidos como os fosfatidilinosítóis ou ésteres de acil-CoA de cadeia longa. Tanto o ADP como estes últimos aumentam a probabilidade de abertura do K(ATP) e reduzem a sensibilidade ao ATP (Tarasov *et al*, 2004). A actividade do canal é ainda sensível a cAMP e a vias de sinalização associadas a proteínas G (Jacobson & Philipson, 2010). Pode também referir-se a interacção do K(ATP) com proteínas excitóticas como a syntaxina-1A, que se liga à subunidade SUR1 e parece inibir directamente o canal K(ATP) (Leung *et al*, 2007). Trabalhos recentes apontam ainda para um

papel relevante da AMPK na regulação do número de unidades do K(ATP) na membrana (Lim *et al*, 2009), como já foi referido na secção 1.2.4.3.

#### 1.2.5.1.2 Os canais de $\text{Ca}^{2+}$ sensíveis à voltagem e o influxo de $\text{Ca}^{2+}$

O influxo de cálcio através dos canais de cálcio dependentes de voltagem é essencial para qualquer uma das fases da secreção de insulina estimulada por glucose. Os potenciais de acção em célula- $\beta$  de roedores devem-se principalmente a correntes de  $\text{Ca}^{2+}$  e não de  $\text{Na}^+$ , apesar de em humanos haver também contribuição de correntes de  $\text{Na}^+$ . Os principais responsáveis por essas correntes de entrada de cálcio são os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  sensíveis à voltagem de tipo L. A participação de outros canais de  $\text{Ca}^{2+}$  sensíveis à voltagem (de tipo P/Q, N ou T) tem sido controversa. Recentemente, foi também atribuída uma função aos canais de tipo-R na segunda fase da secreção de insulina. Contudo, a utilização de antagonistas dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L leva à inibição da secreção de insulina em humanos e roedores e, por essa razão, os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L são considerados os principais agentes da secreção de insulina (MacDonald *et al*, 2005). Já se observou igualmente que o pré-tratamento de células  $\beta$ -pancreáticas com nifedipina, uma di-hidropiridina bloqueadora dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L, inibe efectivamente a secreção de insulina em qualquer uma das fases, com valores de  $\text{IC}_{50}$  semelhantes (Aizawa *et al*, 1994).

Em termos estruturais, o canal de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L é um complexo hetero-oligomérico constituído por cinco subunidades,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ , organizadas segundo a estequiometria 1:1:1:1:1 (Catterall, 1995). As subunidades  $\alpha_2$  e  $\delta$  são derivadas por clivagem proteolítica do produto do mesmo gene, permanecendo associadas por ligações persulfureto. As outras subunidades são codificadas por diferentes genes. As subunidades  $\alpha_1$ ,  $\gamma$  e  $\delta$  são transmembranares, enquanto que a subunidade  $\beta$  é citoplasmática. A subunidade  $\delta$  parece actuar como uma âncora na membrana à subunidade  $\alpha_2$ , que é maioritariamente extracelular. Em termos funcionais, a subunidade mais relevante é a  $\alpha_1$ , constituindo o poro do canal, o sensor de voltagem e o receptor para inúmeros ligandos farmacológicos. As outras subunidades têm funções auxiliares regulando, por exemplo, a magnitude da corrente, as propriedades cinéticas do canal e a sensibilidade a moduladores (Ashcroft, 2000).

Os canais de cálcio sensíveis à voltagem estão sujeitos a uma complexa regulação, por uma variedade de moduladores citosólicos. Parece, no entanto, que a proteína cinase A

dependente de cAMP, a proteína cinase G dependente de cGMP e as tirosina cinases desempenham apenas papéis menores na regulação dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L de células  $\beta$ -pancreáticas, assumindo a proteína cinase C o papel de manter a fosforilação destes canais. Os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L encontram-se altamente fosforilados em célula  $\beta$  primária sob condições basais, não se julgando por isso que fosforilações adicionais possam constituir um mecanismo de regulação da actividade do canal (Drews *et al*, 2010).

A localização dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L na membrana não é uniforme. Dispõem-se em agregados que se co-localizam com as vesículas excitóticas, o que permite a melhor rentabilização do aumento intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  para a excitose. Adicionalmente, foi já descrita a ligação do *loop* II destes canais a proteínas na maquinaria excitótica (ver secção 1.2.3) (Drews *et al*, 2010).

#### 1.2.5.1.3 OS CANAIS DE $\text{K}^+$ SENSÍVEIS À VOLTAGEM

Também os canais de  $\text{K}^+$  sensíveis à voltagem (Kv) desempenham um papel relevante na função da célula  $\beta$ -pancreática. Estes canais abrem com a despolarização da membrana e medeiam a repolarização durante a fase descendente do potencial de acção (MacDonald *et al*, 2005).

Estruturalmente são constituídos pelo acoplamento de quatro subunidades  $\alpha$ , as quais possuem seis segmentos transmembranares (S1-S6). O segmento S4 é o sensor de voltagem e os segmentos S5 e S6 formam o poro propriamente dito. Existem onze famílias de subunidades  $\alpha$  de canais Kv actualmente conhecidas. Destas, apenas quatro formam por si mesmas canais funcionais (Kv1, Kv2, Kv3 e Kv4). As restantes, quando participantes na estrutura de um determinado canal, exercem um efeito modulador nas propriedades deste. Esta diversidade heteromultimérica e a falta de antagonistas selectivos têm dificultado o estudos destes canais (Ashcroft, 2000).

Em células  $\beta$  pancreática as correntes Kv são constituídas pelo menos por duas componentes. Uma dessas correntes não apresenta inactivação, é insensível à 4-aminopiridina (corrente “delayed rectifier”,  $\text{K}_{\text{DR}}$ ) e é inibida por tetraetilamónio numa gama de concentrações da ordem milimolar. A outra corrente, apresenta inactivação (corrente A) e é inibida por 4-aminopiridina. As correntes-A em células  $\beta$ -primárias podem ser mediadas pelas isoformas

Kv1.4, Kv3.3 e Kv3.4, enquanto que a isoforma Kv2.1 parece ser responsável pela corrente  $K_{DR}$  (Drews *et al*, 2010).

Numerosos estudos sugerem que o Kv2 possa ser regulado por sinais com origem mitocondrial, nomeadamente pela razão NADPH/NADP<sup>+</sup>. Esta regulação pode ter importância na fisiologia da célula  $\beta$ , uma vez que a geração de NADPH pode reduzir a eficiência com que os canais de K<sup>+</sup> sensíveis à voltagem repolarizam a célula  $\beta$ , contribuindo desta forma para a excitabilidade eléctrica em resposta à glucose, alargando os potenciais de acção e aumentando o influxo de cálcio. Este efeito pode, em parte, justificar a capacidade da célula  $\beta$  modificar a sua actividade eléctrica mesmo quando os canais de K(ATP) estão fechados por sulfonilureias (MacDonald *et al*, 2005).

Outros moduladores dos canais Kv são os ácidos gordos não esterificados. Demonstrou-se que a hidrólise de fosfolípidos de membrana mediada pela fosfolipase A2- $\beta$  conduz a uma redução no pico das correntes Kv (Drews *et al*, 2010).

#### 1.2.5.1.4 OS CANAIS DE K<sup>+</sup> SENSÍVEIS À VOLTAGEM E ACTIVADOS POR Ca<sup>2+</sup>

Os canais de K<sup>+</sup> sensíveis à voltagem e activados por Ca<sup>2+</sup> ( $K_{Ca}$ ) podem dividir-se em três grupos em função da sua condutância: canais de grande condutância, BK (B de “big”); canais de condutância intermédia, IK (I de “intermediate”) ou SK4; canais de baixa condutância, SK1, SK2 e SK3 (S de “small”).

Os canais BK são hetero-octâmeros de quatro subunidades  $\alpha$ , que formam o poro, e de quatro subunidades  $\beta$  com funções de regulação. Estes canais têm uma condutância de canal único de 100-250 pS (medido com soluções simétricas de 100 mM de K<sup>+</sup>). Têm sensibilidade a baixas concentrações de tetraetilamónio, caribdotoxina (CTX) e iberiotoxina mas não são afectados por apamina. São activados por despolarização ou por concentrações nanomolares de Ca<sup>2+</sup> e a sensibilidade à despolarização de membrana aumenta com o Ca<sup>2+</sup> (Drews *et al*, 2010).

Os canais de condutância baixa (5-20 pS) ou intermédia (20-80 pS) não são sensíveis à voltagem na ausência de Ca<sup>2+</sup> e são activados por este ião em concentrações submicromolares. Em termos estruturais não são muito diferentes, embora os SK tenham um terminal amina

mais curto, e se assemelhem à topologia dos Kv, com seis domínios transmembranares. Os de baixa condutância são insensíveis a tetraetilamónio e alguns, mas não todos, são bloqueados por apamina. Os de condutância intermédia são insensíveis à apamina mas são bloqueados por CTX e por clotrimazol (Ashcroft, 2000).

Os canais SK1-SK4 regulam a duração e a frequência dos potenciais de acção de  $\text{Ca}^{2+}$  em células  $\beta$ , o padrão oscilatório da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  e a secreção de insulina estimulada por glucose (Drews *et al*, 2010).

#### 1.2.5.1.5 CANAIS DE $\text{Na}^+$ DEPENDENTES DE VOLTAGEM

Em termos estruturais os canais de  $\text{Na}^+$  dependentes da voltagem são constituídos por uma subunidade principal,  $\alpha$ , e, dependendo do tecido, por uma ou mais subunidades reguladoras,  $\beta$ . A subunidade  $\beta$  aumenta a amplitude das correntes de  $\text{Na}^+$  e modifica as suas propriedades (Ashcroft, 2000).

A importância dos canais de  $\text{Na}^+$  dependentes de voltagem não é a mesma em todas as espécies. Em roedores, os canais de  $\text{Na}^+$  em célula- $\beta$  encontram-se completamente inactivados no potencial de membrana de repouso, não participando nos potenciais de acção, uma vez que não há inibição ou alteração da actividade eléctrica na presença de tetrodotoxina, o inibidor farmacológico destes canais. Tal não é o caso em cães e em humanos, nos quais há um contributo de correntes de  $\text{Na}^+$  para a actividade eléctrica induzida por glucose. Neste caso, o influxo de  $\text{Na}^+$  despolariza a membrana levando à abertura dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L. Em cães, estes canais são mesmo os principais responsáveis pela fase de despolarização dos potenciais de acção, que são totalmente inibidos por tetrodotoxina (Drews *et al*, 2010; Pressel & Mislner, 1991).

### 1.2.5.2 OUTROS SISTEMAS ELECTROGÉNICOS EM CÉLULA $\beta$ -PANCREÁTICA

A actividade eléctrica da célula  $\beta$ -pancreática possui muitos outros sistemas de transporte iónico que poderão contribuir para a regulação fina do potencial de membrana. Estes incluem outros canais como o de  $\text{Cl}^-$ , canais catiónicos não selectivos, trocadores e bombas electrogénicas. O papel destes sistemas não foi ainda extensivamente caracterizado em célula  $\beta$ . Nesta secção descrever-se-á a participação de alguns destes sistemas, que não canais, relevantes em célula  $\beta$ -pancreática, abordando o que no momento actual se conhece sobre a sua regulação em célula  $\beta$ -pancreática.

#### 1.2.5.2.1 O TROCADOR Na/Ca

O trocador Na/Ca (NCX) constitui um sistema de transporte electrogénico, localizado na membrana plasmática que permite o antiporte de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  com a estequiometria de três iões  $\text{Na}^+$  por cada  $\text{Ca}^{2+}$ . Este trocador aproveita o gradiente electroquímico da entrada de  $\text{Na}^+$  a favor do gradiente de concentração para realizar o contra-transporte de  $\text{Ca}^{2+}$ , constituindo um mecanismo fundamental para a extrusão de  $\text{Ca}^{2+}$  do interior das células (DiPolo & Beauge, 2006).

A NCX apresenta uma baixa afinidade para o  $\text{Ca}^{2+}$ , mas uma elevada capacidade, podendo realizar o transporte rapidamente (podem ser transportados cinco mil iões  $\text{Ca}^{2+}$  por segundo) o que lhe permite actuar na remoção do  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático. Esta acção contribui para a regulação da concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  e, conseqüentemente, da função celular em célula  $\beta$ -pancreática (DiPolo & Beauge, 2006).

Estão actualmente clonadas três isoformas da NCX de mamífero, produto de diferentes genes, NCX1, NCX2 e NCX3. NCX1 está distribuída por diferentes tecidos, enquanto que as NCX2 e NCX3 estão restringidas ao cérebro e músculo esquelético. A isoforma NCX1 tem diversas variantes que podem ser obtidas por *splicing* alternativo. Existem tecidos que expressam apenas uma das variantes, como o coração, que expressa exclusivamente a NCX1.1, enquanto que outros tecidos expressam duas ou três variantes desta isoforma, como o rim, o cérebro e a célula- $\beta$ . Em células- $\beta$  de diferentes espécies animais têm sido encontradas expressas diferentes combinações de variantes da isoforma NCX1. Por exemplo, as células  $\beta$ -pancreáticas de rato expressam duas variantes da isoforma NCX1, obtidas por *splicing*, NCX1.3

e NCX1.7 e no ratinho é expressa, além destas, uma variante adicional, a NCX1.3. Tem sido sugerido que estes padrões de expressão diferenciados da NCX da célula  $\beta$ -pancreática entre diferentes espécies possa contribuir para as diferenças observadas nos padrões característicos da actividade eléctrica (Antunes *et al*, 2000; Van *et al*, 2001).

Além da regulação conferida pela expressão isoenzimática diferenciada, a NCX sofre ainda regulação por intermediários do metabolismo. Embora não tenham sido encontrados na bibliografia estudos realizados em célula  $\beta$ -pancreática, está descrita noutros tecidos a estimulação da captação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo trocador pelo MgATP (DiPolo & Beauge, 2006). Assim, devido à amplitude das variações dos nucleótidos de adenina em célula  $\beta$ -pancreática (Detimary *et al*, 1996b), poderá equacionar-se que este mecanismo também ocorra e seja relevante para a função destas células.

#### 1.2.5.2.2 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPASE DA MEMBRANA PLASMÁTICA

A  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase da membrana plasmática (PMCA) é responsável pela extrusão de  $\text{Ca}^{2+}$  do citoplasma para o exterior e existe na maioria das células de eucariotas. Ao contrário da NCX, efectua o transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  com uma elevada afinidade, mas com baixa capacidade, sendo a sua acção muito relevante na manutenção da concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  em níveis muito baixos. Assim, as actividades da PMCA e da NCX na extrusão de  $\text{Ca}^{2+}$  são complementares, contribuindo para a restauração e manutenção da concentração basal de  $\text{Ca}^{2+}$  (Strehler & Zacharias, 2001).

A PMCA pertence, tal como a Na,K-ATPase, à família das ATPases tipo-P, que se caracteriza pela existência de um intermediário aspartil-fosfato no seu ciclo reacional. Caracteriza-se estruturalmente por ter dez regiões transmembranares, com os terminais amina e carboxilo citoplasmáticos. A parte intracelular pode dividir-se em três grandes zonas: um *loop* entre os segmentos transmembranares 2 e 3; um grande *loop* entre os segmentos transmembranares 4 e 5 e uma grande região após o último segmento transmembranar, que contém o terminal carboxilo. O *loop* entre os segmentos transmembranares 2 e 3 corresponde ao domínio de transdução, e pensa-se desempenhar um papel importante nas modificações conformacionais que ocorrem durante o ciclo catalítico, contendo uma região de resposta a fosfolípidos. O grande *loop* entre os segmentos 4 e 5 contém o domínio catalítico com o local de ligação ao ATP e o resíduo de aspartato, conservado, que permite a formação do intermediário aspartil-fosfato durante a hidrólise do ATP. Finalmente, a enorme “cauda”



terminal corresponde ao domínio regulador, tendo o motivo de ligação à calmodulina. Existem várias regiões que podem resultar de *splicing* alternativo (Strehler & Zacharias, 2001).

As PMCA são reguladas por diversos mecanismos que alteram a sua funcionalidade. São activadas por  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina, por fosfolípidos ácidos, por fosforilação em resíduos de serina/treonina, podendo ainda ser reguladas por proteínas G heterotriméricas. A  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina liga-se no terminal carboxilo, cerca de 40 resíduos após o último segmento transmembranar. Na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina, esta sequência actua como um domínio auto-inibitório, ficando a bomba num estado inactivo. Com o aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático, ocorre um aumento do complexo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina, que se liga com elevada afinidade ao domínio auto-inibitório da PMCA, estimulando a actividade da bomba para próximo da sua capacidade máxima (Strehler & Zacharias, 2001).

O *splicing* alternativo afecta a afinidade das PMCA pela  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina, bem como a velocidade máxima de actividade enzimática da bomba, podendo esta diferença de afinidade ser de duas ou três ordens de magnitude entre as variáveis de *splicing* em diferentes tecidos. O *splicing alternativo* constitui assim um mecanismo que confere grande diversidade de funcionamento às PMCA (Strehler & Zacharias, 2001).

Outros mecanismos de regulação que podem ser afectados pelo *splicing* alternativo das PMCA são a regulação por fosfolípidos ácidos, que activam a bomba, e a fosforilação pelas proteínas cinases A e C (Strehler & Zacharias, 2001), dado que pode afectar a estrutura da bomba nos domínios de selectividade e/ou fosforilação. Em célula  $\beta$ -pancreática foram já identificadas seis variantes por *splicing* alternativo de mRNA ( rPMCA1xb, 2yb, 2wb, 3za, 3zc, 4xb). A célula  $\beta$ -pancreática está assim equipada com múltiplas isoformas da PMCA, com possível regulação diferencial (Kamagate *et al*, 2000).

#### 1.2.5.2.3 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPASE DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

A  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do retículo endoplasmático (SERCA) pertence também à família das ATPases tipo-P. É estruturalmente muito semelhante à PMCA, diferindo principalmente no terminal carboxilo que é, na SERCA, muito mais curto, e não contendo o motivo de ligação à  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina (Strehler & Zacharias, 2001). A SERCA transporta dois iões  $\text{Ca}^{2+}$  por antiporte com 2-3 protões (Moller *et al*, 2010).

Em mamíferos, três genes codificam para as três isoformas de SERCA conhecidas, cada uma delas apresentando, contudo, variáveis de *splicing* alternativo com um padrão de expressão que é dependente do tecido, permitindo desta forma que a função da SERCA se adapte às necessidades do tecido em que está a ser expressa. A isoforma SERCA1 apresenta duas variantes, a SERCA1a e SERCA1b, que são expressas em músculo “fast-twitch” neonatal e adulto, respectivamente, enquanto que a SERCA2a é expressa selectivamente em coração e tecidos musculares “slow-twitch”. A variante SERCA2b é expressa de forma ubíqua. Finalmente, a SERCA3 é apenas expressa num número limitado de células não musculares (Brini & Carafoli, 2009).

A proteína reguladora da SERCA mais bem conhecida é a fosfolambam. Esta interage com a SERCA1a, SERCA2a e SERCA2b, mas não com a SERCA3. Esta proteína reguladora apresenta na sua estrutura terciária uma porção carboxilo terminal hidrofóbica em hélice, intrínseca à membrana do retículo, e a região amina terminal prolonga-se para o citosol. Na sua forma não fosforilada, a fosfolambam liga-se à SERCA inibindo-a, reduzindo a afinidade aparente para o  $\text{Ca}^{2+}$  (Brini & Carafoli, 2009).

Em células  $\beta$ -pancreáticas, em resposta a uma concentração estimulatória de glucose, observa-se um decréscimo inicial da concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  anterior ao aumento da concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  resultante do influxo por canais de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L (Gylfe, 1988). Pensa-se que esse decréscimo da concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  após estimulação com glucose se deva à activação da SERCA, que capta este catião para o interior do retículo. A SERCA, ao sequestrar o  $\text{Ca}^{2+}$  para o retículo endoplasmático, desempenha, conjuntamente com outros sistemas, um papel na reposição dos níveis basais da concentração citoplasmática de  $\text{Ca}^{2+}$  em célula  $\beta$ -pancreática (Roe *et al*, 1994a; Rutter *et al*, 2006).

Nas células  $\beta$ -pancreáticas foram já identificadas as isoformas SERCA2 e a SERCA3 (Borge *et al*, 2002). Uma diminuição na actividade da SERCA, em especial, na expressão do gene da SERCA3 parece estar associada à diabetes em ratinhos ob/ob (Roe *et al*, 1994b) e em ratos GK (Varadi *et al*, 1996). Adicionalmente, foram também identificadas quatro raras mutações no gene da SERCA3 em pacientes diabéticos no Reino Unido (Varadi *et al*, 1999). Estes dados em conjunto sugerem que o gene que codifica para a SERCA3 contribui para a susceptibilidade genética da DT2.

1.2.5.2.4 A Na,K-ATPASE EM CÉLULA- $\beta$  PANCREÁTICA

*“The requirement for modulators of the Na,K-ATPase activity is likely to be greatest in tissues in which perturbations of the intracellular alkali cation concentration underlie their specialized functions.”*

Vague, et al., 2004, *Experimental Diab. Res.*, 5, 37-50

Os primeiros registos experimentais da presença da Na,K-ATPase em célula  $\beta$ -pancreática remontam a 1968, aos trabalhos de Howell e Taylor (Howell & Taylor, 1968) e de Hales e Milner (Hales & Milner, 1968). Procurava-se compreender quais os mecanismos iónicos subjacentes à secreção de insulina, aplicando conhecimentos adquiridos principalmente no estudo de células excitáveis. A existência da bomba de sódio e potássio e das suas propriedades fundamentais ao nível do transporte activo tinha sido descrita uns anos antes (1957) por Skou, em tecido muscular (Skou, 1967;Skou, 1998).

Em célula  $\beta$ -pancreática, a actividade enzimática da bomba de sódio foi extensivamente estudada nos anos 70. Ficou então estabelecido que as suas funções eram semelhantes às desempenhadas noutros tecidos (Levin *et al*, 1978;Sehlin & Taljedal, 1974), tendo sido confirmada a sua electrogenicidade (Henquin & Meissner, 1982). Postulou-se que contribuía para o potencial do repouso e que a sua inibição farmacológica com ouabaína resultava na despolarização da membrana (Henquin & Meissner, 1982).

A Na,K-ATPase era então vista como uma forte candidata a explicar o fenómeno estímulo-secreção em célula  $\beta$ -pancreática. Os trabalhos de Howell e Taylor em ilhéus isolados de coelho evidenciaram a capacidade de 0,1 mM de ouabaína inibir a captação de  $K^+$  mas não mostraram efeito desta concentração de ouabaína na secreção de insulina (Howell & Taylor, 1968). Hales e Milner fizeram o seu estudo medindo secreção de insulina em pedaços de pâncreas de coelho incubados em meios com diferentes composições iónicas e em resposta a diversas substâncias, tendo observado que a exposição a  $10^{-6}$ - $10^{-5}$ M de ouabaína estimulava transientemente a secreção de insulina, o que também era observado na ausência de  $K^+$  no meio exterior. Concluíram então que o estímulo à secreção de insulina era conseguido por inibição da Na,K-ATPase (Hales & Milner, 1968).

Para exercer a sua acção na célula  $\beta$ -pancreática, a Na,K-ATPase consome cerca de 75-80% do ATP produzido, consumindo preferencialmente ATP proveniente de glicólise (Malaisse, 1996). Para além disso, existem alguns trabalhos que sugerem que a glucose possa exercer um efeito regulador sobre a Na,K-ATPase, mas o assunto é ainda controverso. Existem, na literatura, estudos que apontam para uma activação da bomba por glucose (Elmi *et al*, 2000), outros, pelo contrário, apontam para uma inibição (Levin *et al*, 1978; Owada *et al*, 1999), ou ainda outros onde não se registou qualquer efeito (Elmi *et al*, 2001).

Um estudo de Levin *et al*. realizado em homogeneizados de ilhéus apontava para a hipótese de a Na,K-ATPase de ilhéus de Langerhans ser inibida por uma concentração estimulatória de glucose (Levin *et al*, 1978).

No trabalho de Owada *et al*., foram utilizadas culturas de ilhéus ou de células  $\beta$ -pancreáticas de ratinho ob/ob, permeabilizados por choque térmico, sendo estudada a actividade da Na,K-ATPase por doseamento do  $^{32}\text{P}$ , uma medida directa do ATP marcado com este isótopo radioactivo. Nos seus estudos Owada *et al*. estudaram uma gama de concentrações de glucose entre 3 e 15 mM em que observaram uma diminuição da actividade da bomba com o aumento da concentração do segretagogo. Estudaram também a cinética da inibição induzida por 15 mM de glucose durante 10 min, tendo observado que o efeito inibitório mais amplo ocorreu no tempo máximo estudado, isto é, aos 10 min (Owada *et al*, 1999).

Os trabalhos de Elmi *et al*. seguiram metodologias diferentes. No trabalho publicado em 2000 foram realizadas experiências de influxo de  $^{86}\text{Rb}^+$  em ilhéus de ratinho em cultura (sendo o  $^{86}\text{Rb}^+$  um marcador para o  $\text{K}^+$ , esta técnica permite avaliar a actividade da Na,K-ATPase) e também experiências de medição da actividade da Na,K-ATPase em homogeneizados de ilhéus por medição do fosfato inorgânico libertado pela hidrólise de ATP. As experiências com influxo de  $^{86}\text{Rb}^+$  revelaram que a actividade enzimática da Na,K-ATPase foi estimulada quando a concentração de glucose aumentou de 0 para 20 mM. Os estudos de actividade em homogeneizados foram realizados com diferentes concentrações de glucose (0, 3 e 20 mM), mas tendo sido as incubações de glucose realizadas já nos homogeneizados, não foram observadas, nestas circunstâncias, quaisquer variações da actividade enzimática da Na,K-ATPase (Elmi *et al*, 2000a). No trabalho de 2001, Elmi *et al*. apresentaram uma curva dose-resposta para a actividade da Na,K-ATPase, em que a actividade foi estimada pelo método do influxo  $^{86}\text{Rb}^+$ , relativamente à concentração de glucose (0; 5; 12,5 e 20 mM de glucose). Observaram que o efeito estimulatório máximo exercido pela glucose na actividade

da bomba ocorreu para a concentração de 5 mM (uma concentração de glucose basal em ratinho), observando para concentrações de glucose superiores a 5 mM de glucose uma ligeira inibição (Elmi *et al*, 2001).

No seu conjunto, os dados descritos na literatura foram obtidos em condições muito diversas, tendo sido utilizadas metodologias diferentes e, inclusivamente, material biológico tratado diferentemente, motivos que devem ter contribuído para as diferenças observadas nos resultados obtidos.

Assim, quer o efeito da glucose sobre a actividade da Na,K-ATPase quer os processos envolvidos na regulação da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase na célula-β, particularmente a sua regulação metabólica e a sua possível contribuição para os processos na base da regulação fisiológica da secreção de insulina, permanecem essencialmente desconhecidos.

Os dados actuais sugerem que a regulação da Na,K-ATPase em célula-β pancreática pode desempenhar um papel relevante na fisiologia destas células. Tendo em conta a importância que têm os eventos iónicos iniciais do processo de acoplamento estímulo-secreção na célula β-pancreática, poder-se-á levantar a hipótese de que alterações na actividade da bomba afectem a concentração de ATP disponível, o que poderia, por esta via indirecta, repercutir-se na actividade do canal K(ATP) e, portanto, na despolarização da membrana e no influxo da Ca<sup>2+</sup>, podendo desta forma ter implicações na secreção de insulina. Um trabalho recente em célula β-pancreática de ratinhos *knock-out* (SUR<sup>-/-</sup>) reforça esta hipótese, dado que, na ausência do K(ATP) se observou despolarização induzida por glucose, a qual foi atribuída à actividade da Na,K-ATPase (Dufer *et al*, 2009). Alguns dos estudos apontam para que a glucose contribua para esta regulação, muito embora os mecanismos subjacentes sejam essencialmente desconhecidos.

Para além disso, em ilhéus de ratos GK, estão descritas alterações que incluem uma cinética de despolarização da membrana mais lenta relativamente ao observado em controlos e o aparecimento tardio de potenciais de acção cujos mecanismos não estão completamente esclarecidos, e para os quais eventuais alterações à regulação da actividade da Na,K-ATPase, tomando em consideração a sua electrogenicidade, poderiam contribuir. Apesar de não haver estudos sobre a Na,K-ATPase em célula β-pancreática na diabetes, estão descritas, noutros

tecidos, como foi referido na secção 1.1.3.1, diversas alterações ao funcionamento ou expressão da Na,K-ATPase relacionadas com esta patologia.

Assim, o estudo da regulação da Na,K-ATPase pela glucose em célula  $\beta$ -pancreática bem como dos processos que possam contribuir para essa regulação, ganha elevada relevância científica.

### 1.3 A DIABETES TIPO 2

*“ In addition to the muscle, liver, and  $\beta$ -cell (triumvirate), the fat cell (accelerated lipolysis), gastrointestinal tract (incretin deficiency/resistance),  $\alpha$ -cell (hyperglucagonemia), kidney (increased glucose reabsorption), and brain (insulin resistance) all play important roles in the development of glucose intolerance in type 2 diabetic individuals. “*

DeFronzo, R. A., (2009), *Diabetes*, 58, 773-795.

A homeostasia da glucose no sangue é mantida pelo balanço entre a ingestão de glucose, a produção de glucose hepática, a captação da glucose pelos tecidos periféricos e a sua utilização. Este equilíbrio é mantido pela interacção complexa de vários órgãos e de várias hormonas como a glucagina, o cortisol, a hormona de crescimento e as catecolaminas, que tendem a elevar a concentração de glucose, e uma outra hormona, que permite a redução de glucose plasmática, a insulina (Sundsten & Ortsater, 2009).

A diabetes *mellitus* é uma desordem metabólica com elevada prevalência, caracterizada por um desarranjo na homeostasia da glucose devida a uma absoluta ou relativa falta de insulina e/ou a uma acção inadequada da mesma. As formas mais comuns de diabetes, designadas tipo 1 (DT1) e tipo 2 (DT2), são patologias de etiologia distinta. A DT1 é causada pela destruição auto-imune de células  $\beta$ -pancreáticas, o que leva a uma deficiência absoluta de insulina e conduz a hiperglicemia e cetoacidose fatais se não tratada (Holt *et al*, 2010). Quanto à DT2, é multifactorial na sua origem, contribuindo para o seu desenvolvimento tanto factores genéticos como ambientais. Constitui uma patologia evolutiva, na qual um conjunto de disfunções em diferentes órgãos se acumulam ao longo do tempo, condicionando um estado patológico que pode também culminar na morte do paciente (Holt *et al*, 2010).

O mecanismo molecular preciso conducente à DT2 não é ainda conhecido. Diferentes órgãos participam no estado fisiopatológico, onde o denominador comum é a insulina: Insulino-resistência e disfunção na secreção de insulina são as principais causas apontadas para o início das disfunções conducentes à DT2, sendo hoje em dia reconhecido que as alterações ao nível da célula- $\beta$  se instalam precocemente (Clark, 2010;Seino & Bell, 2008).

### 1.3.1 Fisiopatologia da DT2

A homeostasia da glucose é mantida por um balanço muito preciso entre a secreção de insulina pelas células  $\beta$ -pancreáticas e as acções da insulina nos tecidos sensíveis, principalmente músculo, tecido adiposo e fígado, onde a insulina promove a captação e o armazenamento de carbo-hidratos, gorduras e amino-ácidos enquanto que, ao mesmo tempo, antagoniza o catabolismo das reservas desses nutrientes (Alsahli & Gerich, 2010;DeFronzo, 2009).

No músculo esquelético a insulina estimula o transporte de glucose e o seu armazenamento como glicogénio, bem como a glicólise e a actividade do ciclo dos ácidos tricarbóxicos. Ao nível hepático, a insulina inibe a glicogenólise e a gluconeogénese, aumentando a formação de glicogénio. Nos adipócitos, a insulina promove a captação de glucose, a síntese de glicerol e a formação de triacilgliceróis, desempenhando ainda um papel anti-lipolítico (Alsahli & Gerich, 2010;DeFronzo, 2009).

Durante períodos de jejum, a insulina circulante afecta a secreção de outras hormonas, como a glucagina, o que favorece o catabolismo dos nutrientes armazenados, permitindo manter disponíveis substratos metabólicos para as funções vitais celulares. A alteração dos níveis de insulina entre os períodos pós-prandial e de jejum desempenha um papel fundamental na regulação do metabolismo, permitindo manter os níveis de glucose num estreito intervalo fisiológico (Alsahli & Gerich, 2010;DeFronzo, 2009).

A insulina diminui ainda o catabolismo proteico e estimula a tradução, tendo também um papel potenciador do crescimento celular, da diferenciação e da sobrevivência como consequência dos processos mitogénicos e anti-apoptóticos. A acção da insulina não se resume assim à regulação do fluxo de substratos, mas desempenha também tarefas de coordenação da função de múltiplos órgãos e da adaptação dos organismos ao ambiente nutricional (Alsahli & Gerich, 2010;DeFronzo, 2009).



A intolerância à glucose surge quando estes mecanismos se desarticulam e, seja no jejum, seja após a ingestão de alimentos (pós prandial), a concentração de glucose no sangue aumenta para níveis não fisiológicos. Quando a insulina não consegue exercer as suas acções ao nível dos tecidos periféricos, falamos em insulino-resistência. A insulino-resistência pode ter origem hereditária, de causa multigénica, mas pode também ser desenvolvida por acção de factores ambientais, sendo o mais relevante a obesidade (DeFronzo, 2009;Yki-Jarvinen, 2010).

O músculo-esquelético é o primeiro local de utilização da glucose no estado insulino-estimulado. A resistência à acção da insulina neste tecido é um factor patogénico relevante para a DT2, contribuindo ainda para a morbidade da obesidade. A acção da insulina implica uma série de cascatas de sinal, iniciadas pela ligação da insulina ao seu receptor, conduzindo à autofosforilação do receptor e activação do receptor tirosina cinase, o que resulta na fosforilação dos substratos do receptor da insulina. A fosforilação desta leva à activação do fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K) e, subsequentemente, à activação de Akt e do seu mediador a jusante, a AS160, todos estes passos importantes para a translocação do GLUT-4 para a membrana e consequente estimulação do transporte de glucose induzido por insulina (Choi & Kim, 2010). Apesar do mecanismo de resistência do tecido muscular esquelético não ser ainda bem conhecido, parece resultar, pelo menos em parte, de uma incorrecta activação da PI3K dependente de insulina e concomitantemente, da sinalização a jusante. Alterações no estilo de vida que levem a perda de peso ou a utilização de agentes farmacológicos sensibilizadores da acção da insulina, como as tiazolidinedionas (TZDs), podem controlar alguns dos problemas resultantes da insulino-resistência (Choi & Kim, 2010).

A insulino-resistência por si só não implica o aparecimento de diabetes. Desde que as células  $\beta$ -pancreáticas consigam aumentar a sua produção de insulina, de forma a que as deficiências na acção desta última sejam compensadas, a tolerância à glucose manter-se-á normal. Trata-se, contudo, de um factor de *stress* a que as células  $\beta$  estão sujeitas, e que poderá traduzir-se na progressiva perda de função da célula- $\beta$ . Os níveis de glicemia terão então tendência a aumentar, inicialmente os pós-prandiais e progressivamente também a glicemia do jejum, desencadeando o desenvolvimento da DT2 (DeFronzo, 2009;Yki-Jarvinen, 2010).

Não são conhecidos os mecanismos através dos quais as disfunções da célula  $\beta$ -pancreática se associam à insulino-resistência. Uma hipótese que tem sido apontada pela literatura é que ambas as situações possam ser geradas pela mesma causa: a deposição de gordura em excesso (acil-CoAs de cadeia longa, diacilglicerol e ceramidas) no fígado e músculo

(causas conhecidas da lipotoxicidade geradora da insulino-resistência), mas também na célula  $\beta$ -pancreática, sendo a lipotoxicidade um factor na disfunção destas células. Uma outra hipótese tem sido formulada e implica o polipeptídeo amilóide do ilhéu, que é segregado na razão 1:1 com a insulina. Numa situação em que, para ser ultrapassada a insulino-resistência ocorre uma hipersecreção de insulina, este péptido é igualmente hipersecretado levando à formação de depósitos amilóides que têm sido implicados na falha progressiva da célula  $\beta$ -pancreática e na etiologia da DT2. Em roedores existem evidências experimentais que suportam esta segunda hipótese, mas ainda não em humanos. Há ainda a considerar uma terceira hipótese, que consiste na toxicidade induzida pela própria glucose, quando surge hiperglicemia crónica, uma vez que se tem observado que as células  $\beta$ -pancreáticas ficam dessensibilizadas, deixando de responder ao estímulo (DeFronzo, 2009; Yki-Jarvinen, 2010).

A evolução progressiva da DT2 conduz a uma redução acentuada na secreção de insulina em resposta ao estímulo e também a alterações significativas do perfil dinâmico de secreção e do padrão pulsátil da mesma (Pratley & Weyer, 2001). Está ainda associado à DT2 uma redução da massa de células- $\beta$  pancreáticas, como resultado de um aumento da apoptose destas, sendo contudo ainda incerto em que fase do desenvolvimento da doença é que essa perda de massa ocorre e quais são as suas implicações na redução da capacidade secretora observada em pacientes da doença (Sundsten & Ortsater, 2009).

O papel da célula  $\alpha$  na fisiopatologia da DT2 tem sido objecto de estudo nos últimos anos. A DT2 tem também associada uma alteração dos níveis de glucagina, a hormona segregada pelas células  $\alpha$ -pancreáticas, sendo que os pacientes de DT2 apresentam níveis de glucagina excessivos para a sua glicemia (Henquin & Rahier, 2011). Esta hiperglucaginemia agrava as consequências da libertação inadequada de insulina, uma vez que activa a produção de glucose hepática, favorecendo, desta forma, a hiperglicemia. Tem sido sugerido na literatura que as alterações ao nível da massa de célula- $\alpha$  possam contribuir para a desregulação da secreção de glucagina observada da DT2. Um trabalho recente com um elevado número de indivíduos observados (autópsias a pâncreas de 50 pacientes de DT2 e de 52 indivíduos não diabéticos) revela que a razão entre a massa de célula- $\alpha$  e célula- $\beta$  está aumentada nos pacientes de DT2 em cerca de 1,7x relativamente aos indivíduos controlo (Henquin & Rahier, 2011). Este estudo põe em evidência a necessidade de valorizar as disfunções da célula  $\alpha$ -pancreática na fisiopatologia da DT2

Outros órgãos têm também sido implicados na fisiopatologia da DT2. É o caso do trato gastrointestinal, uma vez que as hormonas segregadas após uma refeição, nomeadamente as

incretinas, afectam a secreção de insulina e de glucagona. A ingestão de glucose desencadeia um nível de secreção de insulina muito superior ao que se regista aquando da administração de glucose por via intravenosa, que se pensa estar relacionada com a potenciação da secreção induzida pelas incretinas segregadas pelo tracto gastrointestinal, nomeadamente o peptídeo semelhante à glucagona-1 (GLP-1) e o polipeptídeo insulínico dependente da glucose, também designado de peptídeo inibitório gástrico, (GIP). Os pacientes de DT2 apresentam níveis diminuídos de GLP-1 e resistência à acção do GIP. A deficiência em GLP-1 é observada em indivíduos intolerantes e agrava-se com a progressão da DT2 (DeFronzo, 2009).

São, assim, de diferentes naturezas as perturbações subjacentes ao desencadeamento da DT2, estando implicados diferentes órgãos e tecidos.

### 1.3.2 O diagnóstico da diabetes

O diagnóstico da diabetes tem sido feito há décadas com base na medição da glicemia plasmática, tanto no jejum como em testes de tolerância oral à glucose. Um indivíduo é considerado diabético se apresentar glicemia em jejum  $\geq 126$  mg/dL ou se apresentar, após 2h da administração de um *bolus* de 75g de glucose, uma glicemia  $\geq 200$ mg/dL ou ainda se, numa medição aleatória da glicemia, o valor for  $\geq 200$  mg/dL. Um outro teste tem sido utilizado no diagnóstico da glicemia, a percentagem de hemoglobina glicosilada (HbA<sub>1c</sub>), cujo aumento tem vindo a ser associado a um estado de hiperglicemia continuado. Este teste indica menos de um terço dos casos diagnosticados com a glicemia do jejum, tendo contudo a vantagem de ser de mais fácil aplicabilidade em situações de rastreio, por não exigir o jejum. O indivíduo é considerado diabético se apresentar uma percentagem de HbA<sub>1c</sub>  $\geq 6,5\%$ . O diagnóstico, quer seja feito por quantificação de glicemia ou da hemoglobina glicosilada, tem que ser confirmado por uma segunda análise da prova alterada (American Diabetes Association, 2010).

Em 1997 e 2003 a organização *The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus* identificou um grupo intermediário de indivíduos cujos níveis de glucose no sangue, embora não correspondessem aos critérios para o reconhecimento como diabéticos, se apresentavam demasiado elevados para serem

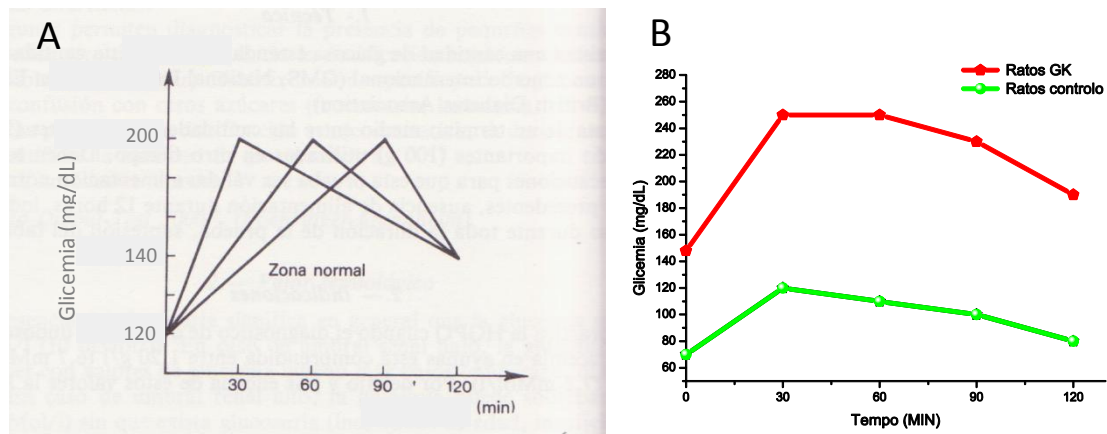
considerados normoglicémicos. Este grupo, conhecido como pré-diabético, caracteriza-se por apresentar glicemia no jejum entre 100 e 125 mg/dL ou, no teste de tolerância à glucose oral apresentar, 2h após a administração de um *bolus* de 75g de glucose, glicemia entre 140 e 199 mg/dL. Qualquer uma destas provas alteradas corresponde a um elevado factor de risco para o desenvolvimento futuro da diabetes. Como a medição da concentração de hemoglobina glicosilada (HbA<sub>1c</sub>) tem sido utilizada de forma crescente no diagnóstico de diabetes em indivíduos que apresentam factores de risco, definiu-se também o intervalo entre 5.7-6.4% para a HbA<sub>1c</sub> como factor de risco para a diabetes, a que a designação pré-diabético se aplica (American Diabetes Association, 2010).

### 1.3.3 Modelos animais da doença

Os estudos da diabetes em pacientes humanos, particularmente os de fisiopatologia, são difíceis por natureza e baseiam-se sobretudo no estudo de tecidos de biopsia ou em pós-morte, nos quais é difícil ter uma percepção das alterações graduais que vão ocorrendo nos tecidos, particularmente ao nível do tecido pancreático e da célula  $\beta$ . Na área da diabetes têm-se procurado modelos alternativos em que a fisiopatologia da doença possa ser estudada.

Tratando-se a DT2 de uma desordem metabólica complexa, na qual interagem factores genéticos e ambientais, de natureza evolutiva e com múltiplas condições clínicas, é impossível reunir num só modelo animal todas as suas características. Por este motivo, têm sido desenvolvidos e estudados diferentes modelos animais para responder à multiplicidade de situações fisiopatológicas existentes. As espécies mais utilizadas são de roedores, embora possam também ser utilizados felinos, suínos e primatas (Chatzigeorgiou *et al*, 2009).

Uma das vantagens da utilização de ratos em estudos da diabetes reside no facto destes apresentarem uma prova de tolerância à glucose por via oral (PTGO) muito semelhante à humana, quer em termos do seu perfil, quer em termos dos valores absolutos (ver Figura 12).



**FIGURA 12 – Provas de tolerância à glucose por via oral em humanos e em ratos**

No painel **A**, mostram-se os limites de normalidade das PTGO em humanos; (adaptado de Perlemuter & Collin de L'Hortet, 1989). No painel **B**, apresentam-se PTGO de ratos Wistar (controlo) e GK (diabéticos); (Adaptado de Seïça *et al*, 2003).

Há ainda a considerar os modelos de DT2 induzida, que incluem a diabetes induzida pela dieta e a induzida quimicamente ou cirurgicamente. O modelo animal da diabetes induzida pela dieta mais utilizado é o rato do deserto Israelita (*Psammomys obesus*), pois torna-se obeso por acção da mudança na sua dieta natural, de vegetariana para ração normal de laboratório, mais calórica. O rato desenvolve então hiperfagia, obesidade, hiperinsulinemia, intolerância à glucose, aumento da produção de glucose hepática e hiperglicemia e, posteriormente, perda de massa da célula  $\beta$ -pancreática. É, pelas suas características, um modelo muito útil para o estudo de interacções entre a obesidade e a diabetes (Chatzigeorgiou *et al*, 2009).

Algumas das características da DT2 podem ainda ser mimetizadas em modelos da diabetes quimicamente induzida, nomeadamente por estreptozotocina ou por aloxano. Embora maioritariamente utilizados para a obtenção de modelos da DT1, estes compostos podem ainda ser utilizados para a obtenção de modelos da DT2, quando administrados em fases distintas do desenvolvimento, em dosagens menores ou em combinação com outros fármacos. O desenvolvimento de diabetes nestes animais é sempre acompanhado por decréscimo da massa de célula- $\beta$  e, conseqüentemente, de secreção de insulina. Um resultado semelhante pode também ser conseguido pela remoção cirúrgica parcial do pâncreas (até 90%) (Chatzigeorgiou *et al*, 2009).

Na Tabela 2 identificamos e sumarizamos as principais características dos modelos animais da DT2, espontâneos ou derivados geneticamente, mais utilizados.

A fim de seleccionar determinadas características da doença têm sido ainda desenvolvidos modelos que combinam modelos espontâneos ou derivados geneticamente, com indução química, como é o caso da administração de estreptozotocina a animais com insulino-resistência genética como os ZFR, resultando num modelo animal que apresenta hiperglicemia na presença de insulinemia plasmática normal, o que constitui um modelo mais apropriado ao estudo da DT2 que qualquer um dos modelos isoladamente (Chatzigeorgiou *et al*, 2009).

TABELA 2 - Modelos animais da DT2, espontâneos ou derivados geneticamente

Modelo	Descrição		Características	
Obesos	Causa monogênica (MG)	<b>Ratinho ob/ob</b>	Mutação no gene da leptina	Hiperglicemia ligeira; Hiperinsulinemia (3-4 semanas); Hiperfagia, obesidade e insulino-resistência.
		<b>Ratinho db/db</b>	Mutação no gene do receptor da leptina	Hiperfagia e obesidade (~4 semanas); Hiperinsulinemia e insulino-resistência (~2-semanas); Hiperglicemia (4-8 semanas); Não sobrevivem para além dos 8-10 meses.
		<b>Rato Zucker fa/fa</b>		Características semelhantes aos ratinhos db/db; Apresentam adicionalmente hiperlipidemia e hipertensão.
	Causa poligênica (PG)	<b>Ratinho Kuo Kondo (KK)</b>	<i>Inbred</i> para grande tamanho corporal	Hiperfagia, hiperinsulinemia e insulino-resistência; Glicemias moderadas; Tornam-se gradualmente obesos entre os 2 e os 4-5 meses;
		<b>Ratinho New Zealand Obese (NZO)</b>		Ganham drasticamente peso nos primeiros 2 meses de vida; A frequência do surgimento de diabetes varia entre subestirpes; Adquirem resistência hepática à insulina muito cedo; Desenvolvem hiperleptinemia e simultaneamente leptino-resistência; Características iniciais semelhantes ao ratinho KK, mas que se agravam enormemente, apresentando glicemias de 300-400 mg/dL entre 20-24 semanas.
		<b>Rato Otsuka Long Evans Tokushima Fatty (OLETF)</b>		Moderadamente obesos; Os machos desenvolvem diabetes a partir de 18-25 semanas; Hiperfagia, hiperinsulinemia, hiperlipidemia e hiperglicemia que se agrava com a idade.
		<b>Ratinho NSY</b>		Moderadamente obesos, com acumulação visceral de gordura; Desenvolvimento de diabetes preferencialmente em machos; Secreção de insulina alterada a partir das 24 semanas; Insulino-resistência moderada.
Não obesos	PG	<b>Rato Goto-Kakizaki (GK)</b>	<i>Inbreeding</i> de ratos Wistar com intolerância ligeira à glucose durante muitas gerações	Insulino-resistência; Normolipidemia; Secreção de insulina insuficiente; Animais adultos têm 60% de decréscimo de massa de célula- $\beta$ ; Glucose elevada só a partir de 3-4 semanas; Hiperlicemia no jejum ligeira e estável.
	MG	<b>Ratinho não obeso mutante C57BL/6 (Akita)</b>	Mutação no gene INS2 (homólogo em ratinho do gene da pre-pro-insulina);	Polidipsia, poliúria, hipo-insulinemia progressiva e finalmente hiperglicemia (3-4 semanas); Redução gradual na massa de célula $\beta$ .

Finalmente, há ainda que considerar a hipótese da produção de modelos transgênicos, desenvolvidos com a finalidade de estudar genes que possam contribuir para a patogênese e o desenvolvimento da DT2. Alguns dos genes alvo têm sido, por exemplo, os que codificam proteínas como as que se pensa serem reponsáveis pela insulino-resistência, de que são exemplo o IRS-1, o IRS-2 e o GLUT-4, ou proteínas do metabolismo de lípidos e da glucose, como os PPARs, ou ainda com proteínas com papel relevante na secreção de insulina, como o GLUT-2, a glucocinase ou o K(ATP) (Chatzigeorgiou *et al*, 2009).

Já são conhecidas muitas das disfunções características da DT2, mas pouco tem sido elucidado do processo de desenvolvimento da mesma. O conhecimento dos mecanismos subjacentes ao desenvolvimento da doença podem contribuir para o desenvolvimento de estratégias de prevenção na mesma e para a eventual descoberta de novos alvos terapêuticos. A dificuldade em estudar o desenvolvimento da DT2 advém, em parte, da inexistência de modelos animais pré-diabéticos. Actualmente tem-se recorrido à utilização de alguns dos animais referidos na Tabela 2, escolhendo criteriosamente a sua idade, de forma a que a DT2 ainda não esteja instalada, mas que já apresentem características do estado pré-diabético. Neste sentido, têm sido utilizados, por exemplo, ratos OLETFs com idade inferior a 15 semanas ou ratos GK com idades inferiores a 4 semanas. As grandes desvantagens destas opções são o facto de que se dispõe de um tempo útil de estudo curto, relativamente ao tempo de vida do animal, e, particularmente no que diz respeito aos GK, a imaturidade dos animais, podendo alguns sistemas fisiológicos não corresponder aos existentes no animal adulto.

Na experimentação que deu lugar a esta tese foi usado um modelo animal de pré-diabetes obtido por cruzamentos dirigidos entre ratos Wistar que apresentavam espontaneamente intolerância à glucose. Este modelo foi escolhido porque permite o estudo e avaliação de alterações/disfunções a nível celular e molecular, características do estado pré-diabético, que podem contribuir para o desenvolvimento da patologia.



## 2 PROBLEMÁTICA E OBJECTIVOS

A DT2 é uma desordem metabólica, multifactorial na sua origem, caracterizada por um desequilíbrio na homeostasia da glucose, contribuindo para o seu desenvolvimento tanto factores genéticos como ambientais. É o resultado de uma progressiva degradação da função da célula  $\beta$ -pancreática, do decréscimo da sua massa ou de ambas as situações, das quais resulta uma inadequada secreção de insulina (Clark, 2010;Seino & Bell, 2008).

Têm sido dispendidos, ao longo dos anos, enormes esforços, monetários e humanos, no sentido de melhor conhecer a fisiopatologia da DT2, no tratamento e prevenção da doença, a encontrar novos alvos terapêuticos e a criar condições para melhorar a qualidade de vida dos pacientes. É neste âmbito que o estudo da fisiologia da célula- $\beta$  pancreática ganha relevância, constituindo um campo de estudo vasto e actual.

A Na,K-ATPase é o sistema de transporte activo responsável por manter o gradiente transmembranar de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , desempenhando esse papel na grande maioria das células eucariotas (Skou, 1967). Conhecem-se actualmente diversos níveis de regulação endógenos da actividade da bomba que permitem ajustar a sua função às necessidades particulares de determinados tecidos ou tipos celulares. Essa regulação pode ser conseguida por meio de uma expressão isoenzimática diferencial, por modificações covalentes, como fosforilações, que podem ser desencadeadas nos processos de transdução de sinal de diversas hormonas, pelo próprio ambiente lipídico em que se inserem, pela acção dos compostos cardiotónicos endógenos, bem como pela disponibilidade de substratos (Blanco & Mercer, 1998).

O papel da Na,K-ATPase, bem como o de outras bombas, em célula- $\beta$ , foi extensivamente estudado na década de 1970, quando se davam os primeiros passos no esclarecimento dos eventos iónicos subjacentes ao acoplamento estímulo-secreção, sendo a Na,K-ATPase considerada como um provável elemento chave na compreensão desses fenómenos. Ficou claro, a partir desses estudos, que o funcionamento da bomba em célula- $\beta$  era electrogénico, tal como nos outros tipos celulares, que contribuía para o potencial do repouso e que a sua inibição farmacológica com ouabaína resultava na despolarização do potencial de membrana (Henquin & Meissner, 1982).

Com o advento das técnicas electrofisiológicas demonstrou-se que a despolarização da célula- $\beta$  era desencadeada por uma redução da permeabilidade ao  $\text{K}^+$ , o que levou à

descoberta do K(ATP), central na interpretação actualmente mais aceite da sequência de eventos iónicos que desencadeiam e subjazem à secreção de insulina (Aizawa *et al.*, 1994; Rorsman & Renstrom, 2003). A descoberta deste canal levou a uma desvalorização do papel da Na,K-ATPase na fisiologia das células  $\beta$ -pancreáticas, tendo os estudos da actividade e da regulação metabólica desta e doutras bombas iónicas perdido relevância científica relativamente ao estudo dos canais, facto tornado evidente pela escassez de publicações que incidiram sobre elas nas duas décadas seguintes. Contudo, com a constatação de que o canal K(ATP) não explica todo o fenómeno de actividade eléctrica em célula  $\beta$ -pancreática, ressurgiu o interesse no estudo destes sistemas de transporte e da sua regulação.

Na célula  $\beta$ -pancreática, a função da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase consiste essencialmente na manutenção dos gradientes Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, contribuindo desta forma para o potencial de repouso. Estima-se que o transporte activo exercido pela bomba seja responsável pelo consumo de 75-80% do ATP produzido (Malaisse, 1996). Tendo em conta o enorme gasto de ATP de que a bomba necessita para exercer a sua acção, levantou-se a hipótese de que alterações na sua actividade pudessem afectar a concentração de ATP disponível e, desta forma, interferir na secreção de insulina. Porém, pouco se sabe sobre a relevância fisiológica deste mecanismo. Existem alguns estudos que, por mostrarem que a actividade da Na,K-ATPase parece ser regulada pela glucose, apoiam esta hipótese. Owada *et al.*, em 1999, apresentaram um trabalho no qual observaram inibição da actividade da bomba quando os ilhéus ou células  $\beta$ -pancreáticas, permeabilizadas por choque térmico, foram estimulados com 15 mM de glucose (Owada *et al.*, 1999). Elmi *et al.* apresentaram resultados aparentemente contraditórios, nos quais foi observado um aumento da actividade da Na,K-ATPase aquando do aumento da concentração de glucose de 0 para 5 mM (Elmi *et al.*, 2000b), uma gama de concentração distinta da utilizada por Owada *et al.* (1999). Assim, à luz destes resultados, não é claro se a glucose promove um efeito activador ou inibitório sobre a Na,K-ATPase.

Os resultados experimentais do trabalho de Owada *et al.* mostraram também que a inibição da actividade da bomba por glucose depende da sua metabolização, apontando ainda, como provável mecanismo para a inibição observada, a fosforilação da subunidade  $\alpha$  num mecanismo dependente da PKC (Owada *et al.*, 1999), provavelmente resultante da fosforilação do resíduo ser-23 dependente desta cinase (Chibalin *et al.*, 1998; Dada *et al.*, 2003; Defronzo, 2009; Feschenko & Sweadner, 1997; Logvinenko *et al.*, 1996). No entanto, o efeito da fosforilação deste resíduo pela PKC na actividade da Na,K-ATPase não é consensualmente descrito na literatura, tendo sido referido que este constitui um sinal para a remoção das unidades da bomba da membrana para os compartimentos intracelulares por endocitose

(Chibalin *et al*, 1998; Dada *et al*, 2003). Também se lhe apontam alterações directas no comportamento cinético da bomba, havendo estudos que descrevem um decréscimo da afinidade para o  $K^+$  após fosforilação (Logvinenko *et al*, 1996), resultando numa diminuição da actividade da mesma, e outros ainda que sugerem que o facto de a bomba ser fosforilada no mesmo resíduo não tem implicações cinéticas no seu funcionamento (Feschenko & Sweadner, 1995).

A PKC parece também poder ser activada por glucose (Williams & Schrier, 1993; Lee *et al*, 1989; Warwar *et al*, 2006), sendo desconhecido o mecanismo subjacente. A mediar a sua activação por glucose poderá estar a AMPK. Esta última cinase tem sido descrita como um sensor metabólico, respondendo a variações subtis da razão AMP:ATP. É activada em situação de depleção energética por ligação de AMP e fosforilação por uma cinase a montante na cascata, a AMPKK. A sua activação leva à regulação negativa de diversas vias consumidoras de energia e à regulação positiva de vias geradoras de energia (Russell, III *et al*, 1999).

Há sugestões na literatura que apontam a AMPK como possível reguladora da Na,K-ATPase, nomeadamente por promoção de endocitose de unidades da bomba num processo mediado pela AMPK e pela PKC, em células epiteliais alveolares, estando a activação da PKC a jusante da activação da AMPK (Vadasz *et al*, 2008). Para além disso, em célula  $\beta$ -pancreática, a AMPK foi apontada como sistema candidato a participar na regulação da actividade secretora (Rutter *et al*, 2003), uma vez que nestas células, em resposta ao estímulo de glucose, ocorrem variações significativas dos níveis intracelulares de ATP e, conseqüentemente, de AMP (Detimary *et al*, 1996b).

No entanto, quer a regulação da bomba por glucose, quer os processos envolvidos na regulação da Na,K-ATPase na célula- $\beta$  e a sua possível contribuição para a regulação fisiológica da secreção de insulina, permanecem essencialmente desconhecidos.

Por outro lado, têm sido descritas alterações significativas da secreção de insulina induzida pela glucose em indivíduos diabéticos (Pratley & Weyer, 2001; Seïça *et al*, 2004) e em modelos animais da DT2 (Pratley & Weyer, 2001; Seïça *et al*, 2004), pelo menos parcialmente resultantes de alterações significativas da actividade eléctrica induzida por glucose (Antunes *et al*, 2002; Antunes, 2004) e, conseqüentemente, na regulação da  $[Ca^{2+}]_i$  (Santos *et al*, 1997; Zaitsev *et al*, 1997). Contudo, os mecanismos subjacentes a estas alterações não foram ainda clarificados. Devido às propriedades electrogénicas da Na,K-ATPase (Henquin & Meissner, 1982), poder-se-á admitir que alterações da sua actividade possam contribuir para a

regulação do potencial de membrana e, conseqüentemente, da secreção de insulina (ver secção 1.2.5.2.4 da revisão bibliográfica).

Porém, a possibilidade da função da bomba se encontrar comprometida na DT2 nunca foi até ao momento abordada. Desta forma, ganha pertinência testar-se a hipótese de uma deficiente regulação da Na,K-ATPase poder contribuir para as diferenças observadas na resposta à estimulação com glucose em células  $\beta$ -pancreáticas em condições fisiológicas ou na DT2.

Assim, elegeu-se como objectivo principal deste trabalho o estudo da influência da glucose, enquanto principal estímulo metabólico da célula  $\beta$ -pancreática, na actividade enzimática da Na,K-ATPase e da avaliação do papel da bomba na cascata de eventos iónicos subjacentes à secreção de insulina em célula  $\beta$ -pancreática em ratos controlo e intolerantes à glucose (GIR). Para isso, propusemo-nos:

- a) Desenvolver um método que permitisse avaliar o efeito da glucose na actividade enzimática da Na,K-ATPase em célula  $\beta$ -pancreática, mantendo intactas as estruturas de transdução de sinal celulares, método este que será apresentado na secção 3.1.
- b) Estudar o efeito da glucose na actividade enzimática da Na,K-ATPase de célula  $\beta$ -pancreática. Para este fim, optou-se por utilizar, como modelo da pré-diabetes, uma estirpe de ratos intolerantes à glucose (GIR), desenvolvida no laboratório. Na secção 3.2 apresentam-se os resultados da caracterização sumária dos ratos GIR. Para o estudo da acção da glucose na actividade enzimática da Na,K-ATPase em célula  $\beta$ -pancreática de ratos controlo e GIR utilizou-se o método referido no ponto anterior e os resultados também estão apresentados na secção 3.2.
- c) Estudar a expressão isoenzimática da Na,K-ATPase em tecido pancreático e células  $\beta$ -pancreáticas isoladas de ratos controlo e GIR. Utilizou-se a técnica de imunohistoquímica para realizar esta caracterização. Esta técnica permite fazer uma avaliação semi-quantitativa da expressão de proteínas e relacionar essa expressão com a sua localização a nível celular. Utilizaram-se, para este estudo, secções de tecido pancreático de ratos controlo e GIR, procurando-se fazer a análise da imunomarcagem das subunidades da Na,K-ATPase  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  e  $\beta_2$ . Foi ainda avaliada a morfologia do ilhéu de Langerhans, designadamente ao nível das células  $\alpha$ - e  $\beta$ -pancreáticas, tendo-se procurado caracterizar as áreas insulino-marcadas e glucagino-marcadas em

secções de tecido pancreático de ratos controlo e GIR, relacionando-as com as áreas positivas para as subunidades da Na,K-ATPase. Os resultados obtidos estão descritos na secção 3.3.

- d) Estudar o papel das cinases PKC e AMPK na regulação da actividade da Na,K-ATPase de células  $\beta$ -pancreáticas por glucose. Neste sentido, para o estudo do papel da AMPK na regulação da actividade da Na,K-ATPase pela glucose, utilizaram-se moduladores farmacológicos desta cinase e a actividade enzimática foi determinada utilizando o método referido em a). Para o estudo do papel da PKC, optou-se por desenvolver uma metodologia de *Western Blot* utilizando um anticorpo específico para a fosforilação da subunidade  $\alpha_1$  da Na,K-ATPase na posição Ser-23, fosforilação atribuída à PKC. Procurou-se ainda relacionar o estudo da imunomarcação dessa proteína especificamente fosforilada no resíduo Ser-23 com a acção de moduladores farmacológicos da AMPK. Na secção 3.4 apresentam-se os resultados obtidos.



### 3 PARTE EXPERIMENTAL

Neste capítulo serão apresentados o delineamento e os resultados do trabalho experimental, bem como a sua discussão. Optou-se por organizar a componente experimental do trabalho em subcapítulos independentes em termos dos objetivos, da metodologia, dos resultados obtidos e da sua discussão, por se ter considerado que cada subcapítulo contém uma mensagem que pode ser transmitida autonomamente, sem perder de vista a coerência global do trabalho em que se integram.





### 3.1 DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE ENZIMÁTICA DA Na,K-ATPASE EM CÉLULAS $\beta$ -PANCREÁTICAS EM CULTURA PRIMÁRIAS

#### 3.1.1 Introdução

A Na,K-ATPase é o principal sistema que contribui para manter o equilíbrio de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  através da membrana plasmática. Para efectuar o transporte destes iões contra os seus gradientes de concentração, a Na,K-ATPase consome 75-80% do ATP produzido. Assim, alguns autores têm vindo a sugerir que a Na,K-ATPase poderá ter um papel relevante na secreção de insulina. Contudo, a maioria dos estudos foram efectuados ou em células permeabilizadas ou em homogeneizados de células ou de ilhéus, nos quais se perdem as vias de sinalização intracelulares, e recorrendo a metodologias muito diversificadas, tendo originado resultados contraditórios (ver secção 1.2.5.2.4 da revisão bibliográfica). Tomados em conjunto, estes dados evidenciam a necessidade de o estudo ser realizado mantendo intactas as vias de metabolização da mesma, em particular durante as incubações com este nutriente. Portanto, o desenvolvimento de métodos que permitam estudar a actividade da Na,K-ATPase em células intactas e onde se mantêm as vias metabólicas e de sinalização activas são da maior relevância para o estudo da regulação desta bomba por glucose e do papel que esta poderá desempenhar na fisiologia da célula  $\beta$ -pancreática (Trabalho já publicado em (Costa *et al*, 2010)).

#### 3.1.2 Objectivos

O objectivo deste trabalho foi desenvolver um método que permitisse a quantificação da actividade da Na,K-ATPase em células  $\beta$ -pancreáticas intactas, sendo mantidas as vias de transdução de sinal, possibilitando assim investigar a hipótese da regulação da Na,K-ATPase

por glucose e o seu possível papel na modulação da secreção de insulina. Para tal, foi necessário:

- i) Proceder à optimização das condições da cultura de células e avaliar o número ideal de células para proceder ao ensaio enzimático;
- ii) Determinar as condições ideais para a realização do ensaio enzimático, designadamente o melhor tempo de reacção, a concentração óptima de ouabaína para conseguir a inibição da bomba em célula  $\beta$ -pancreática e a determinação dos parâmetros cinéticos aparentes para o ATP;
- iii) Avaliar a viabilidade das células, antes e depois do ensaio enzimático, utilizando o método de exclusão do corante azul de tripano;
- iv) Caracterizar a actividade enzimática da Na,K-ATPase, nas condições do ensaio implementadas;
- v) Avaliar a função da célula  $\beta$ -pancreática, durante a realização do ensaio enzimático, recorrendo à quantificação da insulina segregada por meio de uma técnica de ELISA competitivo;

### 3.1.3 Metodologias

Descreveremos no presente subcapítulo o método detalhado para a determinação da actividade enzimática da Na,K-ATPase em células  $\beta$ -pancreáticas mantidas em cultura, pelo método desenvolvido no Laboratório e já publicado (Costa *et al*, 2010). As fases principais são: o isolamento de ilhéus de Langerhans a partir de pâncreas de rato; a dispersão desses ilhéus em células; a cultura das células em micro-placas e o ensaio enzimático propriamente dito. Descrever-se-ão também as metodologias utilizadas para a análise da viabilidade celular, para a determinação da concentração proteica, que permitirá o cálculo de actividades específicas, e para a quantificação da insulina segregada. Nesta secção descreveremos o método já optimizado, apresentando como resultados experimentais os estudos de optimização realizados.

### 3.1.3.1 REAGENTES

Todos os sais utilizados na preparação das soluções possuíam pureza analítica e eram provenientes da Sigma-Aldrich (USA), bem como a albumina sérica bovina (BSA; fracção V, isenta de proteases), o meio de cultura RPMI 1640, o soro (Soro Bovino Fetal), os antibióticos (penicilina e estreptomicina) e a glucose. A liberase RI foi fornecida pela Roche (Alemanha). A referência aos reagentes utilizados especificamente no imuno-ensaio para quantificação de insulina será feita na secção 3.1.3.9.

O material utilizado na cultura de células, tais como micro-placas para cultura, caixas de Petri, pipetas e unidades de filtração descartáveis, foram adquiridos à firma Sarstedt (Alemanha).

### 3.1.3.2 MODELO ANIMAL

Neste estudo foi utilizado o rato Wistar para obtenção do material biológico. Foram utilizadas fêmeas com 12-14 semanas, do biotério do Departamento de Química da Universidade de Évora. Os animais foram mantidos num regime de foto-período normal, com água e alimentação *ad libitum* (Ração SAFE OA), de acordo com as indicações da Portaria nº 1005/92 de 23 de Outubro, tendo-se ainda em conta as indicações da Directiva 2010/63/UE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 22 de Setembro de 2010.

### 3.1.3.3 ISOLAMENTO DE ILHÉUS DE LANGERHANS

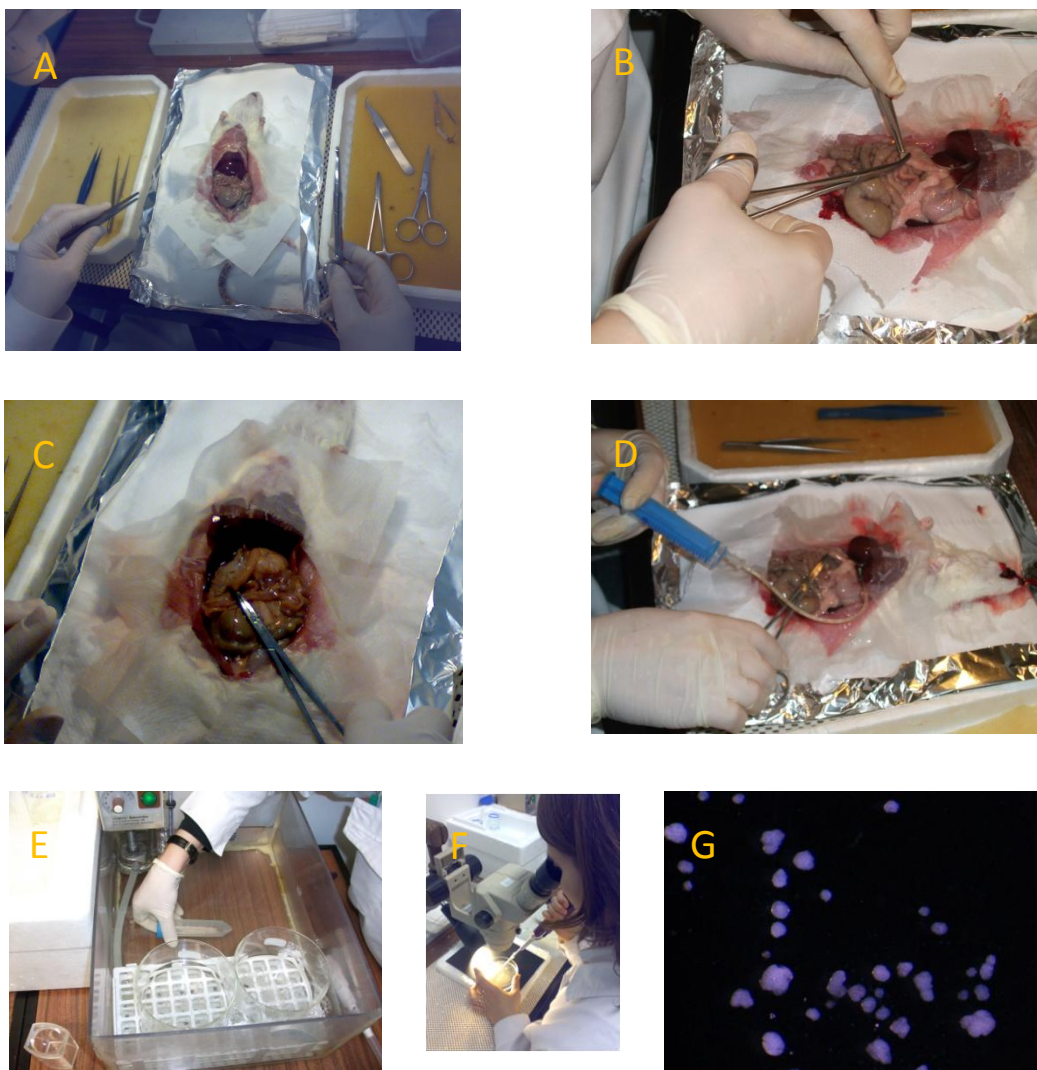
Procedeu-se ao isolamento dos ilhéus com base no método optimizado por Antunes (2004) que consiste no enchimento do pâncreas com uma solução enzimática que permite a digestão do tecido exócrino a partir do interior do pâncreas (Antunes, 2004). A mistura enzimática, designada comercialmente como *liberase RI*<sup>4</sup>, consiste num conjunto de enzimas digestivos, nomeadamente colagenase e tripsina, que permitem, quando determinadas as

---

<sup>4</sup> No decorrer deste trabalho este produto foi descontinuado e substituído pela *Liberase TL-Research grade*, também da Roche, que se utiliza em concentração equivalente (0,25mg/mL).

condições óptimas da reacção, a degradação do tecido exócrino, mantendo intacto o tecido endócrino, que pode então ser isolado.

Após o sacrifício por deslocamento cervical, o animal foi pesado e lavado com água corrente, de modo a minimizar a contaminação do pâncreas com pêlos, sendo seguidamente colocado sobre uma plataforma (placa coberta com papel absorvente) em posição dorsal de forma a deixar o ventre exposto. Todas as operações conducentes à extracção do pâncreas foram executadas num curto período de tempo, entre 10 a 15 min, de forma a evitar que as células entrassem em hipóxia.



**FIGURA 13 - Isolamento de ilhéus de rato**

Sequência fotográfica de algumas das fases do isolamento de ilhéus de Langerhans. A – Exposição da cavidade abdominal; B – Distensão do colédoco; C – Fechamento do colédoco com “clamp” cirúrgico; D – Enchimento do pâncreas com solução de liberase fria; E - Reacção enzimática da liberase em tecido pancreático, em banho-maria a 37°C e sob agitação suave; F – colheita dos ilhéus manualmente com micro-pipeta; G – visualização dos ilhéus com lupa (original; ampliação 20x).

Com a ajuda de uma tesoura e de uma pinça fez-se uma incisão longitudinal na pele, desde o púbis até ao pescoço, puxando-a para os lados. Fez-se uma segunda incisão, desde o púbis até ao apêndice xifóide, cortando agora a parede abdominal (musculatura e peritoneu) (ver Figura 13- A).

Removeu-se, com um corte, a ponta do externo, permitindo assim o deslocamento do fígado para cima do tórax, expondo o colédoco (ver Figura 13.- B). Durante todo o processo de isolamento, o abdómen do animal foi sendo humedecido regularmente com solução de isolamento mantida entre 2-4°C, utilizando uma mistura de gelo e água (em mM: NaCl 115, KCl 5, NaHCO<sub>3</sub> 10, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2, CaCl<sub>2</sub> 2,56, MgCl<sub>2</sub> 1,1, HEPES 25, glucose 8,4; pH 7,4, após saturação com 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>), a fim de evitar a sua desidratação, permitindo o arrefecimento dos órgãos e mantendo a liberase inactiva durante a injeção da solução no pâncreas.

Em seguida, fechou-se a terminação do colédoco no duodeno com um *clamp* cirúrgico, de modo a impedir a saída da solução enzimática para o intestino (ver Figura 13.- C). Na outra extremidade do colédoco, imediatamente após a coalescência das ramificações hepáticas, colocou-se um fio de sutura de seda, com nó solto. Preparou-se então a solução de liberase RI (0,25 mg/mL em solução de isolamento fria).

Com uma tesoura oftalmológica (nº3, de pontas finas) fez-se cuidadosamente uma pequena incisão transversal parcial no colédoco, um pouco acima do fio de sutura previamente colocado (aproximadamente no ponto de coalescência das ramificações hepáticas). Introduziu-se rapidamente uma cânula de 22G, em ângulo recto, no orifício que ficou exposto, no sentido do duodeno, e apertou-se o nó feito anteriormente de forma a segurar firmemente a cânula no seu interior, dando-se um segundo nó (ver Figura 13 - D). A solução de liberase foi então injectada, lentamente (habitualmente um volume de 7-8 mL), devendo esta operação dar-se por concluída logo que o pâncreas se encontre totalmente distendido, mesmo que não se tenha injectado todo o conteúdo da seringa. Procedeu-se então à dissecação do pâncreas separando-o dos órgãos vizinhos (estômago, intestino e baço) e limpando-o do tecido adiposo envolvente.

Após a dissecação, o pâncreas foi lavado com a solução de isolamento, sendo colocado num tubo de *Falcon*, que se submergiu num banho termostaticado a 37°C (ver Figura 13 - E). A reacção enzimática é assim termicamente favorecida. O tubo foi agitado suavemente na posição horizontal de forma a evitar a fragmentação mecânica do pâncreas. A digestão teve uma duração de 8 a 12 minutos, utilizando-se o critério visual para decidir qual o momento

adequado para parar a reacção. Este foi identificado pela presença de pequenos fragmentos que se desprendem do pâncreas e pela turbidez da solução que começou a aparecer fora do pâncreas devido à desintegração das membranas. Neste momento, retirou-se imediatamente o tubo do banho, colocou-se em gelo e encheu-se com solução de isolamento suplementada com 2 % BSA e arrefecida (2-4°C), tendo como objectivo baixar a temperatura do meio de reacção e neutralizar, por diluição, o excesso de liberase, de forma a suprimir a actividade enzimática, para a qual contribui também a acção inibitória do BSA sobre a actividade enzimática, sendo assim evitada a digestão da cápsula de colagénio dos ilhéus, garantindo a integridade destes.

Agitou-se vigorosamente o tubo contendo o pâncreas, de modo a desintegrar o que restava deste, e colocou-se em repouso durante alguns minutos, para permitir a sedimentação do material biológico. Após esta sedimentação, o sobrenadante foi suavemente retirado utilizando uma pipeta de Pasteur. Ressuspendeu-se novamente o material pancreático na solução acima referida, agitou-se e repetiu-se o processo anterior mais uma vez. Após a última lavagem, o material pancreático homogeneizou-se muito suavemente no mesmo meio, desta vez à temperatura ambiente, por meio de passagens sucessivas pela ponta de uma pipeta descartável de 10 mL, de forma a não danificar os ilhéus. O material resultante dispersou-se por cinco caixas de Petri bacteriológicas, sendo em seguida observado à lupa (ver Figura 13 – F). Os ilhéus foram então recolhidos um a um a partir da suspensão resultante da digestão, utilizando uma micro-pipeta de 20 µL. Esta recolha decorreu à lupa, para permitir a observação dos ilhéus e a sua selecção, usando como critério as suas características morfológicas, designadamente, contornos bem definidos, opacidade e aspecto refringente (ver Figura 13 – G). Foram necessárias pelo menos quatro passagens para obter ilhéus limpos do tecido digerido.

#### 3.1.3.4 DISPERSÃO DOS ILHÉUS E CULTURA DE CÉLULAS $\beta$ -PANCREÁTICA

Procedeu-se à dispersão dos ilhéus em células com base no método descrito em Salgado *et al.* (Salgado *et al.*, 1996). Transportaram-se os ilhéus isolados para a sala de cultura de tecidos num micro-tubo à temperatura ambiente. No caso do presente trabalho, implicou mudança de instalações, uma vez que a primeira parte do trabalho decorreu no Laboratório de Toxicologia e Farmacologia do Colégio Luís António Verney, enquanto que a Sala de Cultura de Tecidos se situa no Colégio da Mitra.

Todos os procedimentos que se seguem foram desenvolvidos em câmara de fluxo laminar (Nuair). A dispersão dos ilhéus em células fez-se com recurso a uma solução sem  $\text{Ca}^{2+}$  que designámos de solução de dispersão (em mM: NaCl 112, KCl 4,7,  $\text{MgCl}_2$  1,2,  $\text{NaHCO}_3$  20,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1,2,  $\text{NaH}_2\text{SO}_4$  1,2, HEPES 1,6, EGTA 1, glucose 8,4; pH 7,4, após saturação com 95%  $\text{O}_2$ /5%  $\text{CO}_2$ ). Esta solução foi previamente esterilizada por filtração e à temperatura ambiente. Os ilhéus foram lavados com a solução de dispersão por três vezes, em ciclos de sedimentação e ressuspensão suave por inversão do tubo, utilizando para a sedimentação uma mini centrífuga de bancada (Sigma-Aldrich, *strip-fuge*, máx 6000 rpm). Na última ressuspensão, os ilhéus foram deixados na solução de dispersão durante cerca de 10 min e seguiu-se uma homogeneização mecânica com micro-pipeta P200. A ponta da micro-pipeta encostou-se no fundo do micro-tubo e a solução fez-se passar por ela com vigor, mas evitando a formação de bolhas. A dispersão considerou-se completa quando a suspensão adquiriu um aspecto turvo e homogéneo.

A suspensão de células obtida pelo processo descrito foi então centrifugada durante 5 min na mesma centrífuga. O sedimento foi transferido para um micro-tubo estéril e ressuspendido em meio de cultura RPMI-G8 estéril (RPMI 1640 sem glucose nem bicarbonato, 8,4 g/L, suplementado com glucose 8,4 mM,  $\text{NaHCO}_3$  25 mM, 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor e com antibióticos, estreptomicina 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e penicilina 100 U/mL, sendo o pH ajustado a 7,2<sup>5</sup>). Fizeram-se três lavagens do sedimento no meio de cultura e a última ressuspensão fez-se com um volume de meio de cerca de 600  $\mu\text{L}$  por cada 1000 ilhéus.

Procedeu-se então à contagem das células numa câmara de Neubauer na presença do corante Azul de Tripiano, de forma a avaliar a concentração e a viabilidade das células. O corante entra nas células quando a membrana destas não está íntegra, permitindo assim distinguir as células não viáveis por estas apresentarem uma forte coloração azul.

As células obtidas por este processo são maioritariamente  $\beta$ -pancreáticas, pois a sua percentagem nos ilhéus de rato é de cerca de 90% (Grapengiesser *et al*, 1993).

As células assim preparadas foram cultivadas em micro-placas de 96 poços de forma a estarem cerca de  $10^4$  células/poço. Para isso pipetou-se o volume necessário da suspensão de células (de acordo com a concentração determinada) e completou-se o volume de cada poço até 200  $\mu\text{L}$  com meio RPMI. As células em cultura foram mantidas a 37°C numa atmosfera com 95% de humidade e com 5% de  $\text{CO}_2$ , numa incubadora de  $\text{CO}_2$  (Shellab).

---

<sup>5</sup> Para preparação do meio de cultura, adiciona-se o RPMI, o bicarbonato e a glucose, acertando-se o pH a 7,2. Já na câmara de fluxo, este meio é esterilizado por filtração e são-lhe adicionados posteriormente o soro fetal e os antibióticos. O pH após incubação na incubadora de  $\text{CO}_2$  será 7,4.

Cerca de 24h após a cultura das células, procedeu-se a uma mudança de meio. Para isso, o meio anterior foi retirado por aspiração e foi aplicado meio novo (200  $\mu$ L). Este passo permite retirar células que não tenham ficado aderentes, em particular as não viáveis. As experiências foram desenvolvidas 48h após a cultura.

### 3.1.3.5 ENSAIO DE ACTIVIDADE ENZIMÁTICA DA Na,K-ATPASE

A actividade enzimática foi determinada directamente nas células aderentes. Teve por base o método desenvolvido por Taussky e Shorr de quantificação colorimétrica do fosfato inorgânico resultante da hidrólise de ATP por acção das ATPases (TAUSSKY & SHORR, 1953). De acordo com o método proposto por Taussky e Shorr, na presença de molibdato de amónio, o Pi libertado forma um complexo de fosfomolibdato que, após redução pela acção do sulfato de ferro (II), apresenta coloração azul.

O ensaio decorreu em dois passos paralelos. Um deles permitiu a avaliação da actividade das ATPases totais (isto é, de todas as ATPases que na presença de ATP e dos iões em solução estão activas) utilizando-se um meio de reacção com a seguinte constituição: (em mM) ATP 2, NaCl 100, KCl 5, MgCl<sub>2</sub> 10, EGTA 1 e Tris-HCl 50; pH 7,4. O ensaio realizado em paralelo com este permitiu obter a actividade enzimática de todas as ATPase activas com excepção da Na,K-ATPase que foi inibida, utilizando-se para isso ouabaína e um meio pobre em Na<sup>+</sup> e sem K<sup>+</sup>, sendo o meio constituído por: (em mM) ATP 2, ouabaína 1, NaCl 15, MgCl<sub>2</sub> 10, NMG<sup>6</sup> 90, EGTA 1 e Tris-HCl 50; pH 7,4. Para a osmolaridade desta solução ser equivalente à anterior utilizou-se NMG<sup>6</sup> em substituição dos iões Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>.

A actividade ATPásica foi determinada pela quantificação do fosfato inorgânico formado em 30 min de reacção a 37°C, calculando-se a diferença entre os resultados obtidos utilizando as condições experimentais anteriormente descritas, isto é, a diferença entre a actividade das ATPases totais e a actividade das ATPases resistentes à ouabaína.

O processo iniciou-se com a retirada da micro-placa com as células em cultura da incubadora de CO<sub>2</sub> e, na câmara de fluxo, fez-se uma lavagem às células com 100  $\mu$ L do meio reaccional respectivo (os poços com células destinadas a determinação da actividade ATPásica total com o meio para ATPases totais, e as células para ATPases-resistentes à ouabaína com o

---

<sup>6</sup> NMG – cloreto de *N*-metil-D-glucamina



meio respectivo). Em seguida, aplicaram-se 100  $\mu\text{L}$  de meio reaccional e as células foram incubadas durante 30 min na incubadora de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$ . Após este período, colocou-se a placa na câmara de fluxo e imediatamente retiraram-se 60  $\mu\text{L}$  do meio, transferido para uma nova placa, onde se adicionou um volume equivalente de TCA<sup>7</sup> 11,5%. Nessa mesma placa, preparou-se também uma curva de calibração para o fosfato inorgânico (com concentrações de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  compreendidas entre 5 e 320  $\mu\text{M}$ ). Adicionaram-se então 80  $\mu\text{L}$  de reagente sulfomolibdico (molibdato de amónio 1% e sulfato de ferro (II) 5% em ácido sulfúrico 1N) a cada poço e fez-se de imediato a leitura de absorvância a 630 nm, num leitor de micro-placas (Bio-rad).

### 3.1.3.6 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

No final do ensaio enzimático, procedeu-se à determinação da viabilidade celular, utilizando o método de exclusão do corante azul de tripano (ver Figura 14). A fim de avaliar a viabilidade celular em diferentes etapas do ensaio, foram preparados poços na placa correspondentes a essas etapas: células cujo meio de cultura não foi retirado (grupo testemunha); células cujos meios de cultura foram substituídos mas não foi realizado o ensaio enzimático (controlos); células sujeitas ao ensaio de actividade enzimática.



**FIGURA 14 - Fotomicrografia de células  $\beta$ -pancreáticas durante o teste de exclusão do azul de tripano**

Fotomicrografia de um pequeno aglomerado de células  $\beta$ -pancreáticas em cultura, num poço de micro-placa de 96 poços, após adição do corante azul de tripano. Visualização ao microscópio invertido. Pode observar-se que as células estão viáveis. (original, ampliação 400x).

O teste de exclusão do corante azul de tripano foi realizado directamente nos poços da micro-placa, onde se encontravam as células em cultura. Imediatamente antes de efectuar o teste, retirou-se todo o meio de cultura nos poços correspondentes aos grupos testemunha e controlo e efectuou-se uma lavagem com PBS<sup>8</sup>, enquanto que no grupo teste apenas se retirou o meio da reacção enzimática. Finalmente, adicionou-se o reagente azul de tripano e, 5 min

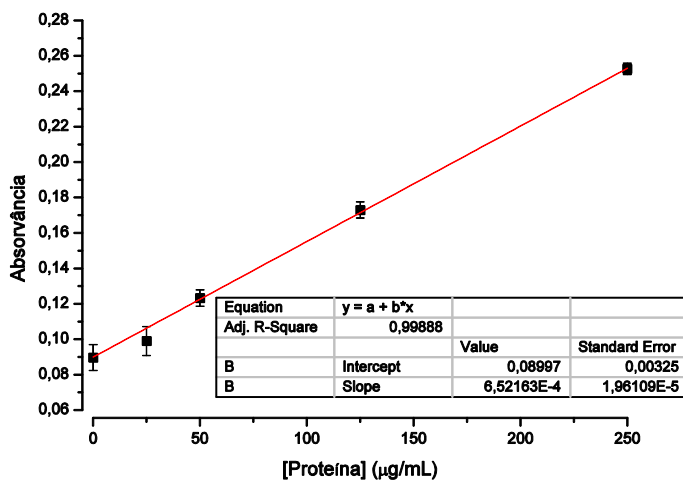
<sup>7</sup> TCA – ácido tricloroacético

<sup>8</sup> PBS – Tampão de fosfatos salino (em mM: NaCl 137, KCl 2,7,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  8,1,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,76; pH 7,4)

depois, observaram-se as células ao microscópio invertido (Olympus, modelo BX41) (ver Figura 14). Observaram-se vários campos (pelo menos cinco por poço) e contaram-se as células totais e as coradas de azuis, de forma a permitir o cálculo da percentagem de células viáveis:  $[(\text{n}^\circ \text{ células total} - \text{células coradas de azul}) / \text{n}^\circ \text{ células total}] * 100$ .

### 3.1.3.7 QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA

Para a determinação da concentração de proteína em cada poço utilizou-se o método do ácido bicinonínico (Kit BCA, Calbiochem, USA). O método tem por base a redução do  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$  na presença de proteínas, em solução alcalina. Segue-se a quantificação do  $\text{Cu}^+$  produzido, o que se consegue pela acção do ácido bicinonínico, um reagente cromogénico quelante do cobre reduzido, originando um complexo de cor púrpura com um máximo de absorvância a 562 nm (Smith *et al*, 1985).



**FIGURA 15 - Exemplo de curva de calibração para quantificação de proteína pelo método BCA**

Na figura representa-se um exemplo de curva de calibração para quantificação de proteína por utilização do método BCA. É utilizada albumina de soro bovina como proteína padrão, diluída com uma solução de 0,05% de Triton X-100. O ajuste linear é realizado no programa Origin Pro8, sendo a estatística do ajuste apresentada na tabela incluída. Os dados são apresentados como a média de três replicados e o respectivo desvio padrão.

Este método pode ser utilizado para a quantificação de proteína de uma grande variedade de amostras num curto intervalo de tempo. A gama de sensibilidade é extensa (20-2000  $\mu\text{g/mL}$ ) mesmo em micro-ensaio. Este método é robusto na presença de 0,05% de Triton X-100, utilizado para desintegrar as membranas das células. Um exemplo da curva de calibração obtida por este método apresenta-se na Figura 15. A quantificação de proteína efectuou-se na própria placa onde as células foram cultivadas. Para isso, no final do ensaio

enzimático, retirou-se todo o meio restante a cada poço (por inversão da placa em papel absorvente). Adicionaram-se 25 µL de uma solução aquosa de Triton X-100 a 0,05% e a placa foi congelada (-20°C). Ambos os procedimentos favorecem a lise celular. Foram deixados proposadamente alguns poços vazios em cada placa, para aplicação da curva de calibração de BSA<sup>9</sup> (5-250µg/mL). Imediatamente após o descongelamento da placa aplicaram-se as soluções padrão de BSA a cada poço e adicionaram-se 200 µL do reagente a cada poço. Nesta formulação comercial, o reagente prepara-se pela mistura de 50:1 de reagente BCA e sulfato de cobre, respectivamente. A placa foi incubada 1h a 37°C e a absorvância foi lida a 570 nm.

#### 3.1.3.8 PROTOCOLO DE APLICABILIDADE DO MÉTODO AO ESTUDO DO EFEITO DA GLUCOSE NA ACTIVIDADE DA Na,K-ATPASE EM CÉLULA $\beta$ -PANCREÁTICA

Para avaliar a aplicabilidade do método desenvolvido, delineou-se uma experiência em que as células foram pré-incubadas durante 30 min com RPMI-G2 (com composição equivalente ao anteriormente descrito com excepção da concentração de glucose que aqui foi 2,1 mM), com a finalidade de reduzir o metabolismo das células para níveis basais. Subsequentemente, o RPMI-G2 foi substituído por RPMI-G2 ou, paralelamente, por RPMI-G8, nos quais as células foram incubadas durante 30 min. Findo este período, o meio de cultura foi recolhido para posterior quantificação de insulina segregada e procedeu-se de seguida à determinação da actividade enzimática da Na,K-ATPase pelo método descrito na secção 3.1.3.5 .

---

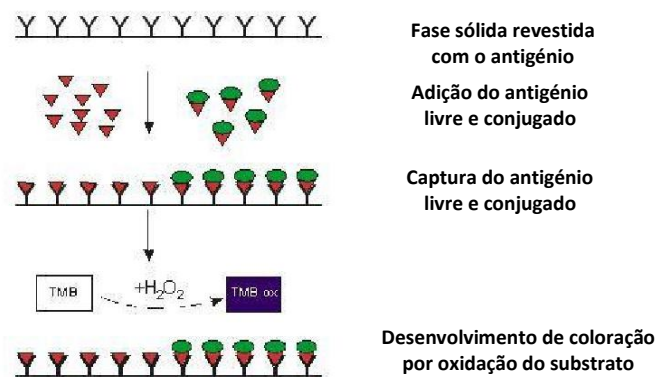
<sup>9</sup> BSA – albumina de soro bovina. É fornecido com o kit uma solução aquosa de BSA de 2mg/mL.

### 3.1.3.9 QUANTIFICAÇÃO DA INSULINA SEGREGADA POR ELISA COMPETITIVO

A insulina segregada foi quantificada utilizando uma técnica de *ELISA* (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*). Trata-se de um ensaio imunológico muito selectivo e muito sensível que permite a determinação da concentração de insulina em pequenos volumes de amostra, sendo adequada ao estudo da secreção dinâmica a partir de um só ilhéu (Antunes, 2004). Uma das mais importantes vantagens desta técnica é o facto de dispensar o uso de radioisótopos.

O método de ELISA competitivo, utilizado neste trabalho, consiste na competição entre uma quantidade fixa de antigénio marcado com um enzima (conjugado) e o antigénio existente na amostra em análise ou nos padrões (antigénio não marcado), pela ligação a uma quantidade limitada de anticorpo fixo numa fase sólida (Kemeny, 1991).

O método que aqui apresentamos foi optimizado por Antunes (2004) tendo sido feitos alguns ajustes, uma vez que o anticorpo e as soluções padrão de insulina aqui utilizados foram diferentes. Esta técnica processa-se em várias fases que consistem em revestimento da fase sólida com anticorpo, lavagem, saturação da placa, ligação do antigénio e do conjugado, adição do substrato e desenvolvimento de coloração, e cujo procedimento se descreve nas secções seguintes (ver Figura 16).



**FIGURA 16 - Esquema de um ELISA competitivo**

A técnica inicia-se com o revestimento da placa com anticorpo. A ligação do antigénio e do antigénio marcado com o enzima peroxidase de rábano (conjugado) pode ocorrer concomitantemente ou em diferentes etapas. Como ambos competem pelos mesmos locais de ligação do anticorpo, existe uma concentração ideal de conjugado a utilizar de modo a que não seja deslocado o antigénio que se pretende dosear. A intensidade de coloração num ELISA competitivo é inversa à concentração do antigénio nas amostras. Obtém-se a coloração máxima nos brancos (onde apenas se ligará conjugado) e mínima nos pontos em que a concentração do antigénio for máxima (o que corresponderá a haver poucas moléculas de conjugado ligadas).

#### 3.1.3.9.1 REVESTIMENTO DA FASE SÓLIDA COM ANTICORPO

A primeira etapa do ensaio consiste no revestimento dos compartimentos de microplacas de poliestireno (*Nunc-Immuno Plate Maxisorp C96*, Nunc, Dinamarca) com uma solução contendo anticorpo de ratinho anti-insulina de rato (*Mouse anti-rat insulin serum*, BT53-3033-39, Linco Research, USA). Preparou-se a solução do anticorpo por diluição 1:2000 (concentração final de aproximadamente 0,5µg/mL) em tampão de reconstituição (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 32,4 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 7,63 mM, NaCl 9,97mM, pH 7,3-7,5).

O procedimento consistiu em adicionar 100 µL da solução de anticorpo a cada poço. No final desta operação procedeu-se à selagem das placas para evitar perdas por evaporação. A incubação com o anticorpo fez-se durante a noite (16h-18h) a 4°C.

#### 3.1.3.9.2 LAVAGEM DAS PLACAS

A lavagem das placas teve como objectivo eliminar as moléculas de anticorpo não adsorvidas à fase sólida. O procedimento experimental envolveu repetidas lavagens (tipicamente três) dos compartimentos com 200 µL de tampão de lavagem (em mM: NaCl 137, KCl 2,7, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7,4, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5; pH 7,2 e Tween-20 0.05% (v/v)), à temperatura ambiente. Após a lavagem, inverteram-se as placas sobre papel absorvente de forma a remover a totalidade da solução de lavagem.

#### 3.1.3.9.3 SATURAÇÃO DA PLACA COM BSA

Este passo teve por objectivo diminuir a ligação inespecífica do antigénio ao suporte sólido. Para isso, trataram-se as placas com o tampão de saturação (BSA 1% (m/v) em tampão de reconstituição). Pretendeu-se que a BSA se ligasse nos locais deixados vagos pelas moléculas de anticorpo. Colocaram-se tipicamente 100µL do referido tampão em cada compartimento, efectuando-se a incubação a 4°C, durante 1 hora.

#### 3.1.3.9.4 LIGAÇÃO DO ANTIGÉNIO E DO CONJUGADO

Após lavagens repetidas (procedimento idêntico ao descrito previamente) procedeu-se à ligação do antigénio (insulina existente nas amostras e nos padrões) ao anticorpo imobilizado na fase sólida. Adicionam-se 50 µL das amostras e padrões a cada compartimento, sempre em triplicado. As soluções padrão foram preparadas por diluição em tampão de antigénio (em mM: NaCl 125, KCl 5, Hepes ácido 25, MgCl<sub>2</sub> 1,13, CaCl<sub>2</sub> 2,56; pH 7,3-7,5 suplementado com BSA 0,1% (m/v)) de insulina de rato padrão (ref. 813K, Linco, Research, USA).

Neste ensaio o conjugado foi aplicado imediatamente após a adição do antigénio o que tornou o ensaio mais breve. Assim sendo, adicionaram-se a cada poço 50 µL do conjugado (insulina extraída de pâncreas bovino e marcada com peroxidase - *Insulin-Peroxidase HPR Labelled*, ref. I-2133, Sigma) na diluição 1:4000 em tampão do conjugado (em mM: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 32,4, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 7,63, NaCl 100; pH 7,3-7,5 suplementado com BSA 6% (m/v)). A competição do conjugado com a insulina não marcada (amostras e padrões) decorreu durante 4 horas à temperatura de 4°C.

#### 3.1.3.9.5 ADIÇÃO DO SUBSTRATO E REACÇÃO ENZIMÁTICA

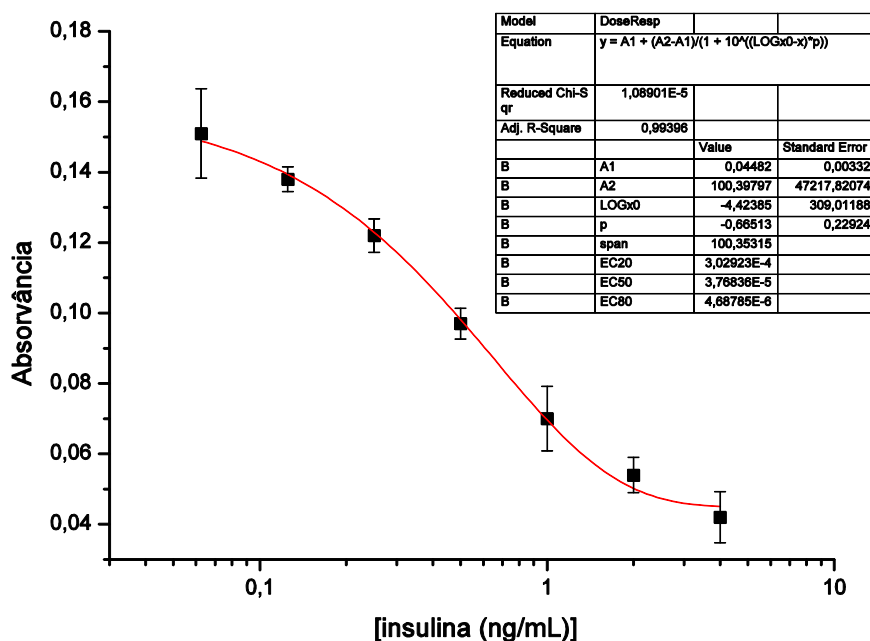
Findas as 4 horas de incubação com o conjugado, o excesso foi removido e as placas foram novamente lavadas. Adicionou-se então o substrato da peroxidase. O substrato é uma preparação que engloba o cromogéneo (tetrametilbenzidina – TMB) e peróxido de hidrogénio (0,03 % v/v) dissolvidos em tampão de citratos (pH=6,1; *liquid substract system*, Sigma Chemical Co.). A reacção (iniciada pela adição de 100 µL do substrato a cada compartimento) decorre à temperatura ambiente, na ausência de luz e por um período de 15-30 minutos. O produto resultante da reacção enzimática é uma substância de cor azul (TMB oxidado) cujo espectro de absorção exhibe dois máximos localizados a 370 e 655 nm. Nesta etapa é particularmente importante ter em atenção as condições óptimas para a reacção enzimática, tais como a temperatura, o pH e a molaridade das soluções tampão, de modo a obter um desenvolvimento colorimétrico, resultante da transformação do substrato, num dado intervalo de tempo.

A reacção foi interrompida por adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M (100 µL/compartimento). Em consequência da alteração do pH, ocorre uma alteração da cor da solução que passa de azul para amarelo (máximo de absorção entre 400 e 500nm). A absorvância desta solução foi determinada recorrendo ao método de duplo filtro, efectuando-se a leitura a 450 nm e

utilizando 630 nm como comprimento de onda de referência, com um fotômetro de absorção para micro-placas (Microplate reader, Biotek, ELX 800).

### 3.1.3.9.6 ANÁLISE DOS RESULTADOS DO MÉTODO ELISA

Dado tratar-se de um ensaio competitivo, a concentração do produto da reação é inversamente proporcional à concentração do antigénio presente nos padrões e na amostra, sendo a relação semi-logarítmica. A curva padrão de insulina foi ajustada a uma regressão não-linear, de acordo com o modelo dose-resposta (função dose-resposta com declive de Hill variável dado pelo parâmetro “p”, de 4 parâmetros); (ver Figura 17). Foram consideradas apenas as amostras cujas absorvância se situaram na zona de maior sensibilidade da sigmóide.



**FIGURA 17 - Exemplo de curva de calibração para ELISA de insulina**

Este gráfico representa um exemplo da curva de calibração obtida para quantificação de insulina por ELISA competitivo. Utilizam-se soluções padrão de insulina de rato entre 0,0625 e 4 ng/mL. Os resultados apresentam-se como a média de triplicado com o respectivo desvio padrão. O tratamento de resultados é realizado com recurso ao programa ORIGIN Pro 8, realizando-se o ajuste não linear correspondente à relação dose-resposta. A estatística deste ajuste apresenta-se na tabela apresentada.

### 3.1.3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A avaliação do significado estatístico da diferença entre os valores médios de dois grupos de resultados foi realizado por análise de variância (ANOVA), utilizando o programa Microsoft Excel. Em todos os casos um valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

Os resultados estão apresentados como valores médios  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m.). O erro padrão da média foi considerado mais apropriado que o desvio padrão pelo facto de se pretender comparar as médias.

Os gráficos e as regressões, lineares e não lineares, foram realizadas utilizando o programa ORIGIN Pro 8 (OriginLab Corporation, USA).



### 3.1.4 Resultados e Discussão

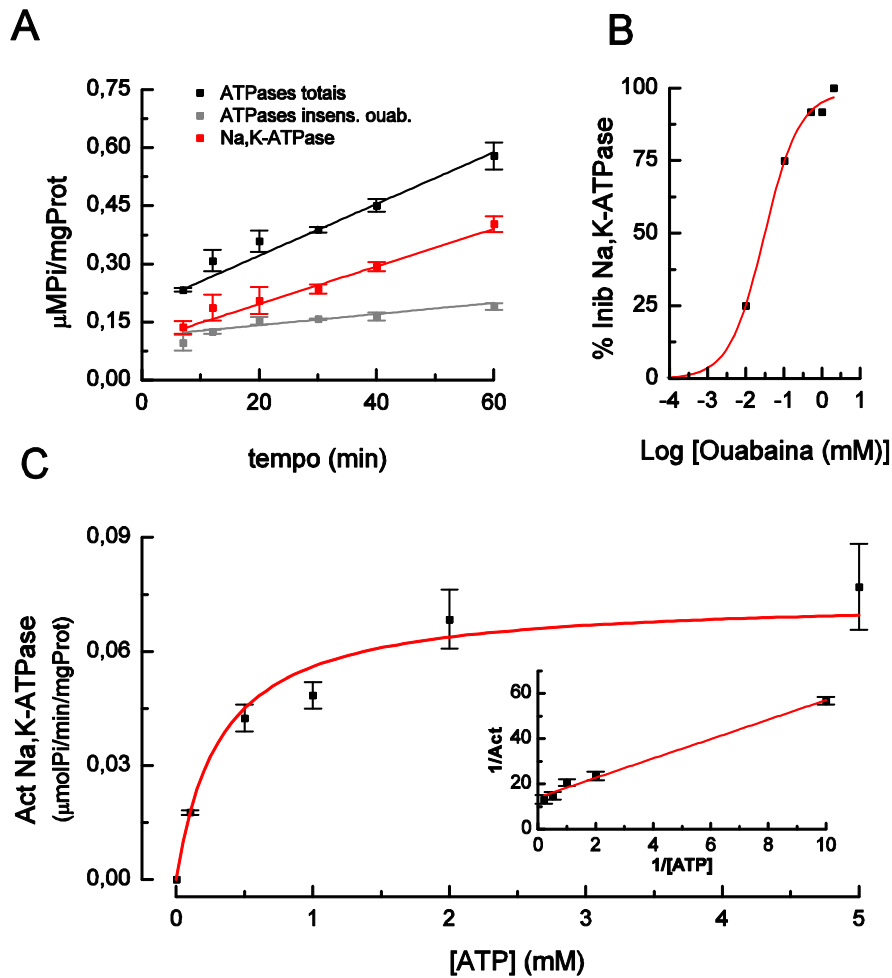
Os resultados apresentados nesta secção subdividem-se em dois grupos principais; o primeiro corresponde ao trabalho realizado para optimização do método enzimático enquanto que o segundo grupo é relativo à aplicação do método desenvolvido ao estudo da modulação da actividade da Na,K-ATPase por glucose em células  $\beta$ -pancreáticas viáveis e mantidas em culturas aderentes.

#### 3.1.4.1 RESULTADOS DA OPTIMIZAÇÃO DO MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE ENZIMÁTICA DA Na,K-ATPASE EM CÉLULAS $\beta$ -PANCREÁTICAS

A optimização do método implicou a realização de alguns estudos prévios, que permitissem determinar o melhor tempo de reacção, a concentração óptima de ouabaína para conseguir a inibição da bomba em célula  $\beta$ -pancreática, a determinação dos parâmetros cinéticos aparentes para o ATP e a análise da viabilidade celular ao longo do ensaio.

O método desenvolvido para a realização deste trabalho baseia-se numa determinação de tempo final. É assim de grande relevância o tempo de reacção enzimática, pois a formação de produto deverá ocorrer linearmente durante o intervalo de tempo escolhido (Cornish-Bowden, 2004). Para isso, estudou-se a formação de fosfato inorgânico ao longo do tempo (5-60min), quer no ensaio das ATPases totais, quer no ensaio das ATPases insensíveis a ouabaína, calculando-se a diferença entre o fosfato inorgânico formado nas situações anteriores, o que permite a determinação da actividade enzimática da Na,K-ATPase, como foi descrito na secção 3.1.3.5.

Os resultados apresentados na Figura 18-A mostram que a reacção é linear para as ATPases totais durante todo o intervalo de tempo escolhido, enquanto a curva da formação de fosfato inorgânico correspondente às ATPases insensíveis a ouabaína apresenta algum afastamento à linearidade entre os 5 e os 20 min. No que diz respeito à progressão da reacção para a Na,K-ATPase, esta mostrou ser linear a partir dos 20 min e até aos 60 min. Por isso optou-se por escolher o intervalo de tempo de 30 min como o mais adequado ao estudo.



**FIGURA 18 - Estudos de optimização do método de determinação enzimática da Na,K-ATPase em células  $\beta$ -pancreáticas mantidas em cultura.**

Estudos de optimização do método: A – Estudo da formação de produto da reacção (Pi) ao longo do tempo ( $y=0,012x+0,458$ ,  $r=0,979$  para ATPases totais;  $y=0,0026x+0,224$ ,  $r=0,780$  para ATPases insensíveis a ouabaína;  $y=0,0099x+0,238$ ,  $r=0,989$  para Na,K-ATPase); B – Estudo dose-resposta da acção da ouabaína na actividade enzimática da Na,K-ATPase ( $EC_{50}=0,3670$  mM), ; C – Estudo cinético da actividade da Na,K-ATPase em função da concentração de ATP, utilizando 115 mM de  $\text{Na}^+$  e 5 mM de  $\text{K}^+$ . A regressão não linear permite determinar  $K_M=0,32$  mM e  $V_{\text{max}}=0,074$   $\mu\text{mol/min/mgProt}$ . No sistema de eixos mais pequeno encontra-se a representação de Lineweaver-Burk correspondente aos mesmos dados ( $y=4,3148x+13,952$ ,  $r=0,9953$ ). Resultados representativos da média  $\pm$  epm ( $n=3$ ).

Na grande maioria dos métodos referidos na literatura para determinação da actividade enzimática da Na,K-ATPase é utilizada ouabaína com o mesmo propósito com que foi utilizado neste trabalho – a inibição selectiva da Na,K-ATPase para que, por diferença entre a actividade das ATPases totais e as ATPases insensíveis à ouabaína se obtenha a actividade da Na,K-ATPase. Para cumprir esta função a ouabaína é utilizada normalmente na gama de concentrações entre 0,5 e 2 mM, sendo a concentração 1 mM a mais comumente usada para

a obtenção da inibição máxima em homogeneizados (Elmi *et al*, 2000a; Elmi *et al*, 2001; Erdmann *et al*, 1971). Assim, efectuou-se um estudo dose-resposta da inibição da Na,K-ATPase pela ouabaína, utilizando concentrações no intervalo 0,02 e 2 mM.

A Figura 18-B apresenta os resultados obtidos na sequência do estudo dose-resposta. Observou-se que, para concentrações de ouabaína iguais ou superiores a 0,5 mM, a inibição da bomba aproxima-se de 100%, não variando significativamente entre 0,5 e 2 mM. A regressão não linear efectuada aos resultados, por aplicação da função dose-resposta, permitiu determinar o IC<sub>50</sub> como sendo 0,0367 mM. Com base nestes resultados, optou-se por utilizar a ouabaína na concentração de 1 mM, um valor trinta vezes superior ao IC<sub>50</sub> e que se situa no patamar superior da curva, garantindo, assim, a inibição máxima da bomba.

Estudou-se também a dependência da Na,K-ATPase relativamente à concentração de ATP em células  $\beta$ -pancreáticas mantidas aderentes, nas condições do método desenvolvido, sendo os resultados apresentados na Figura 18-C. A concentração de ATP variou entre 0,25 e 5 mM, tendo sido possível efectuar a determinação dos parâmetros cinéticos aparentes para este substrato em presença das concentrações óptimas de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> (115 e 5 mM, respectivamente); (ver Figura 18-C). Aplicando uma regressão não linear, com base na equação do ramo de hipérbole rectangular, obtiveram-se os valores de K<sub>M</sub>=0,32 mM e de V<sub>max</sub>=0,074  $\mu$ molPi/min/mgProt. Aplicou-se também o método de Linearização de Lineweaver-Burk (ver Figura 18-C-*inlet*) e os resultados obtidos não diferiram significativamente dos anteriores (K<sub>M</sub>=0,31 mM e V<sub>max</sub>=0,072  $\mu$ molPi/min/mgProt).

Os valores dos parâmetros cinéticos aparentes, aqui apresentados e determinados nas células  $\beta$ -pancreáticas mantidas em cultura, são semelhantes aos registados por Levin *et al*. em homogeneizados de ilhéus de rato (Levin *et al*, 1978).

No final do ensaio enzimático foi determinada a viabilidade celular em células sujeitas à determinação da Na,K-ATPase e em células controlo mantidas em meio de cultura, para avaliação da integridade celular durante o ensaio. Para isso, foram escolhidos poços aleatoriamente na placa, em diferentes fases do ensaio, aos quais realizámos o teste de exclusão do azul de tripano. Observou-se que a viabilidade celular foi sempre superior a 98%, em qualquer das fases do ensaio (contabilizaram-se um conjunto de cinco experiências, com três poços analisados em cada situação experimental).

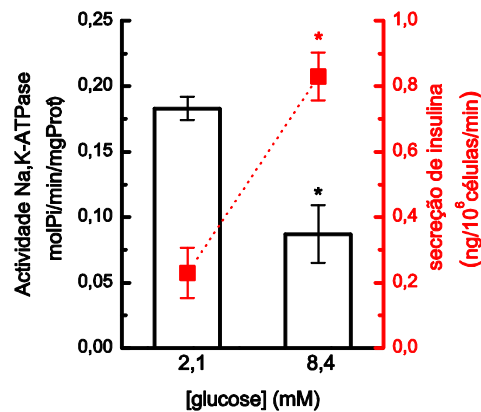
Assim, os resultados apontam para a manutenção das características da actividade da Na,K-ATPase observadas em homogeneizados, quer do ponto de vista da afinidade para o ATP, quer na sensibilidade à ouabaína. Para além disso, as células mantiveram-se viáveis durante a realização do ensaio, sugerindo a possibilidade da sua aplicação em estudos relacionados com a regulação da bomba e seu potencial papel na função da célula  $\beta$ -pancreática.

#### 3.1.4.2 APLICAÇÃO DO MÉTODO AO ESTUDO DA MODULAÇÃO DA ACTIVIDADE DA Na,K-ATPASE POR GLUCOSE EM CÉLULA $\beta$ -PANCREÁTICA E DOSEAMENTO DA SECREÇÃO DE INSULINA

Na secção anterior mostrou-se que é possível efectuar a determinação e estudo da actividade enzimática da Na,K-ATPase em células  $\beta$ -pancreáticas mantidas em cultura. Mostrou-se ainda que as células se mantiveram viáveis durante o processo de determinação de actividade da Na,K-ATPase. Esta metodologia apresenta, sobre outras referidas na literatura, a vantagem de se manterem intactas as vias de transdução de sinal tornando, assim, possível o estudo da modelação da Na,K-ATPase por processos que dependem dessas vias, nomeadamente, de estímulos fisiológicos.

Esta metodologia foi utilizada para estudar o efeito da glucose na actividade enzimática da Na,K-ATPase. Na Figura 19 pode observar-se que a actividade enzimática da Na,K-ATPase registada em células incubadas com uma concentração de glucose de 2,1 mM foi de  $0,183 \pm 0,009 \mu\text{molPi}/\text{min}/\text{mgProt}$  (gráfico de barras). A estimulação das células com 8,4 mM de glucose induziu uma diminuição da actividade da bomba para  $0,087 \pm 0,022 \mu\text{molPi}/\text{min}/\text{mg}$ , cerca de 50% inferior à registada em células expostas a 2,1 mM (ver Figura 19 – gráfico de barras).

Nas mesmas condições, também foi quantificada a insulina segregada pelas células  $\beta$ -pancreáticas após estimulação com glucose 8,4 mM. Os resultados obtidos mostram que a secreção de insulina estimulada por 8,4 mM de glucose foi cerca de 4 vezes superior à secreção basal ( $0,23 \pm 0,08$  e  $0,84 \pm 0,07 \text{ ng insulina}/10^8 \text{ células}/\text{min}$  em 2,1 mM e 8,4 mM, respectivamente) (ver Figura 19), o que sugere que as células apresentam uma resposta fisiológica normal à glucose.



**FIGURA 19 - Estudo sequencial da secreção de insulina e do efeito da concentração de glicose na actividade enzimática da Na,K-ATPase.**

No mesmo ensaio foi determinada a secreção de insulina em células incubadas durante 30 min com concentrações de glicose 2.1 e 8.4 mM (resultados apresentados no eixo a vermelho) e quantificada a actividade enzimática da Na,K-ATPase (eixo a preto). Resultados representativos da média  $\pm$  epm (\* significa  $p < 0,05$ , por ANOVA) de três experiências independentes.

Uma inibição da Na,K-ATPase com o aumento da concentração de glicose relativamente a um valor basal da mesma foi também descrita por outros autores em homogeneizados de ilhéus (Levin *et al*, 1978) e em lisados de ilhéus e células- $\beta$  isoladas (Owada *et al*, 1999). Em termos de valores absolutos, os resultados aqui apresentados são da ordem de grandeza dos dados de Levin *et al*. que registou uma actividade máxima para a Na,K-ATPase de  $0,114 \mu\text{molPi}/\text{min}/\text{mg}$  proteína utilizando homogeneizados de ilhéus de rato (Levin *et al*, 1978), o que sugere que a utilização de células intactas em cultura é aplicável à determinação da actividade enzimática da Na,K-ATPase. Adicionalmente, foi demonstrado que as células se mantiveram viáveis durante a realização do ensaio e que mantiveram a capacidade de segregar insulina em resposta a um estímulo de glicose, um importante indicador do estado fisiológico das células.

Em suma, estes resultados mostraram que a aplicação desta metodologia permite, por um lado, estudar a regulação da actividade enzimática da Na,K-ATPase por glicose em células  $\beta$ -pancreáticas isoladas e mantidas em cultura aderente onde as vias de sinalização celulares se mantêm intactas, o que constitui uma vantagem da aplicação deste método.

### 3.1.5 Conclusões

Neste trabalho desenvolveu-se um método que permite o estudo da actividade enzimática da Na,K-ATPase em células  $\beta$ -pancreáticas mantidas em cultura aderente, sem necessidade de permeabilização celular e que se revelou adequado ao estudo da regulação deste sistema enzimático por glucose e do papel por este desempenhado na fisiologia destas células. Neste âmbito, foi possível concluir que:

- a) As células  $\beta$ -pancreáticas primárias cultivadas nas condições do método mantiveram-se viáveis durante a realização do ensaio, possibilitando a realização de outras determinações nas mesmas células;
- b) O método apresentou linearidade entre os 20 e os 60 min, tendo sido escolhido o período de 30 min para a realização das experiências;
- c) A sensibilidade à oubaína foi semelhante à descrita noutros métodos, com um  $IC_{50}$  de 0,367 mM, tendo sido escolhida a concentração de 1 mM para a inibição completa e selectiva da Na,K-ATPase;
- d) Os parâmetros cinéticos aparentes obtidos para o ATP ( $K_M$  é de 0,32 mM e  $V_{max}$  de 0,074  $\mu\text{molPi}/\text{min}/\text{mgProt}$ ) foram da mesma ordem de grandeza dos estimados por Levin *et al.* (Levin *et al.*, 1978);
- e) A actividade enzimática da Na,K-ATPase em células  $\beta$ -pancreáticas mantidas em cultura foi influenciada pela concentração de glucose com que essas células foram incubadas, sendo a actividade enzimática cerca de 50% menor em 8,4, comparando com 2,1 mM de glucose;
- f) Estas células mantiveram a resposta fisiológica, em termos de secreção de insulina estimulada por glucose, tendo sido determinado que a secreção em 8,4 mM de glucose é cerca de quatro vezes superior à resposta em glucose basal.

Em suma, este método permitiu a determinação da actividade enzimática da Na,K-ATPase em células intactas, mantidas em cultura primária aderente. As células mantiveram-se viáveis e funcionais durante todo o ensaio, possibilitando medições sucessivas ou simultâneas da secreção de insulina ou de outros parâmetros bioquímicos ou celulares. A grande vantagem de realizar a determinação da actividade enzimática nas células mantidas intactas advém do facto de as vias de transdução de sinal se manterem funcionais, permitindo assim perceber mecanismos de regulação celular fina.

## 3.2 ESTUDO DO EFEITO DA GLUCOSE NA ACTIVIDADE ENZIMÁTICA DA Na,K-ATPASE EM CÉLULA $\beta$ -PANCREÁTICA DE ANIMAIS CONTROLO E GIR

### 3.2.1 Introdução

A Na,K-ATPase é responsável por manter os gradientes de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  através da membrana, fazendo o transporte activo de três iões  $\text{Na}^+$  de dentro para fora da célula e de dois iões  $\text{K}^+$  no sentido inverso, gerando uma corrente global de saída. A actividade enzimática da bomba de sódio em célula  $\beta$ -pancreática foi extensivamente estudada nos anos 70, onde ficou estabelecido que as suas funções eram semelhantes às desempenhadas noutros tecidos, tendo sido confirmada a sua electrogenicidade (ver secção 1.2.5.2.4).

As observações de que a incubação de células com ouabaína favorecia a secreção de insulina e de que essa acção era conseguida por despolarização celular tornavam a bomba num sistema com potencial para desempenhar um papel chave nos mecanismos iónicos subjacentes ao acoplamento estímulo-secreção na célula  $\beta$ -pancreática. A descoberta do K(ATP) veio desvalorizar esta hipótese e o interesse do estudo da Na,K-ATPase perdeu relevância relativamente ao estudo de canais iónicos. O interesse no estudo da Na,K-ATPase renasceu da observação de que o K(ATP) não explica todo o fenómeno de actividade eléctrica subjacente à secreção de insulina. Além disso, observou-se que a Na,K-ATPase consumia cerca de 75-80% da produção de energia basal da célula- $\beta$ . Um tal gasto de ATP, que se sabia agora ser regulador de muitas funções na célula- $\beta$ , nomeadamente do K(ATP), permitiu reequacionar o papel da Na,K-ATPase como potencial agente de regulação fina da secreção de insulina, por acção directa ou indirecta. Existem alguns estudos que, por mostrarem que a actividade da Na,K-ATPase parece ser regulada pela glucose, apoiam esta hipótese, muito embora os resultados apresentados sejam controversos.

De facto, existem trabalhos que mostram inibição da actividade da bomba em resposta a um aumento da concentração de glucose em homogeneizados ou lisados de ilhéus ou células  $\beta$ -pancreáticas, outros mostram uma activação da bomba, recorrendo à medição de fluxo de  $^{85}\text{Rb}^+$  em ilhéus, havendo ainda estudos em homogeneizados de ilhéus nos quais não se observou qualquer efeito da glucose na actividade da Na,K-ATPase (ver secção 1.2.5.2.4).

Assim, à luz destes resultados, não é claro se a glucose promove uma activação ou uma inibição da actividade da Na,K-ATPase. Tomados em conjunto, estes dados apontam para a necessidade de esclarecimento de alguns aspectos da regulação da actividade da Na,K-ATPase por glucose.

A contribuição da Na,K-ATPase em célula  $\beta$ -pancreática pode ainda ser mais relevante tendo em conta a importância que têm os eventos iónicos iniciais do processo estímulo-secreção na fisiopatologia da DT2, onde se registam alterações significativas na secreção de insulina induzida pela glucose, pelo menos parcialmente resultantes de alterações significativas da actividade eléctrica induzida por glucose (ver secção 1.2.5), cujos mecanismos não foram ainda clarificados. Devido às propriedades electrogénicas da Na,K-ATPase, poder-se-á admitir que alterações da sua actividade possam contribuir para a regulação do potencial de membrana e, conseqüentemente, da secreção de insulina.

Porém, a possibilidade da função da bomba se encontrar comprometida na DT2 ou em situações de intolerância à glucose nunca foi até ao momento abordada em célula  $\beta$ -pancreática. Desta forma, ganha relevância científica o estudo dos efeitos da glucose na regulação da Na,K-ATPase em células  $\beta$ -pancreáticas em condições fisiológicas e patológicas.

### 3.2.2 Objectivos

O objectivo deste capítulo consistiu no estudo da regulação da actividade da Na,K-ATPase por glucose em células  $\beta$ -pancreáticas de ratos controlo e GIR, mantidas em culturas primárias e viáveis. Neste âmbito, procurou-se:

- a) Caracterizar sumariamente o modelo animal intolerante à glucose utilizado; Para isso, foram realizadas provas de tolerância à glucose por via oral e medições da secreção de insulina plasmática, tendo ainda sido avaliada a resposta secretora de células  $\beta$ -pancreáticas destes animais a um estímulo com glucose, por comparação com os controlos;



- b) Avaliar o efeito da glucose sobre a actividade da Na,K-ATPase num intervalo de concentrações entre 0 e 11,1 mM; Para isso, foi utilizado o método para determinação da actividade enzimática da Na,K-ATPase em células  $\beta$ -pancreáticas mantidas em cultura desenvolvido na secção 3.2;
- c) Avaliar a cinética do efeito modulador da glucose sobre a actividade da Na,K-ATPase ; Para isso, foi utilizado o método para determinação da actividade enzimática da Na,K-ATPase em células  $\beta$ -pancreáticas mantidas em cultura desenvolvido na secção 3.2 e as células foram incubadas num intervalo de tempo de 5 a 120 min;
- d) Averiguar se a potencial regulação da actividade da Na,K-ATPase pela glucose se encontra alterada em GIR, quer no que diz respeito à dose-resposta, quer no que diz respeito à cinética.

### 3.2.3 Metodologias

Nesta secção foi utilizado o método para a determinação da actividade enzimática da Na,K-ATPase em culturas primárias aderentes de células  $\beta$ -pancreática, previamente desenvolvido e descrito na secção 3.1, de ratos controlo e GIR. Foi também necessário proceder à caracterização dos ratos GIR, tendo sido utilizadas metodologias como a prova de tolerância à glucose por via oral e a quantificação da insulina por um método imunológico.

#### 3.2.3.1 MODELOS ANIMAIS

Neste trabalho utilizou-se o rato Wistar *outbred* como modelo animal controlo e uma variante deste, *inbred*, que tem vindo a ser desenvolvida no nosso biotério, obtida por cruzamentos entre animais espontaneamente intolerantes à glucose, que designamos genericamente por GIR, tendo sido utilizados animais da quinta geração de cruzamentos consanguíneos entre irmãos de uma mesma gestação.

Os animais, controlo e GIR, foram mantidos no biotério do Departamento de Química da Universidade de Évora, sob regime de foto-período normal, com água e alimentação *ad libitum*, de acordo com as indicações da Portaria nº 1005/92 de 23 de Outubro.

Para a caracterização do modelo, foram escolhidos aleatoriamente cinco fêmeas e cinco machos, com 12-14 semanas, de cada um dos grupos de animais. Para os ensaios de actividade enzimática, foram utilizadas fêmeas da mesma idade.

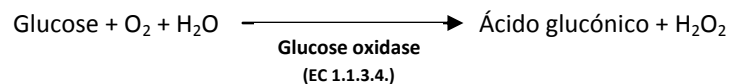
#### 3.2.3.2 DETERMINAÇÃO DE PESOS CORPORAIS E PROVA DE TOLERÂNCIA À GLUCOSE POR VIA ORAL (PTGO)

Um passo prévio, essencial à realização da prova de tolerância à glucose por via oral (PTGO), é a pesagem dos animais que são mantidos em jejum durante 16-18h. A pesagem dos

animais constitui, por si própria, um nível de caracterização destes, sendo ainda essencial para o cálculo da dose de glucose a administrar para a realização da PTGO.

A PTGO propriamente dita inicia-se com a medição da glicemia em jejum, que é realizada numa gota de sangue colhido na extremidade da cauda dos animais, utilizando-se um glicómetro (Accutrend Sensor, Boehringer Mannheim) e tiras reactivas Accu-chek para glucose (Roche). O princípio subjacente a esta determinação é a reacção catalisada pela glucose-oxidase (ver Equação 1).

**EQUAÇÃO 1 : REACÇÃO CATALISADA PELA GLUCOSE OXIDASE QUE PERMITE A QUANTIFICAÇÃO DA GLUCOSE NO SANGUE NAS TIRAS REACTIVAS ACCU-CHEK (ROCHE).**



Após a medição da glicemia do jejum, foi administrada oralmente, com sonda gástrica, uma solução aquosa de glucose a 25%, numa dose de 1,75g/kg peso corporal. A glicemia foi novamente medida aos 30, 60 e 120 min após a administração do *bolus* de glucose, utilizando o mesmo procedimento acima referido.

### 3.2.3.3 QUANTIFICAÇÃO DA INSULINEMIA DO JEJUM

A quantificação da insulinemia plasmática foi realizada pós-morte, em animais deixados em jejum durante 16-18h. Os animais foram eutanasiados por punção cardíaca terminal sob anestesia com éter. O sangue foi colhido com EDTA como anticoagulante e o plasma foi preparado por centrifugação a 3.000g, durante 15 min, a 4°C. O plasma foi depois recolhido, dividido em alíquotas e conservado a -20°C até posterior análise.

A quantificação da insulinemia efectuou-se por aplicação do método de ELISA quantitativo descrito no capítulo IV.3.1.3.9.

#### 3.2.3.4 ESTUDO DO EFEITO DA GLUCOSE NA ACTIVIDADE ENZIMÁTICA DA Na,K-ATPASE EM CÉLULA $\beta$ -PANCREÁTICA

As culturas primárias de células  $\beta$ -pancreáticas de animais controlo e GIR foram preparadas de acordo com o procedimento experimental descrito nas secções 3.1.3.3 e 3.1.3.4.

Para o estudo do efeito da glucose na actividade enzimática da Na,K-ATPase em célula  $\beta$ -pancreática procedemos a uma pré-incubação das células em glucose 2,1 mM, durante 30 min, em incubadora de CO<sub>2</sub>, a 37°C, a que se seguiram incubações de tempo e concentração de glucose diferenciados, realizadas também a 37°C. A actividade enzimática da Na,K-ATPase mediu-se na sequência dessas incubações, de acordo com o procedimento experimental já descrito na secção 3.1.3.5.

Mediu-se ainda a insulina segregada nos meios de incubação das células, na situação em que após a pré-incubação em glucose 2,1 mM se seguiu uma incubação de 20 min em 2,1 ou 8,4 mM de glucose. O procedimento experimental para esta determinação, por utilização de um método de ELISA competitivo, está descrito na secção 3.1.3.9.

#### 3.2.3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A avaliação do significado estatístico da diferença entre os valores médios de dois grupos de resultados foi realizada por análise de variância (ANOVA), no programa Microsoft Excel. Em todos os casos um valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

As análises cruzadas entre grupos foram realizadas com recurso ao teste multi-comparativo Tukey-Kramer, com  $p < 0,05$ , no programa NCSS 2001 (Jerry Hintze, USA).

Os resultados foram apresentados como valores médios  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m.). O erro padrão da média foi considerado mais apropriado que o desvio padrão, pelo facto de se pretender comparar as médias.

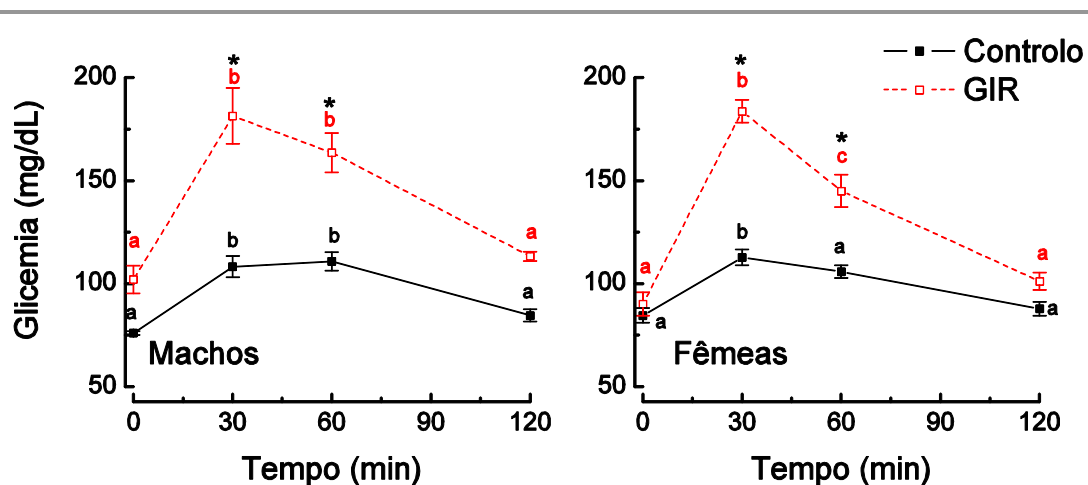
Os gráficos foram realizados no programa ORIGIN Pro8 (OriginLab Corporation, USA).

### 3.2.4 Resultados e Discussão

#### 3.2.4.1 CARACTERIZAÇÃO DO MODELO GIR

A determinação do peso corporal dos animais GIR foi um dos parâmetros avaliados na caracterização deste modelo animal que tem vindo a ser estabelecido. Foram avaliados os pesos dos animais (cinco por cada grupo), tendo sido observado que o peso dos animais GIR não diferiu significativamente do observado nos controlos, quer em machos ( $302 \pm 5$  g e  $292 \pm 12$  g em controlo e GIR, respectivamente), quer em fêmeas ( $205 \pm 6$  g e  $196 \pm 1$  g em controlo e GIR, respectivamente).

Os resultados das PTGO estão apresentados na Figura 20. A glicemia do jejum foi semelhante entre controlos e GIR quer em fêmeas ( $84,6 \pm 3,4$  e  $90,2 \pm 5,7$  mg/dL, respectivamente), quer em machos ( $76 \pm 0,9$  e  $102 \pm 6,8$  mg/dL, respectivamente).



**FIGURA 20 - Curvas de tolerância à glucose de fêmeas e machos de ratos controlo e GIR**

Representações gráficas da medição de glicemia após PTGO. No gráfico da esquerda apresentam-se os resultados relativos aos machos e no da direita os resultados relativos às fêmeas. Resultados representativos da média  $\pm$  epm de um conjunto de cinco animais por cada grupo (médias significativamente diferentes são representadas por letras diferentes dentro do mesmo grupo e por \* entre grupos, para o mesmo tempo de análise; análise cruzada por Tukey-Kramer, com  $p < 0,05$ ).

A concentração máxima de glucose no sangue observou-se nos GIR, machos e fêmeas, 30 min após o *bolus* de glucose ( $181,4 \pm 13,5$  e  $183,6 \pm 5,5$  mg/dL em machos e fêmeas GIR,

respectivamente). Nos animais controlo, fêmeas e machos, o máximo da glicemia registou-se entre os 30 min e os 60 min (o valor mais elevado determinado foi de  $112,8 \pm 3,8$  mg/dL em fêmeas e de  $110,8 \pm 4,4$  mg/dL em machos). Os valores de glicemia após o *bolus* de glucose foram significativamente mais elevados nos ratos GIR quando comparados com os controlo aos 30 e aos 60 min.

Finalmente, aos 120 min, observou-se uma recuperação quase total, sendo as glicemias semelhantes às do jejum, independentemente de serem controlos ou GIR ou do género ( $101,2 \pm 4,1$  e  $87,8 \pm 3,3$  g/dL para fêmeas GIR e controlo, e  $113,2 \pm 2,2$  e  $84,6 \pm 3,0$  g/dL para machos GIR e controlo, respectivamente); (ver Figura 20).

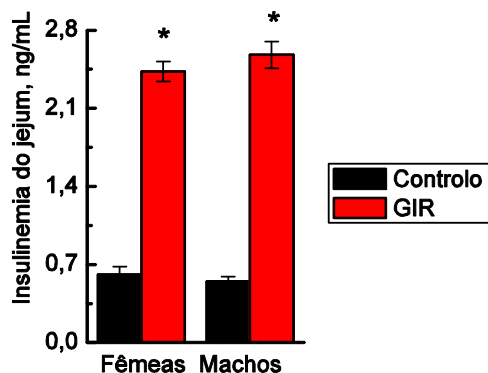
É ainda de realçar que não se observaram diferenças significativas entre as PTGO de machos e fêmeas da mesma estirpe, sendo estas similares qualitativa e quantitativamente.

Em suma, os ratos GIR, independentemente do género, apresentaram curvas de tolerância à glucose bastante alteradas, não sendo atingidos, contudo, valores de glicemia no jejum característicos de ratos classificados como diabéticos (entre 125-140 mg/dL) (Seiça *et al*, 2004). Os valores de glicemia máximos foram observados no intervalo 30-60 min após a administração do *bolus* de glucose oral e aproximaram-se de 200 mg/dL, enquanto a glicemia dos controlos não ultrapassou 120mg/dL. Estes dados permitem, de acordo com a classificação da *American Diabetes Association* (American Diabetes Association, 2011), considerar que estes animais sofrem de uma síndrome semelhante ao estado pré-diabético registado em humanos, o que revela a intolerância à glucose que os caracteriza.

A intolerância à glucose é um importante factor de risco e uma característica da DT2. Uma outra característica desta patologia é a ocorrência de hiperinsulinemia no jejum. Procurámos também caracterizar o nosso modelo no que diz respeito a esse parâmetro. A insulina plasmática de animais (cinco animais por grupo) foi quantificada por um método de ELISA competitivo.

Na Figura 21 podem observar-se as diferenças na insulinemia no jejum entre machos e fêmeas controlo e GIR. Não se registaram diferenças significativas entre machos e fêmeas de cada um dos grupos, mas observou-se uma insulinemia do jejum significativamente mais elevada nos GIR, sendo cerca de quatro vezes superior à registada nos controlos ( $2,43 \pm 0,09$  e  $2,58 \pm 0,12$  ng/mL em fêmeas e machos de GIR, respectivamente e  $0,61 \pm 0,07$  e  $0,55 \pm 0,04$  ng/mL em fêmeas e machos de controlo, respectivamente). Assim, quer machos, quer fêmeas,

apresentaram hiperinsulinemia no jejum, o que provavelmente contribuiu para a manutenção da normoglicemia em jejum observada nestes animais.



**FIGURA 21 - Insulinemia do jejum de ratos controle e GIR**

Foram analisadas por ELISA as insulinemias plasmáticas, representando-se graficamente os resultados experimentais para machos e fêmeas, controle e GIR. Resultados representativos da média  $\pm$  epm de cinco animais por grupo (\* significa  $p < 0,05$  relativamente ao controle, por ANOVA).

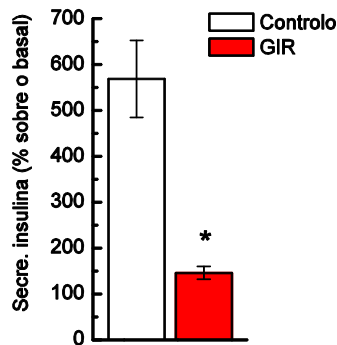
O estado hiperinsulinémico no jejum é uma característica do estado pré-diabético e da DT2 numa primeira fase da doença e tem provavelmente associada insulino-resistência (DeFronzo, 2009). A secreção aumentada pelas células  $\beta$ -pancreáticas, numa situação em que não há entrada de nutrientes, revela que os animais GIR apresentam desregulação metabólica e constitui um factor de *stress* a que as células  $\beta$ -pancreáticas estão sujeitas e que já se observa nos ratos GIR, constituindo este um modelo adequado para o estudo de eventuais alterações precoces ao desenvolvimento da DT2, dado que o estado de intolerância à glucose de que sofrem é considerado um factor de risco para o desenvolvimento da mesma (DeFronzo, 2009).

#### 3.2.4.2 SECREÇÃO DE INSULINA EM CÉLULAS- $\beta$ PANCREÁTICAS DE ANIMAIS CONTROLO E GIR

Os dados anteriores mostram que o modelo animal seleccionado sofre uma condição semelhante à intolerância à glucose em humanos, apresentando normoglicemia em jejum acompanhada de hiperinsulinemia. Estes dados sugerem a existência de resistência à insulina pelos tecidos periféricos, compensada pelos níveis plasmáticos aumentados de insulina. Contudo, não nos permitem inferir sobre a função da célula  $\beta$ -pancreática, que se sabe estar

também alterada na DT2, caracterizando-se essa alteração essencialmente por uma resposta inadequada ao estímulo fisiológico quer em humanos (Defronzo, 2009) quer em modelos animais da patologia (Seiça *et al*, 2004).

A avaliação da função e resposta ao estímulo fisiológico de células  $\beta$ -pancreáticas de animais intolerantes era fundamental para a continuação deste estudo. Para isso, prepararam-se culturas primárias de células- $\beta$  que foram pré-incubadas em glucose basal (2,1 mM de glucose), durante 30 min, seguindo-se incubações de 20 min em 2,1 ou 8,4 mM de glucose. Recolheram-se os meios de cultura destas incubações e, por ELISA, quantificou-se a insulina segregada. A Figura 22 resume os resultados obtidos em três experiências semelhantes e mostra que o aumento da secreção de insulina induzida por 8,4 mM de glucose sobre o basal foi de cerca de seis vezes em células de animais controlo enquanto que, em células de GIR, apenas duplicou.



**FIGURA 22 - Secreção de insulina de células de ratos controlo e GIR**

Foi quantificada por ELISA a secreção de insulina de células  $\beta$ -pancreáticas mantidas em cultura primária. No gráfico representa-se a percentagem de secreção obtida com um estímulo de glucose de 8,4 mM relativamente à secreção basal, obtida com uma incubação em 2,1 mM de glucose. Resultados representativos da média  $\pm$  epm de três experiências (\* significa  $p < 0,05$ , por ANOVA).

Assim, a estimulação da secreção de insulina em resposta ao segretagogo natural encontra-se bastante comprometida, sendo cerca de quatro vezes inferior, para a mesma concentração de glucose. Estes resultados indicam que já existem alterações da função da célula  $\beta$ -pancreática de GIR que se caracterizam por uma significativa diminuição de sensibilidade à glucose. Ambas as condições registadas, a hiperinsulinemia do jejum e a diminuição da secreção de insulina em resposta à glucose, são características do estado diabético, em particular numa fase inicial da DT2.

Existem, na literatura, dados que mostram que, quer em pâncreas perfundido (Portha *et al*, 1991), quer em ilhéus isolados (Seiça *et al*, 2004) de ratos GK, a secreção basal de insulina em resposta a 2 mM de glucose é mais elevada que nos controlos. Contudo, a amplitude da resposta observada na sequência de um estímulo de glucose é significativamente



inferior em pâncreas (Portha *et al*, 1991) ou mesmo abolida em ilhéus (Seiça *et al*, 2004), sugerindo a existência de uma disfunção da célula  $\beta$ -pancreática no que respeita ao reconhecimento do estímulo. Em concordância com estes dados estão também as evidências de uma resposta diminuída *in vivo* de indivíduos diabéticos em resposta a um *bolus* de glucose da qual são características fundamentais a abolição da secreção cefálica de insulina e a perda do padrão oscilatório (DeFronzo, 2009).

A anomalia observada na tolerância à glucose nos ratos GIR, relativamente aos controlos, que atinge igualmente machos e fêmeas, terá certamente subjacente a incapacidade do pâncreas em segregar apropriadamente insulina em resposta ao aumento da concentração da glucose, como sugerem os resultados da Figura 22, sendo como tal incapaz, após a ingestão da glucose, de suprimir a produção de glucose hepática e de promover a sua utilização pelos tecidos periféricos insulino-dependentes. Contudo, é ainda capaz de manter normal a glicemia do jejum cuja responsabilidade é atribuída maioritariamente à produção de glucose hepática e à utilização da glucose pelos tecidos não insulino-dependentes.

Em suma, os dados obtidos mostraram que os ratos GIR apresentam um síndrome semelhante ao da intolerância à glucose que se constitui, em humanos, como uma condição prévia ao desenvolvimento da DT2. Para além das alterações fisiológicas características deste estado, estes animais apresentam já disfunções do acoplamento estímulo-secreção na célula  $\beta$ -pancreática, constituindo assim um modelo adequado para o estudos das alterações celulares e moleculares precoces no desenvolvimento da patologia, que poderão no futuro contribuir para desenvolver estratégias de prevenção actualmente indisponíveis.

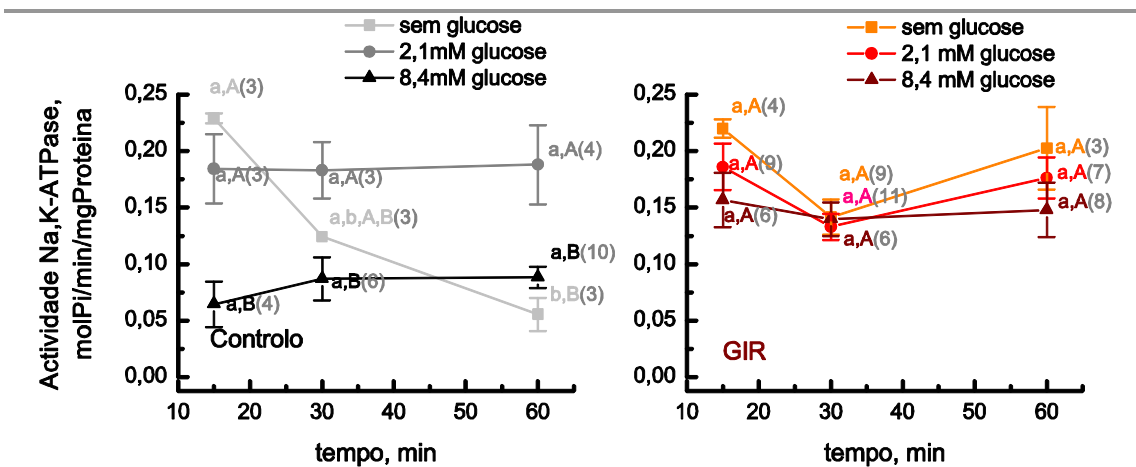
#### 3.2.4.3 DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE ENZIMÁTICA DA Na,K-ATPASE EM CULTURAS PRIMÁRIAS DE CÉLULAS $\beta$ -PANCREÁTICAS DE ANIMAIS CONTROLO E GIR.

Existem evidências na literatura que sugerem que a Na,K-ATPase é regulada por acção da glucose (Elmi *et al*, 2000a; Levin *et al*, 1978; Owada *et al*, 1999). Esta regulação poderá contribuir para a modulação fina da secreção de insulina, em particular, por poder afectar os mecanismos iónicos que estão na base do acoplamento estímulo-secreção (ver secção 1.2.5.2.4). Assim, o estudo da regulação da actividade da Na,K-ATPase pela glucose em células

$\beta$ -pancreáticas de GIR, os quais apresentam uma resposta ao estímulo por glucose significativamente diminuída, assume grande relevância.

Este estudo iniciou-se com a determinação da actividade enzimática da Na,K-ATPase em células  $\beta$ -pancreáticas de GIR e controlos na ausência de glucose e sujeitas a 2,1 mM e 8,4 mM deste nutriente, por períodos de 15, 30 e 60 min.

A Figura 23 mostra as curvas de progressão em função do tempo de incubação, com as concentrações de glucose referidas. Em células  $\beta$ -pancreáticas controlo (Figura 23-painel da esquerda), na ausência de glucose, a actividade enzimática da Na,K-ATPase foi de  $0,229 \pm 0,004$   $\mu\text{molPi}/\text{min}/\text{mgProt}$  aos 15 min, observando-se uma progressiva redução na actividade da mesma de 46% aos 30 min e de 76% aos 60 min, tomando os valores de  $0,124 \pm 0,000$  e  $0,056 \pm 0,015$   $\mu\text{molPi}/\text{min}/\text{mgProt}$ , respectivamente. Quando as células foram incubadas com 2,1 mM de glucose (Figura 23-painel da esquerda) não ocorreram alterações significativas da actividade enzimática da Na,K-ATPase, mantendo-se esta constante durante todo o intervalo de tempo estudado ( $0,184 \pm 0,030$ ,  $0,183 \pm 0,025$  e  $0,188 \pm 0,035$   $\mu\text{molPi}/\text{min}/\text{mgProt}$  para 15, 30 e 60 min, respectivamente).



**FIGURA 23 - Efeito do período de incubação na actividade enzimática da Na,K-ATPase em resposta a diferentes concentrações de glucose**

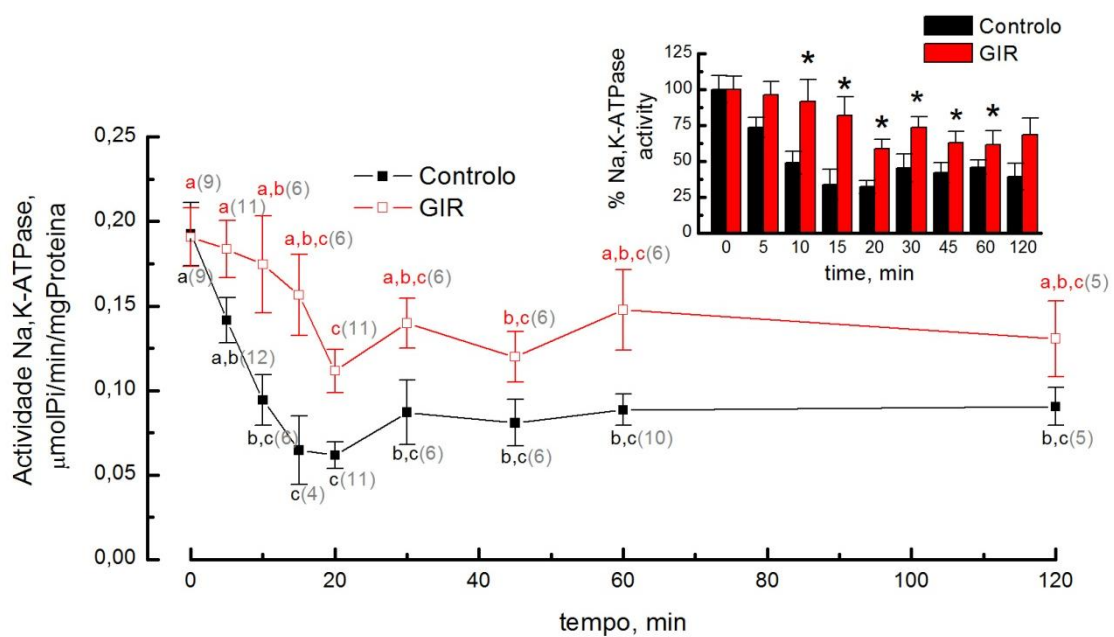
Foi analisada a actividade enzimática da Na,K-ATPase de células  $\beta$ -pancreáticas, mantidas em cultura primária, incubadas previamente sem glucose ou com 2,1 e 8,4 mM de glucose, em três diferentes tempos de incubação, 15, 30 e 60 min. O gráfico da esquerda corresponde aos resultados obtidos a partir de células  $\beta$ -pancreáticas dos controlos, enquanto o gráfico da direita apresenta os resultados obtidos em células  $\beta$ -pancreáticas dos GIR. Os resultados são representativos da média  $\pm$  epm de 3-11 experiências independentes (diferenças significativas para a mesma concentração de glucose representam-se por diferentes letras minúsculas, enquanto que as diferenças entre os valores obtidos por diferentes concentrações de glucose para o mesmo tempo se representam por diferentes letras maiúsculas; análise realizada com teste Tukey-Kramer, com  $p < 0,05$  por ANOVA).

O aumento da concentração de glucose para 8,4 mM provocou uma diminuição de actividade da Na,K-ATPase quando comparada com a registada em 2,1 mM de glucose, independentemente do período de incubação ( $0,064 \pm 0,040$ ,  $0,087 \pm 0,047$  e  $0,088 \pm 0,029$   $\mu\text{molPi}/\text{min}/\text{mgProt}$  para 15, 30 e 60 min de incubação, respectivamente, em 8,4 mM de glucose). Observando a variação dos valores de actividade em resposta a 8,4 mM de glucose ao longo do tempo, parece ocorrer um ligeiro aumento de actividade aos 30 e aos 60 min, mas as diferenças não foram significativas. Quando comparada com a actividade registada em 2,1 mM de glucose, constatou-se que a Na,K-ATPase apresentou menor actividade em resposta a 8,4 mM, sendo a diminuição de 53% a 65%.

No caso das células de GIR (Figura 23, painel da direita) a actividade enzimática da Na,K-ATPase foi semelhante aos 15 min de incubação, independentemente da concentração de glucose utilizada ( $0,220 \pm 0,008$ ,  $0,186 \pm 0,020$  e  $0,157 \pm 0,024$   $\mu\text{molPi}/\text{min}/\text{mgProt}$  para 0, 2,1 e 8,4 mM de glucose, respectivamente). O perfil de actividade em função do tempo também foi semelhante para as três concentrações de glucose estudadas e não se registaram diferenças significativas entre os valores da actividade da Na,K-ATPase, quando considerado o mesmo período de incubação para cada uma das diferentes concentrações do secretagogo utilizadas. De realçar também que a actividade da Na,K-ATPase em células de GIR foi semelhante à observada em controlos quando as incubações foram realizadas em 2,1 mM de glucose.

Em suma, estes resultados sugerem que a Na,K-ATPase, em ratos controlo, sofre regulação induzida pela glucose, sensível à concentração da mesma, e que esta regulação se encontra comprometida em animais GIR. Os resultados sugerem ainda haver, nos controlos, variação da actividade enzimática em função da duração do período de incubação em glucose. Assim, procedeu-se à realização de um estudo detalhado do perfil de actividade da Na,K-ATPase a um estímulo com 8,4 mM de glucose, bem como a um estudo dose-resposta utilizando concentrações de glucose no intervalo 0 a 11,1 mM.

A concentração de glucose escolhida para a realização do estudo do perfil de actividade da Na,K-ATPase foi 8,4 mM, realizando-se este estudo até aos 120 min. Nos resultados apresentados na Figura 24 pode observar-se que, para células de animais controlo, o perfil de actividade é bifásico. A actividade enzimática foi de  $0,193 \pm 0,019 \mu\text{molPi}/\text{min}/\text{mgProt}$  no tempo zero, sofrendo uma inibição máxima de 68% aos 20 min de incubação ( $0,062 \pm 0,008 \mu\text{molPi}/\text{min}/\text{mgProt}$ ), parecendo haver tendência para ocorrer uma ligeira recuperação para valores de aproximadamente 50-55%, que não foi, no entanto, estatisticamente significativa por aplicação do teste estatístico Tukey-Kramer.



**FIGURA 24 - Cinética do efeito da glucose (8,4 mM) na actividade enzimática da Na,K-ATPase**

Foi analisada a cinética da modulação da actividade enzimática da Na,K-ATPase de células  $\beta$ -pancreáticas por glucose. As células  $\beta$ -pancreáticas de animais controlo e GIR mantidas em cultura foram incubadas com 8,4 mM de glucose em diferentes intervalos de tempo, 0, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 e 120 min. A preto estão representados os resultados obtidos em células  $\beta$  de animais controlo e a vermelho os de células  $\beta$  de GIR. Os resultados são representativos da média  $\pm$  epm de 4-13 experiências independentes (letras diferentes correspondem a valores significativamente diferentes com  $p < 0,05$  por aplicação do teste Tukey-Kramer).

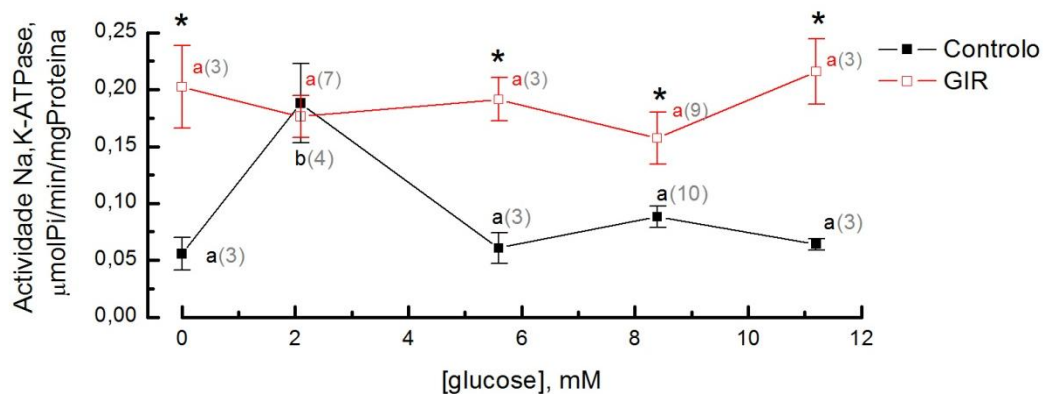
No gráfico de barras *inlet* podemos observar as diferenças em termos de percentagem de actividade enzimática da Na,K-ATPase entre as células  $\beta$ -pancreáticas de controlo e de GIR para o mesmo período de tempo (\* significa  $p < 0,05$  relativamente ao controlo, por ANOVA).

Nas células de GIR, o valor de actividade enzimática no tempo inicial foi semelhante à registada nas células de controlo ( $0,191 \pm 0,017 \mu\text{molPi}/\text{min}/\text{mgProt}$ ). Observou-se ainda, nos primeiros 15 min, um período de latência, onde não se observou inibição, seguido de uma inibição de cerca de 40% aos 20 min de incubação (Figura 24). Quando comparada com a dos controlos, a inibição da actividade enzimática da Na,K-ATPase observada nos GIR foi

significativamente inferior (40% e 68% em GIR e controlos, respectivamente), e transitória, sendo a actividade enzimática a partir dos 30 min equivalente à inicial. A actividade da bomba tendeu a ser mais elevada em GIR que em controlos durante todo o período de tempo estudado, sendo a diferença significativa entre os 10 e os 60 min após estimulação com 8,4 mM de glucose (ver Figura 24-*inlet*). O perfil de actividade da Na,K-ATPase em GIR apresenta-se modificado relativamente ao de controlos, sendo a resposta da bomba à mesma concentração de glucose tardia e significativamente atenuada.

Os dados anteriormente apresentados apontam também para alterações da sensibilidade à glucose das células  $\beta$ -pancreáticas de GIR, que resultam numa deficiente modulação da Na,K-ATPase (Figura 23 e Figura 24), impondo-se a necessidade de efectuar um estudo dose-resposta. Para este estudo foi escolhido um período de incubação de 60 min, em que o efeito inibitório parece ter atingido o estado estacionário, tendo sido estudado o efeito de concentrações de glucose de 0 a 11,1 mM.

A curva dose-resposta das células controlo apresentou um carácter bimodal, com um aumento de 70% na actividade enzimática da Na,K-ATPase para concentração entre 0 e 2,1 mM de glucose, atingindo-se assim o valor máximo de actividade da bomba (ver Figura 25). O aumento da concentração de glucose de 2,1 mM para 5,6 mM induziu uma inibição de 68%, mantendo-se a bomba inibida para as restantes concentrações de glucose estudadas (8,4 e 11,1 mM ) (ver Figura 25).



**FIGURA 25 - Estudo dose-resposta do efeito da concentração de glucose na actividade da Na,K-ATPase**

Foi analisada a actividade enzimática da Na,K-ATPase de células  $\beta$ -pancreáticas, mantidas em cultura primária, incubadas previamente a diferentes concentrações de glucose (0, 2,1, 5,6, 8,4, 11,2 mM) durante 60 min. A preto estão representados os resultados obtidos em células  $\beta$  de animais controlo e a vermelho os de células  $\beta$  de GIR. Os resultados são representativos da média  $\pm$  epm de 3-10 experiências independentes (médias significativamente diferentes são representadas por letras diferentes dentro do mesmo grupo e por \* entre grupos, para a mesma concentração de glucose; análise cruzada por Tukey-Kramer, com  $p < 0,05$ ).

A actividade enzimática da Na,K-ATPase determinada em células de GIR manteve-se constante, num patamar, independentemente da concentração de glucose (Figura 25). Com excepção da concentração de 2,1 mM de glucose, em que a actividade enzimática da bomba determinada para as células controlo tem magnitude equivalente à das células de GIR ( $0,188 \pm 0,035$  e  $0,176 \pm 0,048$   $\mu\text{molPi}/\text{min}/\text{mgProt}$  para células de controlo e GIR respectivamente), a actividade da bomba foi sempre significativamente superior nas células de GIR relativamente às controlo (Figura 25).

Em resumo, observou-se que o efeito dose-resposta da glucose sobre a actividade da Na,K-ATPase foi diferente em células de GIR e controlo. Enquanto que em GIR não houve variação na actividade da Na,K-ATPase em função da concentração de glucose, o mesmo estudo, em controlos, apresentou uma relação bimodal, observando-se uma activação da bomba quando a concentração de glucose foi aumentada para 2,1 mM comparando com uma situação de ausência do segretagogo e uma inibição para concentrações de glucose iguais ou superiores a 5,6 mM, no intervalo estudado. No seu conjunto, estes resultados revelam que a modulação da Na,K-ATPase por glucose é complexa e que se encontra alterada em GIR.

O estudo cinético realizado permitiu ainda mostrar que o perfil de inibição tem um carácter bifásico nos controlos, um aspecto inteiramente novo de regulação da bomba pela glucose. Curiosamente, o perfil identificado apresenta algumas características temporais que se sobrepõem com o perfil bifásico de secreção da insulina, em que ocorre numa primeira fase um aumento rápido e transitório da secreção de insulina, seguido de um declínio (apesar da não haver interrupção na estimulação) a que se segue um aumento gradual da libertação da hormona (Jones & Persaud, 2010). Tem ainda semelhanças com o perfil bifásico da actividade eléctrica, observado na estimulação por glucose na gama fisiológica, em que se observa transitoriamente uma actividade eléctrica mais intensa, seguido de um decréscimo para um patamar intermédio (Antunes *et al*, 2000). Sendo a actividade da Na,K-ATPase inibida por acção da glucose, esta poderá contribuir para a despolarização e, portanto, para o padrão característico da actividade eléctrica e da secreção de insulina estimulada por glucose nas células  $\beta$ -pancreáticas.

Para além disso, mostrou-se também que o perfil cinético de inibição da Na,K-ATPase se apresenta atenuado em células  $\beta$ -pancreáticas de GIR, sendo a actividade da bomba superior à registada nos controlos durante todo o período de tempo estudado. Os resultados mostram que, após a estimulação por glucose, a Na,K-ATPase em células de GIR não

apresentou o mesmo grau de inibição que as dos controlos, o que poderá contribuir para uma atenuação da despolarização induzida por glucose e, conseqüentemente, para eventuais perturbações do potencial de membrana, já observadas em ilhéus de ratos GK (Antunes *et al*, 2002), reforçando a relevância da Na,K-ATPase para a regulação da secreção de insulina na célula  $\beta$ -pancreática.

Por outro lado, tomando em conta resultados apresentados na Figura 23, onde se registou uma diminuição progressiva da actividade da Na,K-ATPase ao longo do tempo na ausência de glucose, ou seja, em situação de depleção metabólica, e os dados da literatura que mostram um decréscimo significativo dos níveis intracelulares de ATP na mesma situação, em célula  $\beta$ -pancreática (Detimary *et al*, 1996b), poder-se-á pensar que a inibição da bomba nesta situação resulta da carência do substrato ATP.

Essa situação parece ter sido ultrapassada na presença de uma concentração de glucose de 2,1 mM, em que se observou uma actividade máxima da Na,K-ATPase. Os dados da bibliografia mostram que a concentração intracelular de ATP em ilhéus de Langerhans aumenta em resposta a uma estimulação com glucose no intervalo 0 - 6 mM, mantendo-se constante para concentrações de glucose superiores (Detimary *et al*, 1996b). Nesta situação, poder-se-á admitir que o aumento da concentração de ATP induzido por 2,1 mM de glucose seja suficiente para manter a actividade da Na,K-ATPase em valores máximos.

Ao contrário do que seria de esperar, tendo em conta o aumento de ATP disponível (Detimary *et al*, 1996b), quando se aumentou a concentração de glucose para 5,6 mM ou superior, foi induzida uma diminuição da actividade da Na,K-ATPase para valores cerca de 3 vezes inferiores, quando comparado com o registado em 2,1 mM de glucose, o que sugere a existência de um mecanismo de regulação adicional que não é directamente dependente da concentração de ATP.

Em células  $\beta$ -pancreáticas de GIR a curva dose-resposta sugere que a bomba, contrariamente ao que acontece nos controlos, não é regulada por glucose, sendo a actividade registada independente da concentração deste nutriente. Nas condições experimentais utilizadas, observou-se que a actividade da bomba apresentou níveis semelhantes aos valores máximos observados no controlo, independentemente do estímulo aplicado.

Na ausência de glucose, ao contrário do que se registou nos controlos, não se observou decréscimo da actividade enzimática da Na,K-ATPase em função do tempo. Admitindo que a situação de depleção metabólica também ocorre nestas células, e

considerando que a diminuição de ATP deva ser da mesma ordem de grandeza, esperar-se-ia uma inibição da actividade da Na,K-ATPase. Porém, a actividade da bomba manteve-se sempre máxima (ver Figura 23 e Figura 25).

Sabendo que a Na,K-ATPase apresenta expressão isoenzimática e que os isoenzimas têm diferentes afinidades para o ATP, sendo que os constituídos pelas isoformas  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$  apresentam valores de  $K_M$  cerca de quatro vezes inferiores aos constituídos pela isoforma  $\alpha_1$  (Blanco & Mercer, 1998), e que esta expressão pode ser alterada por acção da insulina (Gerbi *et al*, 1999), cujos níveis plasmáticos do jejum estão aumentados nos GIR, é de admitir que as células destes animais possam expressar isoenzimas diferentes. Uma maior afinidade para o ATP poderia, portanto, explicar que a actividade se mantivesse máxima para uma concentração menor de ATP.

Para além disso, esta expressão isoenzimática diferencial poderá também contribuir para a ausência de efeito de concentrações iguais ou superiores a 5,6 mM de glucose, admitindo que os diferentes isoenzimas são regulados por mecanismos distintos. Alternativamente, sabendo-se que o efeito da glucose na actividade da Na,K-ATPase depende da metabolização da mesma (Owada *et al*, 1999) e que estão descritas, num modelo animal da DT2 (ratos GK), alterações ao transporte (Ohneda *et al*, 1993) e metabolização da glucose (Giroix *et al*, 1993; Khan *et al*, 1994), não é de desconsiderar a possibilidade de os sinais metabólicos que conduzem à modulação da actividade da Na,K-ATPase por glucose, observada em células dos animais controlo, poderem estar silenciados ou atenuados nas células de GIR.

Em resumo, os resultados aqui apresentados, pelo facto de ter sido utilizada uma gama mais alargada de concentrações de glucose e ter coberto um período de tempo superior, permitiram observar uma concordância com os dados da literatura, onde se mostrou alternativamente uma inibição da actividade da Na,K-ATPase em resposta ao aumento da concentração de glucose de 3 para 15 mM num período de 10 min (Owada *et al*, 1999) ou de 3 para 16,7 mM (Levin *et al*, 1978), e uma activação em resposta a um aumento da concentração de 0 para 20 mM, ao fim de 60 min (Elmi *et al*, 2000a). Os resultados mostram ainda que a acção reguladora da glucose sobre a actividade da bomba é complexa, tendo por base, por um lado, a regulação da disponibilidade de substrato, e por outro um mecanismo ainda não elucidado, provavelmente resultante da activação de sinalização intracelular.



Finalmente, mostrou-se ainda que o efeito da glucose sobre a actividade da Na,K-ATPase está comprometido em GIR. Os resultados obtidos sugerem que, subjacentes a estas modificações podem estar alterações da expressão isoenzimática e/ou um desacoplamento na cascata de sinalização responsável pela regulação.

### 3.2.5 Conclusões

Neste capítulo procurou-se estudar a modulação da actividade da Na,K-ATPase por glucose em célula  $\beta$ -pancreática de animais controlo e GIR, o que também obrigou à caracterização destes últimos comparativamente aos controlos. Os resultados permitiram formular as seguintes conclusões:

- a) Os ratos GIR, apesar de normoglicémicos no jejum, apresentaram hiperinsulinemia e anomalias na PTGO, características de um estado pré-diabético;
- b) As células  $\beta$ -pancreáticas de GIR apresentaram uma resposta, em termos de secreção de insulina estimulada por glucose, diminuída quando comparada com a das células  $\beta$ -pancreáticas de animais controlo;
- c) Os ratos GIR, pelas características apresentadas, constituem um modelo adequado para estudar as alterações celulares e moleculares prévias ao aparecimento da DT2;
- d) Nos controlos, a glucose exerceu um efeito inibitório na actividade da Na,K-ATPase no intervalo de concentrações de 5,6 a 11,1 mM;
- e) A efeito inibitório da glucose (8,4mM) na actividade da Na,K-ATPase, nos controlos, apresentou dependência do tempo de incubação. O perfil da inibição da Na,K-ATPase por glucose em célula  $\beta$ -pancreática teve um carácter bifásico, registando-se a inibição máxima de 68% aos 20 min;
- f) Em controlos, a acção da glucose sobre a actividade da Na,K-ATPase revelou-se dependente da concentração de glucose e apresentou um carácter bimodal, tendo-se registado um pico de actividade máximo para 2,1 mM;

- g) Em GIR, o perfil da inibição da Na,K-ATPase apresentou modificações, sendo a resposta da Na,K-ATPase retardada e atenuada (40% aos 20 min) para a mesma concentração de glucose;
- h) A actividade da bomba nos GIR mostrou-se independente da concentração de glucose, observando-se valores semelhantes ao valor máximo registado nos controlos.

Concluimos, assim, que a glucose parece exercer um efeito regulador sobre a actividade da Na,K-ATPase e que essa regulação se encontra alterada nos GIR, o que poderá ter consequências para as etapas iniciais do acoplamento estímulo-secreção em célula  $\beta$ -pancreática, contribuindo para as alterações da secreção de insulina, observadas em células destes animais. Por estes motivos, considera-se relevante o estudo dos mecanismos subjacentes à regulação da actividade da Na,K-ATPase por glucose em célula  $\beta$ -pancreática.

### 3.3 ESTUDO DA EXPRESSÃO ISOENZIMÁTICA DA Na,K-ATPASE EM ILHÉUS DE LANGERHANS DE ANIMAIS CONTROLO E GIR

#### 3.3.1 Introdução

Os resultados apresentados na secção anterior mostram que a glucose promove uma regulação da actividade da Na,K-ATPase célula- $\beta$  pancreática, que se traduz numa inibição da actividade da bomba para concentrações de glucose no intervalo de 5,6 a 11,1 mM. Para além disso sugerem também que esta regulação está alterada em células  $\beta$ -pancreáticas de GIR, onde parece ter sido abolida a inibição induzida por glucose. Adicionalmente, também se observou uma resposta distinta entre as células controlo e de GIR à ausência de glucose, que se caracterizou por uma inibição da Na,K-ATPase em resposta à depleção metabólica a qual não se registou em GIR. Para estas diferenças, no seu conjunto, poderão contribuir alterações da expressão isoenzimática da Na,K-ATPase, nomeadamente o nível de expressão e/ou distribuição isoenzimática, ou do desacoplamento/disfunção das vias de sinalização que promovem a inibição da bomba induzida por glucose.

Noutros tecidos, a regulação da Na,K-ATPase é complexa e são vários os mecanismos que podem estar implicados nessa regulação (ver secção 1.1.2), sendo um desses níveis o da regulação da expressão isoenzimática. Existem várias isoformas para as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ , bem como várias hipóteses de conjugação  $\alpha\beta$ , originando isoenzimas distintos. Tem-se observado que a expressão dos isoenzimas é específica para diferentes tecidos ou linhagens celulares e que, de acordo com a constituição em isoformas, apresentam propriedades catalíticas diferentes (ver secção 1.1.2.2.3), nomeadamente os isoenzimas que são constituídos pela isoforma  $\alpha_1$  apresentam uma menor afinidade para o ATP, comparativamente aos que são constituídos por  $\alpha_2$  ou  $\alpha_3$ . A modificação da expressão isoenzimática pode também resultar na acção diferenciada das vias de sinalização intracelular que actuam sobre a Na,K-ATPase, não sendo de prever, pelas sequências primárias distintas das diferentes isoformas, que os motivos de fosforilação sejam equivalentes (ver secção 1.1.2.5).

A bibliografia indica que a insulina constitui um dos estímulos que está na base da regulação da expressão isoenzimática da Na,K-ATPase, sendo que o aumento ou diminuição da

expressão de determinada isoforma é específico dos diferentes tecidos ou células. Há ainda alguns estudos que apontam para a ocorrência de alterações da expressão isoenzimática das subunidades da Na,K-ATPase na diabetes em diferentes tecidos ou órgãos (ver secção 1.1.3.1 e Tabela 1). Sabendo-se que os indivíduos diabéticos apresentam níveis de insulinemia alterados, é de admitir que esta condição possa contribuir para a modificação da proporção relativa dos isoenzimas nesses tecidos.

No ilhéu de Langerhans, existem evidências na literatura que descrevem a existência da subunidade  $\alpha_1$ -Na,K-ATPase mas desconhece-se a expressão de outras isoformas. Torna-se assim relevante analisar a expressão isoenzimática, em ilhéus de animais normotolerantes e de animais intolerantes à glucose.

### 3.3.2 Objectivos

Uma vez que a expressão isoenzimática poderá constituir um dos factores relevantes para a sensibilidade diferenciada da Na,K-ATPase à glucose, o principal objectivo deste capítulo foi analisar a expressão isoenzimática em ilhéus de Langerhans de ratos controlo e GIR e averiguar a existência de alterações nessa expressão isoenzimática. Para isso, recorreu-se à técnica da imuno-histoquímica por constituir uma ferramenta que não só permite uma avaliação semi-quantitativa dos níveis de expressão, como permite também situá-los na estrutura morfológica do tecido. Procurou-se então:

- a) Identificar as isoformas das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  da Na,K-ATPase expressas em ilhéus de Langerhans de ratos controlo e GIR. Foram utilizados anticorpos contra as isoformas  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  e  $\beta_2$  da Na,K-ATPase para identificar a sua presença no tecido;
- b) Analisar semi-quantitativamente a expressão das isoformas da Na,K-ATPase identificadas ao nível do ilhéu de Langerhans, de ratos controlo e GIR. Efectuou-se uma análise por critério visual e, sempre que possível, por morfometria;
- c) Efectuar a análise comparativa da distribuição isoenzimática da Na,K-ATPase nos ilhéus de Langerhans de animais controlo e GIR;
- d) Determinar, no tecido do ilhéu de Langerhans, a localização ao nível celular das diferentes isoformas da Na,K-ATPase previamente identificadas. As células  $\alpha$  e  $\beta$ -

pancreáticas foram identificadas pela imunoreacção com as suas respectivas hormonas.

### 3.3.3 Metodologias

O principal método utilizado neste capítulo foi a imuno-histoquímica. Esta é uma técnica de marcação imunológica aplicada a secções de tecido que permite a avaliação da expressão de proteínas de interesse e simultaneamente o relacionamento das zonas de expressão com a estrutura morfológica do tecido (Ramos-Vara, 2005). Foram utilizadas duas variantes desta técnica, a imuno-histoquímica simples, no qual se utiliza apenas um anticorpo primário, dirigido a uma proteína específica, e a imuno-histoquímica dupla, em que são utilizados dois anticorpos primários diferentes, com sistemas de detecção distintos, de forma a que a expressão de duas proteínas de interesse possa ser localizada simultaneamente com cromogéneos diferentes.

#### 3.3.3.1 REAGENTES

Os reagentes foram adquiridos à firma Sigma-Aldrich (USA), salvo indicação em contrário. Os anticorpos utilizados serão referidos na secção seguinte, na descrição da sua utilização.

#### 3.3.3.2 MODELOS ANIMAIS

Os modelos animais utilizados foram o rato Wistar, utilizado como controlo, e o modelo intolerante GIR, já caracterizado na secção 3.2.4.1.

Foram utilizadas fêmeas com 12-14 semanas, do biotério do Departamento de Química da Universidade de Évora. Os animais foram mantidos num regime de foto-período normal, com água e alimentação *ad libitum*, de acordo com as indicações da Portaria nº 1005/92 de 23 de Outubro.

### 3.3.3.3 PREPARAÇÃO DAS SECÇÕES DE TECIDO PANCREÁTICO

Para a realização das análises por imuno-histoquímica foram extraídos pâncreas de animais controlo e GIR, com 14 semanas, eutanasiados por punção cardíaca terminal sob anestesia com éter. Os pâncreas foram fixados em formaldeído neutro a 10%, tamponado com tampão de fosfatos (pH 7,4), durante 24 horas. De seguida procedeu-se ao seu processamento pelas técnicas histológicas de rotina, em sistema automático: inclusão em parafina e corte em micrótomo rotativo, em secções com 5 µm de espessura, trabalho este que decorreu no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Veterinário da Universidade de Évora. Os cortes foram estendidos em lâminas de vidro com revestimento de poli-L-lisina.

### 3.3.3.4 IMUNO-HISTOQUÍMICA DE TECIDO PANCREÁTICO

As lâminas com os cortes de tecido pancreático foram então preparadas para a aplicação da técnica de imuno-histoquímica. O processo iniciou-se com a desparafinização e hidratação do tecido, que se consegue fazendo passar as lâminas por xilol e depois por uma série de soluções etanólicas de concentração decrescente e, por último, por água destilada. Foi ainda necessário proceder à recuperação do antigénio, passo este que resulta de incubar as lâminas em tampão de citratos 0,01 M, pH 6,0, a 95°C, durante 10 min, seguindo-se o arrefecimento das lâminas e a lavagem em PBS<sup>10</sup>.

Procedeu-se, em seguida, ao bloqueio da peroxidase endógena por incubação das lâminas numa solução de peróxido de hidrogénio em metanol 1:9 (v/v), durante 10 min, iniciando-se em seguida o processo de marcação imunológica propriamente dito, que consistiu em marcação simples ou em marcação dupla, consoante o objectivo experimental.

#### 3.3.3.4.1 IMUNO-MARCAÇÃO SIMPLES

Para a marcação simples recorreremos ao kit *UltraVision Detection System Anti-Polyvalent, HRP/DAB* (Thermo Scientific). O procedimento iniciou-se com a utilização da

---

<sup>10</sup> PBS – Tampão de fosfatos salino (em mM: NaCl 137, KCl 2,7, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 8,1, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,76; pH 7,4)

solução de bloqueio, aplicada durante 10 min, e que tem como objectivo ocupar os locais de ligação proteica na superfície do tecido para evitar a ligação inespecífica do anticorpo primário. Segue-se a incubação do anticorpo primário que ocorreu durante 1h, à temperatura ambiente, em câmara húmida. Utilizaram-se os anticorpos anti- $\alpha_1$ -NaK-ATPase (diluição 1:200, preparado em ratinho, A-277, SIGMA), anti- $\alpha_2$ -Na,K-ATPase (diluição 1:200, preparado em coelho, AB9094, Millipore), anti- $\alpha_3$ -Na,K-ATPase (diluição 1:200, preparado em ratinho, A-276, SIGMA) e anti- $\beta_2$ -Na,K-ATPase (diluição 1:200, preparado em coelho, A 3979, SIGMA), diluídos em PBS. Os controlos negativos foram realizados por omissão do anticorpo-primário e aplicação de volume equivalente de PBS. Lavaram-se as lâminas em PBS e adicionou-se, em seguida, o anticorpo secundário biotinilado (que é um anticorpo preparado em cabra e que liga tanto a anticorpos produzidos em ratinhos como em coelhos, disponibilizado no kit), sendo a incubação de 20 min. Seguiu-se, após lavagem das lâminas em PBS, a adição da streptavidina-peroxidase, que se liga ao anticorpo secundário devido à forte afinidade entre a biotina-streptavidina, permitindo a ligação ao complexo de anticorpos do enzima peroxidase de rábano, sendo o tempo de incubação de 10 min. Por último, e também após lavagem das lâminas com PBS, realizou-se a reacção enzimática com o cromogéneo DAB (diaminobenzidina), substrato da peroxidase de rábano, reacção essa que decorreu durante 15 min e que foi terminada por enxaguamento das lâminas em água destilada. Este cromogéneo permite a visualização da expressão da proteína de interesse com coloração castanha.

Após a imunomarcação, realizou-se ainda a contrastação dos núcleos com aplicação do corante hematoxilina, cerca de 1 min, que se enxagua de seguida com água da torneira abundante. Colocaram-se então as lâminas em PBS, cerca de 30 segundos, o que permitiu que o corante adquirisse a coloração azul característica. Seguiu-se a lavagem do PBS com água destilada.

Para a montagem definitiva das lâminas, há que fazer a desidratação do tecido, sujeitando as lâminas a uma série etanólica inversa da realizada no início, terminando com a passagem das lâminas por xilol. Fez-se então a montagem final das lâminas utilizando uma lamela de vidro e uma resina (bálsamo do Canadá, Thermo Fisher Scientific).

#### 3.3.3.4.2 IMUNO-MARCAÇÃO DUPLA

Para a marcação dupla foi utilizado o *kit de coloração dupla PicTure™, Sistema de detecção de polímeros da Zymed* (ZYMED LABORATORIES Inc.). A coloração dupla é possível

neste kit pela utilização de dois anticorpos secundários diferentes, marcados com enzimas diferentes. Um deles é produzido em cabra e reconhece anticorpos de ratinho ou de rato, e tem ligado o enzima peroxidase de rábano. O outro, também produzido em cabra, reconhece anticorpos produzidos em coelho ou em porquinho-da-índia, e tem associado o enzima fosfatase alcalina. Os anticorpos primários e os dois anticorpos secundários deverão ser aplicados ao mesmo tempo na preparação, sendo apenas as reacções com os substratos realizadas sequencialmente.

Quanto à sequência dos procedimentos, a marcação iniciou-se com o bloqueio, que ocorreu durante 10 min, seguindo-se a incubação com os anticorpos primários. Na marcação dupla insulina/ $\alpha_2$ -Na,K-ATPase utilizaram-se os anticorpos anti-insulina (1:2000, anticorpo preparado em ratinho, BT53-3033-39, Biltres) e anti- $\alpha_2$ -Na,K-ATPase (diluição 1:200, preparado em coelho, AB9094, Millipore) enquanto que para a marcação dupla insulina/glucagina foram utilizados os anticorpos anti-insulina (1:100, anticorpo preparado em porquinho da índia, Zymed-18-0067) e anti-glucagina (1:2000, preparado em ratinho, SIGMA, G-2654). Realizaram-se controlos negativos sem os dois anticorpos e com apenas um dos anticorpos, substituindo o outro em falta por PBS. A incubação dos anticorpos primários durou 1h, tendo sido realizada à temperatura ambiente, em câmara húmida. As lâminas foram depois lavadas em PBS e realizou-se a incubação com os anticorpos secundários, que foram aplicados simultaneamente a cada preparação, durante 30 min. Lavaram-se novamente as lâminas em PBS e iniciou-se o processo de revelação, primeiro com o cromogéneo DAB, substrato da peroxidase de rábano, durante 10 min, reacção que foi interrompida por lavagem das lâminas em água destilada e, por último, a reacção com o cromogéneo *Fast Red*, substrato da fosfatase alcalina, durante 20 min, sendo também a reacção parada por enxaguamento das lâminas em água destilada.

Os cromogéneos DAB e *Fast Red* permitem a visualização das proteínas marcadas a castanho e a rosa, respectivamente. Realizou-se, em seguida, a contrastação dos núcleos com hematoxilina, em procedimento equivalente ao realizado para as lâminas de marcação simples. Contudo, a fase da montagem das preparações definitivas tem que ser diferente, uma vez que o produto da reacção do *Fast Red* é solúvel em etanol. Realiza-se então uma montagem em meio aquoso, utilizando um componente do kit, o *Cleramount* que se aplica em fase líquida sobre toda a preparação e que, por aquecimento (de um dia para o outro a 37°C ou durante 30-60 min a 60°C), polimeriza, formando uma lamela de cobertura endurecida sobre a preparação.



### 3.3.3.5 CAPTAÇÃO E ANÁLISE DAS FOTOMICROGRAFIAS

As lâminas foram examinadas por microscopia óptica com um microscópio Nikon Eclipse 600 equipado com uma câmara digital (Nikon DN100) para obtenção das fotomicrografias.

Quando o tipo de marcação apenas permitiu a realização de análise qualitativa, foram analisadas uma média de seis fotografias por lâmina em diferentes ampliações, registando-se a intensidade da coloração com uma escala qualitativa (+=fraca; ++=moderada; +++=forte). Foi depois calculado o resultado ponderado da avaliação qualitativa em cada situação.

Quando o tipo de marcação permitiu a realização de análise quantitativa, utilizou-se então o *software* SIGMA SCAN PRO 5 para realizar a análise das áreas marcadas e das áreas totais dos ilhéus de Langerhans, tendo sido medida em cada uma das situações o número de píxeis totais e o número de píxeis correspondentes às áreas imunomarcadas. Foram analisadas entre cinco e dez imagens de cada uma das lâminas.

### 3.3.3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A avaliação do significado estatístico da diferença entre os valores médios de dois grupos de resultados foi realizado por análise de variância (ANOVA), realizada no programa Microsoft Excel. Em todos os casos um valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

Os resultados foram apresentados como valores médios  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m.). O erro padrão da média foi considerado mais apropriado que o desvio padrão pelo facto de se pretender comparar as médias.

Os gráficos foram realizadas no programa ORIGIN Pro8 (OriginLab Corporation, USA).

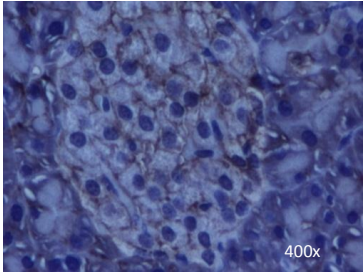
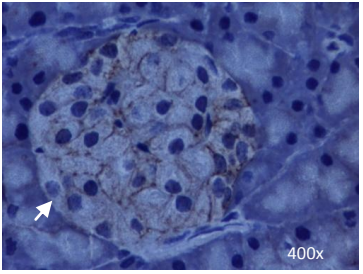
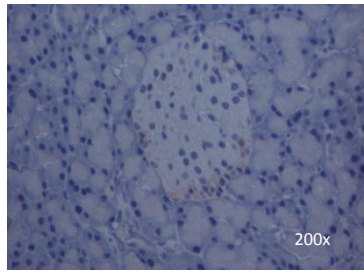
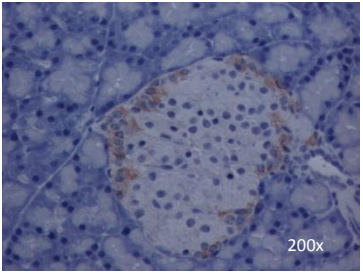
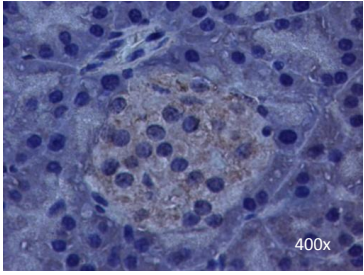
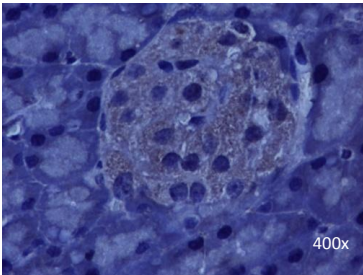
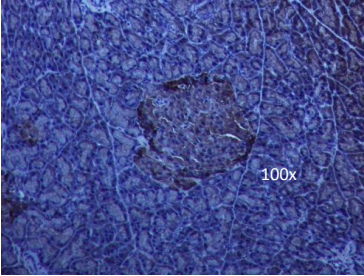
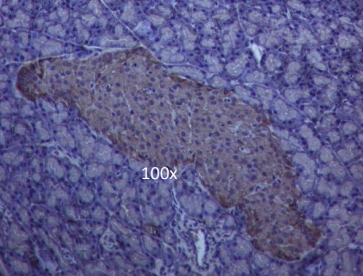
### 3.3.4 Resultados e Discussão

Neste trabalho procurou-se investigar a distribuição isoenzimática da Na,K-ATPase em ilhéus de Langerhans de animais controlo e GIR. Para isso, foram realizados procedimentos de imuno-histoquímica para a marcação imunológica das isoformas das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  da Na,K-ATPase para as quais estão disponíveis comercialmente anticorpos para rato:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  e  $\beta_2$ .

A Figura 26 apresenta fotomicrografias representativas de campos das secções de tecido, onde estão presentes ilhéus de Langerhans, que foram sujeitas a imunomarcação com os anticorpos contra as isoformas  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  e  $\beta_2$  das subunidade  $\alpha$  e  $\beta$  da Na,K-ATPase. Pode observar-se que ocorreu marcação imunológica positiva nos ilhéus de Langerhans para todas as isoformas estudadas ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  e  $\beta_2$ ), quer em controlos, quer em GIR, o que significa que todas elas são expressas neste tecido, como pode constatar-se pela coloração castanha observada em todas as fotomicrografias apresentadas na Figura 26.

A isoforma  $\alpha_1$ -Na,K-ATPase surgiu maioritariamente localizada nas membranas celulares nas células do ilhéu (Figura 26) independentemente de se tratar de tecidos de controlo ou GIR. Nas células da zona central do ilhéu a marcação para a isoforma  $\alpha_1$  apresentou intensidade semelhante nas secções de tecido de controlos e GIR. Contudo, nas células da periferia do ilhéu, registou-se marcação mais intensa nos controlos do que nos GIR (ver Figura 26, seta branca), sugerindo uma diminuição de expressão de  $\alpha_1$ -Na,K-ATPase em GIR.

A marcação para a isoforma  $\alpha_2$ -Na,K-ATPase surgiu dispersa nas células imuno-positivas e não estritamente na membrana plasmática, quer em controlo quer em GIR (Figura 26). Esta isoforma parece pouco expressa em ilhéus de Langerhans dos controlos, tendo-se observado apenas em cerca de 60% dos ilhéus analisados. Para além disso, surgiu apenas na periferia dos ilhéus. Pelo contrário, as secções de pâncreas de GIR analisadas apresentaram marcação imunológica intensa para esta isoforma e também exclusivamente localizada na periferia dos ilhéus de Langerhans (Figura 26).

	Controlo		GIR	
	Fotomicrografias	Análise Semi-Quant.	Fotomicrografias	Análise Semi-Quant.
$\alpha_1$		+++		++
$\alpha_2$		+		+++
$\alpha_3$		++		++
$\beta_2$		++		++

**FIGURA 26 - Análise qualitativa e semi-quantitativa da expressão nos ilhéus de Langerhans das isoformas  $\alpha_1$ ,  $\alpha_3$  e  $\beta_2$  da Na,K-ATPase, em secções de pâncreas de ratos controlo e GIR, analisadas por imuno-histoquímica**

Foram analisadas por imuno-histoquímica secções de tecido pancreático de animais controlo e GIR (cinco animais por cada grupo), tendo sido utilizados anticorpos primários contra as subunidades da Na,K-ATPase  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  e  $\beta_2$ . A seta indica uma área em que a marcação da periferias do ilhéu é menos intensa. Analisou-se uma média de seis fotomicrografias por lâmina em diferentes ampliações e analisou-se visualmente a intensidade da coloração com uma escala semi-quantitativa (+=fraca; ++=moderada; +++=forte). Na figura apresentam-se fotomicrografias representativas das diferentes situações e o resultado ponderado da avaliação qualitativa em cada situação.

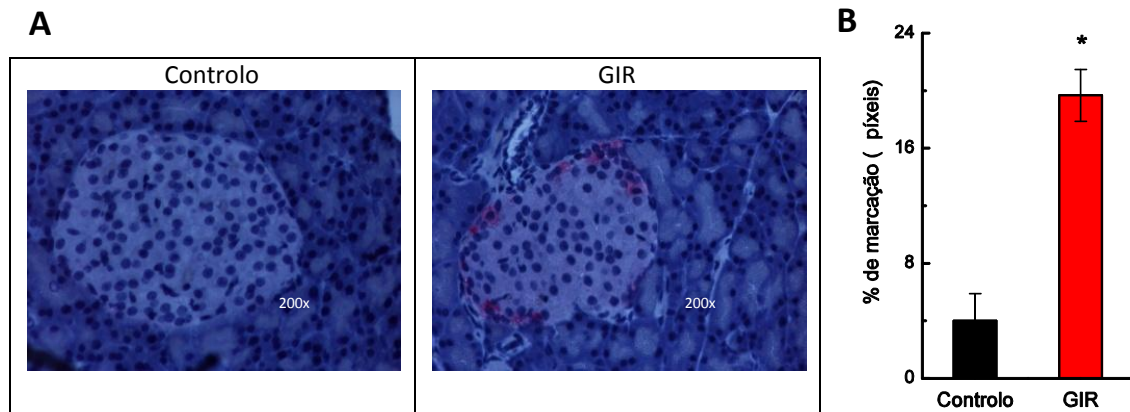
Relativamente à marcação para a isoforma  $\alpha_3$ -Na,K-ATPase, nos controlos, observou-se que surgiu marcação dispersa nas células e de elevada intensidade por todo o ilhéu de Langerhans (ver Figura 26). Nas secções de tecido de GIR, à semelhança de que se observou nos controlos, a marcação para esta isoforma também se revelou dispersa nas células e por todo o ilhéu. Não se registaram, por análise visual das lâminas, alterações do nível da expressão desta isoforma entre os ilhéus de ratos controlo e GIR (ver Figura 26).

No que diz respeito à subunidade  $\beta$ , a marcação para a isoforma  $\beta_2$ - Na,K-ATPase surgiu dispersa pela célula e também por todo o ilhéu, mas com coloração mais intensa na periferia, quer em controlos, quer em GIR. Para além disso, não se verificaram diferenças aparentes na intensidade da marcação entre lâminas de animais controlo e GIR (ver Figura 26).

Em suma, os resultados mostraram que os ilhéus de Langerhans expressam as isoformas  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  e  $\beta_2$  da Na,K-ATPase, independentemente de se tratar de controlos ou GIR. Para além disso, sugerem ainda que a relação entre a expressão de  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  esteja invertida em GIR, sendo que  $\alpha_1$  apresentou uma expressão diminuída e  $\alpha_2$  uma expressão aumentada, relativamente aos controlos, sugerindo uma alteração da expressão isoenzimática da Na,K-ATPase.

No ilhéu de Langerhans a isoforma  $\alpha_2$ , cuja expressão apresentou a maior diferença entre controlos e GIR, foi encontrada preferencialmente associada à periferia do mesmo. Este aspecto, juntamente com o facto de, no mesmo sentido dos resultados apresentados na Figura 26, esta isoforma se encontrar distribuída por toda a célula, permitiu efectuar uma análise semi-quantitativa da sua expressão, recorrendo a um *software* de análise de imagem.

A Figura 27 mostra fotomicrografias representativas da marcação imunológica da isoforma  $\alpha_2$  da Na,K-ATPase em ilhéus de Langerhans de tecido pancreático de controlos (Figura 27-A-painel da esquerda) e GIR (Figura 27-A-painel da direita) e os resultados obtidos da análise morfométrica para a expressão desta isoforma (Figura 27-B). Observou-se que a percentagem de área marcada em animais GIR foi cerca de 5 vezes superior à observada para animais controlo.



**FIGURA 27 - Quantificação da expressão da subunidade  $\alpha_2$ -Na,K-ATPase, em secções de tecido pancreático de ratos controlo e GIR, por análise das áreas marcadas em imuno-histoquímica**

Foram analisadas por imuno-histoquímica secções de tecido pancreático de animais controlo e GIR, sendo utilizado um anticorpo primário anti- $\alpha_2$ -Na,K-ATPase, um anticorpo secundário marcado com fosfatase alcalina e *Fast Red* como substrato. A expressão da isoforma  $\alpha_2$  da Na,K-ATPase surge assim com uma coloração rosada. Foram marcadas lâminas de cinco animais de cada grupo, que depois foram fotografadas com várias ampliações. Foram analisadas cerca de cinco imagens de cada uma das lâminas. No painel **A** apresentam-se fotografias das lâminas imunomarcadas, representativas das observadas para animais controlo e GIR. No painel **B** apresenta-se o gráfico que evidencia a percentagem de área marcada para as lâminas de pâncreas de animais controlo e de animais GIR (\*significa  $p < 0,05$ , por ANOVA).

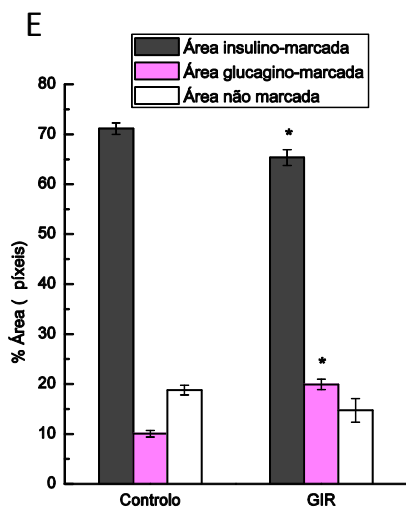
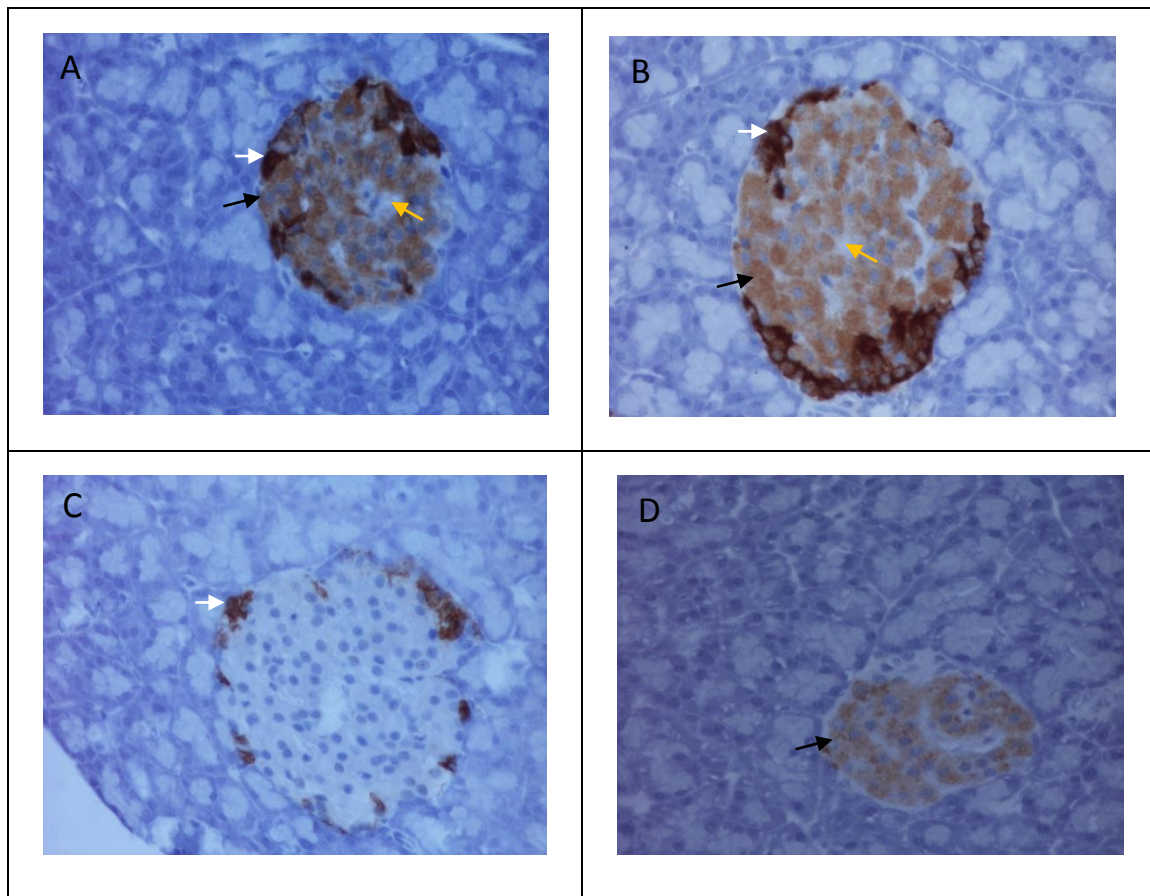
A isoforma  $\alpha_1$  é a mais ubíqua das isoformas da subunidade  $\alpha$  da Na,K-ATPase, estando presente na maioria dos tecidos (Blanco & Mercer, 1998). Existem referências da sua existência em células do ilhéu, onde tem sido utilizada como marcadora da fracção celular, obtida por centrifugação em gradiente, correspondente à membrana plasmática (Blanco & Mercer, 1998; Dotta *et al*, 1998; Yang *et al*, 1999).

Até à data não foram encontradas referências às isoformas  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$  em células do ilhéu de Langerhans, sendo o trabalho aqui apresentado, do que nos é dado a conhecer, pioneiro no que respeita ao esclarecimento da distribuição destas isoformas em ilhéu de Langerhans. A isoforma  $\alpha_2$  é predominantemente expressa em tecido muscular, esquelético e cardíaco, e em tecido cerebral, expressando-se na maioria dos tecidos (Blanco & Mercer, 1998), e também é expressa no ilhéu de Langerhans. Curiosamente, a isoforma  $\alpha_3$ , que surge principalmente associada ao tecido nervoso (Blanco & Mercer, 1998), também apresentou uma expressão significativa em células do ilhéu de Langerhans, o que provavelmente está relacionado com a natureza neuro-endócrina das células do ilhéu (Rojas *et al*, 2010).

Algumas isoformas da subunidade  $\alpha$  da Na,K-ATPase surgiram em zonas particulares dos ilhéus de Langerhans como é o caso da isoforma  $\alpha_2$  que surgiu apenas nas células da periferia. Na morfologia do ilhéu de rato as células  $\beta$ -pancreáticas constituem maioritariamente o centro do ilhéu e as células mais abundantes da periferia são as células  $\alpha$ -pancreáticas (Mescher, 2010), sugerindo que a subunidade  $\alpha_2$  se encontra maioritariamente em células  $\alpha$ , muito embora não seja possível excluir a possibilidade de também se encontrar nas células  $\beta$ . A necessidade de esclarecimento desta dúvida conduziu à realização de um estudo que permitisse distinguir as células  $\alpha$ - das  $\beta$ -pancreáticas. Para tal foi utilizada uma técnica de imuno-histoquímica de dupla marcação que permitiu identificar e distinguir áreas insulino- e glucagino-positivas.

A Figura 28 apresenta fotomicrografias representativas das obtidas para tecido pancreático de ratos controlo (A) e GIR (B), onde se podem observar as células  $\beta$ -pancreáticas com uma coloração rosada (com o cromogéneo *Fast Red*) e as células  $\alpha$ -pancreáticas coradas de castanho (com o cromogéneo DAB). Como se pode observar na Figura 28, a área insulino-positiva ocupa toda a zona central do ilhéu e também aparece na periferia (seta preta), enquanto que as glucagino-positivas aparecem exclusivamente na periferia do ilhéu (seta branca), independentemente de se tratar de ilhéus controlo ou GIR. As áreas não marcadas (seta amarela) podem corresponder a zonas de vascularização do ilhéu e/ou a outras células endócrinas, como as  $\delta$  ou as PP, do mesmo.

A análise visual comparativa entre as lâminas de tecido pancreático de controlo e GIR pareceu indicar que a área glucagino-positiva assumia uma proporção mais elevada em GIR, aspecto que se procurou avaliar quantitativamente. A análise morfométrica das fotomicrografias apresenta-se no gráfico-E da Figura 28. A percentagem de área insulino-positiva em ilhéus de ratos controlo foi de  $71,1 \pm 1,1\%$ , enquanto que em ilhéus de ratos GIR essa percentagem diminuiu significativamente para  $65,3 \pm 1,2\%$  (Figura 28-E). No que diz respeito às áreas glucagino-positivas a diferença é ainda mais expressiva, tendo-se observado um aumento para cerca do dobro em GIR ( $19,9 \pm 1,0$  e  $10,1 \pm 0,7$  % em GIR e controlo, respectivamente). Para além disso, quanto às áreas não marcadas, não se observaram diferenças significativas entre ilhéus de ratos controlo e GIR ( $18,79 \pm 0,99$  e  $14,74 \pm 2,36\%$ , em controlo e GIR, respectivamente). Estes resultados revelaram a existência de alterações significativas nas áreas insulino-positivas e glucagino-positivas entre os animais controlo e GIR.



**FIGURA 28 - Fotomicrografias e gráfico da análise quantitativa da dupla marcação insulina/glucagina**

Em A e em B apresentam-se fotomicrografias de ilhéus de secções de pâncreas de animais controlo e GIR, respectivamente, marcadas duplamente para insulina/glucagina. Nas figuras C e D apresentam-se controlos negativos parciais (C – utilizou-se o anticorpo anti-glucagina e D – utilizou-se o anticorpo anti-insulina). As zonas glucagino-marcadas surgem com uma coloração castanha escura (seta branca), as zonas insulino-marcadas surgem com uma coloração rosada (seta preta). As áreas não marcadas estão identificadas com uma seta amarela. Foram utilizadas secções de pâncreas de 4 animais controlo e de 5 animais GIR, tendo sido analisadas uma média de 10 fotomicrografias de cada um. No gráfico E apresentam-se as % de áreas analisadas. Os resultados estão apresentados como a média±epm (\* significa  $p < 0,05$ , por ANOVA, relativamente ao controlo).

Assim, observou-se que as áreas insulino-marcadas, que correspondem a zonas onde se localizam células- $\beta$  pancreáticas, se encontram diminuídas em cerca de 10% em GIR. Esta é uma característica das alterações morfológicas do ilhéu na DT2 (Clark, 2010;Seiça *et al*, 2004;Seino & Bell, 2008) que, de acordo com estes resultados, já existe na intolerância à



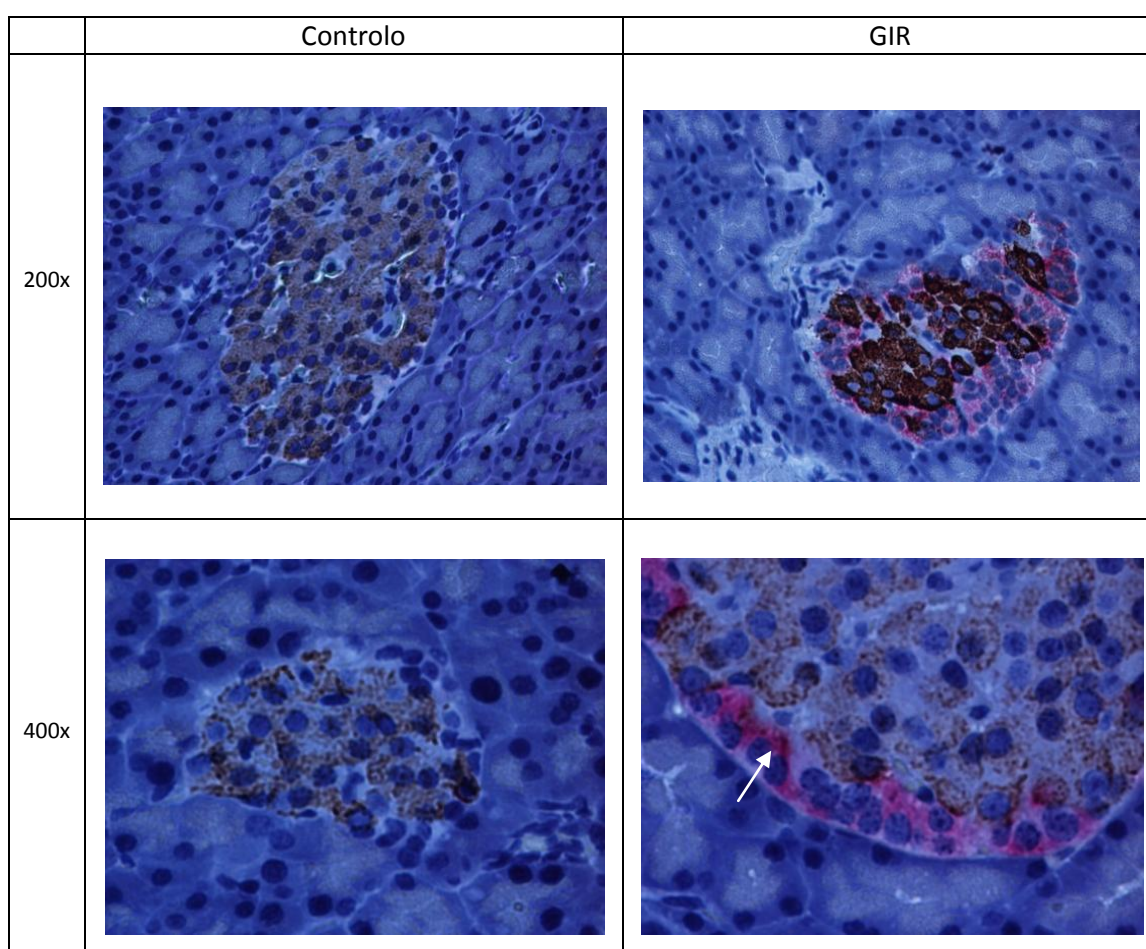
glucose, embora em menor extensão. Concomitantemente, as áreas glucagino-positivas duplicaram em GIR relativamente aos controlos. Calculando a razão entre as áreas glucagino- e insulino-positivas nos dois grupos, registou-se que essa razão foi cerca de 2,1x superior nos GIR (0,14 em controlos e 0,30 em GIR). Esta é também uma característica das alterações morfológicas dos ilhéus de Langerhans observada na DT2 humana, apresentando-se esta razão aumentada 1,7x (Henquin & Rahier, 2011).

Dada a distribuição das células  $\alpha$ - e  $\beta$ -pancreáticas no ilhéu de Langerhans em conjugação com a distribuição observada para as diferentes isoformas da subunidade  $\alpha$ , as isoformas  $\alpha_1$ ,  $\alpha_3$  e  $\beta_2$  deverão encontrar-se associadas tanto às células  $\alpha$ - como às  $\beta$ -pancreáticas, dado que a marcação para estas isoformas se distribuiu por todo o ilhéu (ver Figura 26); pelo contrário, a isoforma  $\alpha_2$  localizou-se preferencialmente na periferia do ilhéu, onde foram encontradas simultaneamente células  $\alpha$ - e  $\beta$ -pancreáticas não sendo possível, sem recurso a uma técnica de dupla-marcação, avaliar essa localização.

Dado que a isoforma  $\alpha_2$  foi a que maior variação apresentou nos GIR, e que mais dúvidas suscitou, em termos da sua localização celular no ilhéu de Langerhans, procedeu-se à realização de um estudo de marcação dupla anti-insulina e anti- $\alpha_2$ -Na,K-ATPase, a fim de poder avaliar se esta isoforma se co-localizava preferencialmente com a insulina.

Os resultados da marcação dupla da insulina e da  $\alpha_2$ -Na,K-ATPase (Figura 29, marcação da insulina a castanho e marcação da  $\alpha_2$ -Na,K-ATPase a rosa). Em concordância com os resultados anteriormente obtidos (ver Figura 26), a marcação para a isoforma  $\alpha_2$  em controlos foi difícil de observar, dada a sua baixa expressão. Em GIR, os resultados revelaram que a maior parte da coloração rosada, correspondente à subunidade  $\alpha_2$  da Na,K-ATPase, ocorreu nas células da periferia do ilhéu (Figura 29-painel superior) em tecido pancreático de GIR. Adicionalmente, observaram-se zonas de sobreposição da coloração (ver Figura 29- painel inferior, seta branca), indicando que a expressão de  $\alpha_2$ -Na,K-ATPase ocorre quer em células  $\alpha$ -pancreáticas quer em células  $\beta$ -pancreáticas dos ilhéus de Langerhans.





**FIGURA 29 - Fotomicrografias da marcação dupla insulina /  $\alpha_2$  - Na,K-ATPase**

Utilizou-se uma metodologia para dupla marcação imunológica a lâminas de pâncreas de animais controlo e GIR anti- $\alpha_2$ -Na-K-ATPase (produzido em coelho) e anti-insulina (produzido em ratinho). A marcação da insulina aparece a castanho, resultante da reacção do DAB, e a marcação da  $\alpha_2$ -Na,K-ATPase surge a rosa, resultante da reacção do *Fast Red*. A seta mostra uma zona em que existe sobreposição da coloração. Analisaram-se lâminas de cinco animais por grupo, tendo sido tirada uma média de seis fotografias por lâmina, em várias ampliações. As fotografias apresentadas são representativas para cada grupo.

Estes resultados, tomados no seu conjunto, sugerem alterações na expressão isoenzimática da Na,K-ATPase preferencialmente nas células da periferia dos ilhéus de Langerhans, que se caracteriza por uma diminuição da expressão dos isoenzimas constituídos pela isoforma  $\alpha_1$  e um aumento concomitante da expressão dos isoenzimas constituídos pela isoforma  $\alpha_2$ . Para além disso, avaliando conjuntamente os resultados das duplas-marcações Na,K-ATPase- $\alpha_2$ /insulina e insulina/glucagina, em que se observou que a área marcada com anticorpo anti- $\alpha_2$ -Na,K-ATPase aumenta 5x em GIR relativamente aos controlos e que a área glucagino-marcada aumenta apenas para o dobro nos GIR relativamente ao controlo, inferiu-

se que a alteração na expressão da subunidade  $\alpha_2$ -Na,K-ATPase ocorrerá não só nas células  $\alpha$ -pancreáticas mas também nas células  $\beta$ -pancreáticas.

A diminuição da expressão de isoenzimas  $\alpha_1\beta$  e o aumento da expressão de  $\alpha_2\beta$  da Na,K-ATPase podem contribuir para as diferenças observadas entre GIR e controlo em termos da regulação da actividade da Na,K-ATPase por glucose. De facto, sabe-se que a afinidade dos isoenzimas  $\alpha_2\beta$  para o substrato ATP é significativamente superior à descrita para os isoenzimas  $\alpha_1\beta$  (Blanco & Mercer, 1998), o que poderá justificar a maior actividade enzimática da bomba nos GIR observada em situação de deplecção metabólica (ver secção 3.2.4.3, Figura 23 e Figura 25).

No entanto, a sensibilidade diferencial ao substrato destes isoenzimas não permite explicar, pelo menos na totalidade, a abolição/atenuação de inibição da actividade da Na,K-ATPase induzida por concentrações de glucose iguais ou superiores a 5,6 mM nos GIR comparativamente aos controlos (ver secção 3.2.4.3). Na bibliografia existem evidências de que os diferentes isoenzimas também poderão ser alvo de diferentes mecanismos de regulação pelas vias de sinalização intracelulares, o que será uma consequência das diferenças estruturais entre as isoformas constituintes dos isoenzimas (Blanco & Mercer, 1998). No caso particular das isoformas da subunidade  $\alpha$ , as diferenças na estrutura primária residem principalmente ao nível do terminal amina, o que pode ter consequências na regulação da actividade da bomba, por exemplo, por fosforilação (Ewart & Klip, 1995).

Em suma, a alteração da expressão isoenzimática poderá contribuir para as diferenças observadas na regulação da actividade enzimática da Na,K-ATPase por glucose em célula  $\beta$ -pancreática de GIR. Contudo, desconhecem-se os mecanismos envolvidos na regulação da Na,K-ATPase por glucose em célula  $\beta$ -pancreática, pelo que não se pode excluir a hipótese de esses próprios mecanismos poderem estar também afectados.

### 3.3.5 Conclusões

Procuraram-se razões que pudessem estar na base das diferenças observada em termos da resposta da Na,K-ATPase à glucose entre GIR e controlos, o que conduziu ao estudo da expressão isoenzimática por imuno-histoquímica. Deste estudo concluiu-se que:

- a) Os ilhéus de Langerhans de GIR e controlos expressam as isoformas  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  e  $\beta_2$  da Na,K-ATPase;
- b) As isoformas  $\alpha_1$ ,  $\alpha_3$  e  $\beta_2$  são expressas em todas as células dos ilhéus de Langerhans, enquanto que  $\alpha_2$  apenas se encontra nas células da periferia do ilhéu.
- c) Observou-se uma diminuição relativa da expressão dos isoenzimas  $\alpha_1\beta$  e um aumento da expressão dos isoenzimas  $\alpha_2\beta$  em ilhéus de Langerhans de GIR relativamente aos de controlo;
- d) Detectou-se uma redução de cerca de 10 % das áreas insulino-positivas e um aumento para o dobro das áreas glucagino-positivas em GIR quando comparado com controlos, duplicando a razão entre células  $\alpha$ - e  $\beta$ -pancreática em GIR;
- e) A alteração na distribuição dos isoenzimas foi detectada principalmente em células da periferia dos ilhéus de Langerhans, estando associada tanto a células  $\alpha$  como a células  $\beta$ -pancreáticas.

Em suma, os dados sugerem que existe alteração da expressão isoenzimática da Na,K-ATPase entre GIR e controlos que se caracteriza por um aumento da expressão dos isoenzimas  $\alpha_2\beta$  e uma diminuição da expressão dos isoenzimas  $\alpha_1\beta$  da Na,K-ATPase em GIR. Estas alterações poderão contribuir para as diferenças observadas na actividade da Na,K-ATPase em células  $\beta$ -pancreáticas de GIR.



### 3.4 ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DA AMPK E DA PKC NA REGULAÇÃO DA Na,K-ATPASE POR GLUCOSE EM CÉLULA $\beta$ -PANCREÁTICA

#### 3.4.1 Introdução

Na secção 3.3 deste trabalho mostrou-se que as células  $\beta$ -pancreáticas expressam vários isoenzimas da Na,K-ATPase, designadamente os constituídos pelas isoformas  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  e  $\beta_2$ . A actividade enzimática total resulta do somatório da actividade dos vários isoenzimas, pelo que, não será de estranhar, que a regulação da actividade da Na,K-ATPase nestas células seja complexa. Neste trabalho (na secção 3.2) demonstrou-se também que a glucose contribui para a regulação da actividade da Na,K-ATPase. Os resultados obtidos mostram que a glucose, na gama fisiológica de concentrações, induziu uma inibição da actividade da Na,K-ATPase em células  $\beta$ -pancreáticas, desconhecendo-se os mecanismos subjacentes.

Mostrou-se também que a acção da glucose na actividade da Na,K-ATPase de célula  $\beta$ -pancreática de ratos GIR está alterada (na secção 3.2) e que estas alterações podem dever-se, em parte, a um padrão distinto de expressão isoenzimática, em que ocorre um aumento da expressão da isoforma  $\alpha_2$  e uma diminuição da expressão da isoforma  $\alpha_1$  (secção 3.3). Assumindo que os diferentes isoenzimas são regulados diferencialmente, o efeito da glucose na actividade da Na,K-ATPase poder-se-á dever à regulação dos isoenzimas e/ou a um desacoplamento dos mecanismos de sinalização despoletados pela glucose.

Desconhece-se de que forma a diminuição da expressão de  $\alpha_1$ - e o aumento da expressão de  $\alpha_2$ -Na,K-ATPase podem justificar as diferenças observadas entre GIR e controlo em termos da regulação da actividade da Na,K-ATPase por glucose. Uma justificação pode passar por as diferentes isoformas apresentarem diferentes afinidades aparentes para os substratos. Uma outra justificação, provavelmente mais relevante que a anterior, reside nas diferenças estruturais entre as duas isoformas, que ocorrem principalmente no terminal amina, o que pode ter consequências na regulação da actividade da bomba que seja mediada, por exemplo, por fosforilação (ver secção 1.1.2). Um dos motivos de fosforilação da bomba pela PKC inclui o resíduo ser-23 e este apenas existe na subunidade  $\alpha_1$ . Tendo em conta os

resultados de Owada *et al.* que sugerem, como mecanismo de regulação da actividade da Na,K-ATPase por glucose, a fosforilação da subunidade  $\alpha$  por acção da PKC (ver secção 1.2.5.2.4), a alteração da expressão isoenzimática registada neste trabalho poderá influenciar a regulação da bomba.

Para além disso, existem outros estudos que referem a activação da PKC, ou de algumas das suas isoformas, por acção da glucose, em célula  $\beta$ -pancreática (ver secção 1.2.4.2). Contudo, não é claro nos trabalhos consultados a relação entre a glucose, o seu metabolismo, e a activação da PKC.

Em célula  $\beta$ -pancreática, a AMPK parece desempenhar um papel único no estabelecimento da conexão entre o estado energético celular e a capacidade de síntese e secreção de insulina, tendo já sido mostrado que a modulação da AMPK por reguladores farmacológicos (AICAR<sup>11</sup> e composto C<sup>12</sup>) afecta a secreção da hormona (ver secção 1.2.4.3). Para além disso, AMPK tem também sido apontada como elemento central no acoplamento entre sistemas de transporte de membrana e o metabolismo celular, intervindo ao nível do tráfego intracelular de proteínas. Por um lado, parece estar envolvida, em célula  $\beta$ -pancreática, na regulação do tráfego intracelular do K(ATP), desconhecendo-se os mecanismos subjacentes a essa regulação. Por outro lado, foi também descrito, em células epiteliais, um mecanismo em que a modulação da AMPK desencadeou a activação da PKC, promovendo a fosforilação da subunidade  $\alpha$  da Na,K-ATPase e a sua internalização (ver secção 1.2.4.3).

Assim, poderá equacionar-se a possibilidade de, nas células  $\beta$ -pancreáticas, a glucose exercer o seu efeito sobre a Na,K-ATPase por uma via de sinalização que envolve a AMPK e a PKC, via esta que pode estar modificada nos GIR e/ou que, devido à expressão isoenzimática distinta, não exerce o seu efeito regulador sobre a bomba.

---

<sup>11</sup> **AICAR** - 5-Aminoimidazole-4-carboxamide 1- $\beta$ -D-ribofuranósido

<sup>12</sup> **Composto C** - 6-[4-(2-Piperidina-1-il-etoxi)-fenil]-3-piridina-4-il-pirazolo[1,5-a]-pirimidina

### 3.4.2 Objectivos

As vias de sinalização através das quais a glucose exerce o seu efeito sobre a actividade da Na,K-ATPase são essencialmente desconhecidas. Já foi postulada a hipótese dos processos de fosforilação dependentes da PKC desempenharem aí um papel relevante. Embora existam sugestões na literatura que propõem que a AMPK poderá ser um elemento da cascata de sinalização que conduz à activação da PKC, esta hipótese nunca foi testada em célula  $\beta$ -pancreática. Assim, o objectivo deste trabalho foi avaliar a participação da AMPK e da PKC nas vias de sinalização subjacente à regulação da Na,K-ATPase induzida por glucose e a sua eventual relevância para os resultados observados em GIR. Para isso, procurou-se:

- a) Averiguar o envolvimento da AMPK na regulação da Na,K-ATPase induzida por glucose. Para tal, recorreu-se ao estudo da actividade enzimática da Na,K-ATPase de células  $\beta$ -pancreáticas de ratos normais e GIR, na ausência e em presença de moduladores farmacológicos da AMPK;
- b) Avaliar a participação da PKC na regulação da actividade da Na,K-ATPase induzida por glucose. Neste caso, recorreu-se à técnica imunológica de *Western blots*, para avaliar o nível de fosforilação da isoforma  $\alpha_1$  da Na,K-ATPase na posição Ser-23, alvo da PKC, na presença e ausência dos moduladores da AMPK, em homogeneizados de ilhéus;
- c) Avaliar a presença da isoforma fosforilada da  $\alpha_1$ -Na,K-ATPase em células  $\beta$ -pancreáticas isoladas e identificadas. A identificação das células  $\beta$ -pancreáticas ocorreu com base na sua insulino-positividade e morfologia e, em paralelo, foi avaliada a presença da isoforma fosforilada da  $\alpha_1$ -Na,K-ATPase, utilizando técnicas de imunocitoquímica.

### 3.4.3 Metodologias

#### 3.4.3.1 REAGENTES

Todos os reagentes foram obtidos à firma Sigma-Aldrich (USA), salvo indicação em contrário. Os anticorpos utilizados foram anti- $\alpha_1$ -Na,K-ATPase (fluido de ascite de ratinho, clone M8-P1-A3, SIGMA, A-277), anti- $\alpha_1$ (fosforilado no resíduo Ser-23)-Na,K-ATPase (anticorpo policlonal produzido por imunização de coelho com um polipéptido sintético correspondente aos resíduos que rodeiam o resíduo Ser-23, Cell Signalling, #4006) e anti-insulina (monoclonal produzido em ratinho, BT53-3033-39, Biotrend).

#### 3.4.3.2 MODELOS ANIMAIS

Os modelos animais utilizados foram o rato Wistar, utilizado como controlo, e o modelo intolerante GIR, já caracterizado na secção 3.2.4.1.

Foram utilizadas fêmeas com 12-14 semanas, do biotério do Departamento de Química da Universidade de Évora. Os animais foram mantidos num regime de foto-período normal, com água e alimentação *ad libitum*, de acordo com as indicações da Portaria nº 1005/92 de 23 de Outubro.

#### 3.4.3.3 DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE ENZIMÁTICA DA Na,K-ATPASE EM CÉLULAS $\beta$ -PANCREÁTICA MANTIDAS EM CULTURAS PRIMÁRIAS

As culturas primárias de células  $\beta$ -pancreáticas de ratos Wistar foram obtidas de acordo com o procedimento descrito nas secções 3.1.3.3 e 3.1.3.4. A actividade enzimática da



Na,K-ATPase foi determinada nas células  $\beta$ -pancreáticas mantidas em culturas primárias aderentes de acordo com o procedimento descrito na secção 3.1.3.5.

O condicionamento de células no dia do ensaio (cerca de 48h após a cultura) foi o seguinte: período de pré-incubação de 30 min em 2,1 mM de glucose; período de incubação de 20 min em 2,1 ou 8,4 mM de glucose, em meio RPMI sem soro. Para os estudos realizados na presença dos moduladores farmacológicos da actividade da AMPK, as incubações decorreram de forma equivalente, sendo o AICAR (concentração final de 1 mM) adicionado ainda na pré-incubação e o composto C (Calbiochem, Alemanha) (concentração final de 10  $\mu$ M) apenas no período de incubação.

#### 3.4.3.4 ANÁLISE POR WESTERN BLOT

A técnica de *Western Blot* consiste na separação de amostras proteicas por SDS-PAGE (Laemmli, 1970), seguida de electrotransferência para uma membrana e de marcação imunológica das proteínas de interesse (Towbin *et al*, 1979).

No caso das culturas de ilhéus de Langerhans, o procedimento foi equivalente ao da preparação de células até ao passo da dispersão dos ilhéus em células, que aqui não se efectuou. Os ilhéus assim obtidos colocaram-se numa caixa de Petri (Sarstedt, Alemanha), estéril, em 6 mL de meio de cultura (equivalente ao das células) estéril e foram passados para novas caixas com o auxílio de uma micropipeta P20, com o intuito de os esterilizar. Ao fim de três passagens, os ilhéus foram recolhidos para caixas de menor volume (2mL) onde se dispuseram cerca de 300 ilhéus por caixa. Foram depois colocados na incubadora de CO<sub>2</sub> até ao dia seguinte.

Cerca de 24h após a cultura, os ilhéus foram mudados para novas caixas de Petri de 2 mL contendo meio sem soro. Só foram seleccionados ilhéus cuja integridade se manteve na observação à lupa, de acordo com o seu aspecto morfológico normal (coloração branca, opacos e de rebordo bem refringente).

Após o condicionamento dos ilhéus, aplicando um protocolo semelhante ao utilizado para as células, que decorreu num período de incubação de 20 min, os ilhéus foram recolhidos para tampão Tris-salino (em mM: Tris-HCl, 50, pH 7,4; NaCl, 100; KCl, 5; MgCl<sub>2</sub> 10; EGTA, 1) e

lavados três vezes neste tampão em ciclos de centrifugação rápida e ressuspensão. No *spin* final, os ilhéus foram ressuspensos em 12  $\mu$ L de tampão de lise (em mM: Tris-HCl, 25, pH 7,5; NaCl, 95; EGTA, 1; EDTA, 1; ditiotretol, 1; Triton X-100, 0,1%; PHSF, 1; cocktail inibidor de proteases (SIGMA) 0,01%(w/w) ). A mistura foi sonicada e incubada a 4°C durante 30 min, com agitação, para potenciar a extracção da Na,K-ATPase pelo Triton X-100. O lisado foi depois centrifugado a 16.000g à temperatura de 4°C, durante 15 min, obtendo-se um sobrenadante (fracção solúvel em Triton) e um sedimento (fracção insolúvel em Triton). Determinou-se então a concentração proteica de cada uma das fracções por utilização do Kit *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad, USA), utilizando a proteína albumina de soro bovina como padrão.

As fracções foram preparadas para a SDS-PAGE por adição de tampão da amostra de Laemmli (6x concentrado) e aquecimento a 45°C durante 30 min. A separação electroforética ocorreu num gel de poliacrilamida a 7,5% num sistema de electroforese *Mini-Protean-3* da Bio-Rad (USA). A electrotransferência fez-se numa tina *Mini-Trans-Blot* (Bio-Rad, USA), utilizando-se uma membrana de PVDF (acrónimo para *Polyvinylidene difluoride*) (Hybond-P, GE Healthcare) previamente activada com metanol. No final da transferência a membrana foi corada em solução de Ponceau-S de forma a poderem ser visualizadas as bandas proteicas em cada linha. Fez-se então uma reprodução da imagem da membrana num *scanner* convencional antes de proceder à imunomarcação.

O bloqueio da membrana é o primeiro passo da imunomarcação e é feito com uma solução de albumina de soro bovina a 5% para o anticorpo anti-proteína-fosforilada e com 5% de leite magro para anticorpos convencionais. A solução de bloqueio, em ambos os casos, foi preparada em tampão TBS-T<sup>13</sup>. O bloqueio decorreu durante a noite, a 4°C, sob agitação.

Seguiu-se a incubação com o anticorpo primário. Os anticorpos anti- $\alpha_1$ -Na,K-ATPase e anti-fosfo- $\alpha_1$ -Na,K-ATPase foram diluídos 1:400 e 1:500, respectivamente, em TBS-T, e incubaram-se as membranas à temperatura ambiente, durante 3h. Seguiram-se três lavagens com TBS-T (15min cada) e procedeu-se à incubação com os anticorpos secundários, também à temperatura ambiente, durante 2h (anti-ratinho ou anti-coelho, GE Healthcare, nas diluições 1:5000 e 1:2500, respectivamente). Estes anticorpos são fornecidos no *ECF Western Blot Reagent Pack, Rabbit e Mouse* (GE Healthcare). Na detecção utilizou-se o reagente luminescente *ECL Plus Western Blotting Detection Reagents* (GE Healthcare). A imagem foi captada e analisada pelo sistema *Bio-Rad Gel-doc (system e software)*.

<sup>13</sup> TBS-T – Tampão Tris salino com Tween-20 (2,5mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH7,6 com 0,1% de Tween-20)

Para a análise das membranas de Western Blot tem-se em conta a intensidade das bandas detectadas com interesse para análise, que são delineadas e quantificadas no *software* de análise de imagem Quantity One (Bio-Rad), sendo expressas as percentagens de intensidade relativas das bandas seleccionadas.

Dado que, nas técnicas de Wester Blot, é frequente a ocorrência de reactividade cruzada e/ou inespecífica que origina falsos positivos, usou-se a técnica de MALDI-TOF-TOF para identificação das proteínas correspondentes a bandas que possam apresentar relevância para o problema em estudo.

### 3.4.3.5 ANÁLISE POR MALDI-TOF-TOF.

#### 3.4.3.5.1 FUNDAMENTO DA TÉCNICA DE MALDI-TOF-TOF

A espectrometria de massa constitui uma ferramenta muito importante na caracterização de proteínas, podendo ser utilizada para medir massas moleculares de polipéptidos intactos, determinando e delineando a estrutura peptídica após digestão com proteases específicas (Yergey *et al*, 2002).

A identificação proteica pode ser conseguida pela aplicação de diferentes abordagens experimentais, muitas vezes utilizadas em combinação. O MALDI-TOF-TOF é o método mais utilizado. Nesta técnica conduz-se à digestão endoproteolítica da proteína alvo e determinam-se as massas exactas dos péptidos resultantes, que são depois comparadas com sequências virtualmente calculadas utilizando a informação disponível em bases de dados de sequências de proteínas, por aplicação de rotinas informáticas. Adicionalmente são utilizados dados de MS-MS, obtidos a partir de ensaios onde é promovida a fragmentação de péptidos seleccionados, produzidos em reacções de colisão múltipla a baixa energia. Em alternativa, podem ser utilizados instrumentos de triplo-quadrupolo ou de captura iónica (Yergey *et al*, 2002).

#### 3.4.3.5.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras foram inicialmente separadas por SDS-PAGE, sendo o gel fixado e corado em solução corante (metanol 45%, ácido acético 10% e azul de coomassie 0,5%) durante 2h e em seguida descorado com solução descorante (metanol 30%, ácido acético 10%) até obter o contraste desejado. Após terem sido identificadas as bandas com interesse, estas são extraídas manualmente do gel, são lavadas em água ultra-pura e descoradas com lavagens sucessivas em acetonitrilo a 50% e a 100%. As ligações persulfureto foram reduzidas com a adição de ditioneitol a 10 mM e foram alquiladas com iodoacetamida a 50 mM. Os pedaços de gel foram digeridos num tampão de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  contendo 6,7 ng/ $\mu\text{L}$  de tripsina (tripsina porcina modificada, grau de sequenciação, Promega) em banho de gelo. Após 30 min o sobrenadante foi removido e descartado, adicionaram-se 20  $\mu\text{L}$  de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 mM e prosseguiu-se a digestão a 37°C, durante a noite.

A mistura peptídica resultante da digestão foi purificada e concentrada em microcolunas porosas R2 e eluídas directamente para a placa de MALDI com 0,8  $\mu\text{L}$  de matriz de recristalização, ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinânico (10 mg/mL) preparado em 70% (v/v) de acetonitrilo com 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético.

#### 3.4.3.5.3 MALDI-TOF-TOF

Os espectros de massa foram adquiridos num equipamento Applied Biosystems 4800 Proteomics Analyzer MALDI-TOF-TOF (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), no modo MS e MS-MS. Os iões carregados positivamente foram analisados no modo de reflectão positivo e o gás de colisão utilizado para a fragmentação foi ar atmosférico. Cada espectro de MS foi obtido com um total de 1000 acumulações de disparos de laser (oito espectros consistem em 125 disparos de laser, cada), sendo a calibração externa realizada com seis pontos da mistura padrão (Calibration Mixture 2, Applied Biosystem).

Foram seleccionados para análise MS-MS dez dos precursores com s/n mais intensos para cada espectro MS. Para cada espectro MS-MS acumularam-se 5200 disparos de laser, cada subespectro contendo 65 disparos, num máximo de oitenta espectros.

Os dados em bruto foram gerados pelo 4000 Series Explorer Software v3.0 RC1 (Applied Biosystems) e todos os possíveis picos  $m/z$  contaminantes, originados por queratina

humana, autodigestão da tripsina ou matriz, foram incluídos na lista de exclusão utilizada para gerar a lista com a massa dos péptidos a usar na pesquisa na base de dados.

A interpretação dos dados de MS e MS/MS combinados foi desempenhada pelo *software* GPS Explorer (versão 3.5, Applied Biosystems). Os mapas de massas peptídicas e as sequências obtidas foram confrontadas com a base de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) utilizando o servidor MASCOT utilizando como restrição a taxonomia de roedores. A pesquisa foi feita utilizando massas monoisotópicas e os seguintes critérios: uma falha na clivagem, limiar de  $p < 0,05$  de significância, tolerância de massa peptídica de 50 ppm, tolerância de fragmentação de massa de 0,25 Da, modificação fixa da carbamidometilação da cisteína e oxidação da metionina como modificação variável.

#### 3.4.3.6 ANÁLISE POR IMUNOCITOQUÍMICA

Isolaram-se ilhéus de Langerhans que se dispersaram em células, utilizando o procedimento experimental já descrito em 3.1.3.3 e em 3.1.3.4. As células, ou agregados de células, obtidos por este processo, cultivaram-se em lâminas de poliestireno (NUNC, Lab-Tek II Chambers) com oito reservatórios, cerca de  $5 \times 10^4$  células por reservatório. Em cada reservatório aplicou-se meio de cultura RPMI (RPMI 1640 8,4 g/L, contendo glucose 8,4 mM,  $\text{NaHCO}_3$  25 mM, 10% de soro e antibióticos, estreptomicina a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e penicilina a 100 U/mL, com pH ajustado a 7,2) de forma a perfazer o volume de 400  $\mu\text{L}$ . As células foram depois cultivadas durante 24h na incubadora de  $\text{CO}_2$ , sendo-lhes mudado o meio ao fim desse período. Mantiveram-se em cultura por mais 18h, tempo ao fim do qual foram utilizadas. Aplicou-se um protocolo semelhante ao descrito para o estudo com os ilhéus, em que se realizou uma pré-incubação com uma concentração de glucose de 2,1 mM, de 30 min, seguindo-se uma incubação de 15 min com 2,1 mM ou com 8,4 mM de glucose. Terminado o período de incubação, as células foram lavadas com PBS<sup>14</sup> frio, retirou-se o excesso de tampão por inversão das lâminas sobre papel absorvente e aplicou-se Roti-Spray (Roth) para fixar as células. Após secagem, iniciou-se o processo de marcação imunológica. Bloqueou-se a superfície de cultivo utilizando uma solução de BSA 5% em PBS (10min). Retirou-se toda a solução de bloqueio por inversão da lâmina sobre papel absorvente e adicionou-se o anticorpo primário anti- $\alpha_1$ -Na,K-ATPase ou anti- $\alpha_1$ -(fosforilado na posição Ser-23)-Na,K-ATPase.

---

<sup>14</sup> PBS – Tampão de fosfatos salino (10 mM de fosfatos, 137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, pH 7,4)

Prepararam-se controlos negativos, nos quais não foi adicionado anticorpo primário. Os reagentes seguintes pertencem ao kit *UltraVision Detection System* (Thermo Scientific) e são o anticorpo secundário biotinizado (que é produzido em cabra e é polivalente para anticorpos produzidos em coelho e em ratinho), a estreptavidina peroxidase e o substrato DAB (diaminobenzidina). Entre cada nova adição fizeram-se três lavagens da lâmina com PBS. A incubação com o anticorpo secundário biotinizado decorreu durante 20 min, com a estreptavidina peroxidase durante 10 min e a reacção de revelação por adição de DAB ocorreu durante 5 min. Realizou-se ainda a contrastação dos núcleos por adição de hematoxilina, durante 2 min, sendo seguidamente as lâminas lavadas com água corrente e PBS. No final desta sequência, foram retirados das lâminas os dispositivos que constituem as demarcações dos reservatórios e montaram-se as lâminas com Clearmount (Zymed), um meio de montagem que permite, após a incubação a 37<sup>o</sup> durante a noite, a formação de uma lamela de cobertura endurecida sobre a lâmina.

Foram também preparadas lâminas de controlo com marcação para a insulina, a fim de identificar as células  $\beta$ -pancreáticas (as que marcam positivamente com o anticorpo anti-insulina). Para este estudo as células foram marcadas imediatamente após as 48h de incubação em meio de cultura, sem alterações na concentração de glucose, sendo seguido o procedimento de imunomarcação anteriormente descrito.

As lâminas foram examinadas por microscopia óptica com um microscópio Nikon Eclipse 600 equipado com uma câmara digital (Nikon DN100) para realização de fotomicrografias.

#### 3.4.3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A avaliação do significado estatístico da diferença entre os valores médios de dois grupos de resultados foi realizado por análise de variância (ANOVA), realizada no programa Microsoft Excel. Em todos os casos um valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

Os resultados foram apresentados como valores médios  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m.). O erro padrão da média foi considerado mais apropriado que o desvio padrão pelo facto de se pretender comparar as médias. Os gráficos e as regressões, lineares e não lineares, foram realizadas no programa ORIGIN Pro8 (OriginLab Corporation, USA).

### 3.4.4 Resultados e Discussão

#### 3.4.4.1 PARTICIPAÇÃO DA AMPK NA REGULAÇÃO DA ACTIVIDADE DA Na,K-ATPASE POR GLUCOSE

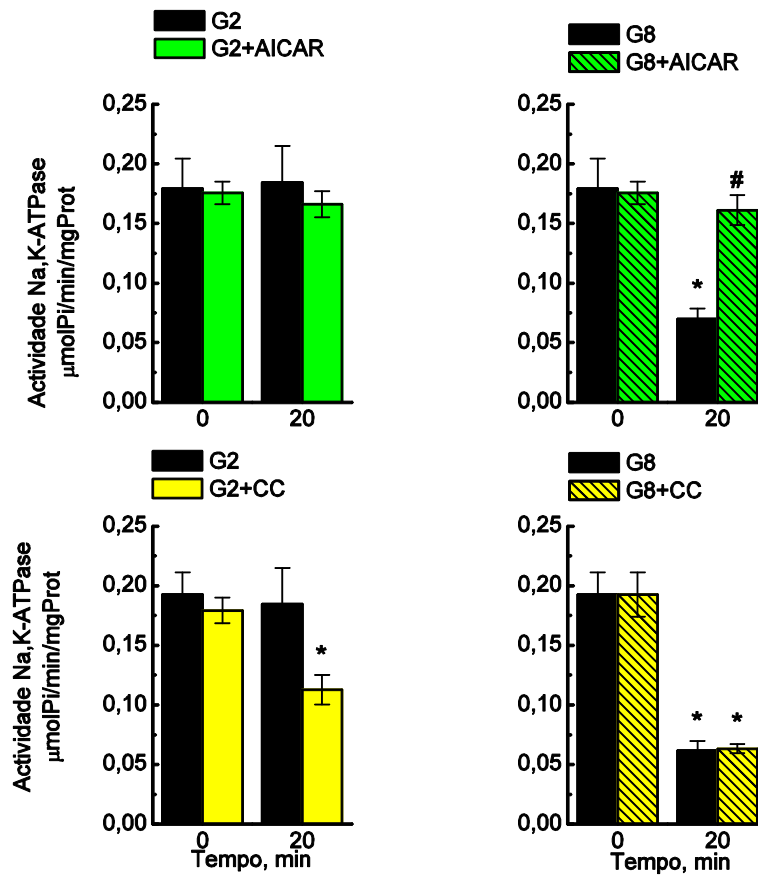
Nesta secção procurou-se estudar a participação da AMPK nas vias de regulação da actividade enzimática da Na,K-ATPase desencadeadas por glucose. Para tal, avaliou-se a actividade da Na,K-ATPase na ausência e na presença de moduladores farmacológicos da AMPK: AICAR (1 mM), um análogo do AMP e activador desta cinase, e composto C (10  $\mu$ M), um inibidor da mesma.

Os resultados do estudo da modulação farmacológica da AMPK na actividade enzimática da Na,K-ATPase nas células controlo e de GIR estão apresentados na Figura 30 e na Figura 31, respectivamente.

Os painéis superiores da Figura 30 mostram que, em células  $\beta$ -pancreáticas de animais controlo, o AICAR não afecta a actividade enzimática da Na,K-ATPase quando as células se encontram expostas a uma concentração de glucose basal (2,1 mM), sendo os valores de actividade da ordem de 0,017  $\mu$ molPi/min/mgProt, independentemente da presença do AICAR. Contudo, aumentando a concentração de glucose para 8,4 mM na presença do activador, este aboliu o efeito inibitório da glucose. A actividade enzimática da Na,K-ATPase foi de  $0,069 \pm 0,009$   $\mu$ molPi/min/mgProt, aos 20 min de exposição a 8,4 mM de glucose, observando-se uma inibição típica de 61 %, enquanto que, na presença de AICAR, a actividade tomou o valor  $0,161 \pm 0,012$   $\mu$ molPi/min/mgProt, semelhante ao observado no tempo 0 ( $0,179 \pm 0,025$   $\mu$ molPi/min/mgProt).

Nos painéis inferiores da Figura 30 pode observar-se que o efeito da incubação de células  $\beta$ -pancreáticas de animais controlo com composto C, na presença de 2,1 mM de glucose, produziu uma inibição da bomba, sendo a actividade registada 39% inferior ao valor observado na ausência do inibidor ( $0,184 \pm 0,031$  e  $0,113 \pm 0,012$   $\mu$ molPi/min/mgProt na ausência e na presença de composto C, respectivamente, aos 20 min de incubação). O aumento da concentração de glucose para 8,4 mM, na presença e na ausência de composto C,

tomou valores semelhantes ( $0,063 \pm 0,01$  e  $0,061 \pm 0,03$   $\mu\text{molPi}/\text{min}/\text{mgProt}$ , na presença e ausência de AICAR, respectivamente).



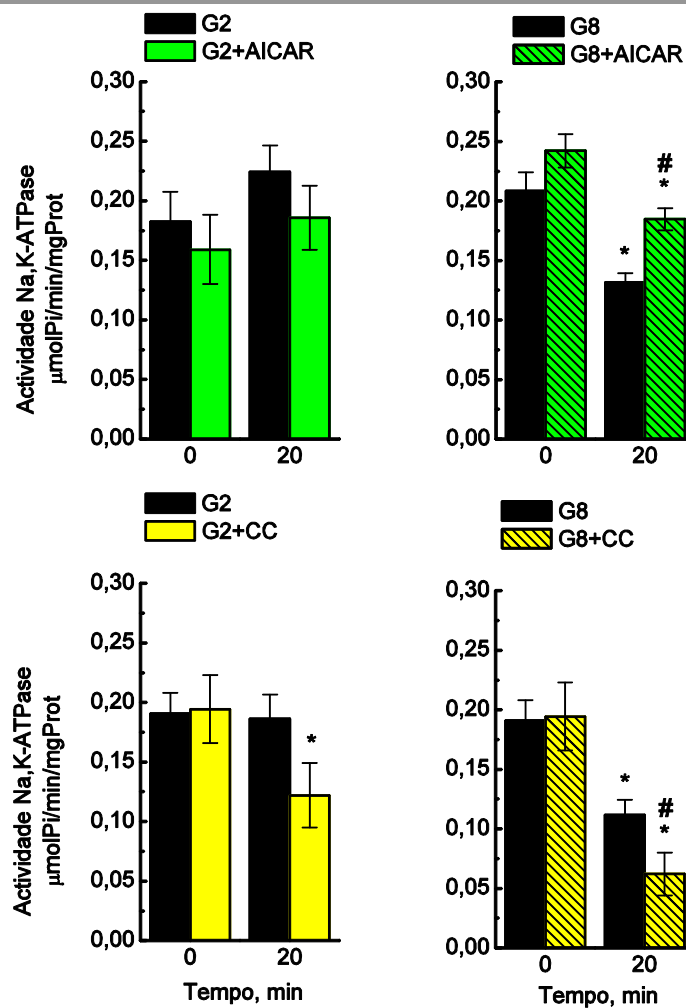
**FIGURA 30 - Efeito do AICAR e do Composto C na actividade enzimática da Na,K-ATPase em células  $\beta$ -pancreáticas de ratos controlo**

Foi quantificada a actividade enzimática da Na,K-ATPase em células  $\beta$ -pancreáticas na presença e ausência dos moduladores da AMPK: 1mM de AICAR (resultados a verde) e 10  $\mu\text{M}$  de Composto C (CC) (resultados a amarelo). Os gráficos da esquerda representam resultados dos estudos em que as células são incubadas em 2,1 mM de glucose (G2) enquanto que os gráficos da direita representam os resultados das incubações na presença de 8,4 mM de glucose (G8). Os resultados são representativos da média  $\pm$  epm de três experiências independentes (\* e # significa  $p < 0,05$ , por ANOVA, entre tempos e entre tratamentos para o mesmo tempo, respectivamente).

Nos controlos, o composto C mimetizou o efeito da glucose na actividade da Na,K-ATPase, embora de menor amplitude quando comparado com o registado em 8,4 mM de glucose. Pelo contrário, o AICAR teve um efeito antagónico, impedindo a inibição induzida pela glucose. Em suma, observou-se que o AICAR e o composto C exerceram, respectivamente, um efeito antagónico e análogo ao da glucose na actividade da Na,K-ATPase, ou seja, a inibição da AMPK pelo composto C e a sua activação pelo AICAR traduziram-se por uma inibição e uma activação da actividade da Na,K-ATPase, respectivamente. Tomados em conjunto, estes resultados sugerem que esta cinase constitua um dos elementos da cascata de regulação da Na,K-ATPase induzida pela glucose.



Num estudo paralelo realizado em culturas de células de GIR (Figura 31), os resultados mostraram que o AICAR não afectou a actividade basal registada em 2,1 mM de glucose da Na,K-ATPase (Figura 30-painel superior esquerdo), sendo esta similar, independentemente da presença ou ausência do activador (0,182±0,025 e 0,159±0,029  $\mu\text{molPi}/\text{min}/\text{mgProt}$ , na ausência e em presença de AICAR, aos 20 min de incubação, respectivamente). O aumento da concentração de glucose para 8,4 mM na presença de AICAR aboliu parcialmente a inibição da bomba (37% e 28% de inibição, na ausência e presença do AICAR, respectivamente).



**FIGURA 31 - Efeito do AICAR e do Composto C na actividade enzimática da Na,K-ATPase em células  $\beta$ -pancreáticas de ratos GIR**

Foi quantificada a actividade enzimática da Na,K-ATPase em células  $\beta$ -pancreáticas de GIR na presença e ausência dos moduladores da AMPK: 1 mM de AICAR (resultados a verde) e 10  $\mu\text{M}$  de CC (resultados a amarelo). Os gráficos da esquerda representam resultados em que as células são incubadas em 2,1 mM de glucose (G2) enquanto os gráficos da direita representam os resultados das incubações na presença de 8,4 mM de glucose (G8). Os resultados são representativos da média  $\pm$  epm de três experiências independentes (\* e # significa  $p < 0,05$ , por ANOVA, entre tempos e entre tratamentos para o mesmo tempo, respectivamente).

É de realçar que, em ratos controlo, o efeito inibitório da glucose foi significativamente superior (68%) e que o AICAR aboliu completamente a inibição induzida por glucose (Figura 30-painel superior direito).

No que diz respeito à acção do composto C, em células  $\beta$ -pancreáticas de GIR, observou-se em glucose basal (2,1 mM) uma inibição de 37% na actividade da bomba, após 20 min de incubação ( $0,186 \pm 0,020$  e  $0,122 \pm 0,027$   $\mu\text{molPi}/\text{min}/\text{mgProt}$ , na ausência e na presença de composto C, respectivamente); (Figura 31-painel inferior esquerdo), similar à observada em células dos controlos, onde se registou uma inibição de 39% (Figura 30). O aumento da concentração de glucose para 8,4 mM, na presença de composto C, induziu uma diminuição na actividade da bomba de  $0,194 \pm 0,028$  para  $0,062 \pm 0,018$   $\mu\text{molPi}/\text{min}/\text{mgProt}$ , enquanto que na ausência deste esta diminuiu de  $0,191 \pm 0,017$  para  $0,112 \pm 0,0112$   $\mu\text{molPi}/\text{min}/\text{mgProt}$ , uma inibição de 68% e 41%, respectivamente (Figura 31-painel inferior direito).

É de notar que os efeitos da glucose e do composto C foram sinérgicos, tendo-se observado uma potenciação do efeito da glucose (8,4 mM) na presença do composto C sobre a actividade da Na,K-ATPase. De facto, a magnitude da inibição da actividade da bomba registada na presença de composto C e de 8,4 mM de glucose em GIR foi semelhante à registada em células dos controlos (Figura 30-painel inferior direito), onde o composto C não induziu qualquer efeito adicional. Para além disso, em células de ratos controlo, o AICAR aboliu totalmente a inibição da actividade da Na,K-ATPase induzida por 8,4 mM de glucose, enquanto que em células de ratos GIR, essa acção foi apenas parcial, não tendo sido totalmente revertido o efeito da glucose.

Estes resultados sugerem que a sensibilidade da AMPK ao nucleótido AMP seja menor em GIR que em controlos, pois o AICAR, que é um análogo do AMP, foi menos eficiente a antagonizar o efeito da glucose em GIR que em controlos. Estes resultados, contudo, não permitem excluir a possibilidade de o metabolismo da glucose poder estar alterado em células  $\beta$ -pancreáticas de GIR, à semelhança do que está descrito para animais GK (Giroix *et al*, 1993), originando uma razão AMP:ATP maior e, conseqüentemente uma inibição menor da AMPK em resposta à glucose, o que se traduziria numa inibição menor da Na,K-ATPase.

O mecanismo de acção da glucose sobre a actividade da Na,K-ATPase passará, muito provavelmente, pela inibição da AMPK, que resultará da diminuição da razão AMP:ATP, devida ao metabolismo da glucose, interrompendo a cascata fosforilativa que lhe está associada,

causando uma inibição da bomba, em que a PKC se configura como um dos possíveis elementos da cascata fosforilativa.

#### 3.4.4.2 ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DA PKC NA REGULAÇÃO DA ACTIVIDADE DA Na,K-ATPASE POR GLUCOSE, EM CÉLULA $\beta$ -PANCREÁTICA

Um dos locais típicos e específico de fosforilação da subunidade  $\alpha_1$  da Na,K-ATPase pela PKC é o resíduo de serina 23. Procurou-se estabelecer a relação entre a modulação farmacológica da AMPK e a fosforilação da Na,K-ATPase nessa posição, que indicará automaticamente a participação da PKC. Para isso, elaborou-se uma série de experiências em que se sujeitaram os ilhéus de Langerhans a incubações com 2,1 mM ou 8,4 mM de glucose, na presença e na ausência dos moduladores farmacológicos da AMPK, AICAR e composto C, analisando-se por *Western Blot* o nível de fosforilação da subunidade  $\alpha_1$  da Na,K-ATPase no resíduo Ser-23, induzido nas referidas condições.

##### 3.4.4.2.1 OPTIMIZAÇÃO DO PROCEDIMENTO PARA *WESTERN BLOT*

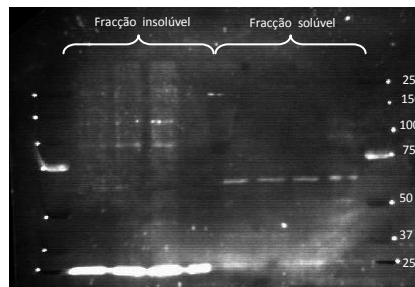
É frequente ser necessário otimizar as condições de preparação da amostra para aplicação em *Western Blot*, de acordo com as características intrínsecas da mesma. De facto, neste caso particular, observou-se que quando a preparação de uma amostra de lisado celular para SDS-PAGE se efectuava recorrendo a um processo convencional, isto é, adicionando tampão da amostra e aquecendo a 95°C durante 5 min, se obtinham quatro bandas na revelação da membrana, após marcação com o anticorpo anti- $\alpha_1$ (fosforilado na posição Ser-23)-Na,K-ATPase, designadamente a ~250, ~150, ~100 e ~65 kDa. Sendo a massa molecular da subunidade  $\alpha_1$  da Na,K-ATPase de ~100 kDa (Clausen, 1998), as bandas mais intensas, contrariamente ao que seria de esperar, apresentaram as massas moleculares de ~250 e ~65 kDa.

Estas poderiam ser o resultado de marcação inespecífica ou alternativamente indicativas da formação de agregados (250 kDa) ou de fragmentação da mesma (65 kDa), resultantes do processo de preparação da amostra. Relativamente a esta última, há ainda na literatura uma referência a uma variante da isoforma  $\alpha$ , a  $\alpha_1$ -truncada, com uma massa de 65 kDa, detectada em tecidos da musculatura vascular (Medford *et al*, 1991), sendo esta uma outra possibilidade a investigar.

Seguiu-se então o procedimento sugerido pela Millipore (protocolo fornecido para *Western Blot* para o anticorpo anti- $\alpha_2$ -Na,K-ATPase, AB9094) que refere a possibilidade de formação de agregados proteicos durante o processo de desnaturação por elevada temperatura, aconselhando antes uma desnaturação mais suave, a 45°C, durante 30 min. Esse procedimento permitiu-nos eliminar as banda de ~150 kDa e de ~250 kDa (surgindo esta vestigialmente nalgumas membranas) e aumentar a intensidade da banda a ~100 kDa. Contudo, não introduziu qualquer diferença na banda a ~65 kDa.

Numa tentativa de avaliar se a banda de ~65 kDa corresponderia à isoforma  $\alpha_1$ -truncada, a marcação inespecífica ou a um fragmento da  $\alpha_1$  da Na,K-ATPase, procedeu-se à remarcação da membrana com o anticorpo anti- $\alpha_1$ . Utilizando esta estratégia apenas se visualizou a banda a ~100 kDa. Não pudemos, contudo, excluir qualquer uma das hipóteses anteriores, uma vez que o anticorpo usado poderia não ter sensibilidade quer para a subunidade  $\alpha_1$ -truncada, quer para um fragmento de  $\alpha_1$ .

Até ao momento, estava a usar-se o lisado celular sem fraccionamento. Contudo, a Na,K-ATPase é uma estrutura da membrana plasmática e existem algumas indicações de que esta se encontra ligada a elementos do citosqueleto (Fekete *et al*, 2008). Segundo Fekete *et al*, a fracção celular ligada a elementos do citosqueleto é insolúvel em Triton-X100 e a fracção não ligada é solúvel neste detergente, podendo ser separadas introduzindo um passo de extracção com o detergente, seguido de centrifugação (Fekete *et al*, 2008). Desta forma, após lise dos ilhéus com o tampão de extracção e a sua sonicação em gelo, introduzimos um passo de centrifugação em centrífuga refrigerada, a 16.000 *g*, durante 15 min, a 4°C. Dessa centrifugação resulta um sobrenadante e um sedimento. O sedimento foi ressuspendido no tampão de homogeneização e ambas as fracções foram preparadas para SDS-PAGE. Quando as fracções solúvel e insolúvel em Triton se aplicaram na SDS-PAGE, conseguiu-se uma visualização separada das bandas ~100 kDa, que surgiu na fracção insolúvel, e de ~65 kDa, que surgiu na fracção solúvel em tampão (ver Figura 32).



**FIGURA 32 - Membrana de *Western Blot* obtida por aplicação em separado da fracção de lisado de ilhéus de Langerhans solúvel em Triton-X100 da insolúvel nesse detergente**

Na imagem apresenta-se a visualização da revelação de uma membrana em que as amostras foram aplicadas após fraccionamento do lisado por centrifugação a 16.000 *g*, 15 min, a 4°C. A banda a ~65 kDa surge apenas na fracção solúvel em Triton.

Concluiu-se, então, que a subunidade  $\alpha_1$ -Na,K-ATPase se encontrava na fracção insolúvel em Triton, associada a elementos do citosqueleto. No entanto, estes resultados não permitiram excluir a hipótese de a banda de ~65kDa corresponder à subunidade  $\alpha_1$ -truncada ou a um fragmento de degradação da subunidade  $\alpha_1$  que contivesse a sequência reconhecida pelo anticorpo anti- $\alpha_1$ -(fosforilado na posição Ser-23)-Na,K-ATPase, uma vez que este anticorpo não reconhece toda a proteína mas apenas o fragmento peptídico que rodeia o resíduo de serina 23 (fosforilado nessa posição). Uma vez que a fosforilação é, em muitos casos, um sinal de internalização e degradação (Soh *et al*, 2010; Terunuma *et al*, 2010), esta banda poderia corresponder a um fragmento internalizado da isoforma  $\alpha_1$ -Na,K-ATPase.

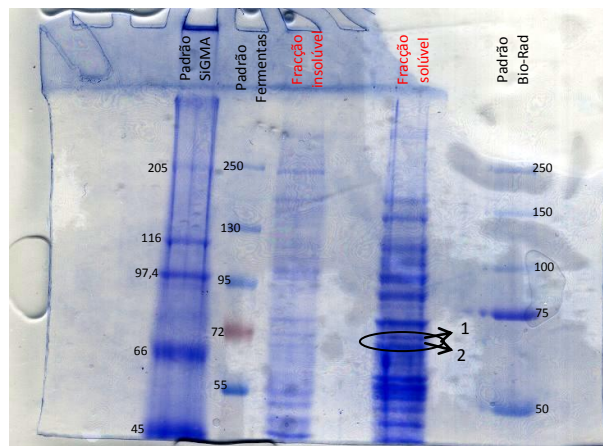
A outra hipótese, mutuamente exclusiva, era de que se tratasse de uma marcação inespecífica do anticorpo. Procurou-se analisar esta banda por MALDI-TOF-TOF, devido ao interesse que o conhecimento da origem deste fragmento poderia representar no esclarecimento do mecanismo de inibição da Na,K-ATPase.

#### 3.4.4.2.2 ANÁLISE DA BANDA PROTEICA DE ~65 kDa POR MALDI-TOF-TOF

A preparação das amostras a analisar por MALDI-TOF-TOF pode fazer-se por excisão das bandas de interesse após separação num gel de SDS-PAGE. Dado que ocorre alteração na estrutura do gel quando este é transferido para a membrana, o que se deve essencialmente à

elevada percentagem de metanol existente no tampão de transferência, não é possível uma sobreposição directa entre o padrão de bandas da membrana e o padrão de bandas da SDS-PAGE (revelado por Ponceau S ou por Azul de Coomassie). Assim, para escolher as bandas a analisar, houve a necessidade de fazer uma análise cuidadosa da massa molecular das bandas separadas por electroforese SDS-PAGE.

Na Figura 33 apresenta-se uma imagem do gel da SDS-PAGE realizado. Na sequência dessa análise, encontraram-se duas bandas, muito próximas, com massas moleculares de 65,2 e 68,4 kDa (ver Figura 33). Optou-se por extrair e analisar as duas bandas por MALDI-TOF-TOF, tendo sido identificadas como amostra 1 a banda de 68,4 kDa e como amostra 2 a de 65,2 kDa.



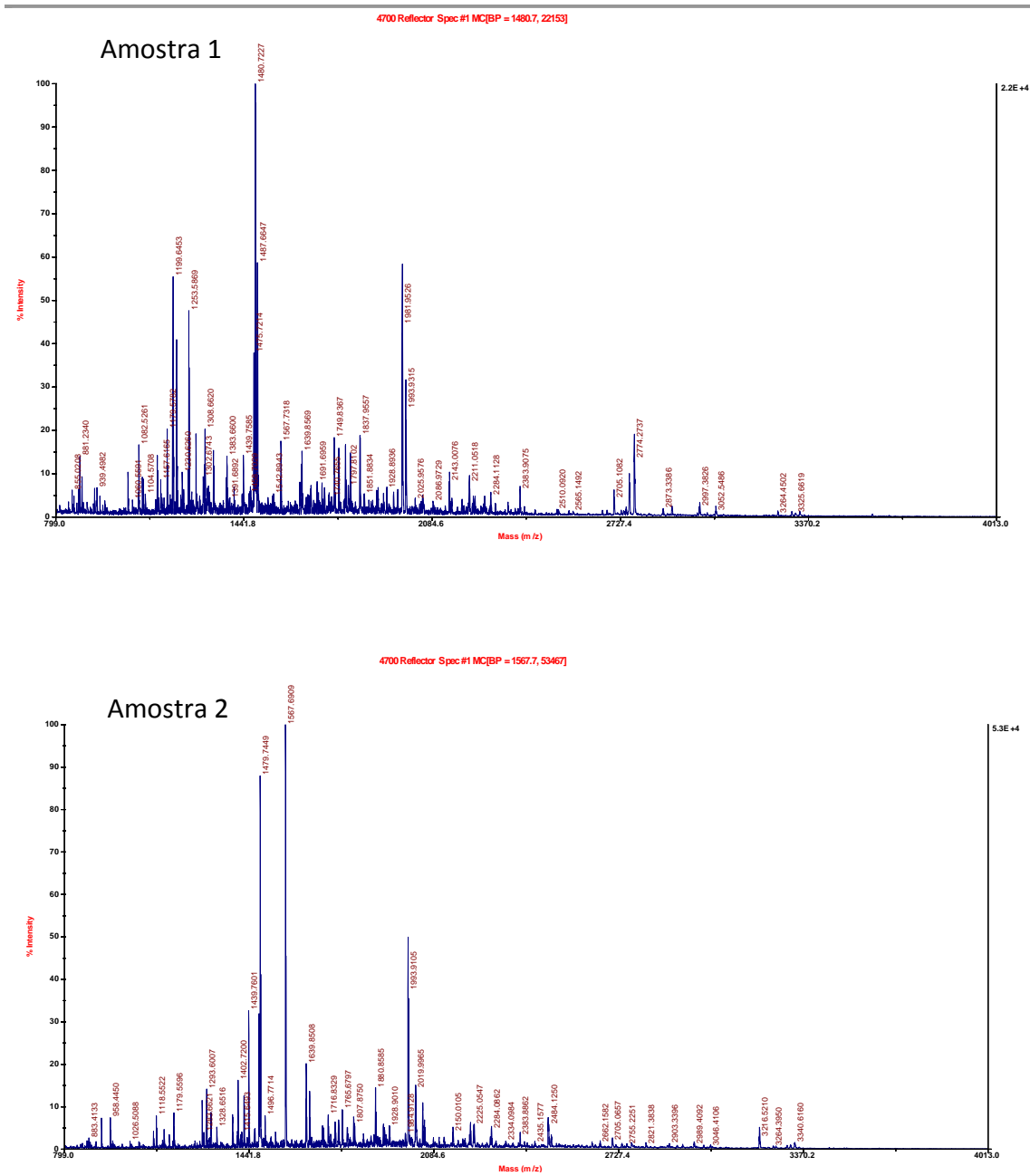
**FIGURA 33 - Imagem digitalizada do gel de SDS-PAGE a partir do qual foram extraídas as duas bandas a analisar por MALDI-TOF-TOF**

Preparou-se uma amostra de lisado de ilhéus, de forma semelhante à dos ensaios de *Western Blot*. Aplicaram-se padrões de diferentes marcas, com diferente constituição, para auxiliar a aferição da massa molecular das bandas. Extraíram-se as duas bandas assinaladas com o círculo com o auxílio de um bisturi para posterior análise por MALDI-TOF-TOF. À amostra 1 correspondeu uma massa calculada de 68,4 kDa e à amostra 2 correspondeu uma massa calculada de 65,2 kDa.

A análise por MALDI-TOF permitiu obter os espectros de massa apresentados na Figura 34. Realizou-se ainda uma digestão teórica do péptido correspondente à isoforma  $\alpha_1$  de rato, utilizando uma ferramenta informática (programa *ExpASY Proteomics Server* do *Swiss Institute of Bioinformatic*) que origina fragmentos que não têm sobreposição com os obtidos nas amostras 1 e 2 (ver Tabela 3).

A comparação entre a massa dos fragmentos de digestão pela tripsina obtidos para as amostras 1 e 2, observáveis nos espectros de massa, e a obtida teoricamente para a isoforma  $\alpha_1$  da Na,K-ATPase de rato, obtida informaticamente (Tabela 3), permitiu afirmar que as

amostras analisadas não correspondem nem a uma subunidade  $\alpha_1$ -truncada nem a um produto de degradação da Na,K-ATPase, devendo, por isso, tratar-se de marcação inespecífica.



**FIGURA 34 - Espectros de massa correspondentes à análise por MALDI-TOF das proteínas com massa molecular ~65kDa extraídas do gel de SDS-PAGE**

Espectros de massa obtidos para cada uma das amostras analisadas, após digestão por tripsina. A amostra 1 corresponde a uma massa calculada na SDS-PAGE de 68,4 kDa e a amostra 2 a uma massa calculada na SDS-PAGE de 65,2 kDa.

**TABELA 3 - Massas obtidas para a digestão teórica da subunidade  $\alpha_1$  da Na,K-ATPase**

Utilizou-se para este cálculo teórico o programa *ExpASY Proteomics Server* do *Swiss Institute of Bioinformatics* (<http://expasy.org/tools/peptidecutter/>).

9035.9981	4109.8716	2823.5032	2004.0769	1629.7689	1302.5960	1030.5713	740.4487
9051.9931	4141.8614	2739.3465	2036.0667	1619.7507	1280.6416	1028.5193	756.4436
8647.8201	3963.9677	2689.4396	1940.0447	1779.6834	1296.6365	1026.5690	739.4209
8491.7190	3995.9575	2705.4345	1923.9229	1584.8744	1268.7143	990.5982	734.3977
6857.3039	3820.8513	2672.2220	1939.9178	1577.8758	1284.7092	982.5316	704.4123
6873.2988	3412.7301	2704.2118	2003.8892	1577.8468	1263.7168	1062.4979	702.3781
6519.4769	3428.7250	2752.1883	1867.8953	1593.8417	1261.6786	979.5207	688.3624
6551.4668	3307.6878	2590.2718	1866.9643	1545.7179	1250.7037	974.5265	684.4039
6491.4708	3323.6827	2553.2289	1838.0204	1523.7998	1266.6987	960.4091	670.4722
6523.4606	3284.6351	2569.2238	1854.0153	1539.7947	1231.6528	976.4040	668.3613
6491.2731	3300.6300	2544.3456	1829.9239	1519.7023	1311.6191	957.5186	642.4661
6507.2680	3238.4204	2464.2024	1819.9224	1599.6686	1194.6048	939.4894	630.3569
6363.3758	3270.4102	2480.1973	1816.9360	1518.7832	1210.5997	928.4999	614.3620
6395.3657	3224.6998	2446.1588	1832.9309	1534.7781	1139.5844	890.4690	576.3174
6140.1105	3130.4534	2462.1537	1811.9497	1484.7168	1135.5894	888.4938	575.2348
6172.1003	3210.4197	2445.1105	1804.9340	1470.8097	1110.6265	878.4288	563.2970
5931.9109	3120.4352	2425.1949	1765.0040	1459.5870	1190.5929	894.4237	579.2919
5947.9059	3360.3342	2406.1565	1780.9989	1491.5769	1100.5470	862.5032	556.3314
5123.4667	3119.3402	2566.0892	1752.8551	1454.8148	1088.5041	856.4159	533.2976
5139.4616	3116.6311	2317.0156	1740.9755	1436.6573	1104.4990	827.4621	549.2926
5120.6204	3132.6260	2312.2543	1725.8918	1452.6522	1086.5724	821.3424	529.2729
5152.6102	3095.6460	2245.1380	1716.7246	1430.6910	1084.6010	811.3944	516.3140
4929.6349	3095.6183	2261.1329	1748.7144	1406.7386	1069.5748	805.4236	514.3711
4961.6248	3111.6133	2226.1011	1699.9159	1387.7539	1056.5394	754.3804	505.2915
4358.9869	3074.6228	2213.1771	1696.9163	1467.7202	1072.5343	770.3753	521.2864
4390.9768	2967.5510	2202.1070	1712.9112	1381.7508	1038.5037	750.3338	
4318.2958	2874.4932	2218.1019	1653.8846	1397.7457	1054.4986	766.3287	
4350.2857	2890.4881	2131.1546	1646.8781	1342.6783	1035.4775	746.3977	
4123.0103	2834.3842	2039.0477	1662.8730	1338.7852	1051.4724	743.4410	

A utilização da técnica de MALDI-TOF-TOF permitiu também obter informação sobre a sequência de alguns destes fragmentos. A combinação com a informação dos dados de espectro de massa com a dos fragmentos sequenciados por MS-MS, realizada informaticamente, utilizando o motor de busca Mascot e a base de dados NCBI, permitiu determinar com elevada certeza que a amostra 1 corresponde a uma proteína de choque térmico (Heat shock 71 kDa) e que a amostra 2 corresponde a uma transcetolase. O resultado dessas pesquisas apresenta-se na Tabela 4 e na Tabela 5.

**TABELA 4 - Resultados de MALDI-TOF-TOF identificativos da amostra 1**

a - A pontuação limite para uma probabilidade de identificação proteica com  $p < 0,05$  é 66; b – Consideram-se peptídeos com um intervalo de confiança acima de 95%

Proteína	Nº acesso	MM (Da)	Pontuação Proteica <sup>a</sup> / Intervalo de confiança (%)	Pontuação para os iões totais/ Intervalo de confiança (%)	% de sequência coberta	Nº de padrões de MS/MS atribuídos a peptídeos <sup>b</sup>
Produto proteico sem nome [ <i>Mus musculus</i> ]	gi 74220592	70648	554/100	464/100	48	6
Heat shock - 71 kDa	gi 123647	70761	554/100	464/100	47	6
Produto proteico sem nome [ <i>Mus musculus</i> ]	gi 74225511	70783	548/100	464/100	47	6
Produto proteico sem nome [ <i>Mus musculus</i> ]	gi 74211667	60764	546/100	464/100	50	6
Produto proteico sem nome [ <i>Mus musculus</i> ]	gi 74143862	70813	544/100	464/100	46	6



**TABELA 5 - Resultados de MALDI-TOF-TOF identificativos da amostra 2**

a - A pontuação limite para uma probabilidade de identificação proteica com  $p < 0,05$  é 66; b – Consideram-se peptídeos com um intervalo de confiança acima de 95%

Proteína	Nº acesso	MM (Da)	Pontuação Proteica <sup>a</sup> / Intervalo de confiança (%)	Pontuação para os iões totais/ Intervalo de confiança (%)	% de sequência coberta	Nº de padrões de MS/MS atribuídos a peptídeos <sup>b</sup>
Transcetolase [ <i>Rattus norvegicus</i> ]	gi 12018252	71141	272/100	259/100	40	3
Transcetolase	gi 1729977	67601	270/100	259/100	40	3
Transcetolase, isoforma CRA_a [ <i>Rattus norvegicus</i> ]	gi 149034221	71113	247/100	235/100	35	3
Transcetolase, isoforma CRA_b [ <i>Rattus norvegicus</i> ]	gi 149034222	67573	244/100	235/100	35	3
Produto proteico sem nome t [ <i>Mus musculus</i> ]	gi 74220095	57768	244/100	235/100	33	3

Estes resultados permitiram concluir que a marcação da banda a ~65 kDa correspondia a marcação inespecífica do anticorpo e não a uma isoforma  $\alpha_1$ -truncada ou qualquer produto de degradação da isoforma  $\alpha_1$  da Na,K-ATPase, não sendo por isso, relevante no prosseguimento deste trabalho.

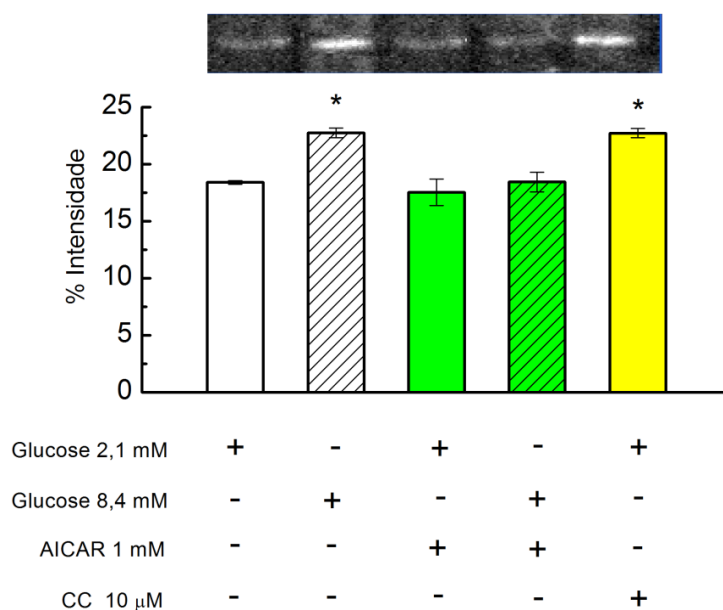
Estes resultados, combinados com o facto de se ter identificado a banda a ~100kDa correspondente à subunidade  $\alpha_1$ -Na,K-ATPase por marcação com o anticorpo anti- $\alpha_1$  (ver secção 3.4.3.5.2), permitiram excluir da análise por Western Blot a banda de ~65kDa, tendo-se procedido apenas à análise da intensidade de fosforilação da banda de ~100kDa.

#### 3.4.4.2.3 ANÁLISE DA BANDA DE ~100 kDa POR WESTERN BLOT

Uma vez esclarecido que a subunidade  $\alpha_1$ -Na,K-ATPase fosforilada no resíduo de serina-23 se encontrava na fracção a ~100 kDa, procurou determinar-se o grau de fosforilação induzido pela glucose, no sentido de avaliar a relevância desta etapa na regulação da actividade da bomba induzida pela glucose.

Um exemplo representativo dos resultados relativos à banda de 100 kDa, obtida para a imunomarcação com o anticorpo anti- $\alpha_1$ -(fosforilada na posição Ser-23)-Na,K-ATPase, a partir de extractos de lisados de ilhéus incubados de acordo com o protocolo descrito em 3.4.3.4 apresenta-se na Figura 35.

A análise destes resultados permitiu demonstrar que a fosforilação mais intensa da subunidade  $\alpha_1$  na posição Ser-23 ocorreu quando os ilhéus foram incubados com 8,4 mM de glucose e com o composto C, inibidor da AMPK, que mimetizou a acção da glucose na actividade da Na,K-ATPase (secção 3.4.4.1), e que também induziu um aumento significativo da fosforilação da subunidade  $\alpha_1$  da Na,K-ATPase na posição serina-23 (Figura 35). Nestes dois casos, a intensidade relativa das bandas foi semelhante e cerca de 22,7%. Níveis de fosforilação menos intensos ocorreram quando os ilhéus foram incubados com 2,1 mM de glucose ou quando, na presença de 8,4 mM de glucose, se activou a AMPK com AICAR (Figura 35).



**FIGURA 35 - Análise da intensidade relativa das bandas obtidas por *Western Blot* para a imunomarcação da subunidade  $\alpha_1$  da Na,K-ATPase fosforilada na posição Ser-23**

Foi realizado um *Western Blot* para análise da fosforilação da subunidade  $\alpha_1$  da Na,K-ATPase na posição Ser-23. Para isso, realizam-se incubações de ilhéus de Langerhans sob diferentes condições experimentais, designadamente na presença de glucose 2,1mM ou de 8,4 mM e na presença ou ausência dos moduladores da AMPK, AICAR e Composto C (CC). No gráfico apresentam-se as percentagens de intensidade relativa de cada banda. Um extracto da imagem da membrana representativo das experiências realizadas é apresentado acima do gráfico. Os resultados são representativos da média  $\pm$  epm de três experiências independentes (\* significa  $p < 0,05$ , por ANOVA).

Estes resultados mostram que em condições em que a AMPK se encontra inibida, por acção do inibidor composto C, o nível da fosforilação da Na,K-ATPase mediado pela PKC aumentou. Em concordância, em situações em que a AMPK se encontra activada, por acção do AICAR, o nível de fosforilação da Na,K-ATPase diminuiu. Adicionalmente, o AICAR antagonizou o efeito de 8,4 mM de glucose, observando-se nesta situação que o nível de fosforilação foi semelhante ao observados na presença de 2,1 mM de glucose.

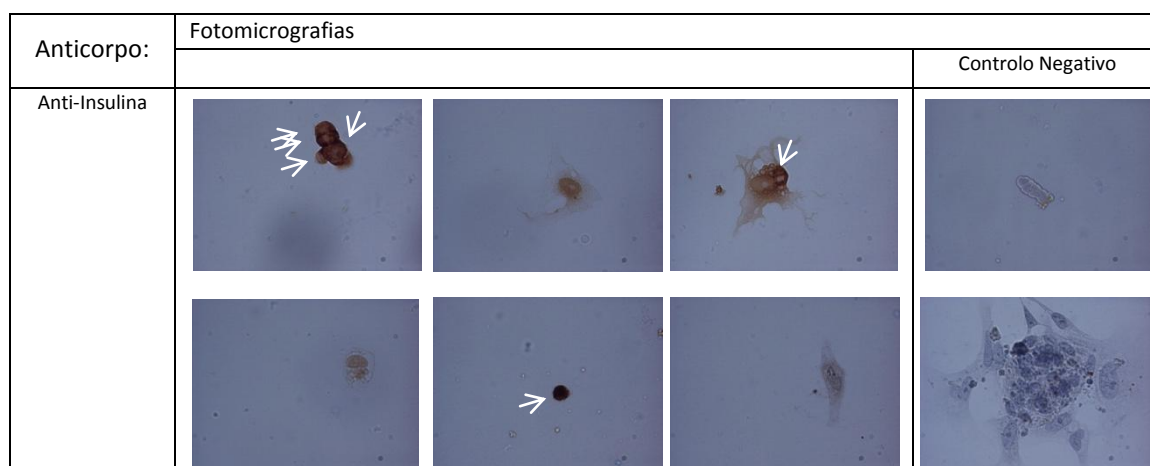
Estes resultados sugerem ainda que a transdução de sinal iniciado com a glucose, passa pela inibição do sensor metabólico AMPK, e conduz à inibição da  $\alpha_1$ -Na,K-ATPase como resultado da fosforilação exercida pela PKC. Assim, a fosforilação da subunidade  $\alpha_1$  da Na,K-ATPase pela PKC na posição Ser-23 poderá constituir um dos mecanismos subjacentes à regulação da actividade da bomba induzida por glucose.

#### 3.4.4.2.4 ESTUDO IMUNOCITOQUÍMICO DA MARCAÇÃO PARA A SUBUNIDADE $\alpha_1$ -Na,K-ATPASE FOSFORILADA NA POSIÇÃO SER-23

Num estudo paralelo procurou-se também avaliar a intensidade de fosforilação em células  $\beta$ -pancreáticas intactas, dado que os *Western Blots* foram efectuados em extractos de ilhéus de Langerhans, os quais são constituídos por diferentes tipos celulares, muito embora as células  $\beta$ -pancreáticas constituam 80-90% das células do ilhéu, em rato.

As células  $\beta$ -pancreáticas foram inicialmente identificadas utilizando um anticorpo anti-insulina. Na Figura 36 podem observar-se células originárias da dispersão dos ilhéus de Langerhans, com diferentes morfologias. A marcação com o anticorpo anti-insulina permitiu identificar as células  $\beta$ -pancreáticas, por estas apresentarem uma coloração castanha (ver Figura 36 - seta branca). Essa marcação mostrou que as células insulino-positivas são redondas e de pequenas dimensões, sendo, portanto, reconhecidas como células  $\beta$ -pancreáticas.

Uma vez conhecidas as características morfológicas que permitiram identificar as células  $\beta$ -pancreáticas, tornou-se possível a realização do estudo da marcação imunocitoquímica com o anticorpo anti-(fosfo-Ser-23)- $\alpha_1$ -Na,K-ATPase.

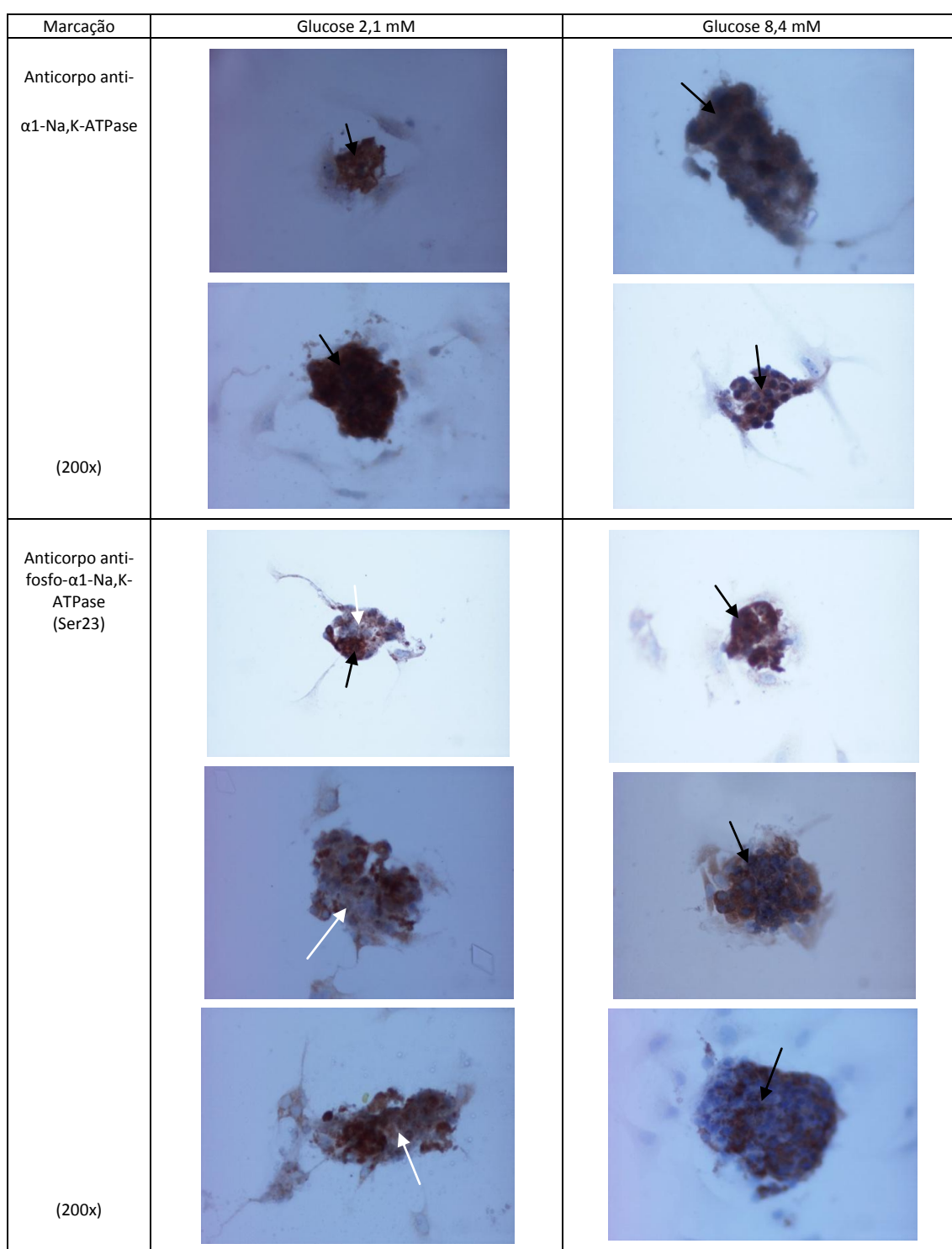


**FIGURA 36 – Identificação de células  $\beta$ -pancreáticas em imunocitoquímica**

Foram realizadas marcações imunocitoquímicas a lâminas onde foram cultivadas células obtidas a partir da dispersão de ilhéus de Langerhans, utilizando-se o anticorpo primário anti-insulina. Foi utilizado o cromogéneo DAB que origina uma coloração castanha nas células insulino-positivas, isto é, as células  $\beta$ -pancreáticas (seta branca). Nas lâminas de controlo negativo não é adicionado o anticorpo primário. Foram realizadas lâminas em triplicado para cada situação estudada, tendo depois sido fotografadas numa média de cinco fotografias por lâmina. As fotomicrografias que se apresentam são representativas do total analisado. Ampliação de 400x.

Foram realizadas marcações imunocitoquímicas a lâminas onde se cultivaram células obtidas por dispersão de ilhéus de Langerhans, tratadas como descrito na secção 3.4.3.6. Resumidamente, as células foram expostas, durante 15 min, a concentrações de glucose diferentes (2,1 mM ou 8,4 mM). Seguiu-se a marcação com os anticorpos primários anti- $\alpha_1$ -Na,K-ATPase e anti- $\alpha_1$ (fosfo-Ser23)-Na,K-ATPase. As fotomicrografias representativas dos resultados obtidos nestes ensaios estão apresentadas na Figura 37.

A Figura 37 (painel superior) mostra fotomicrografias de células marcadas com anticorpo anti- $\alpha_1$ -Na,K-ATPase. Observou-se que a marcação é intensa (seta preta) independentemente da concentração de glucose com que as células foram incubadas, estando esta marcação associada às células previamente identificadas como  $\beta$ -pancreáticas. Na Figura 37 (painel inferior) estão apresentadas fotomicrografias representativas da marcação imunológica com o anticorpo anti- $\alpha_1$ (fosforilado na posição Ser-23)-Na,K-ATPase. Pode observar-se que ocorreu imunomarkação para a subunidade  $\alpha_1$  da Na,K-ATPase fosforilada na posição serina-23 nas células identificadas como  $\beta$ -pancreáticas, independentemente da concentração de glucose com que foram incubadas. Nestas experiências observou-se ainda que a intensidade da marcação foi mais intensa e mais homogénea em células expostas a 8,4 mM de glucose.



**FIGURA 37 – Análise da intensidade de fosforilação de  $\alpha$ <sub>1</sub>-Na,K-ATPase no resíduo Ser-23 por imunocitoquímica.** Foram realizadas marcações imunocitoquímicas a lâminas onde foram cultivadas células obtidas a partir da dispersão de ilhéus de Langerhans. Essas lâminas foram pré-incubadas durante 30 min em glucose 2,1 mM e seguidamente incubadas, durante 15 min com concentrações de glucose diferentes (2,1 mM e 8,4 mM). Foram depois marcadas com os anticorpos primários anti- $\alpha$ <sub>1</sub>-Na,K-ATPase e anti- $\alpha$ <sub>1</sub>(fosfo-Ser23)-Na,K-ATPase. A revelação foi realizada com DAB, que origina uma coloração castanha nas áreas imuno-marcadas. As áreas mais e menos intensamente marcadas estão identificadas com uma seta preta ou branca, respectivamente. Foram realizadas lâminas em triplicado para cada situação estudada, tendo depois sido realizadas fotomicrografias, numa média de cinco por lâmina. As fotomicrografias que se apresentam são representativas do total analisado.

Estes resultados mostram que o aumento da concentração de glucose induziu um aumento da fosforilação da isoforma  $\alpha_1$  da Na,K-ATPase na posição Ser-23 em células  $\beta$ -pancreáticas, correspondente à acção da PKC.

O mecanismo pelo qual a fosforilação no resíduo Ser-23, dependente da acção da PKC, exerce o seu efeito inibitório na actividade da Na,K-ATPase não foi ainda elucidado. Não se sabe se a fosforilação causa a inibição da actividade da bomba por alteração da cinética de transporte ou por remoção das unidades da bomba activas da membrana, sendo necessários estudos posteriores para um mais amplo esclarecimento do mecanismo de modelação da actividade da Na,K-ATPase por glucose.

Estas observações estão de acordo com os resultados obtidos por *Western Blot* mostrando que esta é uma característica da cascata de sinalização desencadeada pela glucose na célula  $\beta$ -pancreática, embora não permita excluir a possibilidade desta também ocorrer noutras células do ilhéu, em particular nas células  $\alpha$ . Embora estes resultados não permitem garantir que a fosforilação da isoforma  $\alpha_1$  da Na,K-ATPase pela PKC seja o único mecanismo a contribuir para a regulação da actividade da bomba por glucose, é sem dúvida um mecanismo que tem relevância e que está dependente da acção moduladora da AMPK.

Se tomarmos em consideração os resultados da secção 3.3, que mostraram existir uma inversão da expressão isoenzimática em GIR quando comparados com controlos, caracterizada por uma diminuição da expressão dos isoenzimas  $\alpha_1\beta$  e um aumento da expressão dos isoenzimas  $\alpha_2\beta$  da Na,K-ATPase na células  $\beta$ -pancreáticas, e tendo em conta que o resíduo fosforilado pela PKC se encontra numa região altamente conservada da isoforma  $\alpha_1$ , inexistente na isoforma  $\alpha_2$ , pode-se inferir que a fosforilação mediada pela PKC é um dos mecanismos que pode contribuir para explicar as diferenças observadas na acção da glucose na actividade da Na,K-ATPase em GIR.

Para além da contribuição da expressão isoenzimática diferencial entre ratos controlo e GIR para as diferenças observadas na actividade enzimática da Na,K-ATPase induzida pela glucose, os resultados apontam ainda para alterações na cascata de sinalização intracelular, nomeadamente na modulação da AMPK, caracterizada por uma aparente perda de sensibilidade ao AMP, embora não seja possível excluir a hipótese de a própria razão AMP:ATP estar alterada em GIR, em resultado de eventuais alterações no metabolismo da glucose.

### 3.4.5 Conclusões

Os nossos resultados experimentais apontam para a participação da AMPK e da PKC na cascata de sinalização intracelular que contribui para a regulação da actividade da Na,K-ATPase por glucose. Foi possível concluir que:

- a) O AICAR, um activador da AMPK, aboliu o efeito inibitório induzido por glucose na actividade da Na,K-ATPase nos controlos;
- b) Em GIR, o AICAR apenas atenuou o efeito inibitório induzido por glucose na actividade da Na,K-ATPase;
- c) O composto C, inibidor da AMPK, mimetizou o efeito da glucose quer em controlos, quer em GIR, tendo nestes últimos potenciado o efeito inibitório induzido pela glucose na actividade da Na,K-ATPase;
- d) Em ilhéus, o nível de fosforilação da isoforma  $\alpha_1$  da Na,K-ATPase no resíduo de serina-23 aumentou, quer em resposta à glucose (8,4 mM), quer em resposta a composto C, quando comparado com o nível de fosforilação registado na presença de AICAR ou de glucose basal (2,1 mM);
- e) Em células  $\beta$ -pancreáticas isoladas também se observou um aumento da fosforilação da Na,K-ATPase no resíduo de serina-23 em resposta a 8,4 mM de glucose quando comparado com a situação basal (2,1 mM de glucose).

Em resumo, os resultados desta secção mostram que a AMPK constitui um elemento relevante na cascata de sinalização que contribui para a regulação da actividade da Na,K-ATPase por glucose. Sugerem também que o efeito inibitório da glucose seja mediado por fosforilação da isoforma  $\alpha_1$  pela PKC, e ainda que a AMPK seja um elemento desta cascata de sinalização que medeia a trasdução de sinal entre a glucose e a PKC. Para além disso, mostram ainda que esta via de sinalização está comprometida em GIR, o que poderá dever-se ao contributo das alterações na expressão isoenzimática previamente observadas e, conjuntamente, a alterações na sensibilidade desta via de sinalização à glucose.





## 4 CONCLUSÕES GERAIS

Pretendeu-se com este trabalho estudar o efeito da glucose na actividade da Na,K-ATPase em célula  $\beta$ -pancreática, bem como avaliar potenciais alterações nesta regulação em situação de normotolerância e intolerância à glucose. Para este estudo, considerou-se relevante a manutenção das vias de sinalização intracelulares e, não havendo descrição na literatura da utilização de células em cultura aderente para o estudo da actividade enzimática da Na,K-ATPase, foi necessário desenvolver um método que permitisse determinar esta actividade em células  $\beta$ -pancreáticas intactas. Para além disso, foi necessário a escolha de um modelo animal de intolerância à glucose. Os ratos GIR foram escolhidos por apresentarem normoglicemia no jejum, alterações da PTGO e hiperinsulinemia em jejum. Adicionalmente, estes animais apresentam também disfunção da célula  $\beta$ -pancreática, no que diz respeito à secreção de insulina induzida por glucose, que se caracterizou por uma resposta diminuída ao estímulo, quando comparada com os controlos.

Os resultados apresentados neste trabalho permitem concluir que:

- Foi possível desenvolver um método para a determinação da actividade enzimática da Na,K-ATPase em células  $\beta$ -pancreáticas intactas, mantendo todos os sistemas de sinalização intracelulares. Este método mostrou ser adequado ao estudo do efeito da glucose na actividade enzimática da Na,K-ATPase em célula  $\beta$ -pancreática e permitiu manter as células viáveis, possibilitando a determinação de outros parâmetros, sequencialmente ou simultaneamente, como é o caso da medição da secreção de insulina.
- A actividade da Na,K-ATPase é regulada por glucose em célula  $\beta$ -pancreática. Observou-se uma resposta bimodal, na qual a bomba se encontra inibida na ausência de glucose e para concentrações da hexose iguais ou superiores a 5,6 mM, apresentando o valor de actividade máximo para 2,1 mM de glucose (60 min de incubação com glucose). Adicionalmente, a cinética de inibição da actividade da Na,K-ATPase induzida por 8,4 mM de glucose apresentou um perfil bifásico, registando-se o máximo de inibição, com uma magnitude de 68%, aos 20 min, seguindo-se uma ligeira

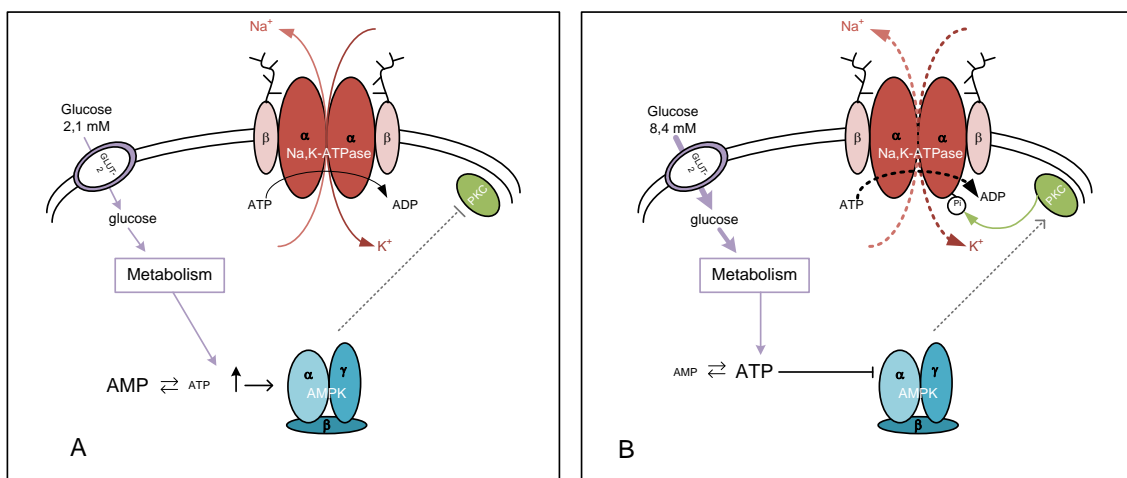
recuperação. A inibição da Na,K-ATPase é induzida por concentrações de glucose que estimulam a secreção de insulina. Esta inibição poderá contribuir para a modulação da secreção de insulina, pois favorece a despolarização da membrana, apresentando também características temporais sobreponíveis com o perfil bifásico da secreção desta hormona.

- Em ratos GIR, a regulação da actividade da Na,K-ATPase por glucose está comprometida. Por uma lado, os valores de actividade da bomba foram semelhantes ao valor máximo observado em controlos (2,1 mM de glucose), independentemente da concentração de glucose a que as células  $\beta$ -pancreáticas de GIR foram sujeitas. Por outro lado, do ponto de vista cinético observou-se um atraso da inibição que, embora se tivesse registado aos 20 min, apresentou um carácter transitório e de magnitude inferior à dos controlos (40%). Esta alteração na acção da glucose na actividade da Na,K-ATPase observada em GIR poderá, assim, contribuir para as alterações na actividade eléctrica e consequentemente na secreção de insulina, já registadas em modelos diabéticos.
  
- Em controlos, as isoformas  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  e  $\beta_2$  da Na,K-ATPase foram identificadas em ilhéus de Langerhans. A distribuição das isoformas  $\alpha_1$  e  $\alpha_3$  foi semelhante, apresentando-se igualmente distribuídas por todas as células dos ilhéus de Langerhans, enquanto que a isoforma  $\beta_2$  é expressa maioritariamente nas células da periferia dos mesmos. Pelo contrário, a isoforma  $\alpha_2$  foi detectada exclusivamente nas células da periferia e apenas em 35% dos ilhéus analisados.
  
- Em GIR, foram identificadas as mesmas isoformas que em controlos e com a mesma distribuição nos ilhéus de Langerhans. Contudo, observou-se uma inversão da expressão isoenzimática relativa de  $\alpha_1\beta$  e  $\alpha_2\beta$ , tendo-se registado um aumento da expressão da isoforma  $\alpha_2$ -Na,K-ATPase de cerca de 4x e uma ligeira diminuição da isoforma  $\alpha_1$ -Na,K-ATPase em GIR, na periferia do ilhéu. Esta alteração de expressão ocorreu maioritariamente nas células  $\alpha$  mas também foi registada nas células  $\beta$ -pancreáticas. As alterações de expressão isoenzimática da subunidade  $\alpha$  da Na,K-

ATPase poderão estar a contribuir para a diferente regulação da actividade da bomba pela glucose observada em GIR.

- A AMPK parece constituir um dos elementos na mediação da regulação da actividade enzimática da Na,K-ATPase induzida por glucose. A activação ou inibição da AMPK promoveram um aumento ou uma diminuição da actividade da Na,K-ATPase, respectivamente. Observou-se que o AICAR (activador da AMPK) antagonizou o efeito da glucose (8,4 mM), abolindo a inibição induzida por este segretagogo, enquanto que o composto C (inibidor da AMPK) induziu uma inibição significativa da actividade da Na,K-ATPase registada em 2,1 mM de glucose. Estes resultados sugerem que o efeito regulador da glucose sobre a Na,K-ATPase é, pelo menos parcialmente, mediado pela AMPK.
  
- Em GIR, a regulação da Na,K-ATPase induzida por glucose que depende da AMPK parece estar parcialmente comprometida. Observou-se que o efeito do AICAR foi apenas parcial, não abolindo a inibição induzida por glucose na actividade da Na,K-ATPase, contrariamente ao que fora observado nos controlos. O composto C, por seu turno, provocou uma inibição semelhante à observada nos controlos, em 2,1 mM de glucose, e induziu uma potenciação da inibição induzida por 8,4 mM de glucose. Estes resultados sugerem uma menor sensibilidade da AMPK aos estímulos derivados do metabolismo ou, alternativamente, a alterações no metabolismo da glucose que conduzam a uma razão AMP:ATP modificada em GIR relativamente aos controlos.
  
- A PKC parece estar implicada no processo de transdução de sinal que leva à inibição da Na,K-ATPase induzida por glucose. De facto, observou-se um aumento da fosforilação da subunidade  $\alpha_1$ -Na,K-ATPase na posição Ser-23, uma posição de consenso para a actuação da PKC, em resposta a 8,4 mM de glucose, bem como na presença de composto C. Em concordância, esta fosforilação foi inibida na presença de AICAR. A fosforilação da  $\alpha_1$ -Na,K-ATPase, mediada pela PKC, correlaciona-se com a inibição da actividade da bomba e é dependente da modulação da AMPK.

Estes resultados em conjunto permitem sugerir que a regulação da actividade da Na,K-ATPase pela glucose se processa, pelo menos em parte, por uma via que envolve a AMPK e a fosforilação pela PKC da Na,K-ATPase. A Figura 38 pretende constituir um esquema elucidativo de algumas etapas deste processo de regulação. Em situação de glucose basal (2,1 mM), prevê-se que a concentração de AMP seja elevada e, em consequência, a AMPK esteja activa. A activação da AMPK poderá ter como consequência a inibição da PKC ou a activação de fosfatases que contraponham a acção fosforilativa da PKC sobre a Na,K-ATPase. Nestas circunstâncias, o número de unidades da Na,K-ATPase fosforiladas será menor, sendo a actividade total da bomba superior (Figura 38-A). Com o aumento da concentração de glucose ( $\geq 5,6$  mM), este nutriente entrará na célula, onde sofrerá metabolização, promovendo o aumento da concentração intracelular de ATP, acompanhado de uma diminuição dos níveis de AMP, provocando a inibição da AMPK. Nesta situação, a PKC activar-se-á, ou alternativamente as fosfatases ficarão inibidas, aumentando o nível de fosforilação da Na,K-ATPase, diminuindo a sua actividade (Figura 38-B).



**FIGURA 38 – Esquema elucidativo de algumas etapas do processo de regulação da Na,K-ATPase induzido por glucose**

Neste esquema apresenta-se uma hipótese de mecanismo para a acção da glucose na regulação da actividade da Na,K-ATPase em célula  $\beta$ -pancreática, envolvendo a AMPK e a PKC. **A** - situação em que a concentração de glucose é basal. **B** - situação em que a glucose é estimulatória.

Este estudo foi conduzido de forma a avaliar a fosforilação do resíduo de serina 23 da isoforma  $\alpha_1$  da subunidade  $\alpha$  da Na,K-ATPase, motivo de consenso inexistente nas outras isoformas desta subunidade, pelo que este processo de regulação será expectável que actue exclusivamente sobre os isoenzimas  $\alpha_1\beta$ .

Este processo de regulação da Na,K-ATPase revelou-se modificado em células  $\beta$ -pancreáticas de GIR, o que parece resultar da contribuição de pelo menos dois fenómenos: por um lado, de uma distribuição isoenzimática alterada que se caracteriza por uma diminuição da expressão dos isoenzimas  $\alpha_1\beta$  e, por outro, de uma modulação anómala do processo envolvido na regulação da actividade da Na,K-ATPase acima descrito (Figura 38) que parece resultar, pelo menos em parte, de alterações da função da AMPK.

Finalmente, os resultados sugerem que a regulação da actividade da Na,K-ATPase por glucose poderá desempenhar um papel relevante na fisiologia da célula  $\beta$ -pancreática e que a regulação anómala deste sistema enzimático poderá contribuir para o desacoplamento entre o estímulo e a secreção nestas células. Esta alteração parece constituir uma disfunção da célula  $\beta$ -pancreática, presente em situações de intolerância à glucose, que pode ter relevância na etiologia da DT2.



## BIBLIOGRAFIA

- Agarwal,V.R., Rastogi,A.K., Sahib,M.K., & Sagar,P. (1985) In vitro insulin action on different ATPases of erythrocyte membranes in normal and diabetic rats. *Acta Diabetol.Lat.*, **22**, 111-118.
- Ahmad,S.S., Tsou,K.C., Ahmad,S.I., Rahman,M.A., & Kirmani,T.H. (1985) Studies on cataractogenesis in humans and in rats with alloxan-induced diabetes. I. Cation transport and sodium-potassium-dependent ATPase. *Ophthalmic Res.*, **17**, 1-11.
- Aizawa,T., Sato,Y., Komatsu,M., Ishihara,F., Taguchi,N., & Hashizumo,K. (1994) ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel-independent, glucose-induced signalling in the pancreatic B-cell. *Frontiers of Insulin Secretion and Pancreatic B-cell research* (ed. by P. Flatt & S. Lenzen), pp. 167-172. Smith-Gordon and Company Limited, London.
- Akera,T. & Brody,T.M. (1977) The role of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in the inotropic action of digitalis. *Pharmacol Rev.*, **29**, 187-220.
- Al-Khalili,L., Kotova,O., Tsuchida,H., Ehren,I., Feraille,E., Krook,A., & Chibalin,A.V. (2004) ERK1/2 mediates insulin stimulation of Na(+),K(+)-ATPase by phosphorylation of the alpha-subunit in human skeletal muscle cells. *J.Biol.Chem.*, **279**, 25211-25218.
- Alsahli,M. & Gerich,J. (2010) Abnormalities of insulin secretion and b-cell defects in type 2 diabetes. *Textbook of diabetes* (ed. by R. I. G. Holt, C. Cockram, A. Flyvbjerg, & B. Goldstein), pp. 160-173. Wiley-Blackwell, Oxford.
- American Diabetes Association (2010) Standards of Medical Care in Diabetes - 2010. *Diabetes Care*, **33**, S11-S61.
- American Diabetes Association (2011) Standards of Medical Care in Diabetes - 2011. *Diabetes Care*, **34**, S11-S61.
- Antunes,C.M. (2004) Actividade eléctrica e secreção pulsátil de insulina em ilhéus de Langerhans de animais normais e diabéticos. Tese de Doutoramento, Universidade de Coimbra, Portugal.
- Antunes,C.M., Rosario,L.M., & Santos,R.M. (2002) Reduced and delayed electric activity responsiveness of diabetic GK rat islets to glucose and sulphonilureia. (Abstract).*Proc.of XIII National Congress of Biochemistry*, **XIII**.
- Antunes,C.M., Salgado,A.P., Rosario,L.M., & Santos,R.M. (2000) Differential patterns of glucose-induced electrical activity and intracellular calcium responses in single mouse and rat pancreatic islets. *Diabetes.*, **49**, 2028-2038.
- Arystarkhova,E., Donnet,C., Asinovski,N.K., & Sweadner,K.J. (2002) Differential regulation of renal Na,K-ATPase by splice variants of the gamma subunit. *J Biol Chem*, **277**, 10162-10172.
- Ashcroft,F. (2000) *Ion channels and disease*, 1st edn, Academic Press, San Diego.
- Ashcroft,F.M., Harrison,D.E., & Ashcroft,S.J. (1984) Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells. *Nature*, **312**, 446-448.
- Barg,S., Eliasson,L., Renstrom,E., & Rorsman,P. (2002) A subset of 50 secretory granules in close contact with L-type Ca<sup>2+</sup> channels accounts for first-phase insulin secretion in mouse beta-cells. *Diabetes*, **51 Suppl 1**, S74-S82.
- Beguín,P., Beggah,A.T., Chibalin,A.V., Burgener-Kairuz,P., Jaisser,F., Mathews,P.M., Rossier,B.C., Cotecchia,S., & Geering,K. (1994) Phosphorylation of the Na,K-ATPase alpha-subunit by protein kinase A and C in vitro and in intact cells. Identification of a novel motif for PKC-mediated phosphorylation. *J Biol Chem*, **269**, 24437-24445.
- Bibert,S., Roy,S., Schaer,D., Horisberger,J.D., & Geering,K. (2008) Phosphorylation of phospholemman (FXD1) by protein kinases A and C modulates distinct Na,K-ATPase isozymes. *J Biol Chem*, **283**, 476-486.

- Blanco,G. & Mercer,R.W. (1998) Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am J Physiol*, **275**, F633-F650.
- Borge,P.D., Moibi,J., Greene,S.R., Trucco,M., Young,R.A., Gao,Z., & Wolf,B.A. (2002) Insulin receptor signaling and sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase in beta-cells. *Diabetes*, **51 Suppl 3**, S427-S433.
- Brini,M. & Carafoli,E. (2009) Calcium pumps in health and disease. *Physiol Rev.*, **89**, 1341-1378.
- Cameron,N.E., Cotter,M.A., Jack,A.M., Basso,M.D., & Hohman,T.C. (1999) Protein kinase C effects on nerve function, perfusion, Na(+), K(+)-ATPase activity and glutathione content in diabetic rats. *Diabetologia*, **42**, 1120-1130.
- Capendeguy,O. & Horisberger,J.D. (2004) Functional effects of Na+,K+-ATPase gene mutations linked to familial hemiplegic migraine. *Neuromolecular.Med.*, **6**, 105-116.
- Catterall,W.A. (1995) Structure and function of voltage-gated ion channels. *Annu.Rev.Biochem.*, **64**, 493-531.
- Ceiça,R.M. (1998) Bases fisiológicas da Diabetes Mellitus Tipo 2 num modelo animal - aspectos clínicos e estudos morfológicos e de secreção de insulina de ilhéus de Langerhans. Tese de Doutorado, Universidade de Coimbra.
- Chatzigeorgiou,A., Halapas,A., Kalafatakis,K., & Kamper,E. (2009) The use of animal models in the study of diabetes mellitus. *In Vivo*, **23**, 245-258.
- Cheng,S.X., Aizman,O., Nairn,A.C., Greengard,P., & Aperia,A. (1999) [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> determines the effects of protein kinases A and C on activity of rat renal Na+,K+-ATPase. *J.Physiol*, **518 ( Pt 1)**, 37-46.
- Chibalin,A.V. (2007) Regulation of the Na,K-ATPase: Special implications for cardiovascular complications of metabolic syndrome. *Pathophysiology*, **14**, 153-158.
- Chibalin,A.V., Pedemonte,C.H., Katz,A.I., Feraille,E., Berggren,P.O., & Bertorello,A.M. (1998) Phosphorylation of the catalytic alpha-subunit constitutes a triggering signal for Na+,K+-ATPase endocytosis. *J Biol Chem*, **273**, 8814-8819.
- Choi,K. & Kim,Y.B. (2010) Molecular mechanism of insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Korean J.Intern.Med.*, **25**, 119-129.
- Clark,A. (2010) Pancreatic Islet Pathology in Type 2 Diabetes. *Pancreatic Beta Cell in Health and Disease* (ed. by S. Seino & G. I. Bell), pp. 381-398. Springer, Hong-Kong.
- Clausen,T. (1998) Clinical and therapeutic significance of the Na+,K+ pump. *Clin.Sci.(Lond)*, **95**, 3-17.
- Cornish-Bowden,A. (2004) *Fundamentals of enzyme kinetics*, Portland Press.
- Costa,A.R., Real,J., Antunes,C.M., & Cruz-Morais,J. (2010) A new approach for determination of Na,K-ATPase activity: application to intact pancreatic beta-cells. *In Vitro Cell Dev.Biol.Anim*, **46**, 7-10.
- Crambert,G., Hasler,U., Beggah,A.T., Yu,C., Modyanov,N.N., Horisberger,J.D., Lelievre,L., & Geering,K. (2000) Transport and pharmacological properties of nine different human Na, K-ATPase isozymes. *J.Biol.Chem.*, **275**, 1976-1986.
- da Silva,X., Leclerc,I., Varadi,A., Tsuboi,T., Moule,S.K., & Rutter,G.A. (2003) Role for AMP-activated protein kinase in glucose-stimulated insulin secretion and preproinsulin gene expression. *Biochem J.*, **371**, 761-774.
- Dada,L.A., Chandel,N.S., Ridge,K.M., Pedemonte,C., Bertorello,A.M., & Sznajder,J.I. (2003) Hypoxia-induced endocytosis of Na,K-ATPase in alveolar epithelial cells is mediated by mitochondrial reactive oxygen species and PKC-zeta. *J Clin Invest*, **111**, 1057-1064.
- Das,P.K., Bray,G.M., Aguayo,A.J., & Rasminsky,M. (1976) Diminished ouabain-sensitive, sodium-potassium ATPase activity in sciatic nerves of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Exp.Neurol.*, **53**, 285-288.



- de Carvalho,A.P., Sweadner,K.J., Penniston,J.T., Zaremba,J., Liu,L., Caton,M., Linazasoro,G., Borg,M., Tijssen,M.A., Bressman,S.B., Dobyns,W.B., Brashear,A., & Ozelius,L.J. (2004) Mutations in the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> -ATPase alpha3 gene ATP1A3 are associated with rapid-onset dystonia parkinsonism. *Neuron*, **43**, 169-175.
- De La Tour,D.D., Raccach,D., Jannot,M.F., Coste,T., Rougerie,C., & Vague,P. (1998) Erythrocyte Na/K ATPase activity and diabetes: relationship with C-peptide level. *Diabetologia*, **41**, 1080-1084.
- DeFronzo,R.A. (2009) Banting Lecture. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes*, **58**, 773-795.
- Detimary,P., Jonas,J.C., & Henquin,J.C. (1996a) Stable and diffusible pools of nucleotides in pancreatic islet cells. *Endocrinology*, **137**, 4671-4676.
- Detimary,P., Van den Berghe,G., & Henquin,J.C. (1996b) Concentration dependence and time course of the effects of glucose on adenine and guanine nucleotides in mouse pancreatic islets. *J.Biol.Chem.*, **271**, 20559-20565.
- DiPolo,R. & Beauge,L. (2006) Sodium/calcium exchanger: influence of metabolic regulation on ion carrier interactions. *Physiol Rev.*, **86**, 155-203.
- Dostanic-Larson,I., Lorenz,J.N., Van Huisse,J.W., Neumann,J.C., Moseley,A.E., & Lingrel,J.B. (2006) Physiological role of the alpha1- and alpha2-isoforms of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase and biological significance of their cardiac glycoside binding site. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol*, **290**, R524-R528.
- Dotta,F., Previti,M., Neerman-Arbez,M., Dionisi,S., Cucinotta,D., Lenti,L., Di,M.U., & Halban,P.A. (1998) The GM2-1 ganglioside islet autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus is expressed in secretory granules and is not beta-cell specific. *Endocrinology*, **139**, 316-319.
- Drews,G., Krippeit-Drews,P., & Dufer,M. (2010) Electrophysiology of the Islet Cells. The islets of Langerhans, *Advances in experimental medicine and biology* (ed. by S. Islam), pp. 115-163. Springer, New York.
- Dufer,M., Haspel,D., Krippeit-Drews,P., Aguilar-Bryan,L., Bryan,J., & Drews,G. (2009) Activation of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase by insulin and glucose as a putative negative feedback mechanism in pancreatic beta-cells. *Pflugers Arch.*, **457**, 1351-1360.
- Elmi,A., Idahl,L.A., Sandstrom,P.E., & Sehlin,J. (2000a) D-glucose stimulates the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump in mouse pancreatic islet cells. *Int.J.Exp.Diabetes Res.*, **1**, 155-164.
- Elmi,A., Idahl,L.A., & Sehlin,J. (2001) Modulation of beta-cell ouabain-sensitive 86Rb<sup>+</sup> influx (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump) by D-glucose, glibenclamide or diazoxide. *Int.J.Exp.Diabetes Res.*, **1**, 265-274.
- Elmi,A., Idahl,L.A., & Sehlin,J. (2000b) Relationships between the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump and ATP and ADP content in mouse pancreatic islets: effects of meglitinide and glibenclamide. *Br J Pharmacol*, **131**, 1700-1706.
- Erdmann,E., Bolte,H.D., & Luderitz,B. (1971) The (Na<sup>+</sup> + + K<sup>+</sup>) -ATPase activity of guinea pig heart muscle in potassium deficiency. *Arch.Biochem.Biophys.*, **145**, 121-125.
- Erlj,D. & Grinstein,S. (1976) The number of sodium ion pumping sites in skeletal muscle and its modification by insulin. *J.Physiol*, **259**, 13-31.
- Ewart,H.S. & Klip,A. (1995) Hormonal regulation of the Na<sup>(+)</sup>-K<sup>(+)</sup>-ATPase: mechanisms underlying rapid and sustained changes in pump activity. *Am.J.Physiol*, **269**, C295-C311.
- Fambrough,D.M., Lemas,M.V., Hamrick,M., Emerick,M., Renaud,K.J., Inman,E.M., Hwang,B., & Takeyasu,K. (1994) Analysis of subunit assembly of the Na-K-ATPase. *Am J Physiol*, **266**, C579-C589.
- Fehlmann,M. & Freychet,P. (1981) Insulin and glucagon stimulation of (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>)-ATPase transport activity in isolated rat hepatocytes. *J.Biol.Chem.*, **256**, 7449-7453.
- Fekete,A., Rosta,K., Wagner,L., Prokai,A., Degrell,P., Ruzicska,E., Vegh,E., Toth,M., Ronai,K., Rusai,K., Somogyi,A., Tulassay,T., Szabo,A.J., & Ver,A. (2008) Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase is modulated by angiotensin II in diabetic rat kidney--another reason for diabetic nephropathy? *J.Physiol*, **586**, 5337-5348.

- Feraille,E., Barlet-Bas,C., Cheval,L., Rousselot,M., Carranza,M.L., Dreher,D., Arystarkhova,E., Doucet,A., & Favre,H. (1995a) Presence of two isoforms of Na, K-ATPase with different pharmacological and immunological properties in the rat kidney. *Pflugers Arch.*, **430**, 205-212.
- Feraille,E., Carranza,M.L., Gonin,S., Beguin,P., Pedemonte,C., Rousselot,M., Caverzasio,J., Geering,K., Martin,P.Y., & Favre,H. (1999) Insulin-induced stimulation of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in kidney proximal tubule cells depends on phosphorylation of the alpha-subunit at Tyr-10. *Mol.Biol.Cell*, **10**, 2847-2859.
- Feraille,E., Carranza,M.L., Rousselot,M., & Favre,H. (1994) Insulin enhances sodium sensitivity of Na-K-ATPase in isolated rat proximal convoluted tubule. *Am.J.Physiol*, **267**, F55-F62.
- Feraille,E., Rousselot,M., Rajerison,R., & Favre,H. (1995b) Effect of insulin on Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in rat collecting duct. *J Physiol*, **488 ( Pt 1)**, 171-180.
- Feschenko,M.S. & Sweadner,K.J. (1997) Phosphorylation of Na,K-ATPase by protein kinase C at Ser18 occurs in intact cells but does not result in direct inhibition of ATP hydrolysis. *J Biol Chem*, **272**, 17726-17733.
- Feschenko,M.S. & Sweadner,K.J. (1995) Structural Basis for Species-specific Differences in the Phosphorylation of Na,K-ATPase by Protein Kinase C. *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 14072-14077.
- Flamez,D., Roland,I., Berton,A., Kutlu,B., Dufrane,D., Beckers,M.C., De,W.E., Rooman,I., Bouwens,L., Clark,A., Lonneux,M., Jamar,J.F., Goldman,S., Marechal,D., Goodman,N., Gianello,P., Van,H.C., Salmon,I., & Eizirik,D.L. (2010) A genomic-based approach identifies FXYP domain containing ion transport regulator 2 (FXYP2)gamma as a pancreatic beta cell-specific biomarker. *Diabetologia*, **53**, 1372-1383.
- Fridlyand,L.E., Ma,L., & Philipson,L.H. (2005) Adenine nucleotide regulation in pancreatic {beta}-cells: modeling of ATP/ADP-Ca<sup>2+</sup> interactions. *Endocrinology and Metabolism*, **289**, E839-E848.
- Gadsby,D.C., Takeuchi,A., Artigas,P., & Reyes,N. (2009) Review. Peering into an ATPase ion pump with single-channel recordings. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.*, **364**, 229-238.
- Geering,K. (2008) Functional roles of Na,K-ATPase subunits. *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.*, **17**, 526-532.
- Gembal,M., Detimary,P., Gilon,P., Gao,Z.Y., & Henquin,J.C. (1993) 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.
- Gembal,M., Gilon,P., & Henquin,J.C. (1992) 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.
- Gerbi,A., Sennoune,S., Pierre,S., Sampol,J., Raccach,D., Vague,P., & Maixent,J.M. (1999) Localization of Na,K-ATPase alpha/beta isoforms in rat sciatic nerves: effect of diabetes and fish oil treatment. *J Neurochem.*, **73**, 719-726.
- Giroix,M.H., Sener,A., Bailbe,D., Leclercq-Meyer,V., Portha,B., & Malaisse,W.J. (1993) Metabolic, ionic, and secretory response to D-glucose in islets from rats with acquired or inherited non-insulin-dependent diabetes. *Biochem.Med.Metab Biol.*, **50**, 301-321.
- Grapengiesser,E., Berts,A., Saha,S., Lund,P.E., Gylfe,E., & Hellman,B. (1993) Dual effects of Na/K pump inhibition on cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> oscillations in pancreatic beta-cells. *Arch.Biochem.Biophys.*, **300**, 372-377.
- Greene,D.A. & Lattimer,S.A. (1983) Impaired rat sciatic nerve sodium-potassium adenosine triphosphatase in acute streptozocin diabetes and its correction by dietary myo-inositol supplementation. *J.Clin.Invest*, **72**, 1058-1063.
- Gylfe,E. (1988) Glucose-induced early changes in cytoplasmic calcium of pancreatic beta-cells studied with time-sharing dual-wavelength fluorometry. *J.Biol.Chem.*, **263**, 5044-5048.
- Hales,C.N. & Milner,R.D. (1968) The role of sodium and potassium in insulin secretion from rabbit pancreas. *J.Physiol*, **194**, 725-743.

- Hamlyn, J.M., Ringel, R., Schaeffer, J., Levinson, P.D., Hamilton, B.P., Kowarski, A.A., & Blaustein, M.P. (1982) A circulating inhibitor of (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)ATPase associated with essential hypertension. *Nature*, **300**, 650-652.
- Hatou, S., Yamada, M., Akune, Y., Mochizuki, H., Shiraishi, A., Joko, T., Nishida, T., & Tsubota, K. (2010) Role of insulin in regulation of Na<sup>+</sup>-/K<sup>+</sup>-dependent ATPase activity and pump function in corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.*, **51**, 3935-3942.
- Henquin, J.C. (1978) D-glucose inhibits potassium efflux from pancreatic islet cells. *Nature*, **271**, 271-273.
- Henquin, J.C. (1988) ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels may control glucose-induced electrical activity in pancreatic B-cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **156**, 769-775.
- Henquin, J.C. & Meissner, H.P. (1982) The electrogenic sodium-potassium pump of mouse pancreatic B-cells. *J. Physiol*, **332**, 529-552.
- Henquin, J.C. & Rahier, J. (2011) Pancreatic alpha cell mass in European subjects with type 2 diabetes. *Diabetologia*, **54**, 1720-1725.
- Herrera, V.L., Emanuel, J.R., Ruiz-Opazo, N., Levenson, R., & Nadal-Ginard, B. (1987) Three differentially expressed Na,K-ATPase alpha subunit isoforms: structural and functional implications. *J Cell Biol*, **105**, 1855-1865.
- Holt, R.I.G., Cockram, C., Flyvbjerg, A., & Goldstein, B. (2010) *Textbook of Diabetes*, John Wiley & Sons.
- Howell, S.L. & Taylor, K.W. (1968) Potassium ions and the secretion of insulin by islets of Langerhans incubated in vitro. *Biochem. J.*, **108**, 17-24.
- Jack-Hays, M.G., Xie, Z., Wang, Y., Huang, W.H., & Askari, A. (1996) Activation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase by fatty acids, acylglycerols, and related amphiphiles: structure-activity relationship. *Biochim. Biophys. Acta*, **1279**, 43-48.
- Jacobson, D. & Philipson, L.H. (2010) Ion channels and insulin secretion. *Pancreatic Beta Cell in Health and Disease* (ed. by S. Seino & G. I. Bell), pp. 91-110. Springer, Japan.
- Jensen, M.V., Joseph, J.W., Ronnebaum, S.M., Burgess, S.C., Sherry, A.D., & Newgard, C.B. (2008) Metabolic cycling in control of glucose-stimulated insulin secretion. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*, **295**, E1287-E1297.
- Jones, P.M. & Persaud, S.J. (2010) Islet function and insulin secretion. *Textbook of diabetes* (ed. by R. I. G. Holt, C. Cockram, A. Flyvbjerg, & B. Goldstein), pp. 87-103. Wiley-Blackwell, Oxford.
- Jorgensen, P.L., Hakansson, K.O., & Karlsh, S.J. (2003) Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions. *Annu. Rev. Physiol*, **65**, 817-849.
- Kamagate, A., Herchuelz, A., Bollen, A., & Van, E.F. (2000) Expression of multiple plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPases in rat pancreatic islet cells. *Cell Calcium*, **27**, 231-246.
- Kaplan, J.H. (2002) Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu. Rev. Biochem*, **71**, 511-535.
- Kemeny, D.M. (1991) *A practical guide to ELISA*, Pergamon Press.
- Khan, A., Ostenson, C.G., & Efendic, S. (1994) Glucose cycling in pancreatic islets. *Frontiers of Insulin Secretion and Pancreatic B-Cell Research* (ed. by P. Flatt & S. Lenzen), pp. 103-111. Smith-Gordon & Nishura, London.
- Kjeldsen, K., Braendgaard, H., Sidenius, P., Larsen, J.S., & Norgaard, A. (1987) Diabetes decreases Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump concentration in skeletal muscles, heart ventricular muscle, and peripheral nerves of rat. *Diabetes*, **36**, 842-848.
- Komatsu, M., Schermerhorn, T., Aizawa, T., & Sharp, G.W. (1995) Glucose stimulation of insulin release in the absence of extracellular Ca<sup>2+</sup> and in the absence of any increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> in rat pancreatic islets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 10728-10732.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **15**, 227(5259):680-5..

- Lecuona,E., Dada,L.A., Sun,H., Butti,M.L., Zhou,G., Chew,T.L., & Sznajder,J.I. (2006) Na,K-ATPase alpha1-subunit dephosphorylation by protein phosphatase 2A is necessary for its recruitment to the plasma membrane. *FASEB J*, **20**, 2618-2620.
- Lee,T.S., MacGregor,L.C., Fluharty,S.J., & King,G.L. (1989) Differential regulation of protein kinase C and (Na,K)-adenosine triphosphatase activities by elevated glucose levels in retinal capillary endothelial cells. *J.Clin.Invest*, **83**, 90-94.
- Leong,S.F. & Leung,T.K. (1991) Diabetes induced by streptozotocin causes reduced Na-K ATPase in the brain. *Neurochem.Res.*, **16**, 1161-1165.
- Leung,Y.M., Kwan,E.P., Ng,B., Kang,Y., & Gaisano,H.Y. (2007) SNAREing voltage-gated K<sup>+</sup> and ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels: tuning beta-cell excitability with syntaxin-1A and other exocytotic proteins. *Endocr.Rev.*, **28**, 653-663.
- Levin,S.R., Kasson,B.G., & Driessen,J.F. (1978) Adenosine triphosphatases of rat pancreatic islets: comparison with those of rat kidney. *J.Clin.Invest*, **62**, 692-701.
- Lim,A., Park,S.H., Sohn,J.W., Jeon,J.H., Park,J.H., Song,D.K., Lee,S.H., & Ho,W.K. (2009) Glucose deprivation regulates KATP channel trafficking via AMP-activated protein kinase in pancreatic beta-cells. *Diabetes*, **58**, 2813-2819.
- Lim,C.T., Kola,B., & Korbonits,M. (2010) AMPK as a mediator of hormonal signalling. *J Mol Endocrinol*, **44**, 87-97.
- Lingrel,J.B. (2010) The physiological significance of the cardiotonic steroid/ouabain-binding site of the Na,K-ATPase. *Annu.Rev.Physiol*, **72**, 395-412.
- Logvinenko,N.S., Dulubova,I., Fedosova,N., Larsson,S.H., Nairn,A.C., Esmann,M., Greengard,P., & Aperia,A. (1996) Phosphorylation by protein kinase C of serine-23 of the alpha-1 subunit of rat Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase affects its conformational equilibrium. *Proc.Natl Acad.Sci.U.S.A*, **93**, 9132-9137.
- Lucking,K., Nielsen,J.M., Pedersen,P.A., & Jorgensen,P.L. (1996) Na-K-ATPase isoform (alpha 3, alpha 2, alpha 1) abundance in rat kidney estimated by competitive RT-PCR and ouabain binding. *Am J Physiol*, **271**, F253-F260.
- Luppa,D. & Muller,F. (1982) Increase of (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-activated ATPase activity of basolateral plasma membranes from intestinal mucosa of diabetic rats. *Acta Biol.Med.Ger*, **41**, 891-898.
- Luppa,D. & Muller,F. (1986) Effect of diabetes and adrenocortical state on intestinal transport capacity and (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-activated adenosine triphosphatase activity. *Diabete Metab*, **12**, 191-196.
- MacDonald,P.E., Joseph,J.W., & Rorsman,P. (2005) Glucose-sensing mechanisms in pancreatic beta-cells. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.*, **360**, 2211-2225.
- MacGregor,L.C. & Matschinsky,F.M. (1986) Altered retinal metabolism in diabetes. II. Measurement of sodium-potassium ATPase and total sodium and potassium in individual retinal layers. *J.Biol.Chem.*, **261**, 4052-4058.
- Malaisse,W.J. (1996) Metabolic signaling of insulin secretion. *Diabetes Reviews*, **4**, 145-159.
- Matsuda,T., Murata,Y., Kawamura,N., Hayashi,M., Tamada,K., Takuma,K., Maeda,S., & Baba,A. (1993) Selective induction of alpha 1 isoform of (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase by insulin/insulin-like growth factor-I in cultured rat astrocytes. *Arch.Biochem.Biophys.*, **307**, 175-182.
- McDonough,A.A., Geering,K., & Farley,R.A. (1990) The sodium pump needs its beta subunit. *FASEB J*, **4**, 1598-1605.
- McGill,D.L. & Guidotti,G. (1991) Insulin stimulates both the alpha 1 and the alpha 2 isoforms of the rat adipocyte (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>) ATPase. Two mechanisms of stimulation. *J.Biol.Chem.*, **266**, 15824-15831.
- Medford,R.M., Hyman,R., Ahmad,M., Allen,J.C., Pressley,T.A., Allen,P.D., & Nadal-Ginard,B. (1991) Vascular smooth muscle expresses a truncated Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase alpha-1 subunit isoform. *J.Biol.Chem.*, **266**, 18308-18312.

- Mescher, A.L. (2010) *Junqueira's Basic Histology, text and atlas*, 12<sup>th</sup> edn, McGraw-Hill, New York.
- Mimura, M., Makino, H., Kanatsuka, A., Asai, T., & Yoshida, S. (1994) Reduction of erythrocyte (Na<sup>+</sup>)-K<sup>+</sup>ATPase activity in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients with microalbuminuria. *Horm. Metab. Res.*, **26**, 33-38.
- Moller, J.V., Olesen, C., Winther, A.M., & Nissen, P. (2010) The sarcoplasmic Ca<sup>2+</sup>-ATPase: design of a perfect chemi-osmotic pump. *Q. Rev. Biophys.*, **43**, 501-566.
- Ng, Y.C., Tolerico, P.H., & Book, C.B. (1993) Alterations in levels of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase isoforms in heart, skeletal muscle, and kidney of diabetic rats. *Am J Physiol*, **265**, E243-E251.
- Nolan, C.J., Madiraju, M.S., Delghingaro-Augusto, V., Peyot, M.L., & Prentki, M. (2006) Fatty acid signaling in the beta-cell and insulin secretion. *Diabetes*, **55 Suppl 2**, S16-S23.
- Ohneda, M., Johnson, J.H., Inman, L.R., Chen, L., Suzuki, K., Goto, Y., Alam, T., Ravazzola, M., Orci, L., & Unger, R.H. (1993) GLUT2 expression and function in beta-cells of GK rats with NIDDM. Dissociation between reductions in glucose transport and glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes*, **42**, 1065-1072.
- Owada, S., Larsson, O., Arkhammar, P., Katz, A.I., Chibalin, A.V., Berggren, P.O., & Bertorello, A.M. (1999) Glucose decreases Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in pancreatic beta-cells. An effect mediated via Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A2 and protein kinase C-dependent phosphorylation of the alpha-subunit. *J. Biol. Chem.*, **274**, 2000-2008.
- Panten, U., Schwanstecher, M., Wallasch, A., & Lenzen, S. (1988) Glucose both inhibits and stimulates insulin secretion from isolated pancreatic islets exposed to maximally effective concentrations of sulfonylureas. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **338**, 459-462.
- Pedemonte, C.H., Efendiev, R., & Bertorello, A.M. (2005) Inhibition of Na,K-ATPase by dopamine in proximal tubule epithelial cells. *Semin. Nephrol.*, **25**, 322-327.
- Peng, L., Martin-Vasallo, P., & Sweadner, K.J. (1997) Isoforms of Na,K-ATPase alpha and beta subunits in the rat cerebellum and in granule cell cultures. *J. Neurosci.*, **17**, 3488-3502.
- Perlemuter, L. & Collin de L'Hortet, G. (1989) *Manual de Diabetología*, Masson Editores, Barcelona.
- Pierce, G.N. & Dhalla, N.S. (1983) Sarcolemmal Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity in diabetic rat heart. *Am. J. Physiol*, **245**, C241-C247.
- Portha, B., Serradas, P., Bailbe, D., Suzuki, K., Goto, Y., & Giroix, M.H. (1991) Beta-cell insensitivity to glucose in the GK rat, a spontaneous nonobese model for type II diabetes. *Diabetes*, **40**, 486-491.
- Pratley, R.E. & Weyer, C. (2001) The role of impaired early insulin secretion in the pathogenesis of type II diabetes mellitus. *Diabetologia*, **44**, 929-945.
- Pressel, D.M. & Mislser, S. (1991) Role of voltage-dependent ionic currents in coupling glucose stimulation to insulin secretion in canine pancreatic islet B-cells. *J. Membr. Biol.*, **124**, 239-253.
- Ramanadham, S., Wolf, M.J., Jett, P.A., Gross, R.W., & Turk, J. (1994) Characterization of an ATP-stimulatable Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A2 from clonal insulin-secreting HIT cells and rat pancreatic islets: a possible molecular component of the beta-cell fuel sensor. *Biochemistry*, **33**, 7442-7452.
- Ramos-Vara, J.A. (2005) Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol*, **42**, (4):405-426.
- Remedi, M.S. & Koster, J.C. (2010) K(ATP) channelopathies in the pancreas. *Pflugers Arch.*, **460**, 307-320.
- Roe, M.W., Mertz, R.J., Lancaster, M.E., Worley, J.F., III, & Dukes, I.D. (1994a) Thapsigargin inhibits the glucose-induced decrease of intracellular Ca<sup>2+</sup> in mouse islets of Langerhans. *Am. J. Physiol*, **266**, E852-E862.

- Roe, M.W., Philipson, L.H., Frangakis, C.J., Kuznetsov, A., Mertz, R.J., Lancaster, M.E., Spencer, B., Worley, J.F., III, & Dukes, I.D. (1994b) Defective glucose-dependent endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> sequestration in diabetic mouse islets of Langerhans. *J. Biol. Chem.*, **269**, 18279-18282.
- Rojas, A., Khoo, A., Tajedo, J.R., Bedoya, F., Soria, B., & Martin, F. (2010) Islet cell development. The islet of Langerhans - Advances in experimental medicine and biology (ed. by S. Islam), pp. 59-75. Springer, New York.
- Rorsman, P. & Renstrom, E. (2003) Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia*, **46**, 1029-1045.
- Rose, A.M. & Valdes, R., Jr. (1994) Understanding the sodium pump and its relevance to disease. *Clin Chem*, **40**, 1674-1685.
- Rosic, N.K., Standaert, M.L., & Pollet, R.J. (1985) The mechanism of insulin stimulation of (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase transport activity in muscle. *J. Biol. Chem.*, **260**, 6206-6212.
- Russell, R.R., III, Bergeron, R., Shulman, G.I., & Young, L.H. (1999) Translocation of myocardial GLUT-4 and increased glucose uptake through activation of AMPK by AICAR. *Am. J. Physiol*, **277**, H643-H649.
- Rutter, G.A., da Silva, X, & Leclerc, I. (2003) Roles of 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) in mammalian glucose homeostasis. *Biochem J.*, **375**, 1-16.
- Rutter, G.A., Tsuboi, T., & Ravier, M.A. (2006) Ca<sup>2+</sup> microdomains and the control of insulin secretion. *Cell Calcium*, **40**, 539-551.
- Salgado, A., Silva, A.M., Santos, R.M., & Rosario, L.M. (1996) Multiphasic action of glucose and alpha-ketoisocaproic acid on the cytosolic pH of pancreatic beta-cells. Evidence for an acidification pathway linked to the stimulation of Ca<sup>2+</sup> influx. *J. Biol. Chem.*, **271**, 8738-8746.
- Sampson, S.R., Brodie, C., & Alboim, S.V. (1994) Role of protein kinase C in insulin activation of the Na-K pump in cultured skeletal muscle. *Am. J. Physiol*, **266**, C751-C758.
- Santos, R.M., Seica, R.M., Salgado, A., Pereira, F.C., Antunes, C.M., Suzuki, K., & Rosario, L.M. (1997) Dissociation between cytosolic Ca<sup>2+</sup> and insulin responses in glucose-stimulated islets from diabetic GK rats. (Abstract). *Diabetologia*, **40**, A115.
- Sato, Y., Aizawa, T., Komatsu, M., Okada, N., & Yamada, T. (1992) Dual functional role of membrane depolarization/Ca<sup>2+</sup> influx in rat pancreatic B-cell. *Diabetes*, **41**, 438-443.
- Scarpini, E., Bianchi, R., Moggio, M., Sciacco, M., Fiori, M.G., & Scarlato, G. (1993) Decrease of nerve Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase activity in the pathogenesis of human diabetic neuropathy. *J. Neurol. Sci.*, **120**, 159-167.
- Schoner, W. & Scheiner-Bobis, G. (2007) Endogenous and exogenous cardiac glycosides: their roles in hypertension, salt metabolism, and cell growth. *Am J Physiol Cell Physiol*, **293**, C509-C536.
- Sehlin, J. & Taljedal, I.B. (1974) Transport of rubidium and sodium in pancreatic islets. *J. Physiol*, **242**, 505-515.
- Seica, R.M., Martins, M.J., Pessa, P.B., Santos, R.M., Rosario, L.M., Suzuki, K., & Martins, M.I. (2003) Alterações na morfologia do ilhéu de Langerhans na evolução da síndrome diabética num modelo animal de diabetes tipo 2. *Acta Médica Portuguesa*, **16**, 381-388.
- Seica, R.M., Suzuki, K., Santos, R.M., & Rosario, L.M. (2004) Deficiência primária da secreção de insulina de ilhéus isolados de ratos Goto-Kakizaki. *Acta Médica Portuguesa*, **17**, 42-48.
- Seino, S. & Bell, G.I. (2008) *Pancreatic Beta Cell in Health and Disease*, 1 edn, Springer, Hong Kong, Japan.
- Sennoune, S., Gerbi, A., Duran, M.J., Benkoel, L., Pierre, S., Lambert, R., Doderio, F., Chamlian, A., Vague, P., & Maixent, J.M. (1999) A quantitative immunocytochemical study of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in rat hepatocytes after STZ-induced diabetes and dietary fish oil supplementation. *J. Histochem. Cytochem.*, **47**, 809-816.

- Sennoune,S., Gerbi,A., Duran,M.J., Grillasca,J.P., Compe,E., Pierre,S., Planells,R., Bourdeaux,M., Vague,P., Pieroni,G., & Maixent,J.M. (2000) Effect of streptozotocin-induced diabetes on rat liver Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Eur.J.Biochem.*, **267**, 2071-2078.
- Shamraj,O.I., Melvin,D., & Lingrel,J.B. (1991) Expression of Na,K-ATPase isoforms in human heart. *Biochem Biophys.Res.Commun.*, **179**, 1434-1440.
- Skou,J.C. (1967) The enzymatic basis for the active transport of sodium and potassium. *Protoplasma*, **63**, 303-308.
- Skou,J.C. (1998) Nobel Lecture. The identification of the sodium pump. *Biosci.Rep.*, **18**, 155-169.
- Smith,P.K., Krohn,R.I., Hermanson,G.T., Mallia,A.K., Gartner,F.H., Provenzano,M.D., Fujimoto,E.K., Goeke,N.M., Olson,B.J., & Klenk,D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal.Biochem.*, **150**, 76-85.
- Soh,U.J., Dores,M.R., Chen,B., & Trejo,J. (2010) Signal transduction by protease-activated receptors. *Br.J.Pharmacol.*, **160**, 191-203.
- Somberg,J.C., Barry,W.H., & Smith,T.W. (1981) Differing sensitivities of Purkinje fibers and myocardium to inhibition of monovalent cation transport by digitalis. *J.Clin.Invest*, **67**, 116-123.
- Straub,S.G. & Sharp,G.W. (2002) Glucose-stimulated signaling pathways in biphasic insulin secretion. *Diabetes Metab Res.Rev.*, **18**, 451-463.
- Strehler,E.E. & Zacharias,D.A. (2001) Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps. *Physiol Rev.*, **81**, 21-50.
- Sundsten,T. & Ortsater,H. (2009) Proteomics in diabetes research. *Mol.Cell Endocrinol.*, **297**, 93-103.
- Sweadner,K.J. (1979) Two molecular forms of (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-stimulated ATPase in brain. Separation, and difference in affinity for strophanthidin. *J Biol Chem*, **254**, 6060-6067.
- Takeuchi,A., Reyes,N., Artigas,P., & Gadsby,D.C. (2009) Visualizing the mapped ion pathway through the Na,K-ATPase pump. *Channels (Austin.)*, **3**.
- Tarasov,A., Dusonchet,J., & Ashcroft,F. (2004) Metabolic regulation of the pancreatic beta-cell ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel: a pas de deux. *Diabetes*, **53 Suppl 3**, S113-S122.
- TAUSSKY,H.H. & SHORR,E. (1953) A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *J.Biol.Chem.*, **202**, 675-685.
- Terunuma,M., Pangalos,M.N., & Moss,S.J. (2010) Functional modulation of GABAB receptors by protein kinases and receptor trafficking. *Adv.Pharmacol.*, **58**, 113-122.
- Therien,A.G. & Blostein,R. (2000) Mechanisms of sodium pump regulation. *Am.J.Physiol Cell Physiol*, **279**, C541-C566.
- Tiedge,M. & Lenzen,S. (1994) Pancreatic B-cell glucokinase and glucose transporter molecular biology. *Frontiers of insulin secretion and pancreatic B-cell research* (ed. by P. Flatt & S. Lenzen), pp. 39-46. Smith-Gordon and Company Limited, London.
- Tirupattur,P.R., Ram,J.L., Standley,P.R., & Sowers,J.R. (1993) Regulation of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase gene expression by insulin in vascular smooth muscle cells. *Am.J.Hypertens.*, **6**, 626-629.
- Towbin.,H., Staehelin,T., Gordon,J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **76** (9), 4350-4354.
- Towler,M.C. & Hardie,D.G. (2007) AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ Res.*, **100**, 328-341.

- Tsimaratos,M., Coste,T.C., Djemli-Shipkolye,A., Vague,P., Pieroni,G., & Raccach,D. (2001) Gamma-linolenic acid restores renal medullary thick ascending limb Na(+),K(+)-ATPase activity in diabetic rats. *J Nutr*, **131**, 3160-3165.
- Tsuboi,T., da,S., X, Leclerc,I., & Rutter,G.A. (2003) 5'-AMP-activated protein kinase controls insulin-containing secretory vesicle dynamics. *J.Biol.Chem.*, **278**, 52042-52051.
- Vadasz,I., Dada,L.A., Briva,A., Trejo,H.E., Welch,L.C., Chen,J., Toth,P.T., Lecuona,E., Witters,L.A., Schumacker,P.T., Chandel,N.S., Seeger,W., & Sznajder,J.I. (2008) AMP-activated protein kinase regulates CO<sub>2</sub>-induced alveolar epithelial dysfunction in rats and human cells by promoting Na,K-ATPase endocytosis. *J.Clin.Invest*, **118**, 752-762.
- Van,E.F., Bollen,A., & Herchuelz,A. (2001) NCX1 Na/Ca exchanger splice variants in pancreatic islet cells. *J.Endocrinol.*, **168**, 517-526.
- Varadi,A., Lebel,L., Hashim,Y., Mehta,Z., Ashcroft,S.J., & Turner,R. (1999) Sequence variants of the sarco(endo)plasmic reticulum Ca(2+)-transport ATPase 3 gene (SERCA3) in Caucasian type II diabetic patients (UK Prospective Diabetes Study 48). *Diabetologia*, **42**, 1240-1243.
- Varadi,A., Molnar,E., Ostenson,C.G., & Ashcroft,S.J. (1996) Isoforms of endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase are differentially expressed in normal and diabetic islets of Langerhans. *Biochem.J.*, **319 ( Pt 2)**, 521-527.
- Viollet,B., Mounier,R., Leclerc,J., Yazigi,A., Foretz,M., & Andreelli,F. (2007) Targeting AMP-activated protein kinase as a novel therapeutic approach for the treatment of metabolic disorders. *Diabetes & Metabolism*, **33**, 395-402.
- Wada,R., Koyama,M., Mizukami,H., Odaka,H., Ikeda,H., & Yagihashi,S. (1999) Effects of long-term treatment with alpha-glucosidase inhibitor on the peripheral nerve function and structure in Goto-Kakizaki rats: a genetic model for type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res.Rev.*, **15**, 332-337.
- Warwar,N., Efendic,S., Ostenson,C.G., Haber,E.P., Cerasi,E., & Neshier,R. (2006) Dynamics of glucose-induced localization of PKC isoenzymes in pancreatic beta-cells: diabetes-related changes in the GK rat. *Diabetes*, **55**, 590-599.
- Williams,B. & Schrier,R.W. (1993) Glucose-induced protein kinase C activity regulates arachidonic acid release and eicosanoid production by cultured glomerular mesangial cells. *J.Clin.Invest*, **92**, 2889-2896.
- Xie,Z. & Cai,T. (2003) Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>--ATPase-mediated signal transduction: from protein interaction to cellular function. *Mol.Interv.*, **3**, 157-168.
- Yang,S.N., Larsson,O., Branstrom,R., Bertorello,A.M., Leibiger,B., Leibiger,I.B., Moede,T., Kohler,M., Meister,B., & Berggren,P.O. (1999) Syntaxin 1 interacts with the L(D) subtype of voltage-gated Ca(2+) channels in pancreatic beta cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **96**, 10164-10169.
- Yergey,A.L., Coorssen,J.R., Backlund,P.S., Jr., Blank,P.S., Humphrey,G.A., Zimmerberg,J., Campbell,J.M., & Vestal,M.L. (2002) De novo sequencing of peptides using MALDI/TOF-TOF. *J.Am.Soc.Mass Spectrom.*, **13**, 784-791.
- Yki-Jarvinen,H. (2010) Insulin resistance in type 2 diabetes. Textbook of diabetes (ed. by R. I. G. Holt, C. Cockram, A. Flyvbjerg, & B. Goldstein), pp. 160-173. Wiley-Blackwell, Oxford.
- Zaitsev,S., Efanova,I., Ostenson,C.G., Efendic,S., & Berggren,P.O. (1997) Delayed Ca<sup>2+</sup> response to glucose in diabetic GK rat. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **239**, 129-133.



## ANEXO A

Ana R. Costa, Joana Real, Célia M. Antunes & Júlio Cruz-Morais, (2010), A new approach for determination of Na,K-ATPase activity in intact pancreatic  $\beta$ -cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*. 46: 7-10.

## A new approach for determination of Na,K-ATPase activity: application to intact pancreatic $\beta$ -cells

Ana R. Costa · Joana Real · Célia M. Antunes ·  
Júlio Cruz-Morais

Received: 7 August 2009 / Accepted: 30 September 2009 / Published online: 14 November 2009 / Editor: J. Denry Sato  
© The Society for In Vitro Biology 2009

**Abstract** It has been postulated that a decrease in Na,K-ATPase-mediated ion gradients may be a contributing mechanism to insulin secretion. However, the precise role of the Na,K-ATPase in pancreatic  $\beta$ -cell membrane depolarization and insulin secretion signalling have been difficult to evaluate, mostly because data reporting changes in enzymatic activity have been obtained in cell homogenates or membrane preparations, lacking intact intracellular signalling pathways. The aim of this work was to develop a method to characterize Na,K-ATPase activity in intact pancreatic  $\beta$ -cells that will allow the investigation of putative Na,K-ATPase activity regulation by glucose and its possible role in insulin secretion signalling. This work demonstrates for the first time that it is possible to determine Na,K-ATPase activity in intact pancreatic  $\beta$ -cells and that this is a suitable method for the study of the mechanisms involved in the Na,K-ATPase regulation and eventually its relevance for insulin secretion signalling.

**Keywords** Pancreatic  $\beta$ -cell · Na,K-ATPase · Enzymatic activity · Insulin secretion

---

A. R. Costa · C. M. Antunes (✉) · J. Cruz-Morais  
Department of Chemistry, University of Évora,  
Rua Romão Ramalho, 59,  
7000 757 Évora, Portugal  
e-mail: cmma@uevora.pt

A. R. Costa · J. Cruz-Morais  
Institute of Mediterranean Agricultural Sciences (ICAM),  
Évora, Portugal

J. Real · C. M. Antunes  
Centre for Neuroscience and Cell Biology (CNC),  
Coimbra, Portugal

The current pancreatic  $\beta$ -cell stimulus-secretion dogma states that glucose metabolism leads to an increase of ATP/ADP ratio, closure of ATP-sensitive  $K^+$  channels, membrane depolarization, and opening of the voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channels and  $Ca^{2+}$  influx, which triggers insulin exocytosis. Na,K-ATPase is the principal system contributing to restore the equilibrium of  $Na^+$  and  $K^+$  ions across the plasma membrane. Since this system carries an outward current, Na,K-ATPase contributes for resting membrane potential in pancreatic  $\beta$ -cell. To perform  $Na^+$  and  $K^+$  transport against their concentration gradients, Na,K-ATPase consumes a considerable amount of ATP. It was estimated that in pancreatic  $\beta$ -cell, this pump consumes as much as 75% of the basal energy production (Malaisse et al. 1978). Taking this observation into account, several investigators have suggested that Na,K-ATPase inhibition may play a relevant role in insulin secretion regulation cascade (Owada et al. 1999; Elmi et al. 2000, 2001a; Dufer et al. 2009). Therefore, the development of methods where intact intracellular signalling pathways are conserved are most relevant, since it will allow the investigation of the mechanisms underlying the regulation of Na,K-ATPase activity and its possible contribution to insulin release.

The method here described enables the study of Na,K-ATPase activity in cultured intact pancreatic  $\beta$ -cells preserving insulin secretion signaling pathways, responding to physiological stimuli. This method presents the advantage of allowing simultaneous or sequential measurements of other parameters such as insulin secretion or ionic transport.

Islets of Langerhans were isolated from Wistar rat pancreata by liberase digestion, an enzymatic method developed in accordance to Salgado et al. (1996). Briefly, rats were euthanized by cervical dislocation. After exposing the abdominal cavity, the distal outlet of the common bile

duct was collapsed. The duct was then cannulated close to the junction with the cholecystic and hepatic ducts, and the pancreas was distended by injecting approximately 8 mL of an ice-cold salt solution supplemented with approximately 0.25 mg/mL liberase (type RI, Roche). This solution had the following composition: 115 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.56 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.1 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM HEPES, 8.4 mM glucose, pH 7.4 after saturation with 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>. The pancreas was then dissected, transferred into a 50-mL polypropylene centrifuge tube, and incubated at 37°C under gentle manual shaking for 8–12 min. Liberase digestion was stopped by adding a large excess of ice-cold solution supplemented with 2% bovine serum albumin (fraction V, protease free, Sigma). The tube was shaken vigorously to tissue disruption. The islets and pieces of exocrine tissue were let to sediment, the supernatant was removed, and a large excess of the solution was added again. This washing step was repeated twice to free the solution from liberase. Intact islets were then handpicked at room temperature using the tip of an automatic pipette, a process that was repeated twice to separate the islets from any contaminating pieces of exocrine tissue. In the last transference, islets were picked to a polypropylene microtube.

Isolated pancreatic  $\beta$ -cells were obtained by mechanic disruption of the islets in a Ca<sup>2+</sup>-free medium. Three cycles of centrifugation were performed to completely change from the islet isolation medium to zero-Ca<sup>2+</sup> medium, followed by homogenation with an automatic pipette. When the solution turned turbid and without visible particles, cells were centrifuged, the supernatant was discarded, and sterile culture medium (RPMI 1640 containing 8.4 mM glucose, 10% heat-inactivated fetal calf serum, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, and antibiotics—100  $\mu$ g/mL streptomycin and 100 U/mL penicillin—pH adjusted to 7.2 to give 7.4 in the incubator; all products from Sigma) was added. Cell suspension was homogenized, and three washing steps were performed to sterilization (Salgado et al. 1996).

Subsequently, cells were counted in the presence of trypan blue to evaluate the viability rate and the cells concentration (Butler et al. 1992). Cells were then seeded in a 96-well microplate (10<sup>4</sup> cells/microwell) and incubated overnight at 37°C under a 5% CO<sub>2</sub>/95% air-humidified atmosphere. The culture medium was renovated 24 h later, and the experiments were performed within 48 h from isolation.

Na,K-ATPase activity was determined directly in adherent cells. The enzymatic assay was developed in two parallel steps: one for the evaluation of total ATPase activity (incubation medium: 2 mM ATP, 100 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 50 mM Tris-HCl pH 7.4) and another for the evaluation of ouabain-insensitive ATPase activity by selectively inhibiting Na,K-

ATPase (incubation medium: 2 mM ATP, 1 mM Ouabain, 15 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 90 mM *N*-methyl-D-glucamine chloride, 1 mM EGTA, 50 mM Tris-HCl pH 7.4). The last medium allowed the total inhibition of Na,K-ATPase, maintaining osmolarity. The ATPase activity was calculated by colorimetric quantification of inorganic phosphate (Pi) formed in 30 min, and Na,K-ATPase activity was determined by the difference between the results obtained using the experimental conditions previously described, i.e., in the absence and presence of ouabain.

To determine Na,K-ATPase activity, culture medium was removed, and the cells were washed with the respective incubation media. After washing, 100  $\mu$ L of enzymatic assay media were added to each well, and cells were incubated for 30 min in a CO<sub>2</sub> incubator at 37°C. After this time period, 60  $\mu$ L of supernatant was transferred to another microplate containing the same volume of trichloroacetic acid (TCA) 11.5%, where Pi was determined by a colorimetric method (Taussky and Shorr 1953). Briefly, a calibration curve was prepared with KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in TCA 11.5% (5–320  $\mu$ M range), and 80  $\mu$ L of sulfomolybdic reagent was added to each well.

At the end of the experiment, trypan blue dye and glucose-induced insulin secretion were monitored to assess cell viability and physiological control, respectively, throughout the assay. For the viability test, batches of cells were washed, and the trypan blue dye exclusion was evaluated. The culture media were collected, and insulin concentration was measured using a competitive ELISA method. Finally, cells were lysed with 0.05% triton-X for subsequent protein quantification by BCA method (Calbiochem kit), for normalization purposes.

The linear range of the enzymatic method to determine Na,K-ATPase activity was assessed by performing the experiments using incubation periods between 7 and 60 min. The enzymatic reaction was found linear at least during 60 min, for both ouabain-sensitive and total ATPase activities (Fig. 1). A 30-min time period was chosen for the routine enzymatic assay since, after this time period, the amount of Pi released was easily quantifiable and the experiments were amenable to perform.

The kinetic parameters observed in adherent culture cells were also determined. The K<sub>M</sub><sup>app</sup> for ATP (measured with 115 mM NaCl and 5 mM KCl) was 0.32 mM. This value is in a good agreement with the kinetic parameters published for islet homogenates (Elmi et al. 2000), suggesting that the characteristic of the enzymatic system was maintained using this method. The IC<sub>50</sub> and IC<sub>80</sub> for ouabain were 0.37 and 0.44 mM, respectively. Taking these results into account, a concentration of 1 mM ouabain was chosen for total inhibition of Na,K-ATPase.

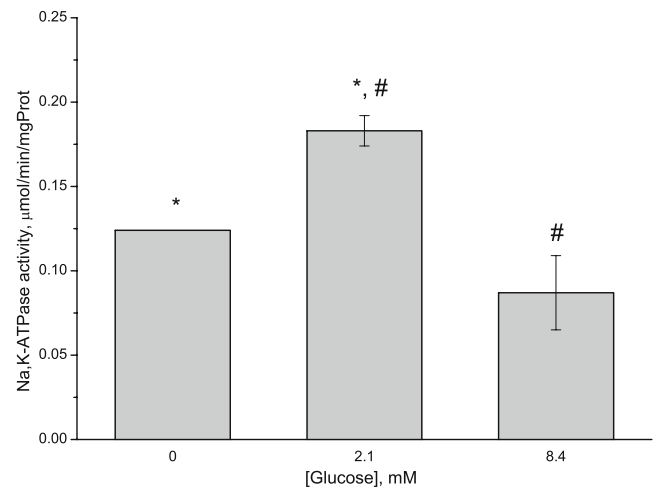
To evaluate Na,K-ATPase sensitivity to glucose, the cells were preincubated first with 2.1 mM glucose for 30 min to

reach basal metabolic level. Subsequently, a 30-min incubation period, with (2.1 and 8.4 mM) or without glucose, was performed. Incubation media were then collected for insulin quantification. Cells were washed, and enzymatic reaction media were added. Na,K-ATPase activity was assessed as described previously.

The results obtained are shown in Fig. 2. In the absence of glucose, the Na,K-ATPase activity was  $0.124 \pm 0.006 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg Pi}$ . Raising glucose concentration to 2.1 mM induced a 32% increase in Na,K-ATPase activity ( $0.183 \pm 0.009 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg Pi}$ ;  $p < 0.05$ ). Challenging the cells with 8.4 mM glucose evoked a 57% reduction on Na,K-ATPase activity, when compared to the effect of 2.1 mM glucose ( $p < 0.05$ ).

The cell viability was assessed by the Trypan Blue exclusion test, performed in randomly chosen wells, before and after the experiments were carried out. In all analytical conditions, it was observed that cell viability was always higher than 98% throughout the assay. Furthermore, basal insulin release observed in response to 2.1 mM glucose was below  $0.23 \text{ ng}/10^6 \text{ cells}/\text{min}$  whereas 8.4 mM glucose stimulated insulin secretion by at least 4-fold ( $0.83 \text{ ng}/10^6 \text{ cells}/\text{min}$ ), showing that the  $\beta$ -cells were normally responding to physiological stimuli.

The results shown in Fig. 2 are in agreement with data previously obtained in our laboratory using islet homogenates, where a 66% reduction of Na,K-ATPase activity was observed in response to a glucose rise from 2.1 to 8.4 mM ( $p < 0.05$ ). Moreover, regarding the profile of Na,K-ATPase activity response to glucose, similar results were also reported by others using rat islet homogenates



**Figure 2.** Effect of glucose concentration on Na,K-ATPase activity in pancreatic  $\beta$ -cell. Na,K-ATPase activity was determined in batches of cells previously incubated for 30 min with (2.1 and 8.4 mM) or without glucose for 30 min. Each column represents the mean  $\pm$  SEM of four to seven determinations performed independently in cells batches pooled from islets obtained from three pancreata. Statistical significance was accessed by ANOVA (\* $p < 0.05$  or # $p < 0.05$ ).

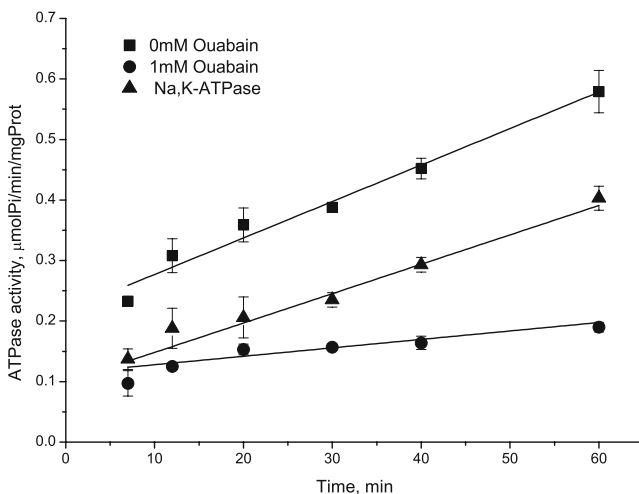
(Levin et al. 1978), heat shock permeabilized mouse pancreatic  $\beta$ -cells (Owada et al. 1999), and freshly isolated mouse islets (Elmi et al. 2001b).

Additionally, the absolute values of the enzymatic activity obtained with our intact cell methodology were similar to the previously reported for rat pancreatic islets homogenates (Levin et al. 1978), indicating that this is a feasible method for Na,K-ATPase activity determination.

However, in experiments using islet homogenates, including ours and those reported in the literature (Owada et al. 1999; Elmi et al. 2001a, b), the cells were stimulated with glucose while intact but the Na,K-ATPase activity was determined after the cells or islets were disrupted thus turning the biological material unusable for further measurements. The method we have developed has the advantage of overcoming this inconvenience, since the cells were maintained viable throughout the assay creating the possibility of simultaneous or sequential experiments using the same cells. Moreover, this method also allowed the use of lower amounts of biological material per experiment rendering the studies easier to perform.

This work demonstrates for the first time that it is possible to determine Na,K-ATPase activity in intact pancreatic  $\beta$ -cells. Moreover, it allows the investigation of the mechanisms underlying glucose-induced putative regulation of Na,K-ATPase activity, and more importantly, it may be used to investigate the physiological role of this pump in insulin secretion signalling.

**Acknowledgments** This work was supported by ICAM, CNC and a PhD grant from *Fundação Eugênio de Almeida*.



**Figure 1.** ATPase-induced ATP hydrolysis over time; cells were incubated with the ATPase activity reactional media for 7 to 60 min. Each point represents the mean  $\pm$  SEM of three parallel experiments performed independently. Linear regression analysis data:  $y = 0.012x + 0.458$ ,  $r = 0.979$ ,  $p = 0.0013$ ;  $y = 0.0026x + 0.224$ ,  $r = 0.780$ ,  $p = 0.0470$ ;  $y = 0.0099x + 0.238$ ,  $r = 0.989$ ,  $p = 0.0006$ ; for total, ouabain-insensitive and ouabain-sensitive ATPase activity, respectively.

## Reference

- Butler M.; Dawson M.; Harbour C.; Steffe R. Cell culture. BIOS Scientific, Oxford; 1992.
- Dufer M.; Haspel D.; Krippeit-Drews P.; Guilar-Bryan L.; Bryan J.; Drews G. Activation of the Na(+)/K (+)-ATPase by insulin and glucose as a putative negative feedback mechanism in pancreatic beta-cells. *Pflugers Arch.* 457: 1351–1360; 2009.
- Elmi A.; Idahl L. A.; Sandstrom P. E.; Sehlin J. D-glucose stimulates the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump in mouse pancreatic islet cells. *Int. J Exp Diabetes Res* 1: 155–164; 2000.
- Elmi A.; Idahl L.; Sehlin J. Modulation of islet ATP content by inhibition or stimulation of the Na(+)/K(+) pump. *Eur. J. Pharmacol.* 426: 139–143; 2001a.
- Elmi A.; Idahl L. A.; Sehlin J. Modulation of beta-cell ouabain-sensitive 86Rb<sup>+</sup>-influx (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump) by D-glucose, glibenclamide or diazoxide. *Int. J. Exp. Diabetes Res.* 1: 265–274; 2001b.
- Levin S. R.; Kasson B. G.; Driessen J. F. Adenosine triphosphatase of rat pancreatic islets comparison with those of rat kidney. *J. Clin. Invest.* 62: 692–701; 1978.
- Malaisse 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. *Pflugers Arch.* 373: 237–242; 1978.
- Owada S.; Larsson O.; Arkhammar P.; Katz A. I.; Chibalin A. V.; Berggren P. O.; Bertorello A. M. Glucose decreases Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in pancreatic beta-cells. An effect mediated via Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A2 and protein kinase C-dependent phosphorylation of the alpha-subunit. *J. Biol. Chem.* 274: 2000–2008; 1999.
- Salgado A.; Silva A. M.; Santos R. M.; Rosario L. M. Multiphasic action of glucose and alpha-ketoisocaproic acid on the cytosolic pH of pancreatic beta-cells. Evidence for an acidification pathway linked to the stimulation of Ca<sup>2+</sup> influx. *J. Biol. Chem.* 271: 8738–8746; 1996.
- Taussky H.; Shorr A. A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *J. Biol. Chem.* 202: 675–683; 1953.



## ANEXO B

Costa, A.R., Antunes, C.M., Cruz-Morais, J., (2010), Abnormal regulation of pancreatic beta cell Na,K-ATPase on glucose intolerant rats. *Diabetologia*. 53 [Suppl1] S227 – Abs. 561.





## Abnormal regulation of pancreatic $\beta$ -cell Na,K-ATPase on glucose intolerant rats

Ana R Costa, Célia M Antunes & Júlio Cruz-Morais

**Background and aims:** Glucose (G) is the most important physiological insulin secretagogue. It is widely accepted that, in pancreatic  $\beta$ -cell, G evoked early ionic events such as membrane depolarization and  $\text{Ca}^{2+}$  influx through voltage dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels triggers insulin exocytosis. However, the role of other electrogenic systems, namely ionic pumps, to these events remains essentially uninvestigated. It is known that the activity of Na,K-ATPase is modified in type 2 diabetes (T2D). The pump is responsible for maintaining  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  gradients across the plasma membrane and generates a net outward current as a result of  $3\text{Na}^+/2\text{K}^+$  exchange. It remains elusive whether Na,K-ATPase activity is regulated by G in pancreatic  $\beta$ -cell and/or this current contributes to the ionic events regulating insulin secretion.

The aim of this work was to assess G evoked regulation of Na,K-ATPase activity in intact  $\beta$ -cells of normal and G intolerant rats.

**Materials and methods:** Pancreatic  $\beta$ -cells, from normal (controls) or glucose-intolerant Wistar rats (GIR), were isolated and cultured (48h). Cell batches were pre-incubated (30min) with 2.1mM G to reach basal. Afterwards cells were challenged with [G] in the interval 0-11.1mM for 60min, for dose-dependence evaluation, or with 8.4mM G for 5-120min, for time-dependence evaluation. ATPase activity was assessed in intact cells by colorimetric quantification of Pi formed in 30min. Na,K-ATPase activity was calculated by the difference between the activities obtained in the absence and in presence the of 1mM ouabain.

**Results:** G evoked both time- and dose-dependent regulation of Na,K-ATPase. In  $\beta$ -cells from controls, G induced a bimodal regulation of Na,K-ATPase. In the absence of G, Na,K-ATPase activity was  $0.056 \pm 0.015 \text{ U/mg}$ . Raising [G] to 2.1mM induced a  $\approx 3$  fold increase of Na,K-ATPase activity whereas a further increase in [G] in the interval of 5.6-11.1mM evoked a significant reduction of Na,K-ATPase activity to the levels observed in the absence of the secretagogue. Compared to 2mM G, the activity was reduced in 68%, 55% and 66% when [G] was increased to 5.6, 8.4 and 11.1mM, respectively ( $n=3-12$ ). GIR  $\beta$ -cells exhibit an altered profile of response to the secretagogue; In the absence of G, Na,K-ATPase activity was  $\approx 4$  fold the activity observed in the controls ( $0.202 \pm 0.036 \text{ U/mg}$ ;  $n=3$ ). The pump activity remained unchanged for 2.1-5.6mM G and similar to maximal activity observed in the controls ( $0.188 \pm 0.035 \text{ U/mg}$ , for 2.1mM G;  $n=4$ ). A significant reduction of the pump activity in GIR  $\beta$ -cells was induced by 8.4mM G ( $0.118 \pm 0.018 \text{ U/mg}$ ).

G (8mM) induced a time-dependent inhibition of Na,K-ATPase with a biphasic profile. Pump activity decreased to a minimum value (32%) after 20min exposure to G, showing a partial recovery to 45%, 46% and 47% for 30, 60 and 120min, respectively ( $n=5-12$ ). GIR  $\beta$ -cells showed an attenuated response to G (59% activity after 20min) without any recovery ( $n=5-11$ ).

**Conclusions:** This work demonstrates that Na,K-ATPase is finely regulated by G in pancreatic  $\beta$ -cell from normal subjects. This regulation is impaired in GIR where desensitization and an attenuation of the inhibitory action of G were observed. In summary, Na,K-ATPase contribution to G-induced ionic events and insulin secretion might be relevant in T2D development.



## ANEXO C

Costa, A.R., Capela e Silva, F., Antunes, C.M., Cruz-Morais, J., (2011),  
Key role of AMPK in glucose-evoked Na,K-ATPase modulation.  
*Diabetologia*. 54 [Suppl1] S196-Abs. 470.



## Key role of AMPK in glucose-evoked Na,K-ATPase modulation

Costa, A. R., Capela e Silva, F., Antunes, C. M. & J. Cruz-Morais

**Background and aims:** Na,K-ATPase is an integral membrane protein responsible for generating and maintaining transmembrane ionic gradients. It has been demonstrated that, in pancreatic  $\beta$ -cells, Na,K-ATPase is regulated by glucose and that this phenomenon is impaired in glucose intolerant subjects. However, the mechanism underlying glucose-induced modulation of Na,K-ATPase is still unclear.

The AMP-activated protein kinase (AMPK) plays a key role in energy homeostasis, providing exquisite sensitivity to small changes in intracellular AMP. Since glucose has marked effects on oxidative metabolism and intracellular ATP and AMP levels in pancreatic  $\beta$ -cell, the involvement of AMPK in the cascade of events regulating Na,K-ATPase was postulated.

The aim of this work was to evaluate the putative role of AMPK in the glucose-evoked regulation of Na,K-ATPase activity in the pancreatic  $\beta$ -cell.

**Materials and methods:** Pancreatic  $\beta$ -cells from normal (control) or glucose-intolerant Wistar rats (GIR) were isolated and cultured (48h). After a pre-incubation (30min) with 2.1mM glucose (G2), cell batches were challenged with G2 or G8 (8.4mM glucose) for 20min, in the presence or absence of AMPK agonist (AICAR 1mM) and antagonist (compound C (CC), 10 $\mu$ M).

Na,K-ATPase activity was assessed in intact cells by quantification of Pi, in the absence and in presence of 1mM ouabain.

Immunocytochemistry (ICC) of  $\beta$ -cells treated as previously described was performed using anti- $\alpha$ 1-Na,K-ATPase and anti-phospho(Ser-23)- $\alpha$ 1-Na,K-ATPase antibodies.

Western blots (WB) were performed in lysates of islets incubated in similar conditions plus AICAR or CC to evaluate  $\alpha$ 1-Na,K-ATPase (Ser-23) phosphorylation.

**Results:** In G2 the activity of Na,K-ATPase from normal and GIR pancreatic  $\beta$ -cell was similar (0.184 $\pm$ 0.030 and 0.186 $\pm$ 0.020  $\mu$ molPi/min/mgProt, respectively). Challenging the GIR  $\beta$ -cells with G8 evoked a significantly lower inhibition (40%) of Na,K-ATPase activity compared to a 62% inhibition observed in control  $\beta$ -cells. In control  $\beta$ -cell, the addition of AICAR abolished glucose-induced Na,K-ATPase inhibition (0.166 $\pm$ 0.011  $\mu$ molPi/min/mg) whereas CC had no effect on glucose-induced inhibition of Na,K-ATPase. In the contrary, in GIR  $\beta$ -cells CC significantly potentiated glucose-evoked inhibition of Na,K-ATPase reaching values similar to that observed in the controls (66%).

WB analysis revealed that Na,K-ATPase- $\alpha$ 1 (Ser-23) phosphorylation was increased by G8 (28 $\pm$ 6% over basal) and abolished by AICAR. Additionally, CC induced an increase in phosphorylation equivalent to that observed in G8 (22 $\pm$ 5% over basal). ICC showed an equivalent immunostaining intensity for  $\alpha$ 1-Na,K-ATPase despite glucose concentration. However, for the phosphorylated (Ser-23)  $\alpha$ 1-Na,K-ATPase, a higher intensity was observed in cells exposed to G8 compared to G2.

**Conclusions:** The AMPK agonist AICAR counteracts the inhibitory action of glucose on Na,K-ATPase of control  $\beta$ -cells whereas CC amplified the glucose-induced inhibition of Na,K-ATPase in GIR  $\beta$ -cells suggesting that AMPK plays a central role in the cascade of events underlying glucose-induced modulation of Na,K-ATPase and that the defect in GIR must be upstream of AMPK. The mechanism of glucose-induced inhibition of Na,K-ATPase may implicate AMPK inhibition by glucose metabolism and subsequent activation of PKC, that traditionally phosphorylates Na,K-ATPase in Ser23. This mechanism must be uncoupled in GIR. Occurring prior to overt type 2 diabetes, this might be a feature in the disease development.