

Avaliação Morfológica e dos Mecanismos de Mobilização de Ca^{2+} pela Glicose e Acetilcolina em Células Pancreáticas Humanas

RESUMO

Objetivos: Avaliar a morfologia das organelas e do citoesqueleto em células pancreáticas humanas cultivadas e a mobilização de Ca^{2+} em resposta à glicose e ACh por medidas fluorimétricas. **Material e Métodos:** As células foram semeadas em lamínulas, fixadas e marcadas com uma combinação de fluoróforos: o núcleo foi corado com DAPI e as mitocôndrias, com Myotracker Red. Foram utilizados faloidina e anticorpos secundários conjugados com Alexa Fluor verde e vermelho fluorescentes (488 e 594) para identificar proteína actina F e receptor muscarínico tipo M3, respectivamente. Para estudar a mobilização de Ca^{2+} , as células foram incubadas com fura-2/AM. **Resultados:** As células pancreáticas humanas apresentaram morfologia preservada com grande quantidade de mitocôndrias. Na região de maior densidade celular, evidenciou-se as pseudo-ilhotas e os receptores muscarínicos M3. Por meio da elevação da $[\text{Ca}^{2+}]_c$, devido à ação da glicose e ACh, mostrou-se preservação da capacidade responsiva a esses estímulos e foi dependente de concentração desses agonistas. A glicose promoveu uma resposta sustentada e a ACh induziu uma resposta bifásica. **Conclusão:** As células pancreáticas humanas cultivadas conservaram sua morfologia. A mobilização de Ca^{2+} em resposta à glicose e a ACh confirma a sua funcionalidade. Os receptores muscarínicos M3 estão presentes nessas células. (Arq Bras Endocrinol Metab 2007;51/3:431-436)

Descritores: Diabetes; Insulina; Células pancreáticas humanas; Ca^{2+} ; ACh

ABSTRACT

Morphologic Evaluation and Ca^{2+} Mobilization by Glucose and Acetylcholine in Human Pancreatic Cells.

Aims: The proposal of this study was to analyze morphology of the organelles and cytoskeleton in human pancreatic cells cultured and the mobilization of the cytosolic calcium ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) in response to glucose and ACh by fluorimetry method. **Material and Methods:** The cells were plated on glass coverslips, fixed and stained with a combination of fluorophores: the nuclei were stained with DAPI and mitochondria with Myotracker Red. It was used phalloidin and the secondary antibodies Alexa Fluor conjugated green and red-fluorescent (488 and 594) to identify the protein cell actin F and type M3 muscarinic receptor respectively. The cells also were loaded with fura-2/AM to study Ca^{2+} mobilization. **Results:** The human pancreatic cells show characteristics morphologically preserved with great amount of mitochondria. In region major cell density was evidenced pseudo-islets and type M3 muscarinic receptors. Through increase of $[\text{Ca}^{2+}]_c$ due to action of glucose and ACh were shown that the cells' capacity to respond to these stimuli were conserved. The elevation of the $[\text{Ca}^{2+}]_c$ depended on concentration by glucose-induced promoting sustained phase and ACh-induced a biphasic response. **Conclusion:** The morphologic characteristics of human pancreatic cells cultured were preserved. The Ca^{2+} mobilization in response to glucose and ACh confirmed its functionality. The expression of the M3 muscarinic receptors in human pancreatic cell cultured was demonstrated. (Arq Bras Endocrinol Metab 2007;51/3:431-436)

Keywords: Diabetes; Insulin; Human pancreatic cells; Ca^{2+} ; ACh

artigo original

**DANIELA ESPINHA CARDOSO
LUCIMAR PEREIRA DE FRANÇA
ELISÂNGELA CHINEN
ANDRÉA A.F. SOUZA MORAES
ALICE TEIXEIRA FERREIRA
JERÔNIMO PEREIRA DE FRANÇA**

Departamento de Biofísica —
UNIFESP/EPM, São Paulo, SP.

Recebido em 04/05/06

Aceito em 23/10/06

EM MAMÍFEROS ADULTOS, as células β das ilhotas pancreáticas de Langerhans são a única fonte de produção de insulina. Essas células não só produzem insulina, mas secretam esse hormônio em quantidades apropriadas para manter os níveis de glicose plasmática dentro dos estreitos limites fisiológicos. A disfunção nas células β pancreáticas é a principal causa do desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2, a desordem metabólica mais comum no ser humano. Diferentes sinais como fatores humorais (hormônios, como o glucagon, vitaminas, nutrientes, íons etc.), estimulação nervosa (acetilcolina) e fatores de comunicação intercelular entre ilhotas, garantem a apropriada função das células β, que mantêm os níveis basais de insulina, e sua principal estimulação é dependente do nível de glicose (1).

A insulina exerce diversas ações biológicas, as quais incluem regulação de glicose, síntese de lipídeos e proteínas e a transcrição gênica (2). Com a falta desse hormônio, observa-se um quadro de hiperglicemia, situação que induz uma série de patologias em diferentes tecidos; entre os mais importantes, tem-se as células vasculares e neuronais, conforme observado em modelos animais e em pacientes diabéticos (3).

O *plexus* entérico de mamífero é um sistema complexo, contendo um grande número de neurônios com uma vasta rede de fibras dos quais são liberados numerosos neurotransmissores, entre eles, a acetilcolina (ACh) (4). A atividade dos nervos parassimpáticos,

bem como a estimulação com a glicose, tem um papel importante na secreção de insulina pelas células β pancreáticas. A ativação do receptor muscarínico por ação da ACh promove a exocitose dos grânulos de insulina e a ACh também despolariza as células β. O influxo de Ca²⁺ promovido pela abertura de canais voltagem-dependentes induzida por glicose e ACh resulta no aumento da [Ca²⁺]_c nestas células (5-6).

O receptor de insulina é uma tirosina cinase, que sofre autofosforilação e catalisa a fosforilação de proteínas celulares, tais como membros das famílias IRS, Shc e Cbl. Junto com a fosforilação da tirosina, essas proteínas interagem com moléculas sinalizadoras através de seus domínios SH2, resultando em diversas vias de sinalização, que modulam a regulação do tráfego vesicular, síntese de proteínas, ativação e inativação de enzimas e expressão gênica (7) (figura 1).

As células β pancreáticas possuem receptores de insulina e há evidências da ação autócrina desse hormônio na função dessas células, incluindo a transcrição da glicocinase e genes responsáveis pela expressão de insulina (9).

O transplante de pâncreas tem tido ótimos resultados em pacientes com diabetes, porém é feito implante do órgão inteiro, cirurgia extensa que aumenta a probabilidade de complicações cirúrgicas e risco de rejeição. O transplante de ilhotas tem mostrado resultados favoráveis em pacientes com diabetes do tipo 1, sendo interessante por se tratar de uma micro-

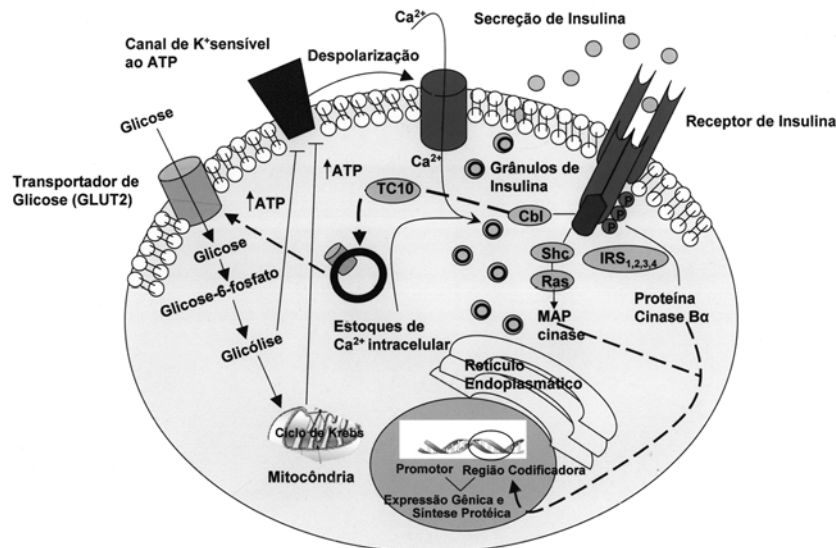


Figura 1. Secreção de insulina e sinalização da célula β pancreática. A glicose é transportada para interior da célula por meio do transportador de glicose GLUT2. A enzima glicocinase catalisa a transferência do fosfato do ATP para glicose, formando glicose-6-fosfato. O aumento dos níveis citosólicos de ATP gerados pela glicólise e ciclo de Krebs promove o fechamento de canais de K⁺ sensíveis ao ATP levando à despolarização da membrana plasmática e promovendo a abertura de VOCs Ca²⁺ (canais operados por voltagem de Ca²⁺), permitindo o influxo de Ca²⁺ capaz de liberar mais Ca²⁺ do retículo endoplasmático liso. Os aumentos citosólicos de Ca²⁺ levam à migração e fusão das vesículas secretoras de insulina, que por exocitose liberam a insulina para a circulação. [Adaptado de Bell GI & Polonsky KS, 2001 (8)].

cirurgia (10). O cultivo de células pancreáticas humanas tem contribuído para esta área de transplantes, por ser uma das fontes alternativas de proliferação de pseudo-ilhotas *in vitro*, já que são necessários 2–4 pâncreas por transplante. Por outro lado, o entendimento dos mecanismos de resposta como os aumentos de Ca²⁺ citosólico e produção de insulina de células das ilhotas pancreáticas cultivadas, são ferramentas importantes para esclarecer o complexo mecanismo funcional e aspectos morfológicos e proliferativos dessas células secretoras de insulina.

O principal interesse deste trabalho foi obter quantidade satisfatória de células pancreáticas humanas, morfológica e funcionalmente viáveis com suas características fenotípicas mantidas, baseado na avaliação da morfologia das organelas e do citoesqueleto, bem como a possibilidade de manutenção da capacidade responsiva à ACh decorrente da presença de receptores muscarínicos do tipo M3 em sua membrana plasmática. Para tal, avaliou-se o aspecto funcional através da mobilização de Ca²⁺ citosólico por ação da glicose e da ACh nas células pancreáticas humanas, por meio de medidas fluorimétricas desse íon.

MÉTODOS

Cultura de células pancreáticas humanas

As células pancreáticas humanas foram doadas pelo Laboratório de Transplante de Pâncreas da Universidade de São Paulo (USP). Estas foram subcultivadas em placas Delta T Dish 0,15 mm com meio de cultura CMRL (ICN Biologicals) estéril contendo 10% de Soro Fetal Bovino (Cultilab Mat. Cult. Cell Ltda.). Foram mantidas em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ e 95% de O₂ a 37°C, cujo meio de cultura foi renovado parcialmente a cada 2–3 dias, a fim de preservar os fatores liberados pelas células durante o cultivo. As células pancreáticas humanas foram cultivadas até a 15ª passagem.

Imunocitoquímica para análise por microscopia de fluorescência confocal

As células pancreáticas foram fixadas em solução de Tyrode (NaCl 137,00 mM; KCl 2,70 mM; CaCl₂·2H₂O 1,36 mM; MgCl₂·6H₂O 0,50 mM; NaH₂PO₄·H₂O 0,36 mM; NaHCO₃ 11,90 mM; Glicose 5,50 mM) contendo formaldeído 0,4%. Após a fixação, as células foram lavadas em Tyrode com glicina 1M e incubadas em solução Tyrode contendo albumina sérica bovina BSA 1% (Sigma do Brasil) e saponina 0,1% (Merck, Darmstadt, Alemanha). Após a fixação e a permeabilização, as células pancreáticas foram incubadas com o corante Mitotracker Red (Molecular Probes Eugene, Oregon, USA) em solução de Tyrode com BSA 1% e saponina 0,1% para marcação das mitocôndrias. Posteriormente, as células

foram lavadas em solução de Tyrode com BSA 1% e saponina 0,1%. O mesmo procedimento foi utilizado para as marcações do núcleo com DAPI (Molecular Probes Eugene, Oregon, USA) e dos receptores muscarínicos M3 com anticorpo monoclonal primário e secundário IGg de coelho (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Califórnia, USA) conjugado com Alexa Fluor 594 (Molecular Probes Eugene, Oregon, USA) e do citoesqueleto, actina F, com Faloidina conjugada com Alexa Fluor 488 (Molecular Probes Eugene, Oregon, USA). Após as marcações, as células foram lavadas novamente e fez-se a montagem das lâminas e a leitura por microscópio de fluorescência Axiophot da Zeiss e Confocal de varredura a laser, Carl Zeiss modelo LSM 510 da UNIFESP-EPM objetiva 63x 1.4 (água). Sendo possível a análise com até três lasers simultaneamente, são eles: laser de Argônio, 488 nm, Hélio/Neônio 543 nm e o Titânio/safira 750 nm. Foram também utilizados os respectivos filtros de interferência para os fluoróforos utilizados, a fim de obterem-se os comprimentos de onda de emissão e as imagens na profundidade do plano focal. Obteve-se imagens por combinação das fatias ópticas projetadas dos eixos x–y, cuja varredura linear nas células deu-se a cada 2 ms. A marcação das células com sondas fluorescentes foi feita de acordo com o método descrito por Bkaily e cols., 2001 (11).

Medidas de Ca²⁺ citosólico

As células pancreáticas cultivadas foram retiradas dos frascos de cultura por ação da tripsina, como segue: o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com PBS (NaCl 140,0 mM; NaH₂PO₄·H₂O 2,6 mM; Na₂HPO₄ 10 mM; EDTA 0,5 mM), o qual foi aspirado e ao frasco foi adicionada tripsina 0,2% para que as células se soltassem e fossem suspensas em solução de Tyrode. A suspensão de células obtida foi centrifugada em 1500 rpm, re-suspensa em Tyrode e transferida para cubeta de quartzo. Em seguida, foram acrescentados o 2 µM fura-2/AM (Molecular Probes Eugene, Oregon, USA) e o ácido plurônico 0,01%. Uma vez incorporado o fluoróforo, através do deslocamento do pico máximo do espectro de excitação entre 300 a 400 nm, por análise no espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 5, o pico desloca de 390 nm para 350 nm quando o fura-2 passa da forma de acetoximetiléster para a forma ácida que se complexa com o Ca²⁺. As células foram centrifugadas e re-suspensas novamente com Tyrode e transferidas para o fluorímetro SPEX, a 37°C para a avaliação dos níveis de Ca²⁺ citosólico ([Ca²⁺]_c) em resposta à estimulação com glicose e com ACh.

Análise estatística

Os níveis de [Ca²⁺]_c foram representados como valores médios ou como porcentagem de aumento relativo ao controle. Os valores foram expressos como média ± desvio-padrão. A análise estatística dos resultados foi determinada usando-se o teste de ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações. Fixou-se em 5% (p < 0,05) o nível de rejeição de nulidade, assinalando-se com um asterisco os valores significantes.

RESULTADOS

A análise morfológica das células cultivadas das ilhotas pancreáticas (figura 2A) demonstrou um grande número de mitocôndrias em torno do núcleo celular observando núcleos íntegros de formato característico para essas células (figura 2B). A aglomeração de núcleos indica um maior estado de confluência das células, as pseudo-ilhotas. A figura 2C mostra a distribuição e a preservação dos filamentos de actina que compõem o citoesqueleto. A sobreposição das imagens 2A, B, C pode ser vista na figura 2D. As micrografias mostram a arquitetura celular e do citoesqueleto para a formação das pseudo-ilhotas pancreáticas e a disposição de suas organelas. A distribuição de receptores muscarínicos tipo M3 pode ser observada na figura 3A.

A capacidade funcional das células pancreáticas humanas cultivadas depende da preservação da maquinaria de sinalização celular. Neste estudo, administraram-se glicose em concentrações consecutivas de 5.5 mM, a partir do valor basal de 5.5 mM glicose. Observou-se um aumento de Ca²⁺ citosólico dependente (figura 4A), e se infere que o aumento de [Ca²⁺]_c é necessário para a modulação e secreção de insulina. A figura 4B mostra que os aumentos da [Ca²⁺]_c foram concentração-dependente promovidos pela estimulação da glicose, apresentando respostas sustentadas. Entretanto, o perfil

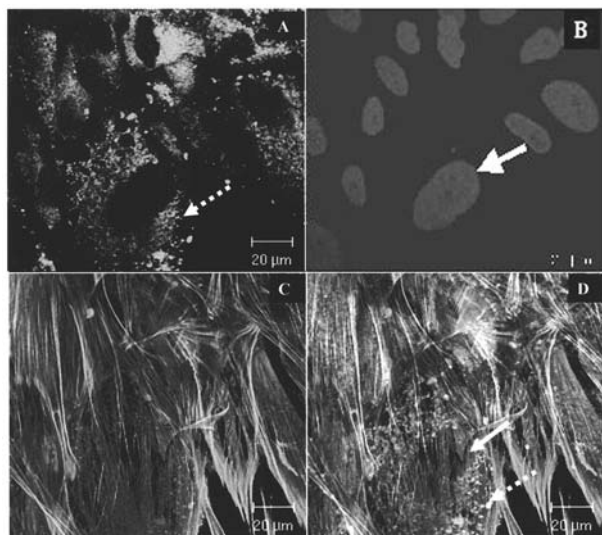


Figura 2. Micrografias das células pancreáticas humanas cultivadas sob microscopia confocal. (A) Distribuição de mitocôndrias marcadas com Myotracker red. (B) Núcleos celulares marcados com DAPI, marcador fluorescente de DNA. (C) Identificação dos filamentos de actina F, marcados com Faloidina conjugado com Alexa Fluor 488. (D) Sobreposição das imagens A, B e C mostrando pseudo-ilhotas e a colocalização dos componentes celulares. Flechas contínuas mostram os núcleos; flechas descontínuas mostram as mitocôndrias.

de resposta à ACh foi transitente, verificando-se uma fase fásica (pico) e outra tônica, mantida acima dos valores basais no registro temporal da variação de [Ca²⁺]_c (figura 4A).

DISCUSSÃO

As condições adequadas de cultivo das células das ilhotas pancreáticas humanas produzem células viáveis caracterizadas pela morfologia das organelas das células pancreáticas, como o núcleo e citoesqueleto. Após o cultivo das células pancreáticas humanas, verificou-se a sua capacidade funcional por meio de resposta a estímulos que induzem a mobilização de Ca²⁺ necessários à produção e secreção de insulina pelas células β do pâncreas.

A análise morfológica das células cultivadas das ilhotas pancreáticas mostrou um grande número de mitocôndrias em torno do núcleo celular, indicativo de grande atividade celular. A aglomeração de núcleos, corados com DAPI, indicou um estado de maior confluência celular e verificou-se a formação das pseudo-ilhotas.

Os filamentos de actina que participam da arquitetura do citoesqueleto celular apresentaram suas características preservadas. Esses filamentos do citoesqueleto representam um dos fatores que implicam na regulação da atividade secretora nessas células

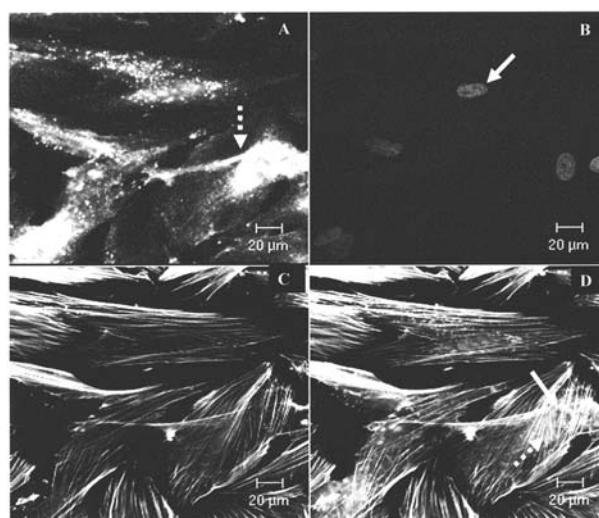


Figura 3. Micrografias das células pancreáticas humanas cultivadas sob microscopia confocal. (A) Distribuição de receptores muscarínicos tipo M3 marcados com anti-M3 e secundário conjugando com Alexa Fluor 594, que se distribuem na membrana plasmática. (B) Núcleos celulares corados com DAPI, marcador de DNA. (C) Distribuição dos filamentos de actina, corados com Faloidina conjugado com Alexa Fluor 488. (D) Sobreposição das imagens A, B e C. Flechas contínuas mostram os núcleos; flechas descontínuas mostram os receptores muscarínicos do tipo M3.

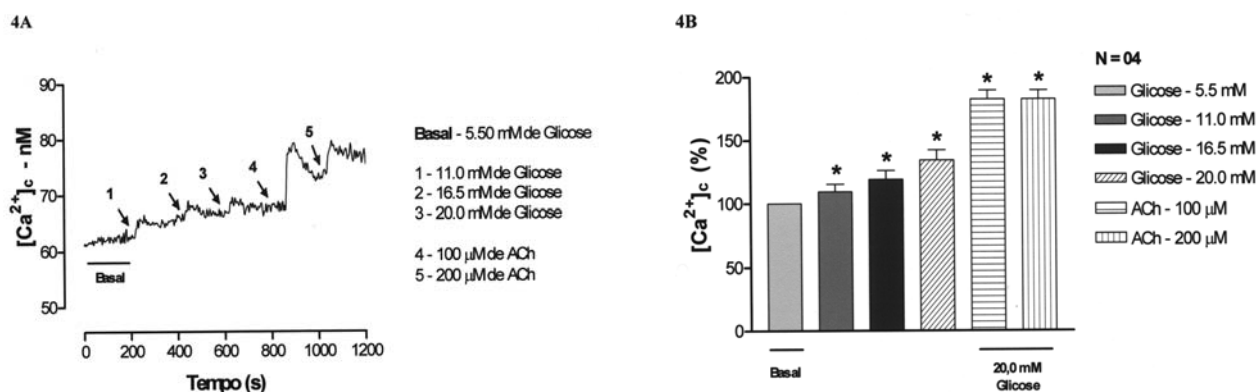


Figura 4. Efeito de curvas cumulativas de concentração resposta para glicose (5,5–20 mM) e acetilcolina (ACh, 100 e 200 µM) na [Ca²⁺]_c em células pancreáticas humanas cultivadas. (A) Perfil de resposta das células pancreáticas carregadas com o fluoróforo de Ca²⁺, o fura-2, foram expostas sucessivamente a 5,5–20 mM de glicose. Duas estimulações consecutivas com 100 e 200 µM ACh. (B) Histograma do aumento percentual de Ca²⁺ das células pancreáticas.

(12). Por isso, o citoesqueleto preservado é importante para a secreção de insulina dependente de Ca²⁺, que é acompanhado também de alterações morfológicas na distribuição da actina F (13).

As alterações nas concentrações de Ca²⁺ intracelular têm um papel central nos diversos processos celulares para a secreção de hormônios e neurotransmissores, proliferação, crescimento e desenvolvimento. Essas mudanças da concentração intracelular de Ca²⁺ resultam da mobilização de seus estoques citoplasmáticos e do influxo de Ca²⁺ através de canais iônicos presentes na membrana plasmática (14).

A secreção de insulina dependente da glicose é modulada por vários hormônios e neurotransmissores, dentre os quais a ACh tem um papel proeminente. A ACh é liberada pela inervação parassimpática intrapancreática proveniente do nervo vago. Os efeitos da liberação da ACh para a secreção de insulina são mediados pela ativação de receptores de ACh localizados nas células β pancreáticas. Estudos têm demonstrado a existência de cinco subtipos de receptores muscarínicos (M1-M5), que são expressos nas ilhotas pancreáticas/ células β ou células β derivadas de linhagens celulares de tumor. Entretanto, o receptor M3 parece ser predominantemente expresso nas células β pancreáticas (15).

As culturas e linhagens de células β pancreáticas secretoras de insulina representam um avanço promissor para o tratamento do diabetes mellitus tipo 1. Cada linhagem dessas células pode prover uma fonte abundante e reproduzível de células para o transplante do pâncreas. Essas células produzem e secretam insulina comparável aos níveis fisiológicos das ilhotas pan-

creáticas normais. Em princípio, a massa de células β pode ser mantida, prevenindo ou diminuindo a destruição dessas por reações auto-imunes, pela regeneração de ilhotas, pelo transplante de ilhotas ou mesmo pela combinação dessas técnicas. Num futuro próximo, o desenvolvimento da cultura de células β, para o transplante, poderá restaurar a função endócrina normal do pâncreas em pacientes diabéticos (16).

O cultivo de células pancreáticas humanas permitiu a obtenção de grande quantidade de células que conservaram as características morfológicas originais com capacidade de proliferação e possivelmente produção de insulina. As regiões de maior densidade celular apresentaram características semelhantes à arquitetura das ilhotas, as pseudo-ilhotas. Os filamentos de actina que compõem o citoesqueleto não apresentaram ruptura ou formação de aglomerados. Na confluência das células cultivadas em placa ou frascos de cultura verificou-se que a morfologia das ilhotas apresentava suas organelas e citoesqueleto preservados, característicos do tecido pancreático humano normal. Foi confirmada a expressão dos receptores muscarínicos do tipo M3, que é fundamental para o controle pelo sistema nervoso autônomo da secreção de insulina por ação da ACh (17).

Concluimos que as células pancreáticas cultivadas até a 15^a passagem não se distinguem morfológicamente das células iniciais e funcionalmente se comportam como tais, pois mantêm nas suas membranas plasmáticas os receptores muscarínicos do tipo M3 e são responsivas à glicose e ACh, promovendo um aumento de Ca²⁺ proporcional à concentração de glicose ou ACh.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Laboratório de Biofísica — UNIFESP/EPM, onde foi realizado este trabalho, e a equipe do Laboratório de Transplante do Pâncreas — Instituto de Química da USP, pela doação do material biológico. Ao CNPq e à FAPESP pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Leibiger BI, Leibiger B, Berggren PO. Insulin feedback action on pancreatic β -cell function. **FEBS Letters** 2002;532:1-6.
2. Rosen OM. After insulin binds. **Science** 1987;237(4821):1452-8.
3. Koya D, King GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. **Diabetes** 1998;47:859-66.
4. Belai A, Lincoln J, Milner P, Crowe R, Loesch A, Burnstock G. Enteric nerves in diabetic rats: increase in vasoactive intestinal polypeptide but not substance P. **Gastroenterology** 1985;89(5):967-76.
5. Nakano K, Suga S, Takeo T, Ogawa Y, Suda T, Kanno T, et al. Intracellular Ca²⁺ modulation of ATP-sensitive K⁺ channel activity in acetylcholine-induced activation of rat pancreatic β -cells. **Endocrinology** 2002;143(2):569-76.
6. Pakhtusova N, Zaostrovskaya L, Lindstrom P, Larsson-Nyren G. Cell-specific Ca²⁺ responses in glucosa-stimulated single and aggregated β -cells. **Cell Calcium** 2003;34:121-9.
7. Saltiel AR, Kahn RC. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature** 2001;414:799-806.
8. Bell GI, Polonsky KS. Diabetes mellitus and genetically programmed defects in β -cell function. **Nature** 2001;414:788-91.
9. Aspinwall CA, Lakey JRT, Kennedy RT. Insulin-stimulated insulin secretion in single pancreatic beta cells. **J Biol Chem** 1999;274(10):6360-5.
10. Aita CAM, Sogayar MC, Eliaschewitz F. Transplante de ilhotas – alternativa atraente para diabéticos. **Ciência Hoje** 2004;35(205):34-40.
11. Bkaily G, Gros-Louis N, Naik R, Jaalouk D, Pothier P. Implication of the nucleus in excitation contraction coupling of heart cells. **Mol Cell Biochem** 1996;154(2):113-21.
12. Torgerson RR, Mcniven MA. Agonist-induced changes in cell shape during regulated secretion in rat pancreatic acini. **J Cell Physiol** 2000;182:438-47.
13. Wilson JR, Ludowyke RI, Bidena TJ. A redistribution of actin and myosin IIA accompanies Ca²⁺-dependent insulin secretion. **FEBS Letters** 2001;492:101-6.
14. Squires PE. Non-Ca²⁺-homeostatic functions of the extracellular Ca²⁺-sensing receptor (CaR) in endocrine tissues. **J Endocrinol** 2000;165:173-7.
15. Duttaroy A, Zimlikli CL, Gautam D, Cui Y, Mears D, Wess J. Muscarinic stimulation of pancreatic insulin and glucagons release is abolished in M3 muscarinic acetylcholine receptor-deficient mice. **Diabetes** 2004;53:1715-20.
16. Efrat S. Cell-based therapy for insulin-dependent diabetes mellitus. **Eur J Endocrinol** 1998;138:129-33.
17. Gilon P, Henquin JC. Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic β -cell function. **Endocr Rev** 2001;22(5):565-604.

Endereço para correspondência:

Daniela Espinha Cardoso
Rua Botucatu 862, 2º andar
04041-990 São Paulo, SP
E-mail: daniela@biofis.epm.br