

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

DANIEL ANDRADE DA CUNHA

**Prolactina induz aumento na expressão das proteínas SNARE e da
sinaptotagmina 4 em ilhotas de ratos**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
para obtenção do Título de Mestre em
Biologia Funcional e Molecular, na área
de Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero

2004

Data da Defesa: 02/03/2004

Banca Examinadora

Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero (orientador) _____

Profa. Dra. Silvana Auxiliadora Bordin da Silva _____

Prof. Dr. Eduardo Melani Rocha _____

Prof. Dr. Francesco Langone _____

Aos meus avós, pais e irmã

À Sylvia

Dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

Aos meus avós, pais e irmã pela ajuda incondicional.

À Sylvia pelo amor e apoio em todos os momentos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero pela paciência, incentivo e ajuda profissional.

Ao Prof. Dr. Eduardo Rocha por sempre me ensinar a ser um pesquisador.

À Profa. Dra. Carla Collares pela colaboração nos trabalhos.

À Profa. Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira pelo auxílio em muitos momentos.

À Esméria por sempre me ensinar e ajudar desde o começo.

Aos meus amigos da grandiosa turma de Biologia 98D.

Aos meus amigos dos imbatíveis times da Biologia.

Aos meus amigos do laboratório.

Ao Léscio pelas constantes ajudas nos procedimentos laboratoriais.

À todos que participaram da elaboração deste trabalho.

À FAPESP pela concessão da bolsa de estudos.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas.....	viii
Lista de Figuras.....	x
Lista de Tabelas.....	xi
Resumo.....	xii
Abstract.....	xiii
1 - Introdução.....	1
2 - Objetivos.....	9
3 - Material e Métodos.....	11
4 - Resultados.....	19
5 - Discussão.....	40
6 - Conclusão.....	45
7 - Referências Bibliográficas.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS

°C – graus centígrados

µg – micrograma

µl – microlitro

µM – micromolar

ANOVA – análise de variância

ATP – trifosfato de adenosina

Ca²⁺ - cálcio

CDNA – ácido deoxiribonucléico complementar

DDT – ditiotreitól

DEPC – dietil pirocarbonato

dl – decilitro

DMSO – dimetil sulfoxido

EDTA – ácido etilendiaminotetracético

EPM – erro padrão da média

GH – hormônio do crescimento

GLUT – transportador de glicose

IRS – substrato do receptor de insulina

K⁺ - potássio

kDA – quilodalton

MAP-cinase – proteína cinase ativada por mitógenos

mg – miligrama

min – minuto

ml – mililitro

mM – milimolar

NSF – fator sensível à N-etilmaleimida

PBS – tampão fosfato salina

PCR – reação em cadeia da polimerase

PI3-cinase – fosfatidilinositol 3-cinase

PRL – prolactina

RIE – radioimunoensaio

RNA_m – ácido ribonucléico mensageiro

SDS – duodecil sulfato de sódio

SNAP-25 – proteína sinaptossomal associada de 25 kDa

SNARE – proteína receptora ao fator sensível à N-etilmaleimida

SNARE - receptores de SNAP

TBE – tris borato EDTA

VAMP-2 – proteína associada à membrana vesicular isoforma 2

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Secreção de insulina por ilhotas de neonatos em presença de 2,8 e 22 mM de glicose.....	20
Figura 2 - Secreção de insulina por ilhotas de ratas adultas em presença de 2,8 e 11 mM de glicose.....	21
Figura 3 – Expressão gênica das sinaptotagminas em ilhotas de ratas adultas.....	23
Figura 4 - Expressão gênica das SNAREs em ilhotas de ratas adultas.....	24
Figura 5 - Expressão gênica da insulina em ilhotas de neonatos.....	25
Figura 6 - Expressão gênica da syntaxina 1A em ilhotas de neonatos.....	26
Figura 7 - Expressão gênica da VAMP-2 em ilhotas de neonatos.....	27
Figura 8 - Expressão gênica da SNAP-25 em ilhotas de neonatos.....	28
Figura 9 - Expressão gênica da sinaptotagmina 4 em ilhotas de neonatos.....	29
Figura 10 - Expressão gênica da sinaptotagmina 1 em ilhotas de neonatos.....	30
Figura 11 – Expressão protéica da sinaptotagmina 4 em ilhotas de neonatos e ratas adultas.....	31
Figura 12 – Expressão protéica da sinaptotagmina 1 em ilhotas de neonatos e ratas adultas.....	32
Figura 13 – Expressão protéica da syntaxina 1A em ilhotas de neonatos e ratas adultas.....	33
Figura 14 – Expressão protéica da SNAP-25 em ilhotas de neonatos e ratas adultas.....	34
Figura 15 – Expressão protéica da VAMP-2 em ilhotas de neonatos e ratas adultas.....	35
Figura 16 – Imunolocalização da sinaptotagmina 4 em ilhotas de ratos neonatos.....	36
Figura 17 – Imunolocalização da sinaptotagmina 4 em ilhotas de ratas adultas.....	37

Figura 18 – Imunolocalização da syntaxina 1A em ilhotas de ratos neonatos.....	38
Figura 19 – Imunolocalização da syntaxina 1A em ilhotas de ratas adultas.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Seqüência dos "primers" utilizados na PCR.....	16
Tabela 2 - Parâmetros utilizados na PCR.....	22

RESUMO

Muitas proteínas estão envolvidas no processo de extrusão de grânulos e fusão de membranas nas células β pancreáticas, e entre estas se destacam as proteínas da família SNARE, composta pela syntaxina, VAMP, SNAP-25 e as sinaptotagminas. Durante a prenhez e o período pós-natal, a prolactina (PRL) e os lactogênios placentários induzem a maturação do processo secretório nas ilhotas pancreáticas por um mecanismo que não está totalmente conhecido. Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar se o aumento na resposta secretória frente à glicose observado durante a prenhez envolve alterações na expressão das proteínas SNARE e das sinaptotagminas 1 e 4. Observamos aumento na expressão gênica e protéica da syntaxina 1A, SNAP-25, VAMP-2 e da sinaptotagmina 4 nas ilhotas de neonatos (1 – 2 dias de vida) tratadas com PRL. Demonstramos também que ilhotas de ratas prenhes (17 – 18 dias após cópula) apresentam maior expressão da syntaxina 1A, SNAP-25 e sinaptotagmina 4 que ilhotas controle. Além disso, a inibição das vias da PI3-cinase pela wortmanina ou da MAP-cinase pelo PD098059, não alterou a transcrição destes genes. Desta forma, podemos concluir que prolactina modula a expressão gênica e protéica de parte dos componentes ligados aos passos finais da extrusão dos grânulos de insulina e que este efeito não é mediado pelas vias da PI3- ou da MAP-cinase.

ABSTRACT

The soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attached protein receptor (SNARE) molecules SNAP-25, syntaxin and VAMP-2 as well as synaptotagmins participate in the extrusion of insulin containing granules in pancreatic β -cells. During pregnancy and the perinatal periods of life, prolactin (PRL) and other lactogenic substances induce maturation of the stimulus-secretion coupling in the pancreatic islets by a mechanism that is still unclear. In the present study, we investigated whether the improvement in the secretory response to glucose during those periods involves alteration in the expression of syntaxin 1A, SNAP-25, VAMP-2 and synaptotagmins 1 and 4. In islets from pregnant rats (17th – 18th days of pregnancy) and islets from neonatal rats (1-2 days old) treated with PRL for five days, the expression of syntaxin, SNAP-25 and synaptotagmin 4 genes and their encoded proteins was increased compared with controls. VAMP-2 gene and protein was increased in PRL treated-islets from neonatal rats but not in islets from pregnant rats. Wortmannin, a PI3-kinase inhibitor, and PD098059 (PD), a MAP-kinase inhibitor, failed to abrogate the effect of treatment with PRL on the expression of the above proteins. In conclusion, these data indicate that PRL modulates the final steps of insulin secretion by increasing the expression of proteins involved in membrane fusion. These experiments also indicate that effects of PRL occur mainly through a signaling cascade distinct from the PI3-kinase or MAP-kinase pathways.

I - INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

A secreção de insulina pelas células β pancreáticas é ajustada continuamente, de acordo com as flutuações dos níveis de nutrientes circulantes, em especial, da glicose. A secreção é ainda modulada, direta ou indiretamente, por hormônios, neurotransmissores e agentes farmacológicos. Esse controle multifatorial permite que as células β secretem insulina em quantidade e tempo adequados, regulando perfeitamente os níveis de nutrientes no sangue em diferentes situações fisiológicas, tais como: jejum, refeição, exercício físico, gravidez, lactação, crescimento, velhice, e outros. Alterações no mecanismo de produção e secreção de insulina, muitas vezes associadas ao aumento da resistência à ação do hormônio nas células alvo, levam ao aparecimento de hiperglicemia crônica que, dependendo da etiopatologia é classificada nos diferentes tipos de diabetes *mellitus*.

1.1 - Mecanismos gerais da ação da PRL

PRL, a exemplo do GH e de diferentes citocinas, atua nas células alvo por meio da interação com receptores específicos pertencentes à superfamília de receptores das citocinas e eritropoetina, que se caracterizam pela homologia de seus domínios extracelulares (Taga e Kishimoto, 1992). Diferentes isoformas dos receptores de PRL foram clonadas e seqüenciadas e, dependendo do comprimento e composição de aminoácidos do segmento intracelular, os mesmos foram classificados como longos, intermediários e curtos (Goffin e Kelly, 1996). Uma outra isoforma dita solúvel, encontrada no lado externo das membranas também foi relatada, contudo de função desconhecida (Amit *et al.*, 1997). Embora o domínio intracelular das diferentes isoformas dos receptores de PRL difira quanto ao tamanho e composição de seus aminoácidos, a região extracelular é muito conservada (Goffin *et al.*, 2002). Após ligação da PRL no seu

receptor específico é necessária a ocorrência de dimerização do receptor e a subsequente fosforilação de resíduos tirosina localizados na parte citoplasmática do mesmo. A existência de receptores com diferentes domínios intracelulares leva-nos a inferir que a PRL pode induzir nas células alvo diferentes ações, dependendo do tipo ou tipos de isoformas ali presentes. O primeiro evento intracelular induzido pela PRL, largamente descrito na literatura, é a fosforilação da proteína JAK2 (Janus cinase 2). Esta, por sua vez, pode ativar diferentes proteínas intracelulares, especialmente os STATS. Dentre os STATS merece destaque o STAT5 que, ativado, migra em direção ao núcleo da célula, liga-se a elementos responsivos no DNA estimulando a transcrição de genes específicos (Yamauchi *et al.*, 1998). Contudo, é sabido que as vias intracelulares da sinalização de diferentes hormônios que atuam via receptores do tipo tirosina cinase podem, em níveis diferentes, se cruzarem (*cross talk*). Com o sinal da PRL não é diferente. Assim, a literatura apresenta inúmeras evidências que a PRL pode interferir na atividade de diferentes proteínas intracelulares envolvidas na transmissão de diferentes sinais. Entre estas: Fyn, Ras, Raf, Vav, Grb2, Sos, Shc, MAP-cinase, IRS1, SHP2, PKC, PI3-cinase, G proteínas, PLC, IRS2/3 (David *et al.*, 1994; Erwin *et al.*, 1995; Too *et al.*, 1989; Berlanga *et al.*, 1997; Yamauchi *et al.*, 1998).

1.2 - Ações da PRL nas ilhotas de Langerhans

Durante prenhez, as ilhotas de Langerhans dos mamíferos passam por modificações estruturais e funcionais em resposta a uma demanda maior de insulina. Observa-se um aumento da massa total das ilhotas como conseqüência da hipertrofia (Parsons *et al.*, 1992), hiperplasia (Weinhaus *et al.*, 1996) e redução da apoptose das células β (Parsons *et al.*, 1995). A curva dose resposta à glicose, durante esse período, é deslocada para a esquerda permitindo a secreção de

quantidades maiores de insulina frente a concentrações fisiológicas de glicose, evitando-se a hiperglicemia. Estas adaptações são comandadas por diferentes hormônios, especialmente pelos lactogênios placentários.

Muitas das alterações observadas durante a prenhez podem ser reproduzidas *in vitro*, em especial, se forem usadas ilhotas de Langerhans de neonatos, como modelo experimental. Está bem estabelecido que o tratamento prolongado de ilhotas de ratos neonatos *in vitro* com PRL aumenta a síntese de insulina (Brelje *et al.*, 1993); expressão do transportador de glicose GLUT2 (Mazancourt *et al.*, 1994); atividade da glicoquinase IV; metabolismo da glicose (Burch *et al.*, 1981), formação de ATP e aumento da atividade iônica, representada aqui por maior habilidade da glicose em reter K^+ e Ca^{2+} pelas células secretoras de insulina (Crepaldi *et al.*, 1997); aumento da interação das células β nas ilhotas através aumento da expressão da conexina 43 e da β -catenina (Michaels *et al.*, 1987; Collares-Buzato *et al.*, 2001) e; finalmente, secreção de insulina (Crepaldi *et al.*, 1997; Sorenson *et al.*, 1993).

Quanto ao mecanismo de ação da PRL nas células secretoras de insulina está bem estabelecido que ela age através ativação da via JAK/STAT5 (Yamauchi *et al.*, 1998). Como já assinalado anteriormente, foi demonstrado, em várias linhagens de células, que a PRL é capaz de estimular a fosforilação do IRS-1, -2 e -3 e induzir a associação dessas proteínas fosforiladas com a PI3-cinase via JAK-2, sugerindo possível participação dessa via de sinalização da PRL para obtenção de seus efeitos biológicos finais. Recentemente, experimentos conduzidos em nosso laboratório, demonstraram que a PRL pode estimular as vias de sinalização IRSs/PI3-cinase e SHC/GRAB2/MAP-cinase em ilhotas isoladas de ratos neonatos (Amaral *et al.*, 2003). Estas observações confirmam a existência de um *cross talk* entre os sinais da PRL e da insulina favorecendo a manutenção de uma massa adequada e da funcionalidade das ilhotas (células β) em

diferentes situações fisiológicas. Através da fosforilação da BAD, enzima presente na membrana das mitocôndrias e importante para o processo de morte celular, a PRL inibiu apoptose em células insulares de ratos neonatos. Esse efeito foi bloqueado por wortmanina, inibidor da via da PI3-cinase, indicando a participação desta via no efeito da PRL sobre a apoptose (dados ainda não publicados).

1.3 - Maquinaria de Exocitose

Entre as inúmeras ações da PRL nas células β pancreáticas, certamente, a extrusão aumentada dos grânulos de insulina é uma das mais importantes para compensar a maior demanda de insulina durante a prenhez. O controle da fusão de membranas é essencial para o perfeito funcionamento das células. Este controle apresenta inúmeras características conservadas entre as células eucarióticas, entre elas a necessidade de energia e a presença de várias proteínas. Entre estas se destacam os fatores sensíveis à N-etilmaleimida (NSF), as proteínas solúveis ligantes a NSF (SNAP), os receptores de SNAP (SNARE) e as GTPases da família Rab (Otto *et al.*, 1997; Ungermann *et al.*, 1998; Hay & Scheller, 1997).

A família SNARE é conhecida pela presença de um domínio comum de aproximadamente 60 resíduos de aminoácidos (Sutton *et al.*, 1998). Ela ainda pode ser dividida em duas subfamílias as v-SNARE, composta por proteínas localizadas nas membranas das vesículas de secreção, como a proteína associada a membrana vesicular (VAMP), também chamada de sinaptobrevina e, as t-SNAREs, situadas na membrana plasmática alvo, sendo as principais a Sintaxina e a SNAP-25 (proteína sinaptossomal associada de 25 kDa). Foi demonstrado que as proteínas SNARE têm a propriedade de se agruparem formando um complexo heterotrimérico estável composto por 4 hélices paralelas ligando as vesículas a membrana plasmática (Sollner *et al.*,

1993; Fasshauer *et al.*, 1997; Sutton *et al.*, 1998). Desta forma, acredita-se que o complexo SNARE teria a função de aproximar as membranas gerando a reorganização dos fosfolípidios e conseqüente fusão (Rothman, 1994). A presença de algumas proteínas SNARE, como a syntaxina 1 e a SNAP-25 em ilhotas (Nagamatsu *et al.*, 1999) e em linhagens de células (β HC-9) secretoras de insulina (Daniel *et al.*, 1999) foram confirmadas. Constatou-se que tais proteínas exercem função importante na secreção de insulina (Martin *et al.*, 1995; Sadoul *et al.*, 1995).

A syntaxina 1 possui uma região C-terminal transmembrana, um domínio SNARE central e uma porção N-terminal longa, dita domínio Habc (Fernandez *et al.*, 1998). Esta região pode assumir duas conformações diferentes; aberta ou fechada. Quando em presença de SNAP-25 ou VAMP esta região permanece aberta favorecendo a formação do complexo SNARE (Rothman 1994). Foi observado que uma proteína da família SM, a Munc-18-1, se liga ao domínio Habc (Hata *et al.*, 1993) quando fechado evitando a interação da syntaxina com as outras SNARE (Pevsner *et al.*, 1994) e, por esta razão, este tem sido considerado um ponto de regulação na formação do complexo SNARE. Existem diversas isoformas de syntaxina além de duas variantes da syntaxina 1 conhecidas como 1A e 1B. Nagamatsu e colaboradores (1996) demonstraram que apenas a isoforma 1A é expressa em ilhotas de camundongos.

A SNAP-25 é uma t-SNARE presente em várias células neuroendócrinas possuindo em sua estrutura dois domínios SNARE separados por uma região central rica em resíduos cisteínas. Esta região é importante para sua fixação na membrana, pois diferente de outras t-SNARE ela não possui uma porção transmembrana (Oyler *et al.*, 1989). Vários trabalhos têm identificado a SNAP-25 como sendo uma proteína importante na secreção da insulina por ilhotas e linhagens de células β . As toxinas do botulismo (BoNT/A) e (BoNT/E), que clivam a SNAP-25 em sítios específicos (Niemann *et al.*, 1994), inibiram a secreção de insulina dependente de cálcio em

ilhas de rato e células HIT (Sadoul *et al.*, 1995). Além disso, a SNAP-25 pode ligar-se ao canal de potássio K_{DR} e alterar sua atividade (Ji *et al.*, 2002) e desta forma, controlar a secreção vesicular por duas vias distintas, a formação do complexo SNARE e a atuação direta sobre o canal de potássio.

VAMP-2 é o componente do complexo SNARE presente na membrana das vesículas secretórias com ampla distribuição nas células neuroendócrinas. VAMP-2 é composta por apenas 120 resíduos de aminoácidos, divididos em uma região C-terminal transmembrana, um domínio SNARE central e uma porção N-terminal (Trimble *et al.*, 1988). Sua importância na secreção de insulina, dependente de cálcio, já foi evidenciada por Wheeler e colaboradores (1996) em que o tratamento de células HIT com a toxina TeTx-LC, que cliva molécula da VAMP-2 inibindo sua função, reduziu, drasticamente, a secreção da insulina.

Em diversas células neuroendócrinas, o estímulo final para a secreção de seu conteúdo vesicular é o influxo de Ca^{2+} . Evidências obtidas *in vitro*, em células neuronais indicam a participação do Ca^{2+} como estímulo para a formação do complexo SNARE (Neher, 1998). Contudo, não existem receptores para o Ca^{2+} nas proteínas que compõe o complexo SNARE então, seria necessária a presença de um sensor de Ca^{2+} para o processamento da reação. Possíveis sensores de Ca^{2+} tem sido estudados e, entre eles, destaca-se a sinaptotagmina, uma proteína integral de membrana, amplamente distribuída nos tecidos neuroendócrinos (Brose, *et al.*, 1992), incluindo as ilhotas pancreáticas (Gao *et al.*, 2000). Estas proteínas possuem dois domínios repetidos importantes para suas funções, chamados C_2 . Estes apresentam grande homologia com domínios ligantes ao Ca^{2+} identificados, primeiramente, na proteína cinase C (Perin, *et al.*, 1990) e em várias outras enzimas como a fosfolipase A e fosfolipase C (Clark *et al.*, 1991). Demonstrou-se, em linhagens de células INS-1E e HIT-T15, que a ligação do Ca^{2+} com o domínio C_2 da sinaptotagmina é essencial para a exocitose da insulina (Lang *et al.*, 1997).

Sinaptotagmina pode se ligar a syntaxina em presença de alta concentração Ca^{2+} livre (Li *et al.*, 1995). Desta forma, tem sido proposto que a ligação do Ca^{2+} com a sinaptotagmina provocaria sua interação com a syntaxina induzindo e/ou acelerando a formação do complexo SNARE levando, finalmente, a fusão de membrana e conseqüente extrusão das vesículas.

Pesquisas recentes tem indicado que o próprio canal de Ca^{2+} pode exercer esta função. Tanto o canal $\text{Ca}_v1.2$ (tipo Lc) quanto o $\text{Ca}_v2.3$ (tipo N) podem se ligar a syntaxina 1A, SNAP-25 e sinaptotagmina (Wiser *et al.*, 1999; Tobi *et al.*, 1998). Assim, a ligação do cálcio ao canal induziria alteração conformacional no complexo SNARE- $\text{Ca}_v1.2$ promovendo a liberação dos grânulos ancorados (Wiser *et al.*, 2002).

II - OBJETIVOS

2 - OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo analisar o efeito da prolactina sobre a expressão gênica e protéica de elementos envolvidos na extrusão dos grânulos de insulina em ilhotas pancreáticas de ratos neonatos e adultos.

2.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a expressão gênica e protéica das sinaptotagminas 1 e 4, syntaxina 1A, SNAP-25 e VAMP-2 em ilhotas de ratas prenhes e de neonatos submetidas a cultura com prolactina.
- Analisar se a inibição das vias da PI3-cinase ou da MAP-cinase alteram a expressão dos genes da sinaptotagminas 4, syntaxina 1A, SNAP-25, VAMP-2.
- Analisar a localização celular da sinaptotagmina 4 e da syntaxina 1A em ilhotas de neonatos submetidas a cultura com prolactina e ilhotas de ratas adultas.

III – MATERIAL E MÉTODOS

3 - MATERIAL E METODOS

3.1 - Animais

NEONATOS: foram utilizados ratos Wistar neonatos de ambos os sexos, com até 48 h de vida provenientes do biotério central da UNICAMP. Os animais recém nascidos foram sacrificados imediatamente para retirada do pâncreas.

FÊMEAS: foram utilizadas ratas de 90 a 120 dias de idade provenientes do biotério central da UNICAMP. As ratas foram divididas em grupos de 3 ou 4 por gaiola e colocadas para reprodução. O macho permaneceu na gaiola por 2 dias. No 18º dia, as ratas foram sacrificadas para a retirada do pâncreas. As fêmeas não prenhes foram utilizadas como controle.

3.2 - Separação das ilhotas de ratas prenhes e controles pelo gradiente descontínuo de ficoll

O isolamento das ilhotas foi feito pela técnica da digestão do pâncreas com colagenase tipo 5. O material digerido foi passado em peneira, com malha de $240 \mu\text{m}^2$, para a retenção e descarte de possíveis ductos pancreáticos ou fragmentos maiores, não digeridos. O material filtrado, oriundo de 8 fêmeas prenhes e 8 controles, foi transferido para 4 tubos cônicos de 50 ml em quantidades iguais, sendo 2 tubos com ilhotas de ratas prenhes e 2 tubos ilhotas de ratas controles e centrifugados por 1 min a 186 g (Centrifuges SORVALL RT 7). Retirado o sobrenadante, acrescentou-se solução de ficoll dializado (Amershan Biosciences) a 27%, seguida de agitação para homogeneização do material. Sobre a solução de 27% acrescentou-se a solução de ficoll 21,6% e sobre esta a solução de ficoll 10,8%, lentamente, para a formação das diferentes fases. A seguir os tubos foram centrifugados a 746 g por 10 min. Após a centrifugação, com auxílio de pipeta Pasteur, o material localizado entre as camadas 21,6% e 10,8% foi transferido para 2 novos tubos cônicos e lavados por 3 vezes com solução de Hanks para a remoção do ficoll.

As ilhotas livres de material exócrino foram transferidas para placas de Petri de fundo preto e distribuídas em eppendorffs com auxílio de uma pipeta Pasteur.

3.3 - Cultura de ilhotas pancreáticas de neonatos

Todo o material utilizado para cultura de ilhotas foi submetido a esterilização em autoclave por 20 min a 120 °C. Para cada experimento foram utilizados aproximadamente 40-60 neonatos. Após decapitação e assepsia da região abdominal, os animais foram colocados em placas de Petri de vidro e levados ao fluxo laminar (VECO, HLFS-12) para a retirada dos pâncreas. Durante a cirurgia todos os pâncreas foram mantidos em solução de Hanks. A seguir, foram reduzidos a fragmentos pequenos, com auxílio de tesoura, e lavados com solução Hanks. O tecido fragmentado foi transferido para um tubo de ensaio de 15 ml. Para facilitar a separação das ilhotas das células acinares, foi realizado um tratamento com colagenase. Após a adição de 0,2 mg da colagenase/pâncreas em 4 ml de solução de Hanks, o tubo de ensaio foi agitado durante 5 min, em banho-maria a 37°C. Em seguida, o material foi lavado 3 vezes com solução de Hanks, para eliminação da colagenase bem como possíveis contaminações adquiridas durante o procedimento cirúrgico. Cada lavagem foi seguida de centrifugação e descarte do sobrenadante. Uma quarta lavagem foi realizada com meio de cultura RPMI 1640 (Sigma). O tecido pancreático, parcialmente digerido, foi transferido para placas de cultura (Falcon 3003 – 100 x 120 mm), contendo 10 ml de meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 0,5% de uma mistura dos antibióticos penicilina (100 IU/ml), streptomina (100 µg/ml) e 10 mM de glicose. As placas foram mantidas em incubadora (CO-24, New Brunswick Scientific Co., Inc., New Jersey, USA) a 37°C, em atmosfera umidificada a 5% de CO₂ por 5 dias. Quando necessário, adicionou-se ao meio 0,1 µg/ml de PRL, 0,1 µg/ml de wortmanina e 30 µM de

PD098059. Foi adicionada ao meio de cultura das ilhotas não tratadas quantidade de DMSO semelhante à utilizada nas tratadas com wortmanina e PD098059. Após cultura, as ilhotas pancreáticas foram ressuspensas por aspirações com auxílio de uma pipeta Pasteur e distribuídas em eppendorfs.

3.4 - Secreção de insulina

Grupos de 5 e 10 ilhotas isoladas de ratas adultas e de neonatos, respectivamente, foram pré-incubados em solução de Krebs-bicarbonato por 45 min a 37 °C e pH 7.4. A seguir, o meio de pré-incubação foi descartado e as ilhotas incubadas por período suplementar de 1 h também em Krebs-bicarbonato o qual continha diferentes concentrações de glicose. Após incubação, uma alíquota do sobrenadante foi estocada a -20 °C para dosagem de insulina.

3.5 - Dosagem de insulina

A insulina contida nos meios de incubação foi avaliada por radioimunoensaio e a curva padrão confeccionada com insulina de rato.

3.6 - Extração do mRNA

RNA total foi extraído de grupos contendo 300-500 ilhotas por meio de adição de 1 ml de reagente Trizol (GIBCO BRL - Life Technologies). As ilhotas foram homogeneizadas em vortex e incubadas por 5 min à temperatura ambiente. Em seguida, 200 µl de clorofórmio foram adicionados e as amostras vigorosamente homogeneizadas em vortex por 15 sec. Após incubação de 3 min, à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 15 min a 4 °C.

O volume correspondente à fase aquosa foi transferido para outro tubo e o RNA precipitado pela adição de 500 µl de álcool isopropílico, seguido de incubação por 10 min, à temperatura ambiente. Nova centrifugação a 12.000 g por 15 min a 4 °C foi realizada. O pellet obtido foi lavado em seguida com 1ml de etanol 75%, centrifugado a 7500 g por 10 min a 4 °C e, posteriormente, lavado com 1 ml de etanol 100%. O etanol foi descartado e o pellet parcialmente seco em estufa a 37 °C. As amostras foram ressuspensas em 30 µl de água previamente tratada com DEPC.

A integridade do RNA foi verificada em gel de agarose desnaturante para visualização das unidades ribossomais 28S e 18S após coloração com brometo de etídeo, e a quantificação do mesmo foi feita por leituras de absorbâncias a 260 e 280 nm em aparelho Genequant (Pharmacia Biotech).

3.7 - Obtenção de cDNA a partir de RNA total

A reação da transcriptase reversa foi realizada a 42 °C durante 50 min, em 20 µl de uma mistura contendo 2,0 µg de RNA total, 10 mM de dNTP mix, 40 U/µl de inibidor de RNase, 0,1 M de DTT, 5X first-strand buffer, 0,5 µg/ml de oligo dT e 200 U da enzima Super Script II RNase H⁻ Reverse Transcriptase (GIBCO BRL – Life Technologies).

3.8 - PCR

O cDNA resultante foi amplificado com os "primers" listados na tabela 1. A PCR será realizada em 25 µL de uma mistura contendo tampão da Taq polimerase, 50 mM de MgCl₂, 10 mM de cada deoxinucleosídeo trifosfato, 2,5U/µL de Taq DNA polimerase, 10 pmol de cada "primer", e cDNA. O número de ciclos de amplificação e a temperatura de anelamento utilizadas foram

padronizados para cada “primer”. Alíquotas de 10µL do produto da PCR serão analisados por eletroforese em gel de agarose 1,8% preparado em tampão TBE. Após coloração com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) o gel será visualizado e fotografado sob luz UV (*Gel Doc EQ* - BioRad), e a quantificação das bandas em programa Quantity One (BioRad), para análise estatística.

Tabela 1. Seqüência dos "primers" utilizados na PCR.

Nome	Direto (d) ou Reverso (r)	Seqüência (5` a 3`)	Registro GeneBank
Sinaptotagmina 1	d	ACTGAGCCAGCCAGTCCTGG	AJ617615
	r	ATGTCGTGCTTGGAGAAGCG	
Sinaptotagmina 4	d	GCATCTTCAGTGCTTTTGGC	NM031693
	r	TCTCCAATGACATCATCTCT	
SNAP-25	d	GAATTCAATGGCCGAGGACGCAGA	NM030991
	r	ACTTAACCACTTCCCAGCATCTTTGT	
Sintaxina 1A	d	ATGAAGGACCGAACCCAGGAGC	NM053788
	r	TCTATCCAAAGATGCCCCCGA	
VAMP-2	d	GAATTCAATGTCGGCTACCGCTG	NM012663
	r	GTCGACTTAAGTGCTGAAGTAAACGA	
Insulina	d	ATTGTTCCAACATGGCCCTGT	NM019129
	r	TTGCAGTAGTTCTCCAGTT	
B-actina	d	TGAGCGCAAGTACTCTGTGTGG	NM031144
	r	TTTGGGAGGGTGAGGGACTTC	

A PCR foi realizada em 25 µl de uma mistura contendo tampão da Taq polimerase, 50 mM de MgCl₂, 10 mM de cada deoxinucleosídeo trifosfato, 2,5 U/µl de Taq DNA polimerase, 10 pmol de "primer" direto, 10 pmol de "primer" reverso, e cDNA. Alíquotas de 5 µl do produto da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,0 % preparado em tampão TBE.

3.9 - Identificação e quantificação protéica por “imunoblotting”.

As proteínas estudadas neste projeto foram avaliadas pela técnica de “Western blot”. As ilhotas foram homogeneizadas por sonicação com 6 pulsos de 5 sec com 5 sec de intervalo entre

os pulsos (VirSoni 60). Os extratos foram centrifugados a 15.000 g a 4 °C por 45 min para remoção do material insolúvel. As amostras foram tratadas com tampão Laemmli contendo DDT 10 mM, aquecidas em água fervente por 5 min. Aliquotas com concentrações protéicas semelhantes foram aplicadas no SDS-PAGE (10% Tris acrilamida) em aparelho minigel (Miniprotean) em paralelo com marcadores de pesos moleculares conhecidos. Após corrida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose. Esta foi incubada por 2 h em solução bloqueadora para diminuir a ligação inespecífica das proteínas. A seguir as membranas foram incubadas com anticorpo policlonal anti-Sinaptotagmina 4 ou anti-Sinaptotagmina 1 ou anti-Syntaxina 1A na diluição 2 µg/ml (Santa Cruz), por 4 hs. Após, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com HRP (Sigma) por 2 hs. Após lavagem, as membranas foram incubadas em solução reveladora Super Signal (Pierce) e colocadas junto a filmes radiográficos (Kodak) para auto-radiografia. A intensidade das bandas foi avaliada por densitometria pelo programa Scion Image (Scion Corporation).

3.10 - Imunohistoquímica

Ilhotas isoladas de neonatos submetidas à cultura por 5 dias, com ou sem 0,1 µg/ml de PRL, foram fixadas em solução PBS contendo sacarose 10 % e paraformaldeído 2 %, por 30 min à temperatura ambiente. Após fixação, as ilhotas foram incluídas em solução PBS com concentrações crescentes de gelatina (5, 10 e 25 %) por 2 h em cada concentração à 37 °C. O bloco formado foi envolto em “Tissue Freezing Médium” e congelado em N-hexano resfriado por nitrogênio líquido. Pâncreas de ratas controles e prenhes foram lavados em solução PBS, envoltos em “Tissue Freezing Médium” e congelados em N-hexano resfriado por nitrogênio

líquido. Cortes de 6 μm de espessura foram bloqueados em solução PBS com 5 % de leite por 2 h a temperatura ambiente e posteriormente, incubados por 12 h em solução PBS com 1 % de leite e 5 $\mu\text{g/ml}$ de anticorpo anti-sinaptotagmina 4 ou syntaxina 1A (Santa Cruz) a 4 °C. A seguir, os cortes foram incubados por 2 h a temperatura ambiente com anticorpo secundário conjugado com FITC (Sigma). Nas reações de dupla marcação, as amostras foram expostas por 2 h a temperatura ambiente a anticorpo anti-insulina (Zymed) e posteriormente incubadas com anticorpo secundário conjugado com TRITC e , finalmente, visualizados em microscópio confocal.

3.11 - Análise Estatística

Para os ensaios de RIE e PCR de neonatos foi utilizado ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. Para os ensaios da PCR de ratas adultas foi utilizado o teste t de Student e para os ensaios de “Western Blot” foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. As análises foram feitas utilizando-se o programa BioEstat (versão 2.0). Em todos os casos, o nível de significância adotado foi de $p < 0.05$.

IV - RESULTADOS

4 – RESULTADOS

4.1 – Secreção Estática de Insulina

A figura 1 mostra a secreção de insulina por ilhotas isoladas de ratos neonatos mantidas em cultura com ou sem prolactina (0,1 µg/ml), incubadas por 1 h em meio contendo 2.8 mM ou 22 mM de glicose. Os valores de secreção, registrados respectivamente para as concentrações de 2.8, e 22 mM de glicose, foram 0.49 ± 0.04 e 3.34 ± 0.41 nos controles e 0.59 ± 0.08 e 5.8 ± 0.82 ng/ml nos tratados, por ilhota (n = 6 para todas as condições experimentais). Somente sob 22 mM de glicose foi observado aumento significativo (p = 0.026) da secreção de insulina induzido pela prolactina.

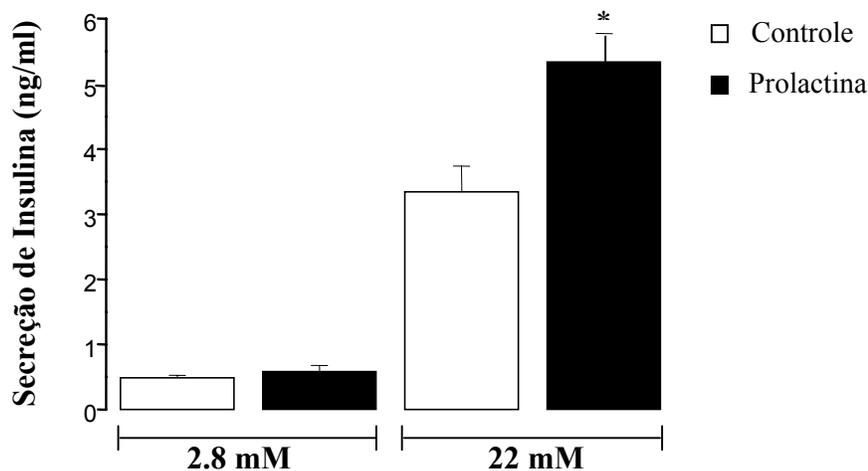


Figura 1. Insulina secretada por ilhotas isoladas de neonatos incubadas por 1 h na presença de 2.8 e 22 mM de glicose. Dados mostram médias \pm EPM, n = 6. * p < 0.05.

Analisamos também a secreção de insulina por ilhotas de ratas adultas controles e prenhes. Houve aumento significativo na secreção de insulina em ilhotas de ratas prenhes, tanto em 2.8 mM quanto em 16 mM de glicose comparado às ilhotas controles (fig 2).

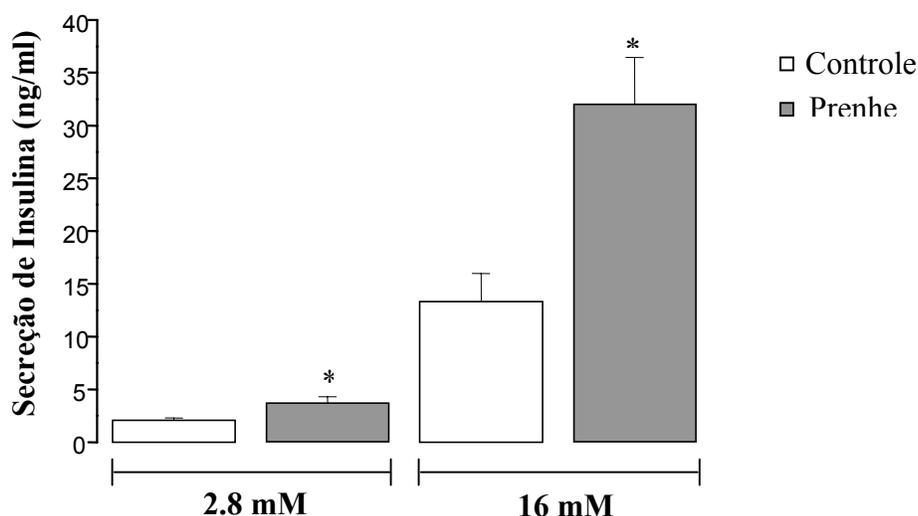


Figura 2. Insulina secretada por ilhotas isoladas de ratas controles e prenhes por 1 h na presença de 2.8 e 16 mM de glicose. Dados mostram médias \pm EPM, n = 6. * p < 0.05.

4.2 – Expressão Gênica em Ilhotas de Ratas Prenhes

Para análise da expressão gênica foi necessário determinar o número de ciclos de amplificação utilizados para cada um deles na PCR. Para isto, foram feitas PCRs com número de ciclos variado, obtendo-se uma curva sigmóide. O ponto anterior ao platô da curva obtida foi utilizado como ciclo para as reações. Estes dados encontram-se na tabela 1. Foi utilizado como controle interno o gene da proteína de citoesqueleto β -actina, pois não foram detectadas diferenças significativas na expressão gênica da mesma tanto em ilhotas de neonatos em presença

de prolactina por 5 dias quanto em ratas prenhes, comparados aos respectivos controles. Os dados estão expressos como valor de densitometria do gene / valor de densitometria do controle interno.

Tabela 2. Parâmetros utilizados na PCR.

Gene	Nº de ciclos para neonatos	Nº de ciclos para adultas	Temperatura de anelamento	Fragmento obtido (bp)
Insulina	23	23	57 °C	340
Sinaptotagmina 1	36	34	55 °C	640
Sinaptotagmina 4	31	31	55 °C	711
SNAP-25	34	35	63 °C	621
VAMP-2	40	39	62 °C	354
Sintaxina 1A	33	33	55 °C	868
β -actina	23	23	57 °C	498

A expressão dos genes listados na tabela 1 foi avaliada em ilhotas de ratos neonatos tratadas com PRL (0,1 μ g/ml) por 5 dias na presença ou ausência de wortmanina (0,1 μ g/ml), um inibidor específico da PI3-cinase, e PD098059 (30 μ M), um inibidor específico da MAP-cinase. Avaliamos também o efeito da prenhez na expressão das referidas proteínas em ilhotas isoladas de ratas controle e ilhotas de ratas prenhes sacrificadas no décimo oitavo dia após cópula, correspondente ao nível máximo de PRL no plasma.

Foi observado aumento significativo de 69 % na expressão do gene da sinaptotagmina 4 em ilhotas isoladas de ratas prenhes comparado às ilhotas controle. Por outro lado, ilhotas de ratas prenhes e controles apresentaram níveis semelhantes do RNAm da sinaptotagmina 1 (fig 3).

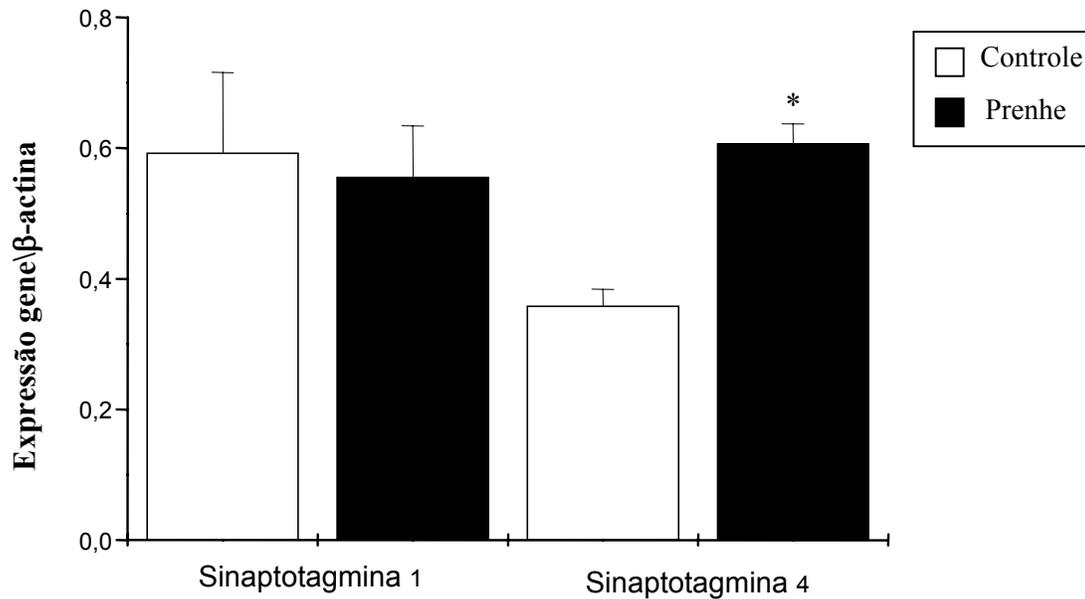


Figura 3. Expressão do gene da Sinaptotagmina 1 e 4 por ilhotas isoladas de ratas adultas controles e prenhes. Dados mostram médias \pm EPM, n = 6. * $p < 0.05$.

Analisamos também a expressão dos genes que codificam os três componentes do complexo SNARE, a syntaxina 1A, a SNAP-25 e a VAMP-2 em ilhotas de ratas adultas e prenhes. Como demonstrado na figura 4, tanto o RNAm da syntaxina 1A, quanto o da SNAP-25 encontraram-se aumentados nas ilhotas de ratas prenhes ($0,89 \pm 0,03$ e $1,18 \pm 0,04$) em relação as controles ($0,7 \pm 0,01$ e $0,63 \pm 0,03$). Ilhotas de ratas controles e de ratas prenhes apresentam níveis semelhantes do RNAm da VAMP-2 ($0,70 \pm 0,03$ e $0,62 \pm 0,05$).

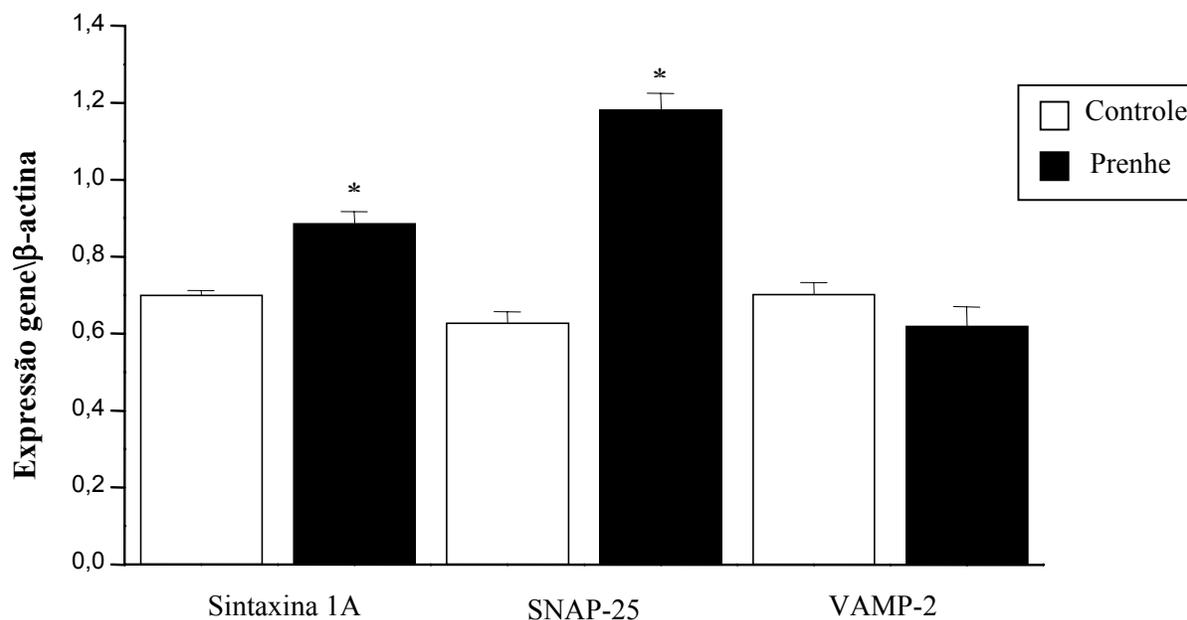


Figura 4. Expressão dos genes da Sintaxina 1A, SNAP-25 e VAMP-2 por ilhotas isoladas de ratas controles e prenhes. Dados mostram médias \pm EPM, n = 7. * p < 0.05.

4.3 – Expressão Gênica em Ilhotas de Ratos Neonatos

Passamos então a estudar o efeito da PRL *in vitro* sobre a expressão dos genes listados na tabela 1 em ilhotas isoladas de ratos neonatos. A figura 5 indica aumento de 72 % na transcrição do gene da insulina nas ilhotas cultivadas com PRL frente às controles. Podemos observar redução na expressão do gene da insulina tanto nas ilhotas tratadas com wortmanina quanto nas tratadas com wortmanina e PRL quando comparadas as ilhotas controle e tratadas com somente PRL, respectivamente. Além disso, a inibição pelo PD098059 da via MAP-cinase reverteu o efeito da PRL sobre a expressão do gene da insulina, não havendo alteração significativa nas tratadas apenas com o PD098059.

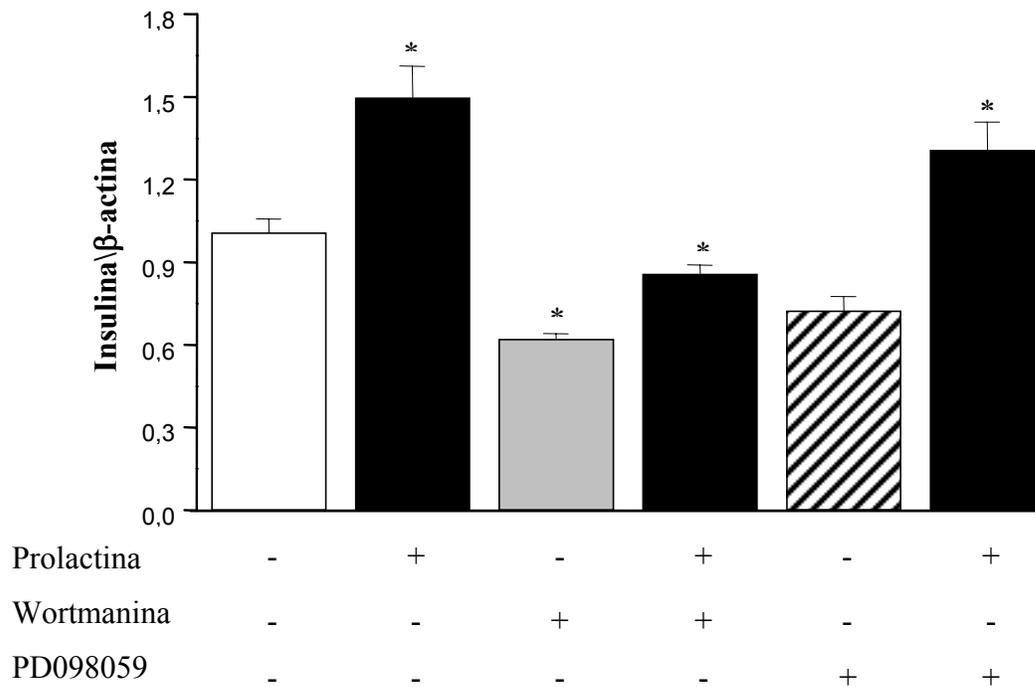


Figura 5. Expressão do gene da insulina por ilhotas isoladas de neonatos incubadas por 5 dias com ou sem 0,1 µg/ml de prolactina e/ou wortmanina 0,1 µg/ml e/ou PD098059 30 µM. Dados mostram médias ± EPM, n = 7. * p < 0.05.

Observou-se aumento significativo de 48% na transcrição do gene da Sintaxina 1A nas ilhotas de neonatos tratados com PRL por 5 dias, não ocorrendo modificações significativas na transcrição deste gene nas ilhotas cultivadas em presença de wortmanina ou PD098059 (fig 6).

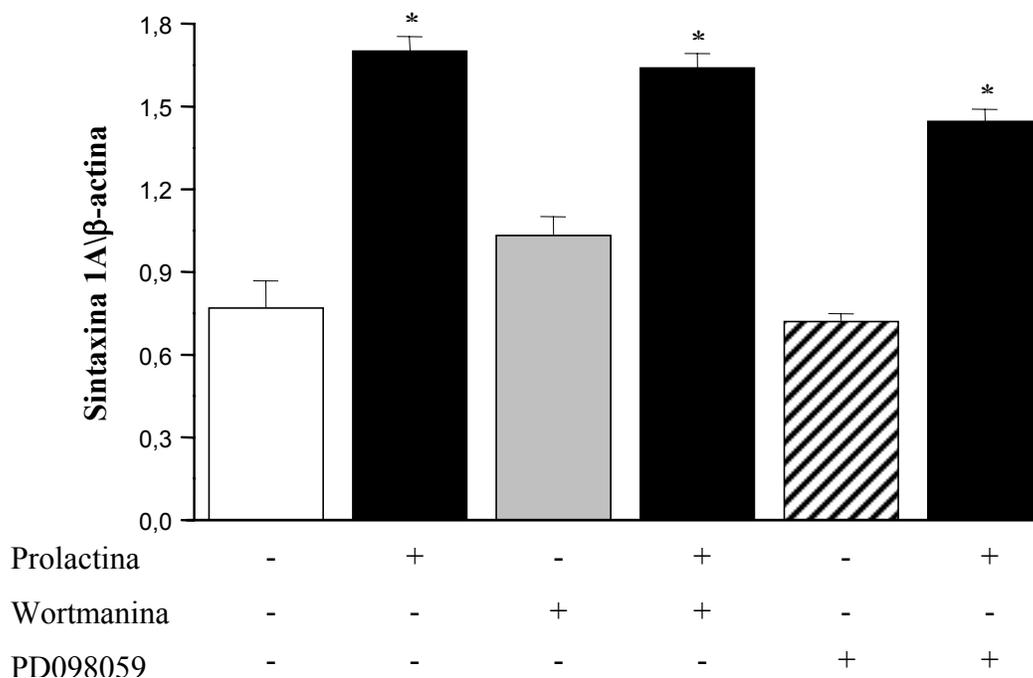


Figura 6. Expressão do gene da Sintaxina 1A por ilhotas isoladas de neonatos incubadas por 5 dias com ou sem 0,1 μ g/ml de prolactina e/ou wortmanina 0,1 μ g/ml e/ou PD098059 30 μ M. Dados mostram médias \pm EPM, n = 6. * p < 0,05.

Resultados semelhantes aos obtidos para o gene da sintaxina 1A foram observados quanto ao gene da VAMP-2. Tratamento com PRL em ilhotas isoladas de neonatos por 5 dias induziu aumento de 100 % na expressão do gene da VAMP-2 em comparação as ilhotas controle. Nenhuma diferença significativa foi observada em ilhotas cultivadas com wortmanina ou PD098059 (fig7).

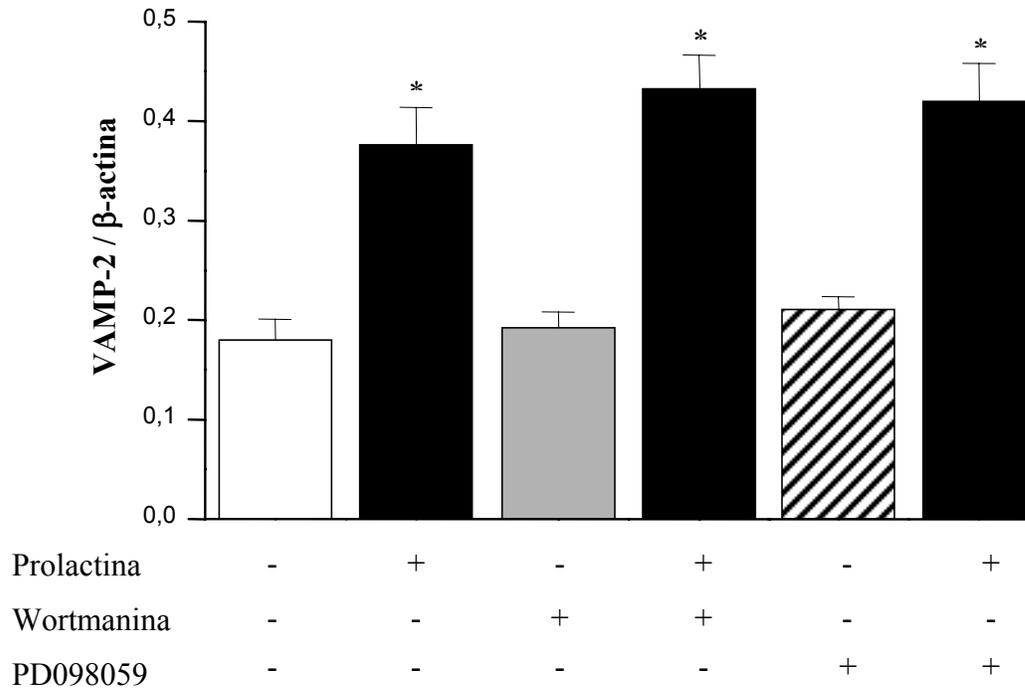


Figura 7. Expressão do gene da VAMP-2 por ilhotas isoladas de neonatos incubadas por 5 dias com ou sem 0,1 μ g/ml de prolactina e/ou wortmanina 0,1 μ g/ml e/ou PD098059 30 μ M. Dados mostram médias \pm EPM, n = 6. * p < 0.05.

Ilhotas de neonatos cultivadas com PRL apresentaram aumento de 77 % na concentração do RNAm da SNAP-25 em relação às ilhotas controle. A adição de wortmanina ou PD098059 ao meio de cultura ao longo de 5 dias não alterou a expressão deste gene (fig 8).

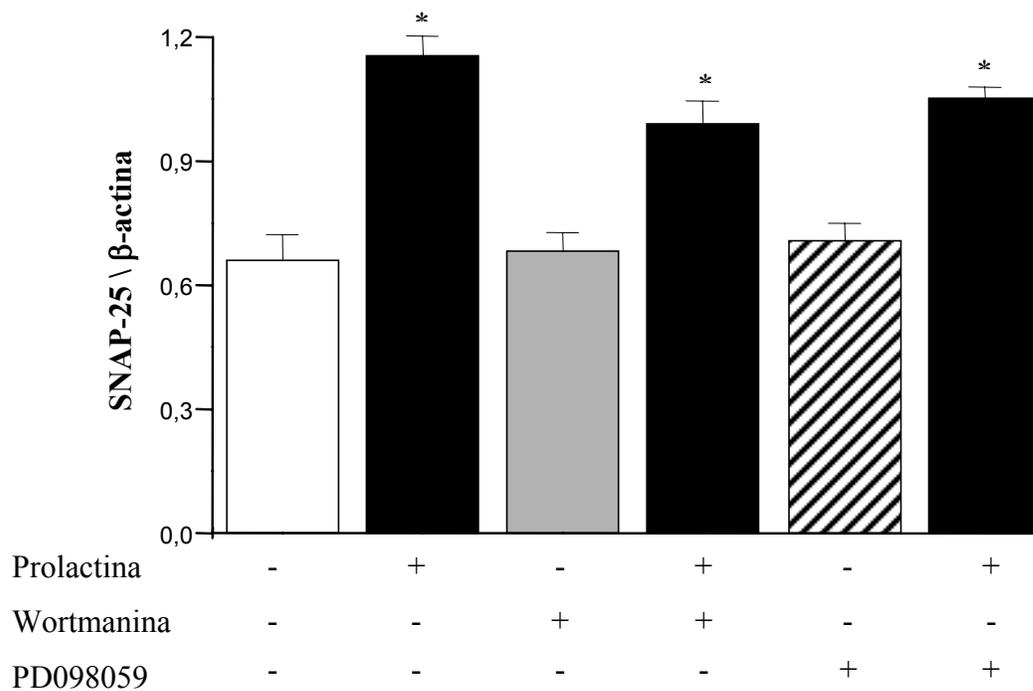


Figura 8. Expressão do gene da SNAP-25 por ilhotas isoladas de neonatos incubadas por 5 dias com ou sem 0,1 µg/ml de prolactina e/ou wortmanina 0,1 µg/ml e/ou PD098059 30 µM. Dados mostram médias ± EPM, n = 6. * p < 0.05.

A PRL induziu aumento de 60 % na transcrição do gene da Sinaptotagmina 4 em ilhotas de neonatos comparado as ilhotas controle. Não foram detectadas diferenças na expressão deste gene nas ilhotas cultivadas com wortmanina ou PD098059 (fig 9).

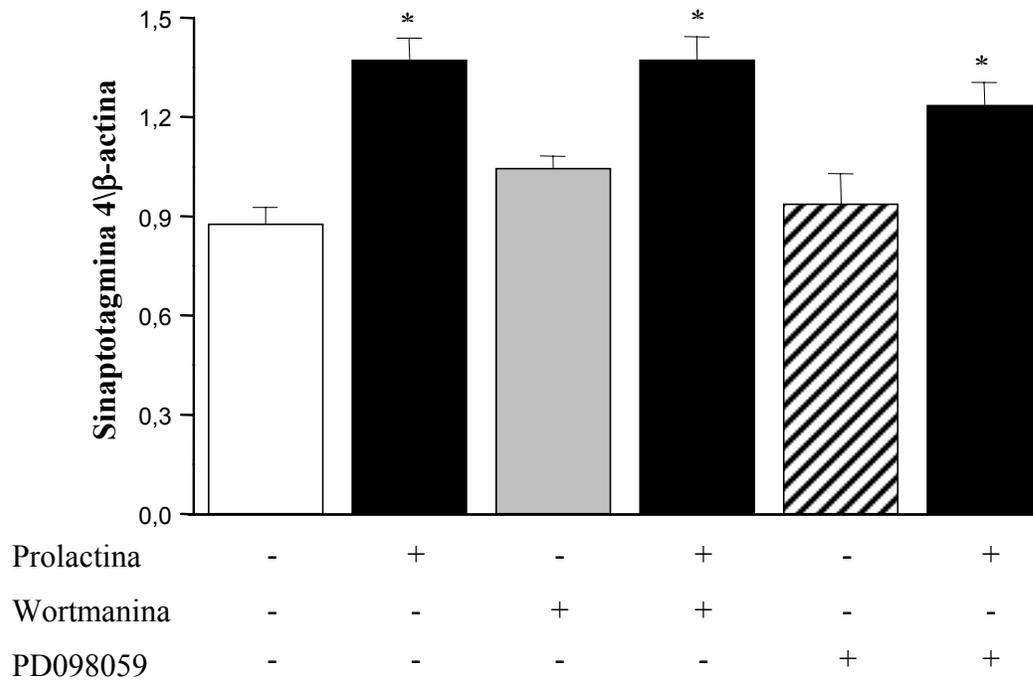


Figura 9. Expressão do gene da Sinaptotagmina 4 por ilhotas isoladas de neonatos incubadas por 5 dias com ou sem 0,1 µg/ml de prolactina e/ou wortmanina 0,1 µg/ml e/ou PD098059 30 µM. Dados mostram médias ± EPM, n = 8. * p < 0.05.

Além disso, analisamos a expressão da sinaptotagmina 1 em ilhotas de neonatos cultivadas com PRL, não sendo observadas diferenças significativas em relação as ilhotas controle (fig 10).

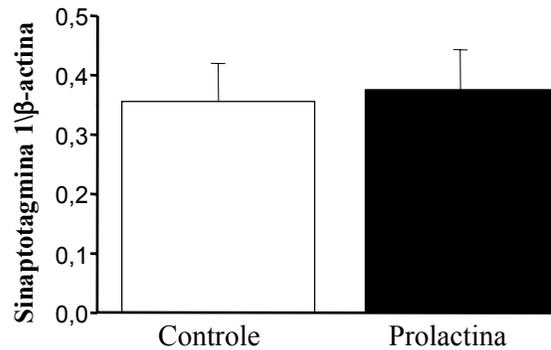


Figura 10. Expressão do gene da Sinaptotagmina 1 por ilhotas isoladas de neonatos incubadas por 5 dias com ou sem 0,1 µg/ml de prolactina. Dados mostram médias \pm EPM, n = 6. * p < 0.05.

4.4 - Expressão Protéica em Ilhotas de Ratos Neonatos e Ilhotas de Ratas Prenhes

A expressão da proteína Sinaptotagmina 4, em ilhotas de neonatos mantidas em cultura por 5 dias na presença de PRL, aumentou 42 % comparado às controles. O aumento de expressão desta proteína nas ratas prenhes em relação as não prenhes atingiu valores semelhantes (40 %), (fig 11).

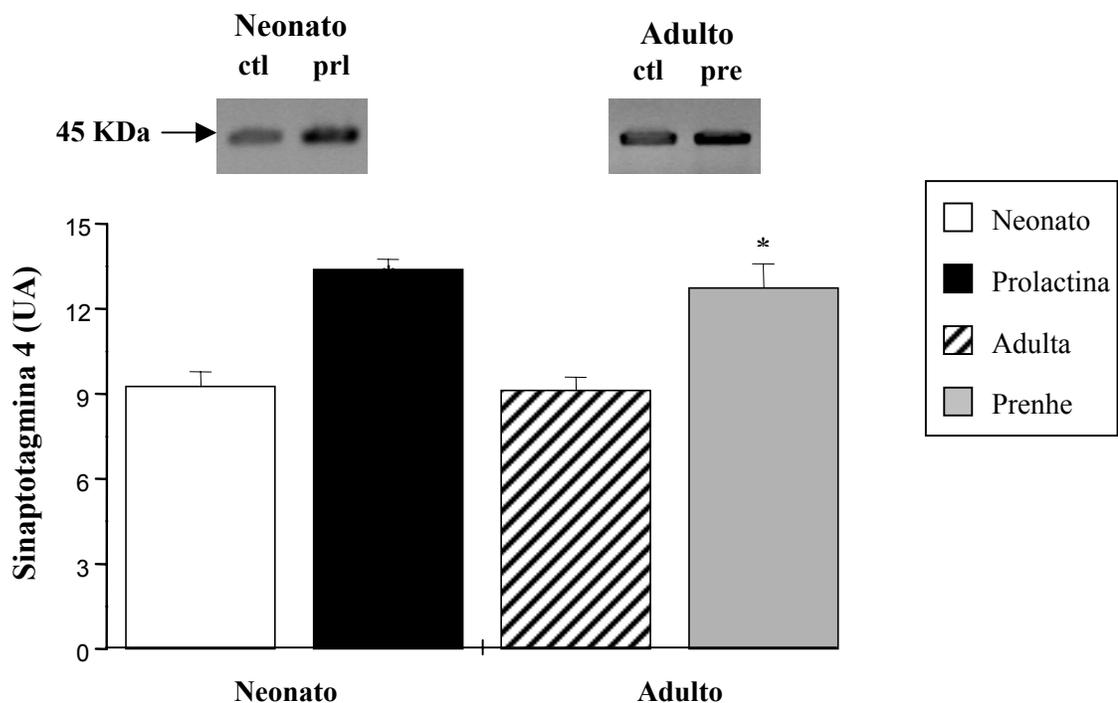


Figura 11. Expressão protéica da Sinaptotagmina 4 por ilhotas isoladas de neonatos incubadas por 5 dias com (prl) ou sem (ctl) 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de PRL e ilhotas de ratas prenhes (pre) ou não (ctl). Dados mostram médias \pm EPM, expressos em unidades arbitrárias (UA), $n = 5$. * $p < 0.05$.

Ilhotas cultivadas com PRL ou ilhotas isoladas de ratas prenhes não apresentaram diferenças significativas na expressão da proteína sinaptotagmina 1 comparadas aos seus controles. Contudo, foi observado um aumento de 86 % em sua expressão em ilhotas controles de ratas adultas comparadas as ilhotas controle de neonatos (fig 12).

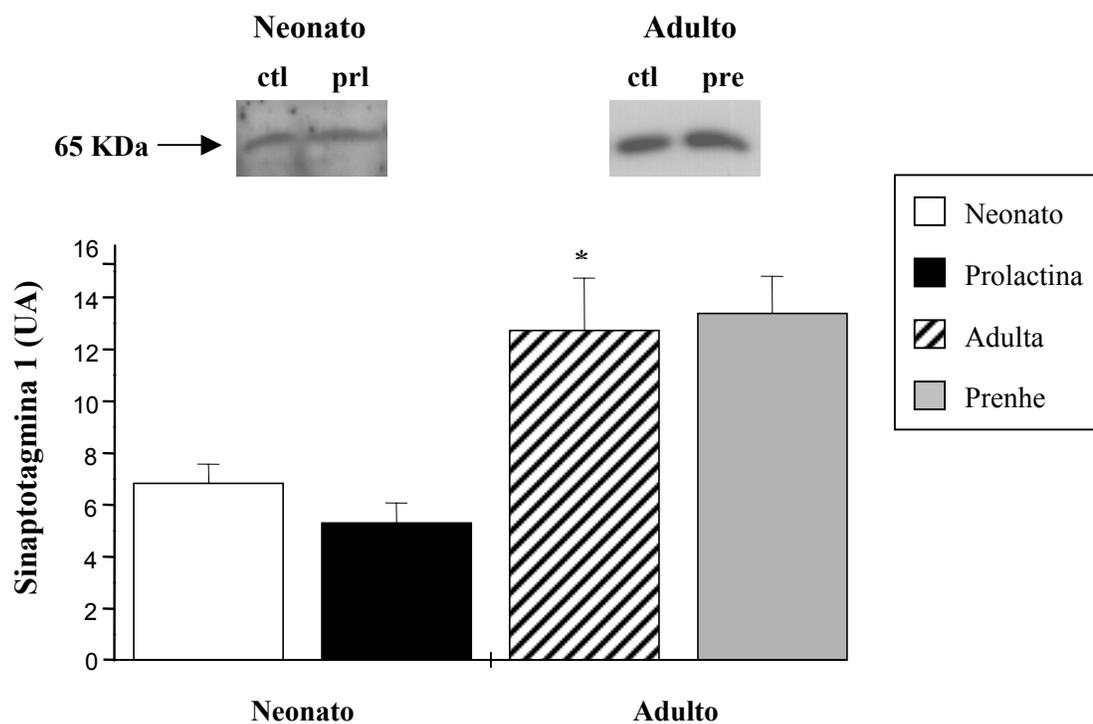


Figura 12. Expressão protéica da Sinaptotagmina 1 por ilhotas isoladas de neonatos incubadas por 5 dias com (PRL) ou sem (CTL) 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de PRL e ilhotas de ratas prenhes (PRE) ou não (CTL). Dados mostram médias \pm EPM, expressos em unidades arbitrárias (UA), $n = 4$. * $p < 0.05$.

Como mostrado na figura 6, houve aumento de 49 % na concentração da Sintaxina 1A nas ilhotas tratadas com PRL comparado às não tratadas e de 51 % nas ilhotas de ratas prenhes em relação às controle (fig 13).

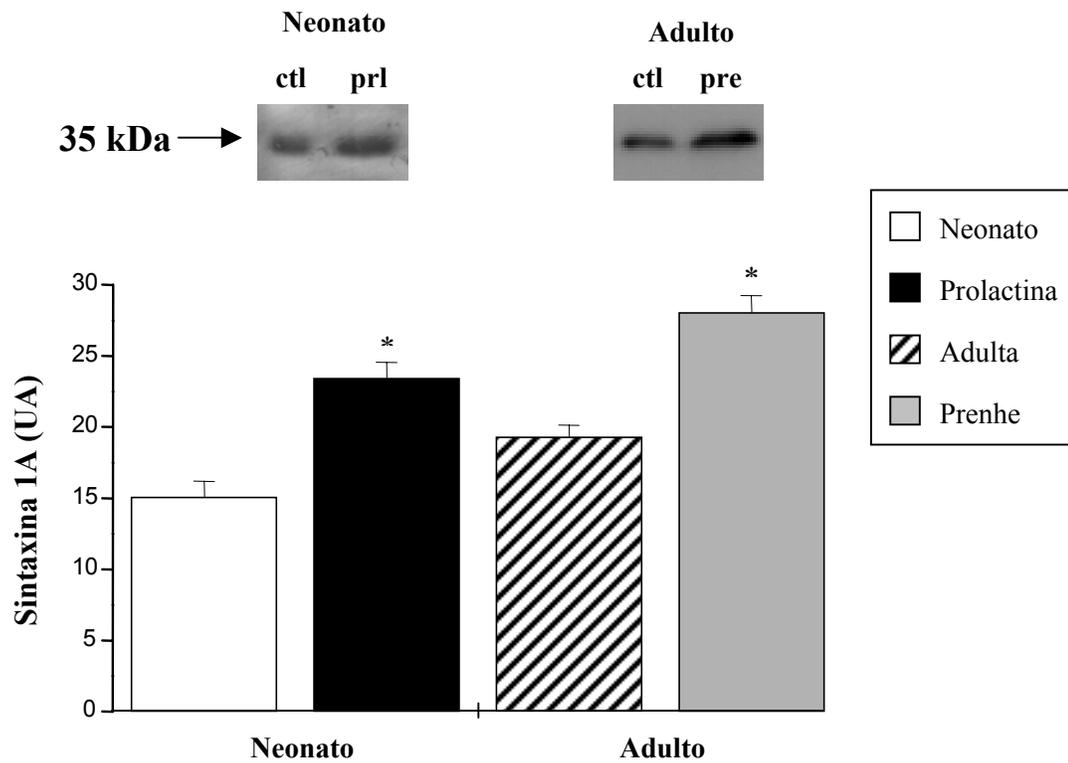


Figura 13. Expressão protéica da Sintaxina 1A por ilhotas isoladas de neonatos incubadas por 5 dias com (PRL) ou sem (CTL) 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de PRL e ilhotas de ratas prenhes (PRE) ou não (CTL). Dados mostram médias \pm EPM, expressos em unidades arbitrárias (UA), $n = 4$. * $p < 0.05$.

Semelhante aos resultados obtidos com a Sinaptotagmina 4, foi observado maior expressão da proteína SNAP-25 tanto nas ilhotas cultivadas com PRL quanto nas de ratas prenhes comparadas aos seus controles, atingindo médias de $13,6 \pm 0,5$ e $10,7 \pm 1,7$ para os controles e $19,5 \pm 1,5$ e $18,1 \pm 3,1$ nas ilhotas tratadas com PRL e de ratas prenhes, respectivamente (fig 14).

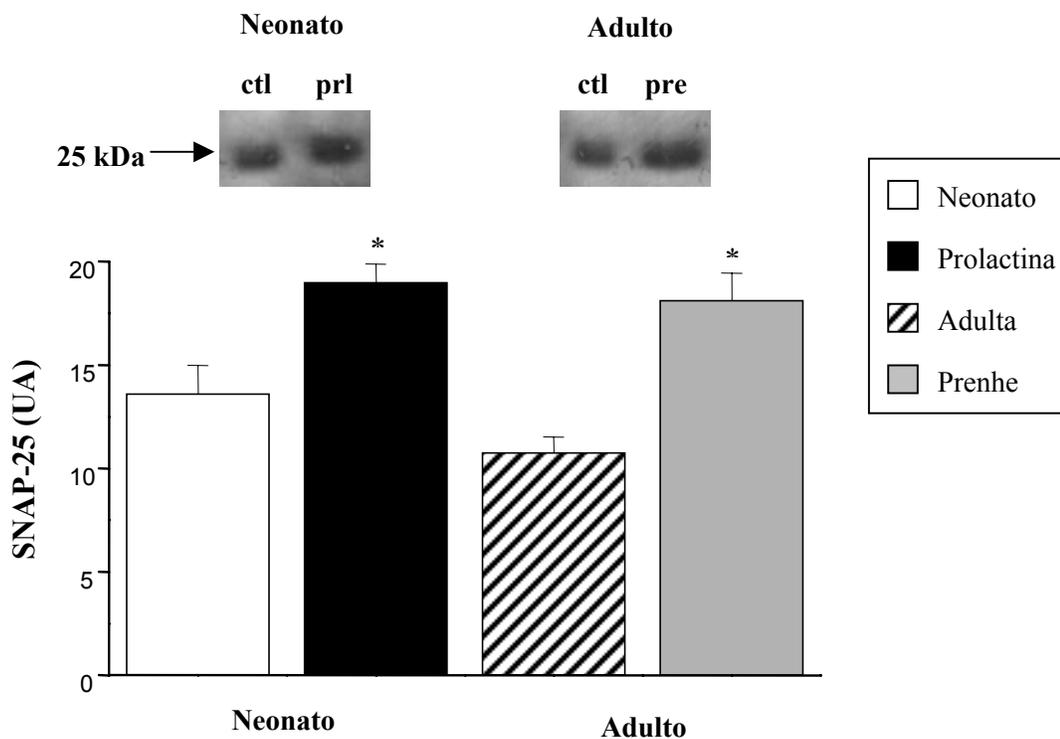


Figura 14. Expressão protéica da SNAP-25 por ilhotas isoladas de neonatos incubadas por 5 dias com (PRL) ou sem (CTL) 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de PRL e ilhotas de ratas prenhes (PRE) ou não (CTL). Dados mostram médias \pm EPM, expressos em unidades arbitrárias (UA), $n = 4$. * $p < 0.05$.

Ilhotas cultivadas com PRL apresentaram aumento de 58 % na expressão da VAMP-2 comparado as ilhotas controle. Por outro lado, foi observado que ilhotas de ratas prenhes e controles tem níveis semelhantes da proteína VAMP-2 (fig 15).

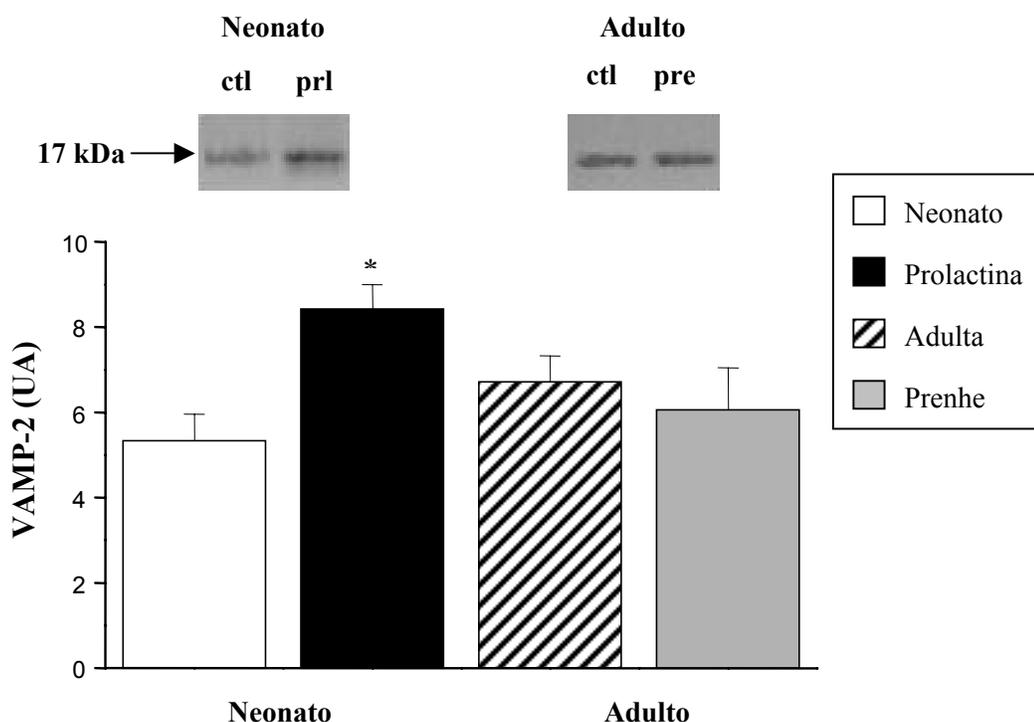


Figura 15. Expressão protéica da VAMP-2 por ilhotas isoladas de neonatos incubadas por 5 dias com (PRL) ou sem (CTL) 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de PRL e ilhotas de ratas prenhes (PRE) ou não (CTL). Dados mostram médias \pm EPM, expressos em unidades arbitrárias (UA), $n = 5$. * $p < 0.05$.

4.5 – Microscopia Confocal de Ilhotas de Ratos Neonatos e Ilhotas de Ratas Prenhes

Como observado na figura 16, a sinaptotagmina 4 está homogeneamente distribuída no citoplasma das células insulares. Além disso, em ilhotas incubadas com anticorpo anti-sinaptotagmina 4 e anti-insulina foi demonstrada a co-localização destas proteínas (fig 16 A, B e C). Nos painéis D e E observamos cortes de ilhotas de neonatos controle e tratadas com PRL, respectivamente.

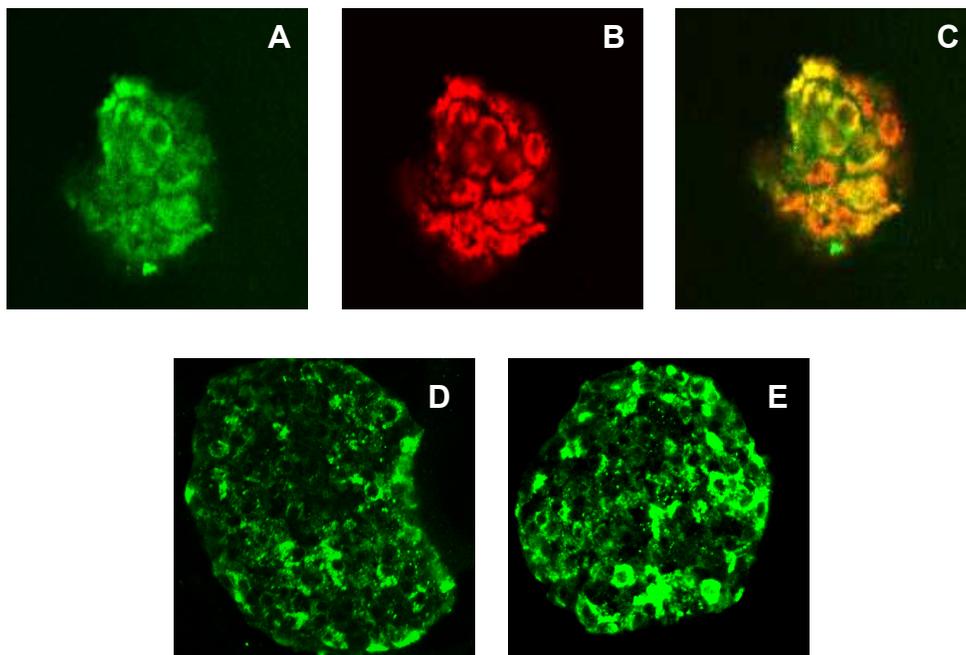


Fig 16. Detecção por imunofluorescência da sinaptotagmina 4 em ilhotas de ratos neonatos mantidos em cultura por 5 dias com ou sem prolactina 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Em A e B ilhota controle incubada com anticorpo anti-sinaptotagmina 4 (verde) e anti-insulina (vermelho), em C sobreposição das imagens A e B. No painel D ilhota controle e em E ilhota tratada com PRL, ambas incubadas com anticorpo anti-sinaptotagmina 4.

Podemos observar na figura 17 painel A que a sinaptotagmina 4 se encontra distribuída no citoplasma das células de forma semelhante àquela observada em ilhotas de neonatos. Demonstramos ainda que sinaptotagmina 4 se co-localiza com a insulina e que sua expressão não é exclusiva de células β (fig 17, painéis B e C). A figura 17, painéis D, E e F mostram cortes de pâncreas de ratos prenhes. Não observamos diferenças quanto a localização da sinaptotagmina 4 em comparação a ilhotas controle.

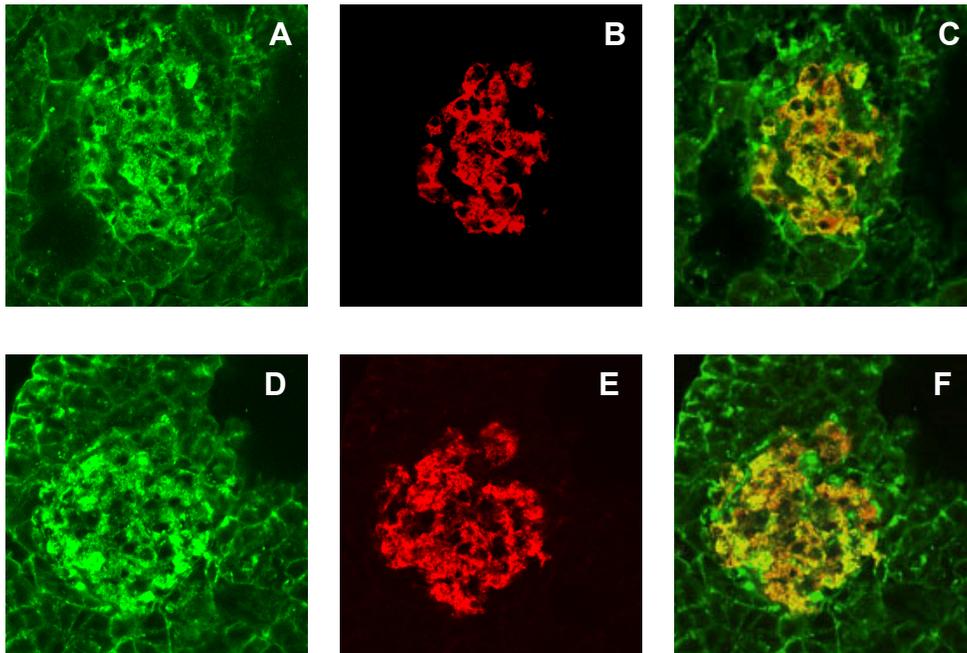


Fig 17. Detecção por imunofluorescência da sinaptotagmina 4 em pâncreas ratos controle e prenhe. Em A e B corte de pâncreas controle incubado com anticorpo anti-sinaptotagmina 4 (verde) e anti-insulina (vermelho), em C sobreposição das imagens A e B. Em D e E corte de pâncreas ratas prenhes incubado com anticorpo anti-sinaptotagmina 4 (verde) e anti-insulina (vermelho), em C sobreposição das imagens A e B

Podemos observar na figura 18 (letras A, B e C) que a syntaxina 1A se localiza na membrana plasmática das células e que sua expressão não é exclusiva de células β . Nos painéis D e E são mostrados cortes de ilhotas controle e cultivadas com PRL por 5 dias (fig 18, letras D e E).

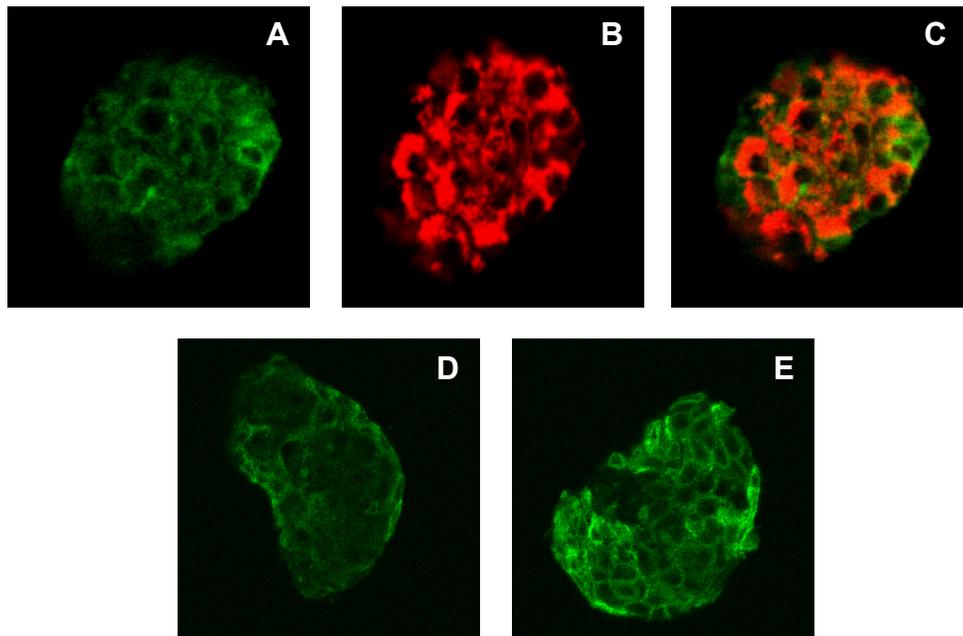


Fig 18. Detecção por imunofluorescência da syntaxina 1A em ilhotas de ratos neonatos mantidos em cultura por 5 dias com ou sem prolactina 100 ng/ml. Em A e B ilhota controle incubada com anticorpo anti-syntaxina 1A (verde) e anti-insulina (vermelho), em C sobreposição das imagens. No painel D ilhota controle e em E ilhota tratada com PRL, ambas incubadas com anticorpo anti-syntaxina 1A.

Finalmente, como visto na figura 19, a syntaxina 1A localiza-se na membrana plasmática de células β e não β . Além disso, observamos células negativas para insulina no interior das ilhotas fortemente marcadas para a syntaxina 1A. Não foram detectadas diferenças quanto à localização da syntaxina 1A em ilhotas controle ou de ratas prenhes.

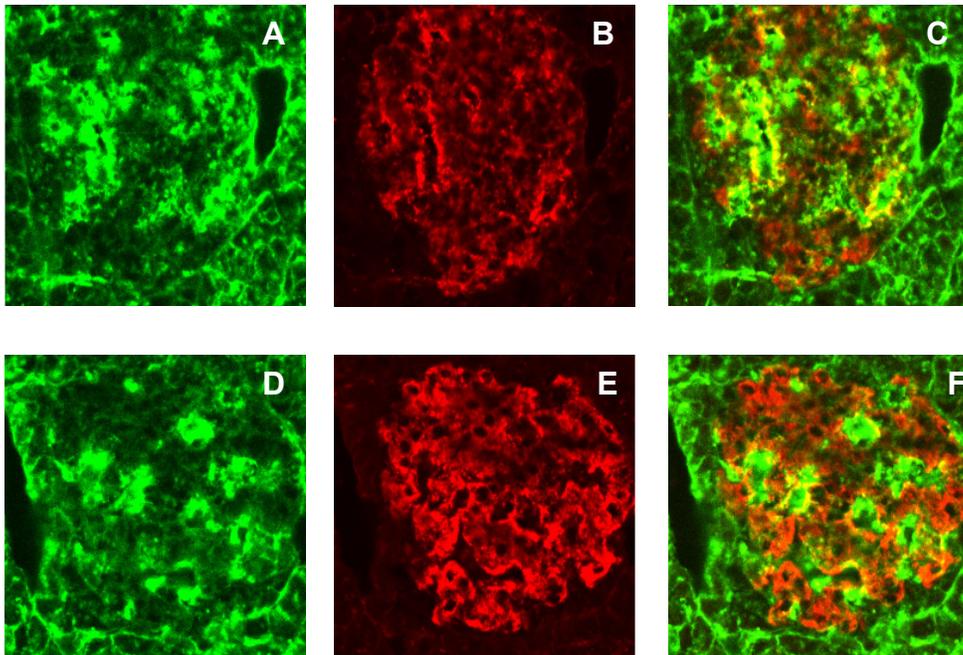


Fig 19. Detecção por imunofluorescência da syntaxina 1A em pâncreas ratas controle e prenhe. Em A e B corte de pâncreas controle incubado com anticorpo anti-syntaxina 1A (verde) e anti-insulina (vermelho), em C sobreposição das imagens A e B. Em D e E corte de pâncreas ratas prenhes incubado com anticorpo anti-syntaxina 1A (verde) e anti-insulina (vermelho), em C sobreposição das imagens A e B

V - DISCUSSÃO

5 - DISCUSSÃO

Diversas teorias têm sido sugeridas para a participação do complexo SNARE e de sensores de cálcio nos processos finais da secreção da insulina. Mesmo na ausência de estímulos para secreção, uma parte das vesículas presente encontra-se ligadas a membrana alvo. Este processo é conhecido como “*docking*” e provavelmente envolve a participação das proteínas SNARE (Daniel *et al.*, 1999). A despolarização da membrana plasmática induz a abertura de canais de cálcio, elevando sua concentração no interior da célula (Wollheim *et al.*, 1981). Pela teoria mais aceita, o cálcio se ligaria a uma sinaptotagmina que induziria uma modificação conformacional no complexo SNARE que, por sua vez, facilitaria a fusão entre a membrana plasmática e a vesicular e conseqüente liberação da insulina. Contudo, são necessários mais estudos para a compreensão geral do processo e quais fatores podem modificá-lo. Assim, o presente trabalho foi o primeiro a fornecer dados sobre o controle da PRL nos processos finais da liberação da insulina em ilhotas de rato neonatos e durante a prenhez.

Trabalhos anteriores já haviam identificado a presença da Sintaxina 1A em ilhotas de ratos e em linhagens secretoras de insulina (Weeler *et al.*, 1996, Nagamatsu *et al.*, 1996). No presente trabalho, foi observado que ilhotas de ratas prenhes tiveram a expressão tanto gênica quanto protéica da sintaxina 1A aumentado em relação aos seus controles. Foi também demonstrado aumento significativo na transcrição e da concentração protéica da sintaxina 1A em ilhotas de ratos neonatos, submetidas a cultura com PRL por 5 dias e que este aumento não foi dependente das vias PI3-cinase ou MAP-cinase. Foi evidenciado ainda que a sintaxina 1A se localiza na membrana plasmática das células insulares e sua expressão não é exclusiva das células β . Estes resultados indicam que durante a prenhez é necessário um aumento na concentração da sintaxina

1A nas células β a fim de facilitar a secreção da insulina uma vez que esta participa do processo secretório. Além disso, os resultados obtidos com ilhotas de neonatos indicam que PRL possa ser um dos agentes moduladores da expressão da sintaxina 1A durante a prenhez.

No presente trabalho, demonstrou-se que o tratamento com a prolactina induziu aumento significativo na expressão do gene da SNAP-25, em ilhotas de ratos neonatos. Esse aumento não depende da via PI3-cinase ou MAP-cinase, pois, o tratamento com wortmanina, um inibidor específico da PI3-cinase ou com PD098059, um inibidor específico da MAP-cinase, não alterou a expressão deste gene. Foi observado também que ilhotas tratadas com PRL e ilhotas de ratas prenhes apresentavam maior concentração da proteína SNAP-25 comparadas com as controle. Desta forma, fica demonstrada a importância da SNAP-25 para a adaptação das ilhotas pancreáticas frente a maior necessidade de secreção de insulina durante a prenhez.

Estudamos também a modulação da prolactina sobre a expressão gênica da VAMP-2, o componente do complexo SNARE presente nas membranas de vesículas secretórias. Demonstramos que PRL aumentou a expressão tanto gênica quanto protéica da VAMP-2 em ilhotas de neonatos *in vitro*, e este aumento não dependem da ativação da via das PI3-cinase ou MAP-cinase. Por outro lado, não observamos diferenças na expressão de seu gene ou da própria proteína em ilhotas de ratas prenhes. Desta forma, acreditamos que a VAMP-2 tenha um mecanismo regulatório diferente dos outros membros da família SNARE estudados, que apresentaram aumento de expressão.

A isoforma de sinaptotagmina melhor caracterizada até agora é a 1. Sua estrutura é composta por uma porção N-terminal transmembrana seguida de uma região citoplasmática onde se localizam os domínios C₂. Camundongos mutantes para Syt1 apresentavam fenótipo letal, devido a não liberação de neurotransmissores, ficando clara sua importância na transmissão

sináptica (Geppert *et al.*, 1994). Além disso, em linhagens de célula β , a mutação de domínios C₂ da sinaptotagmina 1 induziu diminuição na secreção de insulina dependente de cálcio (Lang *et al.*, 1997). Neste mesmo estudo a super expressão da sinaptotagmina 2, um análogo da Syt1, não alterou a liberação da insulina em células HIT.

Não existem dados na literatura sobre o efeito da PRL sobre a expressão gênica das sinaptotagminas. Neste trabalho demonstramos que o cultivo de ilhotas de Langerhans de neonatos com PRL aumentou a transcrição do gene da sinaptotagmina 4 independente da ativação das vias da PI3-cinase e MAP-cinase. Além disso, os experimentos com “Western blot”, confirmados por microscopia confocal, mostram que PRL aumentou a concentração da proteína sinaptotagmina 4 em ilhotas de neonatos, aumento este também observado nas ilhotas de ratas prenhes. Por outro lado, não observamos diferenças na expressão da sinaptotagmina 1 em ilhotas de ratas adultas e prenhes. Além disso, PRL não alterou a expressão gênica e protéica da sinaptotagmina 1 em ilhotas de ratos neonatos. Desta forma, acreditamos que não seja necessário um aumento na expressão da sinaptotagmina 1 durante a prenhez para atender a maior demanda na secreção da insulina pelas células β .

Como mencionado anteriormente, PRL induz aumento na massa total das ilhotas como consequência da hipertrofia (Parsons *et al.*, 1992), hiperplasia (Weinhaus *et al.*, 1996) e redução na apoptose das células β (Parsons *et al.*, 1995). Mais recentemente, observou-se aumento na produção da insulina via aumento na transcrição do seu gene em ilhotas de rato e ficou comprovada a participação da via Jak-STAT5 como alvo da ação da prolactina (Fleenor *et al.*, 2001). No presente trabalho foi demonstrado que o bloqueio da via PI-3 cinase pela wortmanina reduziu a expressão do gene da insulina assim como bloqueou o efeito da prolactina sobre sua expressão. Notamos ainda, uma diminuição na expressão da insulina nas ilhotas tratadas com

prolactina e PD098059 em relação as cultivadas com somente PRL, o que demonstra que a ação deste hormônio sobre o gene da insulina também ocorre via MAP-cinase. Não foi observada alteração na transcrição da insulina nas ilhotas tratadas apenas com PD098059. Assim podemos afirmar que a PRL aumenta a expressão da insulina em ilhotas de ratos neonatos e que este processo se dá por vias distintas.

VI - CONCLUSÃO

6 - Conclusões

Nossos resultados demonstram que a PRL exerce função importante na modulação da expressão de diversos genes que participam dos processos finais da secreção da insulina.

1) Ilhotas de ratas prenhes apresentam maior expressão da syntaxina 1A, SNAP-25 e da Sinaptotagmina 4.

2) Ilhotas de neonatos cultivadas com PRL apresentam aumento na transcrição da syntaxina 1A, SNAP-25, VAMP-2 e da Sinaptotagmina 4.

3) O aumento de expressão gênica observado em ilhotas de neonatos não está associado à ativação das vias MAP-quinase ou da PI3-quinase.

4) As alterações de expressão gênica se refletem no padrão protéico, aumentando a concentração das referidas proteínas em ilhotas de ratas prenhes ou ilhotas de neonatos tratadas com PRL.

5) Não ocorrem modificações na localização celular da syntaxina 1A e da Sinaptotagmina 4 em ilhotas de ratas prenhes ou ilhotas de neonatos tratadas com PRL.

VII – Referências

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amaral ME, Ueno M, Carvalheira JB, Carneiro EM, Velloso LA, Saad MJ, Boschero AC. (2003). Prolactin-signal transduction in neonatal rat pancreatic islets and interaction with the insulin-signaling pathway. **Horm Metab Res** 35:282-9.
- Amit T, Dibner C, Barkey RJ. (1997). Characterization of prolactin- and growth hormone-binding proteins in milk and their diversity among species. **Mol Cell Endocrinol** 130:167-80.
- Berlanga JJ, Gualillo O, Buteau H, Applanat M, Kelly PA, Edery M. (1997). Prolactin activates tyrosyl phosphorylation of insulin receptor substrate 1 and phosphatidylinositol-3-OH kinase. **J Biol Chem** 272:2050-2.
- Brelje TC, Scharp DW, Lacy PE, Ogren L, Talamantes F, Robertson M, Friesen HG, Sorenson RL. (1993). Effect of homologous placental lactogens, prolactins, and growth hormones on islet B-cell division and insulin secretion in rat, mouse, and human islets: implication for placental lactogen regulation of islet function during pregnancy. **Endocrinology** 132: 879-87.
- Brose N, Petrenko AG, Sudhof, TC and Jahn R. (1992). Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface. **Science** 256:1021-5.
- Burch PT, MD Trus, DK Berner. (1981). Adaptation of glycolytic enzymes: glucose use and insulin release in rat pancreatic islets during fasting and refeeding. **Diabetes** 30: 923-928.
- Clark JD, Lin LL, Kriz RW, Ramesha CS, Sultzman LA, Lin AY, Milona N, Knopf JL. (1991) A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA2 contains a Ca(2+)-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. **Cell** 65:1043-51.

- Collares-Buzato CB, Leite AR, Boschero AC. (2001). Modulation of gap and adherens junctional proteins in cultured neonatal pancreatic islets. **Pancreas** 23:177-85.
- Crepaldi SC, Carneiro EM, Boschero AC. (1997). Long-term effect of prolactin treatment on glucose-induced insulin secretion in cultured neonatal rat islets. **Horm Metab Res** 29:220-4.
- Daniel S, Noda M, Straub SG, Sharp GW. (1999). Identification of the docked granule pool responsible for the first phase of glucose-stimulated insulin secretion. **Diabetes** 48:1686-90.
- David M, Petricoin EF 3rd, Igarashi K, Feldman GM, Finbloom DS, Larner AC. (1994). Prolactin activates the interferon-regulated p91 transcription factor and the Jak2 kinase by tyrosine phosphorylation. **Proc Nat Acad Sci USA** 91:7174-8.
- Erwin RA, Kirken RA, Malabarba MG, Farrar WL, Rui H. (1995). Prolactin activates Ras via signaling proteins SHC, growth factor receptor bound 2, and son of sevenless. **Endocrinology** 136:3512-8.
- Fasshauer D, Otto H, Eliason WK, Jahn R, Brunger AT. (1997). Structural changes are associated with soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor complex formation. **J Biol Chem** 272:28036-41.
- Fernandez I, Ubach J, Dulubova I, Zhang X, Südhof TC, Rizo J. (1998). Three-dimensional structure of an evolutionarily conserved N-terminal domain of syntaxin 1A. **Cell** 94:841-9
- Fleenor DE, Freemark M. (2001). Prolactin induction of insulin gene transcription: roles of glucose and signal transducer and activator of transcription 5. **Endocrinology** 142:2805-10.
- Gao Z, Reavey-Cantwell J, Young RA, Jegier P, Wolf BA. (2000). Synaptotagmin III/VII isoforms mediate Ca²⁺-induced insulin secretion in pancreatic islet β -cells. **J. Biol Chem** 275:36079-85.

- Geppert M, Goda Y, Hammer RE, Li C, Rosahl TW, Stevens CF, Sudhof TC. (1994). Synaptotagmin I: a major Ca²⁺ sensor for transmitter release at a central synapse. **Cell** 79:717-27.
- Goffin V, Kelly PA. (1996). Prolactin and growth hormone receptors. **Clin Endocrinol** 45:247-55.
- Goffin V, Kelly PA. (2002). Growth-promoting actions of prolactin, the hormone of lactation. **J Pediatr Endocrinol Metab** 15:787-8.
- Hata Y, Slaughter CA, Sudhof TC. (1993). Synaptic vesicle fusion complex contains unc-18 homologue bound to syntaxin. **Nature** 366:347-51.
- Hay JC, Scheller R. (1997). SNAREs and NSF in targeted membrane fusion. **Curr Opin Cell Biol** 9:505-12.
- Ji J, Tsuk S, Salapatek AM, Huang X, Chikvashvili D, Pasyk EA, Kang Y, Sheu L, Tsushima R, Diamant N, Trimble WS, Lotan I, Gaisano HY. (2002). The 25-kDa synaptosome-associated protein (SNAP-25) binds and inhibits delayed rectifier potassium channels in secretory cells. **J Biol Chem** 277:20195-204.
- Lang J, Fukuda M, Zhang H, Mikoshiba K and Wollheim CB. (1997). The first C2 domain of synaptotagmin is required for exocytosis of insulin from pancreatic beta-cells: action of synaptotagmin at low micromolar calcium. **J. EMBO** 16:5837-46.
- Li C, Ullrich B, Zhang JZ, Anderson RG, Brose N, Sudhof TC. (1995). Ca²⁺-dependent and -independent activities of neural and non-neural synaptotagmins. **Nature** 375:594-9.
- Martin F, Moya F, Gutierrez LM, Reig JA, Soria B. (1995). Role of syntaxin in mouse pancreatic beta cells. **Diabetologia** 38:860-3.

- Mazancourt P, Carneiro EM, Atwater I, Boschero AC. (1994). Prolactin treatment increases GLUT2 but not the G protein subunit content in cell membranes from cultured neonatal rat islets. **FEBS Lett** 343:137-40.
- Michaels RL, Sorenson RL, Parsons JA, Sheridan JD. (1987). Prolactin enhances cell-to-cell communication among beta-cells in pancreatic islets. **Diabetes** 36:1098-103 .
- Nagamatsu S, Fujiwara T, Nakamachi Y, Watanabe T, Katahira H, Sawa H, Akagawa K. (1996). Expression and functional role of syntaxin 1/HPC-1 in pancreatic beta cells. Syntaxin 1A, but not 1B, plays a negative role in regulatory insulin release pathway. **J Biol Chem** 271:1160-5.
- Nagamatsu S, Nakamichi Y, Ozawa S, Ishida H. (1999). Decreased expression of t-SNARE, syntaxin 1, and SNAP-25 in pancreatic beta-cells is involved in impaired insulin secretion from diabetic GK rat islets: restoration of decreased t-SNARE proteins improves impaired insulin secretion. **Diabetes** 48:2367-73.
- Neher E. (1998). Vesicle pools and Ca²⁺ microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release. **Neuron** 20:389-99.
- Niemann H, Blasi J, Jahn R. (1994). Clostridial neurotoxins: new tools for dissecting exocytosis. **Trends Cell Biol** 4:179-85.
- Otto H, Hanson PI, Jahn R. (1997). Assembly and disassembly of a ternary complex of synaptobrevin, syntaxin, and SNAP-25 in the membrane of synaptic vesicles. **Proc Natl Acad Sci USA** 94:6197-201.
- Oyler GA, Higgins GA, Hart RA, Battenberg E, Billingsley M, Bloom FE, Wilson MC. (1989). The identification of a novel synaptosomal-associated protein, SNAP-25, differentially expressed by neuronal subpopulations. **J Cell Biol** 109:3039-52.

- Parsons JÁ, Brelje TC, Sorenson RL. (1992). Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: increased islet cell proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion. **Endocrinology** 130:1459-66.
- Parsons JÁ, TC Brelje, RI Sorenson. (1995). Number and size of islets Langerhans in pregnant, human growth hormone-expressing transgenic, and pituitary dwarf mice: Effect of lactogenic hormones. **Endocrinology** 136:2013-21.
- Pevsner J, Hsu SC, Braun JEA, Calakos N, Ting AE, Bennet ME, Scheller RH. (1994). Specificity and regulation of a synaptic vesicle docking complex. **Neuron** 13:353-61.
- Rothman JE. (1994). Mechanisms of intracellular protein transport. **Nature** 372:55-63.
- Sadoul K, Lang J, Montecucco C, Weller U, Regazzi R, Catsicas S, Wollheim CB, Halban PA. (1995). SNAP-25 is expressed in islets of Langerhans and is involved in insulin release. **J Cell Biol** 128:1019-28.
- Sollner T, Bennett MK, Whiteheart SW, Scheller RH, Rothman JE. (1993). A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. **Cell** 75:409-18.
- Sorenson RL, Brelje TC, Roth C. (1993). Effects of steroid and lactogenic hormones on islets of Langerhans: a new hypothesis for the role of pregnancy steroids in the adaptation of islets to pregnancy. **Endocrinology** 133:2227-34.
- Sutton RB, Fasshauer D, Jahn R, Brunger AT. (1998). Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. **Nature** 395:347-53.
- Taga, T, T Kishimoto. (1992). Cytokine receptors and signal transduction. **FASEB J** 6:3387-96.
- Tobi D, Wiser O, Trus M, Atlas D. (1998). N-type voltage-sensitive calcium channel interacts with syntaxin, synaptotagmin and SNAP-25 in a multiprotein complex. **Receptors Channels** 6:89-98.

- Too CK, Murphy PR, Friesen HG. (1989). G-proteins modulate prolactin- and interleukin-2-stimulated mitogenesis in rat Nb2 lymphoma cells. **Endocrinology** 124:2185-92.
- Trimble WS, Cowan DM, Scheller RH. (1988). VAMP-1: a synaptic vesicle-associated integral membrane protein. **Proc Natl Acad Sci USA** 85:4538-42.
- Ungermann C, Nichols BJ, Pelham HR, Wickner W. (1998). A vacuolar v-t-SNARE complex, the predominant form in vivo and on isolated vacuoles, is disassembled and activated for docking and fusion. **J Cell Biol** 140:61-9.
- Weinhaus AJ, Stout LE, Sorenson RL. (1996). Glucokinase, hexokinase, glucose transporter 2, and glucose metabolism in islets during pregnancy and prolactin-treated islets in vitro: mechanisms for long term up-regulation of islets. **Endocrinology** 137:1640-9.
- Wheeler MB, Sheu L, Ghai M, Bouquillon A, Grondin G, Weller U, Beaudoin AR, Bennett MK, Trimble WS, Gaisano HY. (1996). Characterization of SNARE protein expression in beta cell lines and pancreatic islets. **Endocrinology** 137:1340-8.
- Wiser O, Cohen R., Atlas D. (2002). Ionic dependence of Ca²⁺ channel modulation by syntaxin 1A. **Proc Natl Acad Sci USA** 99:3968-73
- Wiser O, Trus M, Hernandez A, Renstrom E, Barg S, Rorsman P, Atlas D. (1999). The voltage sensitive Lc-type Ca²⁺ channel is functionally coupled to the exocytotic machinery. **Proc Natl Acad Sci USA** 96:248-53.
- Wollheim C, Sharp WG. (1981). Regulation of insulin release by calcium. **Physiol Rev** 61:914-73
- Yamauchi T, Kaburagi Y, Ueki K, Tsuji Y, Stark GR, Kerr IM, Tsushima T, Akanuma Y, Komuro I, Tobe K, Yazaki Y, Kadowaki T. (1998). Growth hormone and prolactin stimulate tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1, -2, and -3, their association with p85

phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase), and concomitantly PI3-kinase activation via JAK2 kinase. **J Biol Chem** 273:15719-26.