

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Tatiane Cristina de Araujo Nogueira



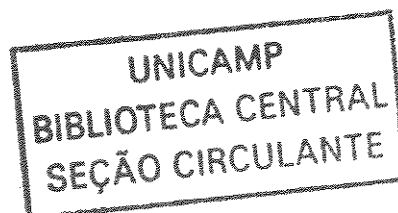
Modulação da secreção de insulina em ilhotas de Langerhans pela crotoxina-like de *Crotalus durissus collilineatus* e suas subunidades.

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Tatiane Cristina de Araujo Nogueira e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Biologia para a obtenção do Título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular na área de Fisiologia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro.

2002



UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	N689m
V	EX
TOMBO BC/	52020
PROC.	16-124103
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	12/02/03
Nº CPD	

CM00179058-5

BIB ID 276351

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

N689m

Nogueira, Tatiane Cristina de Araujo
Modulação da secreção de insulina em ilhotas de Langerhans pela
crotoxina-like de *Crotalus durissus collilineatus* e suas subunidades/
Tatiane Cristina de Araujo Nogueira. --
Campinas, SP:[s.n.], 2002

Orientador: Everardo Magalhães Carneiro
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia

1.Crotoxina. 2.Fosfolipase A2. 3.Célula B. 4.Insulina. I.Carneiro,
Everardo Magalhães. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. III. Título.

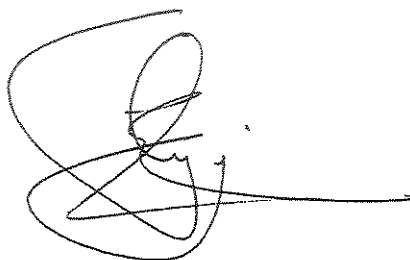
Data da Defesa: 23/09/2002

Banca examinadora:

Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro (Orientador)



Prof. Dr. Edson Antunes



Prof. Dr. Lício Augusto Velloso



Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero

200204340

Dedico este trabalho ao meu pai

e in memoriam à minha mãe.

AMO MUITO VOCÊS!

*"O que sabemos é uma gota,
o que ignoramos é um
oceano".*

(Isaac Newton)

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo amor, apoio e compreensão.

Ào Fabiano...

"Me faço crer que este amor... é igual entre a gente... Posso jurar para você... Nunca se viu tanto amor... Assim tão diferente... O amor dos deuses invejei... Quisera eu parar o mundo agora... eternizando enfim o nosso sentimento... e ao universo anunciar... que nada vai nos separar.... Amor... Queria ser a pele do seu corpo... prá estar junto com você a todo tempo... e só assim realizar... o meu desejo de te amar... Amor... "
(Fundo de Quintal)

...obrigada por toda ajuda, profissional e pessoal... Por ter me ensinado o verdadeiro valor de cada pessoa a começar por mim...

"É preciso sofrer depois de ter sofrido, e amar, e mais amar, depois de ter amado" (Guimarães Rosa)

Cada lágrima ensinou-nos uma verdade... A mais importante delas...O AMOR...

Ào meu grande irmão, amigo e anjo da guarda Faber por toda ajuda...

"Somente palavras são pouco para expressar tamanha amizade, carinho e gratidão que tenho por você..."

À minha irmã Fer, que um belo dia apareceu em casa e me arrastou aqui para Campinas...Valeu por tudo... pela convivência e paciência de quase 7 anos... por todos os conselhos... por nunca ter me deixado na mão e principalmente por ter me ouvido e me compreendido... mesmo sabendo das minhas tolices... TE AMO!!!!

À minha amiga e mãe Renata Penna, por todos os momentos, confidências, risadas de fôca e principalmente, por ter me ensinado que não existem erros irreparáveis...

À Vanessa e Marise com quem, eu pudesse voltar no tempo, teria convivido muito mais tempo...

São exemplos de paciência, principalmente para lidar com o mundo...

Ào Daniel, Baby, Esméria, Eliana, Jairo, Jana, Pingüino, Laura, Andrea, Patricia, Vivi, Carol, Eliane, Vanessa, que sempre souberam ser profissionais, colegas, amigos e irmãos nos momentos certos... Desculpem minhas falhas...

À todos da farmacologia (principalmente Alessandra Lia, Cleber e Juliano) com quem convivi em 2000!!!! Valeu!

Àos professores Edson Antunes e Gilberto De Nucci por terem me acolhido no primeiro ano do mestrado.

Àos professores Boschero e Lício que me ensinaram muito apesar do pouco tempo de convivência.

Obrigado por toda ajuda, compreensão e amizade.

Aos professores Helena, Francesco e Miguel pela convivência.

Ao Marcão pela PLA₂, conversas e idéias.

A minha co-orientadora e mãezona Angel por ter me iniciado na vida acadêmica, me ensinando, corrigindo e incentivando.

E é claro...

Ao meu orientador Everardo pela oportunidade, por acreditar no meu potencial e por ter tido paciência acima do normal para tolerar todos os percalços.

A todos que participaram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

E por fim a FAPESP e PRONEX pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE QUADROS	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Fosfolipase A ₂	4
1.2 Secreção de Insulina	11
1.3 Fosfolipase A ₂ e secreção de insulina	12
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Animais	18
3.2 Soluções	18
3.3 Caracterização e purificação da PLA ₂	20
3.4 Isolamento de ilhotas de Langerhans e gradiente descontínuo de Ficoll	20
3.5 Secreção estática de insulina	21
3.6 Dosagem de insulina	21
3.7 Metabolismo da glicose	22
3.8 Captação de ⁴⁵ Ca	23
3.9 Efluxo de ácido araquidônico	25
3.10 Dosagem de nucleossomos	25
3.11 Extrato total	25
3.12 Reagentes	27
3.13 Materiais	27
3.14 Análise estatística	27
4. RESULTADOS	28
5. DISCUSSÃO	56
6. CONCLUSÃO	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

RESUMO

As fosfolipases A₂ (PLA₂) desempenham importante papel no metabolismo de lipídios de membrana e estão intimamente relacionadas com a liberação de ácido araquidônico (AA), derivado dos lisofosfolípidos e estão presentes em diversos venenos extraídos de animais peçonhentos. A crotoxina é um composto extraído de venenos de cascavel e é constituída pela crotapotina e pela PLA₂. A homologia das PLA₂ de venenos com as dos mamíferos têm sido de grande utilidade no estudo de identificação de proteínas alvo, classificação de receptores de PLA₂ endógenas e estudos funcionais de diferentes tecidos. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar o papel da crotoxina-like, extraída do veneno da cascavel *Crotalus durissus collilineatus*, e suas subunidades sobre a secreção de insulina por ilhotas de Langerhans, visando elucidar os mecanismos que estariam envolvidos na modulação da secreção de insulina em presença de diferentes agentes. Em experimentos realizados em ilhotas de Langerhans de ratos Wistar verificou-se que a crotoxina potencializa a secreção de insulina estimulada por 16.7 mM de glicose e este efeito é devido à subunidade PLA₂ presente nesta toxina, uma vez que a crotapotina não afetou a secreção de insulina estimulada por glicose. Além disso, a PLA₂ do veneno induziu aumento da secreção de insulina de maneira dose-dependente. A adição de glicose marcada na ausência de PLA₂ induziu um aumento de liberação de ¹⁴CO₂ de 30 ± 0.6 pmol/ilhota/90 min que foi similar aos valores obtidos na presença de PLA₂ (32 ± 1.7 pmol/ilhota/min). Nifedipina (10 µM), um bloqueador de canais de cálcio, reduziu a secreção de insulina estimulada por potássio, mas não afetou a potencialização da secreção de insulina pela PLA₂. O bloqueador de canais de sódio, tetrodotoxina (TTX) na concentração de 10 µM não alterou o aumento da secreção de insulina induzido pela PLA₂. A quelação de cálcio extracelular por EGTA (0,5 mM) também não afetou a potencialização da secreção de insulina nas ilhotas de Langerhans de ratos estimulada pela PLA₂. Estes resultados mostram que os mecanismos pelos quais a PLA₂ eleva a secreção de insulina em ilhotas de Langerhans de ratos não envolvem o metabolismo da glicose, a ativação de canais de cálcio e sódio e a participação direta dos íons cálcio do meio extracelular. No entanto, a secreção de insulina potencializada pela PLA₂ foi significativamente atenuada tanto pela incubação prévia das ilhotas de Langerhans com heparina (5 UI/ml) quanto pela adição de dexametasona (5 e 10 µM). Paralelo à potencialização da secreção de insulina, um aumento significativo do efluxo de ácido araquidônico foi observado em ilhotas de Langerhans de ratos em presença de PLA₂. Assim, estes achados sugerem que a potencialização da secreção de insulina induzida pela PLA₂ em baixa concentração ou concentração supralimiar de glicose está possivelmente relacionada com a mobilização de ácido araquidônico.

ABSTRACT

The crotoxin results from phospholipase A₂ (PLA₂) and crotapotin interaction. The PLA₂ acts in the membrane phospholipids generating arachidonic acid (AA). Venom PLA₂ has been used as a pharmacological tool to identify target protein, mammalian receptor, and physiological cellular function. Therefore, the aim of this work was to study the role of crotoxin-like from *Crotalus durissus collilineatus* and its subunits on the insulin secretion of the isolated rat Langerhans islets. Also, we investigated the underlying mechanisms by which the venom PLA₂ would evoke insulin secretion in the presence of insulinotropic agents. Our experiments demonstrated that insulin secretion was potentialized by crotoxin in a dose-dependent manner in presence of low and high glucose concentration and this effect is related to PLA₂. Neither glucose metabolism nor ionic channels (Ca⁺² and Na⁺ channels) are involved in the enhancement of insulin secretion induced by PLA₂ in isolated Langerhans islets since label glucose, nifedipine (10 μM) and tetrodotoxin (10 μM) did not affect this response. EGTA also did not interfere with the potentiation of insulin secretion induced PLA₂ showing that extracellular calcium is not directly involved in this phenomenon. However, heparin and dexametasone significantly attenuated the increase of insulin secretion in response to PLA₂. Moreover, the efflux of AA was markedly increased in parallel to enhancement of insulin secretion in isolated rat Langerhans islets. In conclusion, these findings show that the potentiation of insulin secretion induced by PLA₂ in presence of glucose may be related to AA mobilization of Langerhans islets from rats.

LISTA DE ABREVIATURAS

- AA – Ácido Araquidônico
AC – Adenilato ciclase
ADP – Difosfato de adenosina
AMP_c – Monofosfato de adenosina cíclico
Asp-49 – Aspartato 49
ATP – Trifosfato de adenosina
B – Célula beta
⁴⁵Ca – Isótopo do Cálcio
[Ca⁺²]_i – Concentração de cálcio intracelular
C.d.colli. – *Crotalus durissus collilineatus*
C.d.t. – *Crotalus durissus terrificus*
CCK-8 – Colecistoquinina-8
cPLA₂ – Fosfolipase A₂ intracelular dependente de Ca⁺²
DAG – Diacilglicerol
G – Glicose
Gly-30 – Glicina 30
Gly-32 – Glicina 32
¹²⁵I – Isótopo do Iodo
IP3 – Inositol 1,4,5 trifosfato
iPLA₂ – Fosfolipase A₂ intracelular independente de Ca⁺²
K⁺ – Potássio
K⁺_{ATP} – Canais de potássio ATP dependentes
Lys-49 – Lisina 49
MLCK – Quinase da cadeia leve da miosina
PKA – Proteína quinase A
PKC – Proteína quinase C
PLA₂ – Fosfolipase A₂
PLC – Fosfolipase C
sPLA₂ – Fosfolipase A₂ extracelular ou secretada
TTX – Tetrodotoxina
Tyr-28 – Tirosina 28
vPLA₂ – Fosfolipase A₂ extracelular de venenos

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ação das fosfolipases nos sítios do fosfoglicerídeo e os respectivos substratos liberados.

Figura 2 - Modelo estrutural da PLA₂.

Figura 3 - Representação estrutural esquemática do receptor tipo-M e interação do receptor à sPLA₂.

Figura 4 - Possíveis mecanismos de ação das sPLA₂.

Figura 5 - Mecanismos de secreção de insulina.

Figura 6 - Efeito de 5.6 µg/ml de crotoxina sobre a secreção de insulina.

Figura 7 - Efeito de 5.6 µg/ml de crotapotina sobre a secreção de insulina.

Figura 8 - Efeito de 5.6 µg/ml de PLA₂ na secreção de insulina em ilhotas.

Figura 9A - Efeito de concentrações crescentes de PLA₂ (0,1µg/ml - 10µg/ml) sobre a secreção de insulina.

Figura 9B - Curva concentração-efeito dos valores absolutos de secreção.

Figura 10A - Efeito de concentrações crescentes de glicose em ausência ou presença de 1 mg/ml de PLA₂ sobre a secreção de insulina.

Figura 10B - Efeito de concentrações crescentes de glicose em ausência ou presença de 5.6 mg/ml de PLA₂ sobre a secreção de insulina.

Figura 11 - Efeito da exposição prévia a PLA₂.

Figura 12 - Oxidação de glicose por ilhotas Langerhans.

Figura 13 - Efeito de concentrações crescentes de glicose sobre incorporação de ⁴⁵Ca por ilhotas de Langerhans.

Figuras 14 - Efeito de 5.6 µg/ml de PLA₂ sobre a secreção de insulina em presença ou ausência de nifedipine.

Figuras 15 - Efeito de 5.6 µg/ml de PLA₂ sobre a secreção de insulina na ausência de cálcio e presença de EGTA.

Figura 16 - Efeito de 5.6 µg/ml de PLA₂ sobre a secreção de insulina em presença ou ausência de Tetrodotoxina.

Figura 17 - Efeito de 5.6 µg/ml de PLA₂ sobre a secreção de insulina em presença ou ausência de heparina.

Figura 18 - Secreção de insulina em presença ou ausência de 5.6 µg/ml de PLA₂, previamente tratada ou não com heparina.

Figura 19 - Efeito de 5.6 µg/ml de PLA₂ sobre ilhotas previamente expostas a heparina.

Figura 20 - Efeito de 0.5 $\mu\text{g/ml}$ de PLA_2 sobre a secreção de insulina em presença ou ausência de concentrações crescentes de Dexametasona.

Figura 21 - Efeito de 5.6 $\mu\text{g/ml}$ de PLA_2 sobre a secreção de insulina em presença ou ausência de concentrações crescentes de Dexametasona.

Figura 22A - Efluxo de ácido araquidônico de ilhotas submetidas à ausência ou presença de 0.5 $\mu\text{g/ml}$ de PLA_2 .

Figura 22B - Quantificação da secreção de insulina destas ilhotas.

Figura 23A - Efluxo de ácido araquidônico de ilhotas submetidas à ausência ou presença de 5.6 $\mu\text{g/ml}$ de PLA_2 .

Figura 23B - Quantificação da secreção de insulina destas ilhotas.

Figura 24 - Efeito de 0.5 ou 5.6 mg/ml de PLA_2 sobre nucleossomos liberados em ilhotas.

Figura 25 - Efeito de 0.5 e 5.6 $\mu\text{g/ml}$ de PLA_2 sobre o grau de fosforilação em tirosina das proteínas de ilhotas de Langerhans.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Classificação das PLA₂

INTRODUÇÃO

O estudo de venenos de animais permite não somente compreender o mecanismo de ação das toxinas bem como fornece ferramentas para investigação de muitos processos fisiológicos.

O veneno das serpentes é, geralmente, composto por uma mistura de substâncias. Aproximadamente 90% do total do veneno seco é constituído por proteínas e o restante por sais, lípidios, e outros compostos orgânicos (Tu, 1977). No veneno total estão presentes vários íons, tais como cálcio, magnésio e zinco que atuam como cofatores de muitas enzimas, como as fosfolipases A₂ (PLA₂), dependentes de cálcio, e as metaloproteases, dependentes de magnésio e zinco (Tu, 1977; Jia et al., 1996).

A composição química do veneno varia de acordo com a espécie. Por se tratar de uma mistura complexa, seu mecanismo de ação depende da interação biológica e natureza de seus elementos, a fim de desencadear diferentes respostas fisiológicas. Os venenos das serpentes brasileiras desencadeiam respostas proteolíticas, coagulantes, hemorrágicas, miotóxicas e neurotóxicas.

As serpentes do gênero *Crotalus durissus* conhecidas popularmente como cascavéis, encontram-se distribuídas no Brasil em seis subespécies:

Crotalus durissus terrificus

Crotalus durissus collilineatus

Crotalus durissus cascavella

Crotalus durissus ruruima

Crotalus durissus marajoensis

Crotalus durissus trigonicus.

Venenos de cascavéis, por exemplo, a *Crotalus durissus terrificus* (C.d.t.), contém, no mínimo, quatro grupos distintos de proteínas tóxicas: a convulxina (Brazil, 1972; Lee, 1972), a girotóxina (Barrio, 1961; Brazil, 1972; Alexander *et al.*, 1988), a crotamina (Goncalves & Polson, 1947; Goncalves & Vieira, 1950; Brazil, 1972), e um dos componentes mais importantes do veneno, a crotóxina (Slotta & Fraenkel-Conrat, 1938; Brazil, 1972; Chang & Lee, 1977; Hawgood & Santana de Sá, 1979).

A crotóxina, complexo proteico enfocado neste estudo, representa cerca de 50% do peso seco do veneno da C.d.t. (Faure & Bon, 1988). É o componente mais tóxico isolado do veneno de *Crotalus durissus* e resulta da interação quaternária de suas duas sub-unidades, a

PLA₂, um componente básico responsável pela toxicidade do complexo e a crotapotina, um peptídeo ácido, não tóxico e sem atividade enzimática que potencializa a toxicidade (Rubsamen et al., 1971).

Os efeitos farmacológicos da crotoxina não são necessariamente gerados pela quebra de fosfolípidios ou ruptura de membranas biológicas (atividade característica das PLA₂). A crotoxina também tem ação bloqueadora sobre a transmissão neuromuscular (Brazil & Excell, 1970). Estes efeitos são primariamente pré-sinápticos e causam uma modificação trifásica (depressão, facilitação e bloqueio final) da liberação de neurotransmissores dos terminais nervoso (Chang et al., 1973; Chang & Lee, 1977).

Entretanto, com base na depressão da resposta à acetilcolina no diafragma do rato, Brazil et al. (1966) encontraram que a crotoxina também age sobre a transmissão pós-sináptica. Possui ainda atividade hemolítica (Rosenfeld, 1971), miotóxica sistêmica caracterizada pela liberação de mioglobina (Azevedo-Marques, 1985) e também atividade nefrotóxica (Amaral, 1985).

No veneno da *Crotalus durissus terrificus* (C.d.t.) existem, pelo menos, seis isoformas de crotoxina (Faure & Bon, 1988, Toyama et. al., 2000).

A crotoxina extraída da cascavel *Crotalus durissus collilineatus* é homóloga a crotoxina encontrada no veneno da C.d.t. (Lennon & Kaiser, 1990). Apesar disto, o veneno da *Crotalus durissus collilineatus* contém somente pequena quantidade da neurotoxina crotoxina-like (like devido à sua semelhança com a crotoxina presente no veneno da C.d.t.). Apesar desta baixa concentração no veneno da C.d.colli, a LD₅₀ ao veneno bruto injetado em camundongo por via venosa é baixa (Faure & Bon, 1988) demonstrando sua alta toxicidade.

Muitos autores têm estudado os efeitos da crotoxina, crotapotina e da fosfolipase A₂ sobre o músculo esquelético de animais. As alterações anátomo-patológicas ocorrem quatro a seis horas após inoculação da crotoxina e são lesões subsarcolêmicas, com edema intramitocondrial. Após 24 a 48 horas, as mitocôndrias apresentam depósitos densos, com elevada concentração de cálcio (Dempster, Gopalakrishnakone & Hawgood, 1980; Garcia-Lima & Laure, 1987).

À inoculação de diferentes quantidades de crotapotina no músculo não se evidenciam lesões histológicas. A inoculação de diferentes quantidades de fosfolipase A₂

produz uma necrose tecidual, em quaisquer doses utilizada. As observações experimentais concluem que as lesões causadas pela crotoxina são as mesmas que as verificadas pela fosfolipase A₂, embora sejam mais intensas no primeiro caso. Desta maneira, a associação entre fosfolipase A₂ e crotapotina leva à potencialização dos efeitos da crotoxina. Além disso, foi possível observar que o local primário de ação da crotoxina no músculo é a membrana plasmática e está relacionado à hidrólise de fosfolipídios (Kini & Evans, 1989).

Tem sido crescente o número de estudos utilizando venenos de animais na investigação fisiológica e farmacológica. Da mesma forma as PLA₂ dos venenos tem sido utilizadas como ferramenta na identificação de proteínas alvo de mamíferos incluindo receptores que se ligam as PLA₂ dos venenos. Isto permite investigar as funções fisiológicas destas proteínas de ligação e deste modo avaliar quais fosfolipases A₂ secretadas de mamíferos seriam homólogas as PLA₂ dos venenos e representariam os ligantes endógenos naturais para as proteínas e/ou receptores primeiramente identificados através das PLA₂ dos venenos. Desta forma alguns estudos já sugerem que as PLA₂ secretadas de mamíferos, semelhantes as PLA₂ dos venenos, podem atuar tanto como enzima quanto como ligante (Murakami et al., 1997; Valentin et al., 1999; 2000).

FOSFOLIPASE A₂ (PLA₂)

As fosfolipases são enzimas que catalisam a hidrólise dos fosfoglicerídeos de membrana em quatro diferentes posições (Figura 1).

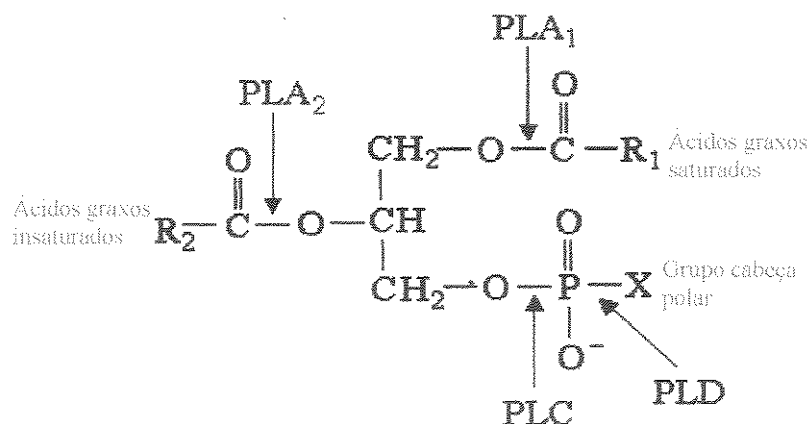


Figura 1 – Ação das fosfolipases nos sítios do fosfoglicerídeo e os respectivos substratos liberados.

Dependendo da posição onde ocorrerá a hidrólise, as fosfolipases recebem diferentes designações. As fosfolipases A₂ (PLA₂; fosfatidil-acil-hidrolases) atuam na posição sn-2 da ligação acil-éster de 3-sn-fosfoglicerídeos (Arni & Ward, 1996).

As PLA₂ tem função em vários processos biológicos incluindo manutenção da homeostase das membranas celulares, defesa e transdução de sinal. Exercem ainda função central no metabolismo de lipídios e estão intimamente relacionadas com a liberação do ácido araquidônico (AA), precursor de lipídios ativos tais como prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanas (Denis, 1983; Waite, 1990) e derivados dos lisofosfolípeos (Valentin & Lambeau, 2000).

As PLA₂ estão amplamente distribuídas na natureza e têm sido tradicionalmente classificadas como fosfolipases extracelulares ou secretadas (sPLA₂) e intracelulares dependentes (cPLA₂) e independentes (iPLA₂) de cálcio.

As PLA₂ extracelulares são abundantemente encontradas no suco pancreático de mamíferos (sPLA₂ grupo IA) e, no veneno de serpentes (sPLA₂ grupos IIA, IIB) e insetos (sPLA₂ grupo III).

As PLA₂ diferem umas das outras quanto ao peso molecular, sítios de ação, requerimento de Ca⁺² e especificidade por fosfoglicerídeos que possuam o AA na posição sn-2 (Glaser et al., 1993). Algumas PLA₂ mostram-se independentes de cálcio mas específicas pelo AA nesta mesma posição (Hazen et al., 1990) como pode ser observado no quadro 1.

De modo geral nas PLA₂, a unidade catalítica está centrada na His 48, Asp 99, molécula de água e na presença do íon cálcio (figura 2). Este íon está ligado pelos oxigênios da Tyr-28, Gly-30, Gly-32 e pelo oxigênio da cadeia lateral do Asp-49 (Renetseder et al., 1985; Scott et al., 1990). No mecanismo de ação proposto, o cálcio teria uma função dupla importante pela fixação do grupamento fosfato dos fosfolipídios e pela estabilização da carga negativa sobre o oxigênio carboxil da ligação éster na posição sn-2. A amina (NH) da Gly-30 também foi sugerida como um fator importante na estabilização do estado de transição (Verheij, et al., 1980).

As PLA₂ do grupo II tem cerca de 125 resíduos e possuem uma extensão extra, a cadeia C-terminal de 5 a 7 resíduos. As fosfolipases do grupo I e II distinguem-se pela ausência ou presença de uma sequência pró-peptídica, também chamada de “alça

pancreática”, que é uma extensão desta cadeia C-terminal e um grupamento disulfeto específico (Valentin & Lambeau, 2000).

Quadro 1 – Classificação das PLA₂:

GRUPO	PONTES DISULFÍDICAS	OUTROS ASPECTOS MOLECULARES	VENENO DE ORIGEM DA sPLA ₂ s	sPLA ₂ s DE MAMÍFEROS		
				NOME COMUM	ORIGEM	PAPEL BIOLÓGICO
IA	7	Alça Elapídica	Naja Tripudians, Naja Bungarus	Sem Equivalente	-	-
IB	7	Propeptídeo Alça Pancreática	Naja Tripudians, Naja Bungarus	sPLA ₂ s Pancreática	Pâncreas, Pulmão, Baço	Digestão de lipídeos, Formação de Eicosanóides, Contração Celular, Proliferação, Migração
IIA	7	Extensão C-Terminal	Cascaveis, Víboras	sPLA ₂ s Inflamatória	Células E Tecidos Inflamados	Formação De Eicosanóides, Câncer, Defesa Antibacteriana
IIB	6	Extensão C-Terminal	Víboras gaboon	Sem Equivalente	-	-
IIC	8	Talvez Extensão Propeptídeo C-Terminal	Sem Equivalente	sPLA ₂ s (Grupo IIC)	Testículos	Desconhecido
IIIA	5	N-Glicosilada	Abelhas, Lacerúdeos	Sem Equivalente	-	-
IIIB	5	2 Subunidades	Escorpiões	Sem Equivalente	-	-
V	6	-	Sem Equivalente	sPLA ₂ s (GRUPO V)	Coração, Placenta e Macrófagos	Formação de Eicosanóides
IX	6	2 Subunidades	Lesma Marinha	Sem Equivalente	-	-
X	6	Talvez Extensão Propeptídeo C-Terminal	Sem Equivalente	sPLA ₂ s (Grupo X)	Baço, Timo, Leucócitos Do Cólon, Pâncreas	Desconhecido

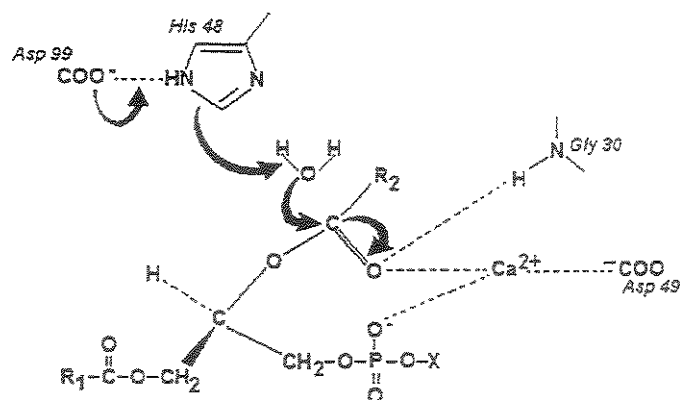


Figura 2 – Modelo estrutural da PLA₂

Com base na atividade enzimática as sPLA₂ do grupo II tem sido distinguidas em dois grupos: sPLA₂ Asp-49 e sPLA₂ Lys-49. A primeira contém um resíduo de ácido aspártico no sítio de ligação para o Ca⁺² e possui alta atividade enzimática, enquanto que a última contém lisina na posição 49, possuindo baixa ou nenhuma atividade (Gambero et al., 2002).

Existe uma ampla diversidade molecular de PLA₂ podendo as diferentes formas ser cataliticamente ativas ou inativas. Entretanto, estudos mais recentes revelam que os efeitos tóxicos das fosfolipases dos venenos não podem ser facilmente correlacionados com sua atividade catalítica, sugerindo que esta pode depender das ligações às proteínas alvo (Valentin et al., 1999). Assim, foi proposto um modelo para explicar os diferentes efeitos farmacológicos destas PLA₂ (Kini & Evans, 1989). Este modelo é baseado na presença de sítios de ligação específicos localizados na superfície das células alvo, os quais têm grande afinidade para as sPLA₂ de venenos e que poderiam estar relacionados à sua toxicidade (Lambeau & Lazdunski, 1999; Gutierrez & Lomonte, 1995), sugerindo que as sPLA₂ extraídas dos venenos podem exercer efeitos farmacológicos independente de suas atividades enzimáticas.

Evidência direta da existência destes receptores específicos de PLA₂ em células de mamíferos foi reportada posteriormente por Lambeau et al. (1989). Identificou-se dois tipos de receptores denominando-os Tipo-N e Tipo-M (Lambeau et al., 1989; Lambeau, Barhanin & Lazdunski, 1991a; 1991b; Lambeau et al., 1994) os quais são estruturalmente e farmacologicamente distintos.

O receptor Tipo-N está presente em grandes quantidades nas membranas de células do cérebro de rato e são compostos por pelo menos dois sítios de ligação. Tem grande afinidade para sPLA₂ neurotóxicas mas baixa afinidade para as não tóxicas, o que sugere seu envolvimento nos efeitos neurotóxicos de diversas sPLA₂ (Lambeau et al., 1989; Ancian et al., 1995). São compostos por diferentes proteínas cujos pesos moleculares variam entre 18-24 kDa, 36-51 kDa e aproximadamente 85 kDa (Lambeau, Barhanin & Lanzański, 1991b). Receptores de alta afinidade, similares mas não idênticos (tipo N-like) aos receptores Tipo-N do cérebro são encontrados em vários tecidos como fígado, pulmão, coração e rim, sugerindo a existência deste tipo de receptor em diferentes tecidos (Lambeau et al., 1989; Nicolas et al., 1997).

O receptor tipo-M (figura 3) está expresso em células do músculo esquelético. É composto por uma proteína única de 180 kDa e são encontrados em grandes quantidades no fígado, pulmão, coração e rim, sendo que os níveis de expressão dependem do tecido e espécie do mamífero (Lambeau et al., 1994; Valentin et al., 2000)

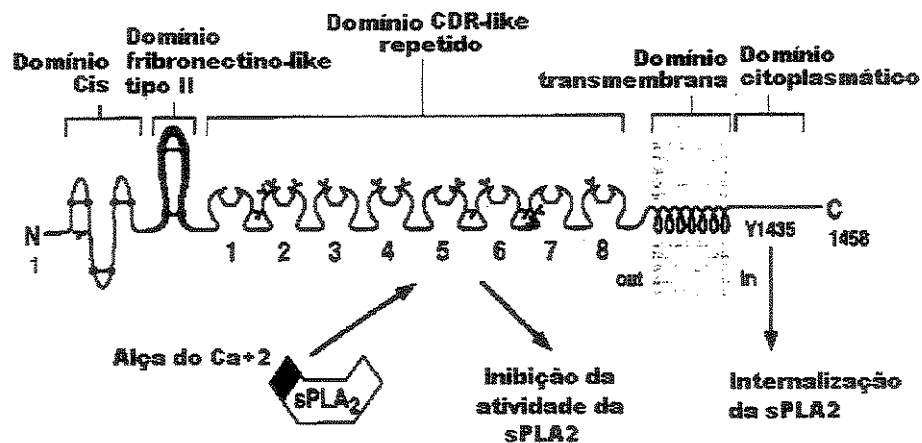


Figura 3 – Representação estrutural esquemática do receptor tipo-M e interação do receptor à sPLA₂.

Estudos sobre a função e estrutura deste receptor indicam que; (1) o domínio CDR5 do receptor tipo-M é um elemento chave na ligação da sPLA₂ (Nicolas et al., 1997); (2) resíduos próximos ou no interior da alça do Cálcio das sPLA₂ estão envolvidos na ligação ao receptor tipo-M (Lambeau et al., 1995); (3) ligação da sPLA₂ ao receptor induz inibição

de sua atividade catalítica (Ancian, Lambeau & Lazdunski, 1995) e ainda que, (4) o receptor tipo-M tem propriedades endocíticas e rapidamente incorpora a sPLA₂ (Gelb et al., 1999).

A primeira indicação de que a sPLA₂ poderiam se ligar às proteínas de mamíferos foi obtida através da interação entre a sPLA₂ pancreáticas do grupo IB e o receptor tipo-M de camundongos (Arita et al., 1991). Posteriormente foi demonstrado que tanto a sPLA₂ do grupo IB quanto do grupo IIA poderiam se ligar ao receptor tipo-M de coelhos (Lambeau et al., 1995) e camundongos (Cupillard et al., 1999).

Outro estudo propôs que sPLA₂ do grupo IIA poderiam se unir à superfície da célula através da ligação às proteínas proteoglicanas sulfato heparanas sendo esta ligação importante para hidrólise dos fosfolípidios (Koduri et al., 1998).

O tratamento de células com derivados da heparina resultou em redução da produção de prostaglandinas, sugerindo que a ligação das sPLA₂ do grupo IIA às proteínas proteoglicanas da superfície das células aumenta liberação de ácido araquidônico (Suga, Marakami & Inoue, 1993). Outro possível exemplo de ligação para as fosfolipase A₂ secretadas seria uma suposta e simultânea ligação a um sítio para heparina (Murakami et al., 1988).

Diante da gama de proteínas alvo às quais poderiam se ligar as PLA₂, uma explicação para as atividades farmacológicas geradas seria a preferência pela superfície do lipídio ou pela proteína receptora específica como primeiro alvo de ligação (Tzeng, Yen & Tsai, 1996) ou ainda, a capacidade para formar um complexo com outra PLA₂ e desta forma desencadear diferentes respostas (Chang, 1985).

Tem sido crescente o número de estudos utilizando venenos de animais na investigação fisiológica e farmacológica. Da mesma forma as PLA₂ dos venenos (vPLA₂) tem sido utilizadas como ferramenta na identificação de proteínas alvo ou receptores em mamíferos, nos quais se ligariam estas vPLA₂. Verificando a homologia entre as vPLA₂ e as PLA₂ secretadas (sPLA₂) encontradas em mamíferos seria possível identificar os ligantes endógenos naturais destas proteínas de ligação e receptores, bem como suas funções fisiológicas. Desta formas alguns estudos já sugerem que as sPLA₂ de mamíferos, semelhante as vPLA₂, poderiam atuar tanto como enzima quanto como ligante (Murakami et al., 1997; Valentin et al., 1999; 2000).

Os alvos primários das sPLA₂ dos venenos poderiam estar localizados na superfície da célula, e o mecanismo de ativação destas PLA₂ poderia envolver: 1) atividade catalítica intrínseca gerando ácidos graxos e lisofosfolípidos a partir de lipídios de membrana; 2) ligação a lipídios de membrana desencadeando atividades celulares através de uma desorganização da membrana; 3) ligação a proteínas específicas localizadas na superfície da célula (Valentin & Lambeau, 2000).

Ligação das vPLA₂ a proteínas específicas ou receptores de membrana (figura 4) poderiam ocasionar liberação de segundos mensageiros ou degradação da sPLA₂ após internalização de seu receptor (Hanasaki & Arita, 1992; Ancian et al., 1995).

Por outro lado, ligação a receptores solúveis poderia levar à inibição da atividade da sPLA₂ e/ou funções ainda não identificadas.

Embora ainda não tenha sido demonstrado, acredita-se que precursores lipídicos liberados pelas sPLA₂ poderiam estar envolvidos em diferentes tipos de crosstalk com PLA₂ intracelular dependente de cálcio (Huwiler et al., 1997; Hernandez et al., 1998; Kuwata et al., 1998; Balsinde, Balboa & Dennis, 1998).

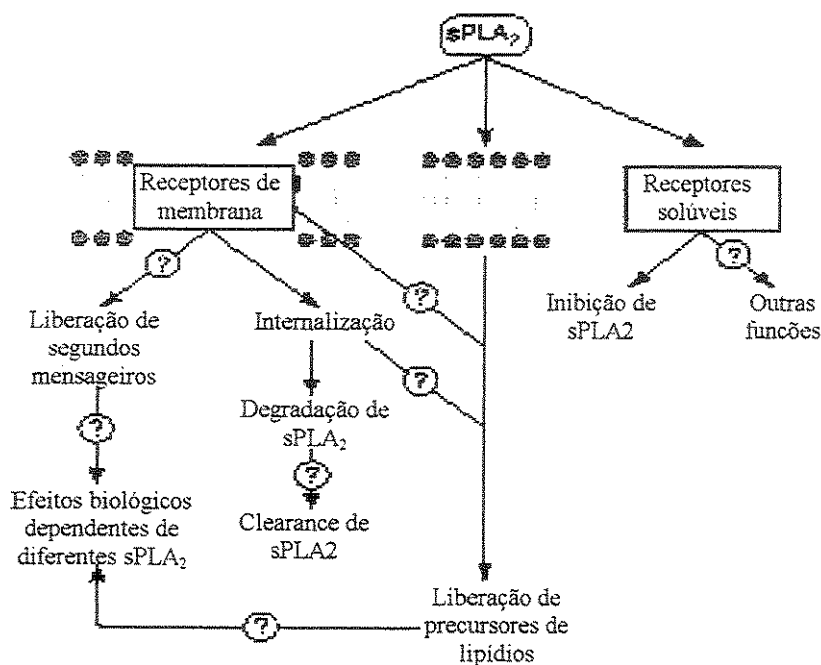
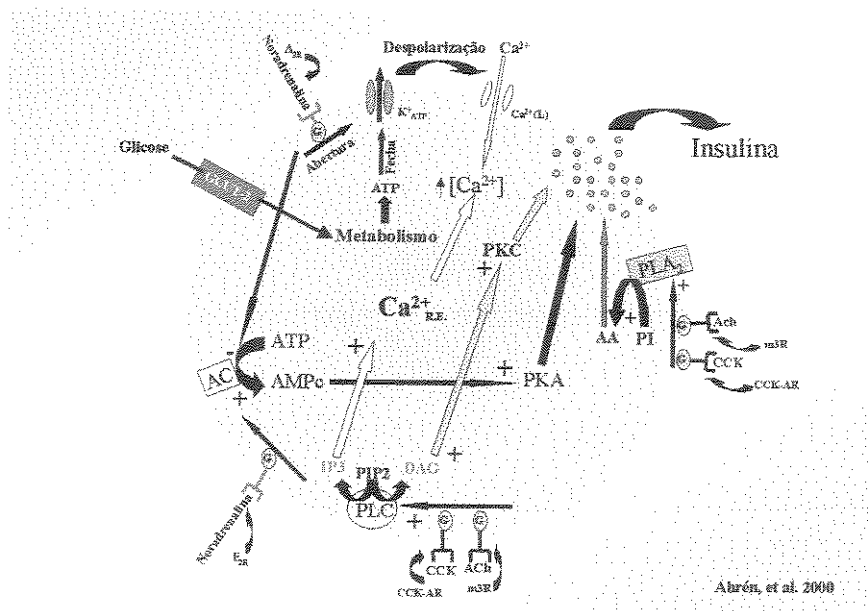


Figura 4 – Possíveis mecanismos de ação das sPLA₂.

SECREÇÃO DE INSULINA

A secreção de insulina estimulada por glicose e aminoácidos inicia-se com o reconhecimento e subsequente fosforilação e metabolização do nutriente pelas células beta, gerando um ou diversos sinais que levam à redução da permeabilidade ao K^+ . Esta diminuição provoca um acúmulo relativo do referido cátion nas células beta, com conseqüente despolarização da membrana e abertura dos canais de Ca^{+2} (L) sensíveis a voltagem (figura 5). O influxo de Ca^{+2} e o aumento da concentração de Ca^{+2} intracelular ($[Ca^{+2}]_i$) leva a ativação da maquinaria exocitótica, finalizando com a migração das vesículas armazenadoras de insulina em direção à membrana e subsequente extrusão do conteúdo granular para o líquido intersticial (Hadeskov, 1980; Wollhiem & Sharp, 1981; Sutter, 1982; Petersen & Findlay, 1987; Grodsky, 1989). Um efeito secundário do aumento da $[Ca^{+2}]_i$ é a ativação da adenilato ciclase (AC) e da fosfolipase C (PLC). A AC gera AMPc enquanto que a PLC hidrolizando fosfolípidios de membrana, gera diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5 trifosfato (IP_3).

Figura 5 -



Mecanismos de secreção de insulina.

Segundo Flatt (1996), o AMP_c e o DAG ativam respectivamente as quinases PKA e PKC. As enzimas AC e PLC são diretamente estimuladas por receptores de membrana específicos para hormônios e neurotransmissores.

As enzimas PKA e PKC agem de maneira sinérgica com a PKA atuando na velocidade de movimentação das vesículas contendo os grânulos de insulina e a PKC na localização das vesículas armazenadoras de insulina e da MLCK (quinase da cadeia leve da miosina), resultando na movimentação das vesículas armazenadoras para a periferia da célula beta (Wei et al., 2000).

As mudanças dos fluxos de K^+ são dependentes de dois tipos de canais: um de alta condutância (200-300 pS) ativado por Ca^{+2} e sensível à voltagem; e outro com condutância entre 50-80 pS, modulado pela relação ATP/ADP celular, chamado de canal K^+_{ATP} (Cook & Hales, 1984; Sturgess et al., 1986; Rajan, 1990).

O canal K^+_{ATP} é fundamental para a manutenção do potencial de repouso de célula beta (Ashcroft et al., 1984; Ashcroft, 1988). É ativado por diferentes substâncias desencadeadoras e/ou potencializadoras da secreção de insulina, tais como: sulfoniluréias, proteínas quinases, proteína G e neurotransmissores (Boschero et al., 1990; Sener et al., 1990; Jones et al., 1991; Fredholm et al., 1991; Caterrall & Epstein, 1992; Caterrall, 1995).

O canal de Ca^{+2} -dependente da voltagem ou L, é ativado em potencial de membrana entre -70 a -50 mV e se caracteriza por ser sensível as diidropiridinas.

O aumento da concentração intracelular de cálcio ($[Ca^{+2}]_i$) e de sua atividade citosólica depende principalmente do influxo de Ca^{2+} extracelular. Entretanto, a liberação de Ca^{2+} por frações subcelulares, essencialmente o retículo endoplasmático, tem função importante na atividade secretória da célula beta. A estimulação muscarínica promove um aumento substancial na $[Ca^{2+}]_i$. A acetilcolina induz formação de IP_3 , que age como mensageiro intracelular mobilizando o Ca^{2+} do retículo endoplasmático. O IP_3 e outros segundo mensageiros como AMPc, proteínas quinases e proteínas G também modulam os canais de Ca^{2+} , contribuindo para a amplificação da secreção de insulina (Zawalich, 1988; Brown & Birnbaumer, 1988; Rajan et al., 1989).

FOSFOLIPASE A_2 E SECREÇÃO DE INSULINA

As PLA_2 citosólicas dependente (c PLA_2) e independente de cálcio (i PLA_2) estão expressas na célula β (Jolly, Major & Wolf, 1992; Gross et al., 1993).

A presença de c PLA_2 em ilhotas de Langerhans foi demonstrada através de imunoreatividade (Loweth, Scarpello & Morgan, 1995; Parker et al., 1996), do estudo de

sua atividade (Jolly, Major & Wolf, 1992) e acúmulo de ácido araquidônico ou lisofosfatidilcolina nas células (Konrad et al., 1992a, b).

A importância funcional da cPLA₂ durante a secreção de insulina foi demonstrada em experimentos nos quais observou-se que: 1) a atividade da PLA₂ acompanha o metabolismo da glicose (Laychock, 1982); 2) a inibição farmacológica da cPLA₂ bloqueia a secreção de insulina estimulada por glicose (Konrad et al., 1992a, b; Loweth, Scarpello & Morgan, 1996) e 3) administração de cPLA₂ promove liberação de insulina (Zawalich & Zawalich, 1985).

Gross et al. (1993) demonstraram que iPLA₂ também é expressa em célula B e, a exemplo da cPLA₂ esta situada no citosol. Esta iPLA₂ é ativada por ATP formado a partir do metabolismo da glicose e potencializa a secreção de insulina (Gross et al., 1993; Jolly, Major & Wolf, 1993; Ramanadhan et al., 1994)

Propõe-se que além da glicose (Laychock, 1982; Loweth, Scarpello & Morgan, 1996) potencializadores da secreção de insulina, tais como a colecistoquinina-8 (CCK-8) e o carbacol (Konrad et al., 1992; Simonsson, Karlsson & Åhrén, 1998) ativariam as PLA₂ das ilhotas pancreáticas, que por sua vez hidrolizaria fosfolípidios de membrana levando a um acúmulo de ácido araquidônico e assim a amplificação da secreção de insulina (Turk, Wolf & McDaniel, 1987; Turk, Gross & Ramanadham, 1993). O carbacol e CCK-8 ativam a cPLA₂ enquanto que somente a CCK-8 ativa a iPLA₂ (Simonsson, Karlsson & Åhrén, 1998).

A iPLA₂ da ilhota pancreática possui um domínio que se liga à proteínas integrais de membrana, incluindo algumas que regulam o fluxo iônico através da membrana, o que sugere sua participação na regulação do fluxo transmembrana de íons em células B estimuladas com glicose (Ramanadham et al., 1997).

Por serem proteínas cataliticamente ativas, de um modo geral associadas a membrana plasmática ou membrana de organelas citoplasmáticas, acredita-se que a cPLA₂ e a iPLA₂ estariam envolvidas no metabolismo de fosfolípidios de membrana, transdução de sinal celular e participação no controle fisiológico de outros mecanismos.

Como dito anteriormente, há presença desta iPLA₂ em células beta e supõe-se atualmente que ela age como sensor para glicose unindo alterações do metabolismo glicolítico à formação de eicosanóides ativos, facilitando desta forma a secreção de insulina

estimulada por glicose. Atualmente já se sabe que os mecanismos pelos quais potencializadores como a CCK-8 e o carbacol, estimulam a secreção não são apenas mediante estimulação de PLC e conseqüentemente ativação de PKC, mas também por outras vias de transdução de sinais. Desta forma, acredita-se que estimulação seja em parte devido à ativação da iPLA₂ (Ramanadham et al., 1999)

A maior parte dos estudos com a crotoxina de venenos de serpentes e/ou suas sub-unidades (PLA₂ e crotapotina) foram realizados na junção neuromuscular, e pouco se sabe a respeito da ação exercida em outros tecidos e em especial no mecanismo de secreção de diferentes hormônios.

Diante da homologia entre as sPLA₂ (PLA₂ secretadas) extraída dos venenos e das cPLA₂ e iPLA₂ (PLA₂ citosólicas dependente e independente de cálcio) de mamíferos, além da considerável facilidade na obtenção destas através de purificação e fracionamento de venenos de animais, seria de grande relevância utilizá-las com intuito de avaliar possíveis mecanismos fisiológicos e processos metabólicos, em particular os mecanismos envolvidos no processo de acoplamento, estímulo, e secreção de insulina, que possam posteriormente ser transcendido para os mamíferos e principalmente o ser humano.

OBJETIVO

Neste trabalho investigou-se o papel da crotoxina-like, extraída do veneno da cascavel *Crotalus durissus collilineatus* com enfoque na sua subunidade básica, a PLA₂, sobre a secreção de insulina de ilhotas de Langerhans de ratos, visando elucidar os mecanismos que estariam envolvidos na modulação da secreção de insulina estimulada e/ou potencializada pela PLA₂, em presença de diferentes agentes que interferem no processo de acoplamento e estímulo do processo de secreção de insulina.

MATERIAIS E MÉTODO

ANIMAIS

Ratos Wistar machos, pesando entre 250 a 300 g, foram utilizados em todos os experimentos. Os ratos foram alojados, pelo menos por uma semana, no biotério de manutenção do Departamento de Fisiologia da UNICAMP, em gaiolas coletivas. Ração e água foram fornecidas *ad libitum*.

SOLUÇÕES

As soluções estoques comumente empregadas nos experimentos obedeceram as seguintes composições:

Solução Hanks Utilizada para isolamento das ilhotas. NaCl: 8.00 g/l, KCl: 0.40 g/l, CaCl₂: 0.14 g/l, MgSO₄.7H₂O: 0.20 g/l, NaH₂PO₄: 0.48 g/l, KH₂PO₄: 0.06 g/l, NaHCO₃: 0.35 g/l, H₂O (qsp): 1.00 L.

Solução de HEPES-bicarbonato: Utilizada para dissolver o Ficoll, foi preparada no momento do uso e constituída por volumes iguais das soluções I, II (sem bicarbonato), III e água, acrescentando-se HEPES a 1.2 mM e NaHCO₃ a 1mM e pH ajustado para 7.4, *Solução I:* NaCl a 0.460M; *Solução II:* NaHCO₃ 0.096M, KCl 0.02M, MgCl₂.6H₂O; *Solução III:* CaCl₂.2H₂O 2.56mM. No momento de utilização das soluções a composição iônica final foi de: 141.5 mM de Na⁺, 5.8 mM de K⁺, 1.3 mM de Ca²⁺, 0.8 mM de Mg²⁺, 143.6 de Cl⁻, 4.2 mM de HCO₃⁻, 0.3 mM de HPO₄²⁻, 0.8 mM de SO₄²⁻ e 0.4 mM de H₂PO₄⁻ para solução de Hanks; e 139.0 mM de Na⁺, 5.0 mM de K⁺, 2.5 mM de Ca²⁺, 1.0 mM de Mg²⁺, 123.6 mM de Cl⁻, e 10 mM de HCO₃⁻ e 15 mM de HEPES, para a solução de Krebs. Para todos os protocolos, quando necessário, o pH e osmolaridade das soluções foram corrigidos.

Soluções de Ficoll: Utilizadas para a separação das ilhotas do material exócrino nas concentrações de 27% , 21% e 10.8%. Preparada no momento do uso com tampão HEPES-bicarbonato.

Solução tampão fosfato para radioimunoensaio: *Solução I:* Na₂HPO₄ 0.2M; *Solução II:* NaH₂PO₄.H₂O 0.25M; *Solução III:* 161mL solução I + 39mL solução II + 800mL H₂O destilada + 0.1g Na azida. A partir da solução III acrescenta-se, no momento do uso, 0.9g NaCl e 0.5g de albumina para cada 100mL e ajustar o pH para 7.4 com NaOH.

Tampão de extração (extrato total): Utilizada para a extração de proteínas celulares dos tecidos estudados. Trisma base 100mM, EDTA 10mM, SDS 10%, fluoreto de sódio

100mM, pirofosfato de sódio 10mM, ortovanadato de sódio 10mM, água deionizada. A solução foi mantida a 4°C, sendo que o ortovanadato, o PMSF e a aprotinina foram acrescidos no momento do uso.

Tampão de Laemmli (5x): Usado para estocar o material extraído e sua posterior aplicação no gel de poliacrilamida para eletroforese (SDS-PAGE). Azul de bromofenol 0.1%, fosfato de sódio 1M pH 7.0, glicerol 50% e SDS 10%.

Solução tampão utilizada na eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE): Trisma base 200mM, glicina 1.52M, EDTA 7.18mM e SDS 0.4%. Para uso, a solução foi diluída 1:4.

Solução tampão para transferência: empregada para a transferência das proteínas separadas no SDS-PAGE para a membrana de nitrocelulose. Trisma base 25mM, glicina 192mM, metanol 20% e SDS 0.02% para facilitar a eluição de proteínas de alto peso molecular. Foi estocada a 4 °C antes do uso.

Solução tampão para SDS-PAGE – Gel de resolução (*resolving*): Tampão composto de EDTA 4mM, SDS 2%, Trisma base 50mM, com pH ajustado para 6.7 com ácido fosfórico.

Solução tampão para SDS-PAGE – Gel da fase de empilhamento (*stacking*) das proteínas: EDTA 4mM, SDS 2%, Trisma base 50mM, com pH ajustado para 6.7 com ácido fosfórico.

Solução basal: Solução básica utilizada para o manuseio da membrana de nitrocelulose após transferência das proteínas, contém: cloreto de sódio 150mM, Trisma base 10mM, Tween 20 a 0.02%.

Solução bloqueadora: Utilizada para incubar a membrana de nitrocelulose, após a transferência. 5% de leite em pó desnatado e azida sódica 0.02%, dissolvidos em solução basal.

Solução para anticorpos: Solução contendo anticorpos específicos que marcaram as proteínas transferidas para a membrana de nitrocelulose; 0.3% de leite em pó desnatado e azida sódica 0.02%, diluídos em solução basal. O anticorpo utilizado foi: antifosfotirosina (Santa Cruz).

Solução com proteína A marcada com ^{125}I : Permite a visualização das bandas em autoradiografia, contém 0.1% de leite desnatado, dissolvido em solução basal com 10 μl de proteína A ^{125}I (100 μCi).

Líquido de cintilação: Tolueno: 70%, Tinovetin: 30% e Omnifluor: 400mg/ml.

CARACTERIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA PLA₂

A PLA₂ foi isolada e purificada segundo método descrito por Toyama et al, (2002).

ISOLAMENTO DE ILHOTAS DE LANGERHANS E GRADIENTE DESCONTÍNUO DE FICOLL

Os ratos foram sacrificados por decapitação. Após incisão abdominal e oclusão da extremidade do ducto biliar comum, inseriu-se uma cânula através de uma pequena incisão na parte proximal (hepática) deste ducto. Através da cânula de polietileno, foi injetada solução de Hanks contendo 2.8 mM de glicose e collagenase 1 mg /mL, que promoveu a divulsão do tecido acinoso. O pâncreas foi excisado e dissecado de gorduras, do tecido vascular e dos gânglios linfáticos. A seguir, foi reduzido a fragmentos pequenos que foram transferidos para um tubo de ensaio (50 ml) contendo Hanks e collagenase (Boehringer Mannheim Biochemicals, USA). Em seguida, os fragmentos foram incubados em banho-maria a 37°C durante aproximadamente 18 min. Após o período de incubação, o tubo foi agitado manualmente por aproximadamente 1 min ou até a obtenção de mistura de viscosidade homogênea. O conteúdo foi transferido para um Becker e o material foi lavado com solução de Hanks, 4 vezes, para a remoção da collagenase, das enzimas digestivas liberadas durante a incubação e também dos fragmentos celulares.

O material isolado foi transferido para 2 tubos cônicos de 50 mL (falcon) em quantidades iguais e centrifugados por 1 min a 1000 rpm (*Centrifuges SORVALL RT 7*). Retirado o sobrenadante, acrescentou-se solução de Ficoll a 27%, seguida de agitação para homogeneização do material. Sobre a solução de 27% acrescentou-se a solução de 21% lentamente, para a formação das diferentes fases do Ficoll e por fim acrescentou a solução de 10.8%. A seguir os tubos foram centrifugados a 2000 rpm por 10 min. Após a centrifugação, com auxílio de pipeta Pasteur, o material localizado entre as camadas foi transferido para 2 novos tubos cônicos e lavados por três vezes com a 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 Ependorffs, com auxílio de uma pipeta Pasteur, e submetidas às condições experimentais.

SECREÇÃO ESTÁTICA DE INSULINA

As ilhotas coletadas foram transferidas para placas de cultura com 24 reservatórios contendo 0.5 ml de solução Krebs, suplementada com 0.5% de albumina bovina (m/v) e 5.6 mM de glicose. Em todos os experimentos 5 ilhotas foram colocadas em cada reservatório. A seguir as placas foram acondicionadas em banho-maria a 37 °C e mantidas em ambiente controlado (umidificado e gaseado com carbogênio). Inicialmente as ilhotas foram pré-incubadas por 1h em solução de Krebs modificada, pH 7.4 com HEPES 10mM, contendo 5.6 mM de glicose. A solução foi rapidamente removida e substituída por nova solução de Krebs modificada com 2.5 mM de Ca^{+2} e incubadas durante 1h em presença de diferentes agentes moduladores da secreção, na presença ou ausência de diferentes concentrações de crotoxina-like, crotapotina e PLA_2 . Após 1h de incubação, as placas foram resfriadas em banho de gelo e o sobrenadante removido, transferido para tubos de ensaio e armazenado a -20 °C para posterior dosagem de insulina.

DOSAGEM DE INSULINA

A insulina secretada durante os diferentes experimentos “in vitro” foi determinada por radioimunoensaio. Para isso transferiu-se 0.1 ml das amostras desconhecidas (em duplicata) as quais receberam a seguir 0.2 ml de uma solução contendo anticorpo anti-insulina (1:200) e insulina marcada com ^{125}I (traçador) em tampão fosfato pH 7.4, acrescido de NaCl 0.9 % e albumina 0.5 %. Em seguida foram preparados os seguintes controle:

- a) 3 tubos (Totais) que receberam somente 0.2 ml do tampão fosfato contendo insulina marcada ^{125}I para averiguação da radiação máxima.
- b) 3 tubos (Ligação não específica) contendo 0.2 ml do tampão fosfato contendo insulina marcada ^{125}I e 0.1 ml de tampão fosfato, para determinar possíveis interferências no ensaio pelos componentes do tampão.

c) 3 tubos (Referência) contendo 0.2 ml de solução tampão fosfato contendo insulina marcada com ^{125}I e anticorpo anti-insulina e 0.1 ml de tampão fosfato, constituindo assim o zero de insulina da curva padrão.

Em seguida preparou-se, também em triplicata, uma série de tubos (curva padrão), contendo 0.1 ml de insulina conhecida nas seguintes concentrações: 0.02; 0.039; 0.078; 0.16; 0.31; 0.63; 1.25; 2.5; e 5.0 ng/ml. Cada tubo dessa série recebeu também 0.2 ml de solução tampão fosfato contendo insulina marcada ^{125}I e anticorpo anti-insulina. No final da preparação dos tubos (amostras, controle e curva padrão), eles foram agitados em vortex e estocados a 4 °C, durante 48 h.

Após este período de incubação, com exceção dos totais para análise da radiação máxima, todos os outros tubos receberam 0.2 ml de uma solução contendo 2.5 % de carvão (Norit A), 0.5 % de albumina e 0.25 % de dextran T 70. Os tubos foram deixados em repouso durante 20 min e a seguir centrifugados durante 20 min (2800 rpm) a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e a radioatividade contida em cada tubo avaliada em contador de radiação gama. Os 3 tubos elaborados para análise da radiação máxima não tiveram o sobrenadante descartado, sendo a radiação dos mesmos avaliada diretamente. Com bases nos valores obtidos nos tubos contendo insulina conhecida elaborou-se uma curva padrão que foi utilizada para a avaliação dos valores desconhecidos das amostras. Os resultados foram expressos em ng/mL de insulina secretada durante os experimentos “*in vitro*”.

METABOLISMO DA GLICOSE

A oxidação da glicose nas ilhotas isoladas foi avaliada através da determinação da oxidação da D-[U- ^{14}C]glicose em $^{14}\text{CO}_2$ (MALAISSE et al., 1974). Para isso, grupos de 15 ilhotas foram coletados e transferidos para tubos de ensaio com volume aproximado de 0.7 ml contendo solução de Krebs. A seguir o meio de coleta foi descartado sendo introduzido 75 μl do meio de incubação (solução de Krebs) contendo 2.8 ou 16.7 mM de glicose, PLA_2 (1 $\mu\text{g/ml}$) e traços de D-[U- ^{14}C]glicose (10 $\mu\text{Ci/ml}$). Paralelamente, preparou-se para cada condição experimental, 3 tubos-controle que receberam os respectivos meios de incubação com a glicose marcada, porém sem as ilhotas (correspondeu ou BG). Os tubos de ensaio foram introduzidos em frascos maiores (suportes), hermeticamente fechados com tampas de

borracha e incubados durante 120 min a 37 °C sob constante agitação, sendo o pH 7.4 equilibrado com carbogênio durante os primeiros 10 min.

Após o período de incubação, foram adicionados aos tubos de ensaio 0.1 ml de uma solução de HCl a 0.1 N, para interromper a oxidação, e 0.5 ml de NaOH 1.0 N nos frascos suportes para a captação do $^{14}\text{CO}_2$ liberado no meio. Para que todo o $^{14}\text{CO}_2$ liberado no meio fosse captado pelo NaOH, os frascos suportes foram agitados durante 60 min à temperatura ambiente. Após este período, os tubos contendo as ilhotas e os controles foram descartados. Foram preparados, também, 3 frascos denominados MAX, onde se introduziu 1.0 µl dos respectivos meios de incubação. Todos os frascos receberam 10 ml de líquido de cintilação e a radioatividade de cada frasco foi medida em um contador de radiação beta.

Através da equação:

$$F = \frac{\{G\} \times 10^{-3}}{15 \times \text{cpm (MAX)}}$$

obteve-se o fator F que multiplicado pelo número de cpm de cada amostra propiciou a quantidade em pmol de glicose oxidada durante 120 min por ilhota.

Na equação:

[G] = concentração molar da glicose no meio de incubação;

15 = número de ilhotas em cada tubo de ensaio;

cpm (MAX) = número de radiações por min obtido em 1 µl do meio de incubação.

CAPTAÇÃO DE ^{45}Ca

Grupos de 180 a 200 ilhotas distribuídos em 3 tupos Eppendorfs foram pré-incubados, por 30 min em solução de Krebs, tamponado com 10 mM de HEPES, pH 7.4, contendo 2.8 mM de glicose e gaseado com oxigênio puro. Após este período, as ilhotas foram incubadas por 5 ou 90 min, em 100 µl de solução de Krebs contendo $^{45}\text{CaCl}_2$ (60 µCi/ml) e glicose em concentrações crescentes (2.8 e 16.7 mM) e PLA_2 (6µg/ml). Após incubação, o sobrenadante de cada frasco foi transferido para outros três tubos Eppendorfs,

para posterior preparo do padrão externo ou máximo (MAX). Imediatamente após retirada do sobrenadante das diferentes situações experimentais (5 ou 90 min de incubação), a reação foi interrompida pela adição, em cada tubo eppendorf, de 0.9 ml de solução de LaCl_3 a uma concentração final de 2.0 mM, a 0 °C e pH 7.4. Os tubos contendo as ilhotas e a solução de LaCl_3 foram mantidos durante 60 min a 0 °C. O sobrenadante foi descartado e as ilhotas lavadas 3 vezes com a solução de LaCl_3 a 0 °C. As ilhotas foram, então, transferidas para placas de Petri pequenas (5 cm de diâmetro), recoletadas em grupos de 10 e transferidas para frascos de polietileno contendo 0.5 ml de solução de EGTA (0.5 mM). De cada uma das placas de Petri, foi tomado um volume de líquido igual ao transportado junto com as ilhotas durante a coleta (em duplicata). Esse volume, serviu para a avaliação da radioatividade contida no meio (BG).

O valor do MAX foi obtido através da avaliação da radioatividade contida em 1 µl do sobrenadante radioativo (meio de incubação), em triplicata, para cada situação experimental. A cada frasco de polietileno foi adicionado 6 ml de líquido de cintilação, sendo a radioatividade medida em contador de partículas beta. A quantidade de cálcio incorporado por ilhota foi calculada pela multiplicação de um fator F pelo número de cpm de cada frasco, após a subtração do (BG) correspondente.

O fator F foi obtido pela seguinte equação:

$$F = \frac{40000}{\text{cpm do MAX} \times 10}$$

Na fórmula:

40000 = quantidade em picogramas de Ca^{2+} contida em 1.0 µl do meio de incubação (conc.do Ca^{2+} = 1.0 mM);

cpm(MAX) = número de radiações por min obtido em 1.0 µl do meio de incubação;

10 = número de ilhotas em cada frasco

Os resultados foram expressos em picomol Ca^{2+} /ilhotas por min. Para isso, foram divididos os valores obtidos em picogramas pelo peso molecular do Ca^{2+} .

EFLUXO DE ÁCIDO ARAQUIDÔNICO

As ilhotas foram incubadas durante 24h em 10 ml de meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2.05 mM de L-glutamina, 100 IU/ml de penicilina, 100µg/ml de estreptomicina e 4 µCi de $[3\text{H}]\text{AA}$ (atividade específica: 209Ci/mmol)

Após cultura de 24 horas as ilhotas foram lavadas três vezes com solução Krebs HEPES-Bicarbonato (pH 7.4). Grupo de 25 ilhotas foram transferidas para reservatórios em placas de cultura (24 well) e incubadas durante 1h em 700µl de solução Krebs contendo 0.5 ou 5.6 µg/ml de PLA_2 e diferentes concentrações de glicose (37 °C, pH 7.4, 5% CO_2).

Após incubação o valor do efluxo máximo foi obtido através da avaliação da radioatividade contida em 500 µl do sobrenadante radioativo (meio de incubação). A cada frasco de polietileno foi adicionado 4 ml de líquido de cintilação, sendo a radioatividade medida em contador de partículas beta. Também foi determinado o conteúdo radioativo máximo das ilhotas. Além disto, 100 µl do meio foi estocado em -20 °C para posterior dosagem de insulina. O efluxo de ácido araquidônico foi obtido através da radioatividade contida no meio, após 1h de incubação, dividida pela radioatividade total das ilhotas.

DOSAGEM DE NUCLEOSSOMOS

A quantidade de DNA fragmentado foi dosada através do Kit da Calbiochem – Nucleosome ELISA. Os nucleossomos foram detectados por anticorpo Anti-Histona (reação feita em placa de ELISA). Esta reação é medida devido à formação de um substrato cromogênico entre o complexo DNA-antihistona e a estreptovidina peroxidase. A leitura da placa de ELISA foi feita em 450/595 nm. Os resultados foram comparados com a curva padrão de nucleossomos fornecida pelo Kit.

EXTRATO TOTAL

Imediatamente após a incubação das ilhotas com 2.8 e 16.7 mM de glicose em presença ou não de PLA_2 , foram acrescentados 200µL do tampão de extração e as ilhotas foram homogeneizadas durante 30 segundos com processador do tipo *polytron*. As

amostras receberam 30 μ L de triton (detergente não iônico) a 10% e foram armazenadas a 4 °C. Determinação prévia da quantidade de proteína do sobrenadante foi processada pelo método do biureto.

Volumes das amostras com a mesma concentração protéica foram tratadas com tampão de Laemmli (Laemmli, 1970) contendo 100 mM de DTT, aquecidas em água fervente por 5 min e centrifugadas por 1 min. As proteínas foram aplicadas sobre gel poliacrilamida (SDS-PAGE), de 2mm de espessura. Em paralelo aplicou-se uma amostra padrão de proteínas de pesos moleculares conhecidos. A eletroforese foi realizada em cuba de minigel da *Bio Rad* (mini-protean), com solução tampão para eletroforese, previamente diluída. O SDS-PAGE foi submetido a 25 volts, inicialmente, até a passagem da linha demarcada pela fase de empilhamento (*stacking*) e 120 volts até o final do gel de resolução (*resolving*). A seguir, as proteínas separadas no SDS-PAGE, foram transferidas para a membrana de nitrocelulose. Para isso utilizou-se o equipamento de eletrotransferência da *Bio Rad* com as membranas embebidas em solução tampão de transferência, mantidas em voltagem constante de 120 volts por 2 horas, sob baixa temperatura.

As membranas de nitrocelulose contendo as proteínas transferidas foram incubadas em solução bloqueadora overnight a 4°C, para diminuir a ligação inespecífica de proteínas. A seguir, as membranas foram lavadas com solução basal três vezes por 10 min, e incubadas com anticorpo antifosfotirosina, diluído em solução tampão por 4 h, a temperatura ambiente sob agitação constante, ou durante uma noite a 4°C. Então foram lavadas novamente 3 vezes por 10 min com solução basal, e incubadas a seguir em solução com proteína A, marcada com ^{125}I , durante 2h a temperatura ambiente.

O complexo anticorpo- $[\text{I}^{125}]$ proteína A foi detectado por Storage Phosphor Screen. A membrana foi armazenada a -20°C por aproximadamente 3 horas dentro de um cassete apropriado e revelado através do sistema Cyclone Storage Phosphor System (Perkin Elmer Life Sciences Inc, Boston, USA).

A intensidade das bandas foi determinada através da leitura das auto-radiografias reveladas por densitometria óptica, utilizando o programa Scion Image.

REAGENTES

Metano hidroximetilamina (TRIS), fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF), aprotinina, ditioneitol (DTT), etilenediamina ácido tetra acético (EDTA), Triton X-100, Tween 20, glicerol, collagenase tipoV, Ficoll, HEPES, BSA (albumina do soro bovino), e o meio de cultura RPMI 1640 foram fornecidos pela *Sigma Chemical Co.* (St. Louis, Mo., USA). [³H] Ácido Araquidônico, Proteína A e Insulina Humana marcadas com iodo radioativo (¹²⁵I) foram adquiridas da *Amersham* (Amersham, UK), e a proteína A Sepharose 6 MB da *Pharmacia* (Uppsala, Suécia). A membrana de nitrocelulose (*Hybond ECL*, 0.45µm) foi obtida da *Amersham* (Aylesbury, UK). O soro fetal bovino e o antibiótico foram fornecidos pela Nutricell.

O veneno bruto da *Crotalus durissus collilineatus* foi adquirido junto ao Instituto Butantan, São Paulo e CEVAP-UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil, e purificado e caracterizado no laboratório de química de proteínas, IB-UNICAMP.

MATERIAIS

Para medição da radioatividade foram utilizados os contadores Gamma 5500 (Beckman) e Beta LS 6000TA (Beckman). A leitura de absorbância foi realizada através de leitor de Elisa (Labsystems).

Os aparelhos para a eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foram adquiridos da *Bio-Rad* (Richmond, CA).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados do procedimento com ilhotas isoladas foram apresentados como média $\pm$ SEM. Quando apropriado teste *t* de Student pareado ou não-pareado foram usados. Os programas InStat e Prisma (GraphPad Software) foram utilizados para a análise estatística e construção das curvas concentração-efeito com determinação da EC_{50} respectivamente. O nível de significância adotado foi $P < 0.05$.

RESULTADOS

Efeito da crotoxina-like sobre a secreção de insulina.

A **fig. 6** mostra a ação da crotoxina-like (5.6 µg/ml), proteína extraída do veneno da cascavel *Crotalus durissus collilineatus*, sobre secreção de insulina em ilhotas isoladas, incubadas durante 1h em presença de 2.8 ou 16.7mM de glicose. Em concentrações subliminares de glicose (2.8 mM) a secreção de insulina por ilhotas incubadas em meio contendo a crotoxina-like foi 2.7 vezes maior comparada com a secreção de ilhotas controle. Em presença de 16.7 mM de glicose o aumento da secreção induzido pela crotoxina-like foi 1.8 vezes maior que o controle.

Efeito da crotapotina sobre a secreção de insulina.

Com o intuito de avaliar qual fração da crotoxina-like estaria induzindo o aumento da secreção de insulina (**fig. 6**) avaliou-se a secreção de insulina de ilhotas incubadas na presença de 2.8 e 16.7mM de glicose e na ausência ou presença de 5.6 µg/ml de crotapotina conforme ilustrado na **fig. 7**. A potencialização da secreção, induzida pela crotapotina, foi significativa apenas em condições basais de glicose, sendo esta 2.7 vezes maior que a secreção do grupo controle.

Efeito da fosfolipase A₂ sobre a secreção de insulina.

O efeito de 5.6 µg/ml de PLA₂ (subunidade da crotoxina-like) sobre a secreção de insulina por ilhotas incubadas na presença de 2.8 ou 16.7mM de glicose. A PLA₂ aumentou a secreção de insulina tanto na condição basal (4.2 vezes em relação ao controle) como na presença de altas concentrações de glicose (1.9 vezes).

Efeito de concentrações crescentes de PLA₂ sobre a secreção de insulina.

A partir da análise das **Fig. 6, 7 e 8** fica claro que o efeito predominante em estimular a secreção de insulina está relacionado a PLA₂. Diante disso, avaliou-se o efeito de concentrações crescentes de PLA₂ (0.1 - 10µg/ml) sobre a secreção de insulina de ilhotas isoladas em presença de 16.7 mM de glicose (**fig. 9A**). Verificou-se que ocorre uma potencialização significativa da secreção de insulina somente para concentrações de PLA₂ superiores a 1 µg/ml. Os valores relativos de secreção de insulina estimulada com as diferentes concentrações de 0.1 – 0.3 – 1 – 3.3 – 6 – 10µg/ml de PLA₂ foi 1.1 – 1.9 – 2.7 –

3.3 – 3.8 – 4.0 vezes maior respectivamente, quando comparado em presença apenas de 16.7 mM de glicose. A **fig. 9B** mostra que esta secreção tende a estabilizar-se, a partir de 3.3 µg/ml, mesmo quando há um aumento da concentração de PLA₂ ($EC_{50} = 0.5 \pm 0.1$ µg/ml).

Efeito de concentrações crescentes de glicose em presença de PLA₂.

A presença de 1 µg/ml (**fig. 10A**) ou 5.6 µg/ml (**fig. 10B**) de PLA₂ potencializou a secreção de insulina em todas as concentrações de glicose utilizadas (2.8 – 8.3 – 16.7 – 22.7 e 27.7). O incremento na secreção de insulina na presença de 1 µg/ml de PLA₂ em diferentes concentrações de glicose foram respectivamente 5.9 – 7.5 – 1.9 – 1.8 e 2.3 vezes maior que seu respectivo controle. Já em presença de 5.6 µg/ml de PLA₂ este aumento foi 6.3 – 2.1 – 2.0 – 2.2 e 1.9 maior comparado ao seu controle. Observa-se que a diferença (Δ) entre os valores de secreção em presença ou não de PLA₂ é inversamente proporcional ao aumento das concentrações de glicose. Observou-se apenas um aumento da resposta máxima da secreção de insulina tanto em presença de 1 µg/ml quanto 5.6 µg/ml de PLA₂, não tendo sido observada diferença na EC_{50} de ambas as curvas com relação ao controle (somente glicose).

Efeito da PLA₂ sobre a viabilidade das ilhotas de Langerhans.

Ilhotas de Langerhans submetidas à pré-estimulação com (A) 2.8 mM de glicose, (B) 2.8 + PLA₂, (C) 16.7 e (D) 16.7 mM de glicose + PLA₂ (**fig. 11**) foram posteriormente lavadas com solução de Krebs contendo 5.6 mM de glicose e submetidas à novo período de incubação por 1 h na presença de 2.8 (A) e 16.7 mM de glicose (B, C e D). Observa-se que as ilhotas submetidas a 16.7 mM de glicose secretou mais insulina comparado à 2.8 mM de glicose. O aumento observado foi de 13, 23 e 20 vezes o controle, respectivamente, indicando a viabilidade das mesmas, ou seja, que a PLA₂ não danificou as ilhotas.

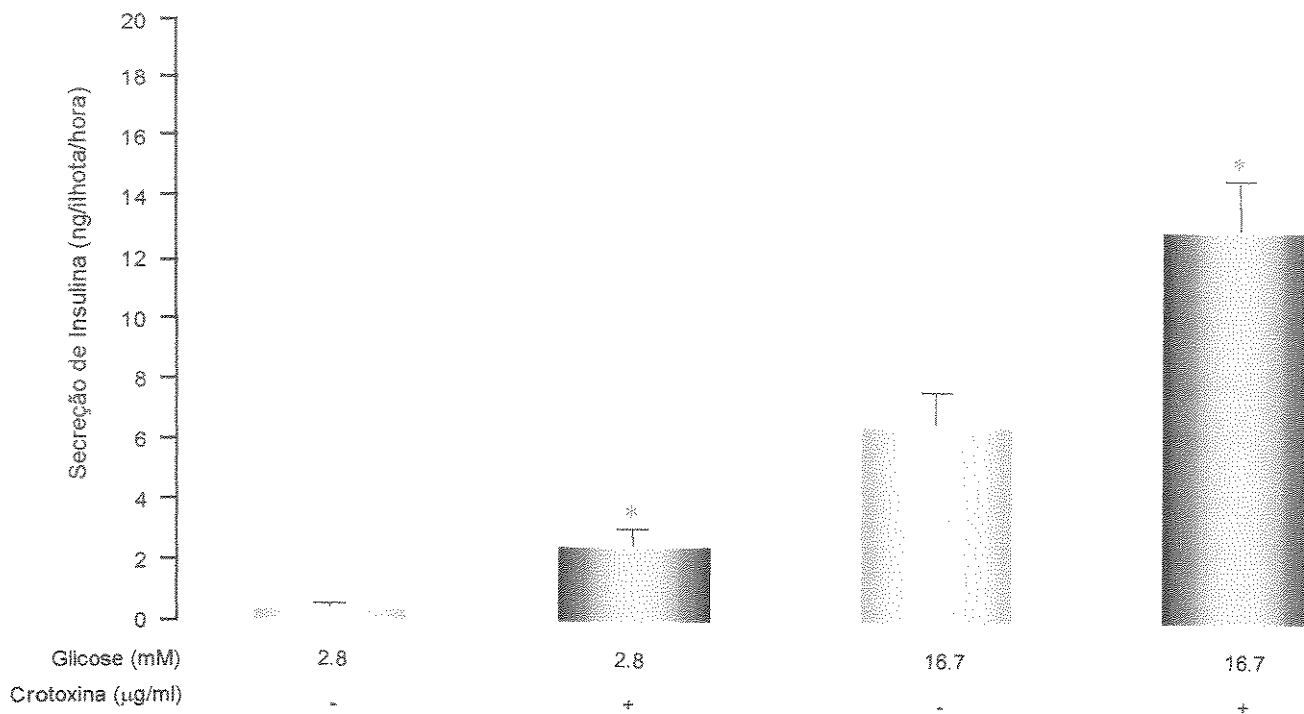


Figura 6 – Efeito de 5.6 µg/ml de crotoxina sobre a secreção de insulina de ilhotas isoladas (n=18), pré-incubadas por 1h em solução de Krebs modificada, pH 7.4 com HEPES 10 mM contendo m 5.6 mM de glicose e incubadas por 1h em solução de Krebs modificada com 2.5 mM de Ca^{2+} na presença de 2.8 ou 16.7 mM de glicose. A insulina acumulada foi quantificada através de radioimunoensaio.

Resultados expressos em média $\pm$ SEM.

* Diferença significativa em relação ao seu respectivo controle ($p < 0.05$).

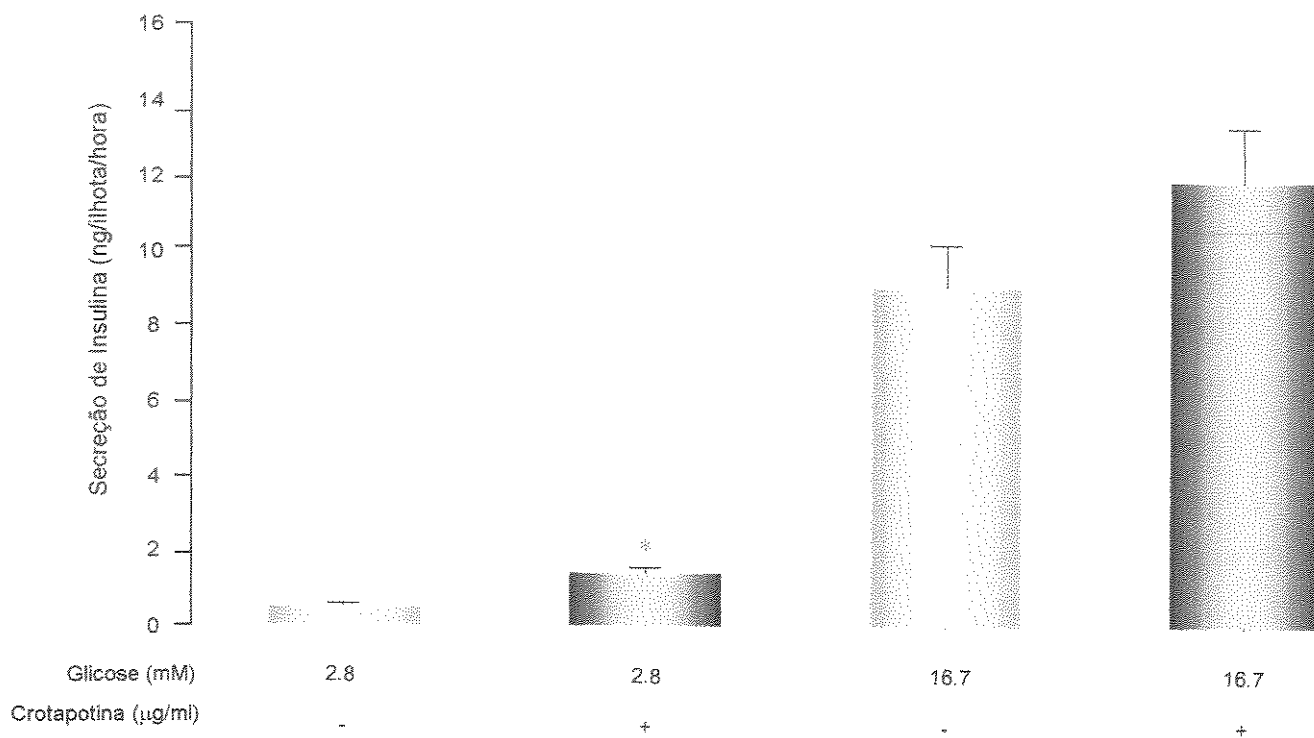


Figura 7 – Efeito de 5.6 µg/ml de crotonotoxina sobre a secreção de insulina de ilhotas isoladas (n=18), pré-incubadas por 1h em solução de Krebs modificada, pH 7.4 com HEPES 10 mM e contendo 5.6 mM de glicose e incubadas por 1h em solução de Krebs modificada com 2.5 mM de Ca^{2+} na presença de 2.8 ou 16.7 mM de glicose. A insulina acumulada foi quantificada através de radioimunoensaio.

Resultados expressos em média $\pm$ SEM.

* Diferença significativa em relação ao seu respectivo controle ($p < 0.05$).

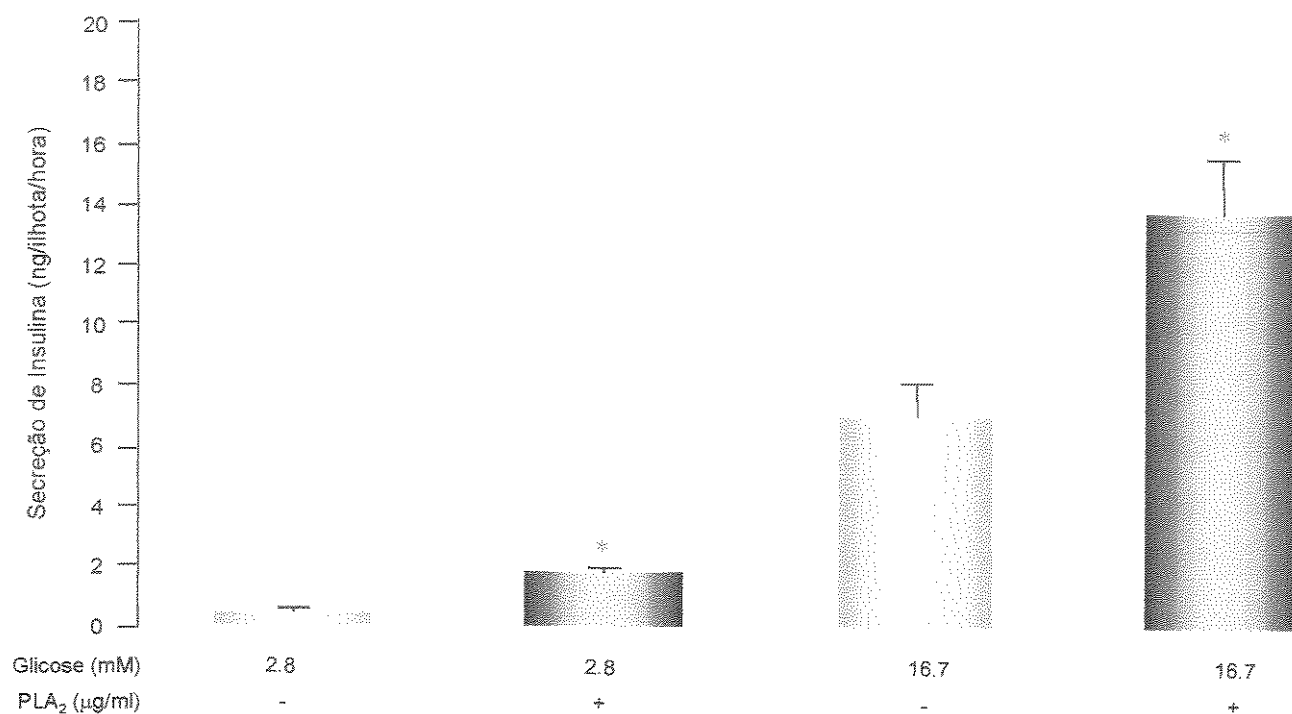


Figura 8 – Efeito de 5.6 $\mu\text{g/ml}$ de PLA₂ na secreção de insulina em ilhotas isoladas (n=24), pré-incubadas por 1h em solução de Krebs modificada, pH 7.4 com HEPES 10 mM contendo 5.6 mM de glicose e incubadas por 1h em solução de Krebs modificada com 2.5 mM de Ca²⁺ em presença de 2.8 ou 16.7 mM de glicose. A insulina acumulada foi quantificada através de radioimunoensaio.

Resultados expressos em média $\pm$ SEM.

* Diferença significativa em relação ao seu respectivo controle ($p < 0.05$).

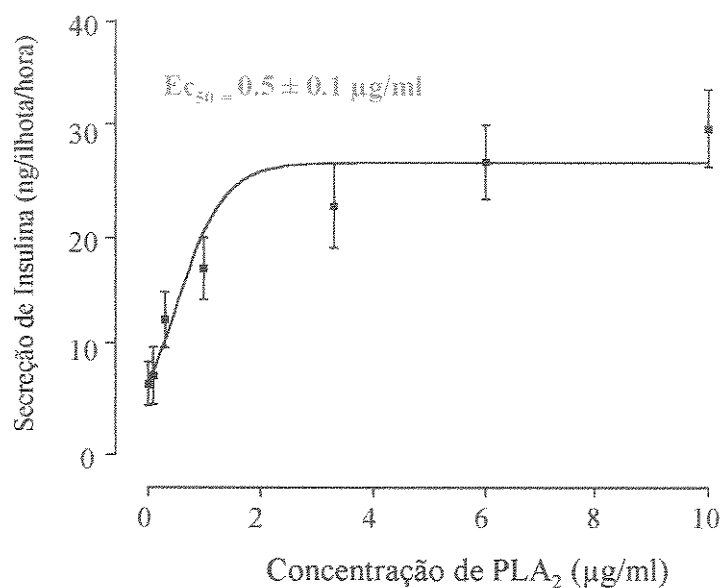
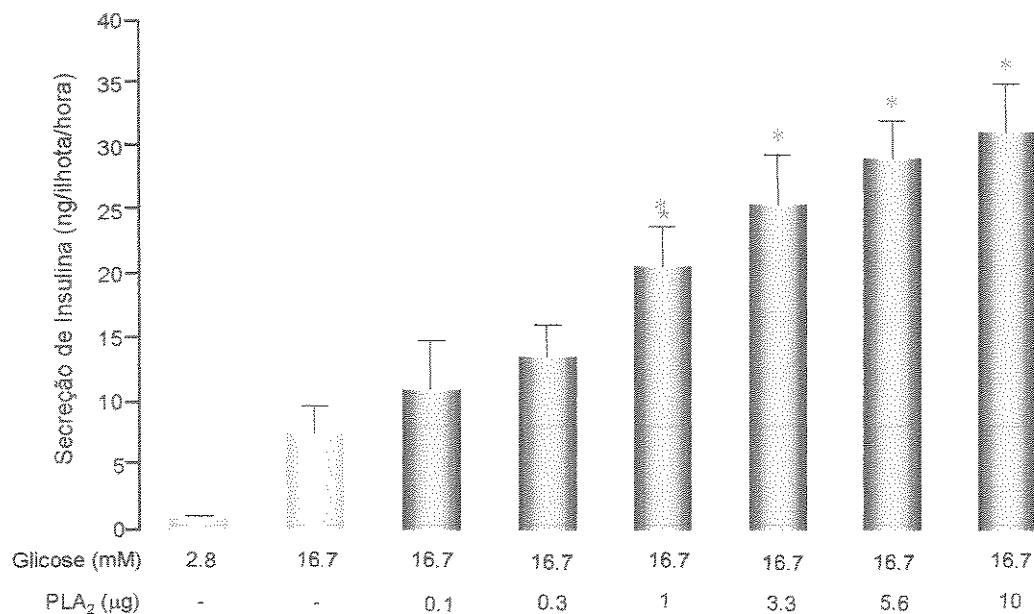


Figura 9A - Efeito de concentrações crescentes de PLA₂ (0,1µg/ml - 10µg/ml) sobre a secreção de insulina de ilhotas isoladas (n=12), pré-incubadas por 1h em solução de Krebs modificada, pH 7.4 com HEPES 10 mM, contendo 5.6 mM de glicose e incubadas por 1h em solução de Krebs modificada com 2.5 mM de Ca²⁺ em presença de 2.8 ou 16.7 mM de glicose. **Figura 9B** - Curva concentração-efeito confeccionada a partir dos valores absolutos de secreção, contidos na fig.2A. Os quadrados (■) representam a secreção de insulina em ng/ml e a curva sigmóide foi obtida por regressão não linear. 50% da resposta máxima foi observada a partir do log da EC_{50} .

Resultados expressos em média ± SEM.

* Diferença significativa em relação a 16.7 mM de glicose ($p < 0.05$).

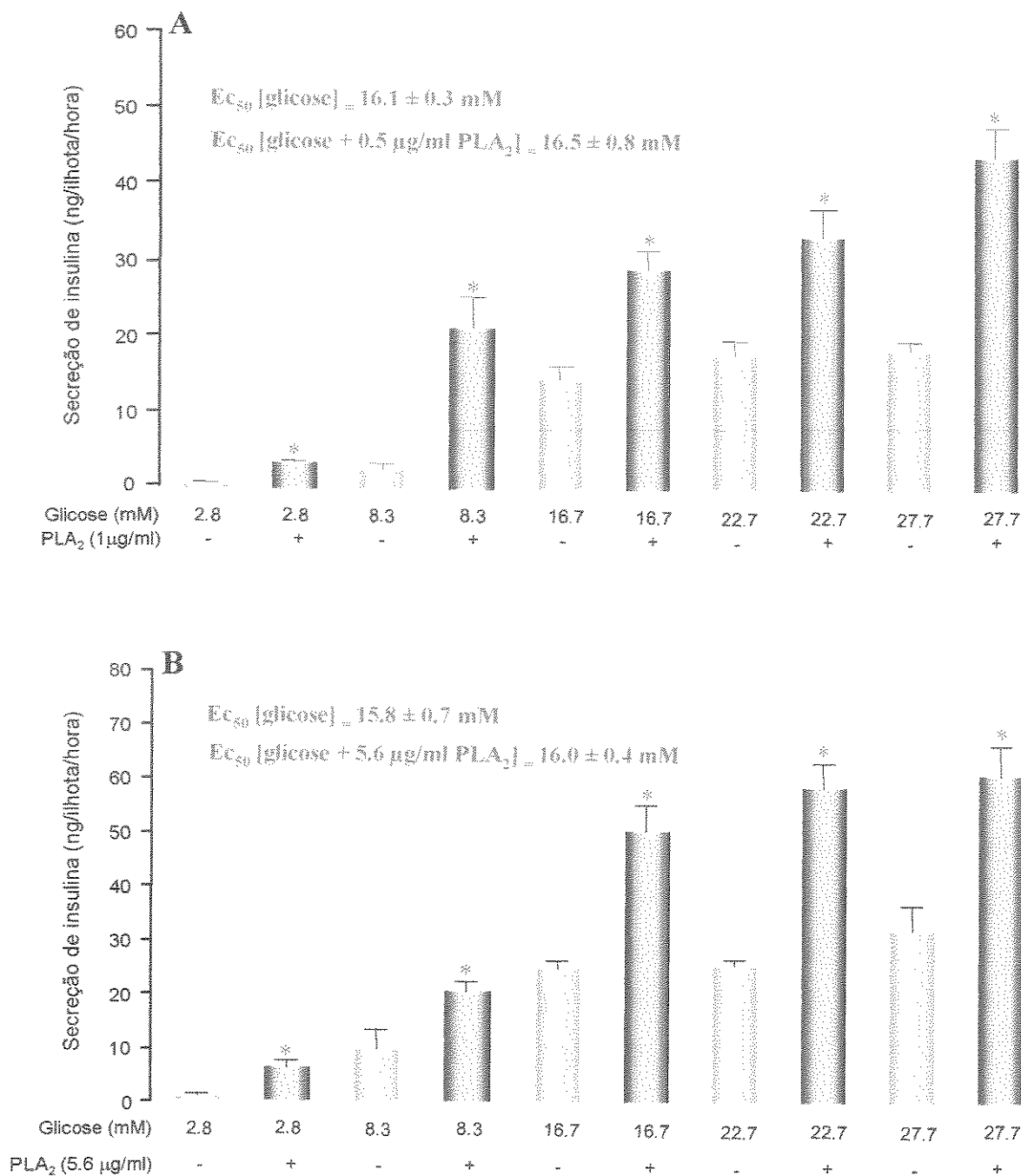


Figura 10A – Efeito de concentrações crescentes de glicose em ausência (barras claras) ou presença (barras escuras) de 1 µg/ml de PLA₂ sobre a secreção de insulina de ilhotas isoladas de ratos (n=6), pré-incubadas por 1h em solução de Krebs modificada, pH 7.4 com HEPES 10 mM e contendo 5.6 mM de glicose incubadas por 1h em solução de Krebs modificada com 2.5 mM de Ca²⁺ e as diferentes concentrações de glicose. A insulina acumulada foi quantificada através de radioimunoensaio. **Figura 10B** – Efeito de concentrações crescentes de glicose em ausência (barras claras) ou presença (barras escuras) de 5.6 µg/ml de PLA₂ sobre a secreção de insulina de ilhotas isoladas de ratos (n=6), pré-incubadas por 1h em solução de Krebs modificada, pH 7.4 com HEPES 10 mM e contendo 5.6 mM de glicose incubadas por 1h em solução de Krebs modificada com 2.5 mM de Ca²⁺ e as diferentes concentrações de glicose. A insulina acumulada foi quantificada através de radioimunoensaio. Resultados expressos em média ± SEM.

* Diferença significativa em relação ao seu respectivo controle ($p < 0.05$).

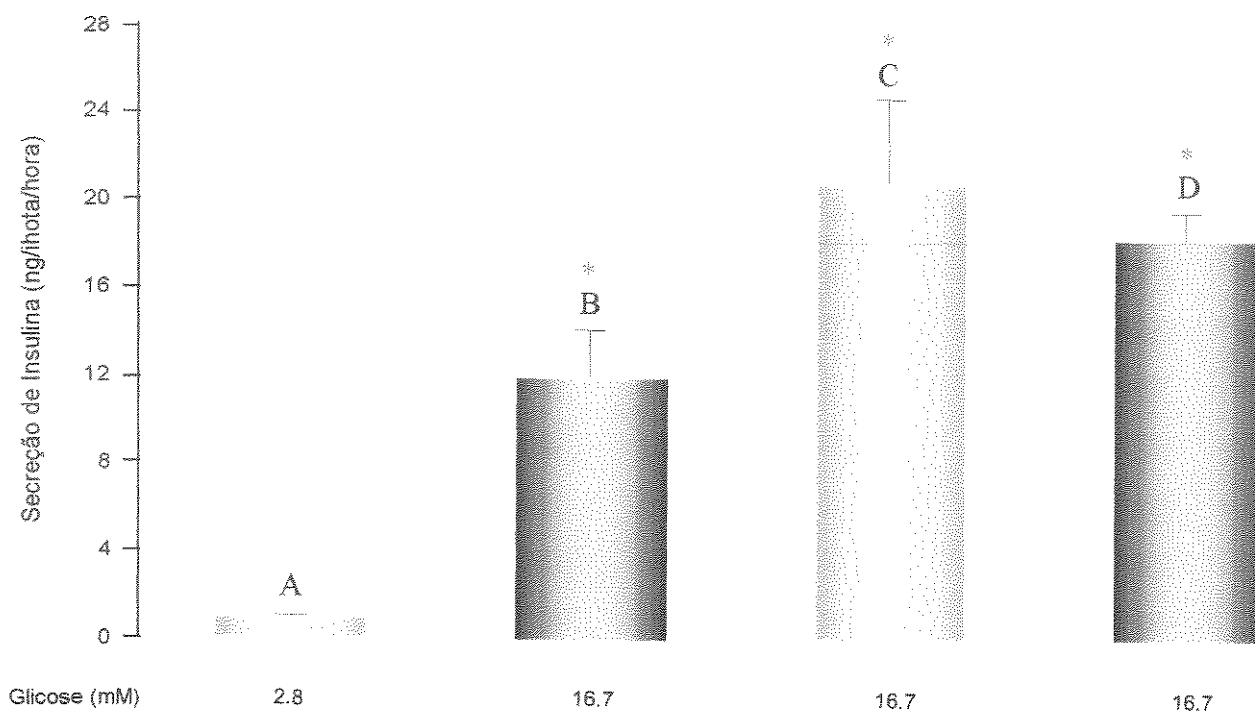


Figura 11 – Efeito da exposição prévia a PLA_2 . As ilhotas do grupo **A** e **C** foram expostas a glicose 2.8 e 16.7 e as ilhotas do grupo **B** e de **D** foram expostas as mesmas concentrações de glicose associadas com 5.6 $\mu\text{g/ml}$ de PLA_2 durante 1h. Após este período as ilhotas dos 4 grupos foram lavadas em solução de Krebs modificada, pH 7.4 com HEPES 10 mM e contendo 5.6 mM de glicose. Em seguida as ilhotas do grupo **A** foram reincubadas por 1 h em solução de Krebs modificada com 2.5 mM de Ca^{2+} e 2.8 mM de glicose, enquanto que as ilhotas dos grupos **B**, **C** e **D** foram expostas a 16.7 mM de glicose na ausência da PLA_2 , pelo mesmo período de incubação. A insulina acumulada foi quantificada através de radioimunoensaio. Resultados expressos em média $\pm$ SEM.

* Diferença significativa em relação ao basal ($p < 0.05$).

Efeito da PLA₂ sobre o metabolismo de glicose.

A oxidação da glicose (**fig. 12**) foi avaliada através de cintilação líquida medindo-se o ¹⁴CO₂ liberado pelas ilhotas de Langerhans após 120 minutos de incubação com 2.8 ou 16.7 mM de glicose em presença ou não de PLA₂. Observa-se que não houve diferença no metabolismo da glicose quando comparada a ilhotas controle às incubadas com 5.6 µg/ml PLA₂.

Efeito da PLA₂ sobre a captação de cálcio extracelular.

A incorporação de ⁴⁵Ca por ilhotas de Langerhans foi avaliada após estimulação com 2.8 e 16.7 mM de glicose, na ausência ou presença de PLA₂ (**fig. 13**). Nota-se que quando estimulado por 16.7 mM de glicose há um aumento significativo (p<0.05) da captação do cálcio extracelular. Em presença de PLA₂ esta captação foi **3.3 vezes maior** que seu controle (16.7 mM de glicose).

Efeito da PLA₂ sobre a secreção de insulina estimulada por potássio em presença de Nifedipine.

Ilhotas de Langerhans foram estimuladas com 30 mM de potássio em presença ou não de PLA₂ e nifedipine, substância que classicamente age bloqueando os canais de cálcio. Houve redução de 75% na secreção de insulina estimulada por potássio quando em presença da nifedipine (**fig. 14**). O incremento na secreção de insulina estimulada por potássio em presença de PLA₂, na ausência (4.7 vezes em relação ao controle) ou presença (5.1 vezes) de nifedipine demonstrou que esta substância não produz diferença significativa na secreção de insulina em presença de PLA₂.

Efeito da PLA₂ sobre a secreção de insulina em ausência de cálcio extracelular.

Ilhotas de Langerhans, incubadas por 60 min em solução Krebs na presença de 2.8 ou 16.7 mM de glicose na ausência de cálcio extracelular e quelado com EGTA (0.5mM) demonstra redução brusca (**fig. 15**) em sua resposta secretória de insulina quando estimulado com 16.7 mM de glicose (média de 3.3 ng/ilhota/hora) comparando com outros experimentos (**fig. 9A e 10B** – média de 14.3 ng/ilhota/hora) nos quais utilizou-se concentrações fisiológicas de cálcio. Entretanto observa-se que mesmo com o

comprometimento do cálcio extracelular, a presença de PLA₂ potencializou a secreção de insulina tanto em condições basais quanto em presença de 16.7 mM de glicose (secreção 1.5 vezes maior para ambas com relação ao controle). A liberação relativa de insulina foi de 2.3 vezes para as ilhotas incubadas na presença de PLA₂ e de 1.9 vezes em ilhotas controle, isto sugere que a PLA₂ foi hábil em induzir secreção na ausência de cálcio externo.

Efeito da PLA₂ sobre a secreção de insulina estimulada por potássio em presença de Tetrodotoxina (TTX).

A secreção de insulina por ilhotas de Langerhans (**fig. 16**) estimulado com 30 mM de potássio em presença ou não de 5.6 µg/ml de PLA₂ e 10 µM de TTX (bloqueador de canais de sódio) demonstrou que o TTX não alterou a secreção de insulina estimulada por potássio na presença de PLA₂. Este resultado sugere que a PLA₂ não interfere diretamente nos canais de sódio

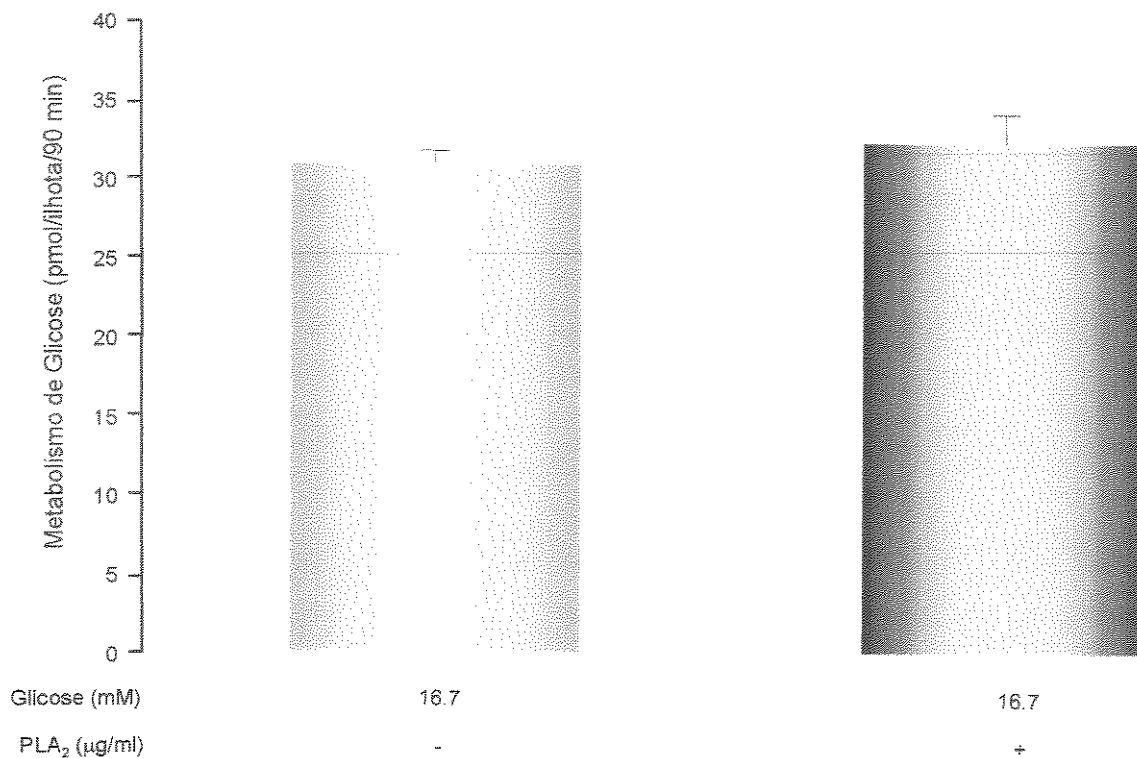


Figura 12 – Oxidação de glicose por ilhotas Langerhans (n=4). As ilhotas foram incubadas em em solução de Krebs modificada, pH 7.4 com HEPES 10 mM e contendo 16.7 mM de glicose, na presença ou ausência de 5.6 µg/ml PLA₂ e traços de D-[U-¹⁴C]glicose, durante 120 min. Após este período o ¹⁴CO₂ liberado pelas ilhotas foi avaliado através de cintilação líquida.

Resultados expressos em média ± SEM.

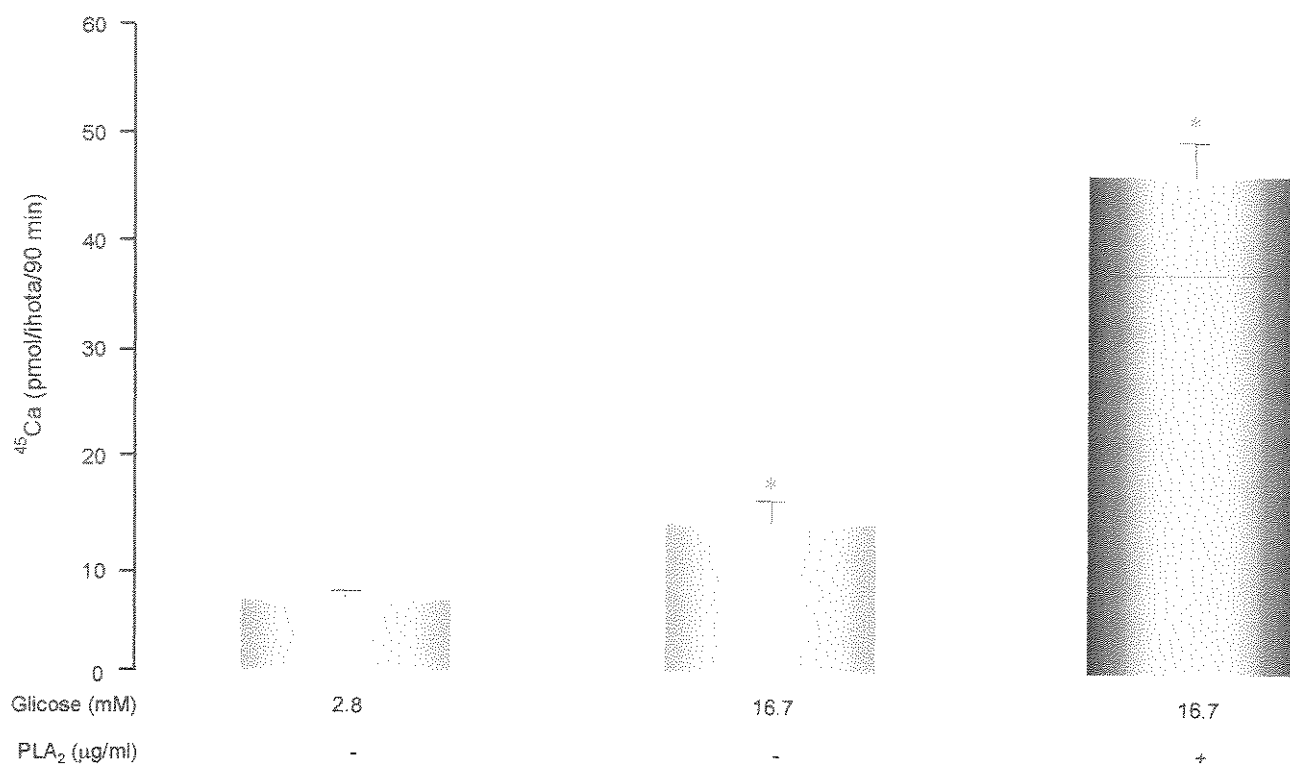


Figura 13 – Efeito de concentrações crescentes de glicose sobre incorporação de ^{45}Ca por ilhotas ($n=8$), pré-incubadas durante 30 min em solução Krebs modificada, pH 7.4 com HEPES 10 mM contendo 5.6 mM de glicose. Após este período as ilhotas foram incubadas por 90 min em solução de Krebs modificada contendo traços de ^{45}Ca , diferentes concentrações de glicose e 5.6 μg/ml de PLA₂. A captação de ^{45}Ca pelas ilhotas foi avaliado através de cintilação líquida.

Resultados expressos em média $\pm$ SEM.

* Diferença significativa em relação ao basal ($p < 0.05$).

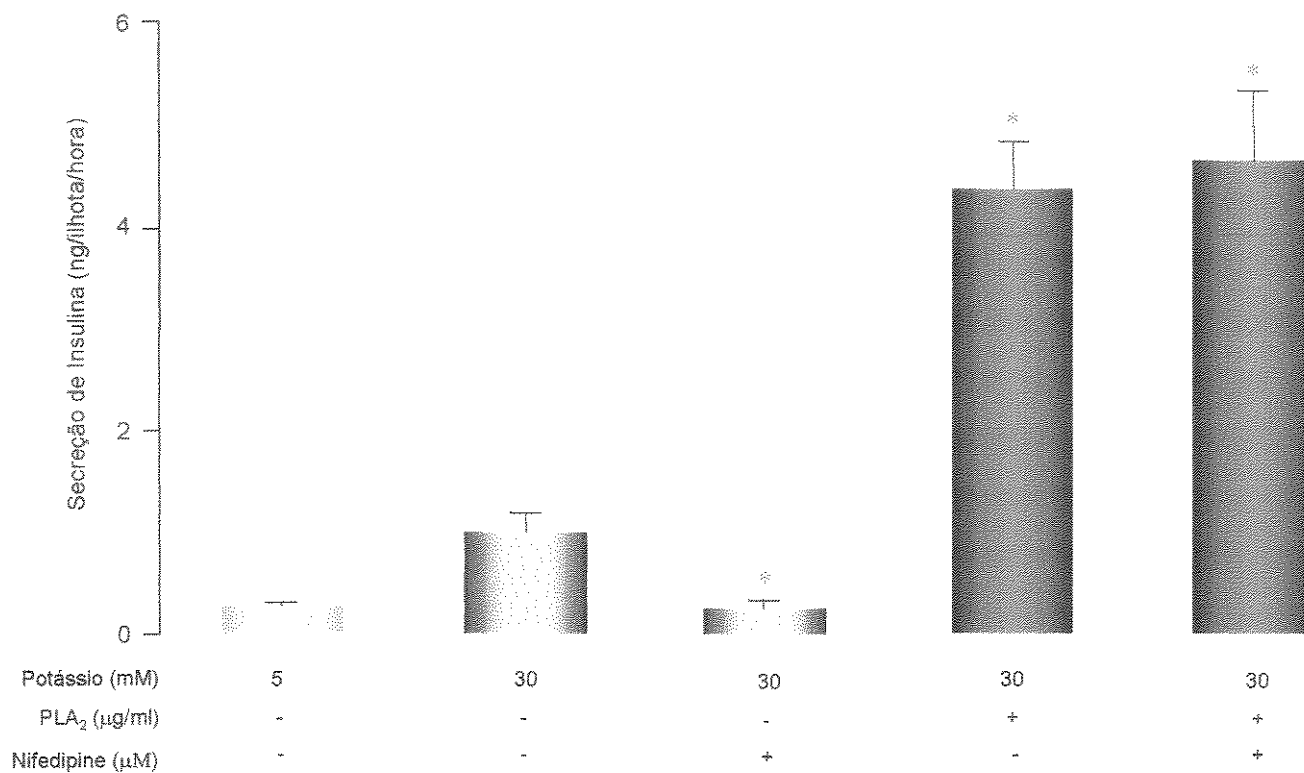


Figura 14 – Efeito de 5.6 μg/ml de PLA₂ sobre a secreção de insulina de ilhotas isoladas (n=12), pré-incubadas por 1h em solução de Krebs modificada, pH 7.4 com HEPES 10 mM contendo 5.6 mM de glicose incubadas por 1h em solução de Krebs modificada com 2.5 mM de Ca²⁺ na presença de 5 ou 30 mM de potássio e em presença ou ausência de 10 μM de nifedipine. A insulina acumulada foi quantificada através de radioimunoensaio.

Resultados expressos em média ± SEM.

- Diferença significativa em relação a 30 mM de potássio (p < 0.05).

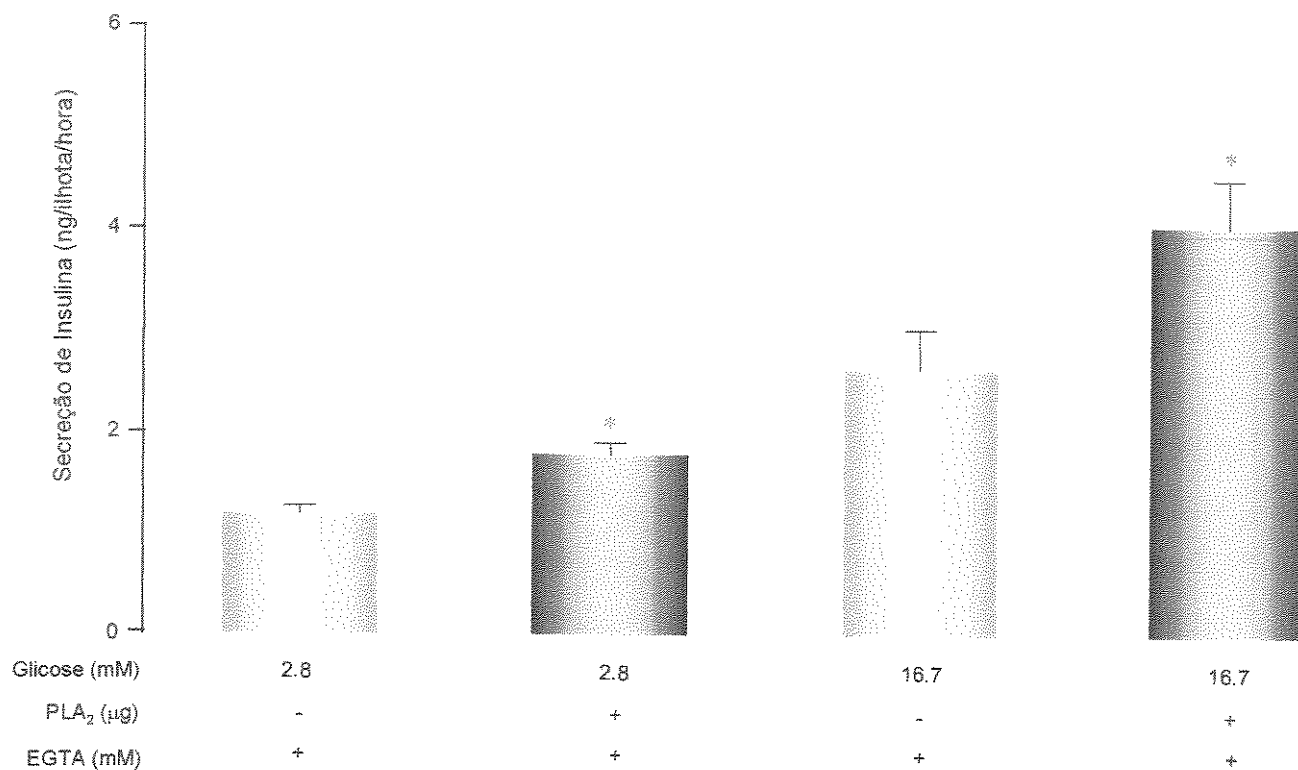


Figura 15 – Efeito de 5.6 $\mu\text{g/ml}$ de PLA₂ sobre a secreção de insulina de ilhotas isoladas (n=18), pré-incubadas por 1h em solução Krebs modificada, pH 7.4 com HEPES 10 mM e contendo 5.6 mM de glicose e incubadas por 1h em solução de Krebs modificada, na presença de 2.8 ou 16.7 mM de glicose e na ausência de cálcio e presença de 0.5 mM de EGTA. A insulina acumulada foi quantificada através de radioimunoensaio.

Resultados expressos em média $\pm$ SEM.

* Diferença significativa em relação ao seu respectivo controle ($p < 0.05$).

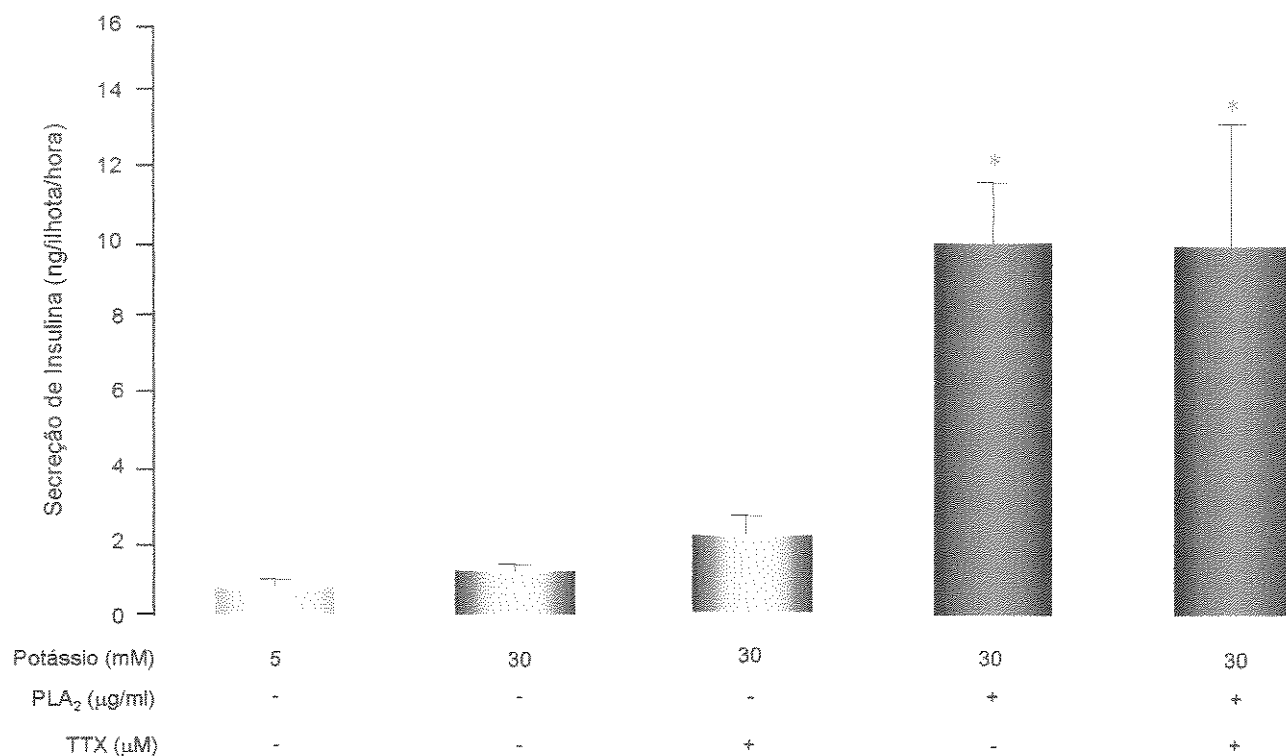


Figura 16 - Efeito de 5.6 $\mu\text{g/ml}$ de PLA₂ sobre a secreção de insulina de ilhotas isoladas (n=6), pré-incubadas por 1h em solução de Krebs modificada, pH 7.4 com HEPES 10 mM contendo 5.6 mM de glicose e incubadas por 1h em solução de Krebs modificada com 2.5 mM de Ca²⁺ na presença de 5 ou 30 mM de potássio e em presença ou ausência de 10 μM de TTX. A insulina acumulada foi quantificada através de radioimunoensaio.

Resultados expressos em média $\pm$ SEM.

* Diferença significativa em relação a 30 mM de potássio ($p < 0.05$).

Efeito da heparina sobre a secreção de insulina.

Na **fig. 17** observa-se o efeito de 5.6 µg/ml de PLA₂ sobre a secreção de insulina estimulada por glicose em presença de 5UI/ml de heparina. A heparina adicionada durante a incubação de 1h com glicose e PLA₂ não foi eficiente em inibir a secreção de insulina estimulada por estes agentes. Na **fig. 18** observa-se que incubação prévia da PLA₂ com heparina (5UI/µg de PLA₂) durante 30 min também não foi eficaz em inibir a secreção de insulina estimulada por glicose e potencializada com 5.6 µg/ml desta PLA₂. Por outro lado, 5UI/ml de heparina (**fig. 19**) adicionada à solução Krebs modificada, pH 7.4 com HEPES (10mM) e 5.6 mM de glicose durante 1h de pré-incubação, inibiu em torno de **25%** a secreção de insulina após nova incubação estimulada com 16.7 mM de glicose e 5.6 µg/ml de PLA₂ ($p < 0.05$).

Efeito de concentrações crescentes de Dexametasona sobre a secreção de insulina.

A **Fig. 20** demonstra o efeito de 0.5 µg/ml de PLA₂ sobre a secreção de insulina de ilhotas de ratos incubadas com 16.7 mM de glicose e concentrações crescentes de Dexametasona (DEXA). A secreção de insulina estimulada com 16.7 mM de glicose e presença de concentrações crescentes de DEXA (5 e 10 µM) foi **42 e 32%** menor respectivamente quando comparado ao seu controle.

A adição de 0.5 µg/ml de PLA₂ potencializou em **1.8 vezes** a secreção de insulina quando comparado ao seu controle (16.7 mM de glicose). Na presença de 5 e 10 µM de DEXA a secreção de insulina foi **36 e 35%** menor comparado ao seu controle (16.7 mM + 0.5 µg/ml de PLA₂).

Na **fig. 21** observa-se a ação destas diferentes concentrações de DEXA em presença de 16.7 mM de glicose e 5.6 µg/ml de PLA₂. Como na **fig. 20**, a presença deste glicocorticóide também inibiu, tanto a secreção de insulina induzida pela glicose (**45 e 27%** menor comparado ao controle) quanto a secreção potencializada por uma maior concentração de PLA₂ (redução de **28 e 44%** respectivamente). Além disto, a presença de 50 µM de DEXA reduziu a secreção de insulina induzida por glicose e potencializada com 5.6 µg/ml de PLA₂ a níveis de insulina similares àqueles secretados em resposta somente à glicose e presença do glicocorticóide.

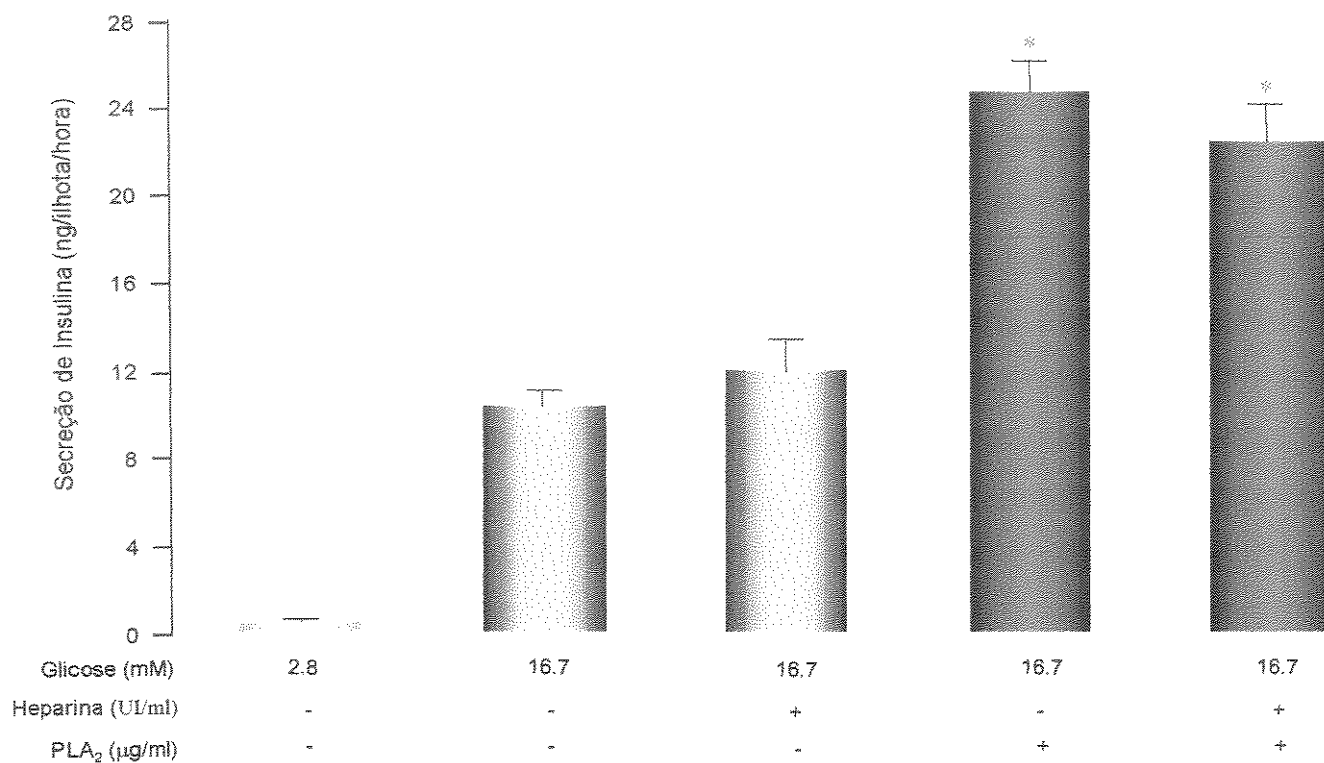


Figura 17 – Efeito de 5.6 µg/ml de PLA₂ sobre a secreção de insulina de ilhotas isoladas de ratos (n=12), pré-incubadas por 1h em solução de Krebs modificada, contendo 5.6 mM de glicose e reincubadas por 1h em solução de Krebs modificada contendo 16.7 mM de glicose e presença ou ausência de 5 UI/ml de Heparina.

Resultados expressos em média ± SEM.

* Diferença significativa em relação a 16.7 mM de glicose (p < 0.05).

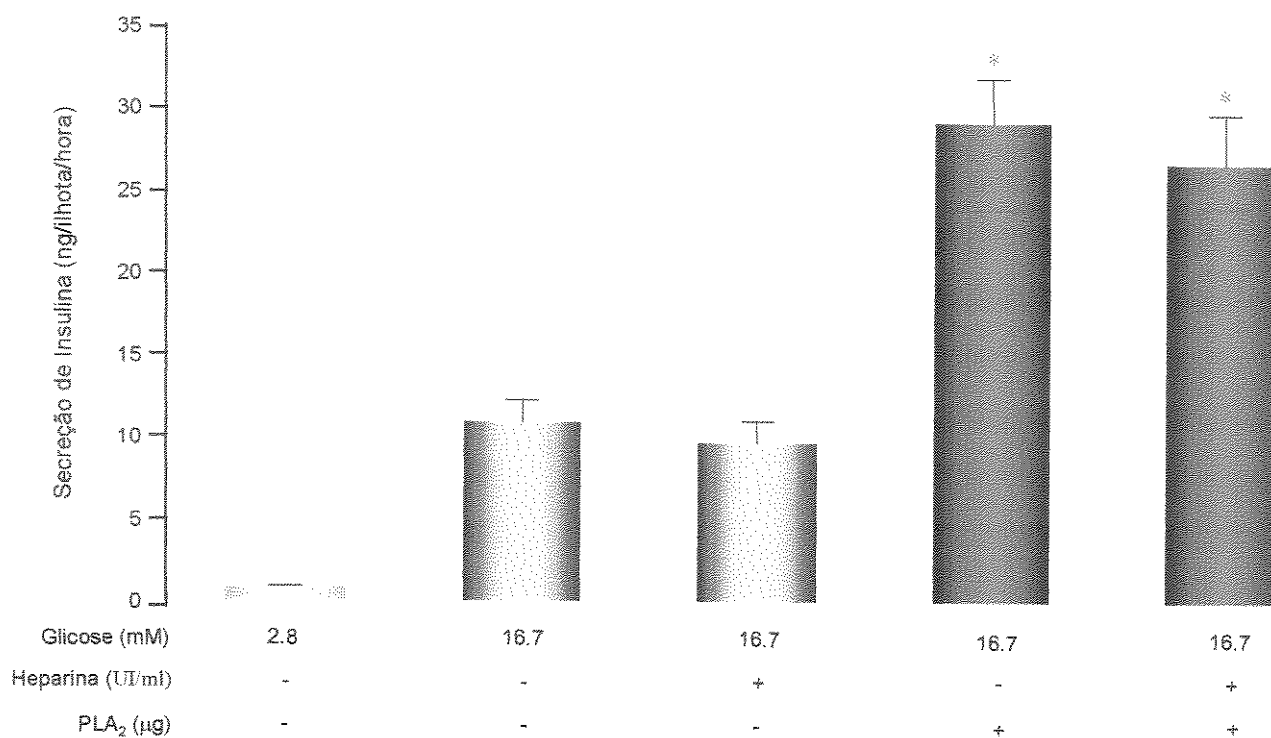


Figura 18 – Secreção de insulina de ilhotas isoladas de ratos (n=12), pré-incubadas por 1h em solução de Krebs modificada, contendo 5.6 mM de glicose e reincubadas por 1h em solução de Krebs modificada em presença de 16.7 mM de glicose e presença ou ausência de 5.6 μg/ml de PLA₂, previamente tratada ou não com Heparina (5UI/μg de PLA₂) por 30 minutos.

Resultados expressos em média ± SEM.

* Diferença significativa em relação a 16.7 mM de glicose (p < 0.05).

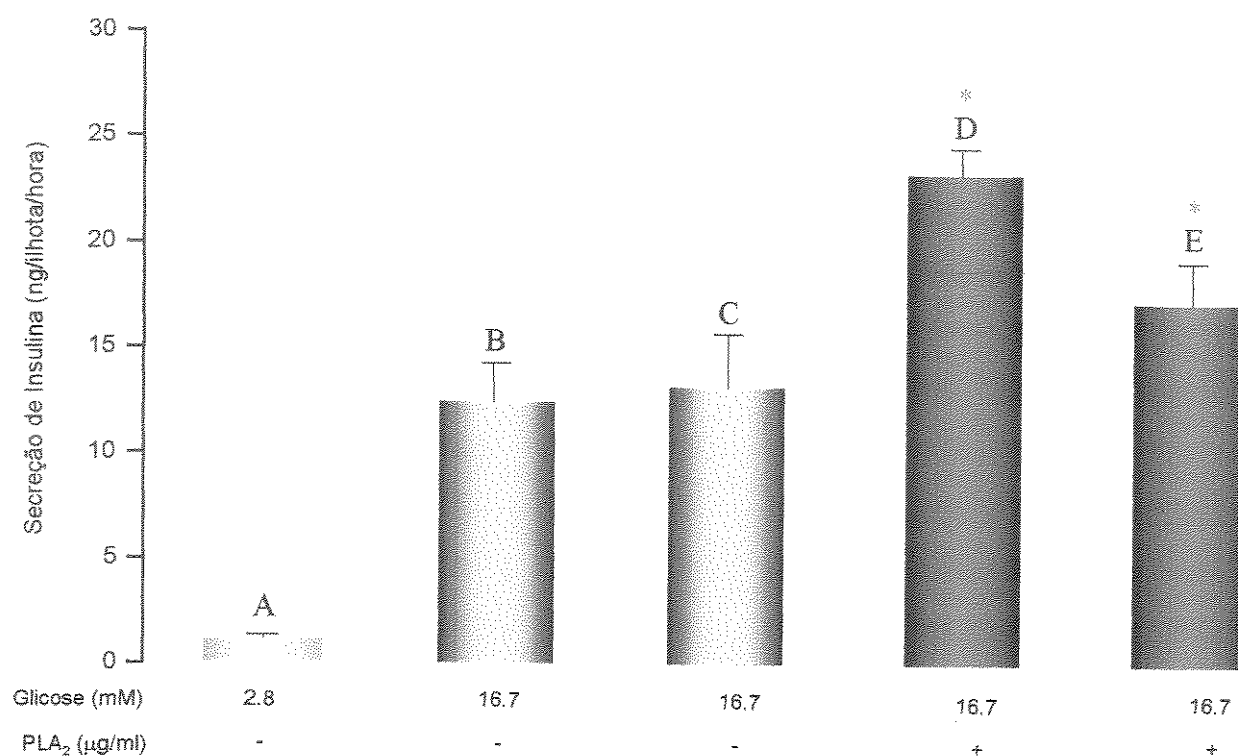


Figura 19 – Efeito da exposição prévia das ilhotas à heparina. Durante a pré-incubação (1h) as ilhotas do grupo **A**, **B** e **D** foram expostas a glicose 5.6 mM de glicose enquanto que as ilhotas do grupo **C** e **E** foram expostas as mesmas concentrações de glicose associadas com 5UI/ml de heparina. Após este período as ilhotas foram reincubadas por 1h em solução de Krebs modificada contendo 2.8 ou 16.7 mM de glicose e presença ou ausência de 5.6 μg/ml de PLA₂.

Resultados expressos em média ± SEM.

* Diferença significativa em relação a 16.7 mM de glicose ($p < 0.05$).

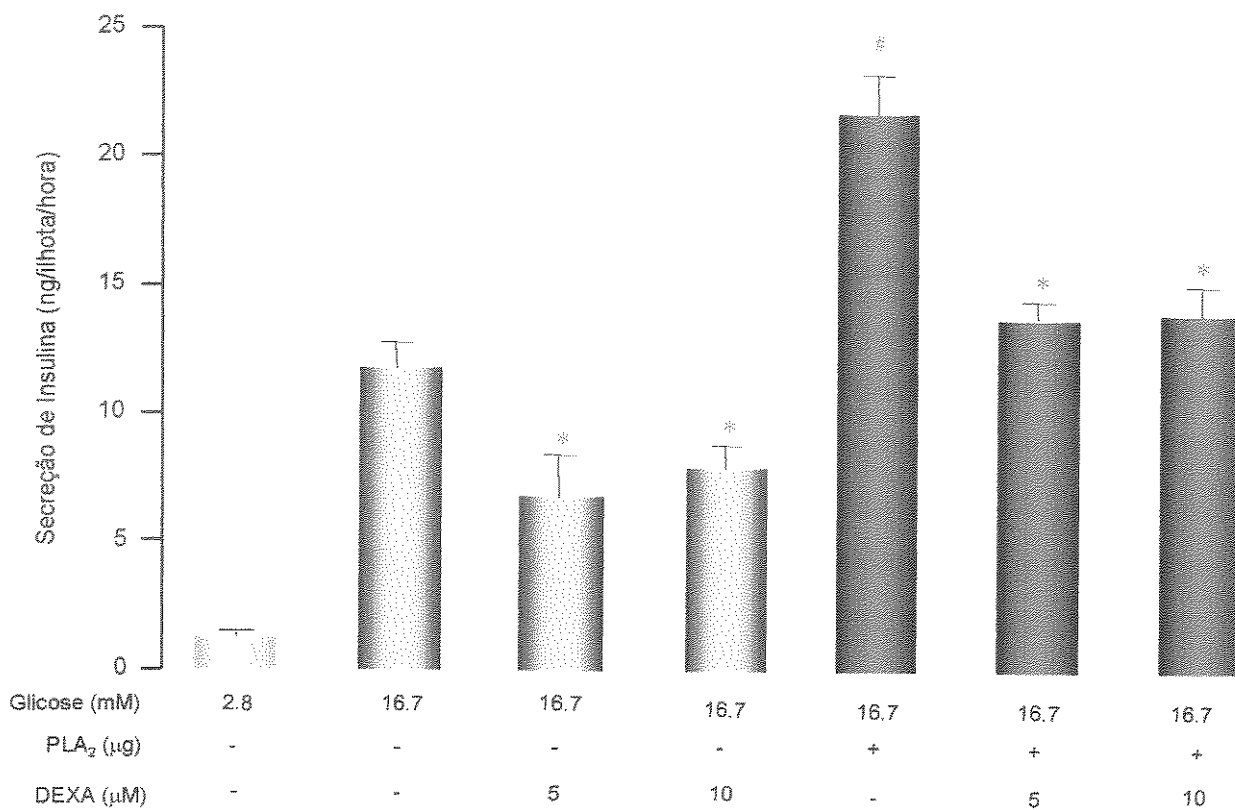


Figura 20 – Efeito de 0.5 µg/ml de PLA₂ sobre a secreção de insulina de ilhotas isoladas de ratos (n=12), pré-incubadas por 1h em solução de Krebs modificada, contendo 5.6 mM de glicose e incubadas por 1h em solução de Krebs modificada e diferentes concentrações de glicose em presença ou ausência de concentrações crescentes de Dexametasona.

Resultados expressos em média ± SEM.

* Diferença significativa em relação ao seu respectivo controle ($p < 0.05$).

Diferença significativa em relação à 16.7mM de glicose ($p < 0.05$).

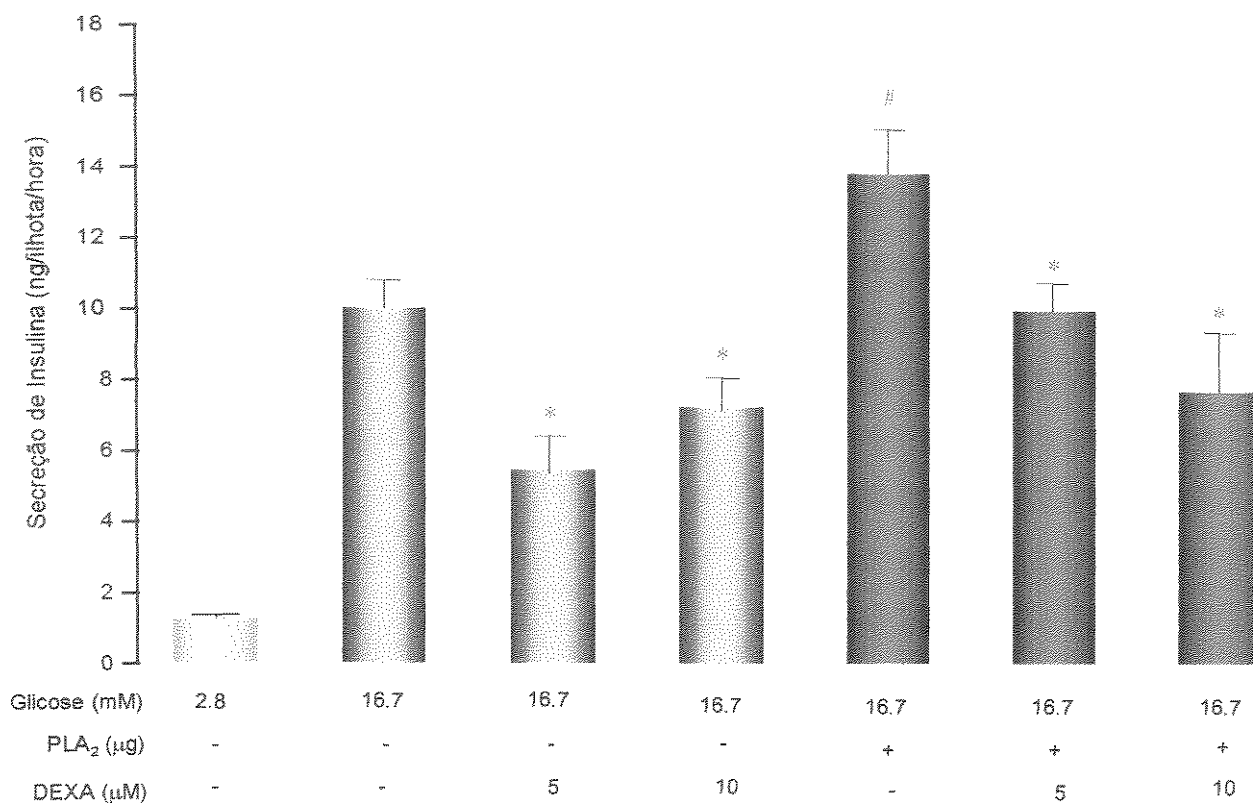


Figura 21 – Efeito de 5.6 µg/ml de PLA₂ sobre a secreção de insulina de ilhotas isoladas de ratos (n=12), pré-incubadas por 1h em solução de Krebs modificada, contendo 5.6 mM de glicose e incubadas por 1h em solução de Krebs modificada e diferentes concentrações de glicose em presença ou ausência de concentrações crescentes de Dexametasona.

Resultados expressos em média ± SEM.

* Diferença significativa em relação ao seu respectivo controle ($p < 0.05$).

Diferença significativa em relação à 16.7mM de glicose ($p < 0.05$).

Efluxo de Ácido Araquidônico (AA).

A **fig. 22A** demonstra o efeito de 0.5 e 5.6 $\mu\text{g/ml}$ de PLA_2 sobre o efluxo de AA de ilhotas em presença de 2.8 mM de glicose. Observa-se que o aumento do efluxo foi dose dependente sendo 1.8 e 4.4 vezes maior comparado ao controle. O aumento da secreção de insulina (**fig. 22B**) tende a ser proporcional ao aumento do fluxo de AA. A secreção de insulina em condições basais de glicose foi 3.2 e 3.3 vezes maior na presença da PLA_2 comparado ao controle. Na **fig. 23A** também observamos um aumento do efluxo de AA proporcional ao aumento da concentração de PLA_2 em ilhotas estimuladas com 16.7 mM de glicose. Este aumento foi 2.6 e 3.9 vezes maior (0.5 e 5.6 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente) comparado ao controle (16.7 mM de glicose). Também a secreção de insulina (**fig. 23B**) foi crescente e proporcional ao aumento da concentração de PLA_2 (1.7 e 1.5 vezes maior comparado ao controle).

Efeito da PLA_2 sobre a liberação de nucleossomos.

Na **fig. 24** tem-se o efeito de 0.5 e 5.6 $\mu\text{g/ml}$ de PLA_2 sobre a quantidade de DNA fragmentado de ilhotas incubadas com 2.8 e 16.7 mM de glicose. A fragmentação do DNA foi quantificada através do Kit de Nucleossomos ELISA. Os nucleossomos foram detectados por anticorpo Anti-Histona. Apenas na presença de 16.7 mM de glicose e 5.6 $\mu\text{g/ml}$ de PLA_2 observou-se aumento significativo da quantidade de nucleossomos sendo este 2.2 vezes maior comparado ao controle, neste caso 2.8 mM de glicose (controle negativo para liberação de nucleossomos).

Efeito da PLA_2 sobre a fosforilação de proteínas em resíduos tirosina.

A **fig. 25** demonstra a quantidade de proteínas fosforiladas em resíduos tirosina sob efeito da PLA_2 . Observa-se uma alteração no perfil de fosforilação de proteínas com peso molecular em torno de 80 e 180 kDa. 0.5 e 5.6 $\mu\text{g/ml}$ de PLA_2 em presença de 2.8 mM de glicose tende a promover maior fosforilação destas proteínas comparado ao controle. Já estas concentrações de PLA_2 tendem a promover menor fosforilação destas proteínas em presença de 16.7 mM de glicose.

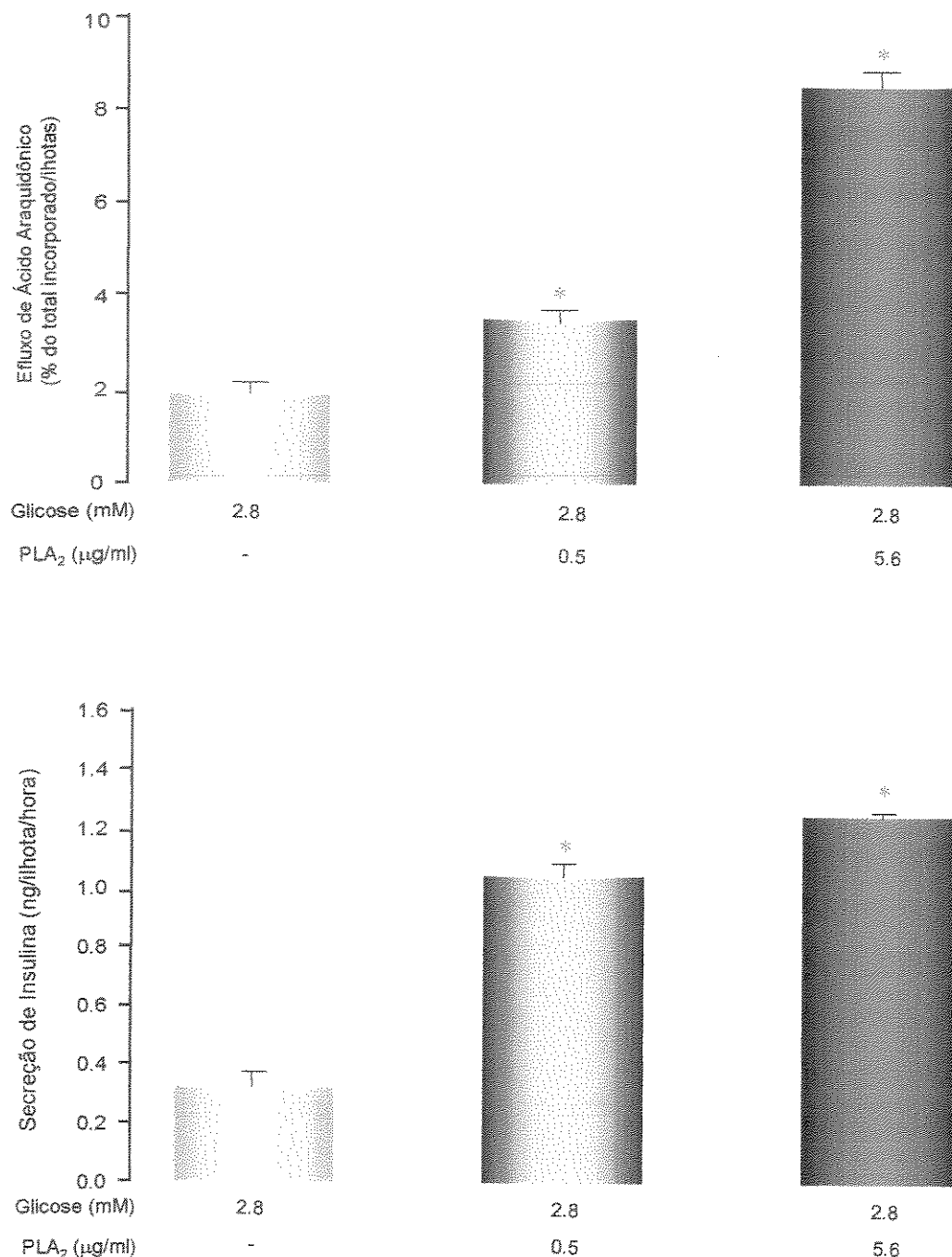


Figura 22A – Efluxo de ácido araquidônico de ilhotas isoladas de ratos (n=12), previamente mantidas em meio de cultura contendo ^3H AA por 24h. Após este período as ilhotas foram lavadas, incubadas por 1h em solução de Krebs modificada, pH 7.4 com HEPES 10 mM, 2.5 mM de Ca^{2+} , 2.8 mM de glicose e ausência ou presença de 0.5 $\mu\text{g/ml}$ de PLA₂. O efluxo de ácido araquidônico foi avaliado através de cintilação líquida. **Figura 22B** – Quantificação da secreção de insulina de ilhotas submetidas as condições experimentais citadas na fig. 8A. insulina acumulada foi quantificada através de radioimunoensaio

Resultados expressos em média $\pm$ SEM.

* Diferença significativa em relação ao seu controle ($p < 0.05$).

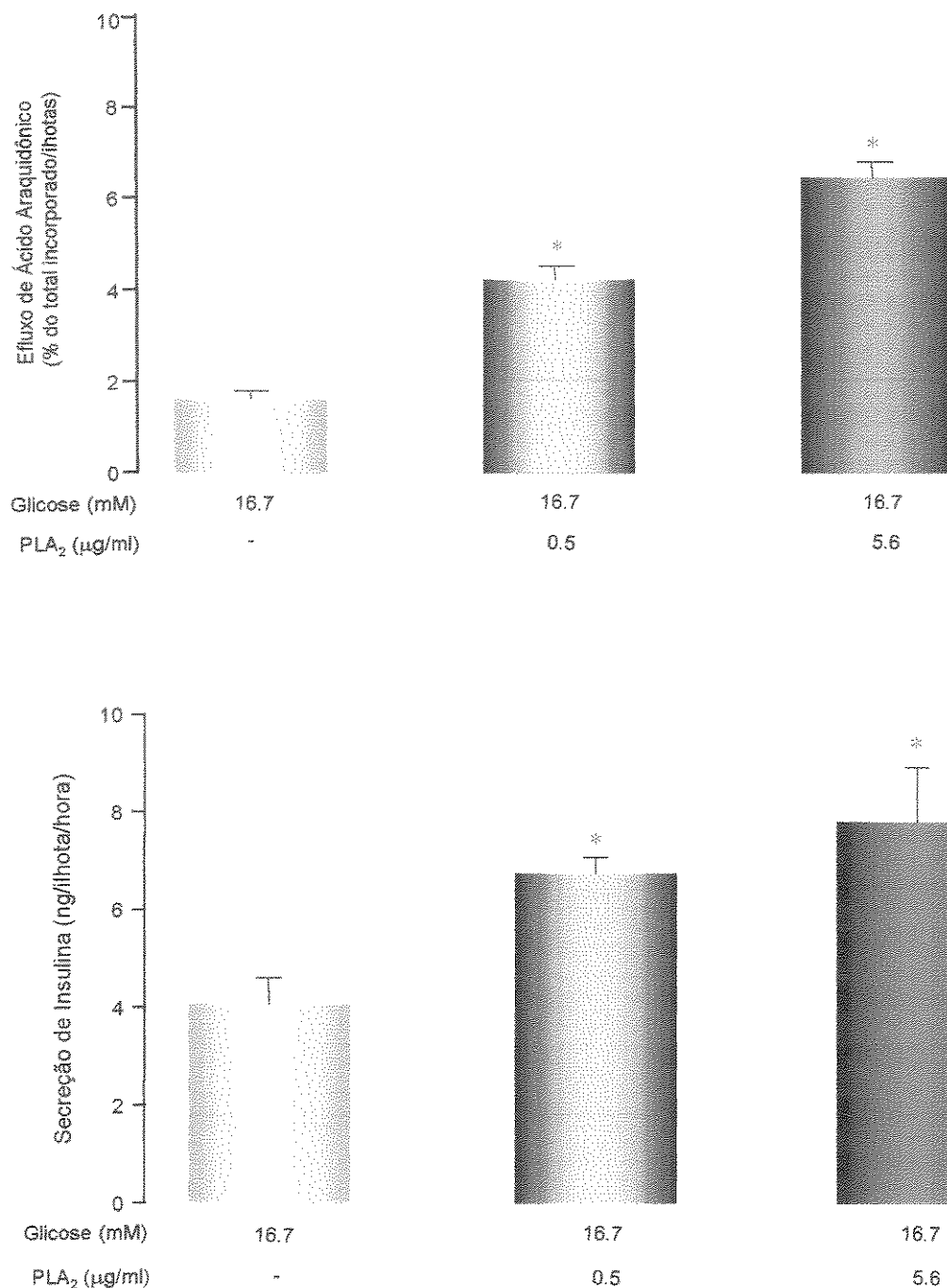


Figura 23A – Efluxo de ácido araquidônico de ilhotas isoladas de ratos (n=12), previamente mantidas em meio de cultura contendo ^3H AA por 24h. Após este período as ilhotas foram lavadas, incubadas por 1h em solução de Krebs modificada, pH 7.4 com HEPES 10mM, 2.5 mM de Ca^{2+} , 16.7 mM de glicose e ausência ou presença de 5.6 $\mu\text{g/ml}$ de PLA₂. O efluxo de ácido araquidônico foi avaliado através de cintilação líquida. **Figura 23B** – Quantificação da secreção de insulina de ilhotas submetidas as condições experimentais citadas na fig. 8A. insulina acumulada foi quantificada através de radioimunoensaio

Resultados expressos em média $\pm$ SEM.

* Diferença significativa em relação ao seu controle ($p < 0.05$).

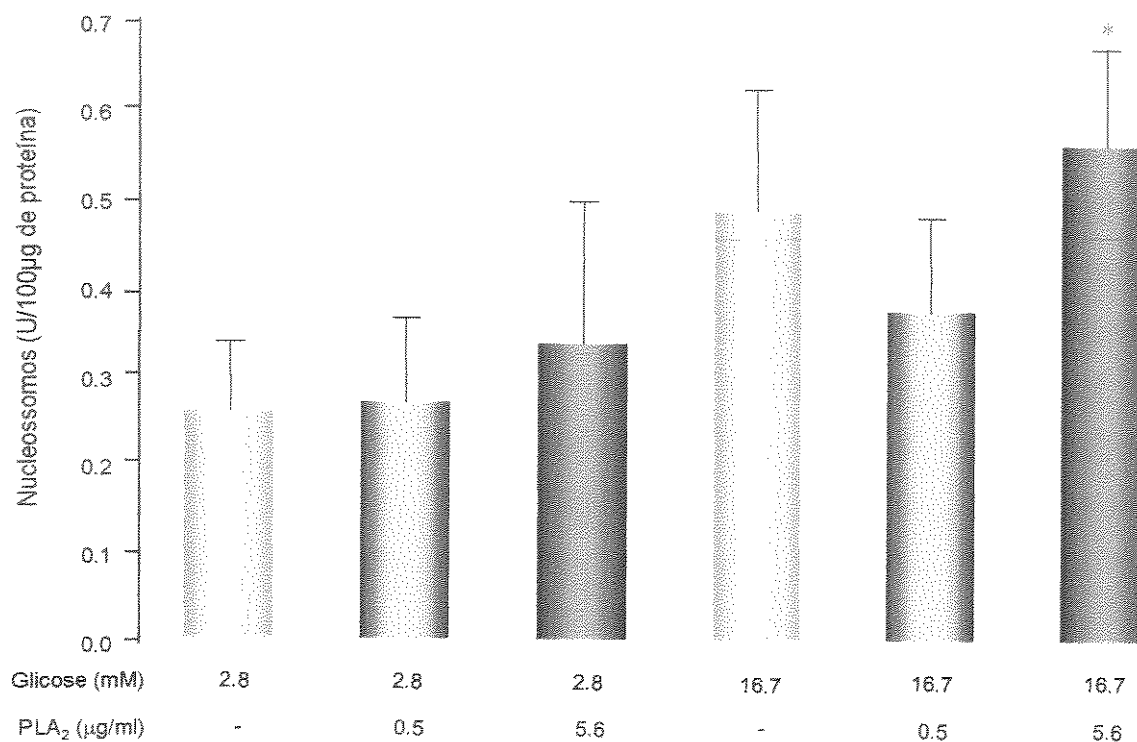


Figura 24 – Efeito de 0.5 ou 5.6 µg/ml de PLA₂ sobre nucleossomos liberados em ilhotas isoladas de ratos (n=12), pré-incubadas por 1h em solução de Krebs modificada contendo 5.6 mM de glicose e incubadas por 1h em presença 2.8 ou 16.7 mM de glicose. O número de nucleossomos livres foi quantificado através do Kit ELISA de Nucleossomos.

Resultados expressos em média ± SEM.

* Diferença significativa em relação a 2.8 mM de glicose ($p < 0.05$).

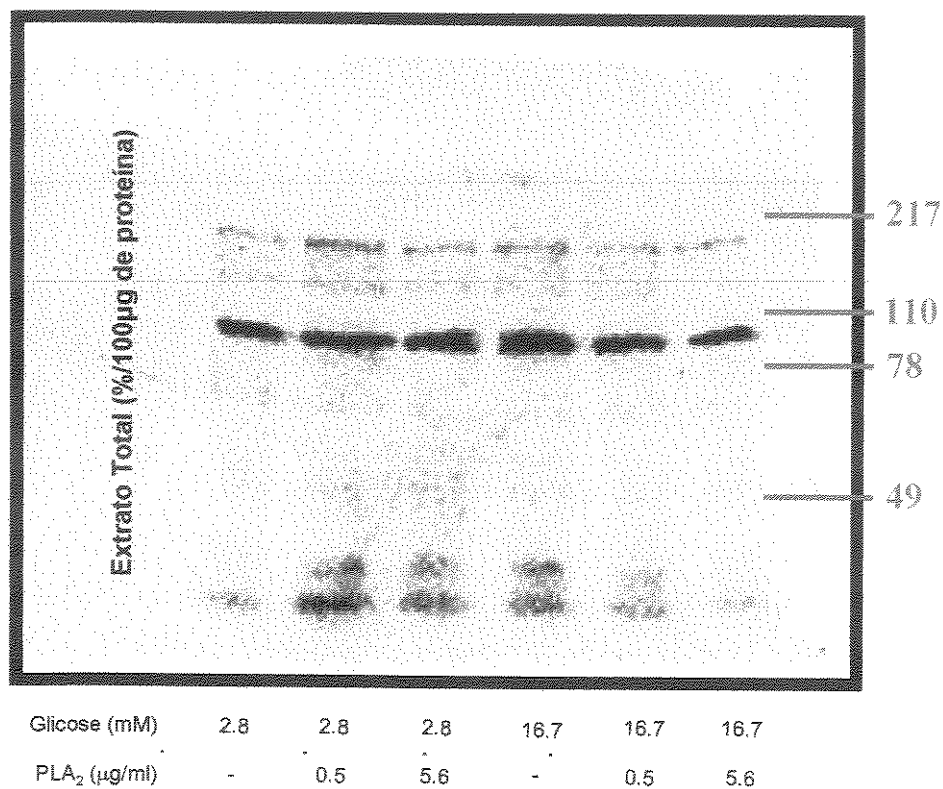


Figura 25 – Efeito de 0.5 e 5.6 µg/ml de PLA₂ sobre a quantidade de proteínas fosforiladas em resíduos tirosina (extrato total) de ilhotas isoladas de rato (n=3) incubadas por 1h em Krebs contendo 2.8 e 16.7 mM de glicose. Amostra contendo 300 ilhotas foram submetidas a *immunoblotting* com anticorpo anti-pTyr.

DISCUSSÃO

O mecanismo de secreção de insulina em células beta envolve o metabolismo de nutrientes com conseqüente geração de um gradiente elétrico na membrana dessas células e movimento de cálcio para interior do citosol, levando desta forma à secreção de insulina. Diante deste contexto o mecanismo de secreção de insulina é eficiente para estudar as toxinas além de permitir que elas possam ser utilizadas como uma possível ferramenta farmacológica para elucidar mecanismos fisiológicos.

Com este intuito verificou-se a ação da toxina crotoxina-like purificada do veneno da cascavel *Crotalus durissus collilineatus* sobre a secreção de insulina estimulada por glicose.

Simonsson, Karlsson & Ahrén (2000) verificaram que a melitina (2µg/ml), toxina presente no veneno da abelha e que possui em sua fração uma PLA₂ do grupo III, aumentou a secreção 10.7 vezes mais em camundongos resistentes à insulina. Em outro estudo do mesmo grupo, a presença de forskolin e GLP-1 potencializou a secreção de insulina em ilhotas de Langerhans estimuladas por melitina.

Igualmente nossos experimentos demonstraram uma potencialização da secreção de insulina estimulada com glicose em presença da crotoxina (fig. 6) que foi significativamente maior comparada às ilhotas controle. Segundo Kini & Evans (1989) os efeitos gerados em músculo de rato pela crotoxina são os mesmos verificados pela ação da PLA₂. Diante destes aspectos e do incremento na secreção de insulina gerado pela presença da crotoxina-like questionou-se se este princípio também seria aplicável às ilhotas de Langerhans. Verificou-se então a secreção de insulina estimulada por glicose em ausência e presença das duas subunidades da crotoxina (PLA₂ e crotapotina).

Quando há a presença de 5.6 µg/ml de crotapotina, observa-se uma diferença significativa na secreção de insulina em condições basais (2.8 mM de glicose) que entretanto não foi observada em presença de 16.7 mM de glicose (fig. 7). Em contrapartida, 5.6 µg/ml de PLA₂ (fig. 8) potencializou a secreção de insulina tanto em presença de 2.8 quanto de 16.7 mM de glicose. Isto demonstra que os efeitos gerados pela crotoxina-like (fig. 6) poderiam estar relacionados à PLA₂, sendo desta forma semelhante ao observado por Kini & Evans (1989) em músculo esquelético.

Para evitar que uma dose excessiva de PLA₂ provocasse lesões e com intuito de determinar uma concentração apropriada de PLA₂ (EC₅₀), avaliou-se o efeito de diferentes

concentrações de PLA₂ na potencialização da secreção de insulina estimulada por glicose (**fig 9A e 9B**).

O incremento da secreção de insulina estimulada por glicose em presença da PLA₂ foi dose-dependente a partir de concentrações iguais ou superiores a 1µg/ml. Também Zawulich & Zawulich (1985) demonstraram que o tratamento de ilhotas com uma cPLA₂ exógena induziu um aumento dose-dependente da secreção de insulina.

Observando as **fig. 10A e 10B** referente aos experimentos nos quais fixou-se a concentração de PLA₂ e variou-se a de glicose observa-se que a Ec₅₀ é semelhante para a secreção de insulina em presença ou não de PLA₂. Isto sugere que a PLA₂ não altera a sensibilidade da ilhota à glicose, o que leva a crer que o mecanismo pelo qual a PLA₂ potencializa a secreção de insulina pode ser independente do mecanismo de secreção estimulado por glicose. Em contrapartida a resposta máxima da secreção de insulina é significativamente maior em presença da PLA₂ confirmando assim seu papel potencializador em ilhotas de Langerhans. Nota-se que apesar dos valores da Ec₅₀ serem semelhantes em presença de 1.0 e 5.6 µg/ml de PLA₂, a resposta máxima em presença da concentração mais elevada de PLA₂ é significativamente maior, reforçando assim a ação dose-dependente com que a PLA₂ atua sobre a secreção de insulina.

Diante dos possíveis efeitos tóxicos que a PLA₂ estaria exercendo em alguns tecidos tornou-se de fundamental importância verificar a viabilidade das ilhotas após um período de pré-incubação com esta substância (**fig. 11**). Assim, após este período as ilhotas foram lavadas e reestimuladas com glicose. Os resultados demonstraram que a PLA₂ não prejudica a viabilidade das ilhotas pois elas voltaram a responder de maneira semelhante às ilhotas controle. Resultados semelhantes também foram observados por Zawulich & Zawulich (1985) demonstrando que a exposição por tempo prolongado destas ilhotas à PLA₂ citosólica exógena não prejudica a resposta secretória das células B e estas responderam normalmente à nova reestimulação com glicose.

Acreditando que o mecanismo pelo qual a PLA₂ estimula a secreção de insulina seja diferente ou independente do mecanismo pelo qual a glicose estimula a secreção de insulina avaliou-se o efeito da PLA₂ sobre o metabolismo da glicose e se este poderia estar contribuindo para o incremento da secreção. Na **fig. 12** observa-se que a presença da PLA₂

não altera a utilização da glicose demonstrando que a PLA₂ não interfere na metabolização de glicose importante para o processo estímulo-acoplamento da secreção de insulina.

Apesar de não interferir no metabolismo da glicose, que por si modula canais voltagem-dependente, observa-se que a presença da PLA₂ na preparação aumenta significativamente a captação de cálcio extracelular (**fig. 13**). Diante da ação potencializadora da PLA₂ supõe-se que uma maior quantidade de cálcio poderia estar sendo requerido para que houvesse extrusão dos grânulos de insulina.

Também o ácido araquidônico, per se, impede a atividade de canais de potássio (Eddlestone, 1995), e facilita a entrada de cálcio para dentro da célula através de ambos canal voltagem-dependente e receptor-dependente (Miller et al., 1992) induzindo um influxo e conseqüentemente um aumento do cálcio citoplasmático na célula B (Ramanadhan, Gross & Turk, 1992).

Não restam dúvidas que a PLA₂ potencializa a secreção de insulina estimulada por glicose em concentrações suprabasais, porém, esta potencialização também foi também observada (**fig. 8, 10A e 10B**) em condições basais de glicose (2.8mM). Com base nestes resultados, podemos concluir que a PLA₂ é capaz de aumentar a secreção de insulina em concentrações muito baixas de glicose, mais também observa-se que a presença da PLA₂ potencializa a secreção de insulina estimulada por potássio. Desta forma, acredita-se que a PLA₂ da *C.d.colli* não teria uma ação diretamente relacionada com a formação de ATP e possivelmente não estaria realizando crosstalk com a iPLA₂ (PLA₂ ATP-dependente) presente na célula B.

Diante do possível envolvimento de canais iônicos, avaliou-se a influência destes na secreção de insulina em presença da PLA₂. Inibi-los e não verificar alteração da resposta secretória em presença da PLA₂ sugere que a ação da PLA₂ não dependeria diretamente destes canais para exercer seus efeitos e desencadear respostas fisiológicas.

Baseada nesta premissa observou-se a resposta secretória de insulina estimulada por potássio em presença da PLA₂ e nifedipine, substância que age sobre canais “L” de cálcio bloqueando-os. A nifedipine foi eficiente em inibir a secreção de insulina estimulada por potássio (redução de 75%), entretanto não alterou a secreção de insulina em presença da PLA₂ (**fig. 14**). Isto poderia sugerir que o mecanismo de ação da PLA₂ independe da abertura dos canais “L” de cálcio e ainda que as respostas secretórias desencadeadas

estariam ocorrendo mediante outros mecanismos independentes da ação direta destes canais.

Da mesma forma quando avaliamos a secreção de insulina na ausência de cálcio externo e presença de EGTA, quelante específico de Ca^{+2} , observamos que o cálcio extracelular é fundamental para secreção de insulina estimulada tanto por glicose quanto pela PLA_2 , visto que esta foi significativamente inibida em presença do EGTA (**fig.15**). Entretanto, a secreção de insulina em presença da PLA_2 não foi completamente inibida e observou-se um aumento significativo tanto em condições basais quanto em presença de 16.7 mM de glicose.

O cálcio tem papel essencial na secreção de insulina. Alguns autores têm demonstrado que a glicose não induz aumento da secreção de insulina na ausência do cálcio extracelular (Grodsky & Bennett, 1966). Entretanto alguns experimentos demonstraram que a exocitose pode ser induzida por derivados de GTP de maneira independente de cálcio (Jonas et al., 1994). Também foi reportado que secreção de insulina estimulada por glicose em total depleção de cálcio pode ocorrer mediante ativação de PKA e PKC (Komatsu et al., 1997). Isto poderia explicar o aumento observado na secreção de insulina induzido por 16.7 mM de glicose comparado ao basal (**fig 15**). Porém é nítido o papel fundamental do cálcio já que, os valores encontrados para a secreção de insulina por ilhotas estimuladas tanto com glicose quanto PLA_2 são consideravelmente menores quando há déficit de cálcio comparando àqueles realizados em condições fisiológicas de cálcio (**fig. 8, 9A 10A e 10B**).

Outro possível canal que estaria envolvido na secreção de insulina em presença de PLA_2 seria o canal de sódio. Mas, esta hipótese foi descartada quando se observou que o TTX falhou em inibir o aumento da secreção de insulina em presença da PLA_2 . A inibição do canal de sódio também não alterou a secreção de insulina estimulada por potássio (**fig. 16**).

Não estando a potencialização da secreção de insulina pela PLA_2 relacionada ao metabolismo de glicose, nem diretamente ligado a canais iônicos, o objetivo seguinte foi avaliar se a PLA_2 poderia estar atuando diretamente na membrana para desencadear suas respostas.

Através de sua interação com a membrana e possíveis proteínas de ligação específicas, as PLA_2 degradariam os lípidios de membrana (Smith & Waite, 1992). Suga et

al. (1993) demonstraram em linhagem de células de mamíferos que as sPLA₂ do tipo II (atividade enzimática preservada) atuariam em uma região da célula denominada região sulfato heparana, que reconhece a porção C-terminal da PLA₂, e degradaria os fosfolípidios de membrana com conseqüente formação de AA e prostaglandina E2 (PGE₂).

A Heparina é um glicosaminoglicano polisulfatado com propriedades antioxidantes e anticoagulantes. Sua ação inibitória (dose dependente e reversível) sobre a atividade da iPLA₂ presentes no cérebro (Yang, Farooqui & Honocks, 1994) sugere que a interação entre a heparina e a PLA₂ são eletrostáticas. Assim, a heparina poderia estar se ligando a resíduos de lisina presentes na região C-terminal da PLA₂ onde se encontra seu sítio de fosforilação e seu sítio catalítico.

Com o intuito de avaliar o sítio de ligação da PLA₂ extraída da *C.d.colli*. na membrana e sua possível participação no processo de secreção de insulina, utilizamos a heparina em dois protocolos diferentes, com exposição anterior ou concomitante à incubação.

Na **fig. 17 e 18** observa-se que adição da heparina não inibiu a secreção de insulina estimulada por glicose em presença de PLA₂. Em contrapartida, a adição da heparina (**fig. 19**) na solução Krebs durante o tempo da pré-incubação (1h), inibiu 25% a secreção de insulina após nova incubação estimulada com 16.7 mM de glicose e potencializada com 5.6 µg/ml de PLA₂. Isto sugere que a heparina não impediu a potencialização da secreção de insulina induzida pela presença da PLA₂, mas foi eficiente em ligar-se à membrana da célula e impedir a interação da PLA₂ com a ilhota.

O fato da presença da heparina não alterar a resposta insulínica à PLA₂ da *C.d.colli*. pode estar relacionado ao fato desta ser uma PLA₂ Asp-49 possuindo em sua porção C-terminal poucos resíduos de lisina, conseqüentemente, possuindo carga praticamente neutra. Isto impede que a heparina, que possui predominantemente uma carga negativa, se ligue à PLA₂.

Entretanto, a membrana plasmática dos tecidos dos mamíferos também contém sítios aniônicos fixos que conferem uma eletronegatividade a estas estruturas. Estes sítios negativos presentes nas membranas são constituídos por diferentes glicosaminoglicanos sulfatados (Hook et al., 1984; Kolset & Gallagher, 1990). A heparina também é capaz de ligar-se aos fosfolípidios presentes em um substrato podendo impedir, bloqueando a

interação entre enzima e substrato, que a PLA₂ exerça sua ação (Farroqui, Yang e Horrocks, 1987). Poderia ser esta a explicação para o fato da heparina inibir a ação da PLA₂ ao ligar-se à membrana. Esta hipótese sustentaria a idéia de que a PLA₂, cataliticamente ativa, estaria atuando diretamente na membrana proporcionando um desarranjo, desorganização de sua estrutura ou uma degradação dos fosfolípidios que compõe a membrana.

As PLA₂ catalisam a hidrólise de fosfolípidios de membrana para produzir ácidos graxos livres e lisofosfolípidios, liberando ácido araquidônico (AA), agente precursor de lípidios inflamatórios, fator de ativação de plaquetas e eicosanóides (prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos e lipoxinas). As evidências mostram que outros produtos da hidrólise dos lisofosfolípidios que não o IP₃ e o DAG, (como por exemplo, o AA) poderiam estar envolvidos na regulação da secreção de insulina.

Diante da idéia de que a PLA₂ tanto intra quanto extracelular poderia estar favorecendo a formação deste AA e conseqüentemente promovendo a secreção de insulina, torna-se necessário saber quais mecanismos poderiam estar envolvidos nesta estimulação.

Glicocorticóides tais como a Dexametasona (DEXA), estão envolvidos em vários processos fisiológicos, entre eles ativação e inibição ou bloqueio de várias cascatas de sinalização, tais como a cascata da inflamação. Além disso, também exercem efeitos sobre o metabolismo de glicose em condições normais e patológicas.

Os glicocorticóides induzem a síntese de proteínas como as lipocortinas (calpatinas e anexinas) que são proteínas citoplasmáticas de mamíferos que interagem com fosfolípidios aniônicos de maneira cálcio-dependente (Pepinsky et al., 1988; Farooqui et al., 1999). Estas proteínas exercem ações inibitórias seletivas nas PLA₂ intra e extracelulares. Portanto, a DEXA é um importante inibidor das vias da ciclooxigenase e lipoxigenase, enzimas que estão envolvidas no metabolismo do ácido araquidônico (AA) e seus metabólitos envolvidos no processo inflamatório.

A fim de avaliar a participação do AA e seus derivados na secreção de insulina verificou-se a ação da DEXA sobre ilhotas estimuladas com glicose na presença de PLA₂. Os resultados demonstraram que o uso de concentrações crescentes de DEXA inibiu a secreção de insulina estimulada com 16.7 mM de glicose tanto na ausência quanto na presença de PLA₂ (fig. 20 e 21). Estudos realizados por Grill & Rundfeldt (1986) e

posteriormente Khan et al. (1992) também demonstraram que os glicocorticóides podem diminuir a secreção e biossíntese de insulina. Contudo, acredita-se que os efeitos promovidos pelos glicocorticóides dependam da concentração e tempo de exposição a estes agentes (Jeong et al, 2001).

Como mencionado, a degradação dos fosfolípidios de membrana através da atividade de fosfolipases tais como a PLA₂ gera ácido araquidônico (Waite, 1990). Para elucidar se a PLA₂ da *C.d.colli*. poderia estar induzindo formação e aumento do efluxo de ácido araquidônico, verificamos este efluxo em ilhotas estimuladas com glicose em presença da PLA₂.

A ilhota contém tanto PLA₂ e DAG lipase, associadas à membrana, que geram AA a partir de fosfatidilcolina e DAG respectivamente (Morgan, 1992). Nas células beta, como em outros tipos de células, o AA pode ser metabolizado em moléculas biologicamente ativas, predominantemente através das vias da ciclooxigenase e lipoxigenase (Turk et al., 1988).

A maior parte do AA produzido não está disponível para ser metabolizado (Mertz, 1988) e ainda permanece retido no interior da célula ao invés de ser liberado para o meio extracelular (Wolf, Pasquale & Turk, 1991) O AA somente é liberado para reacilação e nova incorporação aos fosfolípidios.

Nossos experimentos demonstraram que o aumento do efluxo de AA foi dose dependente e maior que a situação controle (**fig . 22A e 23A**). Além disto, a secreção de insulina (**fig. 23A e 23B**) foi proporcional ao aumento do efluxo de AA.

São sugeridos vários mecanismos através dos quais o AA poderia influenciar a secreção de insulina, incluindo interação com canais de potássio (Ordway, Walsh & Singer, 1989; Schweitzer, Madamba & Siggins, 1990), efeitos sobre o influxo de cálcio (Vacher, Mckenzie & Dufy, 1989), ativação de PLC (Zeitler & Handwerger, 1991), ativação da atividade da adenilato (Engelhard, Glaser, & Storm et al., 1978) ou guanilato ciclase (Gerzer et al., 1985), liberação de cálcio intracelular (Wolf, Colca & Mcdaniel, 1986) e efeitos sobre a PKC (Sekiguchi, Kawahara & Shimizu 1987; Shearman et al., 1991), proteína quinase dependente de Ca⁺²/Calmodulina – CAMK (Piomelli & Greengard, 1992) e outras quinases não identificadas (Basudev et al., 1992).

Como observado em nossos experimentos (fig. 10A, 10B, 13, 14 e 15), a presença do cálcio é extremamente importante para secreção de insulina estimulada por glicose, entretanto não está diretamente relacionada a secreção de insulina potencializada pela PLA₂ através da formação de AA.

Foi demonstrado que o AA exógeno produz na célula beta um aumento bifásico do Ca⁺² citoplasmático (Ramanadham et al., 1992). Estes efeitos foram atribuídos ao AA livre, pois o aumento deste Ca⁺² citoplasmático não foi alterado na presença de inibidores das enzimas da ciclo e lipoxigenase. Entretanto é pouco provável que o AA medie secreção de insulina induzida por nutrientes exclusivamente através da liberação de Ca⁺² do meio intracelular, pois a formação do IP₃ e conseqüente liberação dos estoques de Ca⁺² não são estímulos suficientes para iniciar uma resposta secretória na ausência de concentrações estimulatórias de glicose (Morgan, Rumford & Montague, 1985).

A segunda fase sustentada do aumento de cálcio, na célula beta, induzido pelo AA é dependente da presença do cálcio extracelular e é parcialmente inibida pela nifedipine, sugerindo um influxo de Ca⁺² através de canais de Ca⁺² sensível à voltagem (Ramanadham et al., 1992). Este é um importante evento na célula beta em resposta a estimulação com secretagogos nutrientes (Pretki & Matschinsky, 1987).

Entretanto a resposta secretória da insulina ao AA não é sempre dependente da presença do Ca⁺² extracelular, pois em vários estudos foi demonstrado um aumento da secreção de insulina estimulada pelo AA mesmo na ausência do cálcio extracelular (Band, Jones & Howell, 1992). Estes estudos sugerem uma dissociação entre os efeitos gerados pela glicose e aqueles referentes ao AA sobre o influxo de cálcio e a secreção de insulina, visto que o bloqueio dos canais L de cálcio aboliu completamente tanto o aumento do Ca⁺² citosólico (Pralong, Bartley & Wollheim, 1990) quanto da secreção de insulina induzida por glicose (Malaisse-Lagae, Sener & Malaisse., 1984), mas inibiu apenas parcialmente o aumento do cálcio (Ramanadham et al., 1992) não inibindo, entretanto, a secreção de insulina estimulada pelo AA (Band, Jones & Howell, 1992).

É pouco provável, todavia, que todos os efeitos do AA sobre a secreção de insulina sejam secundários ao aumento do Ca⁺² citosólico (de origem intra ou extracelular) pois tem-se demonstrado que o AA é capaz de estimular secreção de insulina em ilhotas permeabilizadas (eletricamente ou quimicamente) ou incubadas em soluções contendo

quelantes e concentrações sub-estimulatórias de cálcio (Mertz, 1988; Band, Jones & Howell, 1992).

Assim, concomitante com nossos resultados, apesar do Ca^{+2} citosólico ser importante para o controle da secreção de insulina induzida pelo AA, somente ele não pode ser razão para todos os efeitos do AA sobre a secreção de insulina (Jones & Persaud, 1993).

O processo de fusão de membranas requerido para a exocitose da insulina é energeticamente desfavorável e não ocorre espontaneamente, pois são necessários mecanismos específicos para promover este processo (Baker et al., 1988). Creutz (1981) demonstrou que o AA e outros ácidos graxos insaturados promovem a fusão dos grânulos de cromafina. Portanto, é possível que o AA atue como uma molécula fusogênica, sendo gerado no local do evento exocitótico, seja na superfície do grânulo ou na superfície interna da membrana plasmática, desestabilizando as membranas e promovendo a fusão entre elas (Metz, 1988; Band, Jones & Howell, 1992). O AA seria então responsável pela exocitose independente de Ca^{+2} e poderia estar sendo mediado através da ativação de uma proteína G (Ge), que está envolvida na exocitose (Knight, Von Grafenstein & Athayde, 1989).

Desta forma, a relação entre o AA e o processo de extrusão dos grânulos de insulina poderia explicar como a secreção de insulina induzida por AA pode ser independente de concentrações supralimiares de glicose.

Apesar de favorecer a extrusão dos grânulos de insulina, o aumento do cálcio intracelular pode induzir eventos apoptóticos. As células beta são mais susceptíveis que outros tipos celulares à apoptose e necrose por terem uma baixa expressão de enzimas varredoras de radicais de oxigênio, gerados no seu próprio metabolismo (Halliwell & Cross, 1994).

Os eventos apoptóticos incluem a fragilização de mitocôndrias (Kowaltowski, Netto & Vercesi, 1998), aumento na geração de espécies reativas de oxigênio pela NADPH oxidase (Kerr & Lang, 2000) e aumento na síntese de NO pelas isoformas da NO sintetase (Tsuura et al, 1998). Observamos que a PLA_2 pode aumentar a concentração de cálcio intracelular nas células da ilhota (em presença de glicose), sendo este aumento dependente da concentração de PLA_2 no meio. A glicose, da mesma forma, aumenta a entrada de cálcio através da abertura dos canais L de Ca^{+2} .

A **fig. 24** demonstra o efeito da PLA₂ sobre a quantidade de DNA fragmentado de ilhotas incubadas com 2.8 e 16.7 mM de glicose. Separadamente, altas concentrações de glicose ou de PLA₂ não causaram aumento da ocorrência de apoptose. Quando as ilhotas foram expostas ao mesmo tempo a altas concentrações de glicose e PLA₂ houve um pequeno aumento na formação de nucleossomos indicando que nesta condição as ilhotas estariam mais susceptíveis a apoptose. Federici et al. (2001) demonstrou que exposição prolongada a altas concentrações de glicose induz a expressão de proteínas pró-apoptóticas pelas células beta. Também o AA pode estar envolvido em vários processos celulares que levam a apoptose nas células beta, conforme mostrado por Rabinovitch, Baquerizo & Sumoski (1990). Dependendo do tecido alvo, são reportados diferentes efeitos do AA podendo atuar tanto como agente pró-apoptótico quanto anti-apoptótico,

Diante dos inúmeros papéis que têm demonstrado o AA, outro dado interessante neste trabalho está relacionado à quantificação de proteínas fosforiladas em resíduos tirosina (**fig. 25**) as quais poderiam estar envolvidas com outras vias de sinalização celular que modulariam a secreção de insulina.

Em 2.8 mM de glicose, a PLA₂ aumentou a quantidade de proteínas fosforiladas em tirosina com peso molecular em torno de 80 e 180 kDa. Também o aumento na concentração de glicose por si só aumenta estas proteínas, entre as quais podem estar unidades do IR (heterotetramero de subunidades com 95 e 135 kDa). Quando as ilhotas foram expostas a altas concentrações de glicose e PLA₂, houve decréscimo da quantidade destas proteínas à medida que concentração de PLA₂ era aumentada.

Diversos trabalhos citam a fosforilação em resíduos tirosina de proteínas variadas em resposta ao AA ou produtos da ciclo e lipoxigenase (Tang et al., 1995; Joubert et al., 2001).

Nossos resultados demonstraram que ocorre na ilhota um aumento dose dependente do efluxo de AA em resposta à PLA₂. Este ácido araquidônico bem como seus possíveis substratos poderiam estar ativando ou inibindo proteínas quinases, o que caracterizaria o AA como um segundo mensageiro e não como uma substância ativa por si própria (Jones & Persaud, 1993; Turk, Gross & Ramanadham, 1993; Brash, 2001).

CONCLUSÃO

Diante desses resultados conclui-se especificamente que:

> O aumento induzido pela PLA₂ sobre a secreção de insulina em baixa concentração de glicose e também a potencialização em concentrações supralimiares deste secretagogo e de potássio, são devidos a processos independentes da metabolização dos nutrientes nas células beta das ilhotas de Langerhans.

> Os canais iônicos de membrana estudados não estão diretamente envolvidos nem na modulação da atividade da PLA₂ em ilhota nem no mecanismo pelo qual a PLA₂ desencadeia incremento da resposta insulínica.

> Em baixa concentração de glicose este aumento estaria relacionado à mobilização de ácido araquidônico e conseqüentemente à sua participação no processo de exocitose dos grânulos de insulina.

> Em concentrações supralimiares de glicose, tanto a glicose quanto a PLA₂ podem estar alterando o efluxo de AA e desta forma estariam estimulando a secreção de insulina seja por extrusão dos grânulos seja por modular outras vias de sinalização envolvidas no processo de acoplamento estímulo e secreção de insulina.

> Há uma interação mútua entre o aumento do cálcio e os possíveis eventos apoptóticos desencadeados em presença de concentrações elevadas de glicose e PLA₂.

> A formação de AA poderia estar alterando o perfil de proteínas fosforiladas em resíduos tirosina as quais poderiam estar envolvidas com as vias de sinalização celular, controlando tanto processos metabólicos quanto exocitóticos

Conclusão:

Em linhas gerais a PLA₂ obtida a partir da purificação do veneno da cascavel *Crotalus durissus colillineatus* potencializa a secreção de insulina devido a mobilização de

ácido araquidônico e sua possível participação no processo de exocitose dos grânulos de insulina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, A., GROTHUSEN, J., ZEPEDA, H., SCHWARTZMAN, R. J. (1988) Gyrotoxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, is a thrombin-like enzyme. **Toxicon** 26, 953-960.
- ANCIAN, P., LAMBEAU, G., LAZDUNSKI, M. (1995). Multifunctional activity of the extracellular domain of the M-type (180 kDa) membrane receptor for secretory phospholipases A2. **Biochemistry** 34(40): 13146-51.
- ARITA, H., HANASAKI, K., NAKANO, T., OKA, S., TERAOKA, H., MATSUMOTO, K. (1991). Novel proliferative effect of phospholipase A2 in Swiss 3T3 cells via specific binding site. **J Biol Chem** 266(29): 19139-41.
- ARNI, R. K., WARD, R. J. (1996). Phospholipase A2—a structural review. **Toxicon** 34(8): 827-41.
- ASHCROFT, F. M. (1988) Adenosine triphosphate sensitive K⁺ channels. **A. Rev. Neurosc.** 11: 97-118.
- ASHCROFT, F. M., HARRISON, D. E., ASHCROFT, S. J. H. (1984) Glucose induces close of single potassium channels in isolated rat pancreatic B cells. **Nature** 312: 446-448.
- AZEVEDO-MARQUES, M. M., CUPO, P., COIMBRA, T. M., HERING, S. E., ROSSI, M. A., LAURE, C. J. (1985). Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. **Toxicon** 23(4), 631-636.
- BAKER, E. N., BLUNDELL, T. L., CUTFIELD, J. F., CUTFIELD, S. M., DODSON, E. J., DODSON, G. G., HODGKIN, D. M., HUBBARD, R. E., ISAACS, N. W., REYNOLDS, C. D. (1988). The structure of 2Zn pig insulin crystals at 1.5 Å resolution. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci** 319(1195): 369-456.
- BALSINDE, J., BALBOA, M. A., DENNIS, E. A. (1998). Functional coupling between secretory phospholipase A2 and cyclooxygenase-2 and its regulation by cytosolic group IV phospholipase A2. **Proc Natl Acad Sci U S A** 95(14): 7951-6.
- BAND, A. M., JONES, P. M., HOWELL, S. L. (1992). Arachidonic acid-induced insulin secretion from rat islets of Langerhans. **J Mol Endocrinol** 8(2): 95-101.
- BARRIO, A. (1961) Gyrotoxin, a new neurotoxin of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Acta Physiol Latinoamericana** 11, 224.
- BASUDEV, H., JONES, P. M., PERSAUD, S. J., HOWELL, S. L. (1993). Arachidonic acid-induced insulin secretion from rat islets of Langerhans is not mediated by protein phosphorylation. **Mol Cell Endocrinol** 91(1-2): 193-9.
- BEST, L., SENER, A., MALAISSE, W. J. (1984). Does glucose affect phospholipase A2 activity in pancreatic islets? **Biochem Int** 8(6): 803-9.
- BOSCHERO, A. C., BORDIN, S., HERCHUELZ, A., LEBRUN, P. (1990) Effects of glucose on ⁴⁵Ca outflow, cytosolic Ca²⁺ concentration and insulin release from freshly isolated and cultured adult rat islets. **Cell Calcium** 11: 603-609.
- BRAZIL, O V. (1972) Neurotoxin from the South American rattlesnake venom. **J. Formosan Med. Assoc.** 71: 394-400.

- BRAZIL, O. V., FRANCESCHI, J. P., WAISBICH, E. (1966). Pharmacology of crystalline crotoxin. I. Toxicity. **Mem Inst Butantan** 33(3), 973-80.
- BROWN, A. M., BIRNBAUMER, L. (1988) Direct G-protein gating of ion channels. **Am. J. Physiol.** 254: 401-410
- CATERRAL, W. A., EPSTEIN, P. N. (1992) Ions channels. **Diabetologia** 35: 223-233.
- CATERRAL, W. A. (1995) Structure and function of voltage-gated ion channels. **Annu. Rev. Biochem.** 64: 493-531.
- CHANG, C. C. (1985). Neurotoxins with phospholipase A₂ activity in snake venoms. **Proc Natl Sci Counc Repub China B** 9(2): 126-42.
- CHANG, C. C., CHEN, T. F., LEE, C. Y. (1973). Studies of the presynaptic effect of α -bungarotoxin on neuromuscular transmission. **J Pharmacol Exp Ther** 184(2), 339-45.
- CHANG, C. C., LEE, J. D. (1977) Crotoxin, the neurotoxin of South American rattlesnake venom, is a presynaptic toxin acting like β -bungarotoxin. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol** 296, 159-168.
- COOK, D. L., HALES, C. N. (1984) Intracellular ATP directly blocks K⁺ channel in pancreatic beta cells. **Nature** 311: 271 -273.
- CREUTZ, C. E. (1981). cis-Unsaturated fatty acids induce the fusion of chromaffin granules aggregated by synexin. **J Cell Biol** 91(1): 247-56.
- CUPILLARD, L., MULHERKAR, R., GOMEZ, N., KADAM, S., VALENTIN, E., LAZDUNSKI, M., LAMBEAU, G. (1999). Both group IB and group IIA secreted phospholipases A₂ are natural ligands of the mouse 180-kDa M-type receptor. **J Biol Chem** 274(11): 7043-51.
- DEMPSTER, D. W., GOPALAKRISHNAKONE, P., HAWGOOD, B. J. (1980) Intramitochondrial calcium deposits associated with muscle necrosis induced by crotoxin. **J Physiol** 300, 21.
- DENNIS, E. A. (1983) Phospholipases. In **The Enzymes** vol XVI, Academic Press. Inc, New York, Inc.
- EDDLESTONE, G. T. (1995). ATP-sensitive K channel modulation by products of PLA₂ action in the insulin-secreting HIT cell line. **Am J Physiol** 268(1 Pt 1): C181-90.
- ENGELHARD, V. H., GLASER, M., STORM, D. R. (1978). Effect of membrane phospholipid compositional changes on adenylate cyclase in LM cells. **Biochemistry** 17(16): 3191-200.
- FAROOQUI, A. A., LITSKY, M. L., FAROOQUI, T., HORROCKS, L. A. (1999). Inhibitors of intracellular phospholipase A₂ activity: their neurochemical effects and therapeutical importance for neurological disorders. **Brain Res Bull** 49(3): 139-53.
- FAURE, G., BON, C. (1988) Crotoxin, a phospholipase A₂ neurotoxin from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*: purification of several isoforms and comparison of their molecular structure and of their biological activities. **Biochemistry** 27 (2), 730-738.

- FEDERICI, M., HRIBAL, M., PEREGO, L., RANALLI, M., CARADONNA, Z., PEREGO, C., USELLINI, L., NANO, R., BONINI, P., BERTUZZI, F., MARLIER, L. N., DAVALLI, A. M., CARANDENTE, O., PONTIROLI, A. E., MELINO, G., MARCHETTI, P., LAURO, R., SESTI, G., FOLLI, F. (2001). High glucose causes apoptosis in cultured human pancreatic islets of Langerhans: a potential role for regulation of specific Bcl family genes toward an apoptotic cell death program. **Diabetes** 50(6): 1290-301.
- FLATT, P. R. (1996) Hormonal and neural control of endocrine pancreatic function. In **Textbook of Diabetes**. 2nd ed, pp.9.1-9.7 [J.C. Pickup and G. Williams, editors]. Oxford: Blackwell.
- FREDHOLM, B. B., DUNÉR-ENGSTROM, M., FASTBOM, J., HU, P. S., DER PLOEG, I.V. (1991) Role of G protein, cyclic AMP, and ion channel in the of transmitter release by adenosine. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 276 - 288.
- GAMBERO, A., LANDUCCI, E. C., TOYAMA, M. H., MARANGONI, S., GIGLIO, J. R., NADER, H. B., DIETRICH, C. P., DE NUCCI, G., ANTUNES, E. (2002). Human neutrophil migration in vitro induced by secretory phospholipases A2: a role for cell surface glycosaminoglycans. **Biochem Pharmacol** 63(1): 65-72.
- GARCIA-LIMA, E., LAURE, C. J. (1987) A study of bacterial contamination of rat snake venom. **Rev Soc Bras Med Trop** 20, 19-21.
- GELB, M. H., CHO, W., WILTON, D. C. (1999). Interfacial binding of secreted phospholipases A(2): more than electrostatics and a major role for tryptophan. **Curr Opin Struct Biol** 9(4): 428-32.
- GERZER, R., WITZGALL, H., TREMBLAY, J., GUTKOWSKA, J., HAMET, P. (1985). Rapid increase in plasma and urinary cyclic GMP after bolus injection of atrial natriuretic factor in man. **J Clin Endocrinol Metab** 61(6): 1217-9.
- GLASER, K. B., MOBILIO, D., CHANG, J. Y., SENKO, N. (1993). Phospholipase A2 enzymes: regulation and inhibition. **Trends Pharmacol Sci** 14(3): 92-8.
- GONCALVES, J. M., POLSON, A. (1947) The electrophoretic analysis of snake venoms. **Arch. Biochem.** 13: 253-259.
- GONÇALVES, J. M., VIEIRA, L. G. (1950) Estudos sobre veneno de serpentes brasileiras -I. Análise electroforética. **Ann Acad Bras Cienc** 22, 141-149.
- GRILL, V., RUNDFELDT, M. (1986). Abnormalities of insulin responses after ambient and previous exposure to glucose in streptozocin-diabetic and dexamethasone-treated rats. Role of hyperglycemia and increased B-cell demands. **Diabetes** 35(1): 44-51.
- GRODSKY, G. M., BENNETT, L. L. (1966). Cation requirements for insulin secretion in the isolated perfused pancreas. **Diabetes** 15(12): 910-3.
- GRODSKY, G. M. (1989) A new phase of insulin secretion. How will it contribute to our understanding of β cell function? **Diabetes**, 38:673-678.
- GROSS, R. W., RAMANADHAM, S., KRUSZKA, K. K., HAN, X., TURK, J. (1993). Rat and human pancreatic islet cells contain a calcium ion independent phospholipase A2 activity selective for hydrolysis of arachidonate which is stimulated by adenosine triphosphate and is specifically localized to islet beta-cells. **Biochemistry** 32(1): 327-36.

- GUTIÉRREZ, J. M., LOMONTE, B. (1995) Phospholipase A₂ myotoxin from Bothrops snake venoms. **Toxicon** 33(11): 1405 - 1424.
- HADESCOV, C. J. (1980) Mechanism of glucose induced insulin secretion. **Physiol. Rev.**, v.60: p.442-509.
- HALLIWELL, B. (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? **Lancet** 344(8924): 721-4.
- HALLIWELL, B., CROSS, C. E. (1994). Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. **Environ Health Perspect** 102 Suppl 10: 5-12.
- HANASAKI, K., ARITA, H. (1992). Purification and characterization of a high-affinity binding protein for pancreatic-type phospholipase A₂. **Biochim Biophys Acta** 1127(3): 233-41.
- HAWGOOD, B. J. SANTANA DE SA, S. (1979). Changes in spontaneous and evoked release of transmitter induced by the crotoxin complex and its component phospholipase A₂ at the frog neuromuscular junction. **Neuroscience** 4(2), 293-303.
- HAZEN, S. L., STUPPY, R. J., GROSS, R. W. (1990). Purification and characterization of canine myocardial cytosolic phospholipase A₂. A calcium-independent phospholipase with absolute fl- 2 regiospecificity for diradyl glycerophospholipids. **J Biol Chem** 265(18): 10622-30.
- HERNANDEZ, M., BURILLO, S. L., CRESPO, M. S., NIETO, M. L. (1998). Secretory phospholipase A₂ activates the cascade of mitogen-activated protein kinases and cytosolic phospholipase A₂ in the human astrocytoma cell line 1321N1. **J Biol Chem** 273(1): 606-12.
- HOOKE, M., COUCHMAN, J., WOODS, A., ROBINSON, J., CHRISTNER, J. E. (1984). Proteoglycans in basement membranes. **Ciba Found Symp** 108: 44-59.
- HUWILER, A., STAUDT, G., KRAMER, R. M., PFEILSCHIFTER, J. (1997). Cross-talk between secretory phospholipase A₂ and cytosolic phospholipase A₂ in rat renal mesangial cells. **Biochim Biophys Acta** 1348(3): 257-72.
- JEONG, I. K., OH, S. H., KIM, B. J., CHUNG, J. H., MIN, Y. K., LEE, M. S., LEE, M. K., KIM, K. W. (2001). The effects of dexamethasone on insulin release and biosynthesis are dependent on the dose and duration of treatment. **Diabetes Res Clin Pract** 51(3): 163-71.
- JIA L. G., SHIMOKAWA, K.I., BJARNSON, J. B., FOX, J. W. (1996) Snake venom metalloproteinases: Structure, function and relationship to the ADAMs family of proteins. **Toxicon** 34(11-12), 1269-1276.
- JOLLY, Y. C., MAJOR, C., WOLF, B. A. (1993). Transient activation of calcium-dependent phospholipase A₂ by insulin secretagogues in isolated pancreatic islets. **Biochemistry** 32(45): 12209-17.
- JONAS, J. C., LI, G., PALMER, M., WELLER, U., WOLLHEIM, C. B. (1994). Dynamics of Ca²⁺ and guanosine 5'-[gamma-thio]triphosphate action on insulin secretion from alpha-toxin-permeabilized HIT-T15 cells. **Biochem J** 301(Pt 2): 523-9.
- JONES, P. M., PERSAUD, S. J. (1993). The involvement of protein kinase C in glucose-stimulated insulin secretion. **Biochem Soc Trans** 21(4): 428S.
- JONES, P. M., PERSAUD, S. J. (1993). Arachidonic acid as a second messenger in glucose-induced insulin secretion from pancreatic beta-cells. **J Endocrinol** 137(1): 7-14.

- JONES, P. M., PERSUAUD, S. J., HOWELL, S. L. (1991) Protein kinase C and the regulation of insulin secretion from pancreatic B cells. **J. Mol. Endocr.** 6:121-127.
- JOUBERT, A. M., PANZER, A., JOUBERT, F., LOTTERING, M. L., BIANCHI, P. C., DU TOIT, P. J., SEEGER, J. C. (2001). Identification of a tyrosine kinase-phosphorylated protein in arachidonic acid- and prostaglandin A(2)-treated cells in vitro. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids** 65(3): 173-7.
- KERR M. A., LANG, M. L. (2000). Characterization of FC α R-triggered Ca²⁺ Signals : role in neutrophil NADPH oxidase activation. **Biochem. Biophys. Res. Com.** 276:749-755.
- KHAN, A., OSTENSON, C. G., BERGGREN, P. O., EFENDIC, S. (1992). Glucocorticoid increases glucose cycling and inhibits insulin release in pancreatic islets of ob/ob mice. **Am J Physiol** 263(4 Pt 1): E663-6.
- KINI, R. M., EVANS, H. J. (1989) A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipase A₂. **Toxicon** 27: 613-635.
- KNIGHT, D. E., VON GRAFENSTEIN, H., ATHAYDE, C. M. (1989). Calcium-dependent and calcium-independent exocytosis. **Trends Neurosci** 12(11): 451-8.
- KODURI, R. S., BAKER, S. F., SNITKO, Y., HAN, S. K., CHO, W., WILTON, D. C., GELB, M. H. (1998). Action of human group IIa secreted phospholipase A₂ on cell membranes. Vesicle but not heparinoid binding determines rate of fatty acid release by exogenously added enzyme. **J Biol Chem** 273(48): 32142-53.
- KOLSET, S. O., GALLAGHER, J. T. (1990). Proteoglycans in haemopoietic cells. **Biochim Biophys Acta** 1032(2-3): 191-211.
- KOMATSU, M., SHARP, G. W., AIZAWA, T., HASHIZUME, K. (1997). Glucose stimulation of insulin release without an increase in cytosolic free Ca²⁺ concentration: a possible involvement of GTP. **Jpn J Physiol** 47(Suppl 1): S22-4.
- KONRAD, R. J., JOLLY, Y. C., MAJOR, C., WOLF, B. A. (1992a). Carbachol stimulation of phospholipase A₂ and insulin secretion in pancreatic islets. **Biochem J** 287(Pt 1): 283-90.
- KONRAD, R. J., JOLLY, Y. C., MAJOR, C., WOLF, B. A. (1992b). Inhibition of phospholipase A₂ and insulin secretion in pancreatic islets. **Biochim Biophys Acta** 1135(2): 215-20.
- KOWALTOWSKI, A. J., NETTO, L. E., VERCESI, A. E. (1998). The thiol-specific antioxidant enzyme prevents mitochondrial permeability transition. Evidence for the participation of reactive oxygen species in this mechanism. **J Biol Chem** 273(21): 12766-9.
- KUWATA, H., NAKATANI, Y., MURAKAMI, M., KUDO, I. (1998). Cytosolic phospholipase A₂ is required for cytokine-induced expression of type IIA secretory phospholipase A₂ that mediates optimal cyclooxygenase-2-dependent delayed prostaglandin E₂ generation in rat 3Y1 fibroblasts. **J Biol Chem** 273(3): 1733-40.
- LAMBEAU, G., ANCIAN, P., BARHANIN, J., LAZDUNSKI, M. (1994). Cloning and expression of a membrane receptor for secretory phospholipases A₂. **J Biol Chem** 269(3): 1575-8.

- LAMBEAU, G., ANCIAN, P., NICOLAS, J. P., BEIBOER, S. H., MOINIER, D., VERHEIJ, H., LAZDUNSKI, M. (1995). Structural elements of secretory phospholipases A2 involved in the binding to M-type receptors. **J Biol Chem** 270(10): 5534-40.
- LAMBEAU, G., BARHANIN, J., SCHWEITZ, H., QAR, J., LAZDUNSKI, M. (1989). Identification and properties of very high affinity brain membrane- binding sites for a neurotoxic phospholipase from the taipan venom. **J Biol Chem** 264(19): 11503-10.
- LAMBEAU, G., BARHANIN, J., LAZDUNSKI, M. (1991a). Identification of different receptor types for toxic phospholipases A2 in rabbit skeletal muscle. **FEBS Lett** 293(1-2): 29-33.
- LAMBEAU, G., LAZDUNSKI, M., BARHANIN, J. (1991b). Properties of receptors for neurotoxic phospholipases A2 in different tissues. **Neurochem Res** 16(6): 651-8.
- LAYCHOCK, S. G. (1982). Phospholipase A2 activity in pancreatic islets is calcium-dependent and stimulated by glucose. **Cell Calcium** 3(1): 43-54.
- LEE, C. Y. (1972) Chemistry and pharmacology of polypeptide toxins in snake venoms. **A. Ver. Pharmacol.** 12, 265-286.
- LENNON, B. W., KAISER, I. I. (1990). Isolation of a crotoxin-like protein from the venom of a South American rattlesnake (*Crotalus durissus collilineatus*). **Comp Biochem Physiol B** 97(4), 695-9.
- LOWETH, A. C., SCARPELLO, J. H., MORGAN, N. G. (1995). Phospholipase A2 expression in human and rodent insulin-secreting cells. **Mol Cell Endocrinol** 112(2): 177-83.
- LOWETH, A. C., SCARPELLO, J. H., MORGAN, N. G. (1996). A specific inhibitor of cytosolic phospholipase A2 activity, AACOCF3, inhibits glucose-induced insulin secretion from isolated rat islets. **Biochem Biophys Res Commun** 218(2): 423-7.
- MALAISSSE, W. J., SENER, A., MAHY, M. (1974). The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. Sorbitol metabolism in isolated islets. **Eur J Biochem** 47(2): 365-70.
- MALAISSSE-LAGAE, F., SENER, A., MALAISSSE, W. J. (1984). Hexose metabolism in pancreatic islets: phosphoglycerate 2,3-mutase and enolase activities in rat islets. **Biochimie** 66(11-12): 723-5.
- MERTZ, S. A. (1988). Exogenous arachidonic acid promotes insulin release from intact or permeabilized rat islets by dual mechanisms. Putative activation of Ca^{+2} mobilization and protein kinase C. **Diabetes** 37 (11): 1453-69.
- MILLER, B., SARANTIS, M., TRAYNELIS, S. F., ATTWELL, D. (1992). Potentiation of NMDA receptor currents by arachidonic acid. **Nature** 355(6362): 722-5.
- MORGAN, B. P. (1992). Effects of the membrane attack complex of complement on nucleated cells. **Curr Top Microbiol Immunol** 178: 115-40.
- MORGAN, N. G., RUMFORD, G. M., MONTAGUE, W. (1985). Studies on the mechanism by which melittin stimulates insulin secretion from isolated rat islets of Langerhans. **Biochim Biophys Acta** 845(3): 526-32.
- MURAKAMI, M., KOBAYASHI, T., UMEDA, M., KUDO, I.,INOUE, K. (1988). Monoclonal antibodies against rat platelet phospholipase A2. **J Biochem (Tokyo)** 104(6): 884-8.

- MURAKAMI, M., NAKATANI, Y., ATSUMI, G., INOUE, K., KUDO, I. (1997). Regulatory functions of phospholipase A2. **Crit Rev Immunol** 17(3-4): 225-83.
- NICOLAS, J. P., LIN, Y., LAMBEAU, G., GHOMASHCHI, F., LAZDUNSKI, M., GELB, M. H. (1997). Localization of structural elements of bee venom phospholipase A2 involved in N-type receptor binding and neurotoxicity. **J Biol Chem** 272(11): 7173-81.
- ORDWAY, R. W., WALSH, J. V., JR., SINGER, J. J. (1989). Arachidonic acid and other fatty acids directly activate potassium channels in smooth muscle cells. **Science** 244(4909): 1176-9.
- PARKER, K. J., JONES, P. M., HUNTON, C. H., PERSAUD, S. J., TAYLOR, C. G., HOWELL, S. L. (1996). Identification and localisation of a type IV cytosolic phospholipase A2 in rat pancreatic beta-cells. **J Mol Endocrinol** 17(1): 31-43.
- PEPINSKY, R. B., TIZARD, R., MATTALIANO, R. J., SINCLAIR, L. K., MILLER, G. T., BROWNING, J. L., CHOW, E. P., BURNE, C., HUANG, K. S., PRATT, D. (1988). Five distinct calcium and phospholipid binding proteins share homology with lipocortin I. **J Biol Chem** 263(22): 10799-811.
- PETERSEN, O. H., FINDLAY, Z. (1987) Electrophysiology of the pancreas. **Physiol.Rev.** 67:1054-1116.
- PIOMELLI, D., GREENGARD, P. (1991). Bidirectional control of phospholipase A2 activity by Ca^{2+} /calmodulin- dependent protein kinase II, cAMP-dependent protein kinase, and casein kinase II. **Proc Natl Acad Sci U S A** 88(15): 6770-4.
- PRALONG, W. F., BARTLEY, C., WOLLHEIM, C. B. (1990). Single islet beta-cell stimulation by nutrients: relationship between pyridine nucleotides, cytosolic Ca^{2+} and secretion. **Embo J** 9(1): 53-60.
- PRENTKI, M., MATSCHINSKY, F. M. (1987). Ca^{2+} , cAMP, and phospholipid-derived messengers in coupling mechanisms of insulin secretion. **Physiol Rev** 67(4): 1185-248.
- RABINOVITCH, A., BAQUERIZO, H., SUMOSKI, W. (1990). Cytotoxic effects of cytokines on islet beta-cells: evidence for involvement of eicosanoids. **Endocrinology** 126(1): 67-71.
- RAJAN, A. S., AGUILAR-BRYAN, L., NELSON, D. A., YANEY, G. C., HSU, W. H., KUNZE, D. L., BOYD III, A. E. (1990) Ion channels and insulin secretion. **Diabetes Care** 13: 340-367.
- RAJAN, A.S., HILL, R.S., BOYD III, A.E.(1989) Effect of rise in cAMP levels in Ca^{2+} influx through voltage-dependent Ca^{2+} channels in Hit cells: second-messenger synarchy in β -cells. **Diabetes** 38: 874-880.
- RAMANADHAM, S., GROSS, R., TURK, J. (1992). Arachidonic acid induces an increase in the cytosolic calcium concentration in single pancreatic islet beta cells. **Biochem Biophys Res Commun** 184(2): 647-53.
- RAMANADHAM, S., WOLF, M. J., JETT, P. A., GROSS, R. W., TURK, J. (1994). Characterization of an ATP-stimulatable Ca^{2+} -independent phospholipase A2 from clonal insulin-secreting HIT cells and rat pancreatic islets: a possible molecular component of the beta-cell fuel sensor. **Biochemistry** 33(23): 7442-52.

- RAMANADHAM, S., WOLF, M. J., LI, B., BOHRER, A., TURK, J. (1997). Glucose-responsivity and expression of an ATP-stimulatable, Ca^{2+} -independent phospholipase A2 enzyme in clonal insulinoma cell lines. **Biochim Biophys Acta** 1344(2): 153-64.
- RENETSEDER, R., BRUNIE, S., DIJKSTRA, B. W., DRENTH, J., SIGLER, P. B. (1985). A comparison of the crystal structures of phospholipase A2 from bovine pancreas and *Crotalus atrox* venom. **J Biol Chem** 260(21): 11627-34.
- ROSENFELD, G. (1971) Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: *Venomous Animals and their Venoms*, Vol. II, p. 345. (Bucherl, W., Buckley, E. E., Deulofeu, V., Eds.) New York : Academic Press.
- RUBSAMEN, K., BREITHAUP, H., HABERMANN, E. (1971). Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. I. Subfractionation and recombination of the crotoxin complex. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol** 270(3): 274-88.
- SCHWEITZER, P., MADAMBA, S., SIGGINS, G. R. (1990). Arachidonic acid metabolites as mediators of somatostatin-induced increase of neuronal M-current. **Nature** 346(6283): 464-7.
- SCOTT, D. L., WHITE, S. P., OTWINOWSKI, Z., YUAN, W., GELB, M. H., SIGLER, P. B. (1990). Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A2. **Science** 250(1987): 1541-6.
- SEKIGUCHI, T., KAWAHARA, S., SHIMIZU, H. (1987). Calcium-permeable channel in sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle. **J Biochem (Tokyo)** 102(2): 307-12.
- SENER, A., BLACHER, J., RASSCHAERT, J., MALAISSE, W. J. (1990) Stimulus-secretion coupling of arginine-induced insulin release: comparison with histidine-induced insulin release. **Endocrinology** 127:107-113.
- SHEARMAN, M. S., SHINOMURA, T., ODA, T., NISHIZUKA, Y. (1991). Synaptosomal protein kinase C subspecies: A. Dynamic changes in the hippocampus and cerebellar cortex concomitant with synaptogenesis. **J Neurochem** 56(4): 1255-62.
- SIMONSSON, E., KARLSSON, S., AHREN, B. (1998). Ca^{2+} -independent phospholipase A2 contributes to the insulinotropic action of cholecystokinin-8 in rat islets: dissociation from the mechanism of carbachol. **Diabetes** 47(9): 1436-43.
- SLOTTA, K., FRAENKEL-CONRAT, H. L. (1938) Schlangengifte. III. Mitteil.: Reinigung und Krystallisation des Klapperschlangengiftes. **Ber Dtsch Chem** 71, 1076-1081.
- SMITH, D. M., WAITE, M. (1992). Phosphatidylinositol hydrolysis by phospholipase A2 and C activities in human peripheral blood neutrophils. **J Leukoc Biol** 52(6): 670-8.
- STURGESS, N. C., ASHFORD, M. L. J., CARRINGTON, C. A., HALES, C. N. (1986) Single channel recordings of potassium currents in an insulin-secreting cell line. **J. Endocr.** 109:201- 207.
- SUGA, H., MURAKAMI, M., KUDO, I., INOUE, K. (1993). Participation in cellular prostaglandin synthesis of type-II phospholipase A2 secreted and anchored on cell-surface heparan sulfate proteoglycan. **Eur J Biochem** 218(3): 807-13.
- TANG, D. G., TARRIEN, M., DOBRZYNSKI, P., HONN, K. V. (1995). Melanoma cell spreading on fibronectin induced by 12(S)-HETE involves both protein kinase C- and protein tyrosine kinase-

- dependent focal adhesion formation and tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase (pp125FAK). **J Cell Physiol** 165(2): 291-306.
- TOYAMA, M. H., CARNEIRO, E. M., MARANGONI, S., BARBOSA, R. L., CORSO, G. BOSCHERO, A. C. (2000). Biochemical characterization of two crotamine isoforms isolated by a single step RP-HPLC from *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom and their action on insulin secretion by pancreatic islets. **Biochim Biophys Acta** 1474(1): 56-60.
- TOYAMA, M. H., OLIVEIRA, D. G., ROSA, R. G., CARNEIRO, E. M., CAMARA, P. R., ANTUNES, E., NUCCI, G., BERIAM, L. O. S., JOAZEIRO, P., MARANGONI, S., BOSCHERO, A. C. (2002). Structural and biological characterization of a novel PLA₂ isoform isolated from the *Crotalus durissus collilineatus* venom.
- TSUURA, Y., ISHIDA, H., SHINOMURA, T., NISHIMURA, M., SEINO, Y. (1998). Endogenous nitric oxide inhibits glucose-induced insulin secretion by suppression of phosphofructokinase activity in pancreatic islets. **Biochem Biophys Res Commun** 252(1): 34-8.
- TU, A. T. (1977) **Venons. Chemistry and Molecular Biology**, New York - London - Sydney - Toronto. John Wiley.
- TURK, J., GROSS, R. W., RAMANADHAM, S. (1993). Amplification of insulin secretion by lipid messengers. **Diabetes** 42(3): 367-74.
- TURK, J., HUGHES, J. H., EASOM, R. A., WOLF, B. A., SCHARP, D. W., LACY, P. E., MCDANIEL, M. L. (1988). Arachidonic acid metabolism and insulin secretion by isolated human pancreatic islets. **Diabetes** 37(7): 992-6.
- TURK, J., WOLF, B. A., MCDANIEL, M. L. (1987). The role of phospholipid-derived mediators including arachidonic acid, its metabolites, and inositoltrisphosphate and of intracellular Ca²⁺ in glucose-induced insulin secretion by pancreatic islets. **Prog Lipid Res** 26(2): 125-81.
- TZENG, M. C., YEN, C. H., TSAI, M. D. (1996). Binding proteins on synaptic membranes for certain phospholipases A₂ with presynaptic toxicity. **Adv Exp Med Biol** 391: 271-8.
- VACHER, P., MCKENZIE, J., DUFY, B. (1989). Arachidonic acid affects membrane ionic conductances of GH3 pituitary cells. **Am J Physiol** 257(2 Pt 1): E203-11.
- VALENTIN, E., KODURI, R. S., SCIMECA, J. C., CARLE, G., GELB, M. H., LAZDUNSKI, M., LAMBEAU, G. (1999). Cloning and recombinant expression of a novel mouse-secreted phospholipase A₂. **J Biol Chem** 274(27): 19152-60.
- VALENTIN, E., SINGER, A. G., GHOMASHCHI, F., LAZDUNSKI, M., GELB, M. H., LAMBEAU, G. (2000). Cloning and recombinant expression of human group IIF-secreted phospholipase A(2). **Biochem Biophys Res Commun** 279(1): 223-8.
- VALENTIN, E., LAMBEAU, G. (2000). Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A(2) and their receptors and binding proteins. **Biochim Biophys Acta** 1488(1-2): 59-70.
- VERHEI, J. H. M.; VOLWERK, J. J.; JANSEN, E. H.; PUYK, W. C.; DIJKSTRA, B. W.; DRENT, J., DE HAAS, G. H. (1980) Methylation of histidine-48 in pancreatic phospholipase A₂ role of histidine and calcium ion in the catalytic mechanism. **Biochemistry** 19(4):743-750

- WAITE, M., KING, L., THORNBURG, T., OSTHOFF, G., THUREN, T. Y. (1990). Metabolism of phosphatidylglycerol and bis(monoacylglycero)-phosphate in macrophage subcellular fractions. **J Biol Chem** 265(35): 21720-6.
- WEI, Y., TAE, N., TATSUYA F., HIROYOSHI, H., TAKAO, S., YASUHARU, S., IGHIO N. (2000) Synergism of protein kinase A, protein kinase C, and Myosin Light-Chain Kinase in the secretory Cascade of the pancreatic B-cell. **Diabetes** 49: 945-52.
- WOLF, B. A., COLCA, J. R., MCDANIEL, M. L. (1986). Calmodulin inhibits inositol trisphosphate-induced Ca^{2+} mobilization from the endoplasmic reticulum of islets. **Biochem Biophys Res Commun** 141(2): 418-25.
- WOLF, B. A., PASQUALE, S. M., TURK, J. (1991). Free fatty acid accumulation in secretagogue-stimulated pancreatic islets and effects of arachidonate on depolarization-induced insulin secretion. **Biochemistry** 30(26): 6372-9.
- YANG, H. C., FAROOQUI, A. A., HORROCKS, L. A. (1994). Effects of glycosaminoglycans and glycosphingolipids on cytosolic phospholipases A2 from bovine brain. **Biochem J** 299(Pt 1): 91-5.
- ZAWALICH, W., ZAWALICH, K. (1985). Effect of exogenous phospholipase A2 on insulin secretion from perfused rat islets. **Diabetes** 34(5): 471-6.
- ZAWALICH, W. S.(1988) Modulation of insulin secretion from β -cells by phosphoinositide-derived second-messenger molecules. **Diabetes** 37:137-141.
- ZEITLER, P., WU, Y. Q., HANDWERGER, S. (1991). Melittin stimulates phosphoinositide hydrolysis and placental lactogen release: arachidonic acid as a link between phospholipase A2 and phospholipase C signal-transduction pathways. **Life Sci** 48(21): 2089-95.
- ZEITLER, P., HANDWERGER, S. (1985). Arachidonic acid stimulates phosphoinositide hydrolysis and human placental lactogen release in an enriched fraction of placental cells. **Mol Pharmacol** 28(6): 549-54.