

SILVIA CRISTINA CREPALDI ALVES

MATURAÇÃO DA RESPOSTA SECRETÓRIA DE INSULINA,
EM ILHOTAS DE RATOS RECÉM-NASCIDOS, MANTIDAS
EM CULTURA: EFEITO TEMPORAL DA PROLACTINA.

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato a)
Silvia Cristina Crepaldi Alves
e aprovada pela Comissão Julgadora.

7/11/96 *ABoschero*

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

ORIENTADOR: PROF. DR. ANTONIO CARLOS BOSCHERO

CAMPINAS - SÃO PAULO

1996

AL87m

29294/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

SILVIA CRISTINA CREPALDI ALVES

MATURAÇÃO DA RESPOSTA SECRETÓRIA DE INSULINA,
EM ILHOTAS DE RATOS RECÉM-NASCIDOS, MANTIDAS
EM CULTURA: EFEITO TEMPORAL DA PROLACTINA.

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

ORIENTADOR: PROF. DR. ANTONIO CARLOS BOSCHERO

CAMPINAS - SÃO PAULO

1996

Ficha Catalográfica

AL87m	Alves, Silvia Cristina Crepaldi. Maturação da resposta secretória de insulina, em ilhotas de ratos recém-nascidos, mantidas em cultura: efeito temporal da prolactina / Silvia Cristina Crepaldi Alves. - - Campinas, SP: [s.n.], 1996. Orientador: Antonio Carlos Boschero. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. 1. Prolactina. 2. Insulina. 3. Pâncreas. 4. Ratos recém-nascidos. I. Boschero, Antonio Carlos. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.
-------	--

Campinas, 07 de novembro de 1996.

BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

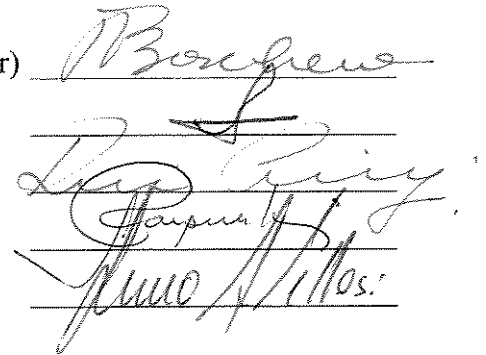
Prof. Dr. ANTONIO CARLOS BOSCHERO (Orientador)

Prof. Dr. MARIO JOSÉ ABDALLA SAAD

Prof. Dr. RUI CURI

Prof. Dr. ANGELO RAFAEL CARPINELLI

Dr. LÍCIO AUGUSTO VELLOSO



Handwritten signatures of the five titular members of the exam board, corresponding to the names listed to the left. The signatures are written in ink on a set of horizontal lines.

SUPLENTES:

Prof. Dr. ANTÔNIO ARI GONÇALVES

Prof. Dr. EVERARDO MAGALHÃES CARNEIRO



Two horizontal lines provided for the signatures of the suplentes (Prof. Dr. ANTÔNIO ARI GONÇALVES and Prof. Dr. EVERARDO MAGALHÃES CARNEIRO).

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: GLUT2 em células B-pancreáticas de ratos adultos.....	52
FIGURA 2: GLUT2 em membranas citoplasmáticas de ilhotas adultas.....	53
FIGURA 3: GLUT2 em ilhotas adultas.....	54
FIGURA 4: GLUT2 em ilhota neonatal controle.....	55
FIGURA 5: GLUT2 em ilhota neonatal tratada com PRL.....	56
FIGURA 6: GLUT1 em ilhota adulta.....	57
FIGURA 7: GLUT1 em ilhota neonatal controle.....	48
FIGURA 8: GLUT1 em ilhota neonatal tratada com PRL.....	59
FIGURA 9: Análise por “Western blot” do efeito da PRL e da glicose, no GLUT2, em ilhotas neonatais cultivadas.....	61
FIGURA 10: Efeito da glicose (8,3 mM) sobre o efluxo fracional do ^{45}Ca de ilhotas neonatais cultivadas durante 7 a 9 dias, na ausência (●) ou presença (■) de PRL.....	63
FIGURA 11: Efeito da glicose (22 mM) sobre o efluxo fracional do ^{45}Ca , em ilhotas neonatais cultivadas durante 7 a 9 dias, na presença (■) ou ausência (●) de PRL.....	64
FIGURA 12: Efeito de 22 mM de glicose (intervalo 40-70 min) sobre o efluxo fracional do ^{45}Ca , em ilhotas neonatais cultivadas durante 7 (A) ou 19 (B) dias, na presença (■) ou ausência (●) de PRL.....	65

FIGURA 13: Efeito da Leu (20 mM) sobre o efluxo fracional do ^{45}Ca , em ilhotas neonatais cultivadas durante 7 (A) ou 19 (B) dias, na presença (■) ou ausência (●) de PRL.....	66
FIGURA 14: Efeito da glicose (22 mM), Cch (100 μM), Arg (20 mM) e Leu (20 mM), sobre a captação do ^{45}Ca , durante 5 min, por ilhotas neonatais mantidas em cultura, durante 7 (A) ou 19 (B) dias, na ausência ou presença de PRL.....	70
FIGURA 15: Efeito da glicose (22 mM), Cch (100 μM), Arg (20 mM) e Leu (20 mM), sobre a captação do ^{45}Ca , durante 90 min, por ilhotas neonatais mantidas em cultura, durante 7 (A) ou 19 (B) dias, na ausência ou presença de PRL.....	71
FIGURA 16: Efeito da glicose (16,7 mM) e da oxo-M (100 μM), sobre a secreção de insulina por ilhotas de ratos de 1 (□) e 7 (●) dias de vida, mantidas em cultura durante 24 horas.....	74
FIGURA 17: Efeito da glicose (16,7 mM) sobre a secreção de insulina, por ilhotas de ratos de 1 dia de vida, cultivadas durante 7 dias, na presença (●) ou ausência (□) de 2 $\mu\text{g/ml}$ de PRL.....	75
FIGURA 18: Efeito de 100 μM de oxo-M (A e B) e 0,1 μM de forbol 12,13-dibutirato (C e D), sobre a secreção de insulina, por ilhotas neonatais controle (o) e tratadas com PRL (●).....	76

FIGURA 19: Efeito de diferentes estimuladores da secreção de insulina, durante 90 min, em ilhotas neonatais, cultivadas durante 7 (A) ou 19 (B) dias, na ausência ou presença de 2 µg/ml de PRL.....	79
FIGURA 20: Efeito do tempo de cultura (A) e de tratamento com PRL (B), sobre a secreção de insulina estimulada por diferentes agentes, em ilhotas neonatais de ratos.....	80

LISTA DE TABELAS

- Tabela I:** Efeitos de diferentes substâncias na captação do ^{45}Ca (pg/ilhota), durante 5 min, em ilhotas neonatais cultivadas durante 7 e 19 dias, na presença ou ausência de PRL.....Apêndice
- Tabela II:** Efeitos de diferentes substâncias na captação do ^{45}Ca (pg/ilhota), durante 90 min, em ilhotas neonatais cultivadas durante 7 e 19 dias, na presença ou ausência de PRL.....Apêndice
- Tabela III:** Efeitos de diferentes agentes na secreção de insulina, durante 90 min, em ilhotas cultivadas durante 7 e 19 dias, na presença ou ausência de PRL.....Apêndice

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIMPLIFICAÇÕES

α -KIC :	α -cetoisocaproato
μ Ci :	microcurrie
μ g :	micrograma
μ l :	microlitro
μ M :	micromolar
[ATP] :	concentração de ATP
$[Ca^{2+}]_i$:	concentração citosólica de Ca^{2+} livre
Ac :	anticorpo
Arg :	arginina
ATP :	adenosina-5'-trifosfato
B :	célula beta pancreática
BG :	“back ground” ou radiação de fundo
Cch :	carbamilcolina
cDNA :	DNA complementar
cpm :	contagens por minuto
DG :	diacilglicerol
DNA :	ácido desoxirribonucleico
EDTA :	ácido etilenodiamino tetraacético
EGTA :	ácido etilenoglicol-bis (β -aminoetil eter) N,N,N',N' tetraacético
EPM :	erro padrão da média
<i>et al.</i> :	<i>et alii</i> (e colaboradores)
FAD :	flavina adenina dinucleotídeo
G :	glicose
g :	grama
GABA :	ácido gama-aminobutírico
GH :	hormônio do crescimento
GHr :	receptor do hormônio do crescimento

GLUT1 :	transportador de glicose facilitador tipo 1
GLUT2 :	transportador de glicose facilitador tipo 2
GSH :	glutathione (reduzida)
GSSG :	glutathione dissulfidrica (oxidada)
h :	hora
Hepes :	ácido (N-[2-hidroxietil] piperazina-N'-[2- etanosulfônico]
IDDM :	diabetes melito insulino-dependente
IP ₃ :	trifosfato de inositol
IU :	unidade internacional
JAK :	Janus quinase
Kb :	kilobase
kDa :	kilodalton
Km :	constante de Michaelis
KREBS :	solução tampão bicarbonato de Krebs-Ringer
L :	litro
Leu :	leucina
mA :	miliampere
MAX :	máximo ou cpm contidos em 1,0 ml do meio de incubação
MGF :	fator da glândula mamária ou STAT5
min :	minuto
ml :	mililitro
mm :	milímetro
mM :	milimolar
n :	número de experimentos
NADP :	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH :	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
ng :	nanograma
NIDDM :	diabetes melito não insulino-dependente
nm :	nanômetro

NSB :	ligação inespecífica (“non-specific binding”)
Oxo-M :	oxotremorina-M
p :	probabilidade
PBS :	solução salina fosfato-tamponada
pg :	picograma
PIF :	fator inibidor da prolactina
PKC :	proteína quinase cálcio-dependente
PL :	lactogênio placentário
PLC :	fosfolipase C
pMol :	picomol
PMSF :	"phenylmethysulfonyl fluoride"
PRL :	prolactina
PRLr :	receptor de prolactina
RIE :	radioimunoensaio
RNA :	ácido ribonucleico
RNA _m :	RNA mensageiro
rpm :	rotações por minuto
RPMI-1640 :	meio para cultura de células
RT-PCR :	transcriptase reversa-reação em cadeia da polimerase
SDS :	"sodium dodecyl sulfate"
seg :	segundo
STATs :	transdutores do sinal citoplasmático e ativadores da transcrição
T3 :	triiodotironina
TPA :	“12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate”
TRH :	hormônio liberador de tireotrofina
Tris :	tris (hidroximetil) aminometano
TYR :	resíduo tirosina do PRLr
v:	volt
V _{max} :	velocidade máxima de transporte

vol : volume

w/v : peso/volume

SUMÁRIO

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Simplificações

1. Introdução.....	1
1.1. Características gerais da célula B-pancreática fetal e neonatal.....	3
1.2. Maturação da célula B-pancreática.....	14
1.3. Prolactina: aspectos gerais.....	16
1.4. Receptores de PRL e mecanismos de ação hormonal.....	17
1.5. Efeitos gerais de PRL.....	23
1.6. Efeitos da PRL na célula B-pancreática.....	24
2. Objetivos.....	26
3. Material e Métodos.....	27
3.1. Animais.....	27
3.2. Obtenção e cultura de ilhotas pancreáticas da ratos neonatais.....	27
3.3. Isolamento e cultura de ilhotas pancreáticas de rato adulto.....	29
3.4. Determinação da viabilidade celular pelo teste de exclusão de corante.....	30
3.5. Imunohistoquímica das proteínas de membrana GLUT2 e GLUT1.....	30
3.6. Análise da proteína de membrana GLUT2, por “Western blot”.....	31
3.6.1. Preparação da membrana.....	31
3.6.2. Dosagem da concentração proteica.....	31
3.6.3. “Immunoblotting”.....	31
3.7. Análise da permeabilidade ao ^{45}Ca	33
3.7.1. Incorporação do ^{45}Ca	33
3.7.2. Efluxo do ^{45}Ca	35
3.8. Conteúdo total de insulina.....	36
3.9. Secreção dinâmica de insulina.....	36
3.10. Secreção estática de insulina.....	37

3.11. Radioimunoensaio de insulina.....	38
3.12. Soluções.....	40
3.12.1. Solução de Hanks.....	40
3.12.2. Solução de Krebs-Ringer.....	40
3.12.3. Solução de Lantânio.....	41
3.12.4. Líquido de Cintilação.....	42
3.12.5. Solução Ácido-Álcool.....	42
3.12.6. Tampão Fosfato para RIE.....	42
3.12.7. Solução de Inibidores de Proteases.....	42
3.12.8. Gel de Empilhamento.....	43
3.12.9. Gel de Separação.....	43
3.12.10. Solução Salina Fosfato-Tamponada (PBS).....	44
3.12.11. PBS-Leite.....	44
3.12.12. Tampão de Corrida.....	44
3.12.13. Tampão de Transferência.....	45
3.13. Substâncias Radioativas.....	45
3.13.1. Anticorpos.....	45
3.13.2. Insulina.....	45
3.13.3. Radioisótopos.....	46
3.14. Reagentes.....	46
3.15. Análise Estatística.....	50
4. Resultados.....	51
4.1. Determinação da viabilidade celular pelo teste de exclusão de corante.....	51
4.2. Imunohistoquímica das proteínas de membrana GLUT2 e GLUT1.....	51
4.3. “Western blot” da proteína de Membrana GLUT2.....	60
4.4. Efluxo do cálcio.....	62
4.5. Captação do cálcio.....	67
4.6. Conteúdo total de insulina.....	72
4.7. Secreção dinâmica de insulina.....	72

4.8. Secreção estática de insulina.....	77
5. Discussão.....	81
6. Resumo e Conclusões.....	93
7. Abstract.....	95
8. Referências Bibliográficas.....	97
Apêndice	

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Muitos estudos demonstram que a célula B pancreática de ratos fetais e neonatais secreta menor quantidade de insulina em resposta a estímulos nutrientes, em especial à glicose, quando comparada a de adultos (LAMBERT *et al.*, 1971; AGREN *et al.*, 1975; ASPLUND *et al.*, 1975; HELLERSTROM *et al.*, 1979; FREINKEL *et al.*, 1984; BOSCHERO *et al.*, 1988; AMMON *et al.*, 1989; MOURMEAUX *et al.*, 1989; HELLERSTRÖM & SWENNE, 1991). Esta resposta secretória “imatura” também é descrita no pâncreas fetal humano (SPELLACY *et al.*, 1967 apud GRASSO *et al.* 1973; GRASSO *et al.*, 1968 apud GRASSO *et al.* 1973; ADAM *et al.*, 1969 apud GRASSO *et al.* 1973 ; THORELL, 1970; KING *et al.*, 1971; MILNER *et al.*, 1972; GRASSO *et al.*, 1973). Curiosamente, semelhanças entre o mecanismo secretório imaturo do feto e do recém-nascido e a resposta secretória diminuída no diabetes tipo II e no diabetes da fase senil (WARD *et al.*, 1984; ELAHI *et al.*, 1985; AMMON *et al.*, 1987; REAVEN *et al.*, 1987; KAHN & PORTE, 1988; LEAHY, 1990), fazem do neonato um modelo importante para o estudo das referidas patologias. Além disso, o modelo é ideal para análises dos mecanismos envolvidos na maturação da secreção de insulina bem como os diferentes fatores atuantes no processo.

Os estudos da fisiopatologia do diabetes tipo II ou NIDDM (diabetes melito não insulino-dependente) identificam basicamente dois defeitos; resistência à insulina e função prejudicada da célula B-pancreática (MANEATIS *et al.*, 1982; LEAHY, 1990). Estas alterações fundamentais incluídas na patogênese do NIDDM são causadas por uma

combinação de fatores genéticos e ambientais (para revisão ver MUECKLER, 1990; TAYLOR *et al.*, 1994). O envelhecimento também associa-se à redução na tolerância à glicose (DE FRONZO, 1984; BUTTURINI, 1986; PERFETTI *et al.*, 1995) e representa um fator etiológico para o desenvolvimento do NIDDM (ANDRES & TOBIN, 1975).

Quanto ao funcionamento da célula B, estudos recentes realizados em ilhotas de ratos adultos portadores de diabetes tipo II (induzido por estreptozotocina neonatal), indicam que nesta patologia a alteração na resposta secretória à glicose deve-se provavelmente a uma deficiência no sistema de transporte da hexose através da membrana da célula B, bem como na atividade da FAD-desidrogenase glicerofosfato, enzima chave na transferência de equivalentes reduzidos pela lançadeira (“shuttle”) do glicerol fosfato (THORENS *et al.*, 1990; GIROIX *et al.*, 1991; GIROIX *et al.*, 1992a; GIROIX *et al.*, 1992b). Outros modelos de disfunção na célula B relatam um ciclo fútil nas reações catalizadas pelas isoenzimas hexoquinase e glicose-6-fosfatase (KHAN *et al.*, 1989; KHAN *et al.*, 1990; VIONNET *et al.*, 1992), de maneira que a perda de ATP em tal processo poderia afetar a resposta secretória à D-glicose (PORTHA, 1985). Além disso, ilhotas isoladas de ratos portadores de NIDDM apresentam alterações na biossíntese e secreção de insulina, alterações na função mitocondrial e diminuição na captação líquida do $^{45}\text{Ca}^{2+}$ glico-estimulada (PORTHA *et al.*, 1988).

1.1. Características gerais da célula B-pancreática fetal e neonatal

No período fetal, a secreção de insulina estimulada por glicose é reduzida e monofásica. Contudo, tanto em roedores quanto em humanos, após o nascimento esta resposta é rapidamente convertida a um padrão adulto típico (HOLE *et al.*, 1988; BOSCHERO *et al.*, 1988; HELLERSTROM & SWENNE, 1991). Portanto, assim como outros órgãos, o pâncreas endócrino durante a fase perinatal, passa por etapas críticas de maturação da resposta secretória, a qual é influenciada por mudanças ambientais e hormonais (para revisão ver EPPLE & BRINN, 1987).

Em ilhotas fetais de ratos, no 21,5º dia de gestação, sabe-se que as reservas de insulina são adequadas (SODDOYEZ-GOFFAUX *et al.*, 1971) e que o mecanismo biossintético está desenvolvido (ASPLUND, 1973a). Apesar disto, os dados da literatura são bastante contraditórios quanto a capacidade secretória do pâncreas, nas diferentes fases de vida fetal.

Em adultos, a estimulação da célula B por concentrações supra-limíares de glicose, provoca uma resposta secretória bifásica, caracterizada por uma elevação inicial rápida, seguida de um aumento secundário lento, que permanece enquanto o estímulo estiver presente (CLEMENTS & RHOTEN, 1976). Durante o desenvolvimento fetal do pâncreas de rato, uma secreção de insulina monofásica e de curta duração, surge entre o 17º e 20º dias de gestação (KERVIRAN & RANDON, 1980; RHOTEN, 1980). Em alguns trabalhos, o feto de rato a partir do 18,5º dia de gestação já responde “in vivo” à hiperglicemia, aumentando sua concentração de insulina plasmática (GIRARD *et al.*,

1974; KERVRAN & GIRARD, 1974; BLAZQUEZ *et al.*, 1975; KERVRAN & GIRARD, 1976; KERVRAN *et al.*, 1979). No pâncreas fetal de rato, a glicose é capaz de estimular a liberação de insulina durante os últimos 4 dias de gestação, de maneira qualitativamente semelhante à do pâncreas adulto (KIKUCHI *et al.*, 1974; CLEMENTS & RHOTEN, 1976) ou seja, um padrão bifásico. A principal diferença é a magnitude da 2º fase de secreção, a qual no pâncreas fetal a termo é apenas 40% comparada ao adulto. Estes resultados são observados em fragmentos de pâncreas fetal e ilhotas isoladas, tanto “in vivo” (GIRARD *et al.*, 1974; KERVRAN & GIRARD, 1974; BLAZQUEZ *et al.*, 1975; KERVRAN & GIRARD, 1976; KERVRAN *et al.*, 1979) quanto “in vitro” (LAMBERT, 1970 apud SODOYEZ-GOFFAUX *et al.*, 1979; SODOYEZ-GOFFAUX *et al.*, 1971; BLAZQUEZ *et al.*, 1975; DE GASPARO *et al.*, 1975; BLAZQUEZ *et al.*, 1975; KERVRAN *et al.*, 1977; RANDON & KERVRAN, 1979; SODOYEZ-GOFFAUX *et al.*, 1979; KERVRAN & RANDON, 1980; RHOTEN, 1980; HILL & RHOTEN, 1983;).

Segundo HILL & RHOTEN (1983) no pâncreas fetal de 17 dias detecta-se uma primeira fase de secreção mínima em resposta a glicose e uma resposta secretória evidente à Arginina (Arg) e Arg mais Leucina (Leu). Alguns autores demonstram que as células B de ratos, no 20º dia de gestação já respondem a glicose, Leu, Arg (SODOYEZ-GOFFAUX *et al.*, 1979; RHOTEN, 1980) e teofilina (KERVRAN & RANDON, 1980), entretanto a secreção nesta fase é bastante reduzida em relação à do adulto. Por outro lado, pâncreas fetal removido no 18º dia de gestação e incubado imediatamente ou cultivado durante 4 dias, não responde à Leu e Arg e nem mesmo à

combinação destes aminoácidos com cafeína (LAMBERT, 1970 apud SODOYEZ-GOFFAUX *et al.*, 1979).

Além da demonstração de que no período fetal a secreção de insulina glicestimulada é muito pequena, tanto em animais experimentais (ASPLUND, 1973a; AMMON *et al.*, 1983) quanto em humanos (OBENSHAIN *et al.*, 1970; PHELPS *et al.*, 1978); vários trabalhos descrevem que a glicose é ineficaz em estimular a secreção de insulina em fragmentos de pâncreas fetal de ratos (VECCHIO *et al.*, 1967 apud SODOYEZ-GOFFAUX *et al.*, 1979; CLARK *et al.*, 1968 apud HOLE *et al.*, 1988; ASPLUND *et al.* 1969; HEINZE & STEINKE, 1971; SODOYEZ-GOFFAUX *et al.*, 1971; HEINZE & STEINKE, 1972; ASPLUND, 1973b; ASPLUND *et al.*, 1975; FOA *et al.*, 1976 apud RHOTEN, 1980; HASTY & MURRELL, 1978) ou ilhotas fetais isoladas (HEINZE & STEINKE, 1971; HEINZE & STEINKE, 1972; AGREN *et al.*, 1976; HELLERSTROM *et al.*, 1978; AMMON *et al.*, 1985). Mesmo utilizando-se um sistema de perfusão dinâmica do pâncreas observa-se apenas um pico inicial e reduzido de secreção de insulina (BURR *et al.*, 1971; ASPLUND *et al.*, 1973a; HEINZE *et al.*, 1975). Entretanto, na presença de inibidores da fosfodiesterase, surge um padrão de resposta semelhante ao adulto (HEINZE & STEINKE, 1972; BURR *et al.*, 1971; LAMBERT *et al.*, 1971). Existem relatos de que ilhotas de ratos de 1 dia de vida, não respondem à glicose (AGREN *et al.*, 1976; ASPLUND, 1973a; GRILL *et al.*, 1975) e de que, assim como ilhotas fetais, respondem a uma alta concentração de glicose apenas na presença de teofilina (AMMON *et al.*, 1985) ou isobutilmetilxantina (BLÁZQUEZ *et al.*, 1975). KERVAN & GIRARD (1974) sugerem que embora “in vitro” a secreção fetal

de insulina seja ausente ou reduzida em resposta à glicose, o mesmo não ocorre “in vivo”. HOLE *et al.* (1988) relatam que em ilhotas de ratos, no 2º dia pós-natal inicia-se uma elevação na resposta secretória à glicose. Segundo AGREN *et al.* (1976) no 1º dia pós-natal a resposta secretória ao D-gliceraldeído, já é comparável à do adulto. Ilhotas neonatais (36 horas de vida) cultivadas durante uma semana, também respondem ao gliceraldeído e à teofilina (BOSCHERO *et al.*, 1988).

Apesar das muitas divergências, alguns estudos deixam claro que existem diferenças qualitativas na secreção de insulina por ilhotas fetais e de 3 dias de vida. Em ilhotas fetais, o perfil de liberação não é tipicamente bifásico e a resposta mantida que ocorre em uma segunda fase de secreção não tem as características da segunda fase do adulto pois não é inibida por bloqueadores de canal de Ca^{2+} (HOLE *et al.*, 1988). No 3º dia de vida, a resposta tem um perfil de secreção de insulina mais parecido ao de uma ilhota adulta e, é dependente da entrada de Ca^{2+} através de canais voltagem-sensíveis. Em síntese, o desenvolvimento da sensibilidade a glicose no rato, parece iniciar-se ao redor do 17º dia de gestação; a mesma torna-se monofásica e transitória antes do surgimento de uma resposta secretória mantida em presença do estímulo. A resposta semelhante à do adulto, ocorre apenas após o nascimento, entre o 3º e 5º dias de vida. Portanto, etapas importantes do processo de maturação ocorrem durante 6 a 8 dias da fase perinatal.

As discrepâncias na literatura com relação ao momento em que a ilhota torna-se sensível à glicose, pode ter várias explicações. São usadas diferentes linhagens de ratos e os estudos são realizados “in vivo” e “in vitro”, em fragmentos de pâncreas e ilhotas isoladas. Para os experimentos “in vitro”, o tratamento do pâncreas fragmentado, a

severidade do isolamento da ilhota, e os diferentes meios e condições de incubação usados, poderiam influenciar os resultados. Além disso, muitos trabalhos demonstram que a concentração de glicose as quais as ilhotas estão expostas na fase perinatal influencia a maturação da resposta secretória (ASPLUND, 1973b; FREINKEL *et al.*, 1984; HELLERSTROM *et al.*, 1979). Portanto, a composição e a quantidade do alimento ingerido bem como os níveis glicêmicos da mãe prenhe, são variáveis importantes.

Alguns trabalhos analisam o desenvolvimento de sistemas inibidores da secreção de insulina. No pâncreas fetal de 21 dias, a somatostatina é capaz de inibir o efeito secretor da Arg (SODDOYEZ-GOFFAUX *et al.*, 1979) e da glicose (WOLLHEIM *et al.*, 1978a; WOLLHEIM *et al.*, 1979; HOLE *et al.*, 1988). Além disso, a secreção de insulina glico-estimulada pode ser inibida em até 80% por altas concentrações de adrenalina (GIRARD *et al.* 1974; WOLLHEIM & SHARP, 1981; HOLE *et al.*, 1988). Estes dados indicam que alguns sistemas inibidores são ativados antes da maturação da resposta secretória à glicose.

A capacidade da célula B fetal em liberar insulina é adequadamente funcional e a maquinaria exocitótica não é limitante do processo. Isto parece claro pelo fato de aminoácidos estimularem a secreção fetal (HEINZE & STEINKE, 1972) e de teofilina ou isobutilmetilxantina potencializarem a resposta pancreática fetal à glicose (LAMBERT *et al.*, 1971; HEINZE & STEINKE, 1972; BLASQUEZ *et al.*, 1975; GRILL *et al.*, 1975; AMMON *et al.*, 1985; MOURMEAUX *et al.*, 1985).

Em humanos, os estudos da resposta secretória do pâncreas fetal, também apresentam resultados variáveis. A insulina pode ser detectada no pâncreas e no sangue

fetais humanos entre a 8º e 10º semanas de gestação (STEINKE & DRISCOLL, 1965 apud GRASSO 1973; RASTOGUI *et al.*, 1970 apud GRASSO 1973). Segundo MILNER *et al.* (1972), no pâncreas fetal humano de 12 a 24 semanas, a secreção de insulina em resposta a uma estimulação com glicose, é pequena ou ausente. Porém, observa-se resposta secretória à Leu, na 14º semana e à Arg, entre a 18º e 20º semanas . Além disso, em crianças prematuras (idade gestacional de 35 ± 2 semanas e peso médio de 2,16 Kg) nas primeiras 24 horas de vida, a resposta secretória a uma infusão de glicose também é muito pequena, comparada à elevação nos níveis séricos de insulina produzida pela infusão de uma mistura de aminoácidos (GRASSO *et al.*, 1973). Nos trabalhos de OTONKOSKY *et al.* (1988), o pâncreas fetal humano responde a glicose a partir da 17º semana de gestação e o padrão bifásico de secreção surge somente após o nascimento. Por outro lado, também existem relatos de que a glicose aumenta significativamente a secreção de insulina “in vitro”, em pâncreas fetal humano de 10 a 12 semanas (PRONINA & SAPRONOVA, 1976 apud RHOTEN, 1980).

Na célula B adulta, o metabolismo da glicose gera sinais que induzem o fechamento de canais de K^+ sensíveis ao ATP, reduzindo o efluxo do K^+ , despolarizando a membrana e causando a abertura de canais de Ca^{2+} voltagem-sensíveis; o que permite o influxo de Ca^{2+} , a favor do seu gradiente eletroquímico. A elevação da $[Ca^{2+}]_i$ promove a extrusão dos grânulos de insulina (para revisão ver MALAISSE *et al.*, 1984). No adulto, tanto o Ca^{2+} intra quanto o extracelular é usado na geração de uma resposta bifásica completa, entretanto a segunda fase de secreção é basicamente dependente da captação

de Ca^{2+} extracelular através dos canais voltagem-dependentes (WOLLHEIM *et al.*, 1978b; WOLLHEIM & SHARP, 1981).

No feto, algumas características do processo de secreção são comparáveis aos no adulto, porém existem muitas diferenças.

Dois canais de K^+ já foram identificados em células B isoladas de adulto e neonatal. Um canal de K^+ sensível ao ATP e bloqueável pelas sulfoniluréias (COOK & HALES, 1984; RORSMAN & TRUBE, 1985; ASCHROFT *et al.*, 1985) e um canal de K^+ ativado por Ca^{2+} (COOK *et al.*, 1984; FINDLAY *et al.*, 1985). Em células B-pancreáticas fetais também está caracterizada a presença dos canais de K^+ sensíveis ao ATP (COOK *et al.*, 1986; RORSMAN *et al.*, 1989). No adulto, ambos são inibidos pela glicose (ATWATER *et al.*, 1988). Em células B fetais de ratos, WELSH *et al.* (1987) demonstram que os canais de K^+ ATP-dependentes são insensíveis à glicose, porém podem ser inibidos pela sulfoniluréia, tolbutamida. Segundo RORSMAN *et al.* (1989) os mesmos são sensíveis à [ATP] intracelular e às sulfoniluréias. Contudo, glipizida, outra sulfoniluréia bloqueadora dos canais de K^+ modulados por ATP, não aumenta a secreção de insulina de células B fetais (PETERSON *et al.*, 1986). Por outro lado diazoxida, estimuladora desses canais, inibe a secreção de insulina em ilhotas fetais mantidas em cultura (MOURMEAUX *et al.*, 1985). O efluxo do $^{86}\text{Rb}^+$ não é alterado pela glicose, em ilhotas isoladas de fetos de 21 dias (AMMON *et al.*, 1985). Em ilhotas neonatais, a permeabilidade a K^+ também está alterada em comparação ao adulto (BOSCHERO *et al.*, 1988; BOSCHERO *et al.*, 1993b). Sabe-se que o canal de K^+ sensível ao ATP é regulado pelo metabolismo celular (MISLER *et al.*, 1986). Portanto, alterações na sensibilidade à

glicose, podem ocorrer devido ao metabolismo imaturo (AGREN *et al.*, 1976; GRILL *et al.*, 1981; BOSCHERO *et al.*, 1990) ou uma alteração na densidade efetiva, bem como na funcionalidade do canal de K^+ ATP-sensível (HOLE *et al.*, 1988, BOSCHERO *et al.*, 1988).

No feto, existem correntes de Ca^{2+} voltagem-dependentes (RORSMAN *et al.*, 1989) e a secreção de insulina, induzida por concentrações despolarizantes de KCl, é inibida pelo verapamil, bloqueador do canal de Ca^{2+} modulado por voltagem (HOLE *et al.*, 1988). Contudo, a glicose não pode estimular o influxo de Ca^{2+} (AMMON *et al.*, 1985) e a secreção reduzida de insulina, estimulada pela glicose, é insensível ao verapamil (HOLE *et al.*, 1988). Por outro lado, em ilhotas neonatais a secreção de insulina estimulada pela glicose, é inibida pela nifedipine (BOSCHERO *et al.*, 1988), a exemplo do que ocorre em ilhotas adultas (MALAISSE & BOSCHERO, 1977). Isto indica que estas ilhotas possuem canais de Ca^{2+} sensíveis à diidropiridina, e que a secreção de insulina induzida por glicose depende da entrada de Ca^{2+} .

Os dados obtidos em ilhotas fetais, indicam que a glicose é incapaz de despolarizar a membrana da célula B (BOSCHERO *et al.*, 1988) o que por sua vez, poderia ser consequência de um número reduzido de canais de K^+ ATP-sensíveis ou da incapacidade celular em produzir o sinal metabólico necessário para bloquear o canal. Neste sentido, já foi proposto que embora as células B fetais de rato possuam canais de K^+ sensíveis ao ATP, eles não são afetados pela glicose devido ao metabolismo imaturo do açúcar (RORSMAN *et al.*, 1989; AMMON *et al.*, 1989; BOSCHERO *et al.*, 1990).

Em ilhotas fetais também demonstra-se a presença e a efetividade dos canais de K^+ utilizando-se quinina, um bloqueador dos canais de K^+ ATP-sensíveis (FINDLAY *et al.*, 1985), que potencializa a resposta secretória fetal à glicose e confere sensibilidade ao verapamil na inibição da referida resposta (HOLE *et al.*, 1988). A imaturidade destas ilhotas não é específica para glicose, mas também para o α -cetoisocaproato ou α -KIC (HOLE *et al.*, 1988). A perda do padrão de secreção bifásico em resposta ao α -KIC bem como à glicose, indica que a imaturidade da resposta não ocorre em uma via específica do metabolismo da glicose. HOLE *et al.* (1988) concluem que a diferença na resposta de ilhotas fetais à glicose e ao α -KIC em relação ao adulto, ocorre devido a uma deficiência no acoplamento estímulo-secreção entre o metabolismo dos substratos e o canal de K^+ . Poderia ocorrer uma falha na produção do sinal metabólico necessário para fechar o canal de K^+ ou incapacidade do sensor em interpretar o sinal. A diminuição na taxa de efluxo do $^{86}Rb^+$ (substituto do K^+) observada em ilhotas de ratos adultos estimuladas por glicose (BOSCHERO *et al.*, 1977), é ausente em ilhotas fetais (AMMON *et al.*, 1985) e bastante reduzida em ilhotas neonatais cultivadas (BOSCHERO *et al.*, 1988; BOSCHERO *et al.*, 1993b).

AMMON *et al.* (1983), fornecem evidência de que em ilhotas fetais de ratos que não secretam insulina em resposta a glicose, ocorre adicionalmente uma falha no aumento da atividade da via do “shunt” da hexose-monofosfato, ou na mudança do estado de oxidação/redução da glutatona (GSH/GSSG). Os autores discutem que devido ao fato da razão NADPH/NADP ser alta em ilhotas fetais, parece que elas são incapazes de transferir hidrogênio do NADPH para a glutatona. Se o estado redox da célula é

importante no acoplamento estímulo-secreção para o fechamento do canal de K^+ , então a falha na transferência de hidrogênio em ilhotas fetais, poderia ser responsável, em grande parte, pela resposta secretória diminuída a glicose.

Em síntese, os resultados obtidos em pâncreas fetal e de ratos de 3 dias, sugerem que a diferença entre a resposta fetal imatura e a resposta bifásica mais madura do pâncreas de ratos de 3 dias, origina-se em uma falha da glicose em despolarizar a membrana da célula B e aumentar a entrada de Ca^{2+} . Isto seria consequência da produção inadequada de ATP pela metabolização dos substratos energéticos, bem como da insensibilidade dos canais de K^+ à alteração da relação ATP/ADP, ou ainda devido a um número reduzido de canais de K^+ ATP-sensíveis, operantes.

Após o nascimento, a capacidade da glicose em promover o influxo de Ca^{2+} e a resposta secretória desenvolve-se rapidamente (HELLERSTROM & SWENNE, 1991). Estudos em ilhotas de ratos neonatais cultivadas, evidenciam que a sensibilidade a antagonistas do canal de Ca^{2+} , na secreção de insulina induzida pela glicose (BOSCHERO *et al.*, 1988) e no influxo de Ca^{2+} (BOSCHERO *et al.*, 1992a), surgem em menos de 36 horas. Contudo, nesta fase ainda observa-se que a resposta a estimulação por glicose, difere do adulto. Esta imaturidade é descrita em várias etapas do mecanismo de secreção; na produção reduzida de ATP (BOSCHERO *et al.*, 1990), na permeabilidade da membrana ao K^+ alterada (BOSCHERO *et al.*, 1988; BOSCHERO *et al.*, 1990; BOSCHERO *et al.*, 1993b), em falha na elevação da concentração do Ca^{2+} intracelular (BOSCHERO *et al.*, 1992a) e também na ausência de uma resposta secretória bifásica, típica do adulto (BOSCHERO *et al.*, 1993a).

As células B de roedores de 3 a 12 dias de vida apresentam canais de K^+ ATP-sensíveis que respondem a glicose (SCHWARTZ *et al.*, 1990), à maneira do adulto (ASHCROFT *et al.*, 1985; SCHWARTZ *et al.*, 1990). Portanto, se a insensibilidade relativa das células B fetais de rato à glicose, deve-se a um defeito no acoplamento do estímulo à despolarização da membrana e à abertura de canais de Ca^{2+} sensíveis a voltagem, este acoplamento ocorreria a partir do 3º dia pós-parto. BLACK *et al.* (1994), examinando em células B cultivadas de ratos, a relação entre estimulação da glicose, despolarização da membrana, atividade do canal de Ca^{2+} e influxo de Ca^{2+} , demonstram que o acoplamento entre estas etapas, torna-se semelhante ao adulto 3 a 5 dias após o nascimento.

A glicose é transportada para a célula B pancreática por uma proteína integral de membrana denominada GLUT2 (HELLMAN *et al.*, 1971; JOHNSON *et al.*, 1990; THORENS *et al.*, 1992), também encontrada em hepatócitos, células epiteliais proximais renais e células do epitélio intestinal (THORENS *et al.*, 1988; THORENS, *et al.*, 1990). Estudos da cinética do GLUT2, revelam que sua constante de equilíbrio (K_m) varia entre 20 e 50 mM e sua capacidade de transporte (V_{max}) é de aproximadamente 2400 pMol/h/ilhota. Estes dados indicam que a sua capacidade de transporte excede àquela necessária para fornecer glicose para a via glicolítica. A fosforilação da glicose pela glicoquinase IV ($K_m \cong 8$ mM), parece ser a etapa limitante da taxa de fluxo glicolítico (para revisão ver MEGLASSON & MATSCHINSKY, 1986; LENZEN & PANTEN, 1988; LENZEN, 1992). A glicoquinase IV é uma enzima que se expressa significativamente apenas no pâncreas e fígado (LENZEN & PANTEN, 1988). Nas

células B-pancreáticas, esta enzima acopla variações glicêmicas a mudanças correspondentes na taxa de fluxo metabólico através da glicólise (LENZEN, 1992). Segundo TIEDGE & LENZEN (1991), ilhotas pancreáticas de ratos adultos expressam 2 tipos de RNAm para glicoquinase (2,8 e 4,4 Kb). Análises de “Northern Blot” indicam que o pâncreas de rato neonatal, de 2 dias, expressa apenas o gene de 2,2 Kb; enquanto em animais de 16 dias, ambos são detectados (TIEDGE & LENZEN, 1993). Portanto, a “imaturidade” da resposta secretória de insulina em ratos neonatais, também pode relacionar-se ao padrão diferenciado de expressão do gene para glicoquinase, comparado ao pâncreas de 16 dias (TIEDGE & LENZEN, 1993).

1.2. Maturação da célula B-pancreática

É consenso na literatura que inúmeros parâmetros estão envolvidos na progressão natural dos eventos que conduzem ao comportamento secretório típico de ilhotas adultas.

Alguns autores relacionam a maturação da célula B pancreática à concentração de glicose no meio de cultura. Nos trabalhos de FREINKEL *et al.* (1978; apud DUDEK *et al.*, 1984), ilhotas fetais de rato (de 21,5 dias) apresentam aumento progressivo na secreção de insulina após 1, 4 e 7 dias de cultura em meio contendo 11,1 mM de glicose, contudo não ocorre uma 2ª fase secretória completa. HELLERSTROM *et al.* (1979) também observam maturação substancial na secreção de insulina por ilhotas fetais, cultivadas durante 7 a 8 dias em presença de 11,1 e 22,2 mM de glicose. Segundo DUDEK *et al.* (1984), os efeitos da glicose envolvem aumento no volume da ilhota, no

conteúdo de DNA e, no conteúdo e na liberação de insulina. Por outro lado, MOURMEAUX *et al.* (1985) não observam melhora significativa na resposta à glicose, em ilhotas fetais cultivadas durante 9 dias em presença de 10 mM de glicose. As causas destas divergências provavelmente devam-se não somente a variações na concentração de glicose, como também ao tipo de soro utilizado e a outros compostos do meio de cultura (DUDEK *et al.*, 1984).

Inúmeros hormônios circulantes, como triiodotironina ou T₃ (FISHER *et al.*, 1977, apud BOSCHERO *et al.*, 1989), hormônio do crescimento ou GH (CORNBLATH *et al.*, 1965, apud NIELSEN, 1982), prolactina ou PRL e os lactogênios placentários ou PL (ARAGONA & FRIESEN, 1979, apud NIELSEN, 1982); estão elevados na fase de vida perinatal. Segundo BOSCHERO *et al.* (1989), em ilhotas de rato neonatal ou adulto, cultivadas durante 7 a 9 dias, em presença de 10 µM de triiodotironina (T₃), não ocorre aumento na sensibilidade à glicose. Por outro lado, o GH e os lactogênios como a PRL e PL (ou somatomamotrofina coriônica), desempenham uma função importante na maturação da sensibilidade a glicose. Sabe-se que o GH e os lactogênios influenciam os mecanismos de síntese e secreção de insulina (SORENSEN *et al.*, 1987a; BRELJE *et al.*, 1989; NIELSEN *et al.*, 1986; BILLESTRUP & NIELSEN, 1991; MARKOFF *et al.*, 1990; BOSCHERO *et al.*, 1993a).

Nos últimos anos, inúmeros trabalhos discutem o papel destes hormônios, principalmente da PRL, na maturação da célula B-pancreática.

1.3. Prolactina: aspectos gerais

A PRL foi identificada por STRICKER & GRUETER em 1928 (apud Kelly, 1990), pela demonstração que extratos de hipófise bovina poderiam induzir secreção de leite em coelhos. Em 1932, RIDDLE *et al.* (apud KELLY, 1990) isolaram uma fração de extratos hipofisários bovino, capaz de estimular o crescimento do papo em pombos, e a denominaram *prolactin*. Desde então, este hormônio já foi identificado em inúmeros mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes e parece existir em todos os vertebrados (NICOLL & BERN, 1972 apud KELLY, 1990). Seu isolamento foi realizado por LEWIS *et al.*, (1971) e sua purificação por HWANG *et al.* (1972).

A PRL, GH e PL, são membros de uma família de hormônios polipeptídios, cuja homologia indica origem à partir de um gene ancestral (NIALL *et al.*, 1971; MILLER & EBERHARDT, 1983). Embora inúmeras funções lhes sejam atribuídas, o GH é mais frequentemente associado a uma estimulação geral do crescimento e do metabolismo, e a PRL à indução e manutenção da lactação em mamíferos.

A secreção de PRL aumenta uniformemente durante a gestação e os níveis plasmáticos podem elevar-se em até 20 vezes. A amamentação após o parto, contribui para manutenção da concentração hormonal plasmática materna elevada. Inúmeros fatores neuroendócrinos regulam a secreção de PRL. Dentre os componentes estimulatórios destacam-se gravidez, estimulação do mamilo, estrogênio, sono, estresse, TRH, antagonistas dopaminérgicos, opiáceos e serotonina. São inibidores da secreção de PRL, a dopamina e seus agonistas, o PIF (fator inibidor da PRL), o GABA (ácido gama-

aminobutírico) e a própria PRL (para revisão ver CLEMENS & SHAAR, 1980; LEONG *et al.*, 1983; KELLY, 1990).

Na espécie humana, a concentração plasmática média de PRL é de aproximadamente 10 ng/ml na mulher (variando de 1 a 20 ng/ml), e um pouco menor no homem. Estes níveis aumentam durante a gravidez e amamentação, para uma concentração máxima de 200 a 300 ng/ml (para revisão ver KELLY, 1990). No rato, a concentração plasmática de PRL varia entre 3,9 e 8 ng/ml, no 20º e no 21º dias de desenvolvimento fetal, respectivamente. Após o nascimento a concentração hormonal é 7,4 ng/ml no 1º dia; e 8,1 ng/ml no 5º dia (KHORRAM *et al.*, 1984).

1.4. Receptores de PRL e mecanismos de ação hormonal

Os receptores de PRL (PRLr) estão presentes em muitos tecidos e existem em várias formas, dependendo da espécie (HUGHES *et al.*, 1985 apud KELLY, 1990). Estão clonados no homem, rato, camundongo, coelho, vaca e galinha (BAZAN, 1989; SCOTT *et al.*, 1992; TANAKA *et al.*, 1992; KELLY *et al.*, 1993). No rato, identificam-se 3 formas naturais: uma forma curta de 291 aminoácidos (BOUTIN *et al.*, 1988); uma forma longa de 591 aminoácidos, que difere da forma curta apenas pela cauda C-terminal (SHIROTA *et al.*, 1990); e a forma Nb2 de 393 aminoácidos, identificada em células de linfoma Nb2 e que representa uma isoforma do PRLr longo, que perdeu 198 aminoácidos por deleção no último exon codificador do receptor (ALI *et al.*, 1991). Apenas as formas longa e Nb2 são capazes de transmitir um sinal lactogênico, como por exemplo estimular

os genes promotores das proteínas do leite, β -caseína ou β -lactoglobulina (LESUEUR *et al.*, 1991; ALI *et al.*, 1992 apud LOCHNAN *et al.*, 1995). Em humanos, a forma longa do PRLr (NAGANO *et al.*, 1995) tem sua atividade funcional lactogênica caracterizada em linhagem celular transfectada por cDNA (LOCHNAN *et al.*, 1995).

Em ratos não existem evidências de receptores diferentes para PRL e PL (FREEMARK *et al.*, 1993; FREEMARK *et al.*, 1995); embora os lactogênios placentários de humanos (HILL *et al.*, 1988); vacas (SCOTT *et al.*, 1992); e ovelhas (HANDWERGER, 1993) possam interagir com receptores distintos de PRL, GH e PL.

A ligação da PRL já está caracterizada em preparações de membrana obtidas de ilhotas isoladas (TESONE *et al.*, 1980) e demonstrada por autorradiografia em secções de tecido pancreático (POLAK *et al.*, 1990). Segundo MOLDRUP *et al.* (1989; 1990), os receptores de GH (GHr) e de PRL expressam-se em linhagens de células de insulinoma de rato (RIN-5AH-T2B). Os RNAs mensageiros do GHr e do PRLr, são demonstrados em ilhotas cultivadas e em ilhotas de rata prenhe e lactante (MOLDRUP *et al.*, 1993). Por intermédio de imunohistoquímica constata-se a presença do PRLr em célula B-pancreática de rato adulto e neonatal e aumento na expressão do PRLr em ilhotas durante a prenhez (SORENSEN & STOUT, 1995). O PRLr e seu RNAm, também são observados em vários tecidos fetais de rato no final da gestação (BOUTIN *et al.*, 1988; FREEMARK *et al.*, 1993; FREEMARK *et al.*, 1995). ROYSTER *et al.* (1995), demonstram aumento na expressão do RNAm e da proteína do PRLr, em inúmeros tecidos fetais de rato; inclusive pâncreas; no período compreendido entre o 17,5 e 20,5 dias de gestação. Estudos de RT-PCR (transcriptase reversa-reação em cadeia da

polimerase) sugerem que no rato, a forma longa do PRLr expressa-se no fígado e placenta maternos e distribui-se amplamente pelos tecidos fetais (inclusive pancreático), exceto coração. A isoforma curta do PRLr também encontra-se no fígado e placenta maternos; e em órgãos fetais tais como adrenal, rim, intestino delgado, fígado e timo. No feto, a forma curta do PRLr apresenta expressão limitada no pâncreas, na hipófise e no cérebro. Não ocorre no pulmão, pele e coração (FREEMARK *et al.*, 1995). Embora existam dúvidas quanto as funções precisas das formas longas e curtas dos PRLr na mediação dos efeitos dos hormônios lactogênicos, as diferenças na expressão relativa das duas formas nos vários tecidos fetais, pode ter importância fisiológica pelo fato já citado de que apenas a forma longa do receptor é mediadora da ativação do gene que transcreve a β -caseína (LESUEUR *et al.*, 1991; ALI *et al.*, 1992 apud LOCHNAN *et al.*, 1995).

O PRLr é um membro da superfamília de receptores de citoquinas e GH; os quais caracterizam-se por não conterem um domínio catalítico intrínseco (tal como tirosina ou quinase serina/treonina), mas associarem-se a tirosinas quinases citoplasmáticas. Estas enzimas, necessárias para a transdução do sinal, constituem uma família denominada JAK (Janus quinase, para revisão ver IHLE *et al.*, 1994).

Estudos da linhagem celular de linfoma Nb2 pré-T dependente de PRL (GOUT *et al.*, 1980; ALI *et al.*, 1991) revelam que o hormônio ativa rapidamente a tirosina quinase JAK2 associada ao receptor (RUI *et al.*, 1994; LEBRUN *et al.*, 1994; CAMPBELL *et al.*, 1994). Em células BAF-3, também relata-se o efeito da PRL na ativação da JAK1 (DUSANTER-FOURT *et al.*, 1994). LEBRUN *et al.* (1994) demonstram que a estimulação de células Nb2 com PRL, além de ativar JAK2, resulta na fosforilação da

tirosina do PRLr, de maneira tempo e dose-dependente. Alguns trabalhos, que analisam vários membros desta família de receptores, descrevem que após estimulação do ligante, os receptores também sofrem fosforilação na tirosina (FOSTER *et al.*, 1988; CARTER-SU *et al.*, 1989; SHACKELFORD & TROWBRIDGE, 1991; MURAKAMI *et al.*, 1991; IOSHIMURA & LODISH, 1992; WANG *et al.*, 1992). Além disso, estudos recentes demonstram que a PRL pode regular a expressão gênica por intermédio da fosforilação direta pela JAK2 (WAKAO *et al.*, 1994), e da ativação de “transdutores do sinal citoplasmático e ativadores da transcrição” ou STATs (SIDIS & HORSEMAN, 1994; DAVID *et al.*, 1994; WAKAO *et al.*, 1994; GRONER *et al.*, 1994; LARNER & FINBLOOM, 1995). Presume-se que os fatores de transcrição STATs são recrutados transitoriamente por ativação hormonal ou receptores de citocinas complexos, por intermédio da ligação a resíduos fosfotirosil específicos através de seus domínios SH2 (HEIM *et al.*, 1995). Esta via sinalizadora JAK-STAT também é usada por outros membros da superfamília de receptor de hematopoetina, de fatores de crescimento, de citocinas (receptores de interferon) e vários receptores tirosina-quinases (FU & ZHANG, 1993; LARNER *et al.*, 1993; RUFF-JAMISON *et al.*, 1993; SADOWSKI *et al.*, 1993; SHUAI *et al.*, 1993; AKIRA *et al.*, 1994; DARNELL *et al.*, 1994; LUTTICKEN *et al.*, 1994; UZE *et al.*, 1995). Existem proposições de que a especificidade do sinal seja obtida através da ativação de moléculas STATs que podem transativar diferentes grupos de genes; como por exemplo o fator de transcrição denominado STAT5 ou MGF (fator da glândula mamária) que está implicado na transativação PRL-dependente do gene promotor da β -caseína (WAKAO *et al.*, 1994;

WELTE *et al.*, 1994). Alguns trabalhos indicam que um resíduo fosfotirosil, presente no domínio citoplasmático dos membros da superfamília de receptores citoquinas/GH/PRL, desempenha uma função crítica na transdução do sinal para ativação gênica (LEBRUN *et al.*, 1995a; LEBRUN *et al.*, 1995b). Certos receptores de citoquinas interagem com fatores de transcrição STAT específicos através de resíduos fosfotirosil citoplasmáticos. Estes incluem a ativação do STAT2 pelo receptor do interferon α ou IFN α (LEUNG *et al.*, 1995), do STAT6 pelo receptor- α da Interleucina-4 (HOU *et al.*, 1994) e do STAT5 pelo receptor- β da Interleucina-2 (FUJII *et al.*, 1995; KIRKEN *et al.*, 1995). Por outro lado, estudos mutacionais têm mostrado que as citoquinas podem recrutar proteínas STATs independente dos resíduos fosfotirosil do receptor citoplasmático, incluindo GH e fator estimulador da colônia granulócito-macrófago (HACKETT *et al.*, 1995; MUI *et al.*, 1995; WANG *et al.*, 1995), indicando que estes receptores variantes possuem a capacidade de ativar tirosinas quinases JAK.

Muitos destes receptores também ativam a via Ras, a qual inclui uma cascata distinta, predominantemente composta de quinases serina/treonina da membrana celular para o núcleo (BOGUSHKI & MCCORMICK, 1993). As proteínas deste circuito de sinalização Ras são produtos de protooncogenes (BOGUSHKI & MCCORMICK, 1993; MANSOUR *et al.*, 1994). Raf-1 é a primeira proteína quinase desta via e pode ser ativada pela Ras bem como pela proteína quinase C e possivelmente p34 MOS (BOGUSHKI & MCCORMICK, 1993). A observação de que a PRL estimula Raf-1 em células Nb2 (CLEVINGER *et al.*, 1994) sugere que este hormônio também poderia ativar Ras. Posteriormente, ERWIN *et al.* (1995) demonstram que a PRL ativa Ras, em

células Nb2, por intermédio de proteínas sinalizadoras SHC, GRB2 (*Growth Factor Receptor Bound 2*) e SOS (*Son of Sevenless*). Estes autores também observam fosforilação da tirosina da SHC pela PRL em duas linhagens celulares de câncer de mama humano (MCF-7 e T47D), sugerindo que a ativação da Ras, SHC-mediada, pode ser uma via geral usada pela PRL.

Estudos recentes mostram que a PRL ativa STAT1, STAT3 e STAT5, sendo estas proteínas mediadoras dos efeitos da PRL em células de origem epitelial mamária, linfóide e mielóide (GOUILLEUX *et al.*, 1994; WAKAO *et al.*, 1994; DASILVA *et al.*, 1996). Por intermédio de estudos de receptores mutantes (formas curtas: M240 e T280), DASILVA *et al.* (1996) confirmam o modelo proposto da JAK2 como uma proteína efetora inicial usada pelos PRLr. Utilizando análises de fosforilação da tirosina e ensaios eletroforéticos, demonstram também que o receptor mutante G328 (o qual não possui quatro; TYR402, TYR479, TYR515, TYR580; dos cinco resíduos tirosina citoplasmáticos conservados dos PRLr) mantém a capacidade para ativar JAK2, STAT1, STAT3 e STAT5. Estes dados sugerem que resíduos fosfotirosil externos ao PRLr, além da tirosina quinase JAK2 associada ao PRLr, estão envolvidos no recrutamento de proteínas STATs (DASILVA *et al.*, 1996). Portanto, o processo de transdução do sinal é bastante complexo desde as fases iniciais, pois interagem inúmeras vias sinalizadoras.

1.5. Efeitos Gerais da PRL

Há mais de 20 anos já haviam sido descritas quase uma centena de ações da PRL em vários tecidos (NICOLL & BERN, 1972 apud KELLY, 1990). NICOLL (1980) enumera nada menos do que 227 efeitos diferentes do hormônio. A PRL está envolvida na regulação de uma variedade de processos fisiológicos, incluindo os sistemas imune (RUSSEL, 1989; BERCZI, 1992; PELEGRINI *et al.*, 1992; MURPHY *et al.*, 1995) e nervoso central (DI CARLO *et al.*, 1992; DUTT *et al.*, 1994); o balanço de fluido e o metabolismo eletrolítico (HORROBIN, 1980); a reprodução (BARTKE, 1980); o crescimento e a diferenciação celular (NICOLL, 1980; BERN, 1983; KELLY *et al.*, 1991; KELLY *et al.*, 1993; HORSEMAN & YU-LEE, 1994); o desenvolvimento da glândula mamária e a lactogênese (GUYETTE *et al.*, 1979). Em roedores, a PRL é um promotor do desenvolvimento e progressão do câncer de mama (WELSCH, 1985; MANNI *et al.*, 1986; TEJWANI *et al.*, 1991; MERSHON *et al.*, 1995); próstata (NAKAMURA *et al.*, 1990) e fígado (BUCKLEY *et al.*, 1985). SHIU & IWASIOU (1985) relatam que a PRL pode estimular proteínas específicas em células de câncer de mama humano T-47D. ERWIN *et al.* (1995), demonstram fosforilação da tirosina da proteína sinalizadora SHC, induzida pela PRL, em 2 linhagens de células de câncer de mama humano (MCF-7 e T-47D). Nos tecidos uteroplacentário, os PRLr provavelmente são mediadores dos efeitos dos hormônios lactogênicos na função decidual nas fases intermediárias da gestação (GU *et al.* 1992; FREEMARK *et al.*, 1993). A PRL promove a absorção de cálcio, água e eletrólitos, no intestino delgado e rim de ratos após o nascimento (RAMSEY & BERN, 1972; MAINOYA, 1975; KRISHNAMRA *et al.*,

1990; HORROBIN *et al.*, 1971; SPANOS *et al.*, 1976; ROBINSON *et al.*, 1982). Estimula a mitogênese e a produção de interleucina 2 em linfócitos T e timócitos (MUKHERJEE *et al.*, 1990; VISELLI *et al.*, 1991; CLEVINGER *et al.*, 1992; GAGNERAULT *et al.*, 1993). Na adrenal fetal, os hormônios lactogênicos estimulam a produção de sulfato de dehidroepiandrosterona (PEPE & ALBRECHT, 1990) contribuindo para produção de estrogênio placentário. Quanto à função do PRLr no tecido nervoso, sabe-se que a PRL estimula a mitogênese em astrócitos cultivados de ratos neonatais (DEVITO *et al.*, 1993).

1.6. Efeitos da PRL na célula B-pancreática

Durante a prenhez, ocorrem diversas mudanças adaptativas na célula B-pancreática para adequar o metabolismo materno e a demanda insulínica aumentada à manutenção da normoglicemia. Sabe-se que a PRL induz aumento na síntese de insulina (GREEN *et al.*, 1973; BONE & TAYLOR, 1976), redução no limiar de estimulação à glicose (GREEN & TAYLOR, 1972; SORENSON & PARSONS, 1985), aumento na secreção de insulina estimulada por glicose (GREEN & TAYLOR, 1972; SORENSON & PARSONS, 1985; BRELJE & SORENSON, 1991), aumento na oxidação da glicose (BRELJE *et al.*, 1989), aumento no metabolismo do AMPc (GREEN *et al.*, 1978), aumento na proliferação e no volume da célula B (HELLMAN, 1960; VAN ASSCHE, 1974; AERTS & VAN ASSCHE, 1975; PARSONS *et al.*, 1992) e aumento no acoplamento intercelular via *gap-junctions* (SHERIDAN *et al.*, 1988). Uma outra característica importante na adaptação das ilhotas à prenhez, é o fato do processo ocorrer

a longo prazo. Ilhotas de rato requerem pelo menos 5 dias para adaptação completa (PARSONS *et al.*, 1992). SORENSON *et al.* (1987b) também observam em ratas adultas tratadas com PRL durante 4 dias, efeitos tais como; diminuição no limiar de estimulação à glicose, aumento na secreção de insulina e aumento no acoplamento intercelular, medido por corante.

Inúmeros estudos “in vitro” demonstram efeitos da PRL na célula B-pancreática neonatal, que incluem vários daqueles que ocorrem durante a prenhez. Sabe-se que o tratamento de ilhotas neonatais com PRL aumenta a síntese de insulina (NIELSEN, 1982; BRELJE *et al.*, 1989); diminui o limiar de estimulação à glicose (SORENSON & PARSONS, 1985; SORENSON *et al.*, 1987a; BRELJE & SORENSON, 1988); aumenta a secreção de insulina (SORENSON & PARSONS, 1985; BRELJE & SORENSON, 1988; MARKOFF *et al.*, 1990; BRELJE *et al.*, 1993); aumenta o acoplamento entre as células B de uma ilhota (MICHAELS *et al.*, 1987); aumenta a oxidação da glicose (BRELJE *et al.*, 1989); estimula a incorporação de [³H]-timidina (NIELSEN *et al.*, 1986; BRELJE *et al.*, 1989); promove a proliferação de células B e aumenta o volume da ilhota (BRELJE *et al.*, 1989; BILLESTRUP & NIELSEN, 1991; BRELJE & SORENSON, 1991; BRELJE *et al.*, 1993; BRELJE *et al.*, 1994; PARSONS *et al.*, 1995); aumenta o número ou a atividade dos canais de K⁺ modulados por ATP (BOSCHERO *et al.*, 1993a), o conteúdo do GLUT2 (MAZANCOURT *et al.*, 1994; WEINHAUS *et al.*, 1996) e a atividade da glicoquinase (WEINHAUS *et al.*, 1996). Concluindo, inúmeras evidências indicam a importância da participação da PRL no processo de maturação da resposta secretória das células B-pancreáticas na fase de vida perinatal.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho é aprofundar os conhecimentos dos mecanismos celulares básicos de maturação do acoplamento estímulo-secreção de insulina. Para isto, analisamos em ilhotas de ratos neonatais, mantidas em cultura; o efeito temporal do tratamento com PRL, sobre a secreção de insulina estimulada por diferentes substâncias, sobre a permeabilidade ao cálcio; e o efeito da PRL e da glicose sobre a expressão do GLUT2.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram usados ratos (Rattus norvegicus, var. albina) wistar, neonatais de ambos os sexos (1, 2 e 7 dias de vida) e machos adultos (2 a 3 meses); fornecidos pela Central de Bioterismo da UNICAMP. Os animais recém-nascidos foram sacrificados imediatamente para retirada dos pâncreas. Os animais adultos foram mantidos em condições de fotoperíodo controlado (12 x 12 h) até sua utilização; recebendo água e ração “ad libitum”.

3.2. Obtenção e Cultura de Ilhotas Pancreáticas de Ratos Neonatais

Todo o material utilizado para cultura de ilhotas foi submetido a condições especiais de esterelização (CREPALDI, 1991).

Para cada experimento foram utilizados aproximadamente 40 animais. Após decapitação e assepsia da região abdominal, os animais foram colocados em placas de Petri de vidro e levados ao fluxo laminar (VECO, HLFS-12) para o procedimento cirúrgico de retirada dos pâncreas.

Procedeu-se a laparotomia para exposição e remoção do pâncreas. Durante a cirurgia todos os órgãos foram mantidos num becker contendo solução de Hanks. A

seguir, foram reduzidos a fragmentos pequenos ($0,5 \text{ mm}^3$), com o auxílio de tesoura e lavados com Hanks. O tecido fragmentado foi transferido para um tubo de ensaio de 15 ml com tampa. Para facilitar a separação das ilhotas das células acinares, foi realizado um tratamento com collagenase. Após adição de 0,2 mg da enzima/pâncreas, o tubo de ensaio tampado foi agitado manualmente durante 5 min, em banho-maria a 37°C . Em seguida, o material foi lavado 5 vezes, com solução de Hanks, para bloqueio da digestão e eliminação da collagenase bem como de possíveis contaminações adquiridas durante o procedimento cirúrgico. Cada lavagem foi seguida de centrifugação e descarte do sobrenadante. Uma 6ª lavagem foi realizada com meio de cultura.

O tecido pancreático parcialmente digerido foi transferido para placas de cultura (Falcon 3003 - 100 x 120 mm), contendo 10 ml de meio RPMI 1640, suplementado com 10% (vol/vol) de soro fetal bovino estéril e 0,5% (vol/vol) de uma mistura dos antibióticos penicilina (100 IU/ml) e estreptomicina (100 $\mu\text{g/ml}$). A montagem e manuseio diário das placas foram feitos sob fluxo laminar.

Uma parte das ilhotas em cultura serviu como controle e a outra recebeu tratamento diário com 2 $\mu\text{g/ml}$ de PRL (SORENSEN *et al.*, 1987a; BOSCHERO *et al.*, 1993a). As placas foram mantidas em incubadora de CO_2 (CO-24, New Brunswick Scientific Co., Inc., New Jersey, USA), a 37°C , em uma atmosfera umidificada e a 5% de CO_2 , durante um período de 7 a 9 dias ou 17 a 19 dias. O meio de cultura foi trocado a intervalos regulares de 48 horas.

Após cultura, o meio foi substituído por solução de Hanks e as ilhotas pancreáticas livres de tecido acinoso, foram destacadas da base da placa, ressuspensas

por leve agitação do fluido de cultura. A seguir foram coletadas individualmente sob lupa, por aspiração com pipeta Pasteur siliconizada e estirada, e utilizadas para experimentação.

3.3. Isolamento e Cultura de Ilhotas Pancreáticas de Rato Adulto

O isolamento das ilhotas consistiu na destruição seletiva do parênquima exócrino pancreático, por intermédio da digestão por collagenase, descrita inicialmente por LACY & KOSTIANOVSKY (1967).

O animal foi sacrificado por decapitação e, após incisão abdominal, ocluiu-se a extremidade duodenal do ducto biliar comum e introduziu-se um catéter através de uma pequena incisão na parte proximal (hepática) deste ducto. Por intermédio de uma seringa conectada ao cateter, injetou-se 8 ml de solução de Hanks contendo 6 mg de collagenase, provocando entumescimento do órgão. O pâncreas foi então retirado, transferido para uma placa de Petri e dissecado o tecido adiposo, vascular e ganglionar linfático. Para a obtenção de quantidade adequada de tecido, foram utilizados 2 pâncreas para cada experimento. Em um becker pequeno, o tecido pancreático foi cortado em fragmentos de aproximadamente $0,5 \text{ mm}^3$. O material foi transferido para um tubo de ensaio com tampa e permaneceu durante 18 min, em banho-maria a 37°C . Após este período, o tubo foi agitado manualmente durante cerca de 2 min, sendo a interrupção do procedimento feita por controle visual da viscosidade. O conteúdo do tubo foi então transferido para um becker e procedeu-se lavagens sucessivas acompanhadas de sedimentação do material,

para remoção enzimática. Finalmente, o tecido foi transferido para placas de Petri e as ilhotas isoladas foram coletadas individualmente sob lupa, com auxílio de uma pipeta Pasteur estirada e previamente siliconizada. O procedimento de cultura das ilhotas adultas foi o mesmo descrito anteriormente para ilhotas neonatais. Após o período de cultura (3 horas, 2 ou 7 dias), as ilhotas adultas foram utilizadas para análise dos transportadores de glicose (GLUT1 e GLUT2), por intermédio de técnicas imunohistoquímicas.

3.4. Determinação da Viabilidade Celular pelo Teste de Exclusão de Corante

A técnica de incorporação do corante azul tripan pode ser utilizada para análise de possíveis lesões na membrana de células e morte celular após cultura de tecido (PHILLIPS, 1973 apud AMMON *et al.*, 1985). As ilhotas cultivadas durante períodos de tempo diferentes, foram lavadas com solução de Hanks e mantidas em solução tampão contendo azul tripan (0,18% w/v), durante 5 min, a temperatura ambiente. Após a incubação foram lavadas três vezes e analisadas em microscópio invertido com contraste de fases (Reichert-Jung, Series 1820 Biostar).

3.5. Imunohistoquímica das Proteínas de Membrana, GLUT2 e GLUT1

Grupos de ilhotas foram submetidas a uma digestão suplementar com solução de Krebs, sem Ca^{2+} , contendo dispase para o isolamento das células B pancreáticas. As células isoladas e também ilhotas íntegras, foram incubadas durante períodos de tempo

diferentes e em condições experimentais variáveis (descritas nos resultados). Em seguida foram fixadas com paraformaldeído (4%) e tratadas com anticorpos específicos. A localização das respectivas proteínas nas células tornou-se possível pela fluorescência emitida pela fluoresceína, acoplada ao segundo anticorpo (ver SAEZ *et al.*, 1991 e BERTHOUD *et al.*, 1992).

3.6. Análise da Proteína de Membrana GLUT2, por “Western blot” (TOWBIN *et al.*, 1979; BURNETTE, 1981)

3.6.1. Preparação da Membrana: após cultura, ilhotas de 4 preparações diferentes foram colocadas num mesmo “eppendorf” (aproximadamente 1000 ilhotas), contendo uma mistura de inibidores de proteases, descrita à seguir. O tecido foi homogeneizado (sonicado) a 4 °C e centrifugado a 14.000 rpm, durante 15 min, a 0 °C.

3.6.2. Dosagem da Concentração Proteica: o conteúdo total de proteínas das amostras foi dosado utilizando-se o “Bio Rad Protein Assay - Dye Reagent Concentrate”. Estabelecida uma curva padrão entre absorbância (595 nm) e conteúdo proteico (variando de 1 a 10 µg/ml), os valores de absorbância das amostras permitiram a extrapolação dos valores das proteínas totais. A concentração de proteína utilizada por amostra foi de 50 µg/pocinho.

3.6.3. “Immunoblotting”: os volumes de amostras utilizados foram calculados rigorosamente para a obtenção de 50 µg de proteínas. As amostras foram incubadas em

“sample buffer” 5x (20% do volume da amostra), a 37 °C, durante 1 hora. Foram incubados também 10 µl de uma mistura de proteínas (Rainbow coloured protein molecular weight markers) purificadas e coradas, com função de marcadores de peso molecular. O marcador e as amostras foram transferidos para os pocinhos do gel (previamente preparado no interior de duas lâminas acrílicas) conectado a um sistema elétrico e preenchido com tampão de corrida. A fonte de energia foi regulada no início para 60 V até que a linha de corrida, visível pela coloração azulada do “sample buffer”, ultrapassasse o gel de empilhamento. Atingido o gel de separação, a fonte foi regulada para 125 V $\pm$ 30 mA. O tempo de corrida foi de aproximadamente 120 min. Finda esta etapa, o sistema foi desmontado e o gel foi colocado em contato com uma membrana de nitrocelulose para transferência das proteínas. O sistema de transferência foi preenchido com solução de transferência e mantido durante 14 a 16 horas, a baixa temperatura (4 °C). A fonte de energia foi mantida em 23 V $\pm$ 230 mA. Após transferência, a membrana de nitrocelulose foi mantida durante 2 horas em salina fosfato-tamponada (PBS) acrescida de leite em pó desnatado (4%) e Tween-20 (0,2%). Após saturação, a membrana foi mantida durante 2 horas, sob agitação constante, em PBS-leite contendo o primeiro anticorpo (1:1000, exemplo: 20 µl de Ac em 20 ml de PBS) específico à proteína em análise. Seguiram-se 3 lavagens da membrana com PBS-leite e finalmente a mesma foi incubada com o segundo anticorpo marcado com ¹²⁵I, e específico para o primeiro. A diluição do segundo anticorpo foi feita também na proporção de 1:1000, em PBS-leite suplementado com 0,1% de albumina. Esta última incubação também foi feita durante 2 horas e seguida de 5 lavagens em PBS-leite-albumina. A membrana de

nitrocelulose foi seca, envolta em parafilme e, em câmara escura foi colocada em contato com um filme de raio X virgem, dentro de um recipiente metálico protetor da luz. Após 5 dias, a - 70 °C, o filme foi revelado e a proteína em análise, visualizada pela impregnação de faixas (bandas) escuras.

A quantificação dos dados foi feita pela leitura da radiação contida, nas regiões correspondentes as bandas do filme, no papel de nitrocelulose.

3.7. Análise da permeabilidade ao ^{45}Ca

3.7.1. Incorporação do ^{45}Ca

A técnica utilizada foi originalmente descrita por HELLMAN e cols (1976). As ilhotas foram coletadas a partir das placas de cultura e distribuídas em grupos de 100 a 130, em frascos tipo “eppendorf”, de acordo com o número de situações experimentais. A seguir foram pré-incubadas durante 30 min em solução de Krebs modificado, tamponado com 10 mM de Hepes, a pH 7,4, contendo 5,6 mM de glicose, e gaseado com oxigênio puro. Após este período, seguiu-se a incubação durante 5 ou 90 min, em 100 µl de solução de Krebs contendo $^{45}\text{CaCl}_2$ (60 µCi/ml), modificada de acordo com a situação experimental, descrita nos resultados. Durante a incubação o pH das soluções foi mantido a 7,4, por intermédio de gaseamento com oxigênio puro.

Imediatamente após os 5 ou 90 min de incubação, o sobrenadante de cada frasco foi transferido para outros recipientes, para posterior confecção do padrão externo ou máximo (MAX). A reação de incorporação foi interrompida pela adição, em cada frasco,

de solução de LaCl_3 a uma concentração final de 6 mM, a 0 °C e pH 7,4. As ilhotas foram mantidas durante 60 min, a 0 °C. Após este período, o sobrenadante foi descartado e as ilhotas foram lavadas 3 vezes com a mesma solução de LaCl_3 , a 0 °C. As ilhotas foram transferidas para placas de Petri e recoletadas em grupos de dez, em frascos de polietileno contendo 0,5 ml de água destilada acrescido de 0,5 mM de EGTA.

Todas as etapas pós-incubação, foram executadas a baixa temperatura (0 °C), obtida pelo uso de banho-maria gelado.

De cada uma das placas de Petri, transferiu-se também para frascos de polietileno, um volume de líquido igual ao transportado junto com as ilhotas durante a coleta das mesmas. Este volume, coletado em duplicata, serviu para a avaliação da radioatividade basal contida no meio (BG).

O valor do Max foi obtido por intermédio da avaliação da radioatividade contida em 100 μl da solução de incubação (10 μl do sobrenadante radioativo mais 990 μl de H_2O destilada), em triplicata para cada situação experimental.

A cada frasco de polietileno foram acrescentados 6 ml de líquido de cintilação, e a radioatividade contida nas amostras foi medida em contador de partículas β (Beckman LS 6000TA, USA).

A quantidade de ^{45}Ca incorporado por ilhota foi calculada pela multiplicação de um fator F pelo cpm (contagens por min) de cada frasco, após a subtração do BG (“background” ou radiação de fundo) correspondente.

O fator F foi obtido pela seguinte equação: $F = \frac{40000}{\text{cpm do Max} \times 10}$, onde

40000 = quantidade (em pMol) de Ca^{2+} contida em 1 μl do meio de incubação
(concentração do Ca^{2+} = 1 mM)

cpm do Max = número de cpm contido em 1 μl do meio de incubação

10 = número de ilhotas coletadas em cada frasco

Os resultados foram expressos em pg de ^{45}Ca /ilhota por 5 ou 90 min.

3.7.2. Efluxo do ^{45}Ca

Grupos de 100 a 150 ilhotas foram incubadas durante 90 min, a 37 °C, em solução de Krebs contendo 16,7 mM de glicose e 180 a 200 $\mu\text{Ci/ml}$ de $^{45}\text{CaCl}$, sendo o pH 7,4 equilibrado durante os 10 min iniciais com carbogênio. Após incubação as ilhotas foram lavadas 4 vezes com Krebs não radioativo e transferidas para 4 câmaras de perfusão (vol 0,3 ml) contendo um filtro poroso (diâmetro do poro = 8 μm) de acetato de celulose (Millipore, SCWP 01300); que foram conectadas a um sistema perfusor. As soluções perfusoras, foram mantidas a 37 °C e equilibradas com carbogênio para manutenção do pH a 7,4, durante toda a perfusão. As alterações na concentração de glicose bem como de outros secretagogos serão descritas nos resultados. A razão de fluxo do sistema foi de 1 ml/min, impulsionado por uma bomba peristáltica (Ismatec SA, MS-REGLO, Modelo 7351-10). A perfusão foi iniciada imediatamente após a transferência das ilhotas para as câmaras e conexão das mesmas ao sistema. O efluente foi coletado a intervalos regulares de 1 min, imediatamente após a montagem do sistema ou após 30 min de adaptação. A cada amostra de efluente utilizada para leitura do ^{45}Ca , foi

acrescentado 6 ml de líquido de cintilação. A contagem das desintegrações foi feita em contador de partículas β (Beckman LS 6000TA, USA). Os resultados foram expressos como efluxo fracional do ^{45}Ca (% / min).

3.8. Conteúdo Total de Insulina

Para medida do conteúdo total de insulina, grupos de 10 ilhotas (controle e tratadas com PRL) foram sonicadas e mantidas durante 24 horas, a 4 °C, em uma solução ácido-álcool. Após a extração da insulina, foram feitas as diluições necessárias e o conteúdo hormonal foi dosado por radioimunoensaio e expresso em ng/ilhota.

3.9. Secreção Dinâmica de Insulina

Para análise da secreção dinâmica de insulina, 4 grupos de 150 ilhotas foram incubadas durante 90 min, a 37 °C, em 1 ml de solução de Krebs contendo 16,7 mM de glicose, sendo o pH 7,4 equilibrado durante os 10 min iniciais com carbogênio (95% O_2 /5% CO_2). Após a incubação as ilhotas foram transferidas para o sistema perfusor já descrito. Após o tempo de adaptação das ilhotas, que variou entre 34 a 50 min, as amostras de perfusato foram coletadas a intervalos regulares de 30 seg, em banho-maria gelado (4 °C) e armazenadas a -20 °C. A insulina secretada também foi dosada por radioimunoensaio e expressa em pg/ilhota por min.

3.10. Secreção Estática de Insulina

Para análise da secreção estática de insulina o tecido pancreático foi distribuído e cultivado em recipientes especiais (Nunclon™ Delta Nunc Inter Med ou Costar Tissue Culture Cluster²⁴). Após o período de cultura, as ilhotas isoladas foram utilizadas para a análise da secreção de insulina, realizada nos mesmos recipientes (pocinhos) nos quais foi feita a cultura. Após a remoção do meio de cultura as ilhotas foram pré-incubadas durante 60 min, em banho-maria a 37 °C e sob gaseamento constante com carbogênio, em 1 ml de Krebs contendo 5,6 mM de glicose. Finda a pré-incubação, as ilhotas foram incubadas durante 90 min, a 37 °C e sob gaseamento com carbogênio, em 1 ml de Krebs contendo diferentes concentrações de glicose e outros secretagogos, que serão descritos nos resultados. Após a incubação os recipientes contendo as ilhotas foram retirados do banho e mantidos em geladeira a 4 ± 1 °C, durante 15 min. A seguir, a solução de incubação foi retirada isenta de ilhotas e armazenada a -20 °C para dosagem posterior da secreção de insulina por radioimunoensaio. Aos pocinhos foi adicionado 1 ml de solução ácido-álcool, para extração do conteúdo total de insulina das ilhotas. Os recipientes foram mantidos durante 24 horas em geladeira e após agitação da solução contida nos pocinhos, foram armazenados a -20 °C para posterior dosagem de insulina. Neste caso, devido ao número de ilhotas ser variável a secreção foi expressa em % do conteúdo total de insulina.

3.11. Radioimunoensaio de Insulina (RIE)

A insulina secretada e o conteúdo total de insulina foram dosados de acordo com o método descrito por HERBERT (1965) e SCOTT *et al.* (1981). Foram feitas as diluições necessárias nas diferentes amostras para possibilitar a extrapolação de valores desconhecidos, a partir de uma curva padrão. O quadro a seguir descreve os componentes do ensaio:

	Insulina (µl)	¹²⁵ I-Insulina (µl)	Anticorpo anti-insulina (µl)
Amostra	100 (desconhecido)	100	100
Totais		200	
NSB		200	
Referência		100	100
S ₁ (0,020 ng/ml)	100	100	100
S ₂ (0,039 ng/ml)	100	100	100
S ₃ (0,078 ng/ml)	100	100	100
S ₄ (0,160 ng/ml)	100	100	100
S ₅ (0,310 ng/ml)	100	100	100
S ₆ (0,630 ng/ml)	100	100	100
S ₇ (1,250 ng/ml)	100	100	100
S ₈ (2,500 ng/ml)	100	100	100
S ₉ (5,000 ng/ml)	100	100	100

As amostras (desconhecidos) foram preparadas em duplicata, e os outros componentes do ensaio, em triplicata.

Utilizou-se tampão fosfato (pH 7,4) para o preparo de todas as soluções; diluições das amostras, anticorpo anti-insulina (1:200) e insulina radioativa. Além disto, os tubos correspondentes ao NSB e referência receberam 100 µl adicionais de tampão fosfato.

A função de cada componente do ensaio é:

Totais: determinação da radioatividade máxima,

NSB (ligação inespecífica): determinação de possíveis interferências por componentes do tampão,

Referência: constituição do zero de insulina conhecida da curva padrão,

S₁ a S₉: curva padrão.

Feitas todas as pipetagem, os tubos foram agitados em vortex e mantidos durante 48 horas, a 4 °C. Após o período de incubação, com exceção dos totais, todas as condições receberam 200 µl de uma solução contendo 2,5% de carvão (Norit A), 0,5% de albumina e 0,25% de dextran T 70. Os tubos foram mantidos durante 20 min, a 4 °C e a seguir foram centrifugados durante 20 min, a 2800 rpm, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e a radioatividade das amostras foi medida em contador γ (Beckman Gamma 5500). O sobrenadante dos 3 tubos correspondentes aos totais, não foi descartado; de maneira que todo o seu volume foi utilizado para leitura da radioatividade. Por intermédio dos valores obtidos nos tubos contendo concentrações fixas de insulina, elaborou-se uma curva padrão que possibilitou o conhecimento dos valores de insulina contida nas amostras.

3.12. Soluções

3.12.1. Solução de Hanks (HANKS & WALLACE, 1949 apud HERCHUELZ, 1980. Composição iônica da solução, em mM: Na^+ , 141,5; K^+ , 5,8; Ca^{2+} , 1,3; Mg^{2+} , 0,8; Cl^- , 143,6; HCO_3^- , 4,2; HPO_4^{2-} , 0,3; SO_4^{2-} , 0,8; H_2PO_4^- , 0,4)

Para 1 L de H_2O desionizada:

NaCl.....	8,000 g
KCl.....	0,400 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,185 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,200 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,087 g
KH_2PO_4	0,060 g
NaHCO_3	0,350 g

Todos os sais, bem como a D-glicose e demais substâncias adicionadas ao meio de isolamento e/ou incubação possuíam grau analítico de pureza (P.A.).

3.12.2. Solução de Krebs-Ringer: (KREBS & HENSELEIT, 1932 apud HERCHUELZ, 1980. Composição iônica da solução, em mM: Na^+ , 139; K^+ , 5; Ca^{2+} , 1; Mg^{2+} , 1; Cl^- , 123,6; HCO_3^- , 24)

Soluções individuais (para 1 L de H_2O desionizada):

Solução I:

NaCl (0,46 M).....	26,886 g
--------------------	----------

Solução II:

NaHCO ₃ (0,096 M).....	8,065 g
KCl (0,02 M).....	1,492 g
MgCl ₂ .6H ₂ O (0,004 M).....	0,813 g

Solução III:

CaCl ₂ .2H ₂ O (0,004 M).....	0,588 g
---	---------

No momento do uso, utilizou-se 25% (vol/vol) das soluções I, II, III e 25% de H₂O desionizada e acrescentou-se à solução, 2 mg/ml de albumina bovina fração V.

3.12.3. Solução de Lantânio

Solução concentrada.....	12,5 ml
--------------------------	---------

Composta por (em g/250 ml):

NaCl.....8,1232

KCl.....0,3503

CaCl₂.2H₂O.....0,3824

MgCl₂.6H₂O.....0,3596

H₂O destilada.....37,5 ml

TRIS (2 amino-2-hidroximetilpropano 1-3 diol) - 5 mM.....34,0 mg

LaCl₃.7H₂O - 4 mM.....74,0 mg

O pH foi ajustado a 7,4 com HCl 0,1 N.

3.12.4. Líquido de Cintilação

Tolueno	70% (vol/vol)
Triton X 100 ou Tinovetin (agente tensoativo).....	30% (vol/vol)
Omnifluor (cintilador orgânico).....	400 mg/ml

3.12.5. Solução Ácido-Álcool

HCl (12 N).....	7,5 ml
Etanol.....	492,5 ml

3.12.6. Tampão Fosfato para RIE

Solução I concentrada: Na_2HPO_4 (200 mM).....	28,4 g/l
Solução II concentrada: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (260 mM).....	35,8 g/l
Preparo:	
161 ml da solução I	
39 ml da solução II	
800 ml de H_2O desionizada	
0,1% de azide de Na^+	

3.12.7. Solução de Inibidores de Proteases (SAMBROOK *et al.*, 1989)

Tris (0,1 M) - HCl (10 mM).....	1 ml
EDTA.....	1 mM
Antipaina.....	1-2 $\mu\text{g/ml}$
Pepstatina A.....	1 $\mu\text{g/ml}$
Benzamidina.....	1 mM

Aprotinina (Trasylol).....	1-2 µg/ml
PMSF.....	100 µg/ml
Triton X 100 ou Twenn 20.....	0,01%

3.12.8. Gel de Empilhamento

Tris-HCl (0,5 M: 3 g de Trizma base em 50 ml de H ₂ O; pH 6,8).....	1,2 ml
Protogel (30 g Acrilamida e 0,8 g Bis-acrilamida em 100 ml H ₂ O)....	0,7 ml
H ₂ O desionizada.....	3,1 ml
Solução de SDS 10% (0,1 g/ml H ₂ O)	50 µl
Persulfato de amônio 10% (0,1 g/ml de H ₂ O).....	38 µl
Temed.....	5 µl

3.12.9. Gel de Separação

1,5 M Tris-HCl (9,08 g em 50 ml de H ₂ O; pH 8,8).....	2,5 ml
Protogel.....	3,3 ml
H ₂ O desionizada.....	4,2 ml
Solução de SDS 10%	100 µl
Persulfato de amônio 10%.....	50 µl
Temed.....	5 µl

3.12.10. Solução Salina Fosfato-Tamponada (PBS) - pH 7,4

NaCl.....	8 g
KCl.....	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
H ₂ O destilada.....	1 L

3.12.11. PBS-Leite

PBS.....	400 ml
Leite em pó desnatado (4%).....	16 g
Tween 20 (0,2%).....	0,8 ml

3.12.11. Tampão de Corrida (4x concentrado)

Trizma base (200 mM).....	24,225 g
Glicina (1,52 M).....	144 g
EDTA (7,18 mM).....	2,675 g
SDS (0,4%).....	4 g
H ₂ O destilada.....	1 L
pH 8,3	

3.12.13. Tampão de Transferência

Tris base (25 mM).....	3,02 g
Glicina (192 mM).....	14,41 g
Metanol (20%).....	200 ml
SDS (0,02%).....	0,2 g
H ₂ O destilada.....	1 L
pH 8,3	

3.13. Substâncias Radioativas

3.13.1. Anticorpos

“Rabbit Ig”: ¹²⁵I-labeled whole antibody (from Donkey); 3,7 Mbq, 100 µCi; Amersham Life Science, n° cat.: IM 135.

“Mouse Ig”: ¹²⁵I-labeled whole antibody (from Sheep); 3,7 Mbq, 100 µCi; Amersham Life Science, n° cat.: IM 131.

3.13.2. Insulina

¹²⁵I-Insulina: Human Insulin, I¹²⁵ labelled at tyrosine-A 14; 370 Kbpq, 10 µCi; Amersham Life Science, n° cat.: IM 166 ou Du Pont New Research Products, Boston, USA, n° cat.: NEX-104.

3.13.3. Raioisótopos

⁴⁵**CaCl₂**: Calcium-45 (Calcium choride in aqueous solution); 74 Mbq, 2 mCi; Amersham Life Science, n° cat.: CES 3 ou Du Pont New Research Products, n° cat.: NEZ-013.

⁸⁶**RbCl**: Rubidium-86 (Rubidium choride in aqueous solution); 37 Mbq, 1 mCi; Amersham Life Science, n° cat.: RGS 2 ou Du Pont New Research Products, n° cat.: NEZ-072.

3.14. Reagentes

Anticorpo anti-insulina de rato: Laboratorie de Medecine Experimentale, Université Libre de Bruxelles, Bruxelles, Belgium; doado gentilmente pela Dra. V. Leclercq e pelo Dr. W. J. Malaisse.

Prolactina: hormônio altamente purificado, sem evidência de contaminação por outros polipeptídeos hipofisários, isolado pelo Dr. A. F. Parlow da Universidade de Harbour, do Centro Médico Califórnia-Los Angeles; foi fornecido pelo Programa Nacional Hormônio e Pituitária do NIDDK, USA.

SIGMA Chemical Company, St. Louis, MO, USA:

Acrilamida: Acrylamide 99,9 % - C_3H_5NO (n° cat.: A 9099)

Antipaina: Antipain Hydroch. from Microbial Source - $C_{17}H_{44}N_{10}O_6$ (A6271)

Albumina bovina fração V: (A 7906)

Azide de Sódio: (S-2002)

Benzamidina: Benzamidine Hydrochloride - $C_7H_8N_2.HCl$ (B 6506)

Bis-acrilamida: N,N'-Methylene-bis-acrylamide - $C_7H_{10}N_2O_2$ (M-7256)

Colagenase: Collagenase tipo V (C 9263)

Dextran: (D 8906)

EDTA: (Ethylenediaminetetraacetic acid) Disodium Salt Dihydrate (E 5134)

EGTA: (Ethylene glycol bis - β -aminoethyl ether) (E 4378)

Forbol 12,13-dibutirato: Phorbol 12,13-dibutyrate - $C_{28}H_{40}O_8$ (P 1269)

Glicina: Glycine - $C_2H_5NO_2$ (G 4392)

HEPES: $C_8H_{18}N_2O_4S$ (H 0891)

Metanol: Methanol, CH_3OH , Spectrophotometric Grade (M 3641)

Persulfato de amônio: Ammonium Persulfate - $(NH_4)_2S_2O_8$ (A 3678)

PMSF: Phenylmethylsulfonyl Fluoride - $C_7H_7FO_2S$ (P 7626)

RPMI-1640: (R1383)

Temed: N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine - $C_6H_{16}N_4$ (T 7024)

Tris: Trizma^R Base, Tris [hydroxymethyl] amino-methane (T 6791)

Triton X 100: t-Octylphenoxypolyethoxyethanol (X 100).

BOEHRINGER Mannheim Corporation GmbH/W Germany/USA:

Aprotinina: Aprotinin (Trasylol) - aus Rinderlunge from bovine lung (236624)

Colagenase: Collagenase P - (1213 873)

Pepstatina A: Pepstatin A (253286).

NOVO BIOLABS, Novo Research Institute, Bagsvaerd, Denmark:

Aprotinina: Aprotinin Novo (7352700)

Insulina Padrão: Rat Insulin.

PFANSTIEHL Laboratories, Inc, Waukegan IL:

Carvão Norit A: Activated charcol (decolorizing carbon) (N-102).

FLUKA Biochemika, Switzerland:

Arginina: L-Arginine [(+)-2-Amino-5-guanidino-pentanoic acid (11009)

Leucina: L-Leucine (61891).

BIO-RAD Laboratories, Richmond/Hercules, CA:

Bis-acrilamida: (161-0200)

SDS: Sodium dodecyl sulfate (161-0301).

Electrophoresis Grade, IGN, Schwarz/Mann Biotech, Cleveland, OH, USA:

Glicina: Glycine (808822).

ALDRICH Chemical Company, Inc. Milwaukee, USA:

Carbamilcolina: Carbamylcholine chloride, 99 % (C 240-9).

DU PONT, Biotechnology Systems, Boston, Massachusetts, USA:

Omnifluor: (NEF-906).

RBI Research Biochemicals Inc., Natick, MA, USA:

Oxotremorina M: Oxotremorine M.

GIBCO BRL Life Technologies, Inc, NY, USA:

Penicilina-Estreptomicina: Penicillin Streptomycin (15075-013).

CULTILAB Materiais para Cultura de Células, Campinas, SP, Brasil:

Penicilina-Estreptomicina

RPMI 1640

Soro Fetal Bovino.

COEMA Produtos Industriais e Tecnologia Ltda, SP, Brasil:

Tinovetin

MERCK S.A. Inds. Químicas, RJ, Brasil:

Tolueno

3.15. Análise Estatística

A determinação do grau de significância entre os valores foi avaliada por meio da aplicação do teste t de Student, admitindo-se como não significativos valores de $P < 5\%$.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Determinação da Viabilidade Celular pelo Teste de Exclusão de Corante

Não foi observado acúmulo de corante nas ilhotas pancreáticas cultivadas, durante 7 ou 19 dias.

4.2. Imunohistoquímica das Proteínas de Membrana GLUT2 e GLUT1

Na fig 1 observamos um grupo de células B, obtidas de ilhotas adultas cultivadas durante 2 dias e incubadas durante 1 hora, a 37 °C, em solução de Krebs contendo 3 g/l de glicose. A localização imunohistoquímica ou seja, a coloração diferenciada ao redor das células indica claramente a presença do transportador de glicose do tipo GLUT2 nas membranas citoplasmáticas. A fig 2 ilustra secções (3 µm) de ilhotas adultas (obtidas utilizando-se vibrótomo) após cultura durante 3 h em meio contendo 1 (lado esquerdo) ou 3 (lado direito) g/l de glicose. A expressão do GLUT2 nas membranas é visivelmente maior com alta concentração de glicose.

A fig 3 representa ilhotas adultas cultivadas durante 7 dias na presença de 2 µg/ml de PRL. As regiões claras delimitadas ao redor das células indicam a presença do GLUT2 nestas preparações.

Nas fig 4 e 5 estão representadas respectivamente ilhotas neonatais cultivadas, durante 7 dias, na ausência ou presença de PRL. Nas duas situações também é possível visualizar a marcação do GLUT2 nas membranas celulares.

As figuras 6, 7 e 8, representam a análise do GLUT1 em ilhotas adultas cultivadas em presença de PRL, ilhotas neonatais controle, e ilhotas neonatais tratadas com PRL, respectivamente. Os 3 grupos foram incubados durante 3 h, a 37 °C, em solução de Krebs contendo 3 g/l de glicose. Nas 3 situações experimentais a coloração observada não permite a localização da proteína nas membranas citoplasmáticas, o marcador apresenta-se espalhado indistintamente na superfície da ilhota pancreática.

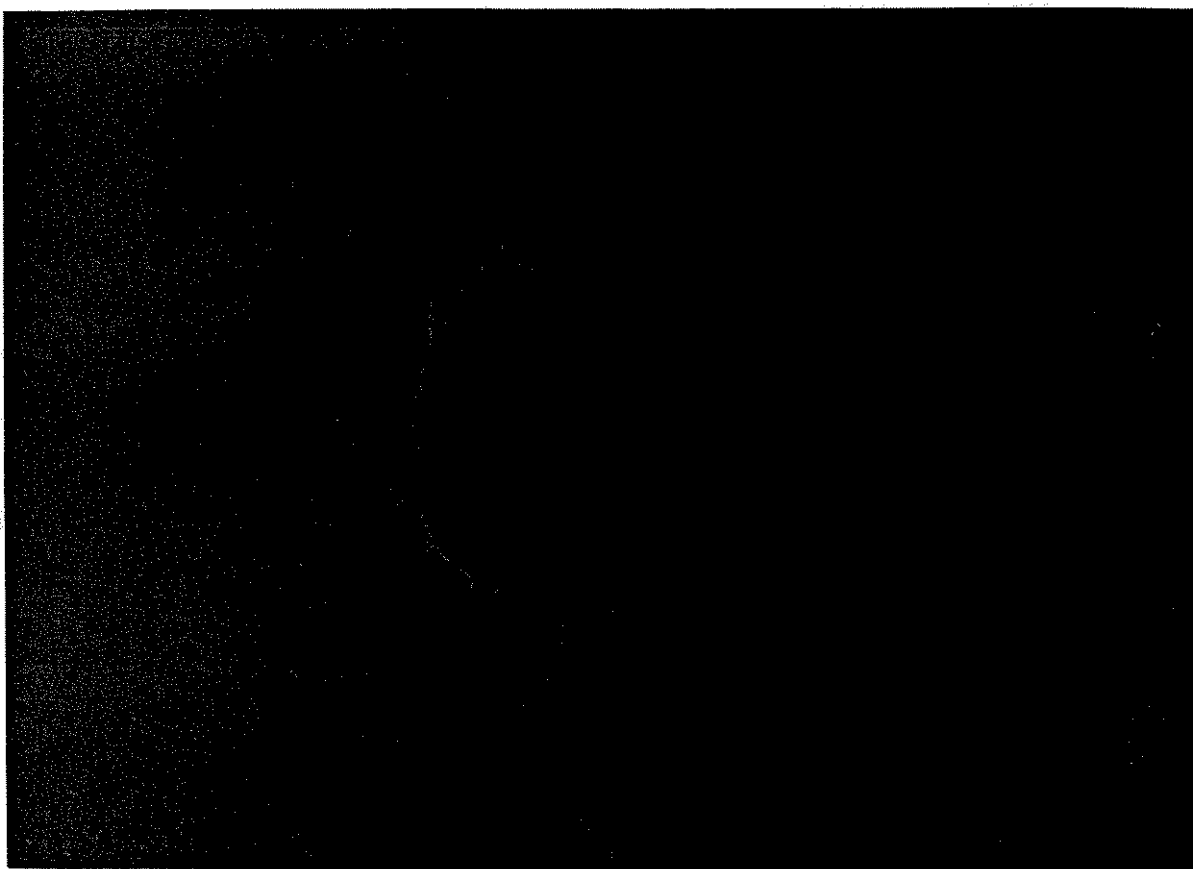


FIGURA 1: GLUT2 em células B-pancreáticas de ratos adultos: Localização imunohistoquímica do transportador de glicose GLUT2, nas membranas citoplasmáticas de células B pancreáticas, obtidas de ilhotas adultas cultivadas durante 2 dias e incubadas durante 1 h, em solução de Krebs contendo 3 g/l de glicose.

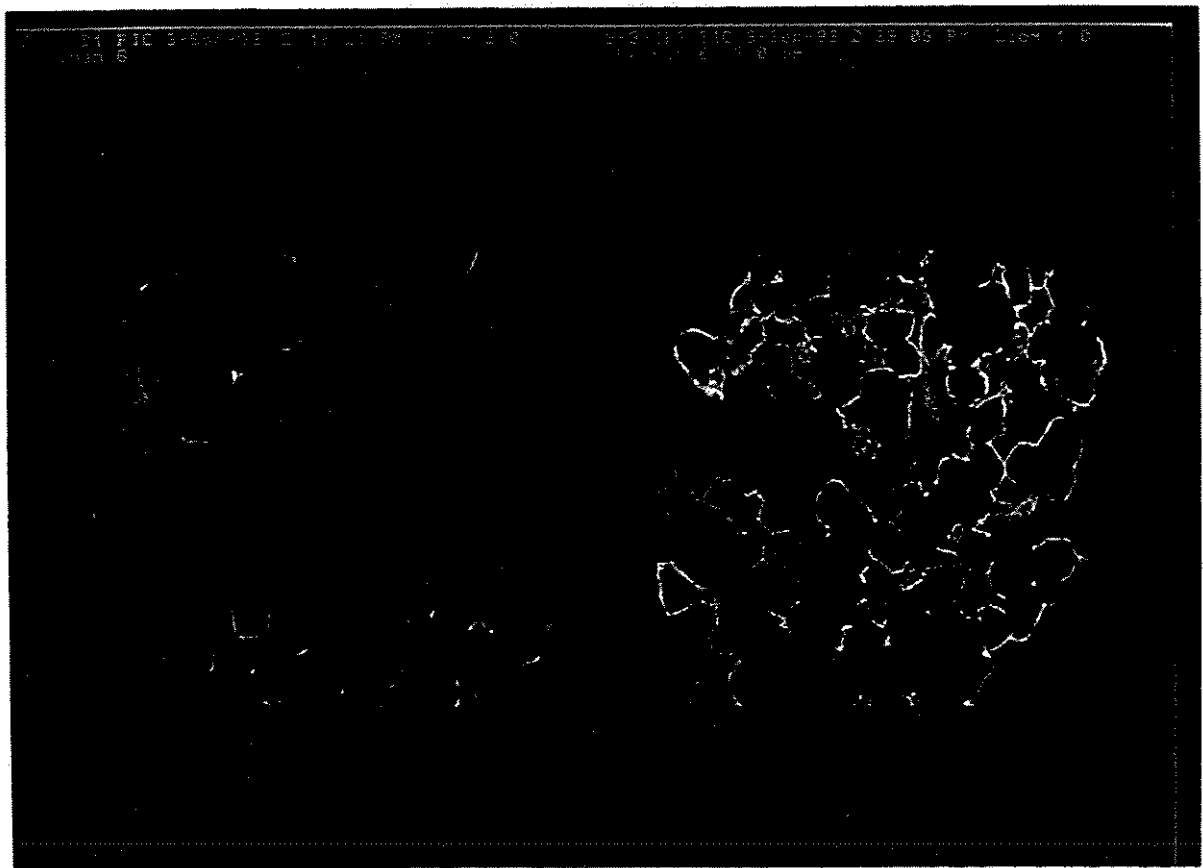


FIGURA 2: GLUT2 em membranas citoplasmáticas de ilhotas adultas: Localização imunohistoquímica do transportador de glicose GLUT2, nas membranas citoplasmáticas de secções (vibrótomo) de ilhotas adultas, cultivadas durante 3 horas, em meio RPMI 1640 contendo 1 (lado esquerdo) ou 3 (lado direito) g/l de glicose.

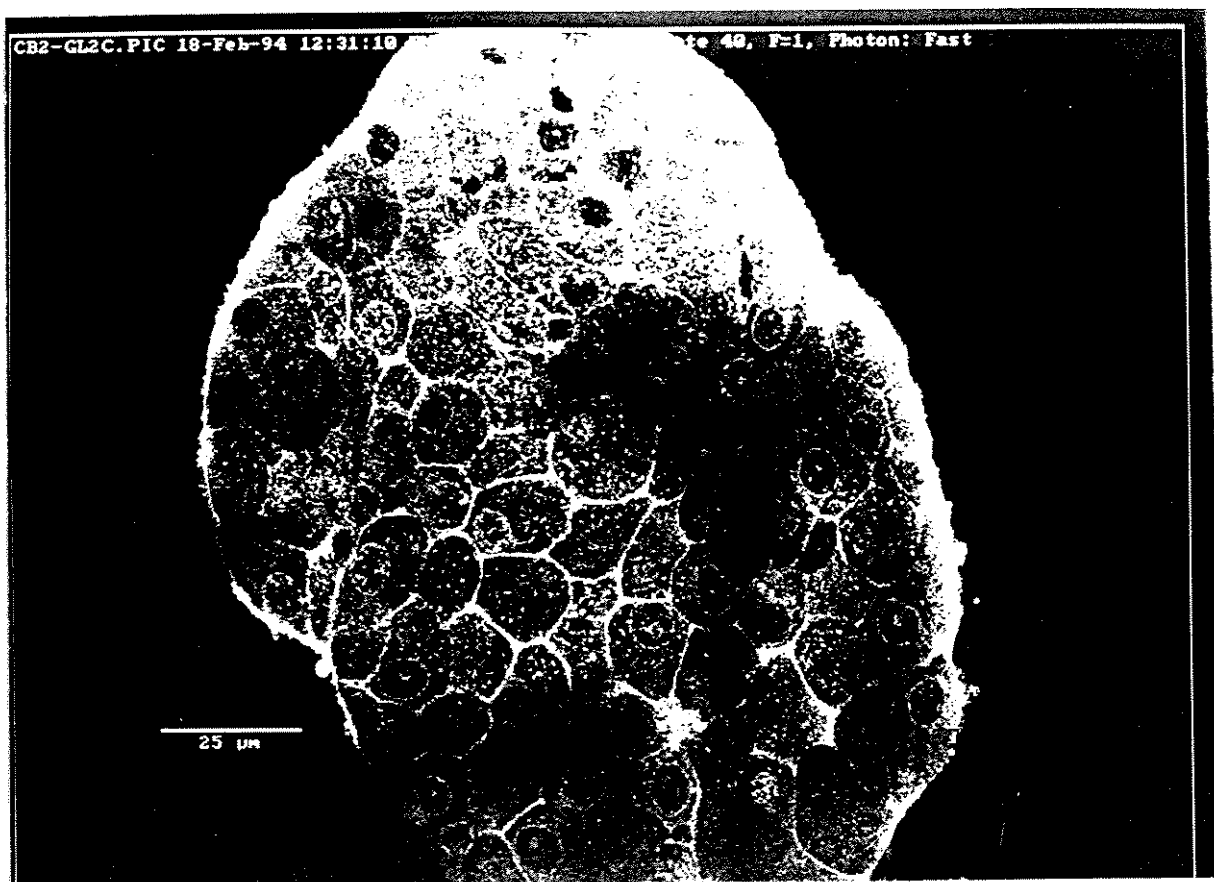


FIGURA 3: GLUT2 em ilhotas adultas: Localização imunohistoquímica do transportador de glicose GLUT2, nas membranas citoplasmáticas de ilhota adulta cultivada durante 7 dias, em presença de 2 $\mu\text{g/ml}$ de PRL.

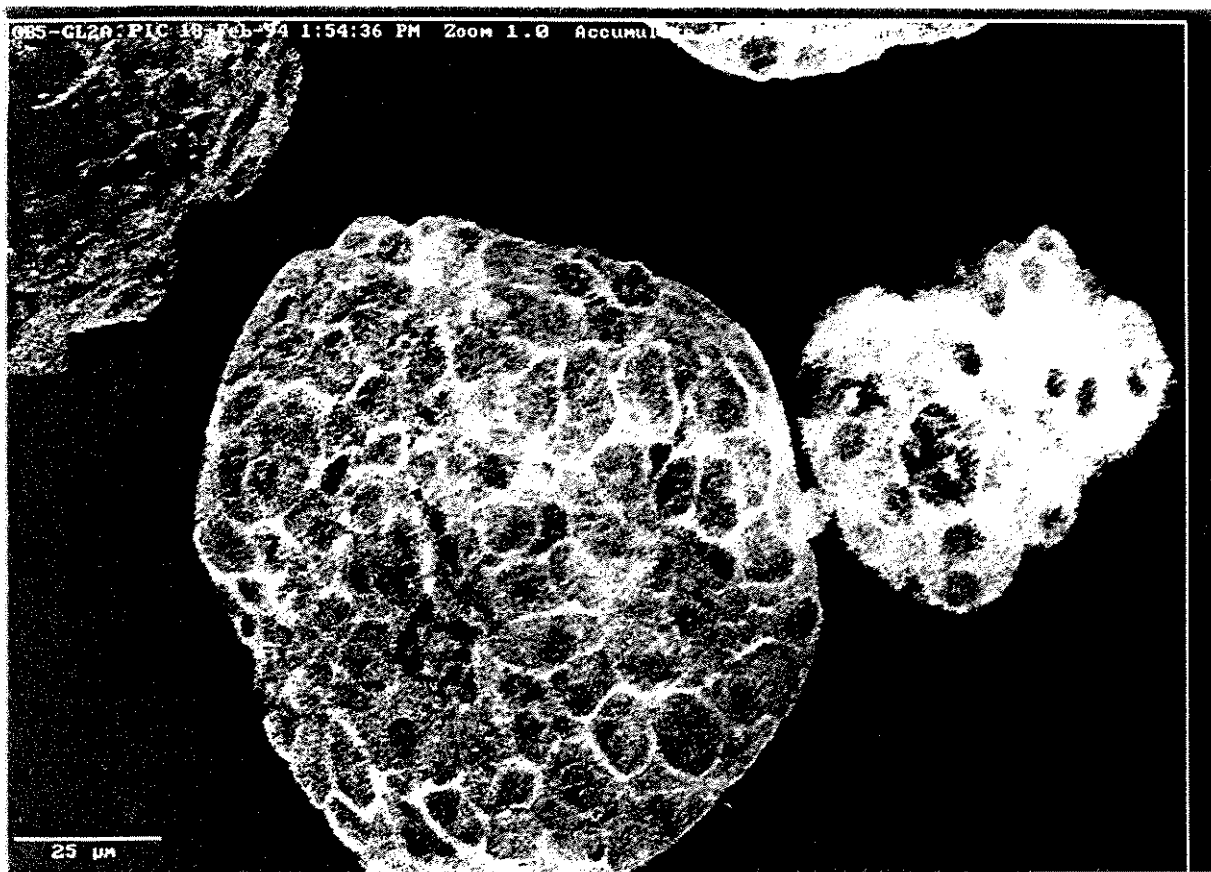


FIGURA 4: GLUT2 em ilhota neonatal controle: Localização imunohistoquímica do transportador de glicose GLUT2, nas membranas citoplasmáticas de ilhota neonatal cultivada durante 7 dias, em condições controle.

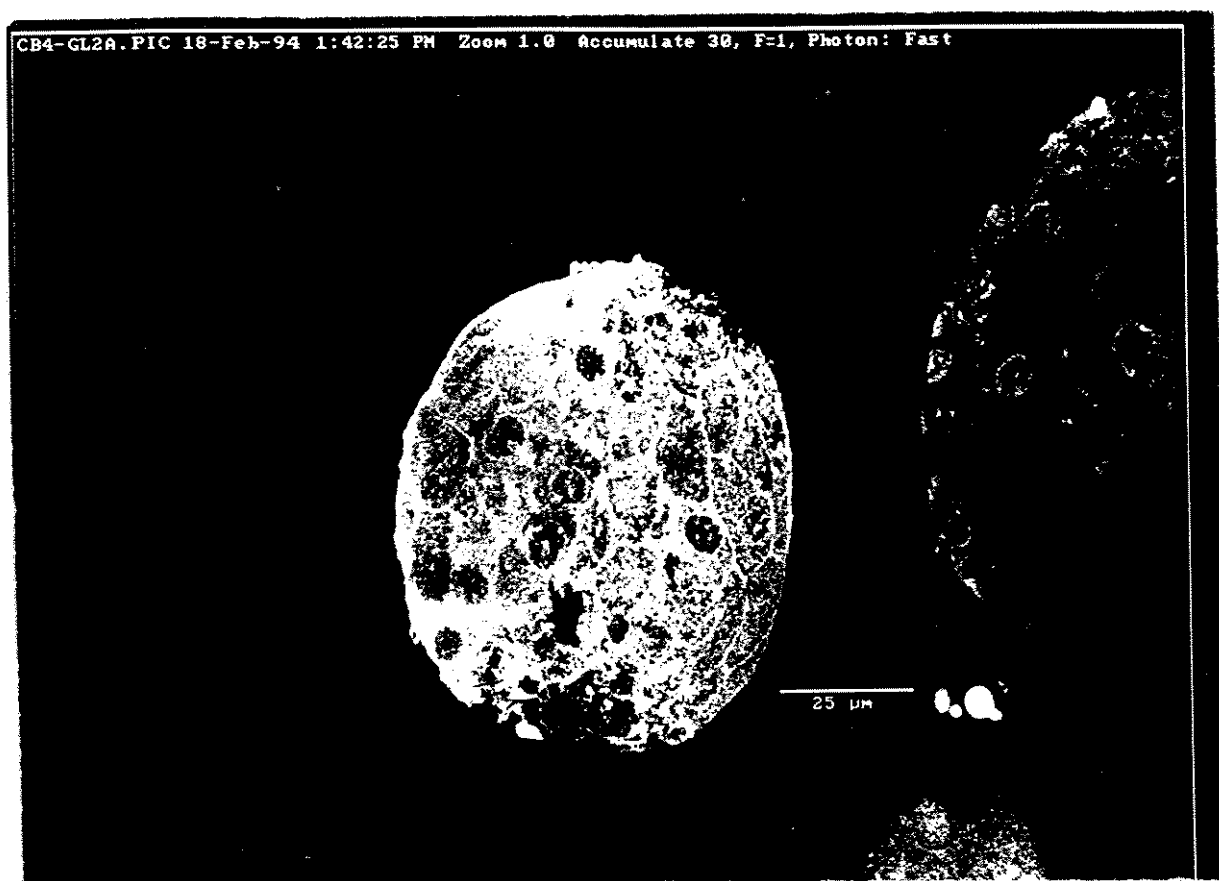


FIGURA 5: GLUT2 em ilhota neonatal tratada com PRL: Localização imunohistoquímica do transportador de glicose GLUT2, nas membranas citoplasmáticas de ilhota neonatal cultivada durante 7 dias, em presença de 2 $\mu\text{g/ml}$ de PRL.

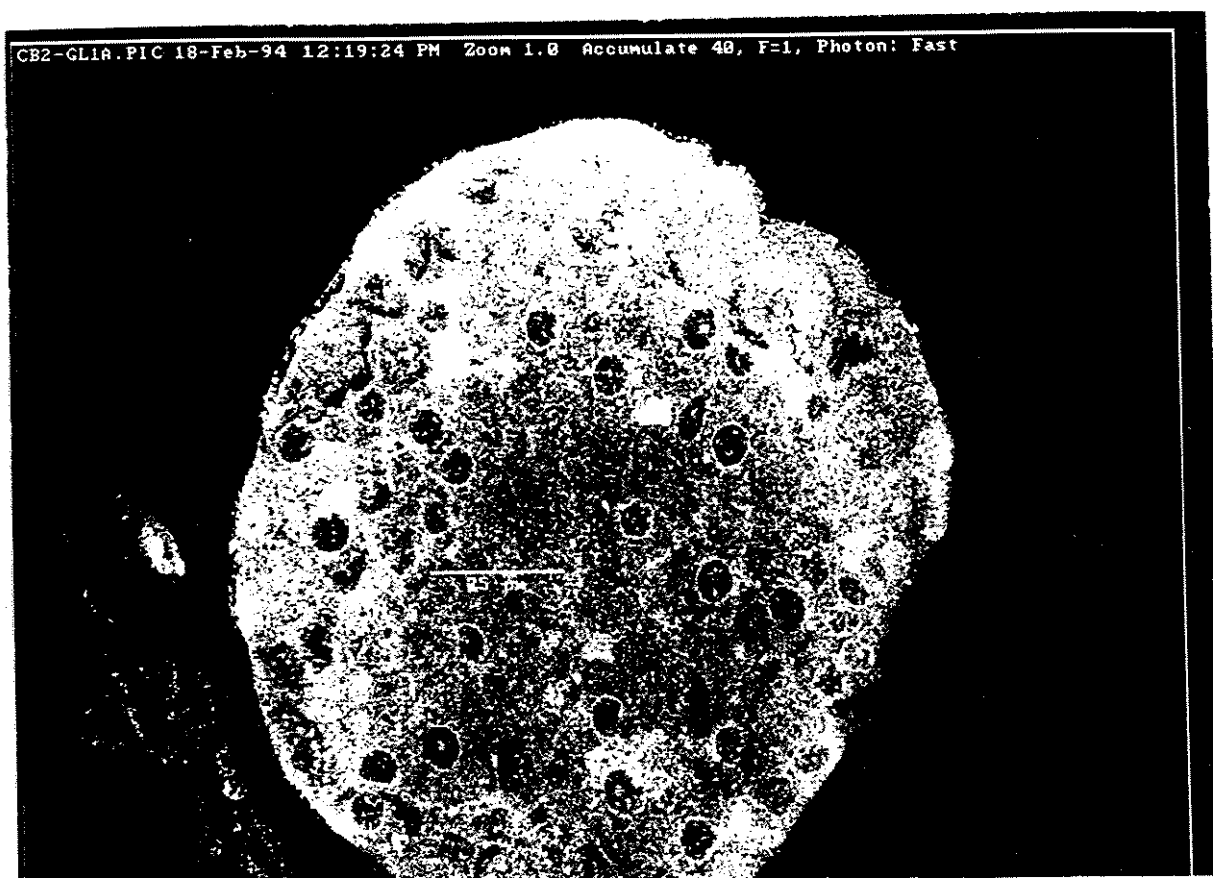


FIGURA 6: GLUT1 em ilhota adulta: Localização imunohistoquímica do transportador de glicose GLUT1, nas membranas citoplasmáticas de ilhota adulta, cultivada durante 7 dias, e incubada durante 3 h, em solução de Krebs contendo 3 g/l de glicose.

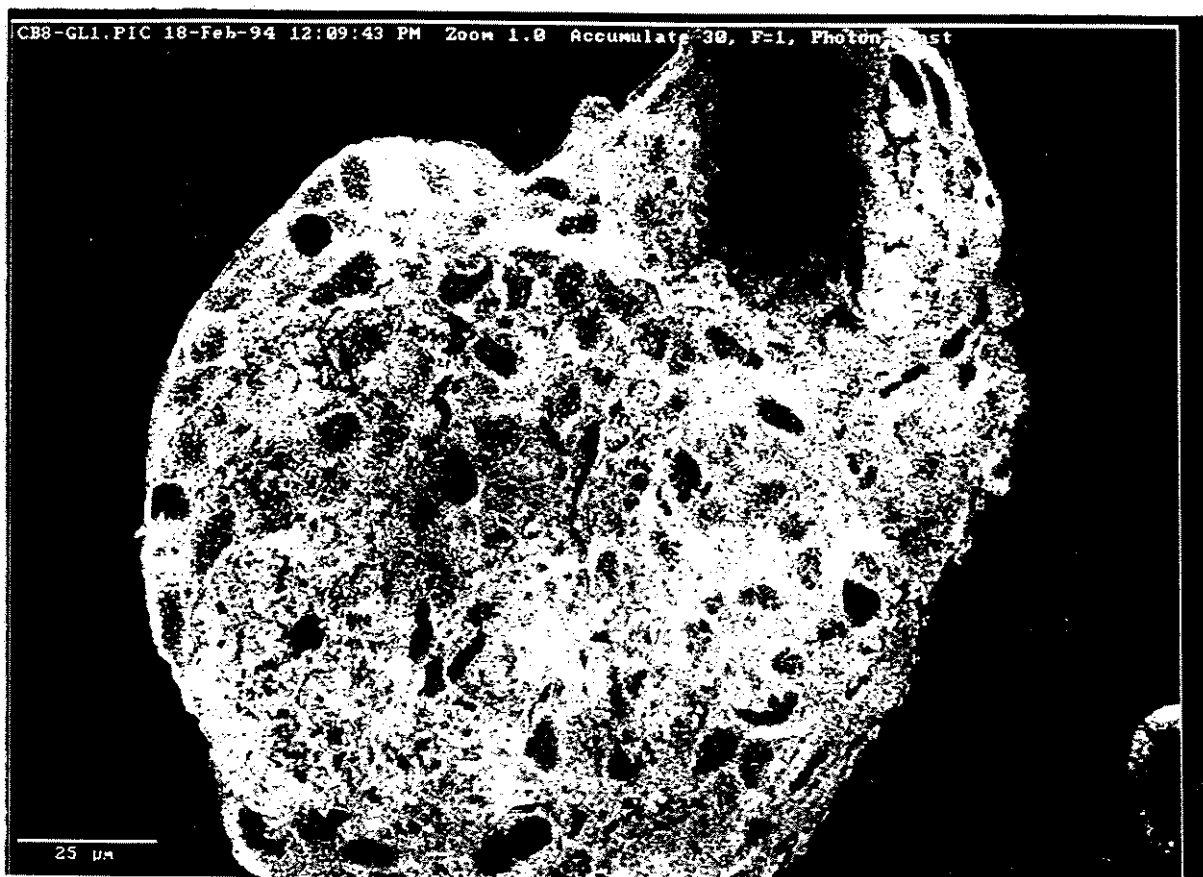


FIGURA 7: GLUT1 em ilhota neonatal: Localização imunohistoquímica do transportador de glicose GLUT1, nas membranas citoplasmáticas de ilhota neonatal, cultivada durante 7 dias e incubada durante 3 h, em solução de Krebs contendo 3 g/l de glicose.

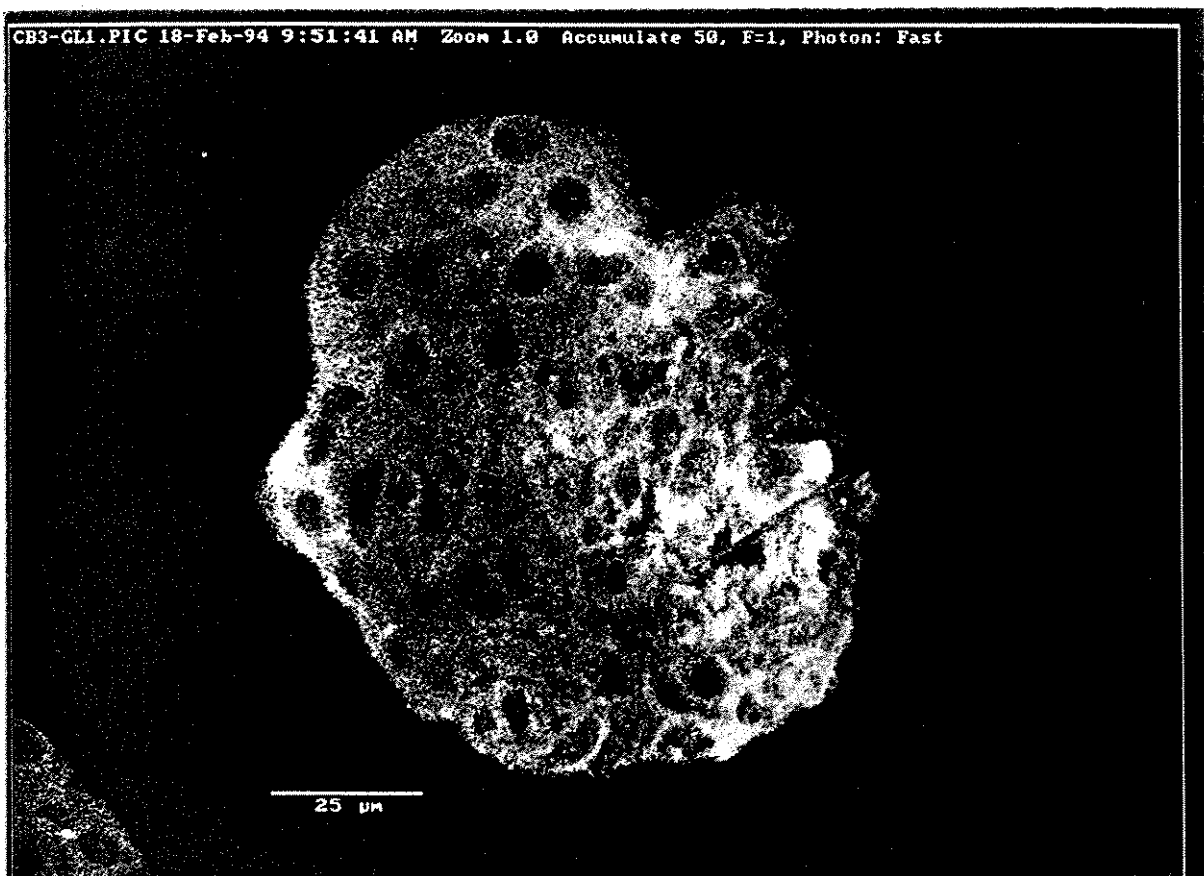


FIGURA 8: GLUT1 em ilhota neonatal tratada com PRL: Localização imunohistoquímica do transportador de glicose GLUT1, nas membranas citoplasmáticas de ilhota neonatal, cultivada durante 7 dias, em presença de 2 $\mu\text{g/ml}$ de PRL e incubada durante 3 h, em solução de Krebs contendo 3 g/l de glicose.

4.3. “Western blot” da Proteína de Membrana GLUT2

Realizamos uma análise de “immunoblot” de ilhotas neonatais usando um anticorpo específico para o transportador de glicose GLUT2. Como pode ser visto na fig 9 este anticorpo marcou uma banda de 53 kDa correspondente ao GLUT2 em 5 situações experimentais diferentes. O quadro a seguir representa os valores obtidos a partir da leitura da radiação contida no papel de nitrocelulose.

Leitura da radiação do papel de nitrocelulose, após “Western blot” para GLUT2:

Grupo	cpm
Controle G 5,6 mM	155
PRL G 5,6 mM	270
Controle G 10 mM	294
PRL G 10 mM	734
Controle G 22 mM	1327

Por intermédio da fig 9 e dos valores acima, observamos que o tratamento com PRL e a elevação na concentração de glicose, induziram aumentos marcantes no conteúdo de GLUT2 em ilhotas neonatais cultivadas. Comparando ilhotas controle e tratadas, em G 5,6 mM o aumento foi de 74% e, em G 10 mM foi de 149%. Expostas a uma concentração muito elevada de glicose (22 mM), a expressão do GLUT2 foi ainda maior; entre ilhotas controle, em G 10 mM e G 22 mM o aumento foi de 351%.

C	PRL	C	PRL	C
G 5,6	G 5,6	G 10	G 10	G 22

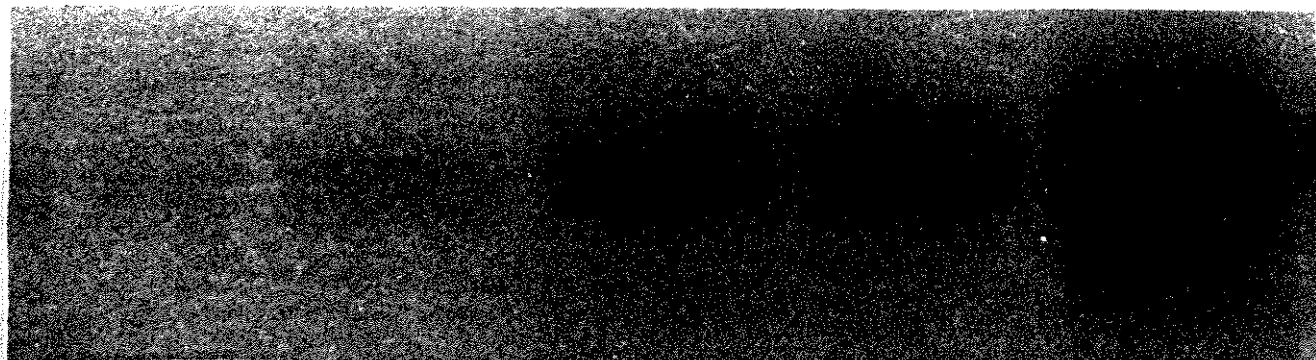


FIGURA 9: Análise por “Western blot” do efeito da PRL e da glicose, no GLUT2, em ilhotas neonatais cultivadas: as ilhotas foram cultivadas durante 7 a 9 dias, em meio de cultura (RPMI-1640 modificado) contendo concentrações diferentes de glicose; na ausência ou presença de 2 µg/ml of PRL. As proteínas (50 µg/poço) dos vários grupos foram analisadas por “immunoblot”, com antisoro específico para GLUT2 (1:1000).

4.4. Efluxo do Cálcio

Na fig 10 observamos o efluxo fracional do ^{45}Ca , em ilhotas cultivadas durante 7 dias e perfundidas durante 40 min por solução contendo 8,3 mM de glicose. As amostras do efluente foram coletadas do 1° ao 40° min. O efluxo não diferiu entre ilhotas controle e tratadas com PRL.

Na fig 11, observamos o efeito de 22 mM de glicose (intervalo 40-60 min) sobre o efluxo fracional do ^{45}Ca , em ilhotas cultivadas durante 7 dias. O aumento bifásico no efluxo causado pelo secretagogo foi semelhante em ilhotas controle e tratadas com PRL.

O efeito de 22 mM de glicose sobre o efluxo do ^{45}Ca , em ilhotas cultivadas durante 7 e 19 dias, e perfundidas por solução na qual não se adicionou Ca^{2+} , e acrescentou-se 0,5 mM de EGTA, está representado na fig 12. Em ilhotas cultivadas durante 7 dias (fig 12A) observa-se que a elevação na concentração de glicose de 2,8 para 22 mM (min 40) induziu redução no efluxo do ^{45}Ca nos dois grupos experimentais, embora este efeito tenha se manifestado mais rapidamente em ilhotas tratadas. Após cultura durante 19 dias (fig 12B), o efeito da glicose em reduzir o efluxo do ^{45}Ca também foi mais acentuado no grupo PRL. A comparação das fig 12A e 12B, indica que o efeito da glicose na redução do efluxo do ^{45}Ca foi potencializado em ilhotas cultivadas durante 19 dias na presença de PRL comparado a 7 dias em cultura.

Na fig 13A, observamos que após 7 a 9 dias em cultura, o efeito da Leu aumentando o efluxo fracional do ^{45}Ca foi maior no grupo tratado em relação ao controle (comparando o intervalo 30-40 min ao 41-45 min; o aumento foi de 18% para o controle e 81% para o tratado). A fig 13B mostra o mesmo efeito, potencializado após 17 a 19 dias de tratamento hormonal (no mesmo intervalo acima, houve aumento de 22% para o controle e 166% para o PRL).

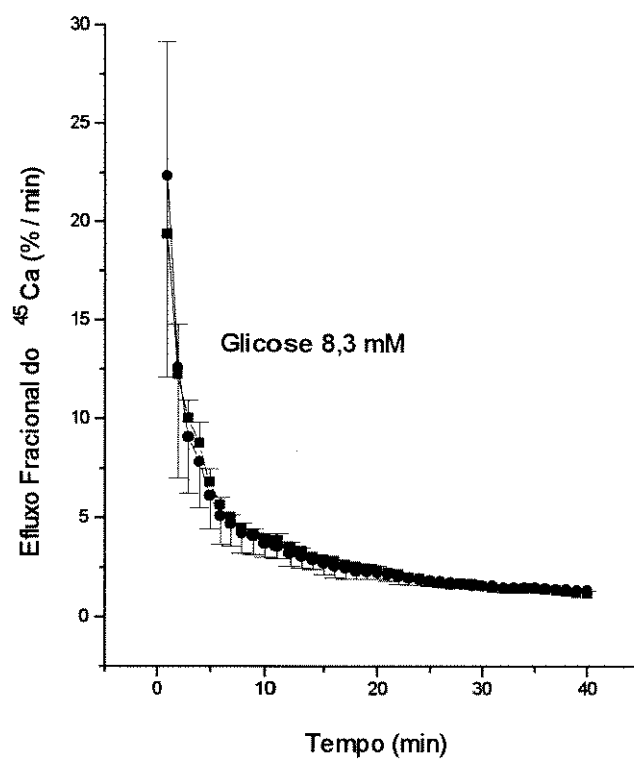


FIGURA 10: Efeito da glicose (8,3 mM) sobre o efluxo fracional do ^{45}Ca de ilhotas neonatais cultivadas durante 7 a 9 dias, na ausência (●) ou presença (■) de PRL. São indicadas as médias $\pm$ EPM ($n = 4$).

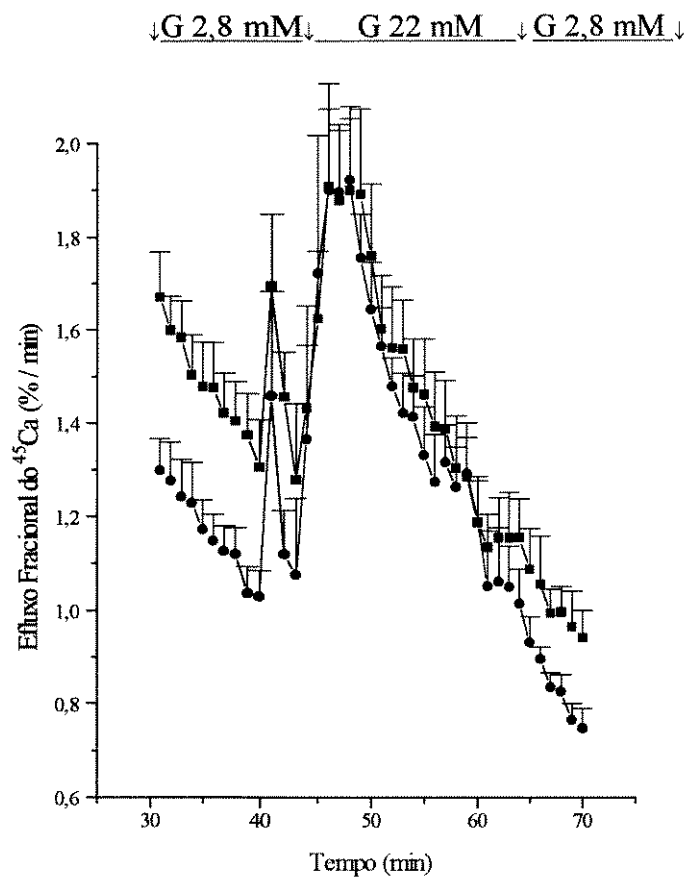


FIGURA 11: Efeito da glicose (22 mM) sobre o efluxo fracional do ⁴⁵Ca, em ilhotas neonatais cultivadas durante 7 a 9 dias, na presença (■) ou ausência (●) de PRL. As ilhotas foram perfundidas durante 70 min por solução contendo 1,0 mM de Ca²⁺ e 2,8 mM de G. No intervalo 40 a 60 min, a concentração de G foi elevada para 22 mM. São indicadas as médias ± EPM (n = 6).

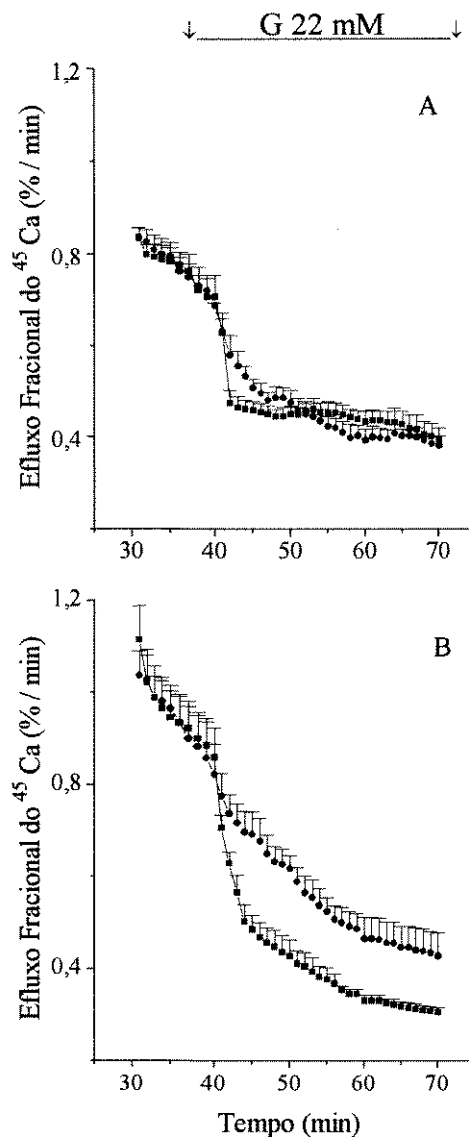


FIGURA 12: Efeito de 22 mM de glicose (intervalo 40-70 min) sobre o efluxo fracional do ^{45}Ca , em ilhotas neonatais cultivadas durante 7 (A) ou 19 (B) dias, na presença (■) ou ausência (●) de PRL. As ilhotas foram perfundidas durante 70 min, por solução sem acréscimo de Ca^{2+} , contendo 0,5 mM de EGTA e 2,8 mM de G. São indicadas as médias $\pm$ EPM ($n = 4$).

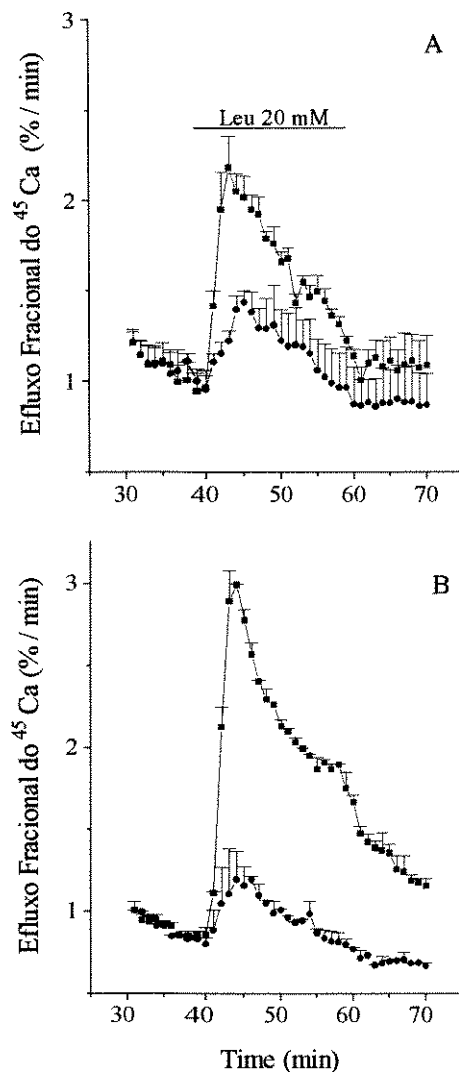


FIGURA 13: Efeito da Leu (20 mM) sobre o efluxo fracional do ^{45}Ca , em ilhotas neonatais cultivadas durante 7 (A) ou 19 (B) dias, na presença (■) ou ausência (●) de PRL. As ilhotas foram perfundidas durante 70 min, por solução contendo 1,0 mM de Ca^{2+} e 2,8 mM de G. No intervalo 40-60 min, foi acrescentado 20 mM de Leu à solução perfusora. São indicadas as médias $\pm$ EPM ($n = 4$).

4.5. Captação do Cálcio

Analizamos o efeito de diferentes secretagogos sobre a captação do ^{45}Ca , durante 5 (fig 14 e tab I) e 90 min (fig 15 e tab II), por ilhotas pancreáticas de ratos neonatais, cultivadas durante 7 e 19 dias, recebendo ou não tratamento com PRL.

Após 7 dias em cultura a captação do ^{45}Ca , durante 5 min (fig 14A e tab I), na presença de 2,8 mM de glicose, foi semelhante em ilhotas controle e tratadas com PRL, atingindo respectivamente $1,61 \pm 0,07$ e $1,65 \pm 0,05$ pg/ilhota ($n = 12$ para ambas). Glicose 22 mM, elevou-se significativamente a captação para $3,62 \pm 0,17$ pg/ilhota no grupo controle e $3,75 \pm 0,16$ pg/ilhota no grupo PRL ($n = 12$), porém não houve diferença entre os dois grupos. Na presença de 100 μM do agonista muscarínico carbamilcolina (Cch), a captação foi de $1,73 \pm 0,03$ e $1,73 \pm 0,04$ pg/ilhota ($n = 12$), em ilhotas controle e tratadas com PRL, respectivamente. A captação estimulada por 20 mM de arginina (Arg) foi $1,98 \pm 0,03$ pg/ilhota no grupo controle e $2,02 \pm 0,05$ pg/ilhota no grupo PRL ($n = 12$, em ambos). Na presença de 20 mM de leucina (Leu), a captação foi de $1,89 \pm 0,04$ e $1,90 \pm 0,03$ pg/ilhota ($n = 12$), em ilhotas controle e tratadas com PRL, respectivamente.

Após 19 dias em cultura, a captação do ^{45}Ca , durante 5 min (fig 14B e tab I) foi maior ($p < 0,05$) em ilhotas tratadas com PRL em relação as controle em todas as situações experimentais. Na presença de 2,8 mM de glicose, atingiu $1,26 \pm 0,02$ pg/ilhota ($n = 31$) em ilhotas controle e $1,56 \pm 0,04$ ($n = 16$) pg/ilhota em ilhotas tratadas. Glicose 22 mM, elevou a captação para $2,69 \pm 0,08$ pg/ilhota no grupo controle ($n = 39$) e $3,61 \pm 0,08$ pg/ilhota no grupo PRL ($n = 15$). Na presença de 100 μM de Cch, a captação foi de $2,05 \pm 0,06$ ($n = 23$) e $2,53 \pm 0,05$ ($n = 33$) pg/ilhota, em ilhotas controle e tratadas com PRL, respectivamente. A captação estimulada por 20 mM de Arg foi $3,29 \pm 0,10$ pg/ilhota no grupo controle ($n = 18$) e $4,57 \pm 0,17$ pg/ilhota no grupo PRL ($n = 20$). Na presença de 20 mM de Leu, a captação foi $3,05 \pm 0,06$ ($n = 25$) e $3,61 \pm 0,04$ ($n = 29$) pg/ilhota, em ilhotas controle e tratadas com PRL, respectivamente.

Após 7 dias em cultura a captação do ^{45}Ca , durante 90 min (fig 15A e tab II), na presença de 2,8 mM de glicose, foi semelhante em ilhotas controle e tratadas com PRL, atingindo respectivamente $1,94 \pm 0,10$ (n = 24) e $1,97 \pm 0,10$ (n = 18) pg/ilhota. A captação estimulada por 22 mM de glicose, elevou-se significativamente para $3,45 \pm 0,19$ pg/ilhota no grupo controle (n = 23) e $3,47 \pm 0,23$ pg/ilhota no grupo PRL (n = 26), porém não diferiu entre os dois grupos. Na presença de 100 μM de Cch, a captação foi de $2,11 \pm 0,13$ (n = 17) e $2,12 \pm 0,11$ (n = 29) pg/ilhota, em ilhotas controle e tratadas com PRL, respectivamente. A captação estimulada por 20 mM de Arg foi $2,14 \pm 0,14$ pg/ilhota no grupo controle (n = 19) e $2,20 \pm 0,12$ pg/ilhota no grupo PRL (n = 21). Na presença de 20 mM de Leu, a captação foi de $2,26 \pm 0,14$ (n = 30) e $2,59 \pm 0,14$ (n = 18) pg/ilhota, em ilhotas controle e tratadas com PRL, respectivamente.

Após 19 dias em cultura a captação do ^{45}Ca , durante 90 min (fig 15B e tab II), na presença de 2,8 mM de glicose, foi semelhante em ilhotas controle e tratadas com PRL, atingindo respectivamente $3,96 \pm 0,19$ (n = 20) e $4,27 \pm 0,18$ (n = 29) pg/ilhota. Glicose 22 mM elevou a captação para $5,94 \pm 0,26$ (n = 20) pg/ilhota no grupo controle e $7,60 \pm 0,45$ (n = 21) pg/ilhota no grupo PRL ($p < 0,05$). Na presença de 100 μM de Cch, a captação foi de $4,87 \pm 0,21$ (n = 17) e $6,77 \pm 0,19$ (n = 34) pg/ilhota, em ilhotas controle e tratadas com PRL, respectivamente ($p < 0,05$). A captação estimulada por 20 mM de Arg não diferiu entre os grupos, sendo $4,80 \pm 0,27$ pg/ilhota no grupo controle (n = 21) e $4,94 \pm 0,25$ pg/ilhota no grupo PRL (n = 24). Na presença de 20 mM de Leu, a captação foi maior em ilhotas tratadas em relação as controle ($p < 0,05$), atingindo respectivamente $8,45 \pm 0,33$ (n = 16) e $9,76 \pm 0,38$ (n = 34) pg/ilhota.

Em síntese, portanto, em ilhotas neonatais cultivadas durante 7 dias, a captação do ^{45}Ca estimulada por 22 mM de glicose, 100 μM de Cch, 20 mM de Arg ou 20 mM de Leu, durante 5 (fig 14A e tab I) ou 90 min (fig 15A e tab II), não diferiu entre ilhotas controle e tratadas com PRL. Por outro lado, após 19 dias de tratamento hormonal, a captação do ^{45}Ca durante 90 min, estimulada por 22 mM de glicose, 100 μM de Cch ou 20 mM de Leu, foi maior no grupo PRL. Não houve diferença apenas na captação

estimulada por 20 mM de Arg (fig 15B e tab II). Contudo após 19 dias em cultura, a captação durante 5 min foi maior em ilhotas tratadas com PRL, em todas as situações experimentais; glicose 22 mM, Cch 100 μ M, Leu 20 mM e também Arg 20 mM (fig 14B e tab I).

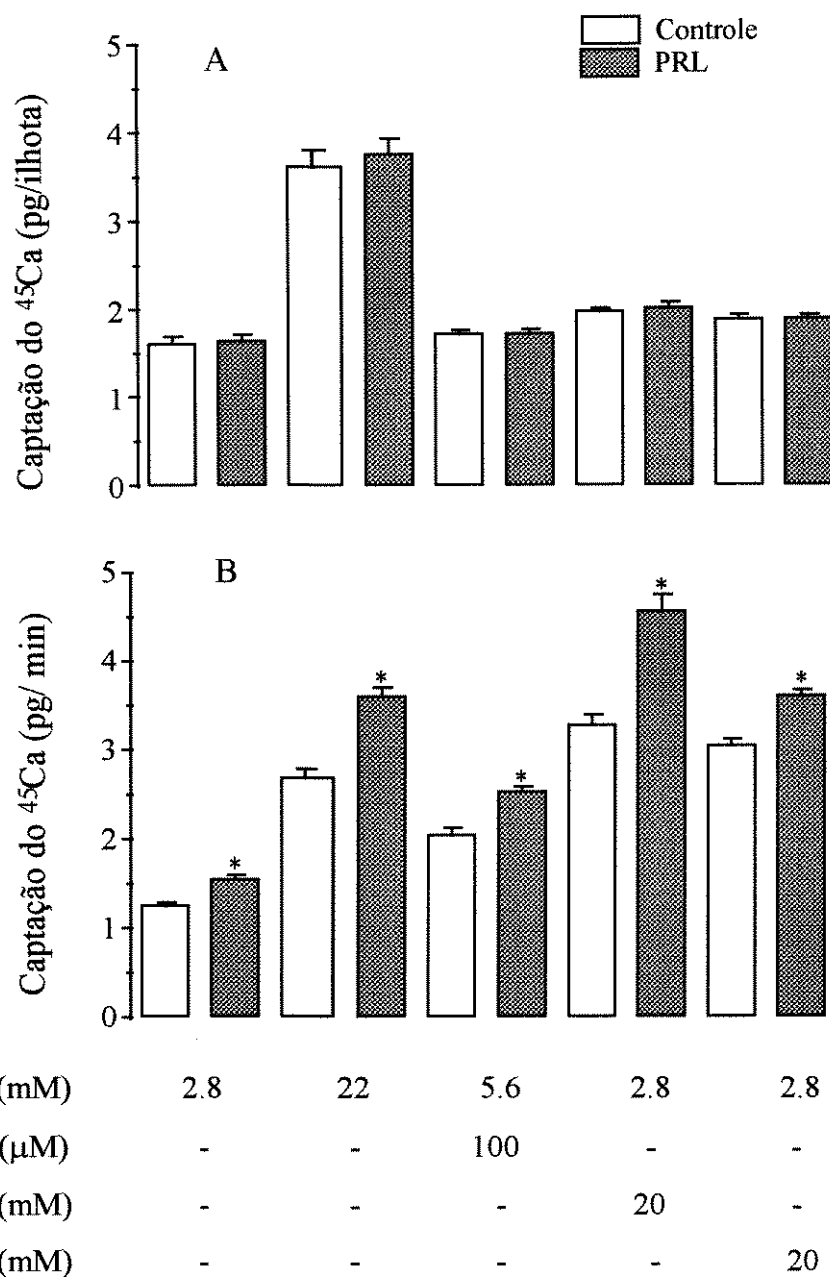


FIGURA 14: Efeito da glicose (22 mM), Cch (100 μM), Arg (20 mM) e Leu (20 mM), sobre a captação do ^{45}Ca , durante 5 min, por ilhotas neonatais mantidas em cultura, durante 7 (A) ou 19 (B) dias, na ausência ou presença de PRL. São indicadas as médias + EPM (n = 12 a 39). * Significativamente diferente ($p \leq 0,05$) de seu respectivo grupo controle.

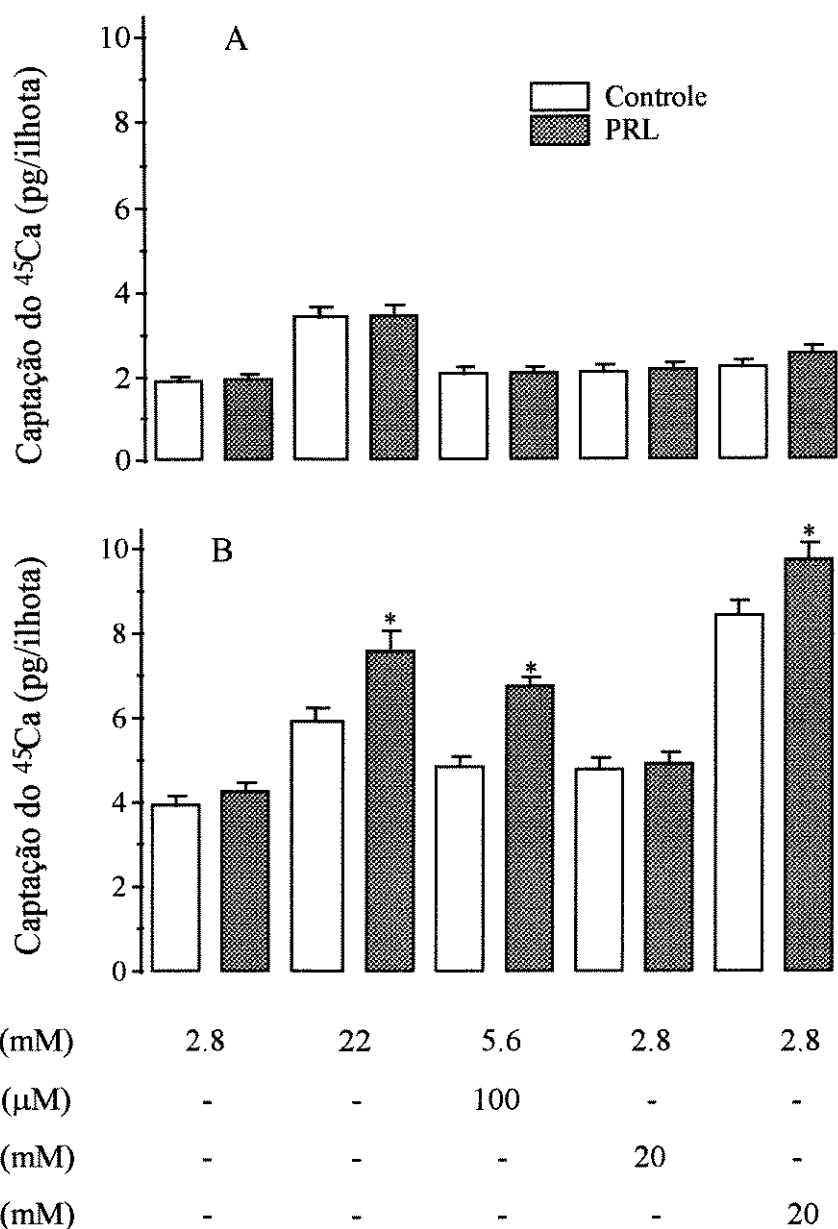


FIGURA 15: Efeito da glicose (22 mM), Cch (100 μM), Arg (20 mM) e Leu (20 mM), sobre a captação do ^{45}Ca , durante 90 min, por ilhotas neonatais mantidas em cultura, durante 7 (A) ou 19 (B) dias, na ausência ou presença de PRL. São indicadas as médias + EPM (n = 14 a 36). * Significativamente diferente ($p \leq 0,05$) de seu respectivo grupo controle.

4.6. Conteúdo Total de Insulina

O conteúdo total de insulina foi $24,4 \pm 2,0$ ng/ilhota no grupo controle e $34,3 \pm 3,5$ ng/ilhota no grupo tratado com PRL ($p < 0,05$; $n = 6$ em ambos os casos).

4.7. Secreção Dinâmica de Insulina

A fig 16 ilustra o efeito da glicose e do agonista muscarínico, oxotremorina-M (oxo-M), sobre a secreção de insulina por ilhotas obtidas de ratos de 1 e 7 dias de idade. As ilhotas foram isoladas e cultivadas durante uma noite, em meio sem PRL. A concentração de glicose da solução perfusora foi 1,8 mM do 1° ao 44° min. Em ilhotas obtidas de ratos com 7 dias de vida, a secreção de insulina apresentou padrão de resposta bifásica após o aumento na concentração de glicose de 1,8 para 16,7 mM (min 44). Por outro lado, em ilhotas obtidas de ratos com 1 dia de vida, a resposta secretória a 16,7 mM de glicose foi pequena. Comparando a secreção no min 49 em relação ao basal (min 35 a 44), o aumento induzido pela glicose foi de 120% em ilhotas de 7 dias e 30% em ilhotas de 1 dia ($p < 0,05$). Em ilhotas obtidas de ratos com 7 dias de vida, a adição de oxo-M (min 64) induziu um aumento significativo e transitório na secreção. Porém, em ilhotas obtidas de ratos de 1 dia de vida, a combinação de glicose e oxo-M provocou apenas um aumento reduzido na secreção de insulina. Comparando o valor máximo de secreção em relação ao basal (min 55 a 64), o aumento induzido pela Oxo-M foi de 140% (min 66) em ilhotas de 7 dias e 80% (min 68) em ilhotas de 1 dia ($p < 0,05$).

A figura 17 ilustra o efeito de 16,7 mM de glicose na secreção de insulina por ilhotas obtidas de ratos de 1 dia de vida, após cultura durante 7 a 9 dias, na presença ou não de PRL. Após 7 dias em cultura, a secreção de insulina aumentou significativamente em ilhotas neonatais controle e tratadas com PRL, em resposta a 16,7 mM de glicose. Além disso, em ilhotas tratadas com PRL, a resposta inicial a glicose foi maior quando comparada a de ilhotas controle. Em relação a secreção basal (intervalo 40-44 min), o aumento médio no intervalo 45-54 min foi de 27% em ilhotas controle e 55% em ilhotas

tratadas com PRL ($p < 0,05$). No intervalo 55 a 64 min não houve diferença na secreção entre os dois grupos. Portanto, a PRL causou elevação na 1ª fase de secreção de insulina. Comparando os intervalos 45 a 64 min, das fig 16 e 17, observamos que ilhotas de 1 dia de vida, cultivadas durante 7 dias, mesmo na ausência de PRL, já demonstram maturação da resposta secretória a glicose.

Em ilhotas neonatais cultivadas durante 7 dias, oxo-M induziu uma liberação de insulina monofásica na presença de 8,3 mM de glicose e bifásica na presença de 16,7 mM (figura 18A e 18B). Estas respostas não foram alteradas pelo tratamento com PRL. Por outro lado, o ativador da proteína quinase C, forbol 12,13-dibutirato, na presença de 8,3 mM de glicose, induziu um aumento significativo e duradouro na secreção de insulina em ilhotas tratadas com PRL, mas não afetou a secreção em ilhotas controle (figura 18C). Frente a 16,7 mM de glicose, a adição de forbol 12,13 dibutirato induziu uma resposta secretória bifásica nos dois grupos; contudo a magnitude da resposta foi maior em ilhotas tratadas com PRL comparadas as controle (figura 18D).

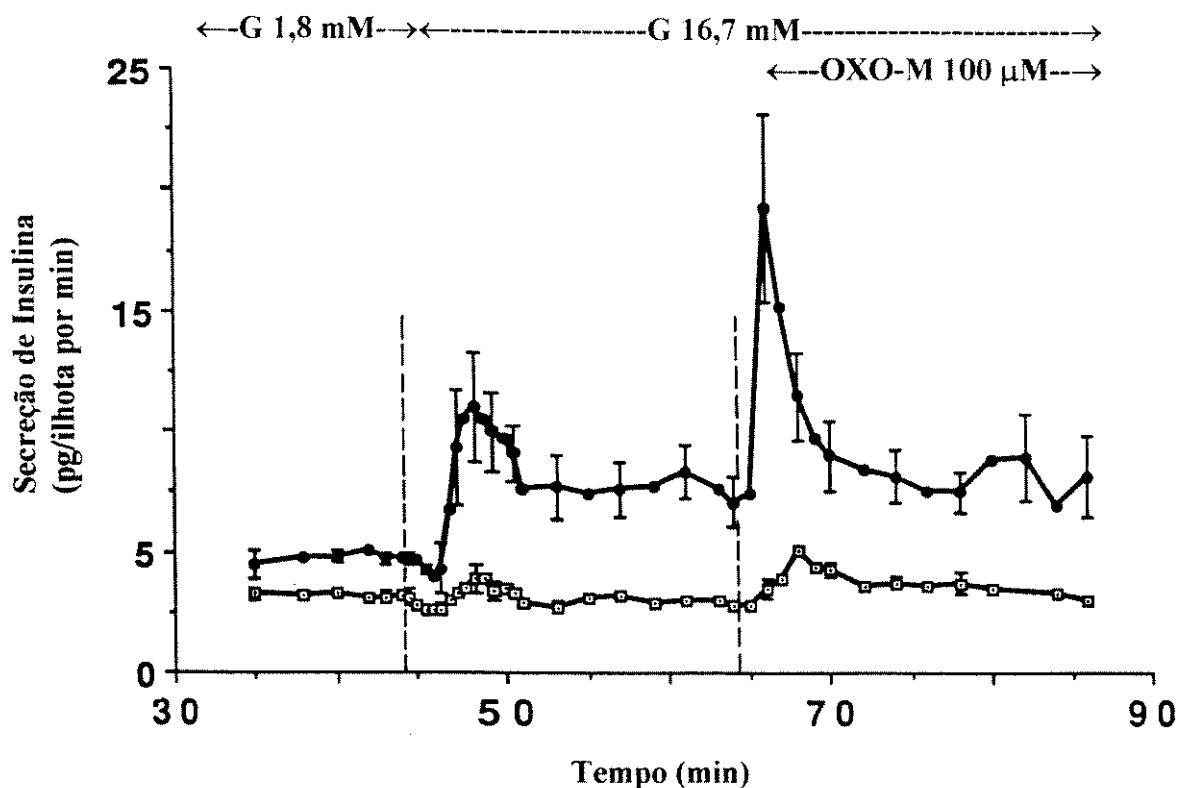


FIGURA 16: Efeito da glicose (16,7 mM) e da oxo-M (100 μM), sobre a secreção de insulina por ilhotas de ratos de 1 (□) e 7 (●) dias de vida, mantidas em cultura durante 24 horas. As ilhotas foram perfundidas durante 86 min e as amostras de solução perfusora foram coletadas a intervalos regulares de 30 seg. Na figura estão representados os valores de secreção obtidos em alguns pontos. A solução perfusora conteve 1,8 mM de G do início até o 45º min de perfusão, quando a concentração de G foi aumentada para 16,7 mM. Como indicado na figura, a oxo-M foi adicionada no min 64, na presença de 16,7 mM de G. Grupos de 150 ilhotas foram perfundidas em cada experimento. Os valores representam a média ± EPM de 4 experimentos.

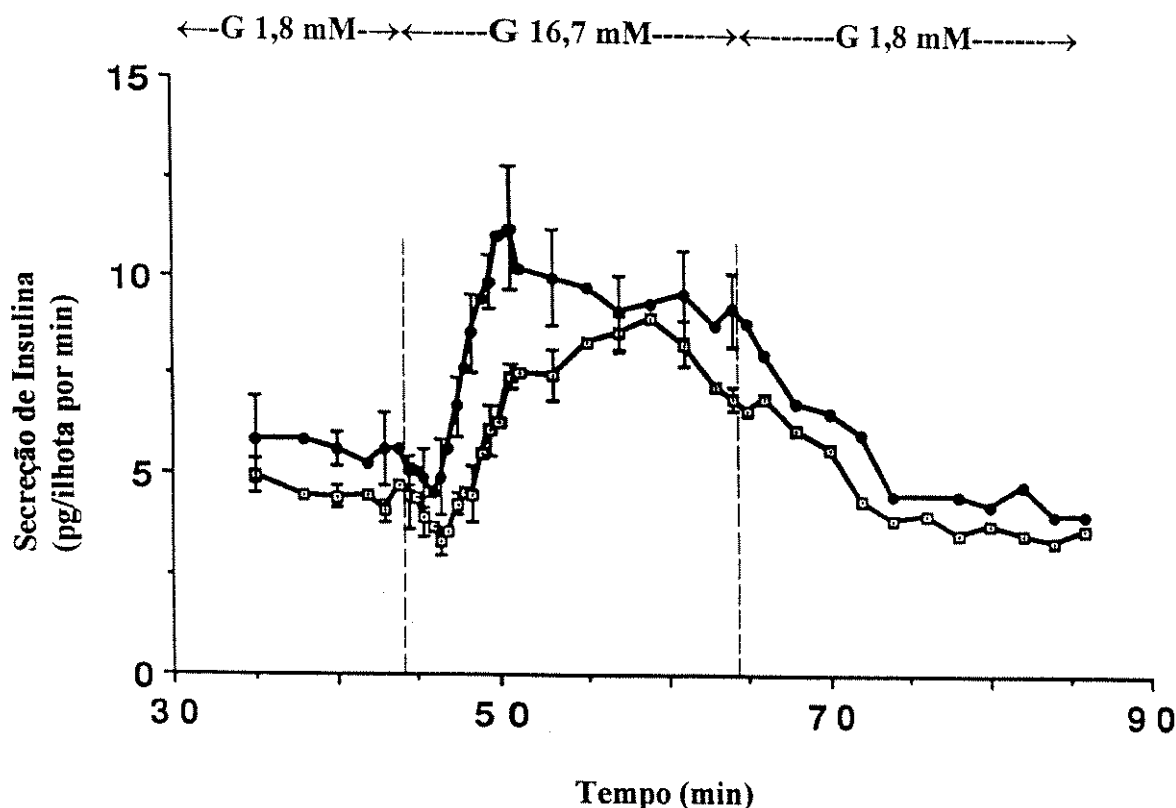


FIGURA 17: Efeito da glicose (16,7 mM) sobre a secreção de insulina, por ilhotas de ratos de 1 dia de vida, cultivadas durante 7 dias, na presença (●) ou ausência (□) de 2 µg/ml de PRL. As ilhotas foram perfundidas durante 86 min e as amostras de solução perfusora foram coletadas a intervalos regulares de 30 seg. Na figura estão representados os valores de secreção obtidos em alguns pontos. A solução perfusora conteve 1,8 mM de G durante toda perfusão, exceto no intervalo 45-64 min, quando a concentração de G foi elevada para 16,7 mM. Os valores são a média ± EPM (n = 4).

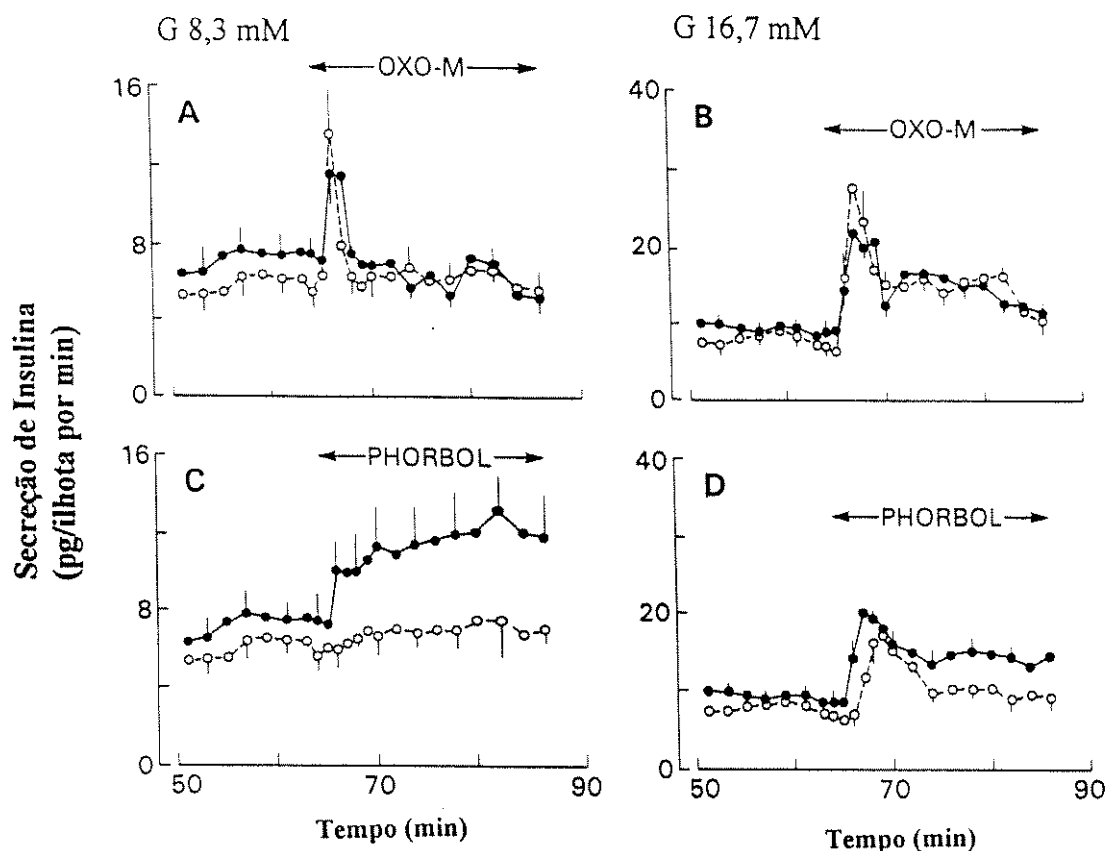


FIGURA 18: Efeito de 100 μM de oxo-M (A e B) e 0,1 μM de forbol 12,13-dibutirato (C e D), sobre a secreção de insulina, por ilhotas neonatais controle (o) e tratadas com PRL (•). As ilhotas foram perfundidas durante 86 min e as amostras de solução perfusora foram coletadas a intervalos regulares de 30 seg. Na figura estão representados os valores de secreção obtidos em alguns pontos. Em todos os experimentos, as ilhotas foram perfundidas do início da perfusão até o min 45, com solução contendo 1,8 mM de G. No min 45, a concentração de G foi elevada para 8,3 mM (painéis da esquerda) e para 16,7 mM (painéis da direita). As escalas verticais para A e C diferem das de B e D. Os valores são a média $\pm$ EPM ($n = 4$).

4.8. Secreção Estática de Insulina

Foi analisado o efeito de diferentes secretagogos na secreção estática de insulina, em ilhotas pancreáticas de ratos neonatais, cultivadas durante 7 e 19 dias (fig 19 e tab III), tratadas ou não com PRL.

Após 7 dias em cultura (fig 19A e tab III), a secreção basal de insulina (2,8 mM de glicose) foi semelhante em ilhotas controle e tratadas com PRL, atingindo respectivamente $1,84 \pm 0,06$ e $2,08 \pm 0,06\%$ do conteúdo total de insulina por ilhota ($n = 21$ para ambas). Quando estimulada por 5,6 mM de glicose, a percentagem de secreção foi $1,38 \pm 0,15$ no grupo controle e $2,43 \pm 0,16$ no grupo PRL ($n = 12$, $p < 0,05$). Em presença de 22 mM de glicose, ilhotas controle secretaram $3,09 \pm 0,21\%$ (1,7 vezes acima do basal) enquanto ilhotas tratadas com PRL secretaram $4,31 \pm 0,24\%$ (2,1 vezes acima do basal; $n = 21$, $p < 0,05$). Em presença de 100 μ M de Cch e 5,6 mM de glicose, o grupo controle secretou $3,67 \pm 0,24\%$ (2,0 vezes acima do basal) enquanto o grupo PRL secretou $5,05 \pm 0,31\%$ (2,4 vezes acima do basal, $n = 12$, $p < 0,05$). Em presença de 20 mM de Leu e 2,8 mM de glicose, a percentagem de secreção foi $4,42 \pm 0,23$ para o controle (2,4 vezes acima do basal) e $6,91 \pm 0,21$ para o grupo PRL (3,3 vezes acima do basal; $n = 21$; $p < 0,05$). A percentagem de secreção estimulada por 20 mM de Arg e 2,8 mM de glicose foi $4,63 \pm 0,17$ (2,5 vezes acima do basal) e $7,45 \pm 0,19$ (3,6 vezes acima do basal, $n = 21$, $p < 0,05$), respectivamente para ilhotas controle e tratadas.

Após 19 dias em cultura (fig 19B e tab III), quando estimulada por 2,8 mM de glicose, a secreção basal em ilhotas controle e tratadas com PRL, foi semelhante, atingindo respectivamente $1,17 \pm 0,05$ e $1,23 \pm 0,05\%$ do conteúdo total de insulina por ilhota ($n = 18$ para ambas). Estimulada por 5,6 mM de glicose, a percentagem de secreção foi $2,10 \pm 0,10$ no grupo controle (1,8 vezes acima do basal) e $4,70 \pm 0,50$ no grupo PRL (3,8 vezes acima do basal; $n = 12$; $p < 0,05$). Em presença de 22 mM de glicose, ilhotas controle secretaram $2,69 \pm 0,28\%$ (2,3 vezes acima do basal) enquanto ilhotas tratadas com PRL secretaram $7,50 \pm 0,60\%$ (6,1 vezes acima do basal; $n = 12$, $p <$

0,05). Estimulado por 100 μ M de Cch e 5,6 mM de glicose, o grupo controle secretou $2,25 \pm 0,23\%$ (1,9 vezes acima do basal) enquanto o grupo PRL secretou $2,90 \pm 0,10\%$ (2,3 vezes acima do basal, $n = 12$, $p < 0,05$). Em presença de 20 mM de Leu e 2,8 mM de glicose, a percentagem de secreção foi $8,51 \pm 0,23$ para o controle (7,3 vezes acima do basal) e $9,85 \pm 0,41$ para o grupo PRL (8,0 vezes acima do basal, $n = 21$, $p < 0,05$). A percentagem de secreção estimulada por 20 mM de Arg e 2,8 mM de glicose foi $7,29 \pm 0,28$ (6,2 vezes acima do basal) e $8,61 \pm 0,44$ (7,0 vezes acima do basal, $n = 18$, $p < 0,05$), respectivamente para ilhotas controle e tratadas.

O efeito exclusivo do tempo de cultura (fig 20A) não elevou a resposta secretória à 2,8 e 22 mM de glicose, ocorrendo aumento apenas em G 5,6 mM. A secreção estimulada por 100 μ M de Cch foi menor após 19 dias de cultura. Arg (20 mM) e Leu (20 mM) aumentaram a secreção em ilhotas cultivadas por período de tempo prolongado. O efeito do tratamento com PRL revelou um aumento temporal significativo na resposta secretória à glicose (5,6 e 22 mM). Na presença de G 2,8 mM e Cch 100 μ M, a secreção após 19 dias de tratamento hormonal foi menor em relação a 7 dias. A resposta secretória à Arg e Leu foi maior após 19 dias de tratamento com PRL, embora tenha sido bastante elevada após 7 dias.

Em síntese, após 7 dias em cultura, a secreção de insulina estimulada por 5,6 e 22 mM de glicose; 100 μ M de Cch; 20 mM de Leu e 20 mM de Arg; foi maior em ilhotas tratadas com PRL em relação aos controle. A resposta secretória aos mesmos agentes, também foi maior em ilhotas tratadas com o hormônio durante 19 dias em relação aos respectivos controle (fig 19A e 19B e tabela III). A análise da percentagem de aumento em relação ao basal, mostrou que a elevação na secreção de insulina foi proporcional ao tempo de tratamento hormonal. Por intermédio da fig 20B, observamos ainda que o efeito temporal da PRL na secreção, foi mais acentuado em resposta à estimulação com glicose.

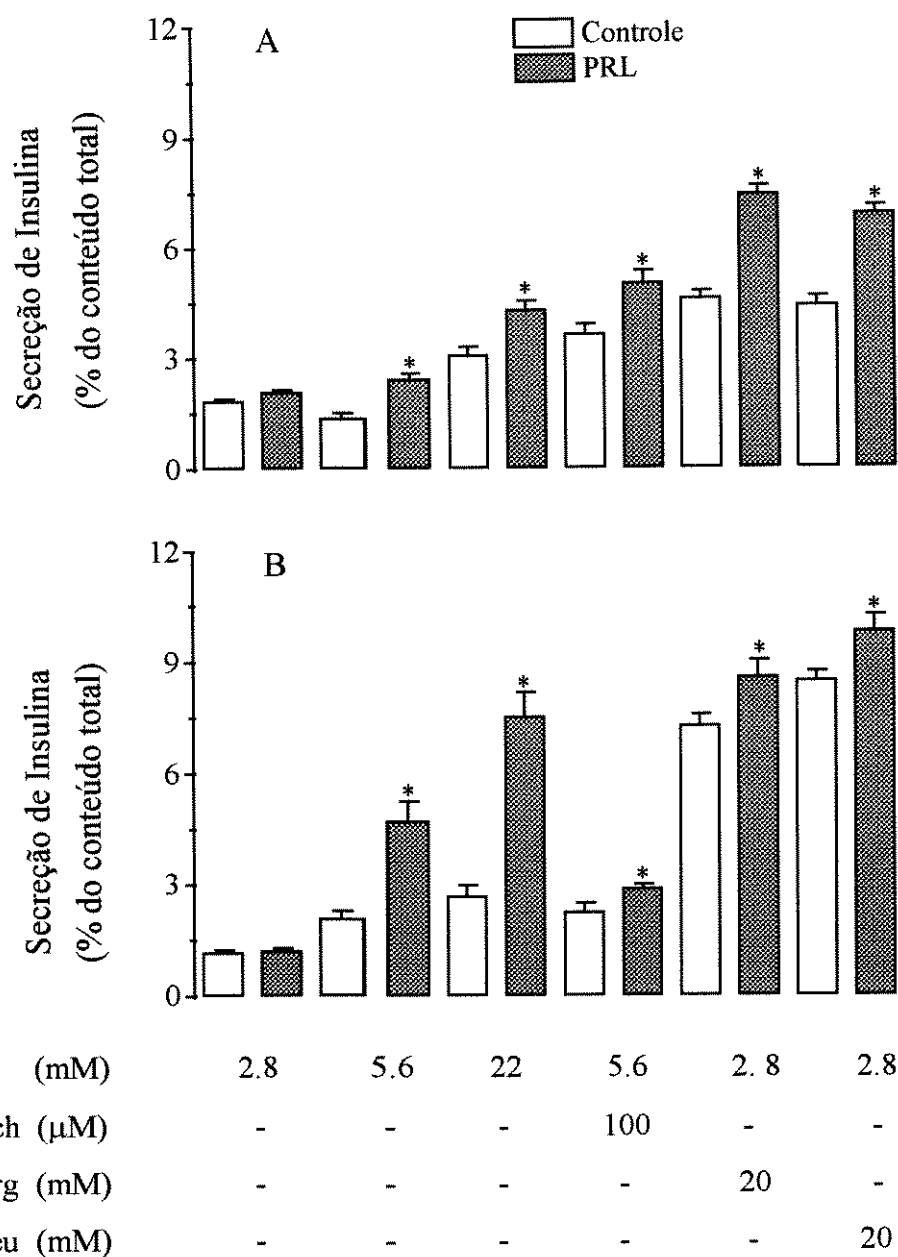


FIGURA 19: Efeito de diferentes estimuladores da secreção de insulina, durante 90 min, em ilhotas neonatais, cultivadas durante 7 (A) ou 19 (B) dias, na ausência ou presença de 2 µg/ml de PRL. São indicadas as médias + EPM (n = 12 a 21). * Significativamente diferente ($p \leq 0,05$) de seu respectivo grupo controle.

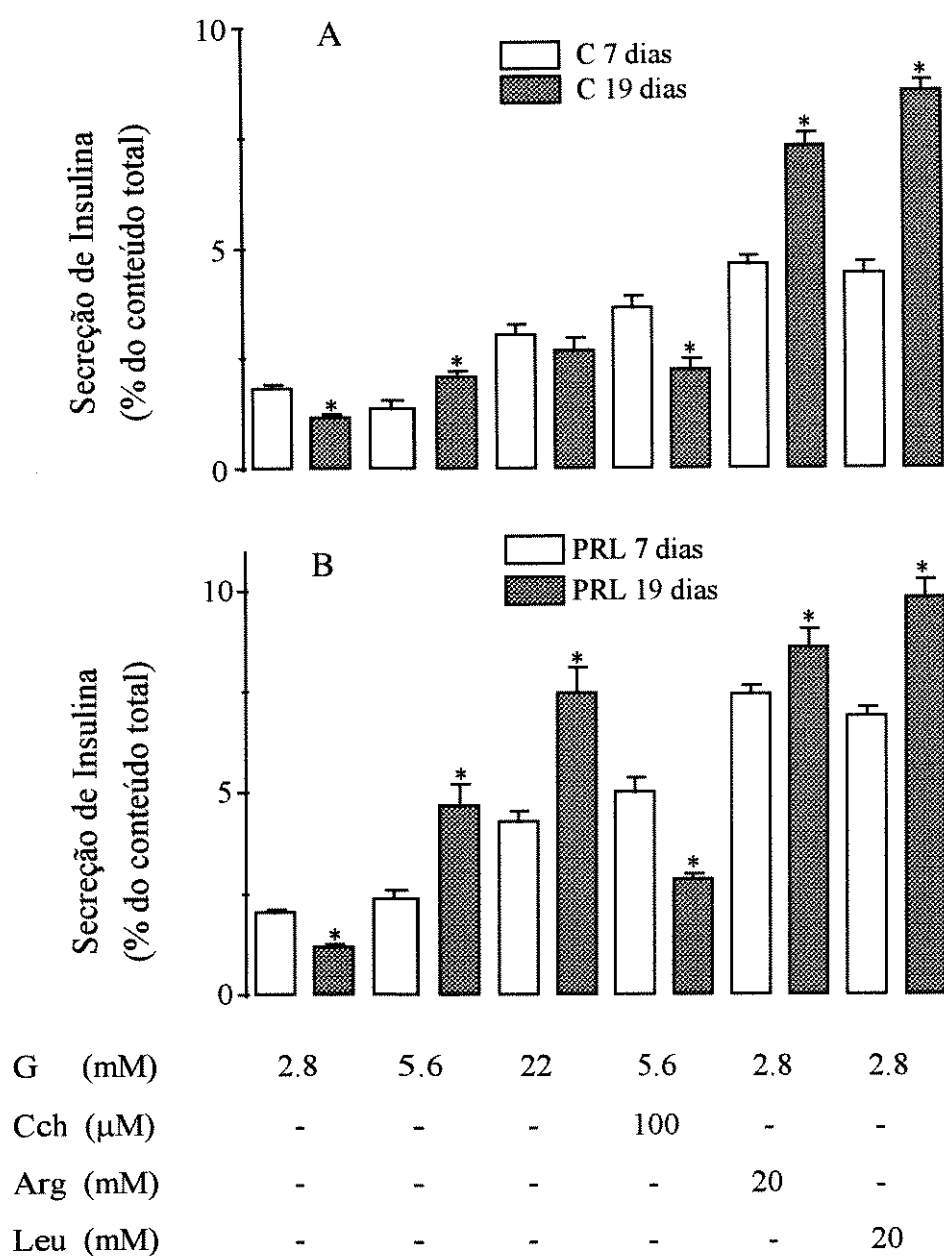


FIGURA 20: Efeito do tempo de cultura (A) e de tratamento com PRL (B), sobre a secreção de insulina estimulada por diferentes agentes, em ilhotas neonatais de ratos. São indicadas as médias $\pm$ EPM ($n = 12$ a 21). * Significativamente diferente ($p \leq 0,05$) do seu respectivo grupo controle.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Durante a fase de vida perinatal, ocorre um processo de maturação da resposta secretória de insulina nas células B-pancreáticas, que adquirem progressivamente um padrão funcional típico de ilhotas adultas (HOLE *et al.*, 1988). A compreensão das diferentes etapas de maturação e dos fatores que controlam esse processo, reveste-se de grande importância; pois os estudos da manifestação da sensibilidade à glicose durante a fase perinatal, podem contribuir para o esclarecimento do processo complexo, implícito na resposta secretória bifásica do adulto. Além disso, também podem fornecer subsídios para o entendimento do crescimento e desenvolvimento fetal; pois existem relatos de que a insulina é um regulador importante desses eventos (MARTIN *et al.*, 1984). Ressalta-se ainda a importância destes estudos, devido às similaridades entre as células B-pancreáticas fetais e neonatais e as células B adultas em alguns tipos de diabetes (WELSH *et al.*, 1987). Assim, o conhecimento do mecanismo de maturação da secreção de insulina, pode contribuir para a compreensão da degeneração da sensibilidade à glicose que ocorre no diabetes tipo II (WARD *et al.*, 1984; KAHN & PORTE, 1988; LEAHY, 1990) e no diabetes da fase senil (ELAHI *et al.*, 1985; AMMON *et al.*, 1987; REAVEN *et al.*, 1987).

Em ratos, a resposta secretória imatura observada durante o período fetal, é rapidamente convertida a uma resposta adulta, poucos dias após o nascimento (HELLERSTRÖM & SWENNE, 1991). Acredita-se que na fase perinatal, a resposta secretória diminuída deva-se a uma falha no acoplamento entre a estimulação pela glicose e a

despolarização da membrana, resultando na abertura de um número insuficiente de canais de Ca^{2+} voltagem-sensíveis, e num aumento inadequado na concentração do Ca^{2+} citosólico (BOSCHERO *et al.*, 1992a; BLACK *et al.*, 1994). Estas características das ilhotas fetais e neonatais com menos de 3 dias, não representam defeitos nos canais de K^{+} sensíveis ao ATP ou nos canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem (RORSMAN *et al.*, 1989); mas provavelmente relacionem-se a uma imaturidade mitocondrial (BOSCHERO *et al.*, 1990). Segundo BOSCHERO *et al.* (1990), ilhotas neonatais incubadas em presença de baixas concentrações de glicose ou Leu, produzem maior quantidade de ATP em relação a ilhotas adultas. Entretanto, a porcentagem de aumento na produção de ATP quando eleva-se a concentração dos substratos, é menor em ilhotas neonatais.

Entre os diversos fatores e hormônios, responsáveis pela maturação da célula B-pancreática na fase perinatal do desenvolvimento, o lactogênio PRL parece exercer um papel relevante.

Durante a prenhez, a PRL também induz mudanças adaptativas na célula B-pancreática, importantes para manutenção da normoglicemia materna (GREEN *et al.*, 1973; BONE & TAYLOR, 1976; SORENSON & PARSONS, 1985; BRELJE & SORENSON, 1991; BRELJE *et al.*, 1989; GREEN *et al.*, 1978; PARSONS *et al.*, 1992; SHERIDAN *et al.*, 1988). Além disso, sabe-se que a adaptação das ilhotas à prenhez ocorre a longo prazo (PARSONS *et al.*, 1992). Neste aspecto, também já observou-se que o tratamento “in vivo” de ratas adultas com PRL durante 4 dias induz mudanças tais como; diminuição no limiar de estimulação à glicose, aumento na secreção de insulina e aumento no acoplamento intercelular (SORENSON *et al.*, 1987b). Na ilhota pancreática,

a ação da PRL “in vivo”, também parece ser tempo-dependente, pelo fato de que os PRLr necessitam passar por um processo regulatório (“up-regulation”) para obtenção de uma resposta máxima (MOLDRUP *et al.*, 1993; SORENSON & STOUT, 1995).

A expressão ampla dos PRLr nos tecidos fetais de ratos e a indução da expressão do receptor no final da gestação, implicam em diversas funções para os hormônios lactogênicos no desenvolvimento fetal e neonatal (ROYSTER *et al.*, 1995; FREEMARK *et al.*, 1995). Inúmeras outras premissas indicam a participação da PRL no processo de maturação da resposta secretória das células B-pancreáticas no período de vida perinatal. Estudos “in vitro” demonstram que a PRL aumenta a síntese de insulina (NIELSEN, 1982; BRELJE *et al.*, 1989), diminui o limiar de estimulação a glicose (BRELJE & SORENSON, 1988); aumenta a secreção de insulina (BRELJE *et al.*, 1993); aumenta o acoplamento entre as células B de uma ilhota (MICHAELS *et al.*, 1987); aumenta a oxidação da glicose (BRELJE *et al.*, 1989); estimula a incorporação de [³H]-timidina (NIELSEN *et al.*, 1986); promove a proliferação de células B e aumenta o volume da ilhota (PARSONS *et al.*, 1995); aumenta o número e/ou atividade dos canais de K⁺-ATP dependentes (BOSCHERO *et al.*, 1993a); aumenta o conteúdo do GLUT2 (MAZANCOURT *et al.*, 1994; WEINHAUS *et al.*, 1996) e aumenta a atividade da glicoquinase (WEINHAUS *et al.*, 1996).

O presente trabalho tem como proposição aprofundar o conhecimento do mecanismo de maturação da célula B-pancreática, analisando principalmente o efeito do tempo de cultura e do tempo de tratamento com PRL, sobre a permeabilidade ao Ca²⁺ e a secreção de insulina.

Cabe lembrar que inúmeras etapas estão envolvidas no acoplamento do estímulo à secreção de insulina. Após o transporte da glicose para o citoplasma da célula B-pancreática, mediado por transportador específico, a etapa inicial na cascata de eventos necessários para o acoplamento do estímulo à secreção de insulina, é a metabolização do açúcar para formação do ATP (SENER & MALAISSE, 1984; MALAISSE *et al.*, 1984). O aumento na relação ATP/ADP intracelular, induz um bloqueio dos canais de K^+ metabolicamente regulados ou ATP-sensíveis. Em consequência ao fechamento dos canais de K^+ , ocorre retenção do íon e despolarização da membrana de célula B-pancreática (BOSCHERO *et al.*, 1977; BOSCHERO & MALAISSE, 1979; COOK & HALES, 1984). Esta despolarização ativa canais de Ca^{2+} voltagem-sensíveis (WOLLHEIM & SHARP, 1981; HENQUIN & MEISSNER, 1984); levando a um aumento na troca do cátion intra e extracelular e a um aumento na concentração do Ca^{2+} citosólico livre (MALAISSE *et al.*, 1978; PRENTKY & WOLLHEIM, 1984; ARKHAMMAR *et al.*, 1987). O Ca^{2+} , por sua vez, ativa o sistema efetor composto por microtúbulos e microfilamentos (HARRISON *et al.*, 1984; HOWELL & TYHURST, 1984), o qual promove a extrusão dos grânulos de insulina (HOWELL & TYHURST, 1984; HUTTON, 1984).

Portanto, o primeiro passo na secreção de insulina induzida pela glicose, é a entrada da hexose na célula B, mediada pelo transportador de glicose facilitador do subtipo GLUT2, uma proteína integral da membrana plasmática (THORENS, 1992 apud HEIMBERG *et al.*, 1995). Alguns autores relacionam alterações na expressão do GLUT2 à deficiências na resposta secretória à glicose, em ratos portadores de diabetes

melito não-insulino-dependentes ou NIDDM e modelos de diabetes melito insulino-dependentes ou IDDM (JOHNSON *et al.*, 1990; UNGER, 1991). Além disso, em diferentes linhagens de células tumorais; tais como células β -TC, HIT e RIN, que apresentam respostas anormais à glicose; foram encontradas quantidades reduzidas de GLUT2, comparadas a células B controle (BRANT *et al.*, 1992). Segundo estes autores, em células HIT, o nível elevado de GLUT1 (com um menor K_m para o transporte da hexose que o GLUT2), poderia contribuir para a resposta secretória anormal a concentrações baixas de glicose.

A presença do GLUT2 em ilhotas neonatais, controle e tratadas com PRL, está demonstrada por imunocitoquímica nas fig 4 e 5. Nossos resultados, sustentados por dados da literatura (MAZANCOURT *et al.*, 1994; WEINHAUS *et al.*, 1996), demonstram que o tratamento com PRL aumenta o conteúdo de GLUT2 em membranas de ilhotas de ratos neonatais. Confirmamos ainda o aumento na expressão desta proteína em ilhotas cultivadas em presença de alta concentração de glicose (fig 9). Neste sentido, a expressão do GLUT2 em ilhotas adultas (fig 1 e 3), também é modulada pela presença de glicose (fig 3).

Devido aos relatos anteriormente citados de que células tumorais apresentam níveis elevados de GLUT1 e secreção de insulina alterada, analisamos sua expressão em células neonatais. Embora saiba-se que o GLUT1 é um transportador presente em níveis elevados em eritrócitos, células endoteliais dos vasos sanguíneos e da barreira hematoencefálica; quantidades menores também são encontradas em muitos outros tecidos (FLIER *et al.*, 1987; FUKUMOTO *et al.*, 1988). Neste caso, ao contrário do

GLUT2, não houve um delineamento nítido do GLUT1 nas membranas citoplasmáticas das células B adultas (fig 6) ou neonatais (fig 7 e 8). Tanto a glicose quanto a PRL não promovem alteração na sua expressão. Curiosamente, em ilhota adulta também pode ser notada a presença do GLUT1 e GLUT2, em estruturas perinucleares (fig 3 e 6); cujo significado funcional não foi descrito até o presente momento.

Como citado anteriormente, após o transporte da glicose, sua metabolização altera a relação ATP/ADP e consequentemente bloqueia os canais de K^+ sensíveis ao nucleotídeo, resultando na despolarização celular. Em células B fetais e neonatais, demonstrou-se a presença dos canais de K^+ modulados pelo ATP (COOK *et al.*, 1986; RORSMAN *et al.*, 1989); funcionalmente semelhantes aos de células B adultas (ARKHAMMAR *et al.*, 1987; DUNE & PETERSEN, 1986). Diante da existência destes canais, já operantes nas células B fetais e neonatais, foi proposto que a resposta secretória “imatura” poderia relacionar-se à deficiência na produção do sinal metabólico apropriado para modulação da atividade do canal (FREINKEL *et al.*, 1984; RORSMAN *et al.*, 1989; BOSCHERO *et al.*, 1992b). Contudo, ilhotas neonatais mantidas em cultura, apresentam um efluxo do $^{86}Rb^+$ na ausência de glicose, reduzido em relação a ilhotas adultas; o que sugere uma menor densidade ou um comportamento alterado dos canais de K^+ modulados pelo ATP (BOSCHERO *et al.*, 1988). Neste aspecto, o fato do tratamento de ilhotas neonatais com PRL induzir uma resposta mais efetiva sobre o bloqueio da permeabilidade ao K^+ , frente a variações na concentração de glicose, indica um possível efeito direto do hormônio na densidade ou na sensibilidade dos canais de K^+ sensíveis ao

ATP, ou ainda um efeito indireto, conseqüente à maturação das vias oxidativas da glicose (CREPALDI, 1991; BOSCHERO *et al.*, 1993a).

Na sequência do acoplamento estímulo-secreção, a despolarização da membrana da célula B ativa a permeabilidade ao Ca^{2+} sensível à voltagem. Portanto, como a secreção de insulina depende de um aumento adequado na concentração de Ca^{2+} citosólico livre (ROJAS *et al.*, 1994) passamos a analisar os possíveis benefícios do tratamento com PRL nos fluxos de Ca^{2+} . A presença dos canais de Ca^{2+} modulados por voltagem foi demonstrada em pâncreas fetal de rato (HOLE *et al.*, 1988; RORSMAN, 1989; BOSCHERO *et al.*, 1992a), e pâncreas fetal humano (TUCH *et al.*, 1990). Resultados referentes à dependência da entrada de Ca^{2+} , através dos canais sensíveis à voltagem, para o mecanismo secretório em células B fetais e neonatais são conflitantes. Por um lado, em ilhotas fetais, a secreção de insulina induzida por concentrações despolarizantes de KCl, é inibida pelo bloqueador de canal Ca^{2+} voltagem-dependente, verapamil (HOLE *et al.*, 1988), e em ilhotas neonatais, a secreção de insulina estimulada por glicose, é inibida pela nifedipine (BOSCHERO *et al.*, 1988); o que confirma a presença dos canais. Por outro lado, em ilhotas fetais a glicose não pode estimular o influxo de Ca^{2+} (AMMON *et al.*, 1985; AMMON *et al.*, 1989) e a secreção de insulina estimulada pela mesma hexose é insensível ao verapamil (HOLE *et al.*, 1988). Em nosso modelo neonatal, o tratamento com PRL durante 7 dias parece não alterar a sensibilidade aos estímulos da permeabilidade ao Ca^{2+} ; pois o efluxo do íon em presença de 8,3 e 22 mM de glicose (fig 10 e 11), não diferiu entre os grupos controle e tratado. Por outro lado, a análise do efluxo do ^{45}Ca na ausência de Ca^{2+} e presença de um quelante do cátion

(condição em que se remove o mecanismo de troca $^{40}\text{Ca} \times ^{45}\text{Ca}$, e o efluxo representa principalmente a capacidade da glicose em reter $^{45}\text{Ca}^{2+}$ no interior das células), demonstra uma maior capacidade de redução no efluxo do íon, em ilhotas cultivadas em presença de PRL (fig 10). Efeito este, mais mais acentuado em ilhotas tratada com PRL durante 19 dias (fig 10b). Em concordância com estes resultados, Leu em presença de Ca^{2+} externo também induziu um efeito maior no efluxo do $^{45}\text{Ca}^{2+}$, em ilhotas tratadas com PRL em relação às controle; sendo o mesmo potencializado após 19 dias (fig 13).

Dando continuidade a esta análise, realizamos medidas da captação do $^{45}\text{Ca}^{2+}$, em ilhotas incubadas durante 5 ou 90 min, o que reflete respectivamente o influxo e a capacidade de retenção do cátion. Confirmando e ampliando dados da literatura (BOSCHERO *et al.*, 1993a), a captação do $^{45}\text{Ca}^{2+}$ durante 5 ou 90 min, induzida por glicose, Cch, Leu e Arg, não diferiu entre ilhotas controle e tratadas com PRL durante 7 dias (fig 14A e 15A, Tab I e II). Contudo, a captação do $^{45}\text{Ca}^{2+}$ durante 5 ou 90 min, registrada após 19 dias de cultura foi maior em ilhotas tratadas em relação às controle, em todas as condições experimentais, exceto para Arg durante 90 min (fig 14B e 15B, Tab I e II).

A alteração na concentração citoplasmática do Ca^{2+} , leva à ativação do sistema efector microtubular-microfilamentar (HARRISON *et al.*, 1984; HUTTON, 1984), responsável pela secreção de insulina, analisada à seguir.

A comparação dos dados apresentados nas fig 16 e 17 confirma as observações de que em ilhotas neonatais, ocorre maturação parcial da resposta secretória à glicose após cultura durante um período de 7 dias (BOSCHERO *et al.*, 1988; FREINKEL *et al.*,

1984). Estas revelaram aumento na secreção de insulina estimulada por 16,7 mM de glicose, mas não apresentaram um padrão bifásico típico, como o observado em ilhotas de ratos adultos perfundidas (BOSCHERO *et al.*, 1990) ou ilhotas obtidas de ratos de 7 dias de idade (fig 16). A maturação do sistema secretor devido ao tempo de cultura também pode ser notada em ilhotas cultivadas durante 19 dias, estimuladas por Leu e Arg; comparadas àquelas cultivadas durante 7 dias (fig 19A).

Verificamos que o tratamento com PRL durante 7 dias, aumentou o conteúdo de insulina de ilhotas neonatais em 40 %. Isto pode refletir uma maior massa tecidual total (BILLESTRUP & NIELSEN, 1991), bem como uma maior taxa biossintética do hormônio (BRELJE *et al.*, 1989; NIELSEN *et al.*, 1986); e pode explicar também a secreção basal de insulina mais elevada (fig 17, min 35 a 45).

Ilhotas neonatais cultivadas durante 7 dias em presença de PRL, perfundidas por solução contendo 16,7 mM de glicose, apresentam um padrão de resposta secretória de insulina bifásico; ausente nas ilhotas controle (fig 17). Esse resultado reitera dados da literatura, nos quais a maturação “in vitro” da resposta secretória de insulina, é acelerada pelo tratamento com PRL (SORENSEN *et al.*, 1987a; SORENSEN *et al.*, 1987b; BRELJE *et al.*, 1989; NIELSEN *et al.*, 1986; BILLESTRUP & NIELSEN, 1991; MARKOFF *et al.*, 1990). A secreção estimulada por glicose, foi claramente potencializada pelo tratamento com PRL durante 19 dias (fig 18, Tab III). Este efeito não pode ser descrito por diferenças no tempo de cultura, uma vez que a secreção basal das ilhotas (2,8 mM de glicose) foi menor após 19 dias em relação a 7 dias, independentemente do tratamento hormonal (fig 19).

A secreção de insulina estimulada por Arg e Leu, também foi maior em ilhotas tratadas com PRL durante 7 ou 19 dias em relação aos respectivos controles (fig 18, Tab III). Além disso, os dados indicam que as ilhotas cultivadas durante um período de tempo prolongado, tornam-se mais sensíveis à estimulação pelos aminoácidos, em relação à glicose (fig 19a). Uma possível explicação para esta discrepância seria a maturação dos diferentes processos enzimáticos, responsáveis pelo metabolismo dos aminoácidos e pelo metabolismo da glicose, ocorrer em períodos de tempo diferentes, durante a cultura. O tratamento com PRL parece acelerar a maturação destes mecanismos, resultando em uma maior secreção de insulina induzida tanto por glicose quanto por Arg ou Leu.

Além dos estimuladores, como a glicose e outros substratos energéticos, a secreção de insulina “in vivo”, é modulada por hormônios e neurotransmissores. Os agentes colinérgicos, como a acetilcolina (Ach), são exemplos de substâncias não-nutrientes potencializadoras da secreção. Na célula B-pancreática, a interação destas substâncias com receptores muscarínicos específicos do subtipo M3 (BOSCHERO *et al.*, 1995), estimula a fosfolipase C (PLC) de membrana, que hidrolisa fosfatidil inositol, formando inositol trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DG). O IP₃ promove liberação de Ca²⁺ de estoques intracelulares (PRENTKI *et al.*, 1984), e o DG ativa a proteína quinase Ca²⁺-dependente (PKC) (BEST & MALAISSE, 1984; INOUE & YOSHII, 1992). O efeito estimulatório de um agonista muscarínico sobre a secreção de insulina deve-se principalmente à PKC; pois embora o IP₃ mobilize Ca²⁺ do retículo endoplasmático, a secreção é predominantemente dependente do Ca²⁺ extracelular (VERCHERE *et al.*, 1991; BOSCHERO *et al.*, 1995). Além da ativação da PKC, o efeito estimulatório da

Ach pode estar associado a alterações nas permeabilidades iônicas; tais como aumento da permeabilidade da membrana ao Ca^{2+} e Na^{+} e redução na permeabilidade da membrana ao K^{+} (HUGHES *et al.*, 1990; GILON & HENQUIN, 1993; SANTOS & ROJAS, 1989); para despolarização suplementar da célula B-pancreática.

Os dados obtidos com estimulação da secreção de insulina por agonistas muscarínicos, são de interpretação mais difícil. Segundo MOURMEAUX *et al.* (1989) o mecanismo pelo qual agonistas muscarínicos estimulam a liberação de insulina passa por uma maturação significativa durante cultura. A comparação dos efeitos da oxo-M, em ilhotas obtidas de ratos de 1 e 7 dias de idade (fig 16), e em ilhotas neonatais cultivadas durante 7 dias (fig 20, A e B), vem corroborar estes dados. Em linha geral, o tratamento com PRL (durante 7 ou 19 dias) potencializou o efeito da Cch sobre a secreção estática comparada ao respectivo controle (fig 18) mas não sobre a secreção dinâmica (fig 20). Contudo, o efeito potencializador da PRL se perde quando comparamos os resultados obtidos após 7 e 19 dias de tratamento hormonal (fig 19). Portanto, parece que o tratamento com PRL não atua nos mecanismos envolvidos na modulação muscarínica.

Existem poucos relatos dos efeitos de ativadores da proteína quinase C na estimulação da secreção de insulina em ilhotas fetais e neonatais. No pâncreas fetal humano, apenas concentrações altas de forbol ester, 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetato (TPA), estimularam a secreção de insulina (TUCH *et al.*, 1988). Por outro lado, em células B fetais de rato cultivadas, doses pequenas de TPA potencializaram a secreção de insulina induzida por níveis de glicose altos (MOURMEAUX *et al.*, 1989); contudo, nenhuma resposta bifásica foi relatada. Nossos resultados mostraram duas diferenças

claras entre os efeitos do forbol 12,13-dibutirato na secreção de insulina de ilhotas controle e tratadas com PRL durante 7 dias. Na presença de 8,3 mM de glicose, o forbol induziu um aumento significativo e mantido na secreção de insulina apenas em ilhotas tratadas com PRL. Na presença de 16,7 mM de glicose, o forbol induziu um aumento significativo e bifásico na secreção de insulina em ambos os tipos de ilhotas, mas a resposta foi maior e mais rápida em ilhotas tratadas com PRL em relação às controle. Cabe ressaltar que a proteína quinase $C\alpha$, mediadora do efeito do agonista muscarínico, ainda não está desenvolvida no 3º dia de vida (FLETCHER & WAYS, 1991). Nossos dados indicam que os níveis elevados de PRL durante a fase perinatal podem estar envolvidos na maturação do sistema PKC, o qual por sua vez desempenha uma função importante no desenvolvimento do mecanismo de sensibilidade à glicose.

RESUMO E CONCLUSÕES

6. RESUMO E CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como objetivo aprofundar os conhecimentos sobre os mecanismos celulares envolvidos na maturação do acoplamento estímulo-secreção de insulina na fase de vida perinatal; e da função do lactogênio PRL neste processo. Para tanto, ilhotas de ratos neonatais foram mantidas em cultura durante períodos de tempo diferentes, recebendo ou não tratamento hormonal diário. À seguir, analisamos a expressão dos transportadores de glicose, a permeabilidade ao cálcio e a secreção de insulina estimulada por substâncias diferentes. Os dados obtidos nos indicam que em ilhotas neonatais o tratamento crônico com PRL e a concentração de glicose no meio de cultura, modulam o aumento na expressão do GLUT2. A expressão do GLUT1 não é alterada pela PRL ou pela glicose. A permeabilidade ao $^{45}\text{Ca}^{2+}$ é modificada após o tratamento prolongado com PRL, aproximando-se ao padrão do adulto. A PRL induz aumento no conteúdo de insulina e maturação da resposta secretória estimulada por glicose e aminoácidos. A maturação da resposta secretória estimulada por glicose é potencializada pelo tempo de tratamento hormonal. O tratamento com PRL parece não atuar nos mecanismos envolvidos na modulação muscarínica embora induza maturação no sistema PKC. O tempo de cultura “per se” induz uma maturação parcial da resposta secretória de insulina. A cultura por período de tempo prolongado torna as células B mais sensíveis à estimulação por Leu ou Arg. Finalmente, a comparação dos dados obtidos após cultura durante 7 ou 19 dias, indica que o tratamento prolongado com PRL atua em etapas importantes do mecanismo de secreção de insulina, favorecendo o acoplamento

entre o metabolismo do nutriente, a despolarização da membrana da célula B, a elevação na concentração citosólica de Ca^{2+} e a resposta secretória. Portanto, ilhotas neonatais cultivadas em presença de PRL durante 19 dias, adquirem uma resposta secretória de insulina mais próxima ao padrão do adulto.

Estes dados reforçam a importância da PRL no processo de maturação da resposta secretória de insulina, das células B-pancreáticas, na fase perinatal e sugerem um efeito tempo-dependente na ação do hormônio.

ABSTRACT

7. ABSTRACT

Maturation of the glucose sensing mechanism in mammals occurs during the perinatal life period. In rats, the poor secretory response to glucose observed during fetal period is rapidly converted to an adult response in few days after birth. This poor secretory response is ascribed to an uncoupling between glucose stimulation and membrane depolarization resulting in the opening of an insufficient number of voltage-sensitive Ca^{2+} -channels, and an impaired increase in cytosolic Ca^{2+} concentration. The observed uncoupling in fetal and neonatal islets seems to be also consequence of a reduced ATP generation by B cells.

Growth and differentiation of the endocrine pancreas are controlled by many factors including the somatolactogenic hormones, especially prolactin (PRL).

The present work aimed at investigating the cellular mechanisms involved in the maturation of stimulus-response coupling of insulin secretion in the perinatal life phase and the functions of PRL in this process. For this purpose, islets from neonatal rats were kept in culture during different periods of time receiving or not daily hormonal treatment. Glucose transporter expression (GLUT1 and GLUT2), Ca^{2+} membrane permeability and insulin secretion were analysed in these cultured neonatal islets. The PRL treatment and the glucose concentration in the culture medium affect GLUT2 expression. GLUT1 expression is not modified by PRL or glucose. After prolonged PRL treatment ^{45}Ca permeability in the neonatal islets are closer to that observed in adult islets. PRL induces increase in the insulin total content and accelerates the maturation of secretory response stimulated by glucose and aminoacids in a time-dependent fashion.

The maturation of secretory response stimulated by glucose is accelerated by time of PRL treatment. The PRL treatment does not affect mechanisms controlled by muscarinic receptors in B-cells. The PRL treatment induces maturation in the PKC system. The culture time "per se" induces partial maturation of insulin secretion response. B cells submitted to prolonged period of culture become more sensitive to Leu or Arg stimulation. Finally, data obtained after culture during 7 or 19 days, show that a prolonged PRL treatment influence important steps of the insulin secretion mechanisms, favouring the coupling among nutrient metabolism, membrane B cell depolarization, increase in the $[Ca^{2+}]_i$ and increase secretory response. Therefore, neonatal islets cultured in the presence of PRL during 19 days acquire an insulin response to the nutrients closer to the adult pattern.

These data reinforce the importance of PRL in the maturation process of insulin secretion response by pancreatic B cells during the perinatal life period and suggest an effect time-dependent in the hormonal action.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAM, P.A.J.; TERANO, K.; RAIHA, N.; GITLIN, D.; SCHWARTZ, R. Human fetal insulin metabolism early in gestational. Response to acute elevation of the fetal glucose concentration and placental transfer of human insulin I-131. **Diabetes**, **18**: 409-416, 1969 apud GRASSO *et al.*, 1973.
- AERTS, L. & VAN ASSCHE, F.A. Ultrastructural changes of the endocrine pancreas in pregnant rats. **Diabetologia**, **11**: 285-289, 1975.
- AGREN, A.; ANDERSSON, A.; HELLERSTROM, C. Effects of D-glyceraldehyde and D-glucose on the insulin release of pancreatic islets isolated from the newborn rat. **FEBS Lett.**, **71** (1): 185-188, 1976
- AGREN, A.; BROLIN, S.E.; HELLERSTROM, C. Glucose phosphorylation and insulin release of the pancreatic islets from newborn rats. **Diabetologia**, **11** (4): 329, 1975.
- AKIRA, S.; NISHIO, Y.; INOUE, M.; WANG, X.J.; WEI, S.; MATSUSAKA, T.; YOSHIDA, K.; SUDO, T.; NARUTO, M.; KISHIMOTO, T. Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p 91-related transcription factor involved in the gp 130-mediated signalling pathway. **Cell**, **77**: 63-71, 1994.
- ALI, S.; EDERY, M; PELLEGRINI, I.; LESUEUR, L.; PALY, J.; DJIANE, J.; KELLY, P.A. The Nb2 form of prolactin receptor is able to activate a milk protein gene promoter. **Mol. Endocrinol.**, **6** (8): 1242-1248, 1992 apud LOCHNAN *et al.*, 1995.

- ALI, S.; PELLEGRINI, I.; KELLY, P.A. A prolactin-dependent immune cell line (Nb2) expresses a mutant form of prolactin receptor. **J. Biol. Chem.**, **266**: 20110-20117, 1991.
- AMMON, H.P.T.; BUMILLER, G.; DUPPENBECKER, H.; HEINZE, E.; LUTZ, S.; VERSPOHL, E.J. Pentose phosphate shunt, pyridine nucleotides, glutathione, and insulin secretion of fetal islets. **Am. J. Physiol.**, **244**: 354-360, 1983.
- AMMON, H.P.T.; FAHMY, A.; MARK, M.; STROLIN, W.; WAHL, M.A. Failure of glucose to affect ⁸⁶Rubidium efflux and ⁴⁵Calcium uptake of fetal rat pancreatic islets. **J. Physiol.**, **358**: 365-372, 1985.
- AMMON, H.P.T.; FAHMY, A.; MARK, M.; WAHL, M.A.; YOUSSEF, N. The effect of glucose on insulin release and ion movements in isolated pancreatic islets of rats in old age. **J. Physiol.**, **384**: 347-354, 1987.
- AMMON, H.P.T.; GLOCKER, G.; WALDNER, R.G.; WAHL, M.A. Insulin release from pancreatic islets of fetal rats mediated by leucine b-BCH, tolbutamide, glibenclamide, arginine, potassium chloride, and theophylline does not require stimulation of Ca²⁺ net uptake. **Cell Calcium**, **10**: 441-450, 1989.
- ANDRES, R. & TOBIN, J.D. Aging and the disposition of glucose. **Adv. Exp. Biol. Med.**, **61**: 239-249, 1975.
- ARAGONA, C. & FRIESEN, H.G. Lactation and galactorrhea. In: DE-GROOT, L.J.; CAHILL, G.F.; ODELL, W.D.; MARTINI, L.; POTTS, J.T.; NELSON, D.H.; STEINBERGER, E.; WINEGRAD, A.I. (eds) **Endocrinology**. Grune and Stratton, NY, vol 3: 1613, 1979 apud NIELSEN, J.H., 1982.

- ARKHAMMAR, P.; NILSSON, T.; RORSMAN, P.; BERGGREN, P.O. Inhibition of ATP-regulated K^+ channels precedes depolarization-induced increase in cytoplasmic free Ca^{2+} concentration in pancreatic β -cells. **J. Biol. Chem.**, **262** (12): 5448-5454, 1987.
- ASHCROFT, F.M.; ASHCROFT, S.J.H.; HARRISON, D.E. The glucose-sensitive potassium channel in rat pancreatic beta cells is inhibited by intracellular ATP. **J. Physiol.**, **369**: 101P, 1985.
- ASPLUND, K. Dynamics of insulin release from the foetal and neonatal rat pancreas. **Eur. J. Clin. Invest.**, **3**: 336-344, 1973a.
- ASPLUND, K. Effects of intermittent glucose infusions in pregnant rats on the functional development of the foetal pancreatic β -cells. **J. Endocrinol.**, **59**: 285-293, 1973b.
- ASPLUND, K.; ANDERSON, A.; JARROUSSE, C.; HELLERSTROM, C. Function of the fetal endocrine pancreas. **Isr. J. Med. Sci.**, **11**: 581-590, 1975.
- ASPLUND, K.; WESTMAN, S.; HELLERSTROM, C. Glucose stimulation of insulin secretion from the isolated pancreas of fetal and newborn rats. **Diabetologia**, **5**: 260-262, 1969.
- ATWATER, I.; LI, M.X.; ROJAS, E.; STUTZIN, A. Glucose reduces both ATP-blockable and Ca-activated K-channel activity in cell-attached patches from rat pancreatic B-cells in culture. **Biophys. J.**, **53** (2): 145a, 1988.
- BARTKE, A. Role of prolactin in reproduction in male mammals. **Feder. Proc.**, **39**: 2577-2581, 1980.

- BAZAN, J.F. A novel family of growth hormone, prolactin, erythropoietin and IL-6 receptors, and the p75 IL-2 receptor β -chain. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **164** (2): 788-795, 1989.
- BERTHOUD, V.M.; LEDBETTER, M.L.S.; HERTZBERG, E.L.; SÁEZ, J.C. Connexin43 in MDCK cells: regulation by a tumor-promoting phorbol ester and Ca^{2+} . **Eur. J. Cell. Biol.**, **57**: 40-50, 1992.
- BEST, L. & MALAISSE, W.J. Nutrient and hormone-neurotransmitter stimuli induce hydrolysis of polyphosphoinositides in rat pancreatic islets. **Endocrinology**, **115**: 1814-1820, 1984.
- BILLESTRUP, N. & NIELSEN, J.H. The stimulatory effect of growth hormone, prolactin, and placental lactogen on β -cell proliferation is not mediated by insulin-like growth factor-I. **Endocrinology**, **129**: 883-888, 1991.
- BLACK, M.A.; MEALING, G.A.R.; WHITFIELD, J.F.; SCHWARTZ, J.L.; BÉGIN-HEICK, N. Insulin secretion and intracellular Ca rises in monolayer cultures of neonatal rat B-cells. **Cellular Signaling** **6**: 897-904, 1994.
- BLÁZQUEZ, E.; LIPSHAW, L.A.; BLÁZQUEZ, M.; FOÁ, P.P. The synthesis and release of insulin in fetal, nursing and young adult rats: studies *in vivo* and *in vitro*. **Pedriatr. Res.**, **9**: 17-25, 1975.
- BOGUSHKI, M.S. & MCCORNICK, F. Proteins regulating RAS and its relatives. **Nature**, **366**: 643-653, 1993.

- BONE, A.J. & TAYLOR, K.W. Metabolic adaptation to pregnancy shown by increased biosynthesis of insulin in islets of Langerhans isolated from pregnant rats. **Nature**, **262**: 501-502, 1976.
- BOSCHERO, A.C. & MALAISSE, W.J. Stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. XXIX. Regulation of ^{86}Rb efflux from perfused islets. **Am. J. Physiol.**, **236**: E139-E146, 1979.
- BOSCHERO, A.C.; BORDIN, S.; HERCHUELZ, A.; LEBRUN, P. Effects of glucose on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ outflow, cytosolic Ca^{2+} concentration and insulin release from freshly isolated and cultured adult rat islets. **Cell Calcium**, **11**: 603-609, 1990.
- BOSCHERO, A.C.; BORDIN, S.; PLASMAN, P.; HERCHUELZ, A. Effect of glucose and K^{+} depolarization on cytosolic free Ca^{2+} in cultured neonatal islets. **Horm. Metab. Res.**, **24**: 51-52, 1992a.
- BOSCHERO, A.C.; BORDIN, S.; SENER, A.; MALAISSE, W.J. D-Glucose and L-leucine metabolism in neonatal and adult cultured rat pancreatic islets. **Mol. Cell. Endocrinol.**, **73**: 63-71, 1992b.
- BOSCHERO, A.C.; CREPALDI, S.C.; CARNEIRO, E.M.; DELATTRE, E.; ATWATER, I. Prolactin induces maturation of glucose sensing mechanisms in cultured neonatal rats islets. **Endocrinology**, **133**: 515-520, 1993a.
- BOSCHERO, A.C.; KAWAZU, S.; DUNCAN, G.; MALAISSE, W.J. Effect of glucose on K^{+} handling by pancreatic islets. **FEBS lett.**, **83**: 151-154, 1977.

- BOSCHERO, A.C.; SZPAK-GLASMAN, M.; CARNEIRO, E.M.; BORDIN, S.; PAUL, I.; ROJAS, E.; ATWATER, I. Potentiation of glucose-induced insulin release from rat pancreatic islets by oxotremorine-m involves M₃ muscarinic cholinergic receptors. **Am. J. Physiol.**, **268**: E336-E342, 1995.
- BOSCHERO, A.C.; TOMBACCINI, D.; ATWATER, I. Effects of glucose on insulin release and ⁸⁶Rb-permeability in cultured neonatal and adult rat islets. **FEBS Lett.**, **236**: 375-379, 1988.
- BOSCHERO, A.C.; TOMBACCINI, D.; ATWATER, I. Effects of triiodothyronine on insulin release from cultured neonatal and adult rat islets. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **22**: 1015-1017, 1989.
- BOSCHERO, A.C.; TOMBACCINI, D.; CARNEIRO, E.M.; ATWATER, I.J. Differences in K⁺ permeability between cultured adult and neonatal rat islets of Langerhans in response to glucose, tolbutamide, diazoxide, and theophylline. **Pancreas**, **8** (1): 44-49, 1993b.
- BOUTIN, J.; JOLICOEUR, C.; OKAMURA, H.; GAGNON, J.; EDERY, M.; SHIROTA, M. BANVILLE, D.; DUSANTER-FOURT, I.; DJIANE, J.; KELLY, P.A. Cloning and expression of the prolactin receptor, a member of the growth hormone/prolactin gene family. **Cell**, **53**: 69-77, 1988.
- BRANT, A.M.; MCCOID, S.; THOMAS, H.M.; BALDWIN, S.A.; DAVIES, A.; PARKER, J.C.; GIBBS, E.M.; GOULD, G.W. Analysis of the glucose transporter content of islets cell lines: implications for glucose-stimulated insulin release. **Cell. Signal.**, **4**: 641-650, 1992.

- BRELJE, T.C. & SORENSON, R.L. Nutrient and hormonal regulation of the threshold of glucose-stimulated insulin secretion in isolated rat pancreases. **Endocrinology**, **123**: 1582-1590, 1988.
- BRELJE, T.C. & SORENSON, R.L. Role of prolactin vs. growth hormone on islet B-cell proliferation in vitro: implications for pregnancy. **Endocrinology**, **128**: 45-57, 1991.
- BRELJE, T.C.; ALLAIRE, P.; HEGRE, O.; SORENSON, R.L. Effect of prolactin *versus* growth hormone on islets function and the importance of using homologous mammosomatotropic hormones. **Endocrinology**, **125**: 2392-2399, 1989.
- BRELJE, T.C.; PARSONS, J.A.; SORENSON, R.L. Regulation of islet β -cell proliferation by prolactin in rat islets. **Diabetes**, **43**: 263-273, 1994.
- BRELJE, T.C.; SCHARP, D.W.; LACY, P.E.; OGREN, L.; TALAMANTES, F.; ROBERTSON, M.; FRIESEN, H.G.; SORENSON, R.L. Effect of homologous placental lactogens, prolactins and growth hormones on islets B-cell division and insulin secretion in rat, mouse and human islets: implication for placental lactogen regulation of islet function during pregnancy. **Endocrinology**, **132**: 879-889, 1993.
- BUCKLEY, A.R.; PUTNAM, C.W.; RUSSEL, D.H. Prolactin is a tumor promoter in rat liver. **Life Sci.**, **37**: 2569-2575, 1985.
- BURNETTE, W.N. "Western blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. **Anal. Biochem.**, **112**: 195-203, 1981.

- BURR, I.M.; KANAZAWA, Y; MARLISS, E.B.; LAMBERT, A.E. Biphasic insulin release from perfused cultured fetal rat pancreas. Effects of glucose, pyruvate and theophylline. **Diabetes**, **20**: 592-597, 1971.
- BUTTURINI, U. Effect of age and environmental factors on glucose tolerance and insulin secretion in a worker population. **J. Am. Geriatr. Soc.**, **34**: 271-275, 1986.
- CAMPBELL, G.S.; ARGETSINGER, L.S.; IHLE, J.N.; KELLY, P.A.; RILLEMA, J.A.; CARTER-SU, C. Activation of JAK2 tyrosine kinase by prolactin receptor in Nb2 cells and mouse mammary gland explants. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **91** (12): 5232-5236, 1994.
- CARTER-SU, C.; STUBBART, J.R.; WANG, X.; STRED, S.E.; ARGETSINGER, L.S.; SHAFER, J.A. Phosphorylation of highly purified growth hormone receptors by a growth hormone receptors associated tyrosine kinase. **J. Biol. Chem.**, **264** (31): 18654-18661, 1989.
- CLARK, C.M. & CAHILL, G.F.; SOELDNER, J.S. Effects of exogenous insulin on the rate of fatty acid synthesis and glucose ^{14}C utilization in the twenty-day rat fetus. **Diabetes**, **17**: 362-368, 1968 apud HOLE *et al.*, 1988.
- CLEMENS, J.A. & SHAAR, C.J. Control of prolactin secretion in mammals. **Feder. Proc.**, **39**: 2588-2592, 1980.
- CLEMENTS, R.S.Jr. & RHOTEN, W.B. Phosphoinositide metabolism and insulin secretion from isolated rat pancreatic islets. **J. Clin. Invest.**, **57**: 684-691, 1976.

- CLEVENGER, C.V.; SILLMAN, A.L.; HANLEY-HYDE, J.; PRYSTOWSKY, M.B.
Requirement for prolactin during cell cycle regulated gene expression in cloned T-lymphocytes. **Endocrinology**, **130**: 3216-3222, 1992.
- CLEVENGER, C.V.; TORIGOE, T.; REED, J.C. Prolactin induces rapid phosphorylation and activation of prolactin receptor-associated RAF-1 kinase in a T-cell line. **J. Biol. Chem.**, **269**: 5559-5565, 1994.
- COOK, D.L. & HALES, C.N. intracellular ATP directly blocks K^+ channel in pancreatic beta cells. **Nature**, **311**: 271-273, 1984.
- COOK, D.L.; HALES, C.N.; SATIN, L.S. Glucose suppresses ATP-inhibited K-channels in pancreatic B-cells. **Adv. Exp. Med. Biol.**, **211**: 63-67, 1986.
- COOK, D.L.; IKEUCHI, M.; FUJIMOTO, W.Y. Lowering of pH, inhibits Ca^{2+} -activated K^+ channel in pancreatic β -cells. **Nature**, **311**: 269-271, 1984.
- CORNBLATH, M.; PARKER, M.L.; REISNER, S.H.; FORBES, A.E.; DAUDHADAY, W.H. Secretion and metabolism of growth hormone in premature and full-term infants. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **25**: 209, 1965 apud NIELSEN, J.H., 1982.
- CREPALDI, S.C. **Efeito da Prolactina sobre a resposta secretória à glicose em ilhotas pancreáticas de ratos recém-nascidos, mantidas em cultura**. Campinas, 1991, 99 p [Dissertação - Mestrado. Instituto de Biologia da Univ. Estadual de Campinas].
- DARNELL, J.E.; KERR, I.M.; STARK, G.R. KAK-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and otther extracellular signalling proteins. **Science**, **264**: 1415-1421, 1994.

- DASILVA, L.; RUI, H.; ERWIN, R.A.; HOWARD, O.M.Z.; KIRKEN, R.A.; MALABARBA, M.G.; HACKETT, R.H.; LARNER, A.C.; FARRAR, W.L. Prolactin recruits STAT1, STAT3 and STAT5 independent of conserved receptor tyrosines TYR402, TYR479, TYR515 and TYR580. **Mol. Cell. Endocrinol.**, 117: 131-140, 1996.
- DAVID, M.; PETRICON, E.F.; IGARASHI, K.I.; FELDMAN, G.M.; FINBLOOM, D.S.; LARNER, A.C. Prolactin activates the interferon-regulated p91 transcription factor and the JAK2 kinase by tyrosine phosphorylation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 91: 7174-7178, 1994.
- DE FRONZO, R.A. Glucose intolerance of aging. **Diabetes Care**, 4: 493-513, 1984.
- DE GASPARO, M.; PICTET, R.L.; RALL, L.; RUTTER, W.J. Control of insulin secretion in the developing pancreatic rudiment. **Develop. Biol.**, 47: 106-122, 1975.
- DEVITO, W.J.; AVAKIAN, C.; STONE, S.; OKULICZ, W.C. Prolactin-stimulated mitogenesis in cultured astrocytes is mediated by a protein kinase C-dependent mechanism. **J. Neurochem.**, 60: 835-842, 1993.
- DI CARLO, R.; MUCCIOLO, G.; PAPOTTI, M.; BUSSOLATI, G. Characterization of prolactin receptor in human brain and chroid plexus. **Brain Res.**, 570: 341-346, 1992.
- DUDEK, R.W.; KAWABE, T; BRINN, J.E.; O'BRIEN, K.; POOLE, M.C.; MORGAN, C.R. Glucose affects "in vitro" maturation of fetal rat islets. **Endocrinology**, 114: 582-587, 1984.

- DUNNE, M.J. & PETERSEN, O.H. Intracellular ADP activates K^+ channels that are inhibited by ATP in an insulin-secreting cell line. **FEBS Lett.**, **208**: 59-62, 1986.
- DUSANTER-FOURT, I.; MULLER, O.; ZIEMIECKI, A.; MAYEUX, P.; DRUCKER, B.; DJIANE, J.; WILKS, A.; HARPUR, A.G.; FISCHER, S.; GISSELBRECHT, S. Identification of JAK protein tyrosine kinases as signaling molecules for prolactin: Functional analysis of prolactin receptor and prolactin: Erythropoietin receptor chimera expressed in lymphoid cells. **EMBO J.**, **13** (11): 2583-91, 1994.
- DUTT, A.; KAPLITT, M.G.; KOW, L.M.; PFAFF, D.W. Prolactin, central nervous system and behavior: a critical review. **Neuroendocrinology**, **59**: 413-419, 1994.
- ELAHI, D.; MULLER, D.C.; ANDERSEN, D.K.; TOBIN, J.D.; ANDRES, R. The effect of age and glucose concentration on insulin secretion by the isolated perfused rat pancreas. **Endocrinology**, **116**: 11-16, 1985.
- EPPLER, A. & BRINN, J.E. The comparative physiology of the pancreatic islets. In: Farne DS (ed) **Zoophysiology**. Springer-Verlag, New York, vol **21**: 47-65, 1987.
- ERWIN, R.A.; KIRKEN, R.A.; MALABARBA, M.G.; FARRAR, W.L.; RUI, H. Prolactin activates RAS via signalling proteins SHC, growth factor receptor bound 2 and son of sevenless. **Endocrinology**, **136**: 3512-3518, 1995.
- FINDLAY, I.; DUNNE, M.J.; ULLRICH, S.; WOLLHEIM, C.B.; PETERSEN, O.M. Quinine inhibits Ca^{2+} -independent K^+ channels whereas tetraethylammonium inhibits Ca^{2+} -activated K^+ channels in insulin-secreting cells. **FEBS Lett.**, **185**: 4-8, 1985.

- FISHER, D.A.; DUSSAULT, J.H.; SACK, J.; CHOPRA, I.J. Ontogenesis of hypothalamic-pituitary-thyroid function and metabolism in man, sheep and rat. **Recent Prog. Horm. Res.**, **33**: 59-116, 1977 apud BOSCHERO *et al.*, 1989.
- FLETCHER, D.J. & WAYS, D.K. Age-dependent expression of protein kinase C isoforms in rat islets. **Diabetes**, **40**: 1496-1503, 1991.
- FLIER, J.S.; MUECKLER, M.; MCCALL, A.L.; LODISH, H.F. Distribution of glucose transporter messenger RNA transcripts in tissue of rat and man. **J. Clin. Invest.**, **79**: 657-661, 1987.
- FOA, P.P.; BLÁZQUEZ, E.; SODOYEZ, J.-C.; SODOYEZ-GOFFAUX, F. The ontogeny of mammalian insular function. In: **The evolution of Pancreatic Islets**. Oxford: Pergamon, 1976, p. 7-19 apud RHOTEN, 1980.
- FOSTER, C.M.; SHAFER, J.A.; ROZSA, F.W.; WANG, X.; LEWIS, S.D.; RENKEN, D.A.; NATALE, J.E.; SCHWARTZ, J.; CARTER-SU, C. Growth hormone promoted tyrosyl phosphorylation of growth hormone receptors in murine 3T3 - F442A fibroblasts and adipocytes. **Biochemistry**, **27**: 326-334, 1988.
- FREEMARK, M.F.; KIRK, K.; PIHOKER, C.; ROBERTSON, M.; SHIU, R.; DRISCOLL, P. Pregnancy lactogens in the rat conceptus and fetus: circulating levels, distribution of binding and expression of receptor messenger RNA. **Endocrinology**, **133**: 1830-1842, 1993.
- FREEMARK, M.F.; NAGANO, M.; EDERY, M.; KELLY, P.A. Prolactin receptor gene expression in the fetal rat. **J. Endocrinol.**, **144**: 285-292, 1995.

- FREINKEL, N.; LEWIS, N.J.; JOHNSON, R.; HELLERSTROM, C. Maturation of stimulus recognition and insulin secretion during tissue culture of fetal pancreas islets. **Transactions of the American Clinical Climatology Association**. Waverly Press, Baltimore, vol 90: 86, 1978 apud DUDEK *et al.*, 1984.
- FREINKEL, N.; LEWIS, N.J.; JOHNSON, R.; SWENNE, I.; BONE, A.; HELLERSTROM, C. Differential effects of age versus glicemic stimulation on the maturation of insulin stimulus-secretion coupling during culture of fetal rat islets. **Diabetes**, **33**: 1028-1038, 1984.
- FU, X.Y. & ZHANG, J.J. Transcription factor p 91 interacts with the epidermal growth factor receptor and mediates activation of the *c-fos* gene promoter. **Cell**, **74**: 1135-1145, 1993.
- FUJII, H.; NAKAGAWA, Y.; SCHINDLER, U.; KAWAHARA, A.; MORI, H.; GOUILLEUX, F.; GRONER, B.; IHLE, J.N.; MINAMI, Y.; MIYAZAKI, T.; TANIGUCHI, T. Activation of Stat5 by interleukin 2 requires a carboxyl terminal region of the interleukin 2 receptor β chain but is not essencial for the proliferative signal transmission. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **92**: 5482-5486, 1995.
- FUKUMOTO, H.; SEINO, S.; IMURA, H.; SEINO, Y.; BELL, G.I. Characterization and expression of human HepG2/erythrocyte glucose-transporter gene. **Diabetes**, **37**: 657-661, 1988.
- GAGNERAULT, M.C.; TOURAINE, P.; SAVINO, W.; KELLY, P.A.; DARDENNE, M. Expression of prolactin receptors in murine lymphoid cells in normal and autoimmune situations. **J. Immunol.**, **150**: 5673-5681, 1993.

- GILON, P. & HENQUIN, J.C. Activation of muscarinic receptors increases the concentration of free Na⁺ in mouse pancreatic B-cells. **FEBS Lett.** **315**: 353-356, 1993.
- GIRARD, J.R.; KERVRAN, A.; SOUFFLET, E.; ASSAN, R. Factors affecting the secretion of insulin and glucagon by the rat fetus. **Diabetes**, **23**: 310-317, 1974.
- GIROIX, M.H.; BAETENS, D.; RASSCHAERT, J.; LECLERCQ-MEYER, V.; SENER, A.; PORTHA, B.; MALAISSE, W.J. Enzymic and metabolic anomalies in islets of diabetic rats: relationship to B cell mass. **Endocrinology**, **130** (5): 2634-2640, 1992a.
- GIROIX, M.H.; RASSCHAERT, J.; BAILBE, D.; LECLERCQ-MEYER, V.; SENER, A.; PORTHA, B.; MALAISSE, W.J. Impairment of glycerol phosphate shuttle in islets from rats with diabetes induced by neonatal streptozotocin. **Diabetes**, **40**: 227-232, 1991.
- GIROIX, M.H.; RASSCHAERT, J.; SENER, A.; LECLERCQ-MEYER, V.; BAILBE, D.; PORTHA, B.; MALAISSE, W.J. Study of hexose transport, glycerol phosphate shuttle and Krebs cycle in islets of adult rats injected with streptozotocin during the neonatal period. **Mol. Cell. Endocrinol.**, **83** (2): 95-104, 1992b.
- GOUILLEUX, F.; WAKAO, H.; MUNDT, M.; GRONER, B. Prolactin induces phosphorylation of Tyr694 of STAT5 (MGF), a prerequisite for DNA binding and induction of transcription. **EMBO J.**, **13**: 4361-4369, 1994.
- GOUT, P.W.; BEER, C.T.; NOBLE, R.L. Prolactin-stimulated growth of cell cultures established from malignant Nb rat lymphomas. **Cancer Res.**, **40**: 2433-2436, 1980.

- GRASSO, S.; MESSINA, A.; DISTEFANO, G.; VIGO, R.; REITANO, G. Insulin secretion in the premature infant. Response to glucose and amino acids. **Diabetes**, **22**: 349-353, 1973.
- GRASSO, S.; SAPORITO, N.; MESSINA, A.; REITANO, G. Serum insulin response to glucose and amino acids in the premature infant. **Lancet**, **ii**: 755-756, 1968 apud GRASSO *et al.*, 1973.
- GREEN, I.C. & TAYLOR, K.W. Effects of pregnancy in the rat on the size and insulin secretory response of the islets of Langerhans. **J. Endocrinol.**, **54**: 317-325, 1972.
- GREEN, I.C.; HOWELL, S.L.; MONTAGUE, W.; TAYLOR, K.W. Regulation of insulin release from isolated islets of Langerhans of the rat in pregnancy. **Biochem. J.**, **134**: 481-487, 1973.
- GREEN, I.C.; PERRIN, D.; HOWELL, S.L. Insulin release in isolated islets of Langerhans of pregnant rats; relationship between glucose metabolism and cyclic AMP. **Horm. Metab. Res.**, **10**: 32-35, 1978.
- GRILL, V.; ASPLUND, C.; HELLERSTROM, C.; CERASI, E. Decreased cyclic AMP and insulin response to glucose in isolated islets of neonatal rats. **Diabetes**, **24**: 746-752, 1975.
- GRILL, V.; LAKE, W.; FREINKEL, N. Generalized diminution in the response to nutrients as insulin-releasing agents during the early neonatal period in the rat. **Diabetologia**, **30**: 56-63, 1981.
- GRONER, B.; ALTIK, S.; MEIER, V. Hormonal regulation of transcription factor activity in mammary epithelial cells. **Mol. Cell. Endocrinol.**, **100**: 109-114, 1994.

- GU, Y.; JAYATILAK, P.G.; PARMER, T.G.; GAULDIE, J.; FEY, G.H.; GIBORI, G. Alpha-2 macroglobulin expression in the mesometrial decidua and its regulation by decidual luteotropin and prolactin. **Endocrinology**, **131**: 1321-1328, 1992.
- GUYETTE, W.; MATUSIK, R.; ROSEN, J. Prolactin-mediated transcriptional and post-transcriptional control of casein gene expression. **Cell**, **17**: 1013-1023, 1979.
- HACKETT, R.L.; WANG, YI-D; LARNER, A.C. Mapping of the cytoplasmic domain of the human growth hormone receptor required for the activation of JAK2 and STAT proteins. **J. Biol. Chem.**, **270**: 21326-21330, 1995.
- HANDWERGER, S. The physiology of placental lactogen in human pregnancy. **Endocr. Rev.**, **12**: 329-336, 1993.
- HANKS, J.H. & WALLACE, R.F. Relation of oxygen and temperature in preservation of tissues by refrigeration. **Proc. Soc. Exper. Med.**, **71**: 200-201, 1949 apud HERCHUELZ, 1980.
- HARRISON, D.E.; ASHCROFT, S.J.H.; CHRISTIE, M.R.; LORD, J.M. Protein phosphorylation in the pancreatic B-cell. **Experientia**, **40**: 1055-1084, 1984.
- HASTY, D.L. & MURREL, L.R. Development of glucose-mediated insulin release response in organ cultured rat pancreas. **Biol. Neonate**, **34**: 32-39, 1978.
- HEIM, M.H.; KERR, I.M.; STARK, G.R.; DARNELL JR, J.E. Contribution of STAT SH2 groups to specific interferon signaling by the JAK-STAT pathway. **Science**, **267**: 1347-1349, 1995.
- HEINZE, E. & STEINKE, J. Glucose metabolism of isolated pancreatic islets: difference between fetal, newborn and adult rats. **Endocrinology**, **88**: 1259-1263, 1971.

- HEINZE, E. & STEINKE, J. Insulin secretion during development: response of isolated pancreatic islets of fetal, newborn and adult rats to theophylline and arginine. **Horm. Metab. Res.**, **4**: 234-236, 1972.
- HEINZE, E.; SCHATZ, H.; NIERLE, C.; PFEIFFER, E.F. Insulin biosynthesis in isolated pancreatic islets of fetal and newborn rats. **Diabetes**, **24**: 373-377, 1975.
- HELLERSTROM, C.; LEWIS, N.; BORG, H.; JOHNSON, R.; FREINKEL, N. Method for large scale isolation of pancreatic islets by tissue culture of fetal rat pancreas. **Diabetes**, **28**: 769-776, 1979.
- HELLERSTROM, C. & SWENNE, I. Functional maturation and proliferation of fetal pancreatic β -cells. **Diabetes**, **40** (2): 89-93, 1991.
- HELLERSTROM, C.; LEWIS, N.J.; JOHNSON, R.; FREINKEL, N. Maturation of insulin release and phosphate metabolism in fetal rat islets maintained in tissue culture. **Diabetes**, **27** (suppl. 2): 456, 1978.
- HELLMAN, B. The islets of Langerhans in the rat during pregnancy and lactation, with special reference to the changes in the B/A cell ratio. **Acta Obstet. Gynecol. Scand.**, **39**: 331-342, 1960.
- HELLMAN, B.; SEHLIN, J.; TALJEDAL, I.B. Evidence for mediated transport of glucose in mammalian pancreatic β -cells. **Biochem. Biophys. Acta**, **241**: 147-154, 1971.
- HELLMAN, B.; SEHLIN, J.; TALJEDAL, I.B. Effects of glucose on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake by pancreatic islets as studied with the lanthanum method. **J. Physiol.**, **254**: 639-656, 1976.

- HENQUIN, J.C. & MEISSNER, H.P. Significance of ionic fluxes and changes in membrana potential for stimulus-secretion coupling in pancreatic B-cells. **Experientia**, **40**: 1043-1052, 1984.
- HERBERT, V.; LAU, K.S.; GOTTLIER, C.M.; BLEICHER, S.J. Coated-charcoal immunoassay of insulin. **J. Clin. Endocrinol.**, **25**: 1375-1384, 1965.
- HERCHUELZ, A. **Regulation des flux calciques dans les ilots des Langerhans**. Bruxelles, 1980, 336 p. [Tese - Univ. Libre de Bruxelles].
- HILL, D.J.; FREEMARK, M.; STRAIN, A.J.; HANDWERGER, S.; MILNER, R.D.G. Placental lactogen and growth hormone receptors in human fetal tissues: relationship to fetal plasma human placental lactogen concentrations and fetal growth. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **66**: 1283-1290, 1988.
- HILL, R.S. & RHOTEN, W.B. Differential effects of microtubule-altering agents on β -cells during development. **Am. J. Physiol.**, **245** (8): E391-E400, 1983.
- HOLE, R.L.; PIAN-SMITH, M.C.M.; SHARP, G.W.G. Development of biphasic response to glucose in fetal and neonatal rat pancreas. **Am J. Physiol.**, **254**: 167E-174E, 1988.
- HORROBIN, D.F. Prolactin as a regulator of fluid and electrolyte metabolism in mammals. **Federat. Proc.**, **39**: 2567-2570, 1980.
- HORROBIN, D.F.; LLOYD, I.J.; LIPTON, A.; BURSTYN, P.G.; DURKIN, N.; MUIRURI, K.L. Actions of prolactin on human renal function. **Lancet**, **ii**: 352-354, 1971.

- HORSEMAN, N.D. & YU-LEE, L.Y. Transcriptional regulation by the helix bundle peptide hormones: growth hormone, prolactin, and hematopoietic cytokines. **Endocr. Rev.**, **15**: 627-649, 1994.
- HOU, J.; SCHINDLER, U.; HENZEL, W.J.; HO, T.C.; BRASSEUR, M.; MCKNIGHT, S.L. An interleukin-4-induced transcription factor: IL-4 Stat. **Science**, **265**: 1701-1706, 1994.
- HOWELL, S.L. & TYHURST, M. Insulin secretion: the effector system. **Experientia**, **40**: 1098-1105, 1984.
- HUGHES, J.P.; ELSHOLTZ, H.P.; FRIESEN, H.G. Growth hormone and prolactin receptors. In: **Polypeptide Hormone Receptors**. Ed. Posner, B.I., Marcel Dekler, NY, 1985, pp. 157-199 apud Kelly, 1990.
- HUGHES, S.J.; CHALK, J.G.; ASCROFT, S.J.H. The role of cytoplasmic free Ca^{2+} and protein kinase C in acetylcholine-induced insulin release in the clonal B-cell line, HIT-T15. **Biochem. J.**, **267**: 227-232, 1990.
- HUTTON, J.C. Secretory granules. **Experientia**, **40**: 1091-1098, 1984.
- HWANG, P.; GUYDA, H.; FRIESEN, H. Purification of human prolactin. **J. Biol. Chem.**, **247**: 1955-1958, 1972.
- IHLE, J.N.; WITTHUHN, B.A.; QELLE, F.W.; YAMAMOTO, K.; THIERFELDER, W.E.; KREIDER, B.; SILVENNOINEM, O. Signaling by the cytokine receptor superfamily: Jaks and Stats. **Trends Biochem. Sci.**, **19**: 222-227, 1994.
- INOUE, M. & YOSHII, M. Modulation of ion channels by somatostatin and acetylcholine. **Prog. Neurobiol.**, **38**: 203-230, 1992.

- IOSHIMURA, A. & LODISH, H.F. In vitro phosphorylation of the erythropoietin receptor and an associated protein, pp 130. **Mol. Cell. Biol.**, **12** (2): 706-715, 1992.
- JOHNSON, J.H.; NEWGARD, C.B.; MILBURN, J.L.; LODISH, H.F.; THORENS, B. The high Km glucose transporter of islets of Langerhans is functionally similar to the low affinity transporter of liver and has an identical primary sequence. **J. Biol. Chem.**, **265**: 6548-6551, 1990.
- KAHN, S.E. & PORTE, D.J. Islet dysfunction in noninsulin-dependent diabetes mellitus. **Am. J. Med.**, **85** (Suppl. 5A): 4-8, 1988.
- KELLY, P.A. Growth hormone and prolactin. In: **Hormones from molecules to disease**. Ed. BAULIEU, E. & KELLY, P.A. Hermann Publishers in Arts and Science, Chapman and Hall, NY, London, 1990, p. 191-217.
- KELLY, P.A.; ALI, S.; ROZAKI, M.; GOUJON, L.; NAGANO, M.; PELLEGRINI, I.; GOULD, D.; DJIANE, J.; EDERY, M.; FINNIDORE, J. The growth hormone/prolactin receptor family. **Recent Progr. Horm. Res.**, **48**: 123-164, 1993.
- KELLY, P.A.; DJIANE, I.; POSTEL-VINAY, M.C.; EDERY, M. The prolactin/growth hormone receptor family. **Endocr. Rev.**, **12**: 235-251, 1991.
- KERVAN, A. & GIRARD, J.R. Glucose-induced increase of plasma insulin in the rat foetus in utero. **J. Endocrinol.**, **62**: 545-551, 1974.
- KERVAN, A. & GIRARD, J.R. Time course of a glucose-induced increase in plasma insulin in the rat foetus in utero. **J. Endocrinol.**, **70**: 519-520, 1976.

- KERVAN, A. & RANDON, J. Development of insulin release by fetal rat pancreas *in vitro*: effects of glucose, amino acids, and theophylline. **Diabetes**, **29**: 673-678, 1980.
- KERVAN, A.; RANDON, J.; GIRARD, J.R. Dynamics of glucose-induced insulin release by fetal rat pancreas *in vitro*: potentiating effect of amino acids. **Diabetologia**, **13**: 408, 1977.
- KERVAN, A.; RANDON, J.; GIRARD, J.R. Dynamics of glucose-induced plasma insulin increase in the rat fetus at different stages of gestation. Effects of maternal hypothermia and fetal decapitation. **Biol. Neonate**, **35**: 242-248, 1979.
- KHAN, A.; CHANDRAMOULI, V.; OSTENSON, C.-G.; AHREN, B.; SCHUMANN, W.E.; LOW, H.; LANDAU, B.R.; EFFENDIC, S. Evidence for the presence of glucose cycling in pancreatic islets of the ob/ob mouse. **J. Biol. Chem.**, **264**: 9732-9733, 1989.
- KHAN, A.; CHANDRAMOULI, V.; OSTENSON, C.-G.; LOW, H.; LANDAU, B.R.; EFFENDIC, S. Glucose cycling in islets from healthy and diabetic rats. **Diabetes**, **39**: 456-459, 1990.
- KHORRAM, O.; DEPALATIS, L.R.; MCCANN, S.M. Hypothalamic control of prolactin secretion during the perinatal period in the rat. **Endocrinology**, **115** (5): 1698-1704, 1984.
- KIKUCHI, M.; RABINOVITCH, A.; BLACKARD, W.G.; RENOLD, A.E. Perfusion of pancreas fragments: a system for the study of dynamics aspects of insulin secretion. **Diabetes**, **23**: 550-559, 1974.

- KING, K.C.; BUTT, J.; RAIVIO, K.; RAIHA, N.; ROUX, J.; TERAMO, K.; YAMAGUCHI, K.; SCHWARTZ, R. Human maternal and fetal insulin response to arginine. **New Engl. J. Med.**, **285**: 603-607, 1971.
- KIRKEN, R.A.; RUI, H.; MALABARBA, M.G.; HOWARD, O.M.Z.; KAWAMURA, M.; O'SHEA, J.J.; FARRAR, W.L. Activation of JAK3, but not JAK1, is critical for IL2-induced proliferation and STAT5 recruitment by a COOH-terminal region of the IL2 receptor β -chain. **Cytokine**, **7**: 689-700, 1995.
- KREBS, H.A. & HENSELEIT, K. Untersuchungen uber die Hanstoffbildung im Tierkoper. Hoppe-Seyler's Z. **Physiol.-Chem.**, **210**: 33-66, 1932 apud HERCHUELZ, 1980.
- KRISHNAMRA, N.; THUMCHAI, R.; LIMLOMWONGSE, L. Acute effect of prolactin on the intestinal calcium absorption in normal, pregnant and lactating rats. **Bone and Mineral**, **11**: 31-41, 1990.
- LACY, P.E. & KOSTIANOVSKY, M. Method for isolation of the intact islet of Langerhans from the rat pancreas. **Diabetes**, **16**: 35-39, 1967.
- LAMBERT, A.E. **Biochemical and morphological studies of cultured fetal rat pancreas**. Thesis, Univ. of Geneva, Switzerland, and Univ. of Louvain, Belgium, 1970 apud SODOYEZ-GOFFAUX *et al.*, 1979.
- LAMBERT, A.E.; KANAZAWA, Y.; BURR, I.; ORCY, L.; RENOLD, A.E. On the role of cyclic AMP in insulin release. I. Overall affects in cultured fetal rat pancreas. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, **185**: 232-244, 1971.

- LARNER, A.C. & FINBLOOM, D.S. Protein tyrosine phosphorylation as a mechanism which regulates cytokine activation of early response genes. **Biochem. Biophys. Acta**, **1266**: 278-287, 1995.
- LARNER, A.C.; DAVID, M.; FELDMAN, G.M.; IGARASHI, K.I.; HACKETT, R.H.; WEBB, D.S.A.; SWEITZER, S.M.; PETRICON, E.F; FINBLOOM, D.S. Tyrosine phosphorylation of DNA binding proteins by multiple cytokines. **Science**, **261**: 1730-1733, 1993.
- LEAHY, J.L. Natural history of β -cell dysfunction in NIDDM. **Diabetes Care**, **13**: 992-1010, 1990.
- LEBRUN, J.J.; ALI, S.; GOFFIN, V.; ULLRICH, A.; KELLY, P.A. A single phosphotyrosine residue of the prolactin receptor is responsible for activation of gene transcription. **Biochemistry**, **92**: 4031-4035, 1995a.
- LEBRUN, J.J.; ALI, S.; SOFER, L.; ULLRICH, A.; KELLY, P.A. Prolactin-induced proliferation of Nb2 cells involves tyrosine phosphorylation of the prolactin receptor and its associated tyrosine kinase JAK2. **J. Biol. Chem.**, **269**: 14021-14026, 1994.
- LEBRUN, J.J.; ALI, S.; ULLRICH, A.; KELLY, P.A. Proline-rich sequence-mediated Jak2 association to the prolactin receptor is required but not sufficient for signal transduction. **J. Biol. Chem.**, **270**: 10664-10670, 1995b.
- LENZEN, S. Nutrient regulation of insulin secretion. **Biochemical Society**, 101-124, 1992.
- LENZEN, S. & PANTEN, U. Signal recognition by pancreatic B-cells. **Biochem. Pharmacol.**, **37** (3): 371-378, 1988.

- LEONG, D.A.; FRAWLEY, S.; NEILL, J.D. Neuroendocrine control of prolactin secretion. **Ann. Rev. Physiol.**, **45**: 109-127, 1983.
- LESUEUR, L.; EDERY, M.; ALI, S.; PALY, J; KELLY, P.A.; DJIANE, J. Comparison of long and short forms of the PRL receptor on PRL induced milk protein gene transcription. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **88**: 824-828, 1991.
- LEUNG, S.; QURESHI, S.A.; KERR, I.M.; DARNELL Jr, J.E.; STARK, G.R. Role of STAT2 in the alpha interferon signaling pathway. **Mol. Cell. Biol.**, **15**: 1312-1317, 1995.
- LEWIS, U.J.; SINGH, R.N.P.; SINHA, Y.N.; VANDERLAAN, W.P. Electrophoretic evidence for human prolactin. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **33**: 153-156, 1971.
- LOCHNAN, H.A.; BUTEAU, H.; RICHARDS, S.; EDERY, M.; KELLY, P.A. Functional activity of the human prolactin receptor and its ligands. **Mol. Cell. Endocrinol.**, **114**: 91-99, 1995.
- LUTTICKEN, C.; WEGENKA, U.M.; YUAN, J.; BUSHMANN, J.; SCHINDLER, C.; ZIEMIECKI, A.; HARPUR, A.G.; WILKS, A.F.; YASUKAWA, K.; TAGA, T.; KISHIMOTO, T.; BARBIERI, G.; PELLEGRINI, S.; SENDTNER, M.; HEINREICH, P.C.; HORN, F. Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp 130. **Science**, **263**: 89-92, 1994.
- MAINOYA, J.R. Effects of bovine growth hormone, human placental lactogen and ovine prolactin on intestinal fluid and ion transport in the rat. **Endocrinology**, **96**: 1165-1170, 1975.

- MALAISSSE, W.J. & BOSCHERO, A.C. Calcium antagonists and islets function. XI. Effect of nifedipine. **Hormone Res.**, **8**: 203-209, 1977.
- MALAISSSE, W.J.; HERCHUELZ, A.; DEVIS, G.; SOMERS, G.; BOSCHERO, A.C.; HUTTON, J.C.; KAWAZU, S.; SENER, A.; ATWATER, I.J.; DUNCAN, G.; RIBALET, B.; ROJAS, G. Regulation of calcium fluxes and their regulatory roles in pancreatic islets. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, **307**: 562-581, 1978.
- MALAISSSE, W.J.; MALAISSSE-LAGAE, F.; SENER, A. Coupling factors in nutrient-induced insulin release. **Experientia**, **40**: 1035-1043, 1984.
- MANEATIS, T.; CONDIE, R.; REAVEN, G. Effect of age on plasma glucose and insulin responses to a test mixed meal. **J. Am. Geriatr. Soc.**, **30**: 178-182, 1982.
- MANNI, A.; WRIGHT, C.; DAVIS, G.; GLENN, J.; JOEHL, R.; FEIL, P. Promotion by prolactin of the growth of human breast neoplasms cultured in vitro in the soft agar clonogenic assay. **Cancer Res.**, **46** (4): 1669-1672, 1986.
- MANSOUR, S.J.; MATTEN, W.T.; HERMANN, A.S.; CANDIA, J.M.; RONG, S.; FUKASAWA, K.; VANDE, W.G.H.; AHN, N.G. Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase. **Science**, **265**: 966-970, 1994.
- MARKOFF, E.; BEATTIE, G.E.; PAGE, E. Effects of prolactin and glycosylated prolactin on (pro) insulin synthesis and insulin release from culture rat pancreatic islets. **Pancreas**, **5**: 99-103, 1990.
- MARTIN, R.J.; RAMSAY, T.G.; HARRIS, B.S. Central role of insulin in growth and development. **Domest. Anim. Endocrinol.**, **1**: 89-104, 1984.

- MAZANCOURT, P.; CARNEIRO, E.M.; ATWATER, I.; BOSCHERO, A.C. Prolactin treatment increases GLUT2 but not the G protein subunit content in cell membranes from cultured neonatal rat islets **FEBS Lett.**, **343**: 137-140, 1994.
- MEGLASSON, M.D. & MATSCHINSKY, F.M. Pancreatic islet glucose metabolism and regulation of insulin secretion. **Diabetes Metab. Rev.**, **2**: 163-214, 1986.
- MERSHON, J.; SALL, W.; MITCHNER, N.; BEN-JONATHAN, N. Prolactin is a local growth factor in rat mammary tumors. **Endocrinology**, **136**: 3619-3623, 1995.
- MICHAELS, J.D.; SORENSON, R.L.; PARSONS, J.A.; SHERIDAN, J.D. Prolactin enhances cell-to-cell communication among B-cells. **Diabetes**, **36**: 1098-1103, 1987.
- MILLER, W.L. & EBERHARDT, N.L. Structure and evolution of the growth hormone gene family. **Endocrine Rev.**, **4**: 97-130, 1983.
- MILNER, R.D.G.; ASHWORTH, M.A.; BARSON, A.J. Insulin release from human foetal pancreas in response to glucose, leucine and arginine. **J. Endocr.**, **52**: 497-505, 1972.
- MISLER, S.; FALKE, L.C.; GILLIS, K.; MCDANIEL, M.L. A metabolite-regulated potassium channel in rat pancreatic B cells. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **83**: 7119-7123, 1986.
- MOLDRUP, A.; BILLESTRUP, N.; NIELSEN, J.H. Rat insulinoma cells express both a 115 kDa growth related to the hepatic receptors. **J. Biol. Chem.**, **265**: 8686-8690, 1990.

MOLDRUP, A.; BILLESTRUP, N.; THORN, N.; LERNMARK, A.; NIELSEN, J.H.

Multiple growth hormone-binding proteins are expressed on insulin-producing cells.

Mol. Endocrinol., **3**: 1173-1182, 1989.

MOLDRUP, A.; PETERSON, E.D.; NIELSEN, J.H. Effects of sex and pregnancy

hormones on growth hormone and prolactin receptor gene expression in insulin-

producing cells. **Endocrinology**, **133**: 1165-1172, 1993.

MOURMEAUX, J.C.; REMACLE, C.; HENQUIN, J.C. Effects of stimulation of

adenilato cyclase and protein kinase C on cultured fetal β -cells. **Endocrinology**, **125**:

2636-2644, 1989.

MOURMEAUX, J.C.; REMACLE, C.; HENQUIN, J.C. Morphological and functional

characteristics of islets neoformed during tissue culture of fetal rat pancreas. **Mol.**

Cell. Endocrinol., **39**: 237-246, 1985.

MUECKLER, M. Family of glucose-transporter genes. Implications for glucose

homeostasis and diabetes. **Diabetes**, **39**: 6-11, 1990.

MUI, A.L.; WAKAO, H.; O'FARRELL, A.M.; HARADA, N.; MIYAJIMA, A.

Interleukin-3, granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin-5

transduce signals through two STAT5 homologs. **EMBO J.**, **14**: 1166-1175, 1995.

MUKHERJEE, P.; MASTRO, A.M.; HYMER, W.C. Prolactin induction of interleukin-2

receptors on rat splenic lymphocytes. **Endocrinology**, **126**: 88-94, 1990.

- MURAKAMI, M.; NARAZAKI, M.; HIBI, M.; YAWATA, H.; YASUKAWA, K.; HAMAGUCHI, M.; TAGA, T.; KISHIMOTO, T. Critical cytoplasmic region of the interleukin 6 signal transducer gp 130 is conserved in the cytokine receptor family. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **88**: 11349-11353, 1991.
- MURPHY, W.J. RUI, H.; LONGO, D.L. Effects of growth hormone and prolactin in immune development and function. **Life Sci.**, **57**: 1-14, 1995.
- NAGANO, M.; CHASTRE, E.; CHOQUET, A.; BARA, J.; GESPACH, C.; KELLY, P.A. Expression of prolactin and growth hormone receptor genes and their isoforms in the gastrointestinal tract. **Am. J. Physiol.**, **31**: G431-G442, 1995.
- NAKAMURA, A.; SHIRAI, T.; OGAWA, K.; WADA, S.; FUJIMOTO, N.A.; ITO, A.; ITO, N. Promoting action of prolactin released from a grafted transplantable pituitary tumor (MtT/F84) on rat prostate carcinogenesis. **Cancer Lett.**, **53**: 151-157, 1990.
- NIAL, H.D.; HOGAN, M.L.; SAYER, R.; ROSENBLUM, I.Y.; GREENWOOD, F.C. Sequences of pituitary and placental lactogenic and growth hormones. Evolution from a primordial peptide by gene duplication. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **68**: 866-869, 1971.
- NICOLL, C.S. & BERN, H.A. On the actions of prolactin among the vertebrates; is there a common denominator? In: **Lactogenic Hormones**. Eds Wolstenholme, G. E. W. & Knight, J., Churchill-Livingstone, London, 1972, pp 299-317 apud Kelly, 1990.
- NICOLL, C.S. Ontogeny and evolution of prolactin's functions. **Fed Proc**, **39**: 2563-2566, 1980.

- NIELSEN, J.H. Effects of growth hormone, prolactin, and placental lactogen on insulin content and release, and deoxyribonucleic acid synthesis in cultured pancreatic islets. **Endocrinology**, **110** (2): 600-606, 1982.
- NIELSEN, J.H.; NIELSEN, V.; PEDERSEN, L.M.; DECKERT, T. Effects of pregnancy hormones on pancreatic islets in organ culture. **Acta Endocrinol.**, **111**: 336-341, 1986.
- OBENSHAIN, S.E.; ADAM, P.A.J.; KING, K.C.; TERAMO, K.; RAIVIO, K.O.; RAIHA, N.; SCHWARTZ, R. Human fetal insulin response to sustained maternal hyperglycemia. **N. Engl. J. Med.**, **283**: 566, 1970.
- OTONKOSKI, T.; ANDERSSON, S.; KNIP, M.; SIMELL, O. Maturation of insulin response to glucose during human fetal and neonatal development. Studies with perfusion of pancreatic islet like cell clusters. **Diabetes**, **37**: 286-291, 1988.
- PARSONS, J.A.; BARTKE, A.; SORENSON, R.L. Number and size of islets of Langerhans in pregnant, human growth hormone-expressing transgenic, and pituitary dwarf mice: Effect of lactogenic hormones. **Endocrinology**, **136**: 2013-2021, 1995.
- PARSONS, J.A.; BRELJE, T.C.; SORENSON, R.L. Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: increased islets cell proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion. **Endocrinology**, **130**: 1459-1466, 1992.
- PELEGRINI, I. LEBRUN, J.J.; ALI, S.; KELLY, P.A. Expression of prolactin and its receptor in human lymphoid cells. **Mol. Endocrinol.**, **6**: 1023-1031, 1992.
- PEPE, G.J. & ALBRECHT, E.D. Regulation of the primate fetal adrenal cortex. **Endocr. Rev.**, **11**: 151-176, 1990.

- PERFETTI, R.; RAFIZADEH, C.M.; LIOTTA, A.S.; EGAN, J.M. Age-dependent reduction in insulin secretion and insulin mRNA in isolated islets from rats. **Am. J. Physiol.**, **269**: (32) E-983-E990, 1995.
- PETERSON, C.M.; MILLER, N.; WALKER, L.; FORMBY, B. Effect of glipizide on insulin secretion from cultured human fetal pancreatic islets. **Diabetes Care**, **9**: 556-557, 1986.
- PHELPS, R.L.; FREINKEL, N.; RUBINSTEIN, A.H.; KUZUNGA, H.; METZGER, B.; BOEHM, J.J.; MOLSTED-PEDERSEN, L. Carbohydrate metabolism in pregnancy. XV. Plasma C-peptide during intravenous glucose tolerance in neonates from normal and insulin treated diabetic mothers. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **46**: 61-68, 1978.
- PHILLIPS, J.J. Dye exclusion tests for cell viability. In **Tissue Culture**, ed. KRUSE JR, P.F. & PATTERSON JR, M.K., pp. 407-408, New York: Academic Press, 1973 apud AMMON *et al.*, 1985.
- POLAK, M.; SCHARFMANN, R.; BAN, E.; HAOUR, F.; POSTEL-VINAY, M.C.; CZERNICHOW, P. Demonstration of lactogenic receptors in rat endocrine pancreata by quantitative autoradiography. **Diabetes**, **39**: 1045-1049, 1990.
- PORTHA, B. Decreased glucose-induced insulin release and biosynthesis by islets of rats with non-insulin-dependent diabetes: effect of tissue culture. **Endocrinology**, **117**: 1735-1741, 1985.
- PORTHA, B.; GIROIX, M-H; SERRADAS, P.; WELSH, N.; CLAES, H.; SENER, A.; MALAISSE, W.J. Insulin production and glucose metabolism in isolated pancreatic islets of rats with NIDDM. **Diabetes**, **37**: 1226-1233, 1988.

- PRENTKI, M.; BIDEN, T.J.; JANJIC, D.; IRVINE, R.F.; BERRIDGE, M.J.; WOLLHEIM, C.B. Rapid mobilization of Ca^{2+} from rat insulinoma microsomes by inositol-1,4,5-triphosphate. **Nature**, **309**: 562-564, 1984.
- PRENTKY, M. & WOLLHEIM, C.B. Cytosolic free Ca^{2+} in insulin secreting cells and its regulation by isolated organelles. **Experientia**, **40**: 1053-1060, 1984.
- PRONINA, T.S. & SAPRONOVA, A.Y. Development of the function of endocrine pancreas in the human fetus. In: **The Evolution of Pancreatic Islets**. GRILLO, T.A.I.; LEIBSON, L.; EPPLE, A., Eds. Oxford: Pergamon, 1976. p. 25-35 apud RHOTEN, 1980.
- RAMSEY, D.H. & BERN, H.A. Stimulation by ovine prolactin of fluid transfer in everted sacs of rat small intestine. **J. Endocrinol.**, **53**: 435-459, 1972.
- RANDON, J. & KERVRAN, A. Cinetique du la secretion d'insuline en réponse au glucose par les ilots de Langerhans isolés de foetus de rat. **C. R. Acad. Sci. Paris**, **288**: 1567-1570, 1979.
- RASTOGUI, G.K.; LETARTE, J.; FRASER, T.R. Immuno-reactive insulin content of 203 pancreases from foetuses of healthy mothers. **Diabetologia**, **6**: 445, 1970 apud GRASSO *et al.* 1973.
- REAVEN, E.P.; CURRY, D.L.; REAVEN, G.M. Effect of age and sex on rat endocrine pancreas. **Diabetes**, **36**: 1397-1400, 1987.
- RHOTEN, W.B. Insulin secretory dynamics during development of rat pancreas. **Am. J. Physiol.**, **239**: E57-E63, 1980.

- RIDDLE, O.; BATES, R.W.; DYKSHORN, S.W. A new hormone of the anterior pituitary. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, **29**: 1211-1212, 1932 apud KELLY, 1990.
- ROBINSON, C.J.; SPANOS, E.; JAMES, F.; PIKE, J.W.; HAUSSLER, M.R.; MAKEEN, A.M.; HILLYARD, C.J.; MACINTYRE, I. Role of prolactin in vitamin D metabolism and calcium absorption during lactation in the rat. **J. Endocrinol.**, **94**: 443-453, 1982.
- ROJAS, E.; CARROLL, B.P.; RICORDI, C.; BOSCHERO, A.C.; STOJILKOVIC, S.S.; ATWATER, I. Control of cytosolic free-calcium in cultured human pancreatic β -cells occurs by external calcium-dependent and independent mechanisms. **Endocrinology**, **134**: 1771-1781, 1994.
- RORSMAN, P. & TRUBE, G. Glucose dependent K^+ -channels in pancreatic β -cells are regulated by intracellular ATP. **Pflugers Arch.**, **405**: 305-309, 1985.
- RORSMAN, P.A.; ARKHAMMAR, P.; BOKVIST, K.; HELLERSTROM, C.; NILSSON, T.; WELSH, M.; WELSH, N.; BERGGREN, P.O. Failure of glucose to elicit a normal secretory response in fetal pancreatic beta cells results from glucose insensitivity of the ATP-regulated K^+ channels. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **86**: 4505-4509, 1989.
- ROYSTER, M.; DRISCOLL, P.; KELLY, P.A.; FREEMARK, M. The prolactin receptor in the fetal rat: cellular localization of messenger ribonucleic acid, immunoreactive protein, and ligand-binding activity and induction of expression in late gestation. **Endocrinology**, **136**: 3892-3900, 1995.

- RUFF-JAMISON, S.; CHEN, K.; COHEN, S. Induction by EGF and interferon- γ of tyrosine phosphorylated DNA binding proteins in mouse liver nuclei. **Science**, **161**: 1733-1736, 1993.
- RUI, H.; KIRKEN, R.A.; FARRAR, W.L. Activation of receptor-associated tyrosine kinase JAK2 by prolactin. **J. Biol. Chem.**, **269**: 5364-5368, 1994.
- RUSSEL, D.H. New aspects of prolactin and immunity: a lymphocyte-derived prolactin-like product and nuclear protein kinase C activation. **Trends Pharmacol. Sci.**, **10**: 40-44, 1989.
- SADOWSKI, H.B.; SHUAI, K.; DARNELL, J.E.; GILMAN, M.Z. A common nuclear signal transduction pathway activated by growth factor and cytokine receptors. **Science**, **261**: 1739-1744, 1993.
- SAEZ, J.C.; BERTHOUD, V.M.; KADLE, R.; TRAUB, O.; NICHOLSON, B.J.; BENNET, M.V.L.; DERMIETZEL, R. Pinealocytes in rats: connexin identification and increase in coupling caused by norepinephrine. **Brain Res.**, **568**: 265-275, 1991.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning - A laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2^o ed, vol 3, cap 18, p 18.2-18.88, 1989.
- SANTOS, R.M. & ROJAS, E. Muscarinic receptor modulation of glucose-induced electrical activity in mouse pancreatic B-cells. **FEBS Lett.**, **249**: 411-417, 1989.
- SCHWARTZ, J.-L.; MEALING, G.A.R.; WHITFIELD, J.F.; BRAATEN, J.T. Long-term culture of neonatal rat pancreatic endocrine cells as model for insulin-secretion and ion-channel studies. **Diabetes**, **39**: 1353-1360, 1990.

- SCOTT, A.M.; ATWATER, I.; ROJAS, E. A method for the simultaneous measurement of insulin release and β -cell membrane potential in single mouse islets of Langerhans. **Diabetologia**, **21**: 470-475, 1981.
- SCOTT, P.; KESSLER, M.A.; SCHULER, L.A. Molecular cloning of the bovine prolactin receptor and distribution of prolactin and growth hormone receptor transcripts in fetal and utero-placental tissues. **Mol. Cell. Endocrinol.**, **89**: 47-58, 1992.
- SENER, A. & MALAISSE, W.J. Nutrient metabolism in islet cells. **Experientia**, **40**: 1026-1035, 1984
- SHACKELFORD, D.A. & TROWBRIDGE, I.S. Ligand-stimulated tyrosine phosphorylation of the IL-2 receptor beta chain and receptor associated proteins. **Cell. Regul.**, **2** (1): 73-85, 1991.
- SHERIDAN, J.D.; ANAYA, P.; PARSONS, J.A.; SORENSON, R.L. Increased dye coupling in pancreatic islets from rats in late-term pregnancy. **Diabetes**, **37**: 908-911, 1988.
- SHIROTA, M.; BANVILLE, D.; ALI, S.; JOLICOEUR, C.; BOUTIN, J.M.; EDERY, M.; DJIANE, J.; KELLY, P.A. Expression of two forms of the prolactin receptor in rat ovary and liver. **Mol. Endocrinol.**, **4**: 1136-1143, 1990.
- SHIU, R.P.C. & IWASIOU, B.M. Prolactin-inducible proteins in human breast cancer cells. **J. Biol. Chem.**, **260** (20): 11307-11313, 1985.

- SHUAI, K.; ZIEMIECKI, A.; WILKS, A.F.; HARPUR, A.G.; SADOWSKI, H.B.; GILMAN, M.Z.; DARNELL, J.E. Polypeptide signalling to the nucleus through tyrosine phosphorylation of Jak and Stat proteins. **Nature**, **366**: 580-583, 1993.
- SIDIS, Y. & HORSEMAN, N.D. Prolactin induces rapid p95/p70 tyrosine phosphorylation, and protein binding to GAS-like sites in the *anx* *Icp35* and *c-fos* genes. **Endocrinology**, **134**: 1979-1985, 1994.
- SODOYEZ-GOFFAUX, F.; SODOYEZ, J.C.; DE VOS, C.J.; FOA, P.P. Insulin and glucagon secretion by islets isolated from fetal and neonatal rats. **Diabetologia**, **16**: 121-123, 1979.
- SODOYEZ-GOFFAUX, F.; SODOYEZ, J.C.; FOA, P.P. Effects of gestational age, birth and feeding on the insulinogenic response to glucose and tolbutamide by fetal and newborn rat pancreas. **Diabetes**, **20**: 589-591, 1971.
- SORENSEN, R.L. & PARSONS, J.A. Insulin secretion in mammosomatotropic tumor-bearing and pregnancy rats: a role for lactogens. **Diabetes**, **34**: 337-341, 1985.
- SORENSEN, R.L. & STOUT, L.E. Prolactin receptors and JAK2 in islets of Langerhans: an immunohistochemical analysis. **Endocrinology**, **136**: 4092-4098, 1995.
- SORENSEN, R.L.; BRELJE, T.C.; HEGRE, O.D.; MARSHALL, S.; ANAYA, P.; SHERIDAN, J.D. Prolactin (*in vitro*) decreases the glucose stimulation threshold, enhances insulin secretion, and decreases dye coupling among islets B cells. **Endocrinology**, **121**: 1447-1453, 1987a.

- SORENSEN, R.L.; JOHNSON, M.G.; PARSONS, J.A.; SHERIDAN, J.D. Decreased glucose stimulation threshold, enhanced insulin secretion, and increased beta cell coupling in islets of prolactin-treated rats. **Pancreas**, **3**: 283-288, 1987b.
- SPANOS, S.E.; COLSTON, K.W.; EVANS, I.M.A.; GALANT, L.S.; MACAULEY, S.J.; MACINTYRE, I. Effect of prolactin on vitamin D metabolism. **Mol. Cell. Endocrinol.**, **5**: 163-167, 1976.
- SPELLACY, W.N.; GALL, S.A.; CARLSON, K.L. Carbohydrate metabolism of the normal term newborn: plasma insulin and blood glucose levels during an intravenous glucose tolerance. **Obstet. Gynecol.**, **30**: 580, 1967 apud GRASSO *et al.*, 1973.
- STEINKE, J. & DRISCOLL, S.G. The extractable insulin content of pancreas from fetuses and infants of diabetic and control mothers. **Diabetes**, **14**: 573, 1965 apud GRASSO *et al.*, 1973.
- STRICKER, P. & GRUETER, F. Action du lobe antérieur de l'hypophyse sur la montée laiteuse. **C. R. Soc. Biol.**, **99**: 1978-1980, 1928 apud KELLY, 1990.
- TANAKA, M.; MAEDA, K.; OKUBO, T.; NAKASHIMA, K. Double antenna structure of chicken prolactin receptor deduced from the cDNA sequence. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **188** (2): 490-496, 1992.
- TAYLOR, S.I.; ACCILI, D.; IMAI, I. Insulin resistance or insulin deficiency: which is the primary cause of NIDDM? **Diabetes**, **43**: 735-740, 1994.

- TEJWANI, G.A.; GUDEHITHLU, K.P.; HANISSIAN, S.H.; GIENAPP, I.E.; WHITACRE, C.C.; MALARKEY, W.B. Facilitation of dimethylbenz[a]anthracene-induced rat mammary tumorigenesis by restraint stress: role of beta-endorphin, prolactin, and naltrexone. **Carcinogenesis**, **12**: 637-641, 1991.
- TESONE, M.; OLIVEIRA-FILHO, R.; CHARREAU, E.H. Prolactin binding in rat Langerhans islets. **J. Recept. Res.**, **1**: 355-372, 1980.
- THORELL, J.I. Plasma insulin levels in normal human fetuses. **Acta Endocr.**, **63**: 134-140, 1970.
- THORENS, B. **Int. Rev. Cytol.**, **137A**: 209-38, 1992 apud HEIMBERG *et al.*, 1995.
- THORENS, B.; SARKAR, H.K.; KABACK, H.R.; LODISH, H.F. Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney and β -pancreatic islet cells. **Cell**, **55**: 281-290, 1988.
- THORENS, B.; WEIR, G.C.; LEAHY, J.L.; LODISH, H.F.; BONNER-WEIR, S. Reduced expression of the liver/beta-cell glucose transporter isoform in glucose-insensitive pancreatic beta cells of diabetic rats. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **87**: 6492-6496, 1990.
- THORENS, B.; WU, Y.-J.; LEAHY, J.-L.; WEIR, G.-C. The loss of GLUT2 expression by glucose-unresponsive beta cells of db/db mice is reversible and is induced by the diabetic environment. **J. Clin. Inv.**, **90** (1): 77-85, 1992.
- TIEDGE, M. & LENZEN, S. Differential regulation of glucokinase and GLUT-2 glucose transporter gene expression in pancreas and liver from neonatal and 16 day old rats. **Biochem. Mol. Biol. Intern.**, **29**: 161-166, 1993.

- TIEDGE, M. & LENZEN, S. Regulation of glucokinase and GLUT-2 glucose-transporter gene expression in pancreatic B-cells. **Biochem. J.**, **279**: 899-901, 1991.
- TOWBIN, H.; STAEGELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **76**: 4350-4354, 1979.
- TUCH, B.E.; OSGERBY, K.J.; TURTLE, J.R. The role of calcium in insulin release from the human fetal pancreas. **Cell Calcium**, **11** (1): 1-10, 1990.
- TUCH, B.E.; PALAVIDIS, Z.; TURTLE, J.R. Activators of protein kinase C stimulate insulin secretion from the human fetal pancreas. **Pancreas**, **3**: 675-680, 1988.
- UNGER, R.H. Diabetic hyperglycemia: link to impaired glucose transport in pancreatic β cells. **Science**, **251**: 1200-1205, 1991.
- UZE, G.; LUTFALLA, G.; MOGENSEN, K.E. α e β Interferons and their receptor and their friends and relations. **J. Interfer. Cyto. Res.**, **15**: 3-26, 1995.
- VAN ASSCHE, F.A. Quantitative morphologic and histoenzymatic study of the endocrine pancreas in non pregnant rats. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **118**: 39-41, 1974.
- VECCHIO, D.; LUYCKX, A.; RENOLD, A.E. Culture d'organe de pancréas foetal de rat: II. Effects du glucose, d'un sulfamidé hypoglycémiant et du glucagon sur la libération de l'insuline. **Helv. Physiol. Acta**, **25**: 134-146, 1967 apud SODOYEZ-GOFFAUX *et al.*, 1979.

- VERCHERE, C.B.; KWOK, Y.N.; BROWN, J.C. Modulation of acetylcholine-stimulated insulin release by glucose and gastric inhibitory polypeptide. **Pharmacology**, **42**: 273-282, 1991.
- VIONNET, N.; STOFFEL, M.; TAKEDA, J.; YASUDA, K.; BELL, G.I.; ZOUALI, H.; LESAGE, S.; VELHO, G.; IRIS, F.; PASSA, P.; FROGUEL, P.; COHEN, D. Nonsense mutation in the glucokinase gene causes early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Nature**, **356**: 721-722, 1992.
- VISELLI, S.M.; STANEK, E.M.; MUKHERJEE, P.; HYMER, W.C.; MASTRO, A.M. Prolactin-induced mitogenesis of lymphocytes from ovariectomized rats. **Endocrinology**, **129**: 983-990, 1991.
- WAKAO, H.; GOUILLEUX, F.; GRONER, B. Mammary gland factor (MGF) is a novel member of the cytokine regulated transcription factor gene family and confers the prolactin response. **EMBO J.**, **13**: 2182-2191, 1994.
- WANG, X.; ULHER, M.D.; BILLESTRUP, N.; NORSTEDT, G.; TALAMANTES, F.; NIELSEN, J.H.; CARTER-SU, C. Evidence for association of the cloned liver growth hormone receptor with a tyrosine kinase. **J. Biol. Chem.**, **267** (24): 17390-17396, 1992.
- WANG, Y. D.; WONG, K.; WOOD, W.I. Intracellular tyrosine residues of the human growth hormone receptor are not required for the signaling of proliferation or JAK-STAT activation. **J. Biol. Chem.**, **270**: 7021-7024, 1995.

- WARD, W.K.; BOLGIANO, D.C.; MCKNIGHT, B.; HALTER, J.B.; PORT, D.JR.
Diminished B cell secretory capacity in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. **J. Clin. Invest.**, 74: 1318-1328, 1984.
- WEINHAUS, A.J; STOUT, L.E.; SORENSON, R.L. Glucokinase, hexokinase, glucose transporter 2, and glucose metabolism in islets during pregnancy and prolactin-treated islets in vitro: mechanisms for long term up-regulation of islets. **Endocrinology**, 137: 1640-1649, 1996.
- WELSCH, C.W. Host factors affecting the growth of carcinogen-induced rat mammary carcinomas: a review and tribute to Charles Brenton Huggins. **Cancer Res.**, 45: 3415-3443, 1985.
- WELSH, M.; BERGGREN, P.O.; RORSMAN, P. Glucose does not block ATP-regulated K⁺-channel activity in fetal B cells. **Diabetologia**, 30: 596A, 1987.
- WELTE, T.; GARIMORTH, K.; PHILIPP, S.; DOPPLER, W. Prolactin-dependent activation of a tyrosine phosphorylated DNA binding factor in mouse mammary epithelial cells. **Mol. Endocrinol.**, 8 (8): 1091-1102, 1994.
- WOLLHEIM, C.B. & SHARP, W.G. Regulation of insulin release by calcium. **Physiol. Rev.**, 61: 914-973, 1981.
- WOLLHEIM, C.B.; BLONDEL, B.; KIKUCHI, M.; SHARP, W.G. Inhibition of insulin release by somatostatin: no evidence for interaction with calcium. **Metabolism**, 27: 1303-1307, 1978a.

- WOLLHEIM, C.B.; KIKUCHI, M.; RENOLD, A.E.; SHARP, W.G. Somatostatin and epinephrine-induced modifications of $^{45}\text{Ca}^{++}$ fluxes and insulin release in rat pancreatic islets maintained in tissue culture. **J. Clin. Invest.**, **60**: 1165-1173, 1979.
- WOLLHEIM, C.B.; KIKUCHI, M.; RENOLD, A.E.; SHARP, W.G. The roles of intracellular and extracellular Ca^{++} in glucose-stimulated biphasic insulin release by rat islets. **J. Clin. Invest.**, **62**: 451-458, 1978b.
- YOSHIMURA, A. & LODISH, H.F. In vitro phosphorylation of the erythropoietin receptor and an associated protein, pp130. **Mol. Cell. Biol.**, **12** (2): 706-715, 1992.

APÊNDICE

Meio RPMI-1640

(Sigma ou Cultilab Materiais para Cultura de Células Ltda, Campinas, SP):

Componentes:	g/L
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O.....	0,1
KCl.....	0,4
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,1
NaCl.....	6,0
NaHCO ₃	2,0
Na ₂ HPO ₄	0,8
L-Arginina.HCl.....	0,2
L-Asparagina.....	0,05
Ác. L-Aspártico.....	0,02
L-Cistina.2HCl.....	0,0652
Ác. L-Glutâmico.....	0,02
L-Glutamina.....	0,3
Glicina.....	0,01
L-Histidina.HCl.H ₂ O.....	0,015
L-Hidroxiprolina.....	0,02
L-Isoleucina.....	0,05
L-Leucina.....	0,05
L-Lisina.HCl.....	0,04
L-Metionina.....	0,015
L-Fenilalanina.....	0,015
L-Prolina.....	0,02
L-Serina.....	0,03
L-Treonina.....	0,02
L-Triptofano.....	0,005
L-Tirosina.2Na.2H ₂ O.....	0.02883

L-Valina.....	0,02
D-Biotina.....	0,0002
Cloreto de Colina.....	0,003
Ácido Fólico.....	0,001
Mio-Inositol.....	0,035
Niacinamida.....	0,035
Ácido p-Amino Benzóico.....	0,001
Ácido D-Pantotênico (hemicálcio).....	0,00025
Piridoxina.HCl.....	0,001
Riboflavina.....	0,0002
Tiamina.HCl.....	0.001
Vitamina B-12.....	0,000005
Glutatione (reduzido).....	0.001
Vermelho de Fenol (sódio).....	0.0053
D-Glicose.....	2.0
(2 g/L de NaHCO ₃ foram acrescentados após dissolução dos sais; pH 7,4; osmolaridade 280 ± 10 mOsm/L)	

TABELA I: Efeitos de diferentes substâncias na captação do ^{45}Ca (pg/ilhota), durante 5 min, em ilhotas neonatais cultivadas durante 7 e 19 dias, na presença ou ausência de PRL.

Agente	Controle (7 dias)	PRL (7 dias)	Control (19 dias)	PRL (19 dias)
G 2,8 mM	1,61 $\pm$ 0,07 (12)	1,65 $\pm$ 0,05 (12)	1,26 $\pm$ 0,02 (31)	1,56 $\pm$ 0,04* (16)
G 22 mM	3,62 $\pm$ 0,17 (12)	3,75 $\pm$ 0,16 (12)	2,69 $\pm$ 0,08 (39)	3,61 $\pm$ 0,08* (15)
G 5,6 mM + Cch 100 μM	1,73 $\pm$ 0,03 (12)	1,73 $\pm$ 0,04 (12)	2,05 $\pm$ 0,06 (23)	2,53 $\pm$ 0,05* (33)
G 2,8 mM + Arg 20 mM	1,98 $\pm$ 0,03 (12)	2,02 $\pm$ 0,05 (12)	3,29 $\pm$ 0,10 (18)	4,57 $\pm$ 0,17* (20)
G 2,8 mM + Leu 20 mM	1,89 $\pm$ 0,04 (12)	1,90 $\pm$ 0,03 (12)	3,05 $\pm$ 0,06 (25)	3,61 $\pm$ 0,04* (29)

Os valores representam a média $\pm$ SEM para o número de experimentos em cada grupo (em parênteses).

*Significativamente diferente ($p < 0,05$) de seu respectivo grupo controle.

TABELA II: Efeitos de diferentes substâncias na captação do ^{45}Ca (pg/ilhota), durante 90 min, em ilhotas neonatais cultivadas durante 7 e 19 dias, na presença ou ausência de PRL.

Agente	Controle (7 dias)	PRL (7 dias)	Controle (19 dias)	PRL (19 dias)
G 2,8 mM	1,94 $\pm$ 0,08 (24)	1,97 $\pm$ 0,10 (18)	3,96 $\pm$ 0,19 (20)	4,27 $\pm$ 0,18 (29)
G 22 mM	3,45 $\pm$ 0,19 (23)	3,47 $\pm$ 0,23 (26)	5,94 $\pm$ 0,26 (20)	7,60 $\pm$ 0,45* (21)
G 5,6 mM + Cch 100 μM	2,11 $\pm$ 0,13 (17)	2,12 $\pm$ 0,11 (29)	4,87 $\pm$ 0,21 (17)	6,77 $\pm$ 0,19* (34)
G 2,8 mM + Arg 20 mM	2,14 $\pm$ 0,14 (19)	2,20 $\pm$ 0,12 (21)	4,80 $\pm$ 0,27 (21)	4,94 $\pm$ 0,25 (24)
G 2,8 mM + Leu 20 mM	2,26 $\pm$ 0,14 (30)	2,59 $\pm$ 0,14 (18)	8,45 $\pm$ 0,33 (16)	9,76 $\pm$ 0,38* (34)

Os valores representam a média $\pm$ SEM para o número de experimentos em cada grupo (em parênteses).

*Significativamente diferente ($p < 0,05$) de seu respectivo grupo controle.

TABELA III: Efeitos de diferentes agentes na secreção de insulina, durante 90 min, em ilhotas cultivadas durante 7 e 19 dias, na presença ou ausência de PRL.

Agente	Controle (7 dias)	PRL (7 dias)	Controle (19 dias)	PRL (19 dias)
G 2,8 mM	1,84 ± 0,06 (21)	2,08 ± 0,06 (21)	1,17 ± 0,05 (18)	1,23 ± 0,05 (18)
G 5,6 mM	1,38 ± 0,15 (12)	2,43 ± 0,16* (12)	2,10 ± 0,10 (12)	4,70 ± 0,50* (12)
G 22 mM	3,09 ± 0,21 (21)	4,31 ± 0,24* (21)	2,69 ± 0,28 (12)	7,50 ± 0,60* (12)
G 5,6 mM + Cch 100 µM	3,67 ± 0,24 (12)	5,05 ± 0,31* (12)	2,25 ± 0,23 (12)	2,90 ± 0,10* (12)
G 2,8 mM + Arg 20 mM	4,63 ± 0,17 (21)	7,45 ± 0,19* (21)	7,29 ± 0,28 (18)	8,61 ± 0,44* (18)
G 2,8 mM + Leu 20 mM	4,42 ± 0,23 (21)	6,91 ± 0,21* (21)	8,51 ± 0,23 (18)	9,85 ± 0,41* (18)

Os valores representam a média (% do conteúdo total) ± SEM para o número de experimentos em cada grupo (em parênteses).

*Significativamente diferente ($p < 0,05$) de seu respectivo grupo controle.