

## SECRECIÓN DE HORMONAS ADENOHIPOFISIARIAS: PAPEL DE LAS PROTEÍNAS SINTAXINA-1 Y SNAP-25

Dr. José Luis Quintanar Stephano\*

### INTRODUCCIÓN:

Tanto en células endocrinas como neuroendocrinas, el tipo de secreción regulada se caracteriza por una rápida y coordinada liberación de péptidos o proteínas contenidos en los gránulos secretores, donde el calcio citoplásmico y proteínas de la membrana plasmática del citoplasma, de las vesículas secretoras y del citoesqueleto, son cruciales para dicho proceso exocitótico (6).

En varios tipos celulares, el incremento de los niveles intracelulares de calcio es suficiente para iniciar el proceso de exocitosis. En células de adenohipófisis, la exocitosis se realiza debido a la activación de canales de calcio dependientes de voltaje. Tal activación puede ser inducida por diferentes factores como despolarización con potasio extracelular, estimulación eléctrica, exposición de las células con agonistas, o bien con la aplicación de calcio extracelular en células permeabilizadas (6).

Una de las hipótesis para explicar la participación del calcio en el proceso secretor es la siguiente: el incremento en el calcio intracelular iniciaría la cascada de eventos que consistirían en que, por un lado, el calcio activara enzimas cinasas que fosforilarían a otras proteínas (anexinas) y esto conduciría a la exocitosis; y por el otro lado, el calcio activaría enzimas cinasas dependientes de calmodulina que actúan sobre las sinapsinas y se produciría la secreción hormonal (11).

Por otra parte, recientemente se han hecho grandes progresos en la identificación de los componentes proteicos tanto de la membrana vesicular como de la plasmática, que están implicadas en el proceso exocitótico (2). Las proteínas localizadas en la membrana de las vesículas están formadas por la

sinaptotagmina, SV2, rabfilina, rab3, proteína membranal asociada a vesículas (VAMP), sinaptofisina y sinapsina, entre otras (13). Entre las proteínas que están asociadas a la membrana plasmática se encuentran: la proteína asociada a sinaptosomas de 25 kDa de peso molecular (SNAP-25) (10) y la syntaxina (1).

Durante el proceso secretor ocurre que en las zonas activas (sitios preferentes de exocitosis) se da un contacto inicial entre ambas membranas (vesicular-plasmática) produciéndose un reconocimiento proteico (etapa de anclaje). En esta etapa, la mayor parte de la syntaxina, SNAP-25 y VAMP no se encuentran unidas entre ellas, sino a otras proteínas de la maquinaria secretora, lo que provoca posteriormente la fase de activación que consiste en la unión de syntaxina, SNAP-25 y VAMP formando un complejo que induce la hidrólisis del ATP dada por el factor sensible a N-etilmaleimida. Tal hecho causa una fase de hemifusión requiriéndose de un sensor de calcio como lo es la sinaptotagmina. Así, finalmente el contenido de la vesícula sería liberado hacia el espacio extracelular (5).

Recientemente se ha establecido la presencia de SNAP-25 y syntaxina en tejido no neuronal, particularmente en cortes de adenohipófisis de rata (5). Además, se ha estudiado la participación funcional de SNAP-25 en la línea celular adenohipofisiaria GH<sub>4</sub>C1, en tal estudio se ha observado que la secreción de prolactina depende de SNAP-25 tras el estímulo con la hormona liberadora de tirotropina (TRH) (8).

En relación a la syntaxina, se ha identificado y definido el papel funcional de la syntaxina 1 en el proceso secretor de catecolaminas en células cromafines bovinas (3); así como en la secreción de insulina en células beta pancreática (9).

Dado que algunas células endocrinas expresan las proteínas syntaxina y SNAP-25, y estas proteínas participan en el proceso de neurosecreción, se puede plantear la hipótesis de que también estarían presentes en células adenohipofisiarias en cultivo, y que podrían

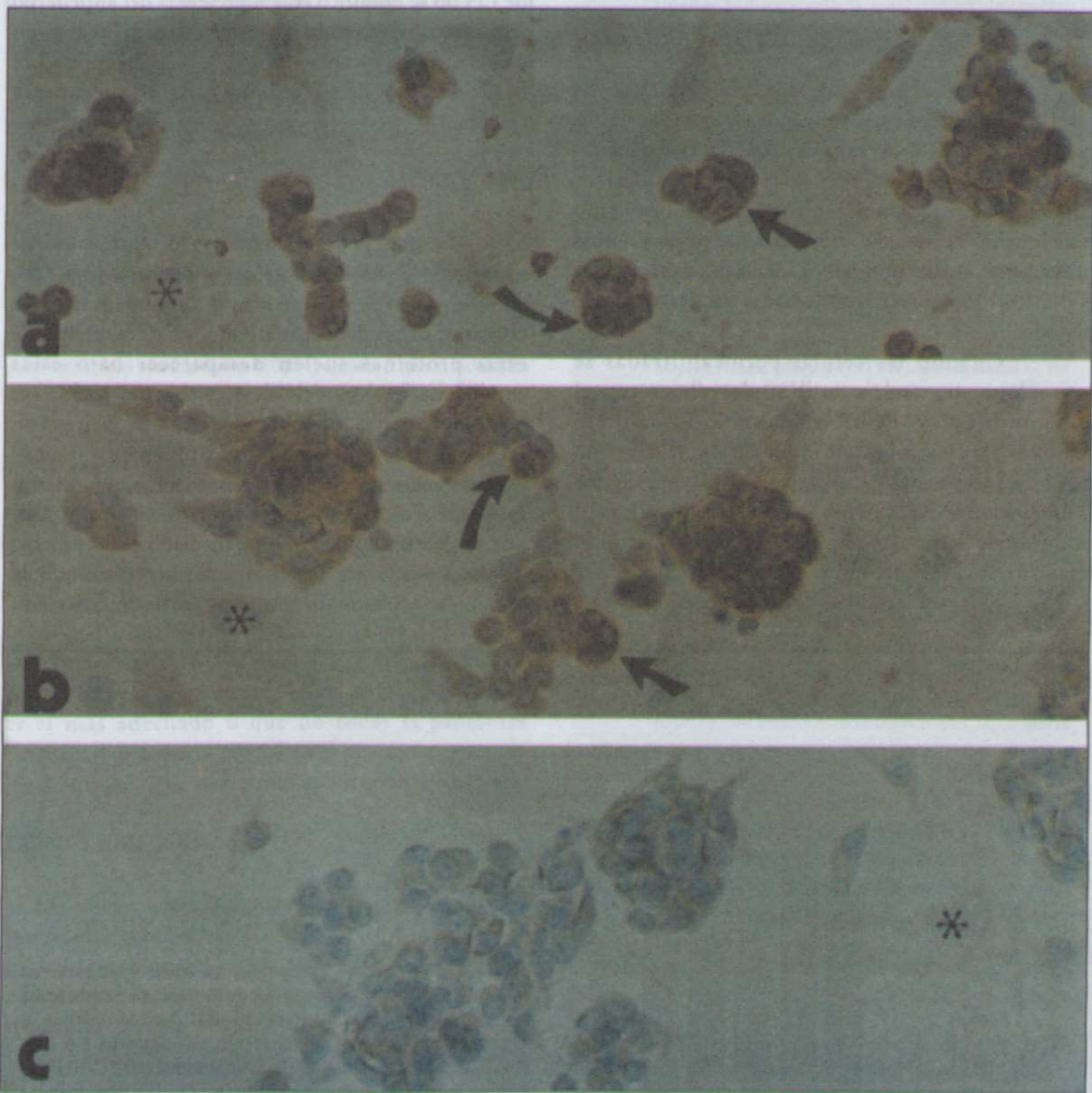
\* Profesor - Investigador del Departamento de Fisiología y Farmacología  
Centro de Ciencias Básicas  
Programa de Investigaciones Biomédicas Básicas  
Tel: 9 10 84 23  
Fax: 9 10 84 01  
Correo Electrónico: jlquinta@correo.uua.mx

estar involucradas en la maquinaria secretora hormonal, como puede ser en el caso de la secreción de la hormona luteinizante (LH) y estimulante de la tiroides (TSH). La finalidad de este trabajo es definir la presencia de estas proteínas membranales y tratar de establecer su participación en el proceso secretor en células adenohipofisiarias.

**MATERIAL Y MÉTODOS:**

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de

200 g de peso corporal como donantes de hipófisis. Se realizó el cultivo de células adenohipofisiarias según el método empleado por Hyde y Keller (4). Al cuarto día de cultivo y en cajas de plástico de 3 cm de diámetro con 100 mil células/caja, se hizo la inmunohistoquímica para la determinación de la syntaxina y SNAP-25 de acuerdo a la técnica descrita por Gutiérrez et al. (3), empleando tanto anticuerpos policlonales anti-syntaxina obtenidos en conejos inoculados con un fragmento de syntaxina, así como anticuerpos monoclonales contra SNAP-25 comerciales (Sigma Co.).



**Figura 1.-** Microfotografía de células adenohipofisiarias de rata en cultivo de tres días, que muestran material inmunorreactivo (color marrón) para syntaxina-1 (a), SNAP-25 (b) y control (c). La reacción de color es con diaminobenzidina. Los núcleos fueron ligeramente teñidos con hematoxilina. 200X de amplificación. La flecha indica células positivas y el asterisco y el núcleo de un fibroblasto.

Una vez que se estableció que las células adenohipofisiarias en cultivo expresaban las proteínas syntaxina y SNAP-25, se evaluó en el sobrenadante la respuesta secretora de las hormonas TSH y LH por la técnica de ELISA (1,12). Lo anterior se realizó en células permeabilizadas con digitonina 10  $\mu$ M (12) y se indujo la secreción con calcio (10  $\mu$ M) a diferentes tiempos (5 y 10 min) según la técnica descrita por Jobin et al. (1) previa incubación por 10 minutos con el anticuerpo anti-syntaxina o anti-SNAP-25. Todos los procedimientos se realizaron en incubación a 37°C.

**RESULTADOS:**

Los resultados obtenidos muestran que las células adenohipofisiarias en cultivo expresan tanto syntaxina-1 como SNAP-25 (Figura 1), las cuales fueron identificadas por métodos inmunohistoquímicos empleando anticuerpos tanto monoclonales como policlonales. El material inmunorreactivo para ambas proteínas se encontró desde el inicio del cultivo hasta el día 13, sin presentarse variaciones a lo largo de este periodo.

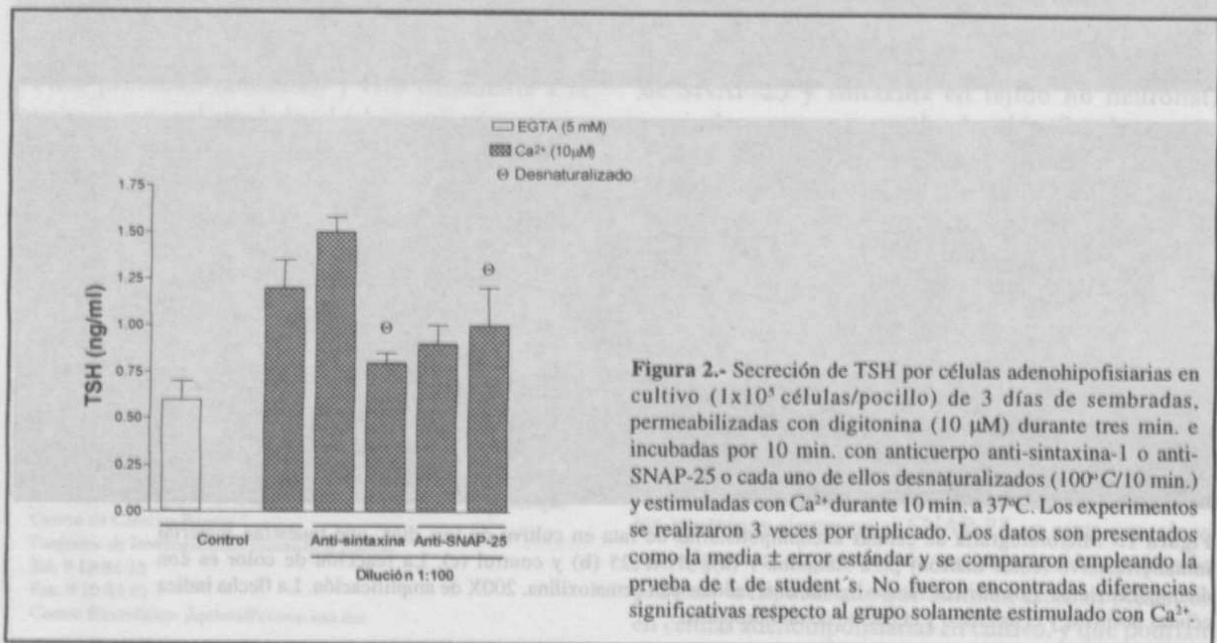
Cuando las células permeabilizadas se estimularon con calcio, utilizando células con el quelante de Calcio, EGTA como control, se encontró que a los 5 y 10 minutos de estimulación, la secreción de LH se incrementó significativamente, mientras que la liberación de TSH sólo se incrementó a los 10 minutos de estimulación; este hecho nos permitió estandarizar el tiempo óptimo de estimulación.

Una vez establecida la metodología para

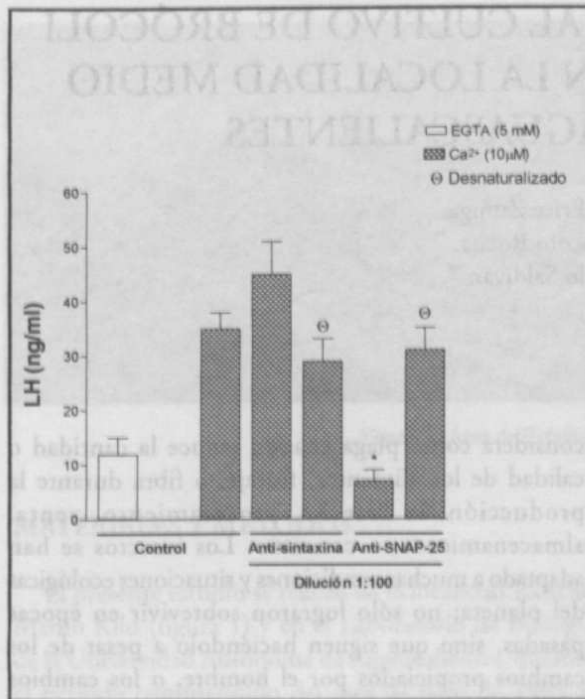
inducir la secreción hormonal por calcio en células permeabilizadas con digitonina, se procedió a definir el papel funcional tanto de syntaxina como de SNAP-25. Para ello, las células permeabilizadas se incubaron con los anticuerpos anti-syntaxina o anti-SNAP-25 con la finalidad de que, al bloquear estas proteínas, disminuyera el nivel de secreción aun con la estimulación con calcio. Los resultados muestran que la secreción de TSH no es afectada por la presencia de anticuerpos anti-syntaxina o anti-SNAP-25, tal como se ilustra en la Figura 2. De igual forma, la secreción de LH no se modificó con la presencia del anticuerpo anti-syntaxina. Sin embargo, en el caso de la incubación con el anticuerpo anti-SNAP-25, la secreción de LH inducida con calcio, disminuyó significativamente (Figura 3).

**DISCUSIÓN:**

*In vivo*, ya se ha demostrado la presencia de syntaxina y SNAP-25 en tejidos endocrinos (3,5,8,9), pero su presencia y permanencia durante los cultivos celulares, es un dato importante, ya que muchas de estas proteínas suelen desaparecer bajo estas condiciones y el modelo de secreción no podría ser aplicado. Nuestra hipótesis fue que, si se expresaban estas proteínas en la membrana plasmática o en el gránulo secretor, su alteración en el acoplamiento mediante el uso de anticuerpos específicos contra ellas, podría afectar su función como mediadoras del proceso de exocitosis y, por lo tanto, inhibir o disminuir la secreción hormonal, como ya se ha demostrado



**Figura 2.-** Secreción de TSH por células adenohipofisiarias en cultivo ( $1 \times 10^5$  células/pocillo) de 3 días de sembradas, permeabilizadas con digitonina (10  $\mu$ M) durante tres min. e incubadas por 10 min. con anticuerpo anti-syntaxina-1 o anti-SNAP-25 o cada uno de ellos desnaturalizados (100°C/10 min.) y estimuladas con Ca<sup>2+</sup> durante 10 min. a 37°C. Los experimentos se realizaron 3 veces por triplicado. Los datos son presentados como la media  $\pm$  error estándar y se compararon empleando la prueba de t de student's. No fueron encontradas diferencias significativas respecto al grupo solamente estimulado con Ca<sup>2+</sup>.



**Figura 3.-** Secreción de LH por células adenohipofisiarias en cultivo ( $1 \times 10^5$  células/pocillo) de 3 días de sembradas, permeabilizadas con digitonina ( $10 \mu\text{M}$ ) durante 3 min. e incubadas por 10 min. con anticuerpo anti-sintaxina-1 o anti-SNAP-25 o cada uno de ellos desnaturalizados ( $100^\circ\text{C}/10$  min) y estimuladas con  $\text{Ca}^{2+}$  durante 10 min a  $37^\circ\text{C}$ . Los experimentos se realizaron 3 veces por triplicado. Los datos son presentados como la  $\pm$  error estándar y se compararon empleando la prueba de t de student's. \*  $P < 0.001$  respecto al grupo solamente estimulado con  $\text{Ca}^{2+}$ .

previamente en células cromafines en cultivo al inhibir la secreción de catecolaminas (3). Sin embargo, sólo se logró reducir el nivel de secreción de LH con el anticuerpo anti-SNAP-25, lo que de alguna manera sugiere que este modelo para bloquear la secreción, no es el más adecuado o que no todas las proteínas participan de manera crucial en el proceso secretor de los diferentes tipos de hormonas adenohipofisiarias.

#### CONCLUSIONES:

- Las células adenohipofisiarias en cultivo, expresan tanto sintaxina-1 como SNAP-25.
- La secreción inducida por calcio en células adenohipofisiarias permeabilizadas con digitonina e incubadas con anticuerpos anti-sintaxina, no modifican la secreción ni de TSH ni de LH.
- La secreción inducida por calcio en células adenohipofisiarias permeabilizadas con digitonina e incubadas con anticuerpos anti-SNAP-25, inhiben la secreción de LH pero no la de TSH.

#### BIBLIOGRAFÍA:

- Bennett M. K., Calakos N. and Scheller R. H. (1992). Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones. *Science*. 257 : 255-259.
- Ferro-Novick S. and Jahn R. (1994). Vesicle fusion from yeast to men. *Nature* 375 : 191-193.
- Gutiérrez L. M., Quintanar J. L., Viniestra S., Salinas E., Moya F. and Reig J. A. (1995). Anti-syntaxin antibodies inhibit calcium-dependent catecholamine secretion from permeabilized chromaffin cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 206 (1) : 1-7.
- Hyde J. F. and Keller B. K. (1991). Galanin secretion from anterior pituitary cells is regulated by dopamine, somatostatin and thyrotropin-releasing hormone. *Endocrinology*. 128: 917-922.
- Jacobsson G. and Meister B. (1996). Molecular components of the exocytosis machinery in the rat pituitary gland. *Endocrinology*. 137 (12): 5344-5356.
- Jobin R.M., Tomic M., Zheng L., Stojilkovic S.S., and Catt J. K. (1995). Gonadotropin-releasing hormone-induced sensitization of calcium-dependent exocytosis in pituitary gonadotrophs. *Endocrinology*. 136 (8): 3398-3405.
- Kemeny D. M. and Challacombe S. J. Eds. *ELISA and others solid phase immunoassays*. Published by John Wiley and Sons Ltd. Uk. 1998.
- Masumoto N., Ikebuchi Y., Matsuoka T., Tasaka K., Miyake A. and Murata Y. (1997). Involvement of the SNAP-25 in TRH-induced exocytosis in pituitary  $\text{GH}_4\text{C1}$  cells. *J. Endocrinology*. 153 : R5-R10.
- Martín F., Moya F., Gutiérrez L. M., Reig J. A. and Soria B. (1995). Role of syntaxin in mouse pancreatic beta-cell insulin secretion. *Diabetologia* 38: 860-863.
- Oyler G. A., Higgings G. A., Hart R. A., Battenberg E., Billingsley M., Bloom F. E. and Wilson W. C. (1989). The identification of the novel synaptosomal-associated protein SNAP-25, differentially expressed by neuronal subpopulations. *J. cell. Biol.* 109: 3039-3052.
- Rao K., Paik W., Zheng L., Jobin R., Tomic M., Jiang H., Nakanishi S. and Stojilkovic S.S. (1997). Wortmannin-sensitive and insensitive step in calcium controlled exocytosis in pituitary gonadotrophs. *Endocrinology*. 138 (4): 1440-1449.
- Scammell JB., Wear LB., Von Haven R. (1990). A monoclonal antibodies which inhibits the biological activity of rat prolactin but not prolactin from other species. *Mol. Cell Endocrinol.* 17:125-131.
- Sudho T.C. (1995). The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature*. 375 : 645-653.

Este trabajo fue presentado en el XLI Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas en la Ciudad de San Luis Potosí.