

11281

14  
Zej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR

EL PAPEL DEL NGF COMO FACTOR TROFICO  
SOBRE LA CELULA BETA PANCREATICA

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
**DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS**  
P R E S E N T A :  
**TAMARA LUTI ROSENBAUM EMIR**

MEXICO, D. F.

266997 1998

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**ESTA TESIS FUE DIRIGIDA POR LA DRA. MARCIA HIRIART URDANIVIA**

**DEL DEPARTAMENTO DE BIOFÍSICA**

**DEL INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR DE LA UNAM**

**ALGUNOS DE LOS RESULTADOS SE ENCUENTRAN PUBLICADOS:**

- 1) Rosenbaum, T., Vidaltamayo-R., Sánchez-Soto, M.C., Zentella, A. e Hiriart, M. (1998)  
Pancreatic  $\beta$  cells synthesize and secrete nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**(13): 7784-7788.

**OTROS RESULTADOS SE ENCUENTRAN EN PREPARACIÓN PARA SER  
PUBLICADOS:**

- 1) Rosenbaum, T., Sánchez-Soto, M.C., Larrieta-Carrasco, E. e Hiriart, M. A short exposure to NGF modifies calcium currents of pancreatic  $\beta$  cells.
- 2) Rosenbaum, T., Castañares, D., López-Valdés, H. e Hiriart, M. Culture of pancreatic  $\beta$  cells with NGF increases calcium currents in pancreatic  $\beta$  cells.

Dedico esto es que es lo más importante que he hecho en mi vida académica a mis **padres Marcos Rosenbaum Pitluck y Meryem Emir Halil**. Gracias por el apoyo, por el cariño y su eterna disposición para lograr que yo hiciera de esta etapa de mi vida un sustento sólido que ha de ser otro de los pasos recorridos en la vida.

A mi hermano, **Mustafa Emirbayer**, también has sido un buen ejemplo que seguir. Gracias por alentar y siempre tener confianza en mi.

A toda la **FAMILIA**, en especial, a mis abuelos: **Leyla y Mehmet Emir, Gerson y Fanny Rosenbaum**. A mi tío **Rustem** y a mis tías **Clara, Niara y Elmira**. A mis primos. Les debo mucho a todos.

A **Marcia** mi querida **madre** académica: Gracias por ser cómplice de los delirios, las metas, los quebrantos y las satisfacciones. Mil gracias por compartir, por dejarme ser libre de decidir y por guiar siempre estos pasos que de repente se descarriaban. Gracias por el apoyo aún fuera de lo académico y por tu sincera amistad. Esta ha sido una de las etapas más disfrutables de mi vida. ¡Eres el mejor ejemplo que seguir, querida jefa!

## **AGRADECIMIENTOS**

A los miembros de mi **COMITÉ TUTORAL**: **Dres. Marcia Hiriart, Arturo Hernández, Emilio Rojas del Castillo y Alejandro Zentella** por su asesoría y valiosa contribución a la realización de esta tesis.

A los **MIEMBROS DEL JURADO**: **Dres. Marcia Hiriart, José Bargas, Mauricio Díaz-Muñoz, David Kershenovich, Milagros Méndez, Julio Morán y Alejandro Zentella** por su valiosa crítica a mi trabajo.

A mis **COMPAÑEROS** de laboratorio: **Ma. Carmen Sánchez-Soto, Elena Larrieta y Martha Palomino**. En especial, gracias a **Carmen** por enseñar, apoyar y ser amiga en los momentos difíciles. A **Diana Castañares y Héctor López** por participar activamente en la realización de algunos experimentos.

A los **AMIGOS**:

A **León** por el apoyo, por su tiempo, por compartir y mucho más.

A **Eleazar, Beatriz, Fabiola, Mónica, Andrea, Lucia, Enrique, Ana, Criselda, Catalina, Ricardo, Frank, Frana, Humberto y Juan**. Por su sincera amistad y por siempre estar conmigo!

Al **Dr. Simón Brailowsky**, cuya pérdida es inmensa, por ser amigo, escuchar y apoyar. Nunca dejará de ser ejemplo de alegría y bondad.

A los doctores **Georges Dreyfus y Antonio Peña**, durante cuya gestión como directores obtuve el más decidido apoyo.

A los doctores: **Francisco Fernández de Miguel, Esperanza García, Diego González-Halphen, Arturo Hernández-Cruz, David Naranjo, Antonio Peña, Celia Santi y Alejandro Zentella**, por su continuo aliento.

**ESTE TRABAJO FUE APOYADO POR EL PROYECTO 030360 DEL PADEP,  
POR UNA BECA DE DOCTORADO Y POR EL PROYECTO IN212194 DE LA  
DGAPA**

## **ABREVIATURAS**

- BSA.**- Albúmina de suero bovino
- CGS.**- Colagenasa
- dbAMPc.**- Dibutilil adenosin monofosfato cíclico
- GABA.**- Acido gamma-amino butírico
- GAD.**- Glutamato descarboxilasa
- GAPDH.**- Gliceraldehído 3'-fosfato deshidrogenasa
- HBSS.**- Solución salina balanceada de Hank's
- IP-3.**- Inositol-3'-fosfato
- MAP.**- Proteína activada por mitógeno
- MAPK.**- Cinasas activadas por mitógeno
- MEK.**- Cinasas activadas por MAP
- NGF.**- Factor de crecimiento neuronal
- PEF.**- Penicilina-estreptomicina-fungizona
- REST.**- Factor de transcripción silenciador del elemento represor
- RHPA.**- Ensayo hemolítico inverso
- RT-PCR.**- Reacción en cadena de polimerasa acoplada a transcripción reversa
- SBF.**- Suero fetal de bovino
- TEA.**- Tetra etil-amonio
- Trk A.**- Tirosina cinasa A
- TTX.**- Tetrodotoxina

# INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCION	5
A) EL PANCREAS Y SU ESTRUCTURA	5
A.1) Anatomía del páncreas	5
A.2) Heterogeneidad funcional	7
B) LA INSULINA Y SU ESTRUCTURA	8
B.1) Síntesis de insulina	9
C) LA SECRECION DE INSULINA	10
C.1) Acoplamiento entre el estímulo con glucosa y la secreción de insulina	11
C.2) La actividad eléctrica de la célula $\beta$ pancreática	12
C.2.1) Canales de K	14
C.2.2) Canales de Na	14
C.2.3) Canales de Ca	15
D) EL FACTOR DE CRECIMIENTO NEURONAL	16
D.1) El descubrimiento del NGF	16
D.2) Estructura del NGF y sus receptores	17
D.3) Mecanismos celulares que transducen en la señal mediada por NGF	20
E) CARACTERÍSTICAS QUE COMPARTEN LAS CELULAS $\beta$ PANCREATICAS CON CELULAS DERIVADAS DE LA CRESTA NEURAL	22
E.1) Efectos del NGF y del dbAMPc sobre las células $\beta$ pancreáticas	23
E.2) El papel de los canales iónicos sobre la extensión de procesos neuríticos	25

F) EL PAPEL DEL NGF SOBRE PROCESOS DEGENERATIVOS ASOCIADOS A LA DIABETES	26
HIPOTESIS	28
OBJETIVO GENERAL	29
OBJETIVOS ESPECIFICOS	29
METODOLOGIA	30
A) OBTENCION DE CELULAS $\beta$ PANCREATICAS DE RATA	30
A.1) Gradiente de Ficoll	30
A.2) Dispersión de las células del islote pancreático	30
A.3) Cultivo de las células del islote	30
B) REGISTRO DE CORRIENTES DE $\text{Na}^+$ y de $\text{Ca}^{2+}$ POR MEDIO DE LA TECNICA DE FIJACION DE VOLTAJE EN MICROAREAS DE MEMBRANA (PATCH-CLAMP)	31
C) DETERMINACION DE LOS EFECTOS DEL NGF Y/O dbAMPc SOBRE LA EXTENSION DE PROCESOS DE TIPO NEURITICO EN LAS CELULAS $\beta$ PANCREATICAS	34
D) INMUNOCITOQUIMICA CONTRA Trk A E INSULINA EN CELULAS SECRETORAS DE INSULINA	35
E) RT-PCR PARA LA DETECCION DE RNAm PARA Trk A Y NGF EN CELULAS $\beta$ DE CULTIVOS PRIMARIOS	35
E.1) Extracción de RNA citoplásmico	35
E.2) Reacciones de RT-PCR	36
E.3) Electroforésis	38
E.4) Transferencia	39

E.5) Incorporación de [ <sup>32</sup> P] a los productos de reacción de RT-PCR	39
F) BIOENSAYO CON CELULAS PC12 PARA LA DETERMINACION DE LA SECRECION DE NGF	40
G) TECNICA DE ELISA PARA EL ESTUDIO DE LA SECRECION DE NGF POR PARTE DE LAS CELULAS $\beta$ PANCREATICAS	41
RESULTADOS	42
A) EFECTO DEL dbAMPc Y DEL NGF SOBRE LAS CORRIENTES MACROSCOPICAS DE Na <sup>+</sup>	42
B) EFECTOS DEL NGF SOBRE LAS CORRIENTES MACROSCOPICAS DE Ba <sup>2+</sup>	46
B.1) Efectos del NGF a corto plazo	46
B.1.1) Efecto de la exposición de las células $\beta$ pancreáticas al NGF sobre la Constante de tiempo de la desactivación de los canales de Ca	51
B.1.2) Dependencia de la activación de los canales de Ca al voltaje	53
B.2) Efectos del NGF a largo plazo	54
B.2.1) Efecto de la exposición de las células $\beta$ pancreáticas al NGF sobre la cinética de desactivación y activación de los canales de Ca	58
B.2.2) Efecto de la privación de NGF durante 24 horas sobre la densidad de corriente de Ba <sup>2+</sup>	60
C) PAPEL DE LOS CANALES DE Na Y Ca SOBRE EL DESARROLLO DE PROCESOS DE TIPO NEURITICO EN LAS CELULAS $\beta$ PANCREATICAS	63
C.1) Efecto del bloqueo de los canales de Na sobre la extensión de procesos de tipo neurítico inducido por NGF + dbAMPc	63
C.2) Efecto del bloqueo de los canales de Ca tipo L sobre la extensión de procesos de tipo neurítico inducida por NGF y/o dbAMPc	64

C.3) Efecto del bloqueo de los canales de Ca tipo N sobre la extensión de procesos de tipo neurítico por NGF + dbAMPc	65
C.4) Efecto de la despolarización con potasio sobre la extensión de procesos citoplásmicos inducida por NGF y/o dbAMPc	66
C.5) Efecto de los tratamientos sobre la longitud de los procesos de tipo neurítico	70
D) DETECCION DE Trk A POR MEDIO DE TECNICAS INMUNOCITOQUIMICAS	76
E) EFECTO DEL NGF Y DEL dbAMPc SOBRE LA EXPRESION DE Trk A EN CELULAS $\beta$ PRIMARIAS	77
F) PRESENCIA DE RNAm PARA NGF EN CELULAS $\beta$ PANCREATICAS Y EFECTO DEL NGF Y DEL dbAMPc SOBRE LOS NIVELES DE RNAm PARA ESTE FACTOR	79
G) LAS CELULAS $\beta$ SECRETAN UN FACTOR CON ACTIVIDAD BIOLOGICA COMO LA DEL NGF	81
H) LAS CELULAS $\beta$ SECRETAN NGF EN RESPUESTA A LA GLUCOSA EXTRACELULAR	82
DISCUSION	84
I) Efecto del dbAMPc y del NGF sobre las corrientes macroscópicas de Na <sup>+</sup>	84
II) Efectos del NGF sobre las corrientes macroscópicas de Ca <sup>2+</sup> de las células $\beta$ pancreáticas	86
II.a) Efectos del NGF a corto plazo sobre la corriente de Ca <sup>2+</sup>	86
II.b) Efectos del NGF a largo plazo sobre la corriente de Ca <sup>2+</sup>	90
III) El papel de los canales iónicos sobre la extensión de neuritas	92

III.a) Efecto de la tetrodotoxina (TTX)	92
III.b) Efecto de la nifedipina	92
III.c) Efecto de la $\omega$ -conotoxina	93
III.d) La despolarización con KCl (40 mM) induce el crecimiento de procesos citoplásmicos	94
III.e) La actividad de los canales de Ca también afecta la longitud de los procesos de tipo neurítico	96
IV) Las células $\beta$ producen y secretan NGF y los niveles de RNAm para este factor y su receptor pueden ser modulados por los distintos tratamientos	97
CONCLUSIONES	101
PERSPECTIVAS	103
REFERENCIAS	105

## RESUMEN

La diferenciación y la fisiología de las células  $\beta$  pancreáticas se encuentran reguladas por una variedad de hormonas y factores de crecimiento, incluyendo al factor de crecimiento neural (NGF). Hemos estudiado los efectos del NGF sobre varios aspectos de la fisiología de las células  $\beta$  pancreáticas. Por ejemplo, hemos demostrado que las células  $\beta$  modifican su morfología en respuesta al NGF y/o dibutilil-AMPc (dbAMPc) (Vidaltamayo *et al.*, 1996) y que el NGF induce un aumento en la densidad de corriente de sodio en células cultivadas en presencia del factor durante 5 días (Rosenbaum *et al.*, 1996).

En este trabajo se analizó, por primera vez, el efecto del NGF y el dbAMPc, en conjunto, sobre las corrientes macroscópicas de sodio. Mostramos que el cultivo de las células  $\beta$  pancreáticas de rata adulta con NGF y dbAMPc, en conjunto, produce un aumento en la densidad de las corrientes macroscópicas de sodio, con respecto a las células control y que este aumento es comparable al que produce el cultivo de las células solamente con NGF.

Los cambios producidos por el NGF sobre la morfología y la fisiología en otras células de mamífero, se encuentran mediados por su interacción con los receptores de alta afinidad a este factor trófico (Trk A). La presencia de Trk A ha sido descrita en líneas de insulinoma de rata, como es el caso de las células RINm5F y en células  $\beta$  fetales de cultivos primarios. Sin embargo, la expresión de este receptor y la regulación de los niveles de su RNAm por NGF y/o dbAMPc, nunca había sido descrita en células  $\beta$  adultas provenientes de cultivos primarios. En este trabajo demostramos que las células  $\beta$  adultas de cultivos primarios poseen al receptor Trk A y que los niveles de su RNAm, pueden ser modulados por el NGF y/o dbAMPc.

Por otro lado, en el laboratorio se ha demostrado que la aplicación de NGF durante una hora a las células  $\beta$ , induce un aumento en la secreción de insulina por las células  $\beta$ . Es bien sabido que la secreción de insulina es un proceso que depende de la actividad de canales iónicos activados por voltaje que se encuentran presentes en la membrana de las células  $\beta$ . En especial, se ha descrito que los canales de calcio tipo L, son indispensables para el proceso de secreción de esta hormona. Por lo anterior y dado que los canales de calcio tipo L también son importantes para la extensión de procesos citoplásmicos en otros modelos celulares, decidimos estudiar los efectos del NGF, a corto y largo plazo, sobre las corrientes de calcio tipo L así como el papel de estos canales sobre la extensión de procesos de tipo neurítico por parte de las células  $\beta$  pancreáticas.

El análisis de las diferentes corrientes de calcio demostró, por primera vez, la presencia de canales de calcio de tipo N en las células  $\beta$  pancreáticas de rata provenientes de cultivos primarios. También se observa que, tanto una exposición corta (5 minutos), como el cultivo de las células  $\beta$  con el NGF por periodos prolongados (durante 5 días), inducen un aumento en la densidad de corriente macroscópica de bario. Cuando las células son expuestas al NGF durante 5 minutos, el factor induce un aumento del 63.5% en la densidad de corriente de bario, con respecto al control. Este aumento en la densidad de corriente de bario total se explica por un aumento del 51% en la densidad de corriente de calcio tipo L. Aunque existe una tendencia a que el NGF aumente la densidad de corriente de tipo N, este aumento no es estadísticamente significativo con respecto al control. En el caso de las células cultivadas en presencia del factor durante 5 días, también se observa un aumento del 63% en la densidad de corriente de calcio de tipo L; sin embargo, la corriente de calcio tipo N, desaparece con el tiempo en cultivo tanto en las células control como en las células cultivadas en presencia del factor.

Por otro lado, en este trabajo también se demuestra que la despolarización de las células  $\beta$  con KCl (40 mM), puede inducir la extensión de procesos parecidos a neuritas en estas células. Además, se muestra que los canales de sodio y los canales de calcio tipo L y N, son importantes en la extensión de procesos de tipo neurítico inducida por NGF y dbAMPc y por el KCl, ya que la aplicación de bloqueadores específicos de estos canales a los cultivos, induce la disminución en el porcentaje de células con procesos de tipo neurítico.

Así también, cabía la posibilidad de que las células  $\beta$  mismas pudieran sintetizar y secretar al NGF. Esto representaba una posibilidad interesante ya que, de ser así, sería posible sugerir funciones autocrinas y endocrinas para el NGF pancreático. En esta tesis se demuestra, por primera vez, que las células  $\beta$  sintetizan y secretan al NGF. Esta secreción es aumentada en respuesta a altas concentraciones de glucosa extracelular o potasio y disminuida por el dbAMPc. Además, el dbAMPc también disminuye los niveles de RNAm para NGF.

En conjunto, estos resultados sugieren funciones endocrinas y autocrinas para el NGF de las células  $\beta$  pancreáticas que, a su vez, podrían estar relacionados a la patología de la diabetes mellitus en la cual los niveles circulantes de NGF se encuentran disminuidos.

## ABSTRACT

Differentiation and function of pancreatic  $\beta$  cells are regulated by a variety of hormones and growth factors, including nerve growth factor (NGF). In our laboratory, we have studied the effect of NGF on different aspects of pancreatic  $\beta$ -cell physiology. For example, we have demonstrated that  $\beta$  cells modify their morphology in response to NGF and/or dibutyryl-cAMP (dbcAMP) (Vidaltamayo *et al.*, 1996) and that NGF induces an increase in sodium current density of cells cultured in the presence of this factor for 5 days (Rosenbaum *et al.*, 1996). Nevertheless, the effect of NGF and dbcAMP, on sodium macroscopic currents has not been studied. In this study we also show that the culture of adult rat pancreatic  $\beta$  cells with NGF and dbcAMP, together, induces an increase on the sodium macroscopic current density with respect to control cells and that this increase is similar to the one induced by the culture of cells only with NGF.

NGF induces its effects on the morphology and physiology of other mammalian cells through its interaction with its high-affinity receptors (Trk A). The presence of Trk A has been described in insulinoma rat cell-lines, such as RINm5F cells, and in fetal  $\beta$  cells from primary cultures. Nevertheless, the expression of this receptor and the regulation of the levels of its mRNA by NGF and/or dbcAMP, have never been described in  $\beta$  cells from primary cultures. Moreover, it was possible that  $\beta$  cells could synthesize and secrete NGF. This was an interesting possibility since it would suggest possible autocrine and endocrine roles for pancreatic NGF. Taking all this into account, in this work we demonstrate that  $\beta$  cells from primary cultures possess the Trk A receptor and its mRNA steady-state levels can be modulated by NGF and/or dbcAMP.

On the other hand, we have shown that the addition of NGF to  $\beta$  cells for one hour induces an increase in insulin secretion. It is well known that insulin secretion is a process which depends upon the activity of voltage-dependent ion channels present in the membrane of  $\beta$  cells. In particular, it has been described that L-type calcium channels are necessary for the secretion of this hormone.

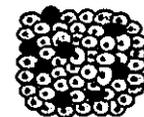
In this work, we demonstrate the presence of N-type calcium channels in pancreatic  $\beta$  cells from primary cultures, for the first time. We also observe that both, a short exposition to NGF (5 minutes) and the culture of  $\beta$  cells with the factor, induce an increase in the macroscopic barium current density. When cells are exposed to NGF during 5 minutes, the

factor induces an increase in the barium current density, with respect to control cells. This increase in the total barium current density is due to an increase in the L-type current density, with respect to control cells. Although there is a tendency of NGF to increase in N-type current density with respect to control cells, this increase is not statistically significant. In the case of cells cultured with the factor for 5 days, we also observe an increase in the L-type calcium current density; nevertheless, N-type calcium currents disappear with time in culture in control cells and in cells cultured with NGF.

On the other hand, we also demonstrate that sodium channels and L- and N-type calcium channels are important for the extension of neurite-like processes induced by NGF and dbcAMP and by a depolarizing agent (KCl 40 mM) since the addition of specific blockers of these channels to the cell cultures, induces a decrease in the percentage of cells with neurite-like processes.

It was also possible that  $\beta$  cells could synthesize and secrete NGF. This represented an interesting possibility since it would suggest autocrine and endocrine roles for pancreatic NGF. In this study we demonstrate, for the first time, that  $\beta$  cells synthesize and secrete NGF. This secretion is increased in response to high extracellular glucose and potassium concentrations and decreased by dbcAMP. The steady-state levels of mRNA for NGF are diminished by dbcAMP, opposite to the effect of this molecule on insulin secretion.

Taken together, these findings suggest endocrine and autocrine roles for pancreatic  $\beta$ -cell NGF, which, in turn, could be related to the pathogenesis of diabetes mellitus where serum NGF levels are diminished.



## INTRODUCCIÓN

El factor de crecimiento neural (NGF) ha sido implicado en la sobrevivencia y diferenciación de sistemas neuronales y no neuronales (Levi-Montalcini, 1987). En particular, induce cambios morfológicos y fisiológicos en las células  $\beta$  pancreáticas, incluyendo un aumento en la densidad de corriente de sodio (Rosenbaum *et al.*, 1996) y la extensión de procesos de tipo neurítico efecto que es potenciado por el dibutilil-AMPc (dbAMPc) (Vidaltamayo *et al.*, 1996). En conjunto, estos datos sugieren que el NGF es un factor importante en el mantenimiento de la función endocrina de las células  $\beta$  *in vitro*. Este proyecto está enfocado a determinar si el NGF puede modular otros aspectos de la fisiología de las células  $\beta$  pancreáticas así como determinar si este factor puede tener funciones autocrinas y paracrinas.

### A) EL PÁNCREAS Y SU ESTRUCTURA

#### A.1) Anatomía del páncreas.

El páncreas de los mamíferos es una glándula mixta formada por una parte exocrina y otra endocrina. En la parte exocrina se elabora el jugo pancreático, rico en enzimas- tripsina, amilasa, etc.- que pasa por los conductos excretores al duodeno, donde sus enzimas participan en la digestión de proteínas, grasas e hidratos de carbono hasta obtener los productos finales. En la parte endocrina se sintetizan varias hormonas: insulina, glucagon, somatostatina, péptido vaso intestinal (VIP) y polipéptido pancreático, que participan en la regulación del metabolismo tisular de los hidratos de carbono, de las proteínas y la grasa (Quiroz, 1990).

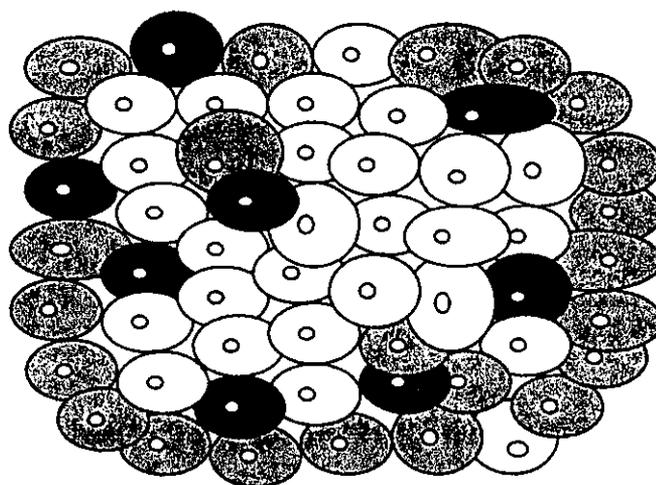
La superficie del páncreas está cubierta con una cápsula conjuntiva fina que se fusiona con la hoja visceral del peritoneo. Su parénquima está dividido en lobulillos, entre los cuales pasan cordones conjuntivos. En los mismos están alojados vasos sanguíneos, nervios, corpúsculos de Vater Pacini y conductos excretores. La parte exocrina de la glándula en los lobulillos está representada por los acinos y los conductos excretores intralobulares, así como por los conductos excretores interlobulillares y el conducto pancreático que se abre al duodeno (Hiriart, 1997).

Los islotes pancreáticos ocupan solamente cerca del 2% del parénquima y se encuentran distribuidos entre el tejido acinar (Hiriart, 1997). En la figura 1, se esquematizan los distintos tipos celulares que constituyen al islote pancreático:

-Las células  $\beta$ , secretan insulina, constituyen cerca del 70% del volumen insular y están localizadas preferentemente al centro del islote, aunque también en menor proporción en la periferia, donde hacen contacto con otros tipos celulares.

-Las células  $\alpha$ , secretan glucagon, constituyen cerca del 15% del islote y se localizan en la periferia del islote.

-Las células  $\delta$ , secretan somatostatina, comprenden cerca del 5% del volumen insular.



Tipo celular	Hormona secretada
Célula $\alpha$	 Glucagon
Célula $\beta$	 Insulina
Célula $\delta$	 Somatostatina

Figura 1. Esquema de un islote Pancreático (Modificada de Taborsky, 1989).

Además, es posible encontrar, en menor proporción, células F o PP que secretan polipéptido pancreático (Orci y Unger, 1975).

Los islotes pancreáticos están muy vascularizados, de una a tres arteriolas aferentes entran en el islote y se ramifican dando una extensa red capilar. El flujo sanguíneo en el islote va del centro hacia la periferia, por lo que las células  $\alpha$  y  $\delta$  son perfundidas por una sangre rica en insulina. Las venas eferentes insulares van a dar al sistema porta, así la sangre que llega al páncreas exocrino y al hígado es rica en hormonas pancreáticas (Hiriart, 1997).

Dentro del islote pancreático existen interacciones paracrinas, sobre todo entre las células de la periferia. Por ejemplo, se ha observado que el glucagon estimula la secreción de insulina, mientras que la somatostatina y el polipéptido pancreático la inhiben (Hiriart, 1997).

Los islotes se encuentran inervados por el sistema nervioso autónomo, simpático y parasimpático (Hiriart, 1997):

- a) Existen fibras simpáticas catecolaminérgicas que proceden del nervio esplácnico y entran al islote por la vía del ganglio cefálico. La adrenalina y la noradrenalina inhiben la secreción de insulina y aumentan la del glucagon.
- b) Las fibras preganglionares parasimpáticas proceden del vago y terminan en un ganglio cercano al páncreas. Las fibras posganglionares son predominantemente colinérgicas, aunque también hay algunas peptidérgicas.

## **A.2) Heterogeneidad funcional.**

Las células  $\beta$  del islote pancreático son heterogéneas. Entre estas diferencias se encuentran:

- a) Diferencias en la actividad eléctrica en respuesta a la glucosa. Por ejemplo, Dean y Matthews, en 1970, encontraron que algunas células responden a concentraciones bajas de glucosa (4 mM) y disparan potenciales de acción, en cambio, otras células sólo lo hacen a concentraciones altas de glucosa de hasta 28 mM.

b) En estudios realizados con microscopía de luz y fluorescencia, se ha observado que las células  $\beta$  del islote pancreático tienen diferente contenido de insulina (Pipeleers *et al.*, 1987).

c) Se ha propuesto la existencia de dos subpoblaciones de células  $\beta$  en ratones obesos: una sensible a glucosa con una tasa alta de transporte y otra que no es sensible a la glucosa y que posee una tasa de transporte baja (Tominaga *et al.*, 1986).

d) Existen diferencias intercelulares en la biosíntesis de insulina estimulada por glucosa y en el almacenamiento de insulina (Schuit *et al.*, 1988; Pipeleers *et al.*, 1987).

e) Hiriart y Ramírez-Medeles, en 1991, describieron que existe una heterogeneidad funcional entre las células  $\beta$  de rata. Estos autores demostraron que la respuesta de las células individuales ante concentraciones estimuladoras de glucosa extracelular, varía ampliamente. En base a esto, se ha sugerido la existencia de diferentes subpoblaciones de células  $\beta$  que podrían ser clasificadas de acuerdo a la cantidad de insulina secretada.

## **B) LA INSULINA Y SU ESTRUCTURA.**

La insulina es un péptido de peso molecular de 5700 a 6100, cuya estructura se encuentra bien conservada a través de la evolución de los vertebrados. Esta hormona es un miembro de una superfamilia de proteínas en las que están los factores de crecimiento parecidos a la insulina (IGFI e IGFII) y la hormona ovárica relaxina.

La insulina consiste en una cadena A (con 21 aminoácidos) y una cadena B (con 30 aminoácidos) conectadas por dos puentes disulfuro intercatenarios (A7-B y A20-B19), con una unión intracatenaria entre A6 y A11. Algunas de las características conservadas incluyen las posiciones de los tres puentes disulfuro, las regiones amino y carboxilo terminales de la cadena A y los residuos hidrofóbicos en la región carboxilo terminal de la cadena B (Steiner *et al.*, 1989).

## B.1) Síntesis de insulina.

La insulina es sintetizada inicialmente como un precursor de una sola cadena, la preproinsulina. El gen para la insulina humana se localiza en el brazo corto del cromosoma 11. El gen se transcribe en un ARN primario. El procesamiento postranscripcional incluye la escisión de intrones y la poliadenilación del extremo 3' para producir el ARN mensajero para la preproinsulina (Briggs *et al.*, 1986).

La preproinsulina es un péptido lineal formado por 110 aminoácidos de peso molecular de 12 kDa y que se encuentra conformada por la secuencia de la proinsulina y un péptido señal de 24 aminoácidos en el extremo N- terminal y que constituye a la secuencia "pre". La secuencia señal de la preproinsulina es removida por la peptidasa de la señal y degradada en el lumen del retículo endoplásmico (RE) para formar la proinsulina, ya sea durante o poco después de la translocación (Lively *et al.*, 1989).

Se piensa que este proceso se encuentra catalizado por 2 proteínas del RE: proteína de unión a cadenas pesadas (BiP), que se une a proteínas recién sintetizadas y completamente dobladas impidiendo que se agreguen (Lively, 1989) y la proteína disulfuro isomerasa (PDI) que cataliza la isomerización de puentes disulfuro de proteínas (Freedman, 1984).

Debido a que la proinsulina carece de la secuencia KDEL (Lys- Asp- Glu- Leu) en el C- terminal es capaz de viajar al complejo de Golgi en donde se forman los gránulos de secreción de la cisterna trans como se ilustra en la figura 2.

La proinsulina es convertida en insulina por actividad de endopeptidasas. No se conoce bien como ocurre esto, pero se ha propuesto que existen dos tipos de actividades de endopeptidasas en los gránulos de secreción. Las enzimas designadas como tipo 1 y tipo 2 poseen especificidad por aminoácidos básicos: la endopeptidasa tipo 1 corta a la proinsulina en el extremo C- terminal de la Arg31 y Arg32, mientras que la endopeptidasa tipo 2 corta predominantemente en el lado carboxilo de la Lys64 y Arg65 y tiene especificidad por el sitio de la Arg31 y de la Arg32. Finalmente, después de las escisiones, el resultado es la forma

madura de la insulina (es decir, la cadena A y la cadena B unidas por puentes disulfuro más péptido C libre dentro de los gránulos de insulina) (Davidson *et al.*, 1988).

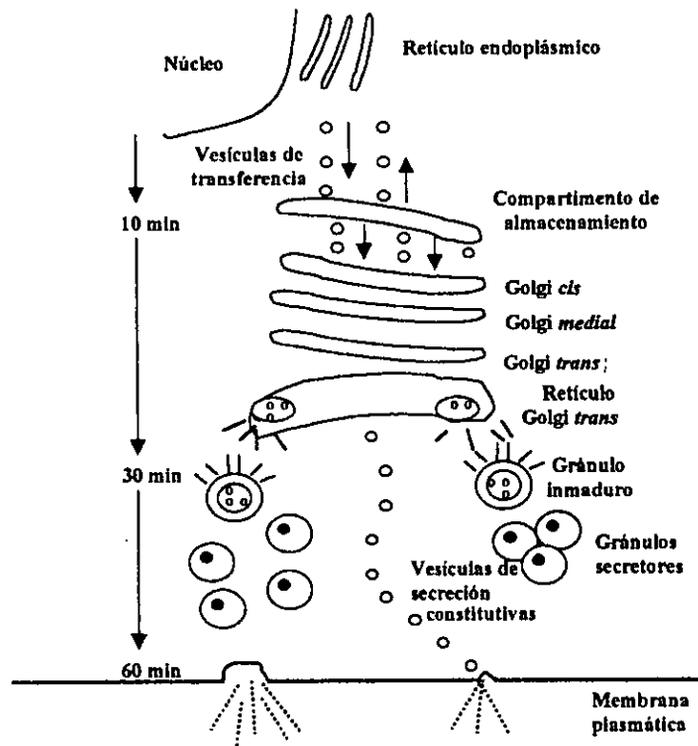


Figura 2. Biosíntesis de insulina (Modificada de Bailyes *et al.*, 1992).

### C) LA SECRECIÓN DE INSULINA

Las sustancias que estimulan la secreción de insulina se pueden dividir en iniciadores y potenciadores de la secreción. Los iniciadores capaces de estimular la secreción son nutrientes que son metabolizados por la células  $\beta$ , como es el caso de la glucosa, así como sustancias que estimulan el metabolismo de nutrientes endógenos y drogas como las sulfonilureas, la tolbutamida y la glibenclamida (Hiriart, 1997).

Los potenciadores aumentan la secreción de insulina en presencia de nutrientes. Entre estos últimos encontramos a las hormonas, como el glucagon, el VIP, el péptido inhibitorio gastrointestinal (GIP) o neurotransmisores, como la acetilcolina (ACh) (Hiriart, 1997).

Por otro lado, la secreción de insulina puede ser inhibida por hormonas como la somatostatina, la galanina y la adrenalina y los agentes  $\alpha_2$  adrenérgicos (Hiriart, 1997).

### C.1) Acoplamiento entre el estímulo con glucosa y la secreción de insulina.

La concentración plasmática de glucosa, en condiciones basales, es alrededor de 4.5 a 5.5 mM. Después de comer, la secreción de insulina se incrementa de 5 a 10 veces, y la cinética de secreción de esta hormona adquiere un comportamiento bifásico. Después de un periodo de latencia, la liberación hormonal aumenta hasta un máximo y regresa a su nivel basal en 2 a 5 minutos, seguido de un nuevo ascenso gradual y sostenido de la secreción. Cuando la concentración de glucosa es reducida se observa una espiga negativa transitoria.

Los mecanismos de acoplamiento entre el estímulo y la secreción en las células  $\beta$  son complejos. No existe un receptor membranal a la glucosa, ésta entra a la célula por medio de un transportador y tiene que ser metabolizada para ejercer su acción estimulante. En la figura 3 se esquematiza el acoplamiento entre el estímulo con glucosa y la secreción de insulina (Hiriart, 1997).

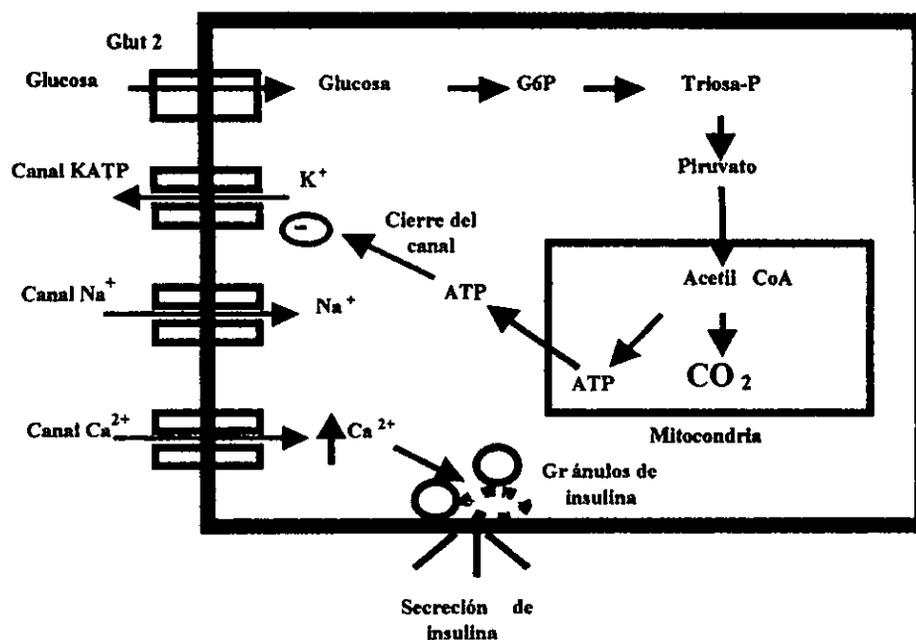


Figura 3) Esquema del acoplamiento entre el estímulo con la glucosa y la secreción de insulina.

(Tomada de Hiriart, 1997). Glut 2 = transportador de glucosa tipo 2.

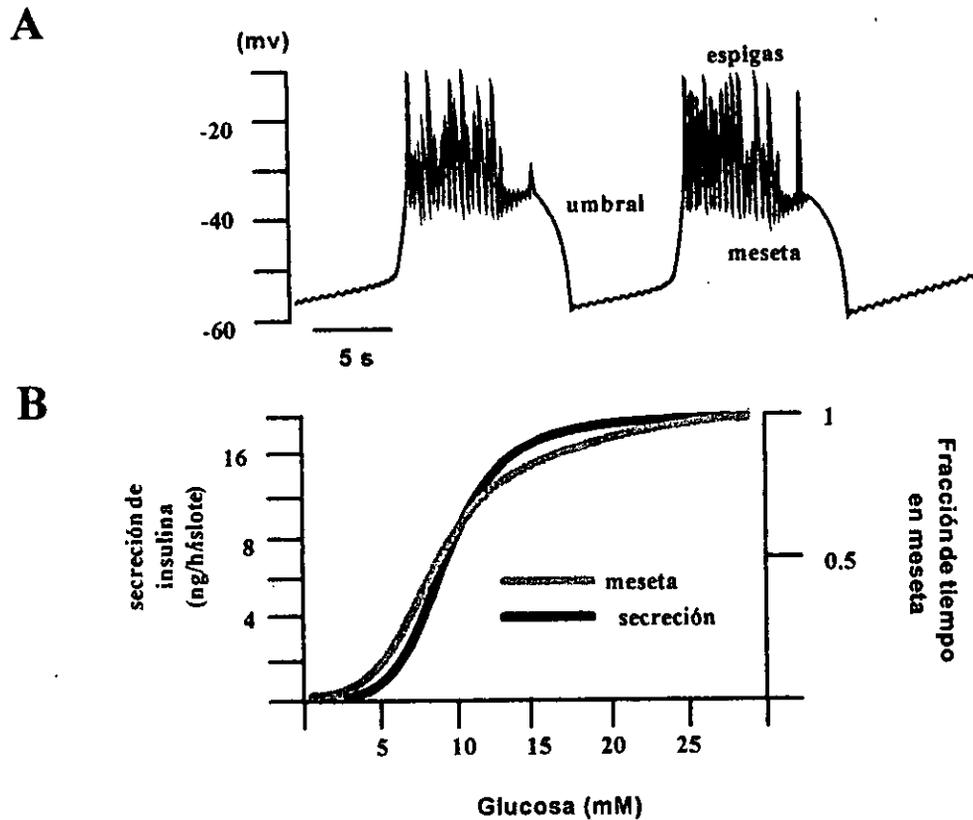
En resumen, la glucosa entra a la célula por difusión facilitada, mediante un transportador de glucosa tipo GLUT2. La glucosa es fosforilada por dos enzimas existentes, la glucocinasa (GK) y la hexocinasa. Mediante varios pasos enzimáticos, la glucosa es convertida en piruvato y se sintetiza ATP.

### **C.2) La actividad eléctrica de la célula $\beta$ pancreática.**

Hay evidencias considerables de que la actividad eléctrica de la célula  $\beta$  juega un papel importante en el acoplamiento entre el estímulo y la secreción hormonal. Algunas de estas evidencias se han obtenido del registro del potencial de membrana de células  $\beta$  en islotes de Langerhans (Henquin y Meissner, 1984). Tales estudios han demostrado que cuando la concentración de glucosa es subestimuladora, las células están polarizadas con un potencial de membrana de  $-70$  mV aproximadamente.

El metabolismo de la glucosa, provoca un cambio en la relación ATP/ADP que está acoplada a una despolarización lenta de la membrana de la célula  $\beta$  debido al cierre de los canales de K dependientes de ATP (KATP). A concentraciones estimulantes de glucosa (mayores a 7 mM), la despolarización es suficiente para llevar a la membrana a un potencial umbral donde hay una despolarización rápida hasta un nivel de meseta en el que se superponen trenes de potenciales de acción, después de lo cual la célula se repolariza, continuando con una actividad eléctrica oscilatoria mientras el nivel extracelular de glucosa sea alto (Ashcroft *et al.*, 1989) (figura 4).

El aumento en la secreción de insulina estimulada por glucosa, está asociada a un aumento en la duración de la fase de meseta o a un aumento en la frecuencia de presentación de las mesetas (Atwater *et al.*, 1979).



**Figura 4. Actividad eléctrica de células  $\beta$  y correlación que existe entre esta actividad y la secreción de insulina (Modificada de Ozawa *et al.*, 1986).** (A) Esta figura muestra la actividad eléctrica de células  $\beta$  de ratón estimuladas con 10 mM glucosa: Cuando la concentración de glucosa es estimuladora, al célula presenta una despolarización lenta, seguida por una despolarización rápida hasta un nivel de meseta en el cual se superponen trenes de potenciales de espigas. Posteriormente, la célula se repolariza. Si la concentración de glucosa sigue siendo alta, se inicia otro ciclo de actividad eléctrica. (B) El tiempo que la célula permanece despolarizada, en el nivel de la meseta disparando potenciales de acción, está estrechamente correlacionado con la concentración extracelular de glucosa y con la secreción de insulina (Hiriart, 1997).

La actividad eléctrica es el resultado de la actividad de diversos canales iónicos presentes en la membrana celular de las células  $\beta$ : además de los canales de K<sub>ATP</sub>, las células  $\beta$  poseen canales de Na, Ca y otros canales de K, que son importantes para la despolarización de la membrana y el aumento de calcio intracelular lleva a la secreción de insulina (Hiriart y Mattesson, 1988) (figura 3).

### C.2.1) Canales de K

El fenómeno iónico más temprano asociado con la secreción de insulina es una disminución en la salida de K (Henquin, 1990). Hay dos tipos de canales de K que son afectados por el metabolismo de la glucosa:

- 1) El canal de K sensible a ATP cuya actividad disminuye cuando el metabolismo de la glucosa incrementa la relación de ATP/ADP.
- 2) El canal de K sensible a  $Ca^{2+}$  que es activado en presencia de  $Ca^{2+}$  cuando la concentración de este último ion aumenta en el citosol debido a su entrada a través de canales de calcio sensibles al voltaje. La acumulación de  $Ca^{2+}$  en el citosol lleva a la activación del canal de K sensible a  $Ca^{2+}$ , que aumenta la entrada de  $K^+$  y repolariza a la membrana, impidiendo una posterior apertura de los canales de Ca (Boyd, 1992).

### C.2.2) Canales de Na.

La corriente de  $Na^+$  en las células  $\beta$ , puede ser identificada por su rápida activación, su rápida inactivación y por su sensibilidad a los bloqueadores específicos como la tetrodotoxina (TTX) y la saxitoxina (STX). Las corrientes de  $Na^+$  se activan a potenciales más positivos que  $-50$  mV con un pico entre  $0$  y  $+10$  mV y cuyo potencial de inversión depende del potencial de equilibrio del  $Na^+$  (Hiriart y Mattesson, 1988; Ashcroft y Rorsman, 1989).

En 1988 Hiriart y Mattesson demostraron que las células  $\beta$  de rata poseen canales de Na sensibles a TTX que se activan rápidamente llegando a un máximo y luego se inactivan durante una despolarización mantenida. La corriente transitoria invierte su dirección de entrante a saliente entre  $+40$  y  $+60$  mV, potencial cercano al potencial de equilibrio calculado para el  $Na^+$ . Esta corriente se activa a  $-30$  mV y llega a un máximo alrededor de  $+10$  mV, es transitoria, bloqueada por TTX y su magnitud disminuye cuando se reduce la concentración de  $Na^+$  extracelular, lo cual indica que es acarreada por canales de Na sensibles a voltaje.

En el mismo estudio, se demostró que la TTX disminuye la secreción de insulina de las células  $\beta$  estimuladas con concentraciones altas de glucosa (10-20 mM), lo que demuestra que los canales de Na de las células  $\beta$  de rata son importantes en el acoplamiento entre el estímulo y la secreción.

Por otro lado, los canales de Na podrían ser importantes para la fase final de la despolarización lenta o incluso, al principio de la despolarización rápida ya que su apertura despolarizaría a la membrana llevándola hasta el potencial al que aumenta la probabilidad de apertura de los canales de Ca.

### C.2.3) Canales de Ca

Se han identificado 3 tipos de canales de Ca en las células  $\beta$  pancreáticas. Estos son el canal tipo T (de lenta desactivación, SD), que se activa a potenciales cercanos a  $-40$  mV y los L y N (de desactivación rápida, FD), que se activan a potenciales más positivos que  $-10$  mV (Hiriart y Mattesson, 1988; Pollo *et al.*, 1993; Findlay y Dune, 1985). De manera interesante, el canal de Ca tipo N que aquí se menciona, solamente ha sido observado en líneas de insulinoma de rata como las células RINm5F (Pollo *et al.*, 1993).

Los canales tipo T son sensibles al bloqueo con  $\text{Ni}^{2+}$ . En 1988, Hiriart y Mattesson propusieron que los canales de Ca tipo T podrían estar involucrados en la despolarización inicial de la meseta debido a que se activan a potenciales más negativos que los canales tipo L, pero se inactivan al aumentar la duración del pulso despolarizante.

En cuanto a los canales FD, se ha demostrado en la línea celular RINm5F que la mayor parte de la corriente es acarreada por los canales tipo L (76%) y que el resto de las corrientes resistentes a bloqueadores de estos canales, son sensibles a bloqueadores de canales tipo N (10-20%) (Pollo *et al.*, 1993).

Las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L son sensibles a las acciones de las dihidropiridinas, ya que la nifedipina es capaz de inhibir estas corrientes y el BAY K 8644 es capaz de aumentarlas (Smith *et al.*, 1989). También se ha descrito que la actividad de estos canales declina con el

tiempo de perfusión intracelular, fenómeno conocido como “lavado”, dependiente de la fosforilación del canal y que puede ser reducido utilizando Mg-ATP dentro de la pipeta de registro (Hiriart y Mattesson, 1988).

En especial, los canales tipo L son importantes en la secreción de insulina ya que se ha descrito que podrían ser los responsables tanto de la despolarización para el potencial de acción como del potencial de meseta (Hiriart y Mattesson, 1988; Ashcroft y Rorsman, 1989).

## **D) EL FACTOR DE CRECIMIENTO NEURONAL.**

### **D.1) El descubrimiento del NGF.**

El NGF fue el primer factor de crecimiento en ser descrito. Durante la década de los cincuentas, Elmer Brueker, observó que al transplantar fragmentos de sarcoma 180 de ratón a embriones de pollo de 3 días, las fibras nerviosas que emergían de los ganglios dorsales presentaban acceso al tejido neoplásico mientras que las fibras nerviosas no entraban en el tumor. Con base en estas observaciones se concluyó que las propiedades histoquímicas del sarcoma proporcionaban un campo favorable para el crecimiento de fibras sensoriales (Bruecker, 1948).

Posteriormente, se descubrió que los embriones en donde se había transplantado este sarcoma, presentaban fibras nerviosas simpáticas que inervaban vísceras que nunca eran inervadas en los embriones normales. También se encontró que estas fibras simpáticas se desarrollaban dentro de las venas del hospedero donde formaban grandes neuronas que obstruían la circulación sanguínea. Con esto surge la hipótesis de que estos efectos anormales podrían deberse a la presencia de un agente difusible producido por las células neoplásicas (Cohen y Levi-Montalcini, 1956).

En 1960, Cohen purificó al NGF, se demostró que la presencia de NGF es necesaria para el desarrollo normal del sistema nervioso, ya que la inyección de anticuerpos contra NGF en roedores recién nacidos destruye selectivamente al sistema nervioso simpático periférico.

Las funciones biológicas más importantes del NGF incluyen: su acción neurotrófica tanto *in vivo* como *in vitro*; su habilidad para modular el programa de diferenciación de las células neuronales precursoras y su contribución al mantenimiento del fenotipo diferenciado adquirido (Aloe y Levi-Montalcini, 1977; Gorin y Johnson, 1979).

Se ha demostrado que el NGF es importante para el desarrollo y sobrevivencia de neuronas colinérgicas del cerebro frontal, neuronas postganglionares simpáticas y células ganglionares sensoriales derivadas de cresta neural (Server y Shooter, 1977).

El NGF es producido por células en blancos periféricos de axones simpáticos y sensoriales así como por células de Schwann y los macrófagos de nervios periféricos en desarrollo. Los niveles más altos de NGF en el cerebro de mamífero ocurren en regiones de la formación hipocámpal y la corteza cerebral (Junqueira *et al.*, 1989).

Las células cromafines y la línea celular PC12 de feocromocitoma de rata se han convertido en los modelos elegidos para estudiar la capacidad del NGF en la modulación de la expresión fenotípica y los mecanismos moleculares adyacentes a este proceso. Cuando las células PC12 son cultivadas en presencia de NGF se diferencian dando lugar a neuronas de tipo simpático, dado que desarrollan neuritas, dejan de dividirse y se vuelven eléctricamente excitables (Bruecker, 1948; Gunning *et al.*, 1981; Heidemann *et al.*, 1986; Lillien *et al.*, 1985).

## D.2) Estructura del NGF y sus receptores.

Se ha descrito que la glándula submaxilar de ratón es una fuente rica de NGF (Bocchini y Angeletti, 1969). La estructura del NGF, aislado a partir de esta glándula, es un complejo de alto peso molecular que contiene tres subtipos de cadenas polipeptídicas designadas como  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  asociadas por fuerzas no covalentes débiles. El complejo posee un peso molecular de aproximadamente 130 kDa y tiene un coeficiente de sedimentación de 7S.

Sin embargo, se ha visto que la actividad biológica del NGF se encuentra asociada con una proteína de peso molecular de 30 K con una constante de sedimentación de 2.5 S ( $\beta$ ) (Frazier *et al.*, 1973). Por medio del análisis de sedimentación y fraccionamiento de péptidos tripticos

(obtenidos por la digestión con tripsina) solubles se encontró que el NGF 2.5 S posee una estructura dimérica compuesta por 2 subunidades idénticas de peso molecular de 14,500. Posteriormente, se estableció que cada cadena polipeptídica poseía 3 enlaces disulfuro y que las subunidades se encontraban asociadas por fuerzas no covalentes.

La subunidad 2.5 S del NGF está compuesta por 118 aminoácidos y posee un dominio con alto contenido en lisina, ácido aspártico, alanina, valina y leucina y dos dominios con alto contenido en ácido glutámico y glicina (figura 5) (Bradshaw y Angeletti, 1971).

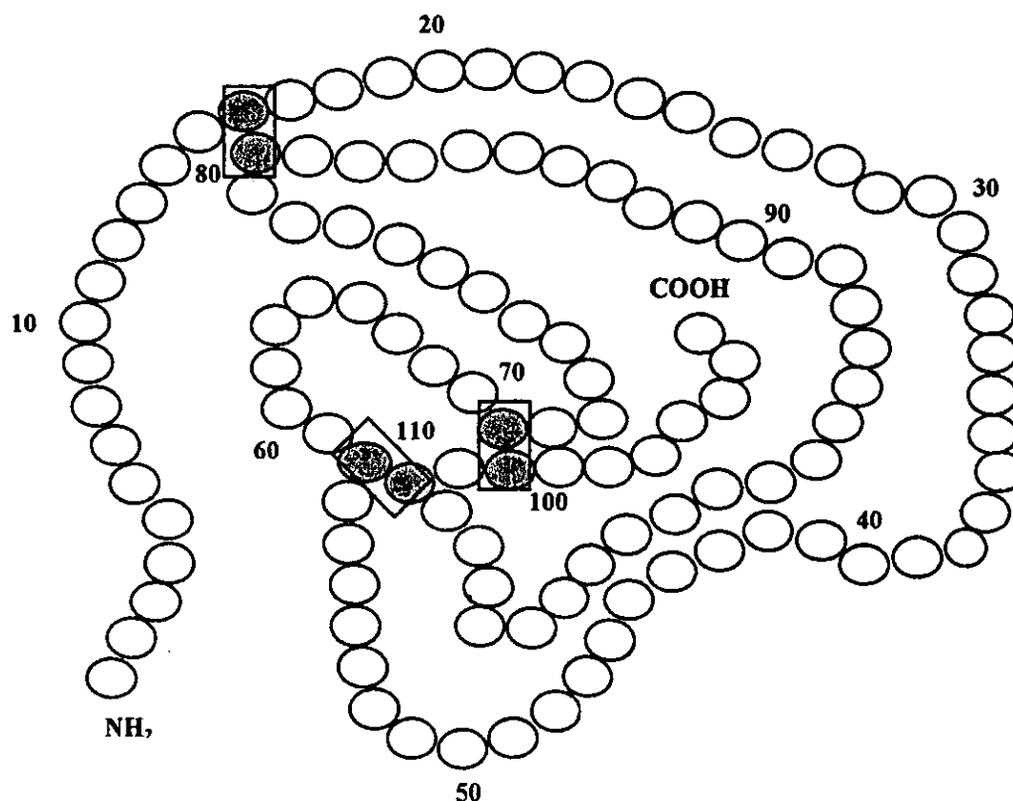


Figura 5. Subunidad 2.5S ( $\beta$ ) del NGF, con actividad biológica (Modificada de Angeletti y Bradshaw, 1971).

Los círculos rellenos representan puentes disulfuro.

La habilidad del NGF para ejercer sus acciones tróficas, de diferenciación y mitogénicas sobre sus células blanco, está mediada por la unión de alta afinidad a los receptores de la superficie celular (Levi-Montalcini, 1987). Existen dos clases de receptores para el NGF: los de alta afinidad (con una constante de disociación,  $K_d=10^{-11}$  M) y los de baja afinidad ( $K_d=10^{-9}$  M) (Levi-Montalcini, 1987) (figura 6). El receptor de alta afinidad es una proteína de 140 kDa que se

denomina trk A (p140<sup>trkA</sup>), y el receptor de baja afinidad es una proteína de 75 kDa que se denomina p75<sup>NGFR</sup> (Cohen y Levi-Montalcini, 1956; Levi-Montalcini, 1987).

El receptor de baja afinidad al NGF (LNGFR o p75<sup>NGFR</sup>) es una cadena polipeptídica sencilla de aproximadamente 400 residuos de aminoácidos, con un dominio único que atraviesa la membrana y que separa un dominio extracelular ligeramente más largo de un dominio intracelular más corto (Meakin y Shooter, 1992). Las regiones ricas en cisteína (en forma de anillos) determinan el dominio de unión al NGF (Welcher *et al.*, 1991) y cada uno de estos anillos se requiere y ordena de tal manera que forma un sitio correcto de unión del NGF (Hempstead *et al.*, 1991).

Es interesante notar que a la región intracelular de este receptor no se le ha comprobado ninguna interacción con los mecanismos de transducción de señales conocidos, sin embargo, se piensa que podría existir alguna relación con la transducción de señales ya que cuando el NGF se une a esta proteína, el complejo que se forma (NGF-p75<sup>NGFR</sup>) es internalizado por endocitosis (Levi-Montalcini, 1987).

Se ha demostrado que el NGF se une al producto del proto-oncogén trk en células PC12 (Kaplan *et al.*, 1991; Hempstead *et al.*, 1991). El producto del proto-oncogén trk es una glucoproteína transmembranal que se expresa selectivamente en el sistema nervioso en desarrollo. Este receptor de alta afinidad pertenece a la familia de las cinasas de proteínas que fosforilan sus substratos en residuos de tirosina (cinasas de tirosina) (Kaplan *et al.*, 1991).

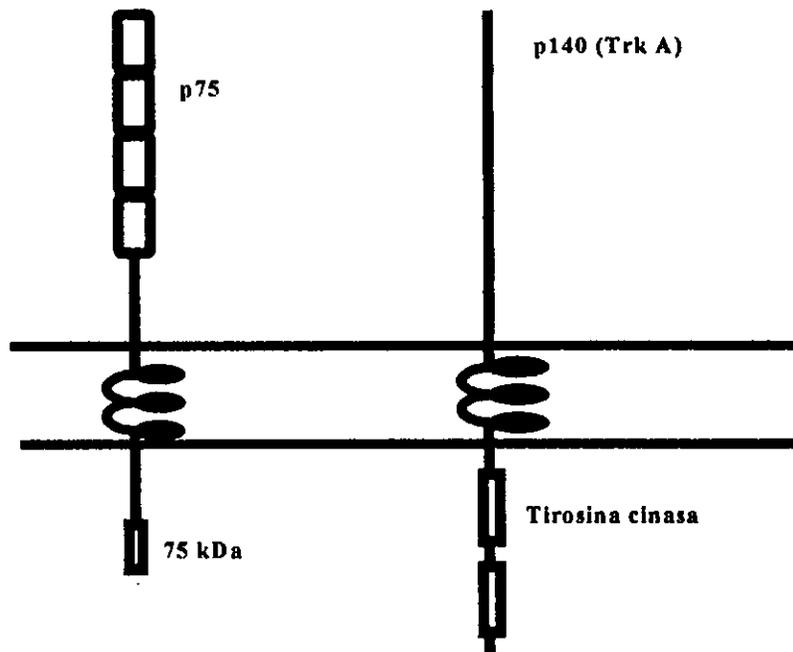


Figura 6. Receptores a NGF. (Modificada de Meakin y Shooter, 1992).

### D.3) Mecanismos que transducen en la señal mediada por NGF.

No se conocen bien las vías de transducción de señales para los receptores del tipo tirosinas cinasas como lo es el caso del receptor del NGF; sin embargo, descubrimientos recientes sobre las interacciones proteína a proteína inducidos por la activación de los receptores han arrojado luz sobre este tema.

Se piensa que los receptores a neurotrofinas se dimerizan después de la unión del ligando llevando a la activación del dominio de las cinasas de tirosina de los receptores y provocando la autofosforilación de los residuos de tirosina (Levi-Montalcini, 1987). Estas tirosinas fosforiladas sirven como sitios de unión para un gran número de moléculas que contienen dominios de homología *src* (SH2) funcionalmente relacionadas. Entre estas se encuentran, la tirosina cinasa pp60<sup>src</sup>, la fosfolipasa C (PLC) $\beta$ , *ras*, la proteína activadora de GTPasa (GAP), la fosfatasa de proteína tirosina (PTPasa) 1C y la oncoproteína *vav*. Por otro lado, la unión del NGF a su receptor de alta afinidad también activa a la cinasa IP-3 y lleva a la fosforilación de proteínas *Shc* que, a su vez, se unen a una proteína adaptadora de SH2, la Grb2 (figura 7).

El NGF induce la asociación de la proteína Shc con Grb2 (que es una proteína adaptadora), que interactúa con SOS activa a la proteína Ras que, a su vez, activa a B-Raf. Esta última es la encargada de activar a las cinasas MEK, que promueven la actividad de las cinasas activadas por mitógeno (MAP cinasas) (Calissano *et al.*, 1984; Greene y Tischler, 1982; Greenberg *et al.*, 1985).

Finalmente, las MAP cinasas (MAPK) pueden activar a proteínas como *Rsk* y *Erk* que parecen tener efectos sobre eventos de transcripción en el núcleo que llevan a la diferenciación o a la proliferación celular (figura 7).

Es importante mencionar que, aunque algunos de los factores de crecimiento que se asocian a receptores del tipo de las tirosil cinasas inducen la proliferación de las células, el resultado final de la interacción del ligando con su receptor depende del estado metabólico y del estado de desarrollo de la célula, ya que, por ejemplo, en las células  $\beta$  pancreáticas adultas, el NGF no induce la proliferación de las mismas.

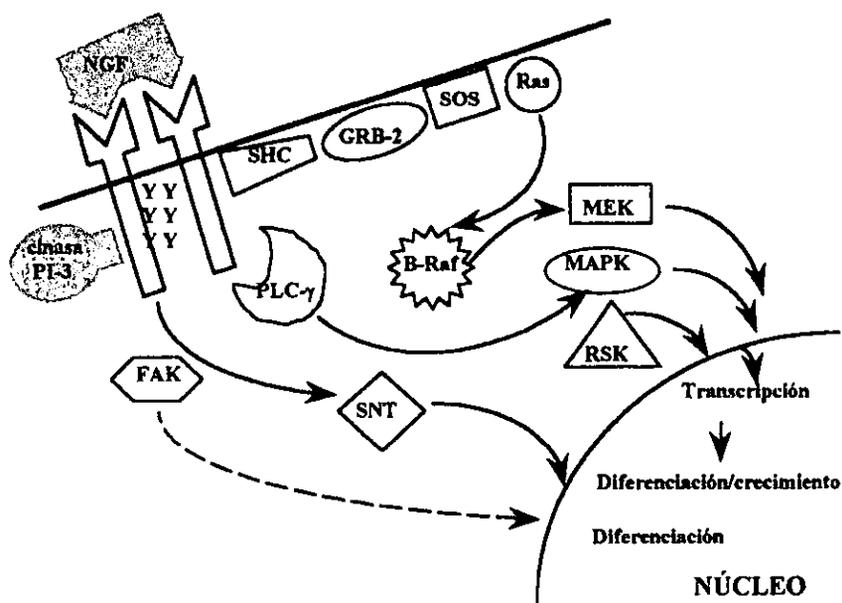


Figura 7. Vía de transducción de señales que induce la unión del NGF a su receptor de alta afinidad. Explicación en el texto (Modificada de Schlessinger y Ulrich, 1992).

## E) CARACTERÍSTICAS QUE COMPARTEN LAS CÉLULAS $\beta$ PANCREÁTICAS CON CÉLULAS DERIVADAS DE LA CRESTA NEURAL.

Aunque el origen embrionario de la célula  $\beta$  pancreática no ha sido completamente esclarecido, existen varios marcadores que las células  $\beta$  comparten con células derivadas de la cresta neural (Le Douarin, 1988; Alpert *et al.*, 1988). Los primeros de estos marcadores identificados fueron las monoaminas fluorogénicas, características de las células del sistema neuroendocrino difuso, también llamado APUD, porque las células capturan y descarboxilan precursores de aminas (Pearse, 1976; Fontaine y Le Douarin, 1974). Estas características compartidas llevaron a proponer un origen común para el sistema nervioso y para algunas células del sistema endocrino.

Otros marcadores expresados por las células  $\beta$  que son compartidos por las células de origen neuroectodérmico, son : la enolasa específica neuronal (Pearse, 1966; Polak *et al.*, 1993), la dopa descarboxilasa (Teitelman *et al.*, 1987), la tirosina hidroxilasa y la feniletanolamina N-metiltransferasa (Teitelman *et al.*, 1988). Además de estas proteínas, las células  $\beta$  sintetizan ácido gamma-amino butírico (GABA) y, por ende, la enzima responsable de su síntesis, la glutamato descarboxilasa (GAD) (Okada *et al.*, 1976). Así mismo, expresan proteínas accesorias a los microtúbulos como la proteína *Tau* y proteínas de adhesión celular como la NCAM (Vidaltamayo *et al.*, 1996), que han sido consideradas como marcadores típicos de diferenciación neuronal.

Al igual que las neuronas, las células  $\beta$  expresan genes neuronales como el factor de transcripción silenciador del elemento represor (REST) que regula la actividad de genes específicos que determinan al fenotipo neuronal (Atouf *et al.*, 1997). Además, las células  $\beta$  son capaces de extender procesos citoplásmicos de tipo neurítico al ser cultivadas *in vitro* (Teitelman, 1990), que expresan neurofilamentos de peso molecular bajo (160 kDa) y periferina, que son componentes del citoesqueleto de los procesos celulares extendidos por las neuronas (Escurat *et al.*, 1991; Teitelman, 1990). Cabe agregar que, como se mencionará más adelante en detalle, el NGF es capaz de inducir un aumento en el porcentaje de células con procesos parecidos a neuritas, con respecto a las células que no son cultivadas con el factor. Finalmente, al igual que las neuronas, presentan actividad eléctrica que es necesaria para la secreción de insulina.

Sin embargo, también existen evidencias que indican que las células  $\beta$  no provienen de la cresta neural sino que se derivan del endodermo. En 1976, Pictet y colaboradores, demostraron que cuando se remueve el ectodermo en embriones de ratón de 9 días de gestación, las células pancreáticas se desarrollan normalmente. Por otro lado, experimentos con embriones quiméricos en estado de neurula, en donde se asociaba el neuroectodermo de codorniz con el endomesodermo de pollo demostraron que los explantes de ganglio entérico se originaban del ectodermo de codorniz, pero las células cromafines así como otras células endocrinas y paraendocrinas del epitelio del intestino y del páncreas provenían del pollo. Así se concluyó que las células endocrinas del intestino y páncreas no se originaban del neuroectodermo, por el contrario eran derivadas del endodermo y se establecían al final de la gastrulación (Fontaine *et al.*, 1977).

No obstante, las similitudes de las células  $\beta$  pancreáticas con las neuronas nos llevaron a preguntarnos si las células  $\beta$  podrían responder al NGF.

### **E.1) Efectos del NGF y del dbAMPc sobre las células $\beta$ pancreáticas.**

El tratamiento con NGF modifica el fenotipo de las células  $\beta$  de rata. Después de 11 días en cultivo con 50 ng/ml de NGF 2.5 S, cerca del 30% de las células  $\beta$  extienden procesos citoplásmico parecidos a neuritas.

Estos efectos son mimetizados parcialmente por el dbAMPc, ya que en los cultivos tratados con dbAMPc 5mM se observa que alrededor de 20% de las células presentan procesos citoplásmicos similares, aunque más cortos. Los cambios más notables en la morfología de las células  $\beta$  se observan cuando las células son cultivadas con las dos moléculas simultáneamente, donde el 50% de las células  $\beta$  modifican su fenotipo (Vidaltamayo *et al.*, 1996). Este efecto del dbAMPc sobre el crecimiento de las neuritas podría deberse a su acción sobre la estabilidad del citoesqueleto, por ejemplo, a niveles de los haces de microtúbulos, los cuales se hacen más resistentes a la despolarización por fármacos, como la colchicina (Heidenmann *et al.*, 1985; Schubert *et al.*, 1977).

Además de los efectos del NGF sobre la morfología de las células  $\beta$ , también se observan cambios a nivel fisiológico ya que, después de 5-7 días en cultivo en presencia de NGF 2.5 S, la amplitud de la corriente macroscópica de sodio sensible a TTX aumenta en un 56%. A este tiempo en cultivo no observamos cambios significativos en la capacitancia membranal, por lo que el aumento macroscópica se refleja en un aumento del 30% en la densidad de corriente de  $\text{Na}^+$  (Rosenbaum *et al.*, 1996). Este efecto es similar a lo que se observa en las células PC12, donde el NGF promueve un aumento en la excitabilidad eléctrica (Ditcher *et al.*, 1977). Aún cuando el dbAMP cmimetiza los efectos del NGF a nivel de la morfología de las células  $\beta$ , el tratamiento con esta molécula no modifica la densidad de corriente de  $\text{Na}^+$  en las células  $\beta$  (Rosenbaum *et al.*, 1996).

Hemos observado el efecto de cultivar a las células  $\beta$  durante 5 días con el NGF y el dbAMPc sobre la secreción de insulina con la técnica de ensayo de placa hemolítico inverso (RHPA). Las células cultivadas en presencia de NGF son capaces de secretar más insulina conforme se aumenta la concentración extracelular de glucosa, propiedad que se pierde en las células bajo condiciones control cuando aumenta el tiempo en cultivo (Vidaltamayo *et al.*, 1996).

El dbAMPc tiene dos acciones sobre la secreción de insulina. Por un lado induce que aumente el porcentaje de células secretoras y por otro, amplifica la respuesta de las células  $\beta$  a la glucosa ya que, la secreción de insulina aumenta en más de un 100% con respecto al control (Vidaltamayo *et al.*, 1996).

También hemos determinado el efecto de tratar a las células  $\beta$  durante una hora con NGF sobre la secreción de insulina medida con el RHPA. En estas condiciones, el NGF induce un aumento de cerca del 50% en la secreción de insulina de células estimuladas con 5 mM y 15.6 mM glucosa con respecto a sus propios controles.

En otros modelos celulares, se ha descrito que los efectos del NGF y el dbAMPc dependen, en parte, de la actividad de los canales iónicos en la membrana de las células. Dado que el NGF y/o dbAMPc inducen cambios en la morfología de las células  $\beta$  pancreáticas, pensamos que uno de los mecanismos involucrados en este proceso podría ser a través de la entrada de iones

a las células. Por esta razón, a continuación se discute el papel que juegan los canales iónicos sobre la extensión de neuritas en otros sistemas celulares.

## **E.2) El papel de los canales iónicos sobre la extensión de procesos neuríticos.**

Además de la importancia que tienen los canales iónicos en la excitabilidad celular, se ha propuesto que estos son importantes para la extensión de procesos citoplásmicos. En particular, los canales de Ca parecen ser necesarios para el desarrollo de estos procesos. Se ha propuesto que los canales de Ca dependientes del voltaje constituyen un componente central de las cascadas de transducción de señales en los conos de crecimiento neuronales. De hecho, se ha demostrado que en el cono de crecimiento hay una densidad mayor de canales de Ca que en otras partes de la célula (Gottman y Lux, 1995).

El papel de los canales iónicos sobre la extensión de neuritas ha sido estudiado en modelos tales como las células PC12 de feocromocitoma de rata. Por ejemplo, la alta densidad de canales de calcio en los conos de crecimiento de las células PC12 sugiere una función de estos canales en la regulación del crecimiento de neuritas (Streit y Lux, 1989). La actividad de los canales de Ca en los conos de crecimiento es importante para la motilidad y forma de los mismos, así como para la adhesión al substrato y elongación de la neurita (Schubert *et al.*, 1978; Fukuda y Kameyama, 1979; Willard, 1980; Meiri *et al.*, 1981; Anglister *et al.*, 1982; Mattson y Kater, 1987).

Además, se ha demostrado que las moléculas de interacción con la matriz celular como la N-cadherina y la molécula de adhesión celular neuronal (NCAM), tienen una actividad reguladora de la morfología de las neuronas que involucra la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de los canales de tipo L y N. Por ejemplo, la N-cadherina requiere  $Ca^{2+}$  para cumplir su función de adhesión. Además, estas moléculas alteran la morfología de las células PC12, respuesta que puede ser inhibida totalmente por la toxina Pertussis y ser bloqueada parcialmente por bloqueadores de los canales de Ca tipo L y N (Doherty *et al.*, 1991; Gottman y Lux, 1995; Cavalie *et al.*, 1994; Solem *et al.*, 1995).

Aunado a esto se ha demostrado que la extensión de neuritas puede ser estimulada por medio de la despolarización con potasio (KCl 45mM) (Manivannan y Terakawa, 1994). En células PC12, se ha descrito que este proceso es dependiente de la presencia de Ca en el medio externo y que los quelantes de este ion (EGTA) abolen el efecto del potasio.

Es importante notar que la inducción del crecimiento de las neuritas en las células PC12, es reducida si se utilizan inhibidores de los canales de calcio tipo L o bien inhibidores de las cinasas dependientes de  $Ca^{2+}$ /calmodulina. En estos trabajos se concluye que existe un sinergismo entre el estímulo despolarizante y la activación de los receptores a NGF para inducir el crecimiento de las neuritas a través de un mecanismo dependiente de  $Ca^{2+}$  y de la vía de señales de cinasa CaM (Solem *et al.*, 1995).

Por otro lado, el papel de los canales de Na en el desarrollo de procesos citoplásmicos no es muy claro. Sin embargo, se ha descrito que la formación de espinas dendríticas de neuronas de hipocampo es dependiente de la actividad eléctrica y que la aplicación crónica de TTX disminuye el número de estas estructuras (Kossel, *et al.*, 1997). Además, se ha visto que la adición crónica de TTX a cultivos primarios de corteza cerebral promueve la retracción y degeneración de los axones de estas células (Ramakers *et al.*, 1991).

## **F) EL PAPEL DEL NGF SOBRE PROCESOS DEGENERATIVOS ASOCIADOS A LA DIABETES.**

Las funciones biológicas más importantes del NGF incluyen su acción neurotrófica tanto *in vivo* como *in vitro*, su habilidad para modular el programa de diferenciación de las células neuronales precursoras y su contribución al mantenimiento del fenotipo diferenciado adquirido (Calissano *et al.*, 1984).

En modelos de animales diabéticos existen deficiencias en la cantidad de NGF circulante y en la expresión de su receptor de alta afinidad (Trk A), lo cual, a su vez, lleva a un transporte axonal retrogrado deficiente de NGF y a la muerte de neuronas sensoriales (Tomlinson *et al.*, 1996; Hellweg, 1994; Brewster *et al.*, 1995; Fernyhough *et al.*, 1995). Mas aún, también se ha

descrito que los niveles de NGF circulantes en pacientes diabéticos se encuentran disminuidos (Faradji y Sotelo, 1990).

De hecho, en los últimos 2 años, se ha propuesto que el NGF puede tener usos terapéuticos potenciales en pacientes con neuropatía diabética, ya que la administración intravenosa o subcutánea de dosis de 1µg/kg a estos pacientes disminuye los síntomas clínicos y produce una mejoría clínica en los estudios neurológicos (Anand, 1996; Bradley *et al.*, 1995):

La identificación de NGF en el páncreas por medio de técnicas de Northern blot (Kanaka-Gantenbein *et al.*, 1995) así como el hecho de que el NGF afecta la morfología y la fisiología de las células β de rata en cultivo, hace relevante estudiar si las células β son capaces de sintetizar y secretar este factor de crecimiento, ya que esto sería una demostración indirecta de que el NGF podría jugar un papel importante en la fisiología de las células β pancreáticas *in vivo*, así como tener relevancia endocrina.

## HIPÓTESIS

Como ya se mencionó, se ha observado que las células  $\beta$  responden ante el NGF cambiando su morfología y su fisiología (Vidaltamayo *et al.*, 1996; Rosenbaum *et al.*, 1996).

1) De acuerdo con los datos obtenidos en el laboratorio en relación a los cambios inducidos por el NGF sobre la morfología de las células  $\beta$  pancreáticas de rata, a los efectos de este factor sobre las corrientes iónicas entrantes en otros sistemas celulares, y a que la aplicación crónica y aguda de este factor puede modificar la secreción de insulina, el NGF podría tener un efecto sobre las corrientes macroscópicas de  $\text{Ca}^{2+}$  que son indispensables para la secreción de insulina y para la extensión y crecimiento de los procesos parecidos a neuritas.

2) Por otro lado, la modulación de los niveles de RNAm para el receptor de alta afinidad a NGF, Trk A, por el NGF y/o el dbAMPc no había sido estudiada anteriormente. Dado que estas moléculas inducen cambios morfológicos en nuestras células y a que se ha sugerido en otros sistemas que la expresión de más receptores a Trk A puede modificar la sensibilidad de las células al NGF circulante (Holtzman *et al.*, 1992; Scharfmann, *et al.*, 1994), es probable que los niveles de RNAm y de proteína funcional para Trk A en las células  $\beta$  pancreáticas, pudieran ser modificados por el tratamiento con NGF y/o dbAMPc y, este aumento en los niveles de este RNAm, probablemente se traduciría en un aumento en la cantidad de receptores de membrana para NGF explicando, en parte, los cambios morfológicos inducidos por estos factores en las células  $\beta$ .

3) Tomando en cuenta que el NGF es capaz de regular la función de las células  $\beta$  pancreáticas y que los niveles de NGF circulante en modelos de animales y pacientes diabéticos se encuentran disminuidos (Faradji y Sotelo, 1990), se propuso que una de las fuentes de NGF circulante pudieran ser las células  $\beta$  pancreáticas mismas. Esto, a su vez, sugeriría que el NGF podría tener acciones tanto paracrinas como endocrinas.

## OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de esta tesis fue el de analizar los efectos del factor de crecimiento neural (NGF) sobre la plasticidad y diversos aspectos de la fisiología de la célula  $\beta$  pancreática primarias cultivadas *in vitro*.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Estudiar el efecto del tratamiento con NGF y dbAMPc, en conjunto, sobre las corrientes macroscópicas de sodio de las células  $\beta$  pancreáticas.
- 2) Analizar el efecto de una exposición corta (5 minutos) al NGF sobre las corrientes macroscópicas de calcio de las células  $\beta$  pancreáticas.
- 3) Analizar el efecto del NGF sobre las corrientes macroscópicas de calcio en células cultivadas en presencia del factor durante 5 días.
- 4) Determinar el papel de los canales iónicos sobre la extensión de procesos de tipo neurítico inducida por NGF y/o dbAMPc.
- 5) Demostrar la presencia de la proteína para Trk A en células  $\beta$  pancreáticas inmediatamente después de ser extraídas del páncreas y la modulación de su RNAm por la presencia de NGF, dbAMPc y su combinación (NGF + dbAMPc), en células cultivadas durante 5 días en presencia de estas moléculas.
- 6) Investigar si las células  $\beta$  pancreáticas sintetizan NGF y, de ser así, estudiar el efecto del tratamiento con NGF y/o dbAMPc sobre los niveles de RNAm para NGF.
- 7) Evaluar si las células  $\beta$  pancreáticas son capaces de secretar NGF biológicamente activo y, si esta secreción es dependiente de la concentración de glucosa extracelular.



## **METODOLOGÍA**

### **A) OBTENCIÓN DE CÉLULAS $\beta$ PANCREÁTICAS DE RATA.**

Los páncreas fueron obtenidos a partir de ratas Wistar macho de peso de 250 a 280 g, de acuerdo con la técnica de Lacy y Kostianovsky (1967). Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (0.063 mg/g). Se cerró el conducto de Wirsung y se canuló el conducto pancreático a la altura de su unión con el conducto biliar y se inyectaron de 5 a 10 ml de solución de Hanks suplementada con gentamicina 5  $\mu$ g/ml y 0.1 % de albúmina sérica bovina (HBSA). Se disecaron y limpiaron el cuerpo y la porción caudal del páncreas insuflado y se cortaron en pedazos pequeños, posteriormente, se digirió el tejido con colagenasa tipo IV (CGS 0.1 mg/ml) durante 15 min a 37 °C.

#### **A.1) Gradiente de Ficoll.**

Para la separación de los islotes pancreáticos se utilizó un gradiente de Ficoll (27, 23, 20 y 11 % en HBSA) que fue centrifugado a 2000 x rpm durante 10 min. Posteriormente los islotes se lavaron tres veces con HBSA y se seleccionaron manualmente los islotes limpios con ayuda de una pipeta Lang-Levi.

#### **A.2) Dispersión de las células del islote pancreático.**

Los islotes limpios de tejido acinar fueron disgregados con tripsina durante 10 min a 37 °C en un baño con agitación constante y rápida, y se dispersaron las células manualmente con la ayuda de una pipeta Pasteur siliconizada. Finalmente, las células se lavaron 3 veces con medio RPMI 1640 adicionado con penicilina (200  $\mu$ g/ml), estreptomycin (200  $\mu$ g/ml), 2 mM de glutamina y 10 % de SBF para interferir con la tripsina.

#### **A.3) Cultivo de las células del islote.**

Se realizó una siembra diferencial en cajas bacteriológicas para promover el pegado de los fibroblastos y así poder recoger a las células insulares en el sobrenadante. Finalmente, este sobrenadante se sembró en cajas Corning para cultivo primario en RPMI- 1640 adicionado con

5 % de SBF, 2 % de PEF y 1 % de glutamina, bajo diferentes condiciones: control, que no recibió ningún tratamiento; NGF (50 ng/ml; Sigma) ; dbAMPc (5 mM; Sigma) y con ambas moléculas en conjunto.

## **B) REGISTRO DE CORRIENTES DE Na<sup>+</sup> y de Ca<sup>2+</sup> POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE FIJACIÓN DE VOLTAJE EN MICROÁREAS DE MEMBRANA (PATCH-CLAMP).**

Los microelectrodos de registro se fabricaron con vidrio Kimax-51 y se recubrieron con el aislante Sylgard. La resistencia de los electrodos en la solución de registro fue de 1.5 a 1.8 MΩ. Los registros para determinar los efectos del NGF + dbAMPc sobre las corrientes macroscópicas de sodio, se llevaron a cabo en células cultivadas durante 5-7 días bajo condiciones control y en presencia del NGF y del dbAMPc. Se utilizó la configuración de célula completa de la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana ( whole-cell patch-clamp) que consiste en formar un sello de alta resistencia (gΩ) entre la punta de un microelectrodo de vidrio y la membrana celular. Después de hacer el sello se rompe la membrana que subyace al electrodo por medio de un pulso de succión haciendo posible el registro de las corrientes macroscópicas (Neher y Sakmann, 1992).

La generación de pulsos y la adquisición de datos fue controlada usando un amplificador Axopatch 200 (Axon Instruments) conectado por una interfase DMA TL-1 (Axon Instruments) a una computadora con una tarjeta Lab Master DMA (Axon Instruments). Los protocolos de pulsos se diseñaron y los datos se adquirieron con el programa Pclamp versión 5.5. Para la obtención de las relaciones corriente-voltaje (curvas IV), se aplicaron pulsos despolarizantes de -30 mV a +40 mV con incrementos de +10 mV. El potencial de mantenimiento fue de -80 mV para todos los casos (figura 11).

También se llevaron a cabo experimentos para calcular las curvas de inactivación para la corriente de Na<sup>+</sup>. El protocolo de pulsos usado consistió en aplicar un prepulso de 35 ms para inactivar los canales de Na<sup>+</sup> hasta un estado estacionario. La corriente de Na<sup>+</sup> se registró durante pulsos de prueba de 10 ms a +10 mV para determinar la fracción de canales que no fueron inactivados por el prepulso (figura 12).

El estudio de los efectos agudos del NGF sobre las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  se llevó a cabo en células cultivadas durante 1-3 días en RPMI-1640 + 5% SBF y antibióticos como ya se mencionó, pero en ausencia del factor. Las células fueron preincubadas en presencia del NGF 5 minutos antes de comenzar el registro. Para la separación de las corrientes de calcio tanto de las células cultivadas durante 5 días como de las células cultivadas de 1-3 días, se utilizó la  $\omega$ -conotoxina (Sigma), que bloquea específicamente a los canales de Ca tipo N, a una concentración final de 3  $\mu\text{M}$ , durante el registro y durante la preincubación de las células con el NGF, con el fin de observar la corriente de calcio a través de los canales de calcio tipo L. Así también, se utilizó la nifedipina (Sigma), que bloquea específicamente a los canales de calcio tipo L, a una concentración final de 5  $\mu\text{M}$  para estudiar la corriente de calcio que pasa a través de los canales de calcio tipo N. En algunos experimentos se utilizó también un agonista específico de los canales de calcio tipo L, el Bay K 8644 (Sigma) a una concentración de 5  $\mu\text{M}$ .

Los efectos del NGF a largo plazo sobre las corrientes de calcio se determinaron en células cultivadas bajo condiciones control (que no estuvieron expuestas al NGF) y en células cultivadas en presencia del NGF durante 5-7 días, al igual que en el caso de la determinación de los efectos del NGF + dbAMPC sobre las corrientes de sodio. Las soluciones de registro fueron las siguientes:

#### SOLUCIONES DE REGISTRO

COMPOSICIÓN	EXTERNA A (mM)	EXTERNA B (mM)
NaCl	130	130
KCl	5	5
$\text{CaCl}_2$	5	—
$\text{BaCl}_2$	--	10
$\text{MgCl}_2$	2	2
Glucosa	10	10
HEPES	10	10
TEA	--	10
TTX	--	100
pH	7.34	7.34

COMPOSICIÓN	INTERNA A (mM)	INTERNA B (mM)	INTERNA C (mM)
CsAsp	120	120	120
CsCl	10	10	10
CsF	5	5	5
ATP-Mg <sub>2</sub>	2	--	2
HEPES	10	10	10
Cs-BAPTA	5	5	5
NaCl	15	--	--
pH	7.3	7.3	7.3

En algunos experimentos se utilizó NaCl 15 mM en la solución de registro B para observar el potencial de inversión de las corrientes de sodio. Por otro lado, también es importante recalcar que se utilizó como portador de corriente al Ba<sup>2+</sup> en el estudio de las corrientes de calcio porque este ion pasa más fácilmente por los canales de calcio tipo L que el calcio mismo.

Los datos experimentales de la inactivación en estado estacionario de los corrientes de sodio fueron normalizados y ajustados por medio de la ecuación de Boltzmann :

$$I/I_{\max} = \{1 + \exp[(V-V_{i/2})/k_i]\}^{-1}$$

donde, I es la corriente al pico, I<sub>max</sub> es la corriente pico obtenida a partir de un prepulso a -120 mV, V es el potencial del prepulso, V<sub>i/2</sub> es el valor de la inactivación media y k<sub>i</sub> es la pendiente.

Los datos experimentales de la conductancia, tanto para las corrientes de sodio como para las colas de corriente de calcio, fueron normalizados y ajustados con la siguiente ecuación de Boltzmann:

$$g/g_{\max} = \{1 + \exp [-(V - V_{a/2})/k_a]\}^{-1}$$

donde,  $g$  es la conductancia de sodio al pico,  $g_{max}$  es la conductancia de sodio máxima,  $V_{a1/2}$  es el punto medio de la curva de activación y  $k_a$  es la pendiente.

El valor del potencial de inversión teórico se calculó a partir de la ecuación de Nernst que se muestra a continuación:

$$E_{Na} = RT/F \ln([Na]_o/[Na]_i)$$

En donde,  $E_{Na}$  = potencial de equilibrio para sodio;  $R$  = constante de los gases;  $T$  = temperatura;  $F$  = constante de Faraday;  $[Na]_o$  = concentración de sodio extracelular;  $[Na]_i$  = concentración de sodio intracelular.

Para la determinación de las constantes de desactivación de los canales de calcio se utilizó un ajuste llevado a cabo con el programa Clampfit Versión 5.5 (Axon Instruments Inc.). Para obtener las constantes de decaimiento de las colas de corriente, se realizó un ajuste con la suma de dos exponenciales al registro de la cola.

### **C) DETERMINACIÓN DE LOS EFECTOS DEL NGF Y/O dbAMPc SOBRE LA EXTENSIÓN DE PROCESOS DE TIPO NEURÍTICO EN LAS CÉLULAS $\beta$ PANCREÁTICAS.**

Para determinar el papel que juegan los canales de  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  tipo L y N sobre la extensión de procesos de tipo neurítico, se cultivaron células  $\beta$  primarias en presencia de NGF 2.5 S (50 ng/ml), dbAMPc (5mM) y/o TTX (100 nM) y/o nifedipina (400 nM) y/o  $\omega$ -conotoxina (3  $\mu$ M) durante 11 días. Las dosis de los compuestos mencionados fueron seleccionados en base a la información reportada en la literatura (Vidaltamayo *et al.*, 1996; Rosenbaum *et al.*, 1996, Pollo *et al.*, 1993). Después, las células fueron procesadas para inmunocitoquímica contra insulina.

Se contaron 10 campos al azar (con un mínimo de 100 células por tratamiento) y se determinó el número de células con procesos citoplásmicos así como la longitud de estos procesos considerando una neurita como un proceso que midiera, por lo menos, el doble del diámetro perinuclear. La longitud de los procesos de tipo neurítico fue determinada por medio de

la proyección de la imagen de la célula en un monitor conectado a una cámara de video y a un microscopio invertido (Nikon Axiophot). Se utilizó el programa de análisis de imágenes JAVA (Jandel Scientific, Versión 1.40, Corte Madera, CA).

Además, se determinó el efecto de usar una concentración extracelular de KCl de 40 mM ya que esto promueve la despolarización de la célula y permite la entrada de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ . De igual manera, las células fueron cultivadas con KCl, KCl + NGF+ dbAMPC + TTX, nifedipina y/o  $\omega$ -conotoxina.

#### **D) INMUNOCITOQUÍMICA CONTRA Trk A E INSULINA EN CELULAS SECRETORAS DE INSULINA.**

Las células fueron fijadas en solución de paraformaldehído al 4 % durante 4 h. Posteriormente, la membrana se permeabilizó con Tritón X-100 al 0.3 % durante 30 min usando como bloqueador suero normal de cabra al 3 %. Después, las células fueron incubadas a 4 °C con el anticuerpo primario, durante 48 h como se indica a continuación:

Para la detección de Trk A se utilizó un anticuerpo primario de conejo dirigido contra Trk A (1:4000; Sigma). Después, se procedió a incubar por 1 h con anticuerpo biotinilado de cabra contra IgG de conejo (5:1000; Sigma). Finalmente, se incubó 1 h con avidina-biotina y se reveló con diaminobenzidina (DAB; Sigma) para la detección de Trk A.

La tinción para insulina se llevó a cabo utilizando un anticuerpo primario de cobayo fluoresceinado (1: 4000; Biodesign International). Las células se observaron bajo un microscopio Nikon para fluorescencia.

#### **E) RT-PCR PARA LA DETECCIÓN DE RNAm PARA Trk A Y NGF EN CÉLULAS $\beta$ DE CULTIVOS PRIMARIOS.**

##### **E.1) Extracción de RNA citoplásmico.**

El RNA total se extrajo de células cultivadas durante 5 días bajo las diferentes condiciones experimentales. Se utilizó 1 ml del reactivo TRIzol (GIBCO/BRL) por cada  $1 \times 10^6$  células para

lisar a las células directamente en las cajas de cultivo. La mezcla de solución de TRIzol y células se transfirió a tubos eppendorf y se agitó por 15 seg, después se incubó durante 5 min en hielo.

Después se llevó a cabo una centrifugación a 12,000 g durante 15 min a 4 °C para obtener una fase orgánica inferior de color rojo, una interfase blanca y una fase superior acuosa incolora. Se recogió la fase superior que contiene al RNA total.

El siguiente paso fue transferir la muestra a tubos eppendorf de 1.5 ml y agregar isopropanol (Sigma; 0.5ml de isopropanol/ml TRIzol) y se mezcló por agitación rápida. Se incubó en hielo durante 10 min y se centrifugó a 12,000 g durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante fue removido y el botón se lavó con etanol frío al 75 % (1 ml de etanol/ml TRIzol). Nuevamente, la pastilla se resuspendió por agitación rápida. Finalmente, se centrifugó a 7,500 g durante 5 min a 4°C, se retiró el sobrenadante y la pastilla se secó en hielo durante 10 min.

La calidad del RNA total extraído fue evaluada por medio de espectrofotometría a una longitud de onda de 260-280 nm.

## **E.2) Reacciones de RT-PCR.**

Con el fin de evaluar la existencia de RNAm para Trk A , NGF o de GAPDH en las células  $\beta$  se utilizó la técnica de transcripción reversa acoplada a una reacción de polimerasa en cadena (RT-PCR) empleando los reactivos de Perkin-Elmer para RNA PCR. Se procedió a diseñar 2 pares de oligonucleótidos, cada uno en base en las secuencias reportadas (Meakin *et al*, 1992; Giordano *et al*, 1992 y Tso *et al*, 1985).

Se utilizaron 200 ng de RNA total para realizar una reacción de transcripción reversa en presencia de la enzima transcriptasa reversa de RNA a DNA derivada del virus de leucemia murina (MuLV) y luego llevar a cabo una amplificación del cDNA de interés utilizando la *Taq* polimerasa y los oligonucleótidos diseñados, siguiendo el protocolo de Perkin Elmer.

Además, se diseñaron oligonucleótidos que sirvieran como marcadores internos en el momento de la hibridación; es decir, sus secuencias se sobrelapan con las de uno de los oligonucleótidos del otro par para cada caso.

La técnica de RT-PCR para detectar Trk A se montó en células de insulinoma de rata (RINm5F), que constituyen una buena fuente de RNA total y porque se ha demostrado que estas células contienen niveles altos de RNAm para Trk A (Scharfmann *et al.*, 1993).

Las secuencias de los oligonucleótidos para la detección de los distintos tipos de RNAm fueron las siguientes:

Para Trk A se usó la secuencia 5'-GCAAAGCCGTGGAACAG-3' para el oligonucleótido sentido (5') y la secuencia 5'-CCCATGGCGCATGTACT-3' para el oligonucleótido antisentido (3') (Meakin *et al.*, 1992). Las secuencias cubiertas por estos oligonucleótidos corresponden a una secuencia amino terminal a 80 aminoácidos de la región transmembranal y a una región carboxilo terminal que, en principio, sería intracelular (Meakin *et al.*, 1992). El tamaño de los productos de reacción fue de 917 pb.

Para NGF las secuencias fueron: 5'-GGCATGCTGGACCCAAGCTC-3' para el oligonucleótido sentido (5') y 5'-GCGCTTGCTCCGGTGAGTCC-3' para el oligonucleótido antisentido (3') del RNAm para NGF. El tamaño de los productos de reacción fue de 461 pb (Giordano *et al.*, 1992; estos experimentos fueron llevados a cabo en colaboración con R. Vidaltamayo).

Además, para confirmar la especificidad de la reacción se utilizaron las siguientes secuencias para los oligonucleótidos internos antisentido (3'): 5'-ATCTAGACTTCCAGGCC-3' para NGF y 5'-GGAGGGCAGAAAGGAAG-3' para Trk A.

Además, se diseñaron 3 oligonucleótidos para un control interno que fue la gliceraldehido-3' fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Estos oligonucleótidos se probaron en una reacción con células RINm5F expuestas a los diferentes tratamientos y resultó ser un buen control ya que no varió en ninguno de los casos.

Las secuencias utilizadas para detectar el RNAm de GAPDH fueron las siguientes:

5-GCCCCCATGTTTGTGAT-3' para el primer sentido (5') y 5'-GCCCCAGCATCAAAGGT-3' para el primer antisentido (3') (Tso *et al.*, 1985). El tamaño de los productos de reacción fue de 515 pb. La secuencia del oligonucleótido interno para GAPDH fue: 5'-GTGGATCTGACATGCCG -3'.

Todas las reacciones del proceso de transcripción reversa y PCR, se llevaron a cabo en un termociclador (M.J. Research):

Para lograr desnaturalización del RNA:

Paso 1: 65 °C, 5 min

Paso 2: Descenso a 40 °C hasta llegar a 25 °C (1 °C/ 0.5 min)

Para la transcripción reversa (paso de RNA a DNA):

Paso 1: 42 °C, 15 min

Paso 2: 99 °C, 5 min

Paso 3: 5 °C, 5 min

Para la amplificación de los productos:

Paso 1: 95 °C, 5 min

Paso 2: 95 °C, 1 min

Paso 3: 57 °C (para Trk A y GAPDH), 59 °C (para NGF), 1.30 min

Paso 4: 72 °C, 1 min

Paso 5: 25 ciclos de PCR.

Paso 6: 72 °C, 10 min

Paso 7: 4 °C, tiempo indefinido

### E.3) Electroforesis

Los productos de PCR se separaron en geles de agarosa al 1% en una solución de TBE 1X (TBE 10X: 89 mM Tris base, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA). Los productos se corrieron a 80 mV. Para visualizar las bandas y evaluar la transferencia se utilizó bromuro de etidio (Sigma).

#### E.4) Transferencia

Los geles se transfirieron con una solución de SSC 6X (20X: 3M NaCl, 0.3 M citrato de sodio) a membranas de nylon (Amersham). Una vez transferida y seca la membrana, se fijó el DNA al nylon irradiando la membrana con luz UV en un Stratalinker (Stratagene).

#### E.5) Incorporación de [ $^{32}\text{P}$ ] a los productos de reacción de RT-PCR.

Se utilizó  $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-ATP para marcar los oligonucleótidos internos por quinación del extremo 3' y así comprobar la identidad de los productos de reacción como se describe a continuación:

-Dilución de 200 ng/ml de cada uno de los oligonucleótidos internos para cada caso, Trk A, NGF y GAPDH.

-Se agregaron 3  $\mu\text{l}$  de  $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-ATP (con actividad específica de 6000 Ci/mmol de ATP), 1  $\mu\text{l}$  de amortiguador 10X (Boehringer Mannheim), 4  $\mu\text{l}$  de agua estéril, 1  $\mu\text{l}$  de DNA (oligonucleótido) y 1  $\mu\text{l}$  T4 cinasa (Boehringer Mannheim).

-La mezcla se pasó por un filtro de acetato para eliminar el  $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-ATP no incorporado.

-La solución obtenida después de la filtración se mezcló con solución de hibridación (ver tabla siguiente).

-Finalmente, se incubó la membrana de nylon con los productos de RT-PCR transferidos durante 4 h en solución de prehibridación y durante una noche con la solución de hibridación con el oligonucleótido marcado a 37 °C en agitación (ver tabla siguiente).

## SOLUCIONES DE PREHIBRIDACIÓN E HIBRIDACIÓN

COMPONENTES	SOLUCIÓN DE PREHIBRIDACIÓN (20 ml)	SOLUCIÓN DE HIBRIDACIÓN (30 ml)
Solución de Denhardt	1X	1X
SSC	6X	6X
SDS	0.5 %	--
H <sub>2</sub> O	12.3 ml	20.19 ml
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.05%	0.05 %
DNA de salmón	100 µg/ml	20 µg/ml
Temperatura	37 °C	37 °C

Las membranas fueron empacadas en bolsas de plástico y expuestas a la pantalla del detector de fósforo (PhosphorImager Storm 2000, Molecular Dynamics). Los datos experimentales obtenidos en el detector de fósforo fueron corregidos con respecto al control interno de expresión (GAPDH). Finalmente, los productos de las reacciones de RT-PCR fueron secuenciados y resultaron tener un 100% de homología con las secuencias de los genes reportados en la base de datos GENE BANK (los productos fueron secuenciados en el laboratorio del Dr. Fernando López-Casillas del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM).

### F) BIOENSAYO CON CÉLULAS PC12 PARA LA DETERMINACIÓN DE LA SECRECIÓN DE NGF.

Se ha descrito que las células PC12 de feocromocitoma de rata son capaces de neurogenizarse en pocas horas al ser cultivadas en presencia del NGF. Como primer paso para determinar si las células  $\beta$  son capaces de secretar NGF, se utilizó un bioensayo que consistió en cultivar células PC12 con un medio condicionado proveniente de células  $\beta$ .

Para esto se preparó un medio químicamente definido de la siguiente forma:

Al medio RPMI-1640 se le agregaron solución de selenita con insulina, transferrina y sodio

(1:100); putrescina (100  $\mu$ M) y progesterona (20 nM). En este medio se cultivaron las células  $\beta$  durante 24 h, se recogió el sobrenadante y se agregó el medio condicionado a las células PC12.

Las células PC12 fueron cultivadas entre 24 y 48 h con medio condicionado. Por otra parte, en algunos experimentos, también se agregó un anticuerpo neutralizante de NGF (Sigma) para determinar si el efecto observado era específico de la acción de este factor. Finalmente, se evaluó el porcentaje de células con neuritas como ya se describió para el caso de las células  $\beta$  pancreáticas anteriormente (estos experimentos fueron llevados a cabo en colaboración con C. Sánchez-Soto).

### **G) TÉCNICA DE ELISA PARA EL ESTUDIO DE LA SECRECIÓN DE NGF POR PARTE DE LAS CÉLULAS $\beta$ PANCREÁTICAS.**

Para determinar si las células  $\beta$  son capaces de secretar NGF, se utilizó un kit para ELISA de NGF comercial (NGF Emax Immunoassay System, Promega) siguiendo la metodología que se enuncia a continuación:

Se sembraron 50,000 células  $\beta$  por pozo. Se incubaron durante 4 h en un volumen de 200  $\mu$ l de RPMI adicionado con 0.1 % de albúmina de suero bovino, glucosa (5 mM, 11 mM y 20 mM), dbAMPc + 11 mM glucosa y KCl (40 mM) + 11 mM glucosa en placas de ELISA.

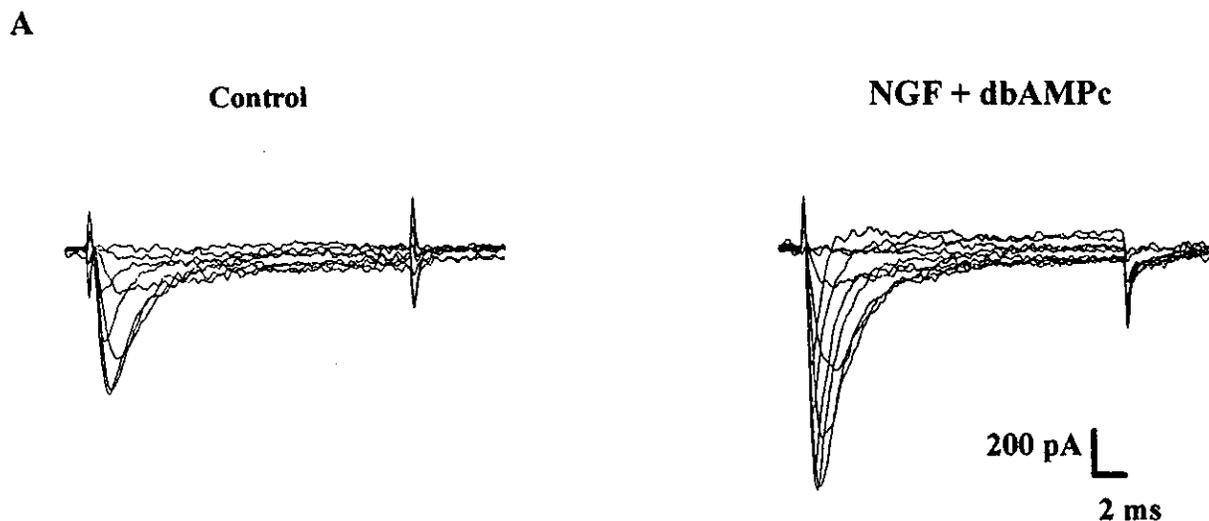
Después las placas de ELISA fueron incubadas durante 18 h con un anticuerpo contra NGF policlonal. A continuación, las placas fueron expuestas a una solución bloqueadora de proteínas para evitar la unión inespecífica del segundo anticuerpo, se agregaron las muestras experimentales (6 h) y después el segundo anticuerpo monoclonal contra NGF (16 h). Finalmente, se agregó un anticuerpo contra IgG de rata (2.5 h) y se agregó el substrato de peroxidasa (5-10 min) y las muestras fueron procesadas en un lector de ELISA a 450 nm (estos experimentos fueron llevados a cabo en colaboración con R. Vidaltamayo).

## RESULTADOS

### A) EFECTO DEL dbAMPc Y DEL NGF SOBRE LAS CORRIENTES MACROSCÓPICAS DE Na<sup>+</sup> EN CÉLULAS β PANCREÁTICAS.

Dado que el NGF induce un aumento en las corrientes de Na<sup>+</sup> de otros sistemas celulares así como de nuestras células (Islas-Suárez *et al.*, 1994; Rosenbaum *et al.*, 1996), y que el NGF y el dbAMPc, en conjunto, inducen cambios en la morfología de nuestras células, estudiamos el efecto del NGF y del dbAMPc sobre las corrientes macroscópicas de Na<sup>+</sup> de las células β pancreáticas, ya que éstas son importantes en la fase inicial de despolarización de la membrana de las células durante la secreción de insulina.

Como se muestra en la figura 8, las células tratadas durante 5 días con estos dos factores presentan un incremento, en promedio, del 47 %, en la amplitud de corriente de Na<sup>+</sup>, con respecto al control. Este efecto es similar al del NGF por sí solo, ya que el dbAMPc no induce cambios en la corriente.



B

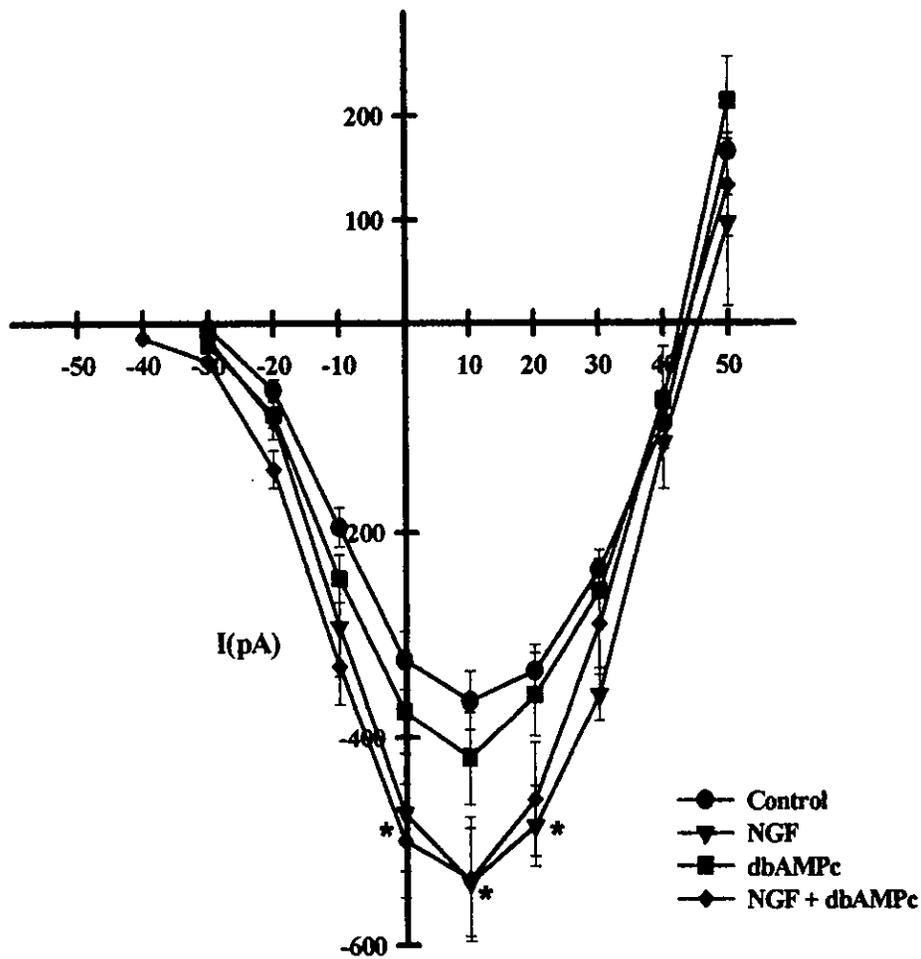


Figura 9. Efecto del NGF +dbAMPc sobre las corrientes macroscópicas de  $\text{Na}^+$ . (A) Familias de corrientes de  $\text{Na}^+$  de células control y células tratadas con NGF + dbAMPc durante 5 días. (B) Relación corriente a voltaje. El registro de las corrientes se llevó al cabo con las soluciones externa e interna A. La duración del pulso fue de 10 ms. Los datos fueron graficados como el promedio ( $\bar{X}$ )  $\pm$  error estándar de la medio (SEM) (\* $p < 0.01$  con prueba de Anova;  $n = 25$ ).

La tabla I muestra que este cambio en la amplitud de corriente de  $\text{Na}^+$  se debe a un aumento del 49 % en la densidad de corriente, ya que las capacitancias de las células tratadas no varían de manera significativa con respecto al control .

Es interesante mencionar que, como se esperaba, el aumento en la densidad de corriente de las células tratadas con NGF y dbAMPc no es diferente del aumento en la densidad de corriente de células tratadas sólo con NGF ya que, como se ha demostrado anteriormente, el dbAMPc por sí solo no induce cambios en estas corrientes (Tabla I) (Rosenbaum, T., *et al.*, 1996).

TRATAMIENTO	CAPACITANCIA (pF)	DENSIDAD DE CORRIENTE (pA/pF)	CORRIENTE AL PICO (+10 mV) (pA)
Control	8.8 ± 0.4	44.7 ± 4.5	-363.7 ± 28
NGF	9.4 ± 0.3	58.1 ± 5.7*	-539.5 ± 52*
DbAMPc	9.6 ± 0.6	47.3 ± 6.7	-419.4 ± 45
NGF + dbAMPc	8.4 ± 0.4	66.9 ± 6.4*	-536.5 ± 58*

**TABLA I.** Efecto del NGF + dbAMPc sobre las corrientes macroscópicas de Na<sup>+</sup>. Los datos se presentan como X ± SEM. (\*p < 0.01 con respecto al control, prueba de Anova).

En la figura 9 se muestra que la inactivación en estado estacionario no se modifica con ninguno de los tratamiento con respecto al control. Como se muestra en la figura 10 y en la tabla II, tampoco existen cambios en la cinética de activación, en la conductancia total de ninguno de los 4 grupos (control, NGF, dbAMPc y NGF + dbAMPc), ni en los parámetros de Boltzmann para la activación y la inactivación de las corrientes.

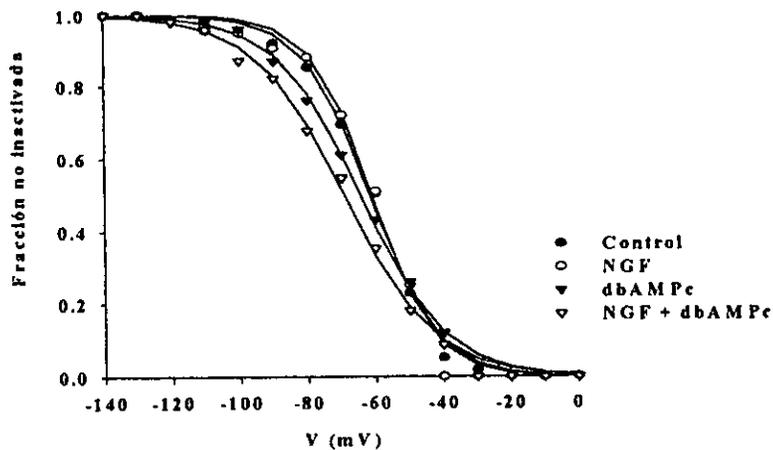


Figura 9. Efecto del tratamiento con NGF + dbAMPc sobre la cinética de inactivación en estado estacionario de la corriente de Na<sup>+</sup>. No existen diferencias significativas entre las cinéticas de inactivación de los distintos grupos experimentales (n = 25)

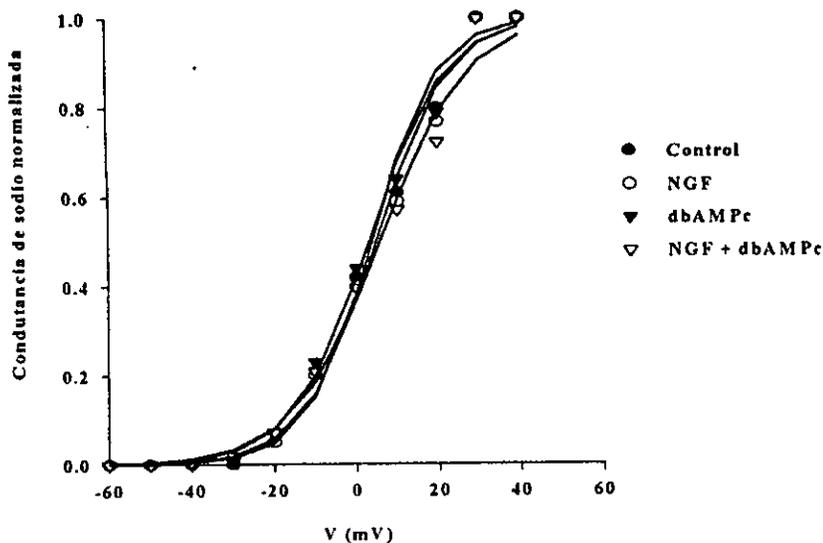


Figura 10. Efecto del NGF + dbAMPc sobre la conductancia de los canales de Na de las células  $\beta$  pancreáticas. En esta figura se encuentra representada la dependencia de la conductancia de Na<sup>+</sup> al pico sobre el voltaje. No se observan cambios significativos entre las conductancias de los distintos grupos experimentales (n= 20)

TRATAMIENTO	V <sub>a1/2</sub>	k <sub>a</sub>	V <sub>i1/2</sub>	K <sub>i</sub>
Control	4.04 ± 1.0	9.12 ± 0.2	-63.5 ± 2.3	-10.49 ± 0.2
NGF	4.45 ± 1.2	8.95 ± 0.4	-62.5 ± 2.3	-9.93 ± 0.6
DbAMPc	3.03 ± 1.1	9.62 ± 0.3	-60.6 ± 2.8	-9.08 ± 1.4
NGF + dbAMPc	5.96 ± 1.5	9.72 ± 0.2	-69.4 ± 2.5	-12.60 ± 0.6

**Tabla II. Parámetros de Boltzmann de las corrientes de Na<sup>+</sup> de las células β pancreáticas.** Esta tabla muestra que no existen diferencias significativas entre los grupos experimentales. (V<sub>a1/2</sub> = voltaje medio de activación; k<sub>a</sub> = constante de activación; V<sub>i1/2</sub> = voltaje medio de inactivación; k<sub>i</sub> = constante de inactivación). Los datos se muestran como X ± SEM.

El potencial de inversión para la corriente de Na<sup>+</sup> fue alrededor de +43 mV, valor que es muy cercano al calculado teóricamente para el potencial de equilibrio del Na<sup>+</sup> en las condiciones de registro (+47.28 mV).

## B) EFECTOS DEL NGF SOBRE LAS CORRIENTES MACROSCÓPICAS DE Ba<sup>2+</sup>.

### B.1) Efectos del NGF a corto plazo.

Dado que la secreción de insulina puede ser modificada por una exposición corta a NGF (50 ng/ml) y que los canales de Ca juegan un papel importante en este proceso, se estudió el efecto de un pulso corto de NGF (5 min) sobre las corrientes macroscópicas de Ba<sup>2+</sup>.

Como se muestra en la tabla III y en la figura 11, el NGF aplicado 5 min antes del registro electrofisiológico en células cultivadas de 1-3 días bajo condiciones control (RPMI-1640 con 5 % SBF y antibióticos), induce un aumento del 63.5 % en la amplitud de la corriente de Ba<sup>2+</sup> que corresponde a un aumento del 51 % en la densidad de la corriente total.

TRATAMIENTO	CAPACITANCIA (pF)	DENSIDAD DE CORRIENTE (pA/pF)	CORRIENTE AL PICO (+20 mV) (pA)
Control	7.5 ± 0.2	10.4 ± 1.7	-77.7 ± 12.7
NGF	8.1 ± 0.3	15.7 ± 2.5*	-127 ± 19.7*

Tabla III. Efecto de un pulso corto de NGF sobre la densidad de corriente de Ba<sup>2+</sup>. Los datos se muestran como X ± SEM (\*p < 0.01 vs. Control).

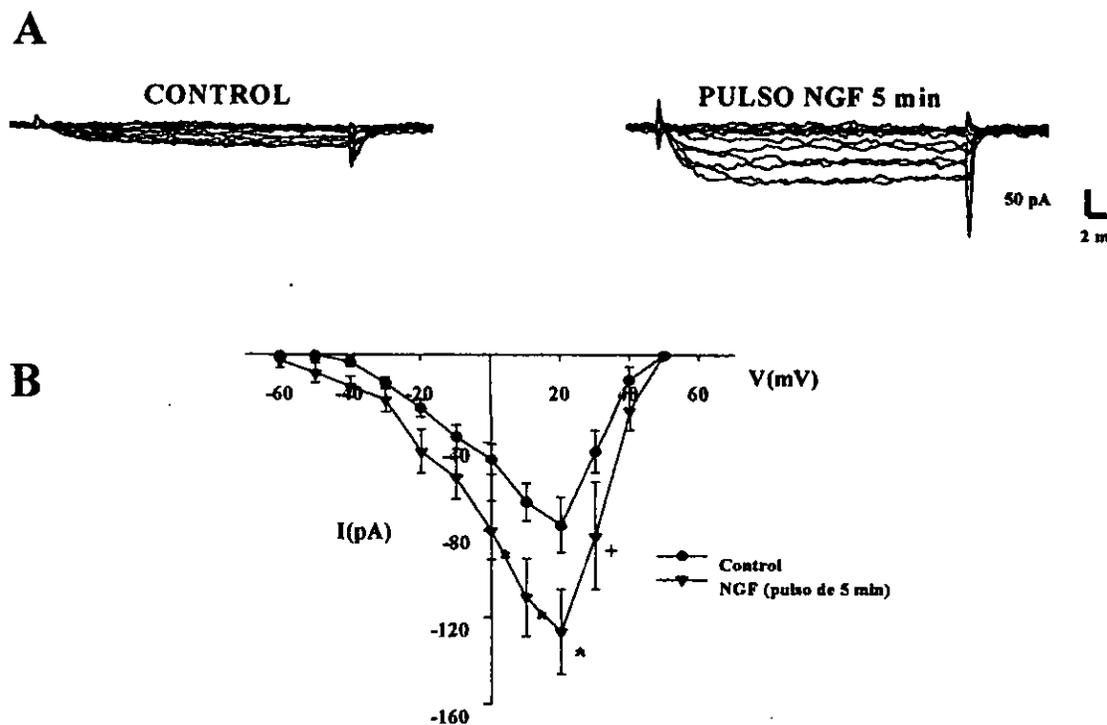
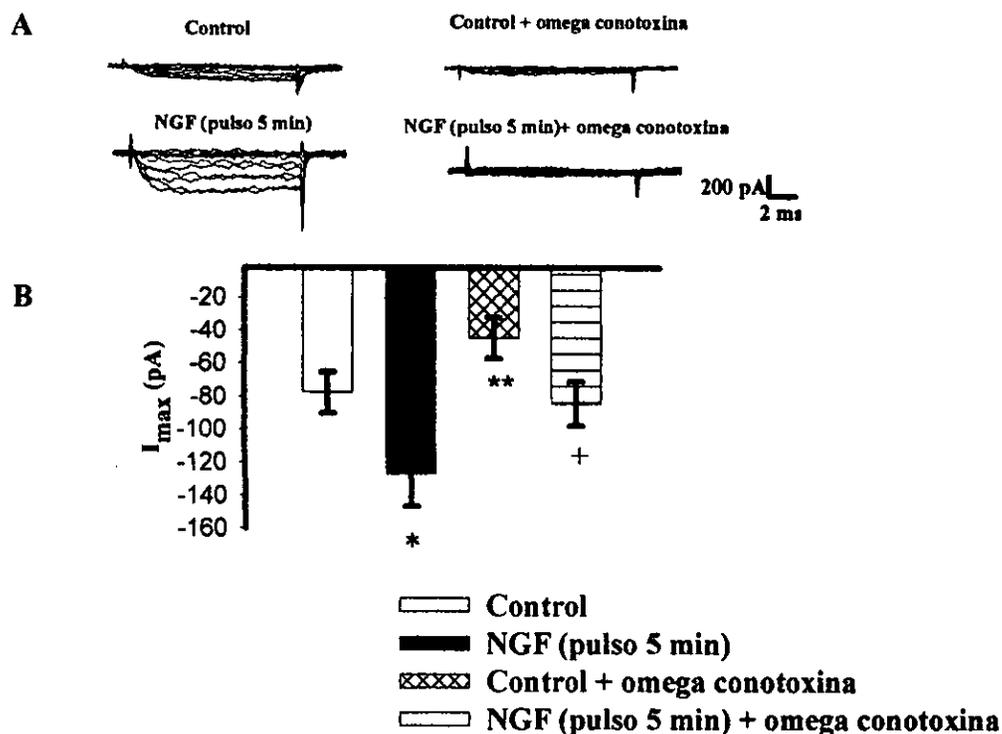


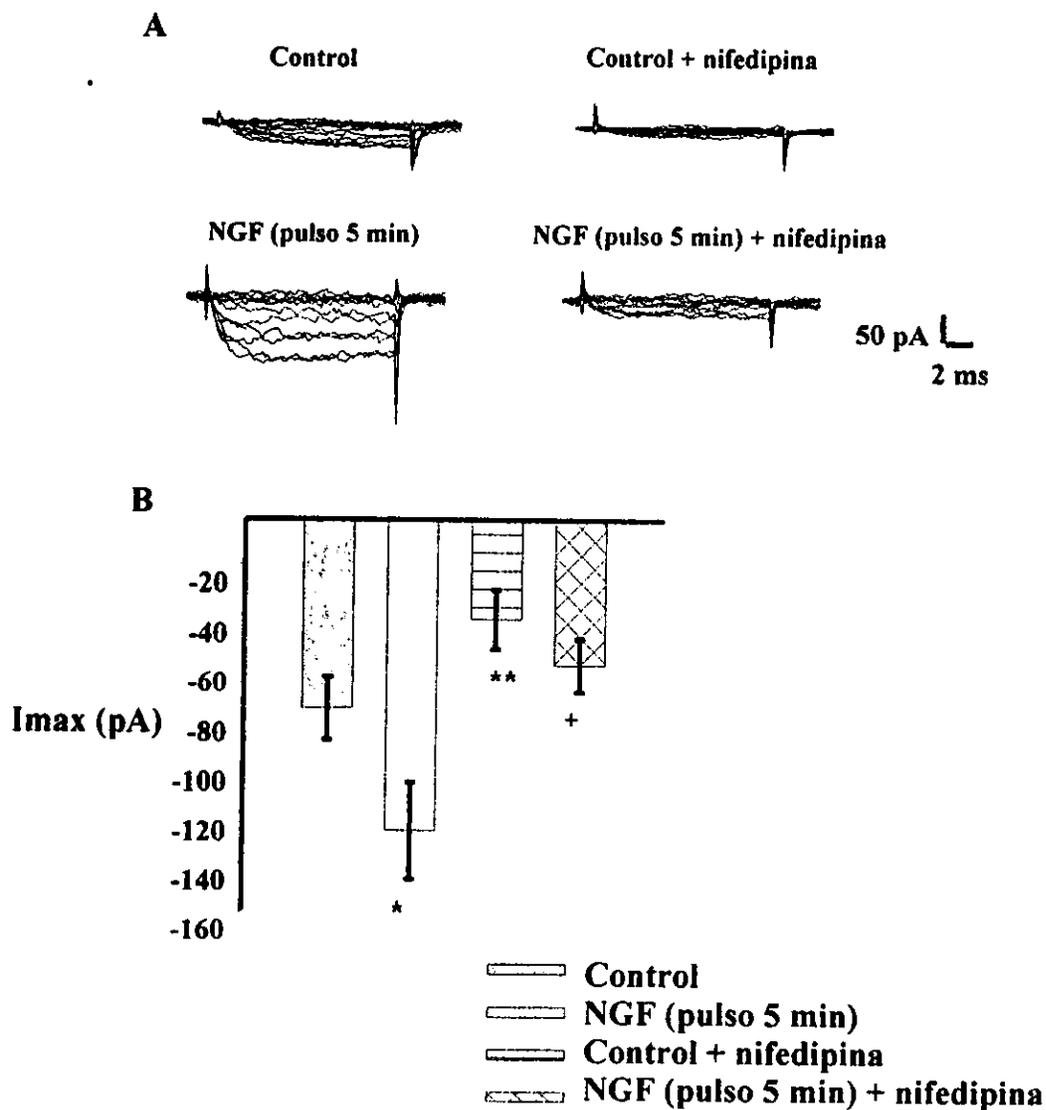
Figura 11. Efecto de un pulso corto de NGF sobre la corriente macroscópica de Ba<sup>2+</sup>. (A) Familias de corrientes de Ba<sup>2+</sup> de células control y células expuestas a un pulso corto de NGF (50 ng/ml, 5 min). (B) Relación corriente a voltaje de células expuestas a un pulso corto de NGF. Los registros se llevaron a cabo con las soluciones externa e interna B. La duración del pulso fue de 10 ms. Los resultado se grafican como X ± SEM (\*p < 0.01; +p < 0.05; n = 22 para ambos casos, prueba de Anova).

Para discernir el tipo de canales de Ca que son modulados por el NGF, se utilizaron la nifedipina (5  $\mu$ M) que bloquea específicamente los canales de Ca tipo L y la omega conotoxina GVIA (3  $\mu$ M) que bloquea los canales tipo N. Los resultados se muestran en las figuras 12A y 13A, donde podemos observar que ambos bloqueadores disminuyen la corriente de  $Ba^{2+}$ .

Para comparar los efectos de los bloqueadores, en las figuras 12B y 13B se muestra su efecto sobre la corriente máxima, medida a +20 mV. En la figura 12B se observa que aproximadamente un 60 % de la corriente total de  $Ba^{2+}$  es acarreada por los canales de Ca tipo L. En la figura 13B se demuestra que el 40 % de la corriente total de  $Ba^{2+}$  es acarreada por canales de Ca tipo N, tanto en las células  $\beta$  control como en las células expuestas a NGF.



**Figura 12. Fracción de corriente resistente a  $\omega$ -conotoxina.** (A) Tanto las células control como las células expuestas a NGF exhiben una corriente resistente a  $\omega$ -conotoxina. (B) Corriente resistente a  $\omega$ -conotoxina. Los registros se hicieron utilizando las soluciones externa e interna B más el bloqueador. La duración del pulso fue de 10 ms. Los datos se presentan como  $X \pm SEM$  (\* $p < 0.01$  vs. control, \*\*  $p < 0.05$  vs. control, + $p < 0.01$  vs. NGF, prueba de Anova;  $n = 14$ ).



**Figura 13. Fracción de corriente resistente a nifedipina.**(A) Tanto las células control como las células expuestas a NGF exhiben una corriente sensible a nifedipina. (B) Corriente resistente a nifedipina. Los registros se realizaron utilizando la solución externa e interna B más el bloqueador. La duración del pulso fue de 10 ms. Los datos se presentan como  $X \pm SEM$  (\* $p < 0.01$  vs. control, \*\*  $p < 0.05$  vs. control, + $p < 0.01$  vs. NGF, prueba de Anova;  $n = 11$ ).

El NGF promueve un aumento del 55 % en la densidad de corriente tipo L con respecto al control. Este factor también produce un aumento del 27 % en la densidad de corriente a través de los canales tipo N; sin embargo, este aumento no es estadísticamente significativo con respecto al control, como se muestra en la figura 13. Es decir, no existen diferencias estadísticamente significativas entre la corriente residual de las células control y las células expuestas a NGF, después de bloquear con la nifedipina. Cabe agregar que la aplicación de la nifedipina y de la omega conotoxina en conjunto, bloquea la corriente macroscópica de  $Ba^{2+}$  en un 100 % (datos no mostrados).

Finalmente, se llevaron a cabo experimentos utilizando un agonista específico de los canales de Ca tipo L, el Bay K 8644, el cual promueve un aumento en el tiempo medio de apertura de este tipo de canales de Ca (Noceti *et al.*, 1998). Estos experimentos se realizaron con el fin de determinar si el efecto del NGF a corto plazo pudiera ser a través de un mecanismo similar al del Bay K 8644. Como se muestra en la figura 14, las células que fueron expuestas al Bay K 8644 alcanzaron una amplitud de corriente casi idéntica a la que se observa con el NGF. Cuando el Bay K 8644 se aplicó en conjunto con el NGF, la amplitud de la corriente de  $Ba^{2+}$  fue muy similar a la que se observa cuando se aplican el Bay K 8644 o el NGF, por separado.

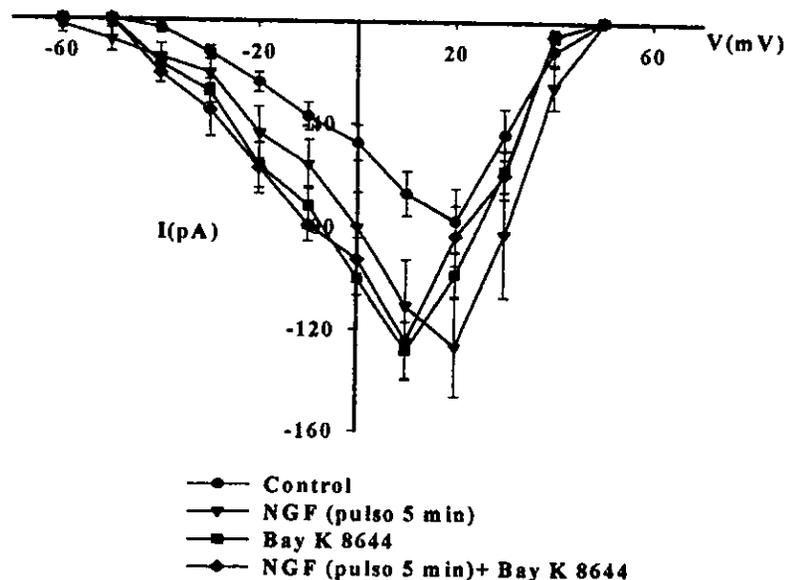
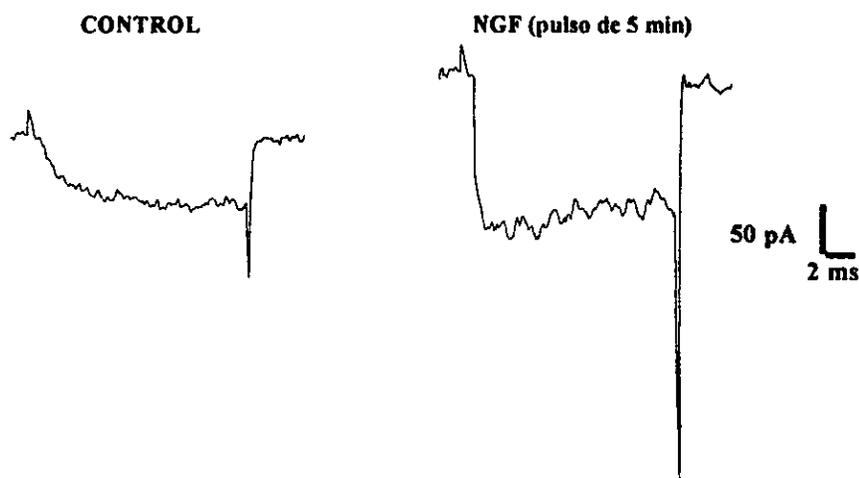


Figura 14. Efecto del Bay K 8644 sobre las corrientes macroscópicas de  $Ba^{2+}$ . Los registros se llevaron a cabo utilizando las soluciones de registro externa e interna B junto con el agonista de los canales de Ca tipo L, Bay K 8644 (5  $\mu$ M). Los datos se expresan como  $X \pm SEM$ .

### B.1.1) Efecto de la exposición de las células $\beta$ pancreáticas al NGF sobre la constante de tiempo de la desactivación de los canales de Ca.

Además de determinar el efecto del NGF sobre las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  macroscópicas de las células  $\beta$  pancreáticas, se determinó el efecto del factor sobre la constante de tiempo de desactivación de los canales de Ca. Se estudió la cinética del componente rápido de desactivación (FD) de los canales de Ca, ya que el NGF actúa sobre estos canales y además la contribución de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T a la corriente total es pequeña, como se evidencia en nuestros registros.

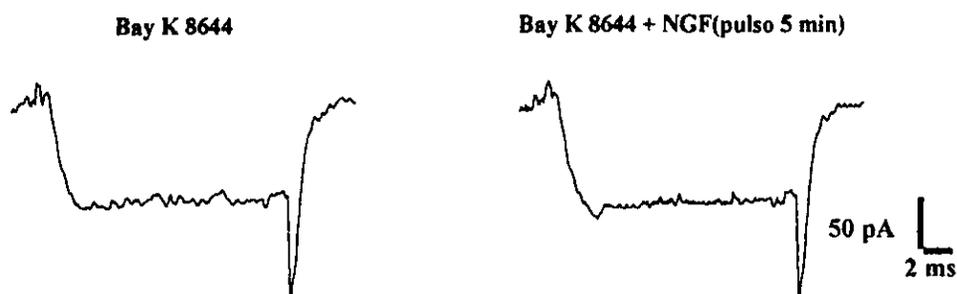
En la figura 15 se muestran las colas de corriente obtenidas al repolarizar a  $-80$  mV, después de un pulso de 10 ms a  $+20$  mV en una célula control y en una célula expuesta al NGF durante 5 minutos.



**Figura 15. Efecto de un pulso corto de NGF sobre la desactivación de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$ .** Registros de las colas de corriente de  $\text{Ba}^{2+}$  (soluciones externa e interna B), obtenidos con un pulso despolarizante a  $+20$  mV a partir de un potencial de mantenimiento de  $-80$  mV. La duración del pulso fue de 10 ms.

En la tabla IV se muestra que las constantes de desactivación de los canales de Ca tipo FD para las células control y las células expuestas al factor, no son distintas entre sí. Es decir, los efectos del NGF no se deben a un cambio en la constante de desactivación FD de los canales Ca.

Además, en la figura 16 se muestran colas de corriente para las células expuestas al Bay K 8644 y al NGF y el Bay K 8644, en conjunto. En la tabla IV también se puede observar que la exposición de las células al Bay K 8644 sólo o con el pulso de NGF, induce que las colas de corriente de  $Ca^{2+}$  sean más lentas con respecto a las células control o a las células expuestas al NGF. Aunque la corriente máxima con el Bay K 8644 se alcanza a +10 mV, para fines comparativos con las células control y expuestas a NGF, en la figura 16 y en la tabla IV, se muestran las colas de corriente y las constantes de desactivación a +20 mV. Además, estas constantes de desactivación no son estadísticamente significativas entre sí a voltajes que van de 0 a +20 mV.



**Figura 16. Efecto del Bay K 8644 sobre la desactivación de la corriente de  $Ca^{2+}$ .** Registros de las colas de corriente de  $Ba^{2+}$  (soluciones externa e interna B), obtenidos con un pulso despolarizante a +20 mV a partir de un potencial de mantenimiento de -80 mV. La duración del pulso fue de 10 ms.

	CONTROL ( $\mu$ s)	NGF ( $\mu$ s)	Bay K 8644 ( $\mu$ s)	Bay K 8644 y NGF ( $\mu$ s)
Constante de desactivación rápida	187 $\pm$ 15.7	172.6 $\pm$ 14	292.3 $\pm$ 24*	280 $\pm$ 20*

**Tabla IV. Constantes de desactivación rápida.** Los datos se muestran como  $X \pm SEM$  (\* $p < 0.01$  vs. Control y NGF;  $n = 8$  para todos los casos).

### B.1.2) Dependencia de la activación de los canales de Ca al voltaje.

La figura 17 muestra las curvas de activación de la corriente de  $Ba^{2+}$  de células control y expuestas al NGF por 5 min. En esta figura se puede observar que la cinética de activación de los canales de Ca de las células expuestas al NGF por 5 min, se encuentra corrida hacia la izquierda de la curva control. Como se muestra en la tabla V, el  $V_{a1/2}$  de las células expuestas al NGF aumenta de manera significativa con respecto al  $V_{a1/2}$  de las células control ( $-29.3 \pm 1.0$  vs.  $-37.2 \pm 1.7$ ).

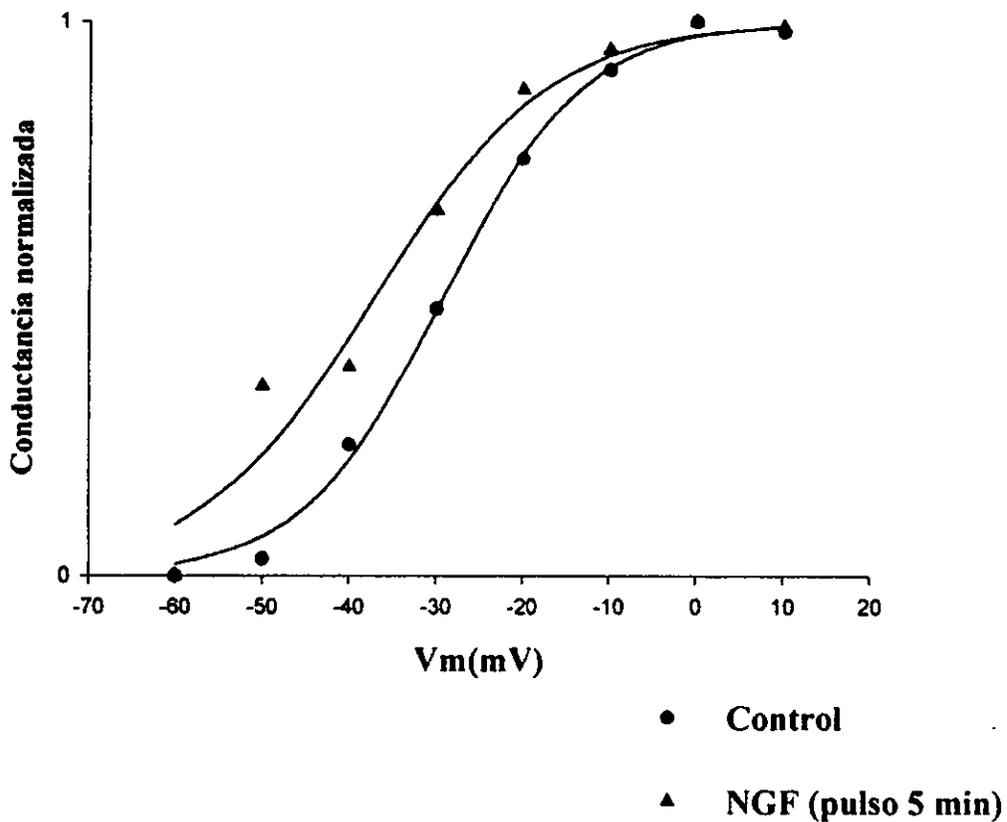
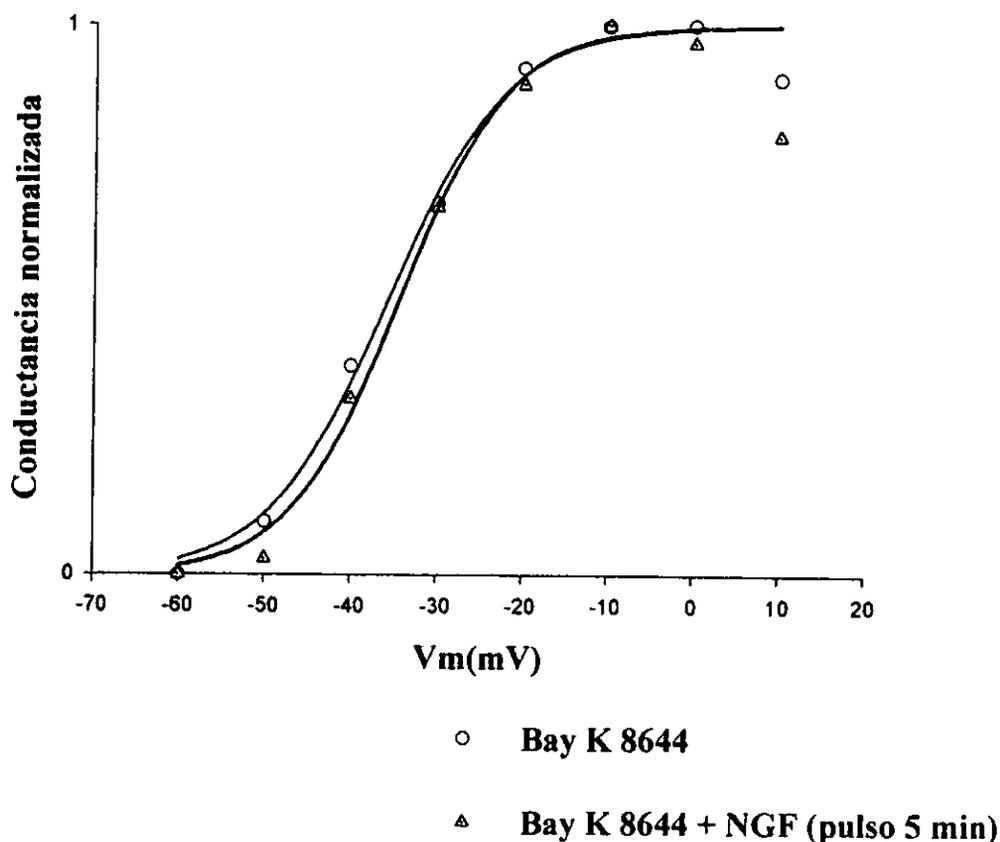


Figura 17. Dependencia de la activación de los canales de Ca al voltaje. Los símbolos representan los datos experimentales. Las líneas continuas representan el ajuste de estos datos a la ecuación de Boltzmann.

En la figura 18, se muestran las curvas de activación para células expuestas al Bay K 8644 y células expuestas al Bay K 8644 y al NGF, en conjunto. Como se ve en la tabla V, el  $V_{a_{1/2}}$  de las células expuestas al agonista de los canales de Ca tipo L cuando se aplicaba sólo o en conjunto con NGF, es estadísticamente distinto del  $V_{a_{1/2}}$  de las células control ( $-29.3 \pm 1.0$  vs.  $-36.1 \pm 3.0$  y  $-29.3 \pm 1.0$  vs.  $-34.4 \pm 3.4$ , respectivamente), pero no del  $V_{a_{1/2}}$  de las células expuestas solamente al NGF.



**Figura 18.** Dependencia de la activación de los canales de Ca al voltaje. Los símbolos representan los datos experimentales. Las líneas continuas representan el ajuste de estos datos a la ecuación de Boltzmann.

Parámetro	Control	NGF	BAY K 8644	BAY K 8644 y NGF
V <sub>a1/2</sub>	-29.3 ± 1.0	-37.2 ± 1.7*	-36.1 ± 3.0*	-34.4 ± 3.4*
ka	8.02 ± 0.9	10.0 ± 1.6	7 ± 2.6	6.31 ± 3.0

**Tabla V. Parámetros de Boltzmann de las corrientes de Ba<sup>2+</sup> de las células β pancreáticas.** (V<sub>a1/2</sub> = voltaje medio de activación y ka = constante de activación. Los datos se muestran como X ± SEM (\*p < 0.05 vs. control, prueba de Anova; n = 12, para todos los casos).

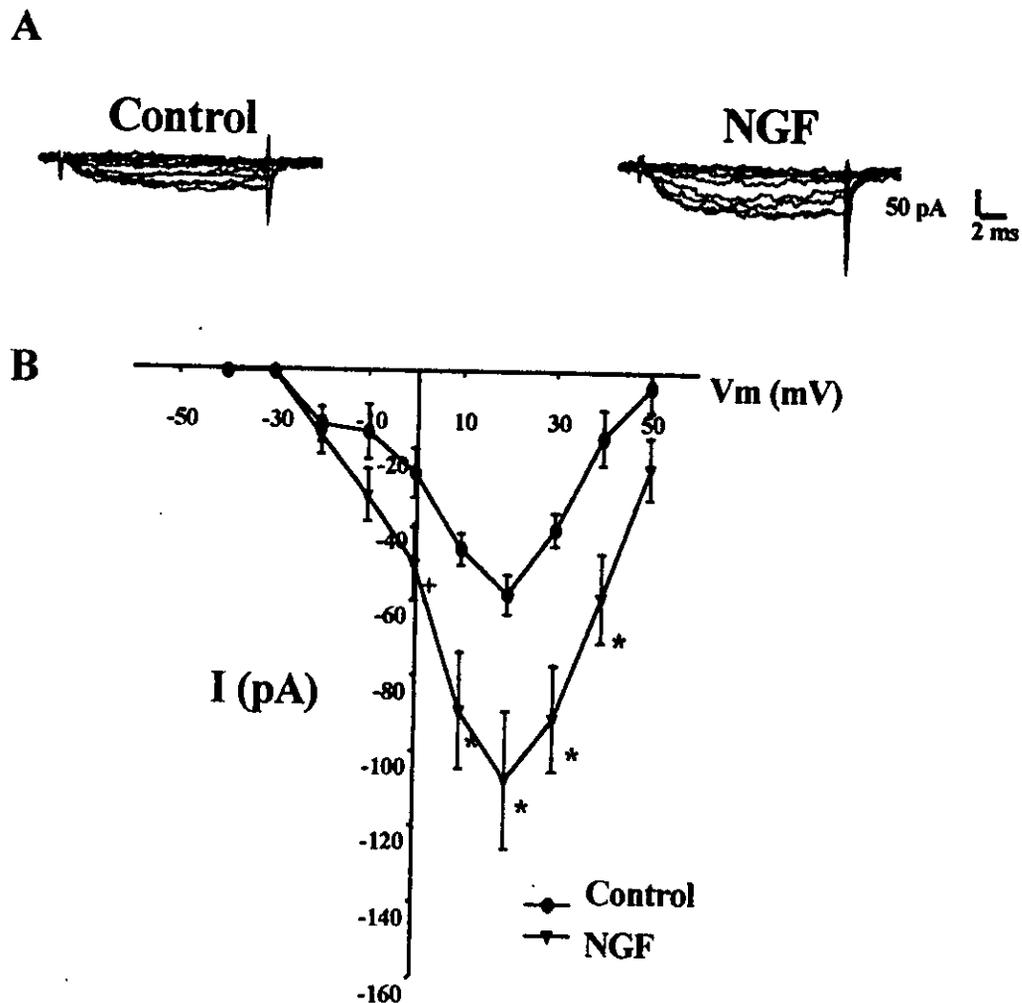
## B.2) Efectos del NGF a largo plazo.

Una vez estudiados los efectos del NGF a corto plazo sobre las corrientes de Ba<sub>2+</sub>, decidimos evaluar los efectos de este factor sobre las mismas pero en células cultivadas durante 5 a 7 días en presencia del factor.

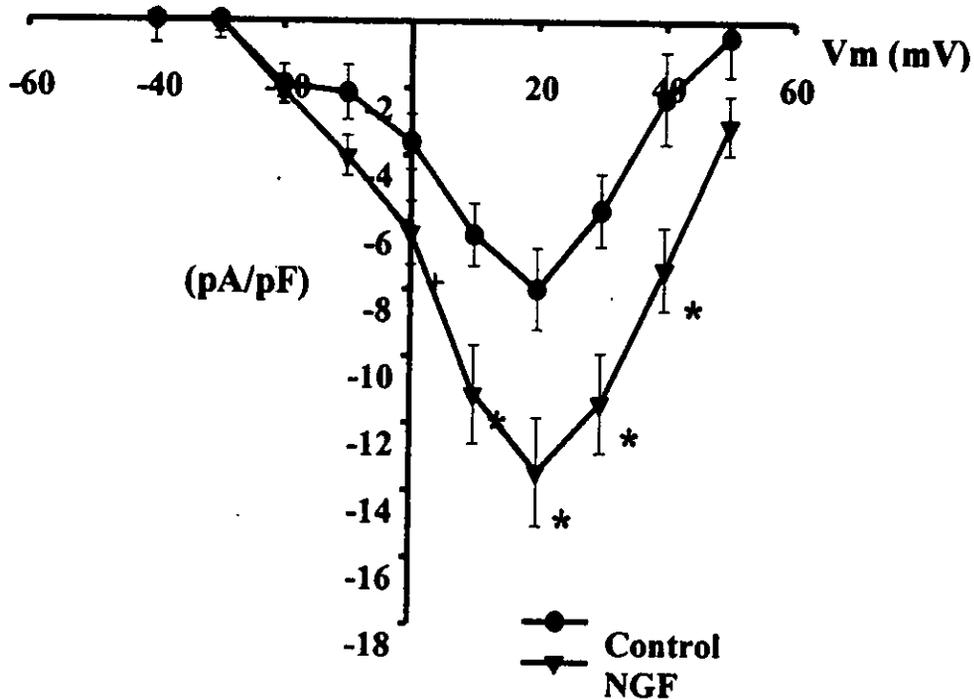
En las figuras 19 y 20 y en la tabla VI, se observa que las células tratadas con NGF durante 5 días mostraron un aumento del 68 % en la densidad de corriente, ya que las capacitancias de las células tratadas no varían de manera significativa con respecto al control.

TRATAMIENTO	CAPACITANCIA (pF)	DENSIDAD (pA/pF)	CORRIENTE AL PICO (+20 mV) (pA)
Control	7.3 ± 0.5	8.0 ± 1.2	-58.1 ± 5.2
NGF	8.0 ± 0.3	13.5 ± 1.3*	-108 ± 18.3*

**Tabla VI. Efecto del cultivo con NGF durante 5 días sobre la densidad de corriente de Ba<sup>2+</sup>.** Los datos se muestran como X ± SEM (\*p < 0.01 vs. control, prueba de Anova).



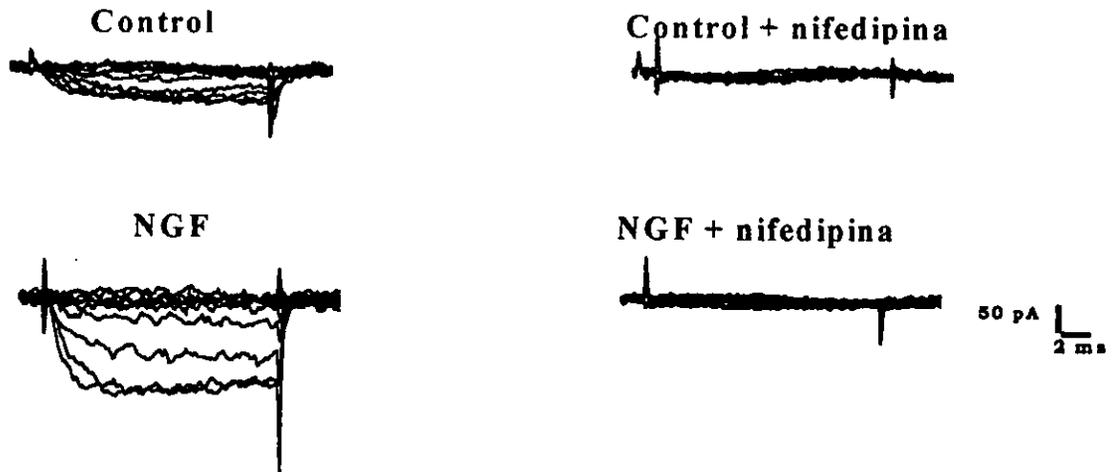
**Figura 19. Efecto del NGF a largo plazo sobre las corrientes macroscópicas de Ba<sup>2+</sup>.** (A) Familias de corrientes de Ba<sup>2+</sup> de células control y células cultivadas con NGF durante 5 días. (B) Relación corriente a voltaje de células cultivadas en presencia del NGF. Los registros se obtuvieron a diferentes voltajes desde un potencial de mantenimiento de -80 mV. Los experimentos se llevaron a cabo con las soluciones de registro externa B e interna C. La duración del pulso fue de 10 ms. Los datos se expresan como X ± SEM (\*p < 0.01 vs. control; +p < 0.05 vs. control, prueba de Anova; n = 25 en ambos casos).



**Figura 20) Efecto del NGF a largo plazo (5 días) sobre la densidad de corriente de bario.**

Los registros se llevaron a cabo usando las soluciones externa B e interna C. Los datos se expresan como  $X \pm SEM$  (\* $p < 0.01$ , prueba de Anova;  $n = 25$  para ambos casos).

En la figura 21 se observa que a los 5 días en cultivo, la corriente sensible a  $\omega$ - conotoxina GVIA (corriente tipo N) desaparece totalmente, tanto en las células control como en las células tratadas con NGF y por lo tanto, se obtiene un bloqueo del 100 % de las corrientes con la nifedipina (corriente tipo L). Es decir, en este caso el aumento inducido en la densidad de corriente por el NGF, se debe exclusivamente a un aumento en la corriente tipo L.

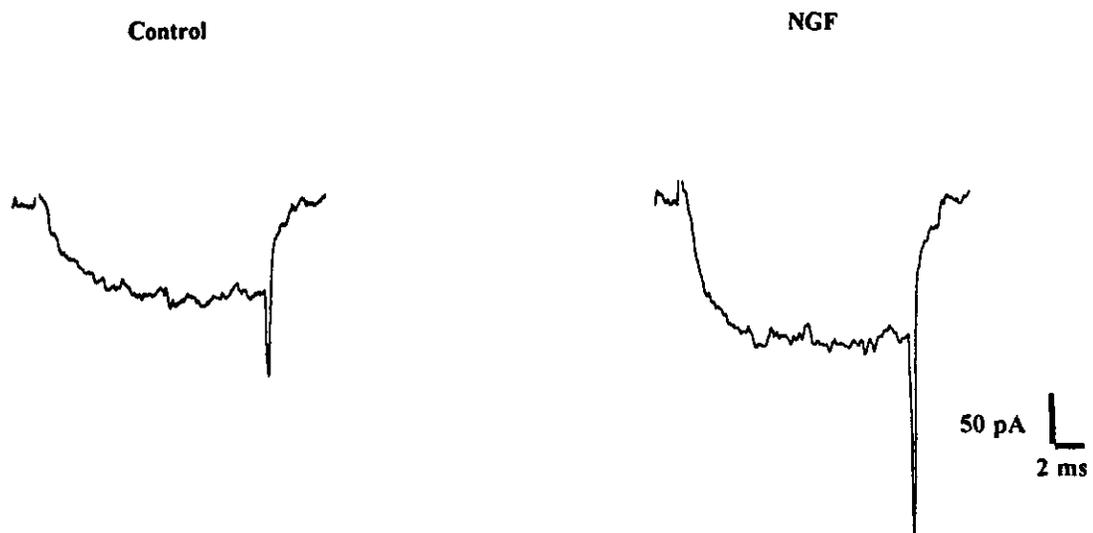


**Figura 21) Efecto de la nifedipina sobre la corriente macroscópica de bario.** Los registros se llevaron utilizando las soluciones de registro externa B e interna C más el bloqueador ( $5 \mu\text{M}$ ). La duración del pulso fue de 10 ms.

### **B.2.1) Efecto de la exposición de las células $\beta$ pancreáticas al NGF sobre la cinética de desactivación y activación de los canales de Ca.**

Además de determinar el efecto del NGF sobre las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  macroscópicas de las células  $\beta$  pancreáticas, se determinó el efecto del factor sobre la cinética de desactivación de estos canales. Como ya ha sido mencionado, se estudió la cinética de los canales de Ca con desactivación rápida (FD), ya que el NGF actúa sobre estos canales y además la contribución de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T a la corriente total es pequeña, como se evidencia en nuestros registros.

En la figura 22 se muestran las colas de corriente obtenidas al repolarizar a  $-80 \text{ mV}$ , después de un pulso de 10 ms a  $+20 \text{ mV}$  en una célula control y en una célula cultivada con NGF durante 5 días.



**Figura 22) Efecto del NGF sobre la desactivación de la corriente de bario.** Registros de las colas de corriente de  $Ba^{2+}$  (soluciones externa e interna B), obtenidos con un pulso despolarizante a +20 mV a partir de un potencial de mantenimiento de -80 mV. La duración del pulso fue de 10 ms.

En la tabla VII se muestra que las constantes de desactivación de los canales de Ca tipo FD para las células control y las células cultivadas con el factor, no son distintas entre sí. Por lo tanto, el NGF no ejerce sus efectos a través de cambios sobre la cinética de cierre de los canales de Ca. Además, se observa que las constantes de desactivación de las células cultivadas durante 1 a 3 días (Tabla IV) y las de las células cultivadas durante 5 días (Tabla VII), no son distintas entre sí.

	CONTROL ( $\mu$ s)	NGF ( $\mu$ s)
Constante de Desactivación rápida	177 $\pm$ 15.4	193 $\pm$ 17

Tabla VII. Constantes de desactivación rápida. Los datos se muestran como  $X \pm SEM$ .

También se determinaron los valores de  $V_{a_{1/2}}$  y  $k_a$  para la cinética de activación de los canales de Ca de células control y células cultivadas con el NGF durante 5 días. Como se muestra en la tabla VIII, no existen diferencias significativas entre los  $V_{a_{1/2}}$  y las  $k_a$  de las células control y de las células cultivadas en presencia del factor.

Parámetro	Control	NGF
$V_{a_{1/2}}$	-18.5 $\pm$ 1.9	-16.0 $\pm$ 2.0
$k_a$	5 $\pm$ 2.0	8.6 $\pm$ 1.1

Tabla VIII. Parámetros de Boltzmann de las corrientes de bario de las células  $\beta$  pancreáticas. ( $V_{a_{1/2}}$  = voltaje medio de activación y  $k_a$  = constante de activación. Los datos se muestran como  $X \pm SEM$ ).

### B.2.2) Efecto de la deprivación de NGF durante 24 horas sobre la densidad de corriente de $Ba^{2+}$ .

El aumento en la amplitud de la corriente y en la densidad de corriente que induce el NGF cuando las células son cultivadas en su presencia durante 5 días, no es significativamente distinto de los efectos que promueve el NGF a corto plazo. Por esto fue necesario esclarecer si los efectos del NGF sobre la corriente de  $Ca^{2+}$  se debían a una acción sobre la fosforilación y/o tiempo de apertura de los canales, como muy probablemente sea el caso para los efectos del factor a corto plazo o si se trataba de un aumento en la cantidad de canales por unidad de área de membrana como ocurre con la corriente de sodio. Para esto se llevó a cabo el registro de las corrientes en células cultivadas durante 4 días en presencia del factor y deprivadas del mismo durante 24 horas antes del registro.

La hipótesis fue que, bajo estas condiciones, el ligando se separaría del receptor y que los canales, en caso de estar fosforilados, se desfosforilarían. De esta manera sería posible discernir si se trataba de un efecto reversible como sería la fosforilación de los canales y/o sobre la probabilidad de apertura de los mismos o si era un efecto de aumento en la densidad de canales.

Como se ve en la figura 23, a los 5 días en cultivo, tanto la relación corriente a voltaje como la densidad de corriente de las células deprivadas del NGF durante 24 h fueron idénticas a la curva de las células cultivadas 5 días en presencia del factor. Esto sugiere fuertemente que el efecto del NGF sobre las corrientes de  $Ca^{2+}$  con el tratamiento a los 5 días en presencia del factor, se debe a un aumento en la densidad de canales por unidad de área de membrana.

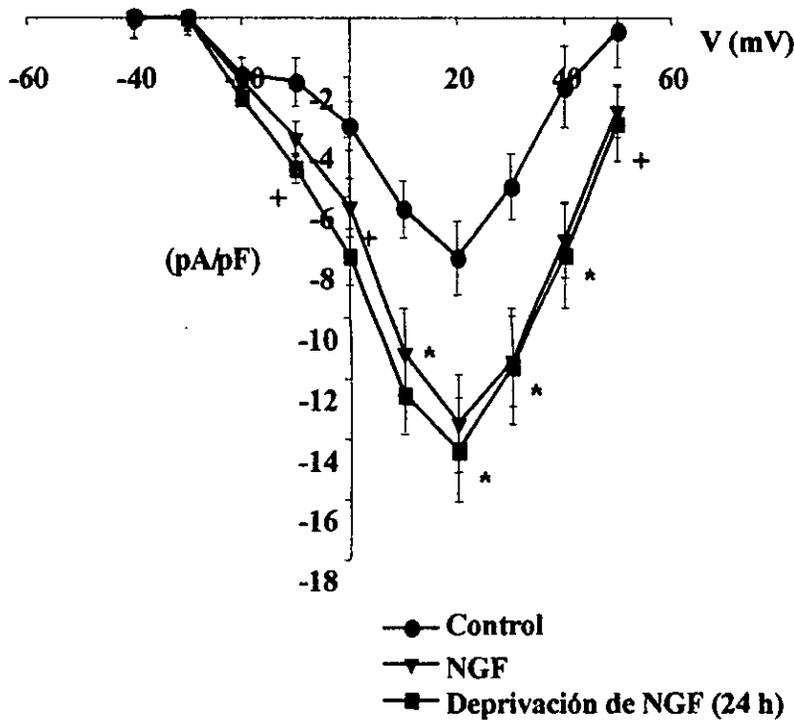
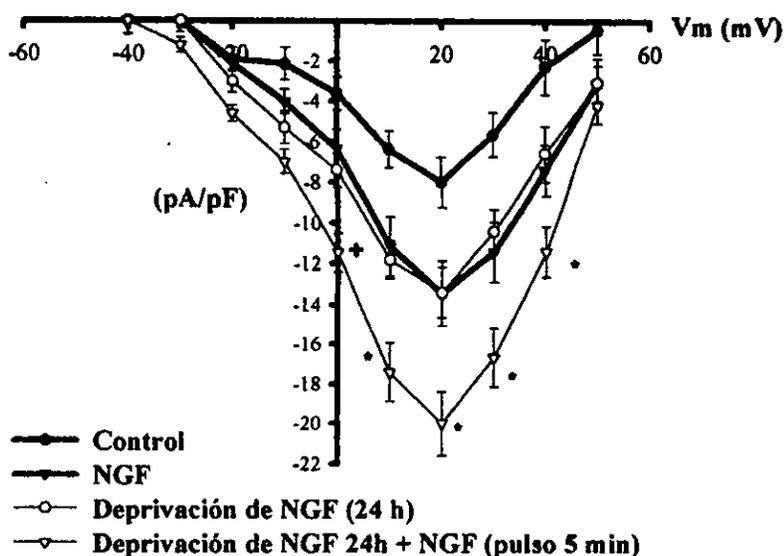


Figura 23. Efecto de la deprivación de NGF durante 24 horas sobre la densidad de corriente de bario. Los registros se llevaron a cabo usando las soluciones externa B e interna C. Los datos se representan como  $X \pm SEM$  (\* $p < 0.01$  vs. Control; + $p < 0.05$  vs. Control, prueba de Anova).

Para determinar si se podía alcanzar una mayor amplitud de corriente que la que se obtiene con el cultivo durante 5 días, se realizaron experimentos en los cuales se mantuvieron a las células en presencia del NGF durante 4 días, luego se les privó del factor durante 24 horas y 5 minutos antes del registro se les aplicó NGF. La hipótesis fue que, dado que el NGF aplicado de manera crónica parece aumentar la *síntesis de novo* de canales, entonces la aplicación de un pulso corto de NGF debería resultar en una amplitud de corriente mayor a la que se obtiene en el cultivo crónico *per se*.

En la figura 24 se muestra que la aplicación del pulso corto de NGF a las células cultivadas durante 4 días en presencia del factor y deprivadas del mismo durante 24 h, induce un aumento del 60 % en la densidad de corriente con respecto a las células que no fueron expuestas al pulso corto de NGF pero cultivadas por 4 días en presencia del factor. De hecho, la densidad de corriente, en este caso, también es mayor a el que se observa en las células cultivadas durante 1 a 3 días y expuestas a un pulso corto de NGF ( $-15.7 \pm 2.5$  vs.  $-21.52 \pm 1.23$ , a +20 mV).



**Figura 24.** Efecto de un pulso corto de NGF sobre la densidad de corriente de bario de células cultivadas en presencia del factor durante 4 días y después deprivadas del mismo durante 24 horas. Los registros se hicieron utilizando las soluciones de registro externa B e interna C. Los datos se muestran como  $X \pm SEM$  (\* $p < 0.01$  vs control y vs. células cultivadas con el NGF, prueba de Anova;  $n = 10$ ; + $p < 0.05$ ).



### C) PAPEL DE LOS CANALES DE Na Y Ca SOBRE EL DESARROLLO DE PROCESOS DE TIPO NEURÍTICO EN LAS CÉLULAS $\beta$ PANCREÁTICAS.

#### C.1) Efecto del bloqueo de los canales de Na sobre la extensión de procesos de tipo neurítico inducido por NGF + dbAMPc.

Para determinar el papel de los canales de Na sobre la extensión de los procesos de tipo neurítico en las células  $\beta$  pancreáticas se utilizó la TTX en el cultivo. Como se muestra en la figura 25, la TTX (100 nM) produce una disminución del 51 % en el número de células con procesos de tipo neurítico en las células cultivadas con NGF + dbAMPc.

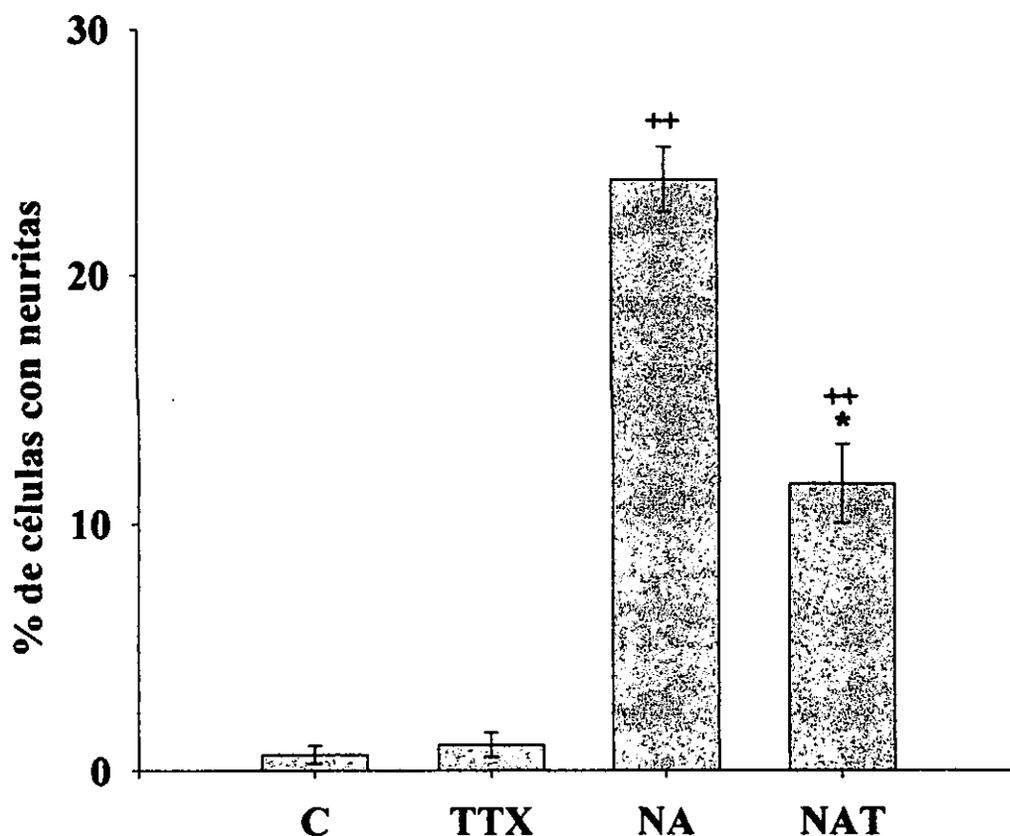


Figura 25. Papel de los canales de sodio sobre la extensión de procesos de tipo neurítico inducida por NGF + dbAMPc. C = Control, TTX = tetrodotoxina, NAT = NGF + dbAMPc + TTX, NA = NGF + dbAMPc. Los datos se expresan como  $X \pm SEM$  (++)  $p < 0.01$  vs. Control, \*  $p < 0.01$  vs. NA; n = 4 experimentos).

## C.2) Efecto del bloqueo de los canales de Ca tipo L sobre la extensión de procesos de tipo neurítico inducida por NGF y dbAMPc.

Dado que los canales de Ca tipo L juegan un papel importante en la extensión de procesos citoplásmicos en otros modelos y a que el NGF induce un aumento en la densidad de corriente de bario, se investigó el papel de estos canales sobre la extensión de procesos de tipo neurítico de las células  $\beta$  inducido por NGF y dbAMPc.

En la figura 26 se muestra que la nifedipina (inhibidor de los canales de Ca tipo L), induce una disminución del 57 % en el número de células con procesos citoplásmicos en las células tratadas con NGF + dbAMPc.

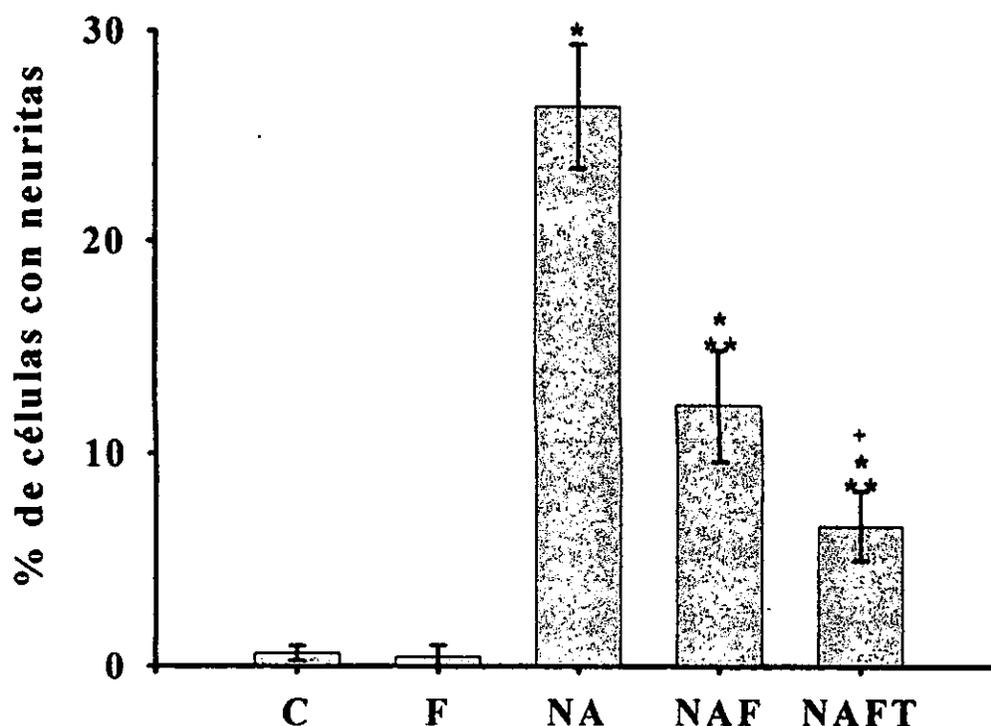


Figura 26. Papel de los canales de Na y de Ca tipo L sobre la extensión de procesos de tipo neurítico inducida por NGF + dbAMPc. C = Control, F = nifedipina, NA = NGF + dbAMPc, NAF = NGF + dbAMPc + nifedipina, NAFT = NGF + dbAMPc + nifedipina + TTX. Los datos se expresan como  $X \pm SEM$  (\* $p < 0.01$  vs. Control, \*\* $p < 0.01$  vs. NA;  $n = 4$  experimentos). Los datos se expresan como  $X \pm SEM$  (\* $p < 0.01$  vs. Control, \*\* $p < 0.01$  vs. NA y + $p < 0.05$  vs. NAF, prueba de Anova;  $n = 4$  experimentos).

La figura 26 muestra que, al agregar TTX a los cultivos con nifedipina, la disminución en el porcentaje de células con procesos citoplásmicos es del 76 % con respecto a las células tratadas con NGF + dbAMPc.

### C.3) Efecto del bloqueo de los canales de Ca tipo N sobre la extensión de procesos de tipo neurítico por NGF + dbAMPc.

Para determinar el papel que juegan los canales de Ca tipo N sobre la extensión de procesos de tipo neurítico inducida por NGF + dbAMPc, se utilizó la  $\omega$ -conotoxina (3  $\mu$ M). La figura 27 demuestra que esta toxina induce una disminución del 30 % en el porcentaje de células con procesos con respecto al grupo que fue tratado sólo con NGF + dbAMPc. Cuando a estos cultivos se agregaron  $\omega$ -conotoxina y nifedipina juntas, se obtuvo una disminución del 71 % con respecto al grupo tratado con NGF + dbAMPc.

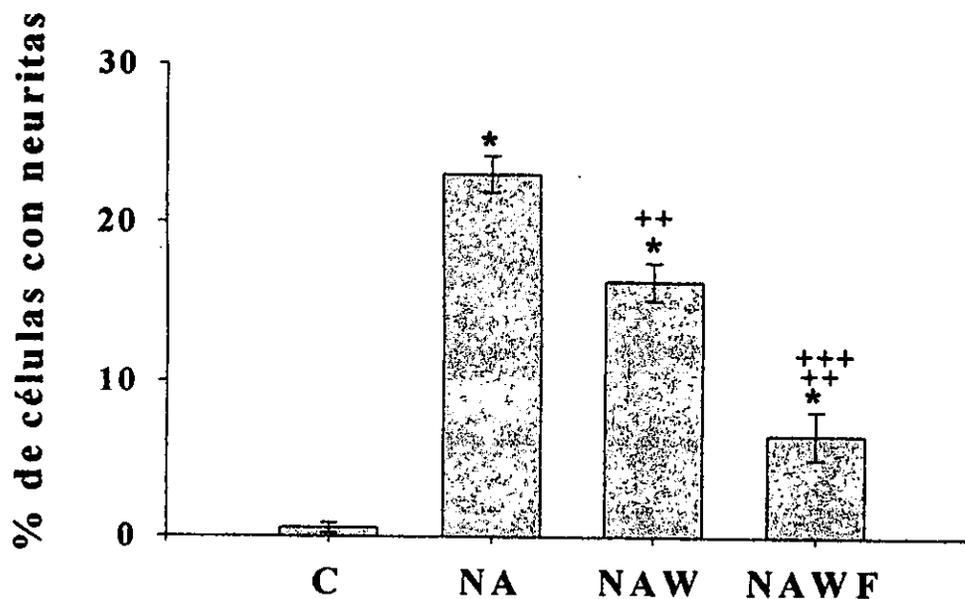


Figura 27. Papel de los canales de Ca tipo L y N sobre la extensión de procesos de tipo neurítico inducida por NGF + dbAMPc. C= Control, NA= NGF + dbAMPc, NAW= NGF + dbAMPc +  $\omega$ -conotoxina, NAWF= NGF + dbAMPc +  $\omega$ -conotoxina + nifedipina. Los datos se expresan como  $X \pm$  SEM. (\* $p < 0.01$  vs. control y ++ $p < 0.01$  vs. NA; +++ $p < 0.01$  vs. NAW, con prueba de Anova; n = 4 experimentos).

#### C.4) Efecto de la despolarización con potasio sobre la extensión de procesos citoplásmicos inducida por NGF y/o dbAMPc.

El aumento en la concentración extracelular de potasio induce la despolarización de las células  $\beta$  llevando a la apertura de canales de Na y Ca. Por esta razón, se decidió investigar el papel del KCl (40 mM) sobre la extensión de los procesos de tipo neurítico inducida por NGF y/o dbAMPc.

Como se muestra en la figura 28, el KCl induce un aumento de 20 veces en el número de células con procesos citoplásmicos con respecto al control y que este efecto es bloqueado por la TTX (70 % de disminución en el porcentaje de células con procesos con respecto a las células que fueron cultivadas sólo con KCl).

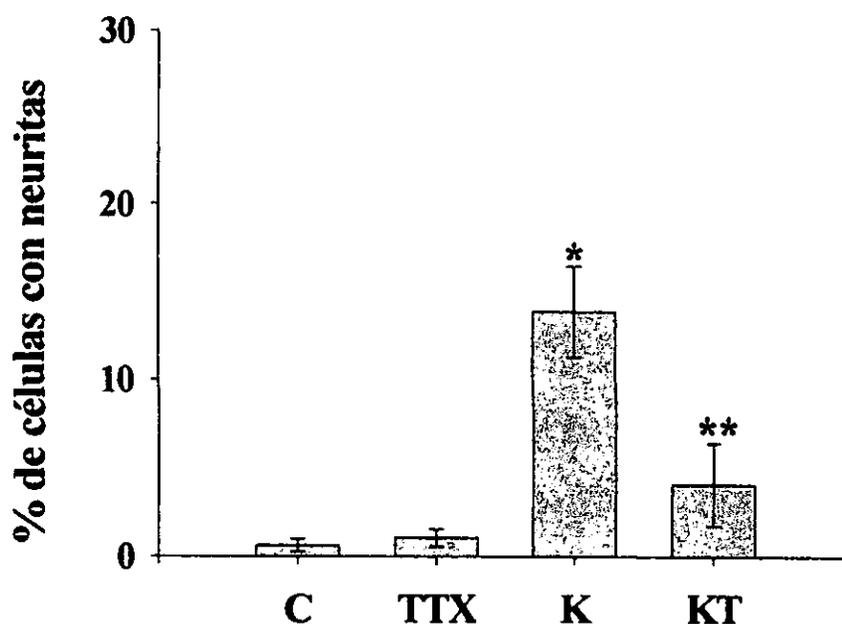


Figura 28. Efecto de la despolarización sobre extensión de procesos citoplásmicos. C = Control, KT= KCl + TTX, K = KCl. Los datos se representan como  $X \pm SEM$  (\* $p < 0.01$  vs. control y \*\* $p < 0.01$  vs. KCl, prueba de Anova;  $n = 4$  experimentos).

En la figura 29 se muestra que la nifedipina bloquea en un 100 % los efectos del KCl sobre la extensión de procesos de tipo neurítico. En cambio, la  $\omega$ -conotoxina, induce una disminución del 59.8 % en el porcentaje de células con procesos.

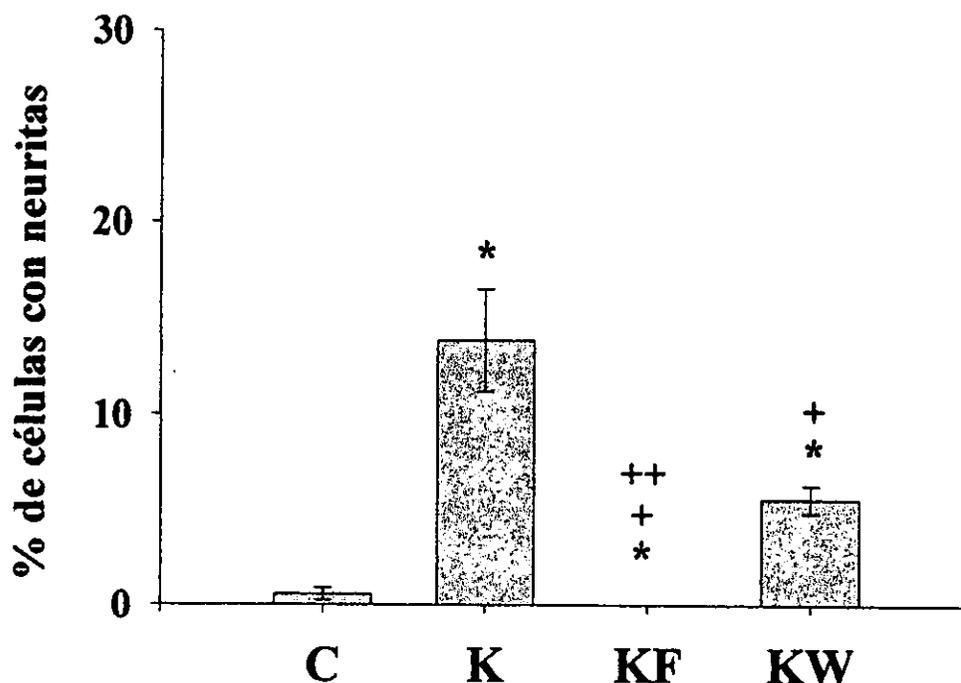
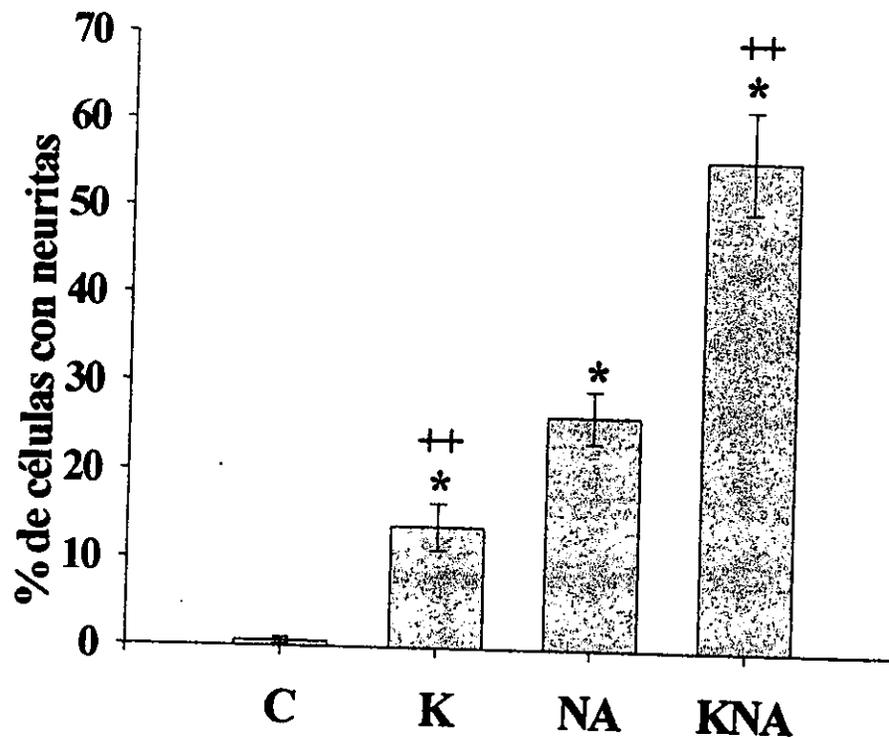


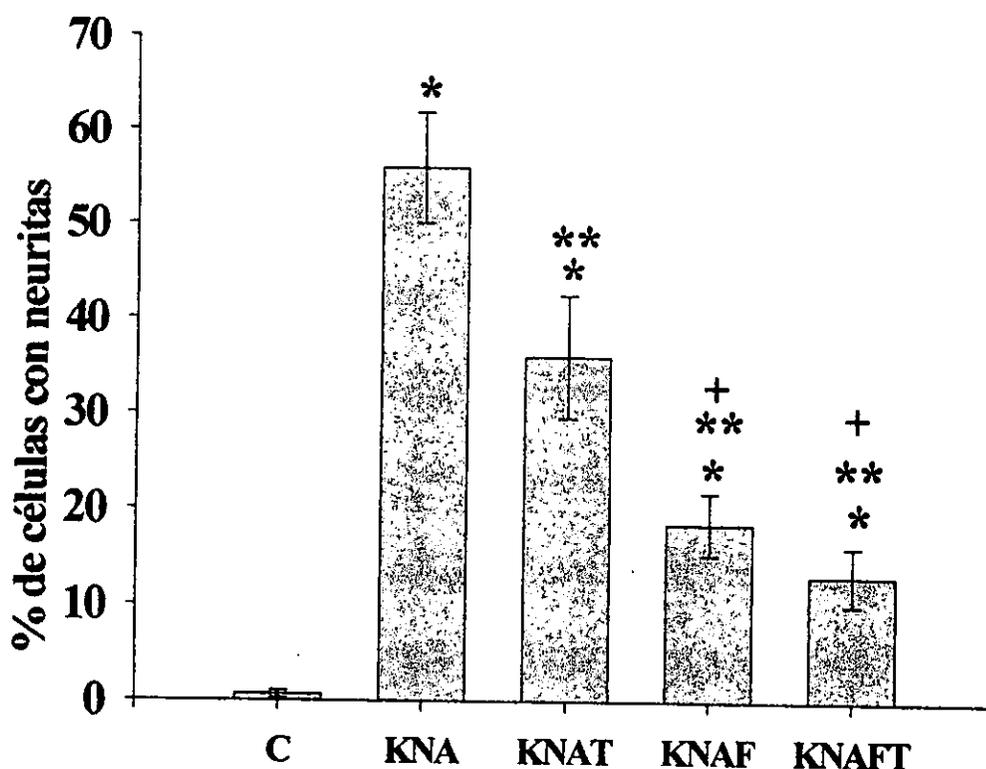
Figura 29. Papel de los canales de Ca de tipo L y N sobre el desarrollo de procesos de tipo neurítico inducido por la despolarización. C = Control, K= KCl, KF = KCl + nifedipina; KW= KCl +  $\omega$ -conotoxina. Los datos se expresan como  $X \pm SEM$  (\* $p < 0.01$  vs. Control;  $p < 0.01$  vs. KCl y  $++p < 0.01$  vs. KW, prueba de Anova;  $n = 4$  experimentos).

En la figura 30 observamos que el KCl induce un aumento del 57 % en el número de células con procesos parecidos a neuritas en las células tratadas con NGF + dbAMPc. Esta combinación produjo prolongaciones parecidas a neuritas en el mayor porcentaje de células, comparado con cualquier otro tratamiento.



**Figura 30. Papel de la despolarización sobre el desarrollo de procesos de tipo neurítico inducido por NGF + dbAMPc.** C = Control, K= KCl, NA = NGF + dbAMPc; KNA= KCl + NGF + dbAMPc. (\* $p < 0.01$  vs. control, ++ $p < 0.01$  vs. NA, prueba de Anova;  $n = 4$  experimentos). Los datos se expresan como  $X \pm SEM$ .

Como se observa en la figura 31, la TTX indujo una disminución del 36 % en el número de células con procesos citoplásmicos con respecto al grupo KCl + NGF + dbAMPc y la nifedipina, una disminución del 66 %. Cuando se agregaron a estos cultivos nifedipina y TTX en conjunto, no se observó una disminución mayor en el porcentaje de células con procesos con respecto al grupo tratado con KCl + dbAMPc y nifedipina.



**Figura 31.** Papel de los canales de sodio y de Ca tipo L sobre el desarrollo de procesos de tipo neurítico inducido por KCl + NGF + dbAMPc. C = Control, KNA = KCl + NGF + dbAMPc, KNAT = KCl + NGF + dbAMPc + TTX, KNAF = KCl + NGF + dbAMPc + nifedipina, KNAFT = KCl + NGF + dbAMPc + nifedipina + TTX. Los datos se expresan como  $X \pm SEM$  (\* $p < 0.01$  vs. Control, \*\* $p < 0.01$  vs. KNA y + $p < 0.01$  vs. KNAT, prueba de Anova;  $n = 4$  experimentos).

En la figura 32 se muestra que la adición de  $\omega$ -conotoxina a los cultivos expuestos a NGF + dbAMPc y KCl, indujo una disminución del 70 % en el porcentaje de células con procesos. Además, si a este último caso se agrega la nifedipina, la disminución alcanzada era del 84 %. Este efecto de la  $\omega$ -conotoxina sobre la extensión de procesos inducida por KCl, NGF y dbAMPc es mayor que el que se observa cuando las células son cultivadas solamente con NGF y dbAMPc (figura 27). Esto podría explicarse por el hecho de que, en el primer caso, el KCl promueve la apertura de los canales de Ca activados por voltaje y, en este caso, la participación de los canales de Ca tipo N, presentes aún en los primeros días del cultivo, es más importante que cuando las células son cultivadas sólo con NGF y dbAMPc.

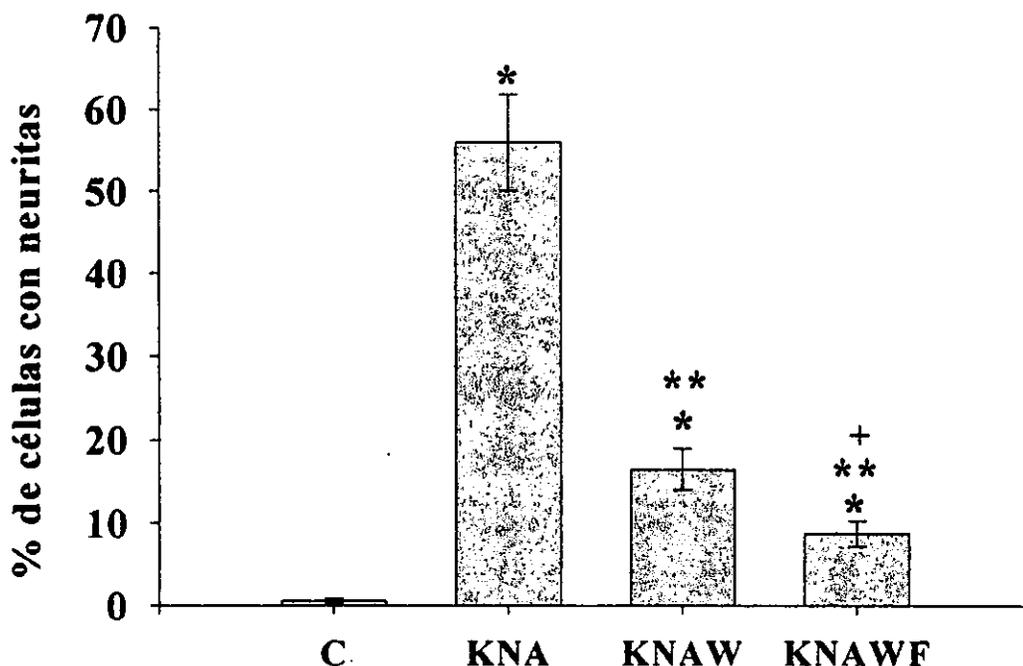
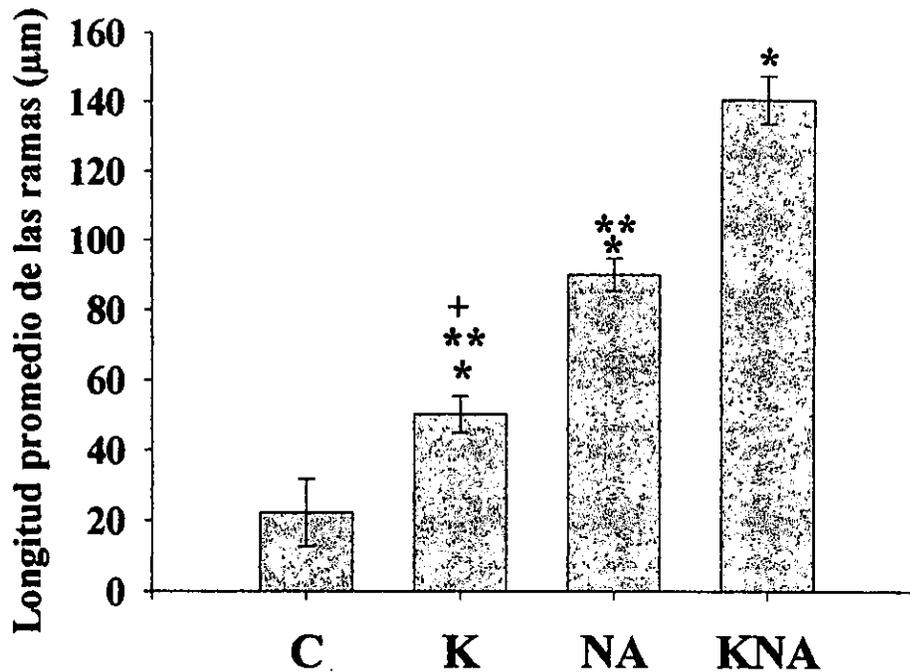


Figura 32. Papel de los canales de Ca tipo N sobre el desarrollo de procesos de tipo neurítico inducido por KCl + NGF + dbAMPc. C = Control, KNA = KCl + NGF + dbAMPc, KNAW = KCl + NGF + dbAMPc +  $\omega$ -conotoxina, KNAWF = KCl + NGF + dbAMPc +  $\omega$ -conotoxina + nifedipina. Los datos se expresan como  $X \pm$  SEM (\* $p < 0.01$  vs. control, \*\* $p < 0.01$  vs. KNA y + $p < 0.01$  vs. KNAW, prueba de Anova;  $n = 4$  experimentos).

### C.5) Efecto de los tratamientos sobre la longitud de los procesos de tipo neurítico.

En la figura 33 se muestra que las células cultivadas con NGF + dbAMPc exhibieron un aumento del 75 % en la longitud promedio de las neuritas con respecto al grupo control. El KCl por sí solo, indujo un aumento del 57 % en la longitud promedio de los procesos con respecto al grupo control. De manera interesante, cuando se añadió KCl a los cultivos expuestos a NGF + dbAMPc, se observó un aumento del 36 % con respecto a su propio control (células tratadas con NGF + dbAMPc).



**Figura 33. Efecto de la despolarización sobre la longitud promedio de los procesos de tipo neurítico inducido por NGF+ dbAMPc. C = Control, K= KCl, NA= NGF + dbAMPc, KNA= KCl + NGF + dbAMPc. Los datos se expresan como  $X \pm SEM$  (\* $p < 0.01$  vs. control, \*\* $p < 0.01$  vs. KNA y + $p < 0.01$  vs. NA, prueba de Anova;  $n = 4$  experimentos).**

En la figura 34 se observa el efecto de los bloqueadores sobre la longitud de los procesos. Se observó que la TTX no tuvo ningún efecto en ninguno de los casos. La  $\omega$ -conotoxina tampoco tuvo efectos sobre la longitud de los procesos de las células tratadas sólo con KCl (datos no mostrados).

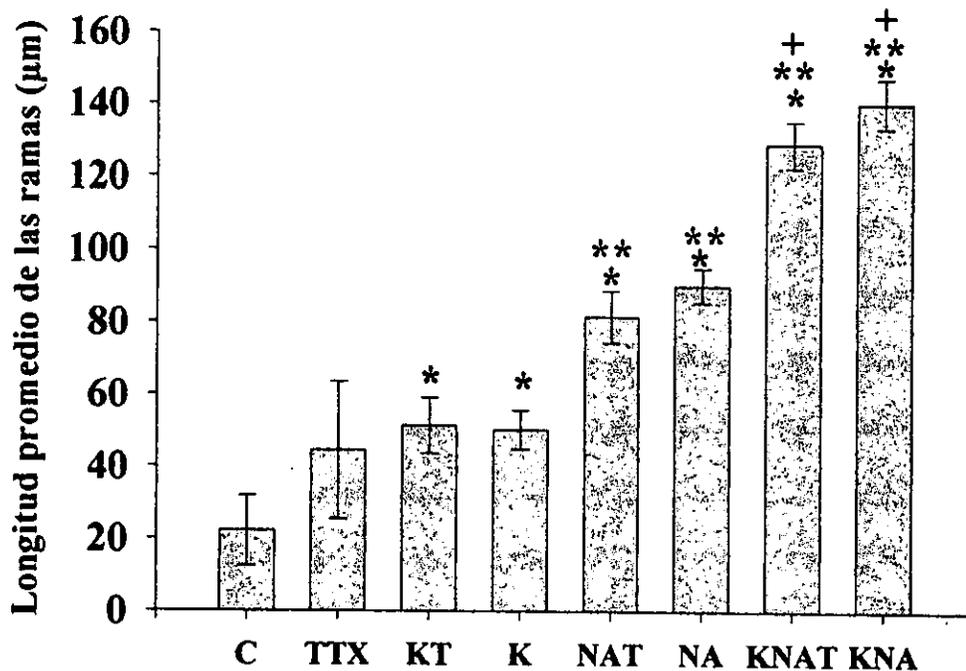


Figura 34. Papel de los canales de sodio sobre la longitud promedio de los procesos inducidos por los distintos tratamientos. C = Control, TTX= tetrodotoxina, KT= KCl + TTX, K= KCl, NAT= NGF + dbAMPc + TTX, NA= NGF + dbAMPc, KNAT= KCl + NGF + dbAMPc + TTX y KNA= KCl + NGF + dbAMPc. Los datos se expresan como  $X \pm SEM$  (\* $p < 0.01$  vs Control, \*\* $p < 0.01$  vs. K, + $p < 0.01$  vs. NA, prueba de Anova;  $n = 4$  experimentos).

Por otro lado, como se muestra en la figura 35, la  $\omega$ -conotoxina produjo una disminución del 31 % en la longitud de los procesos de las células tratadas con NGF + dbAMPc y del 37 % en las células tratadas con NGF + dbAMPc + KCl. Si además se agrega nifedipina a los cultivos con NGF + dbAMPc + KCl, la disminución alcanzada es del 63 %.

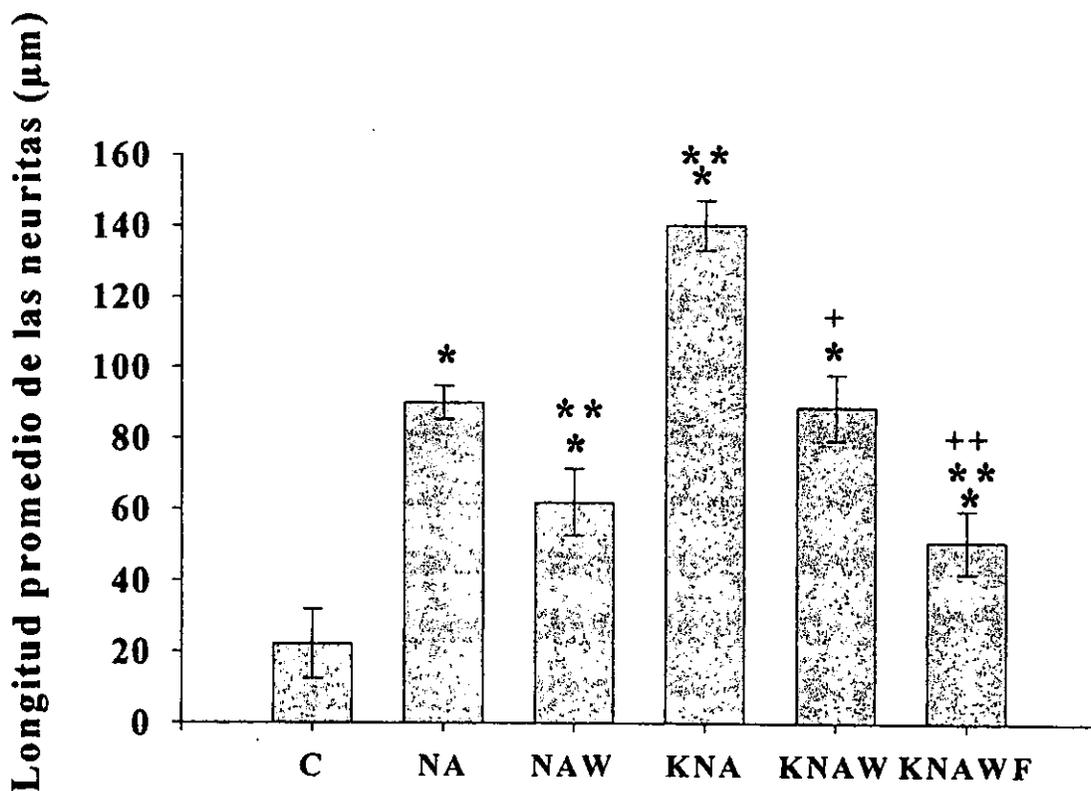
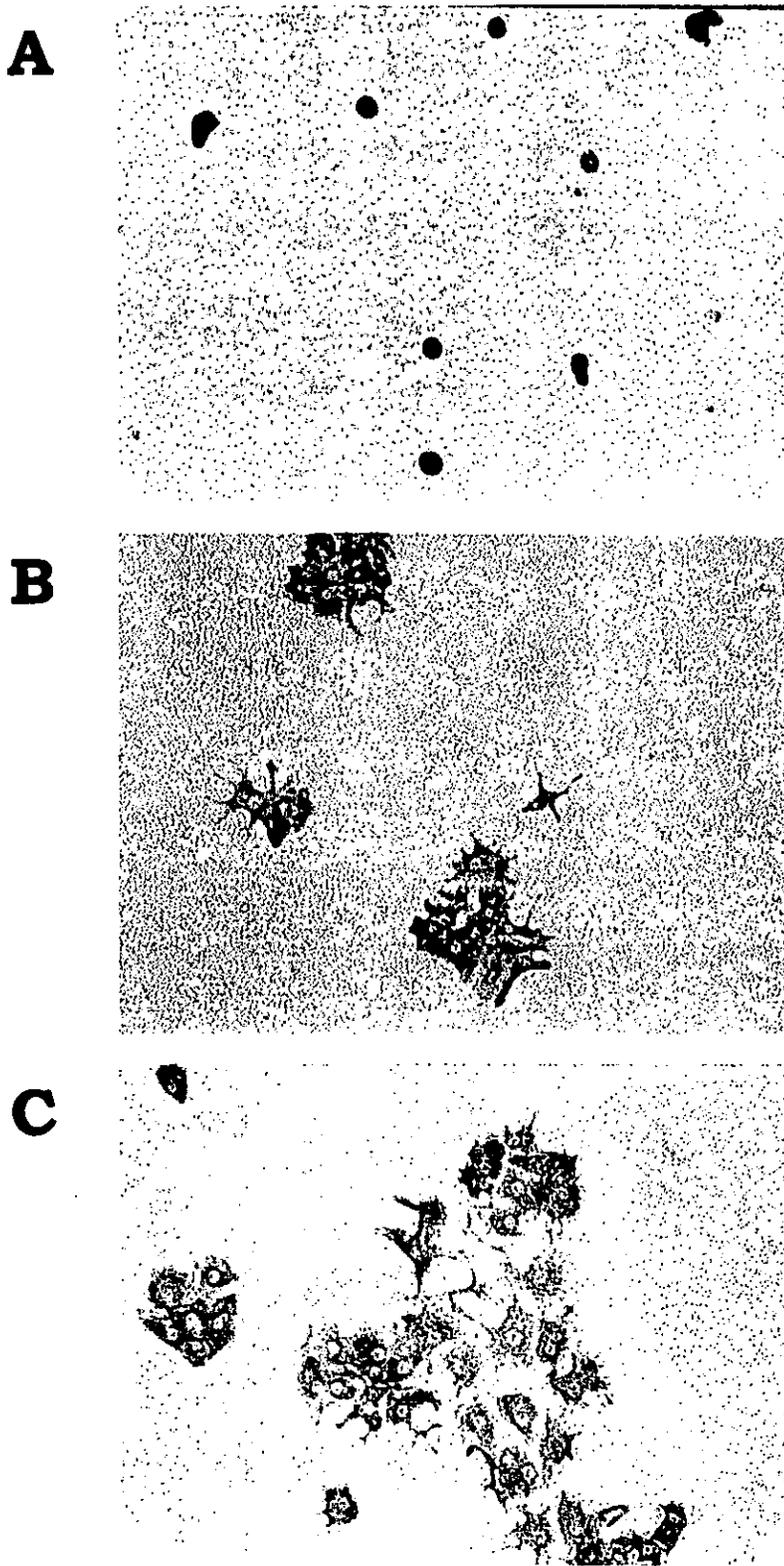
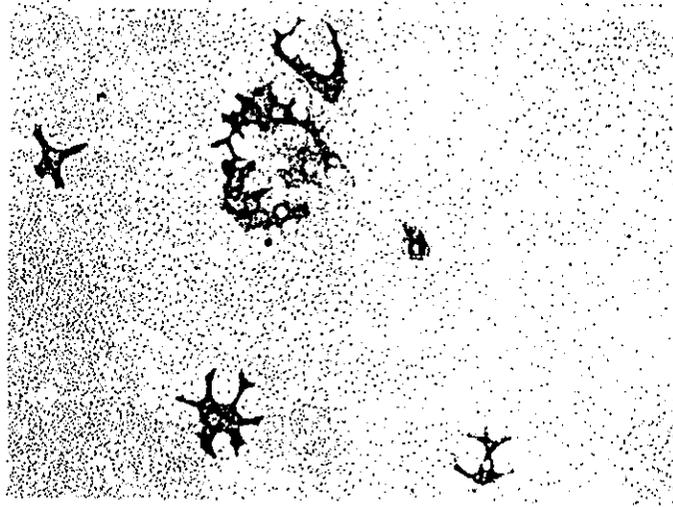
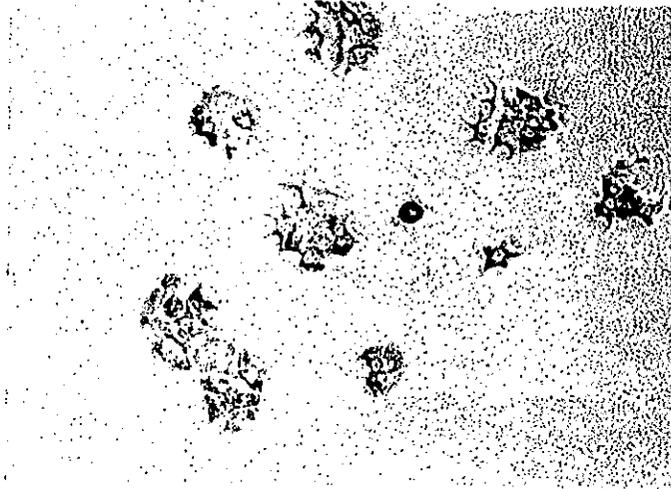
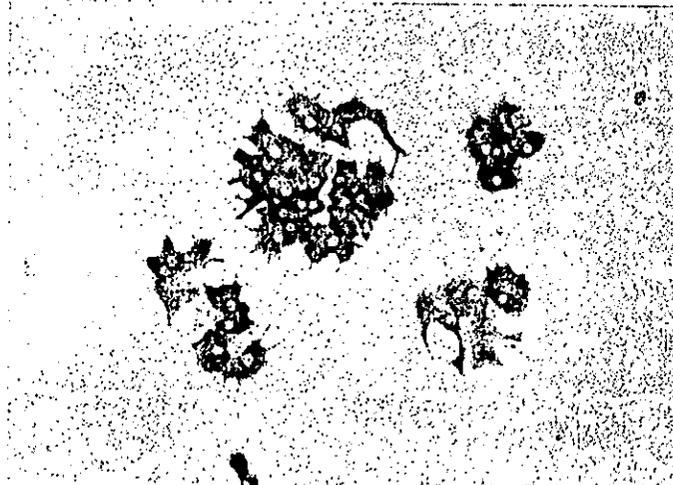


Figura 35) Papel de los canales de Ca tipo N y L sobre la longitud promedio de los procesos inducidos por los distintos tratamientos. **C** = Control, **NA**= NGF + dbAMPc, **NAW** = NGF + dbAMPc +  $\omega$ -conotoxina, **KNA**= KCl + NGF + dbAMPc, **KNAW**= KCl + NGF + dbAMPc +  $\omega$ -conotoxina, y **KNAWF**= KCl + NGF + dbAMPc +  $\omega$ -conotoxina + nifedipina. Los datos se expresan como  $X \pm SEM$  (\* $p < 0.01$  vs. Control, \*\* $p < 0.01$  vs. NA, + $p < 0.01$  vs. KNA y ++ $p < 0.01$  vs. KNA y KNAW, prueba de Anova; n= 4 experimentos).

En la figura 36, se muestran ejemplos representativos de células cultivadas bajo condiciones control, con NGF + dbAMPc y con KCl + NGF + dbAMPc (la condición a la cual llamamos “estimuladora máxima”). Además, en la figura 38, se muestran ejemplos representativos del efecto de los bloqueadores de canales de Na y de Ca tipo L y N sobre la extensión de procesos de tipo neurítico inducido por la “condición estimuladora máxima”.



**Figura 36.** Efecto de la despolarización con KCl sobre la extensión de procesos de tipo neurítico inducida por NGF + dbAMPc. Las células fueron cultivadas durante 11 días bajo las distintas condiciones y procesadas para una inmunocitoquímica contra insulina. (A) Control, (B) NGF + dbAMPc y (C) KCl + NGF + dbAMPc.

**A****B****C**

**Figura 37. Papel de los bloqueadores de canales de Na y de los canales de Ca tipo L y N sobre el desarrollo de procesos de tipo neurítico de células cultivadas bajo la condición de máxima estimulación (KCl + dbAMPc + NGF). Las células fueron cultivadas durante 11 días bajo las distintas condiciones y procesadas para una inmunocitoquímica contra insulina. (A) KCl + NGF + dbAMPc + TTX, (B) KCl + NGF + dbAMPc + nifedipina y (C) KCl + NGF + dbAMPc +  $\omega$ -conotoxina**

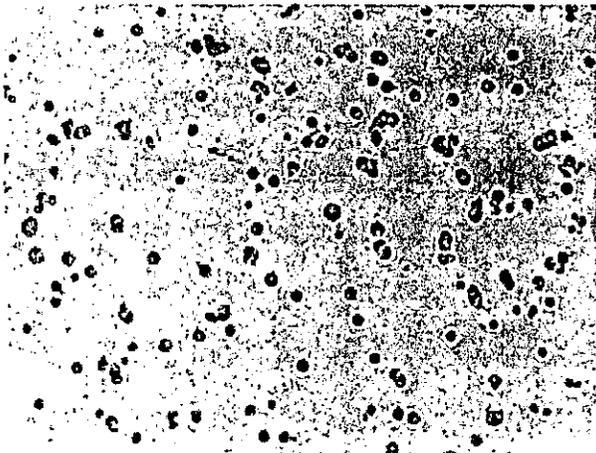


#### D) DETECCIÓN DE Trk A POR MEDIO DE TÉCNICAS INMUNOCITOQUÍMICAS.

La presencia de Trk A ha sido demostrada en células  $\beta$  pancreáticas provenientes de líneas celulares como las células de insulinoma de rata RINm5F (Kanaka-Gantenbein *et al.*, 1995). Sin embargo, su presencia nunca había sido demostrada en células  $\beta$  adultas provenientes de cultivos primarios.

En la figura 38 se observa que al utilizar anticuerpos específicos contra Trk A se obtuvo que el 100 % de las células  $\beta$  recién extraídas del páncreas eran positivas para estas tinciones. Así mismo, el 100 % de las células que fueron positivas a la tinción de insulina también lo fueron para Trk A.

**A**



**B**

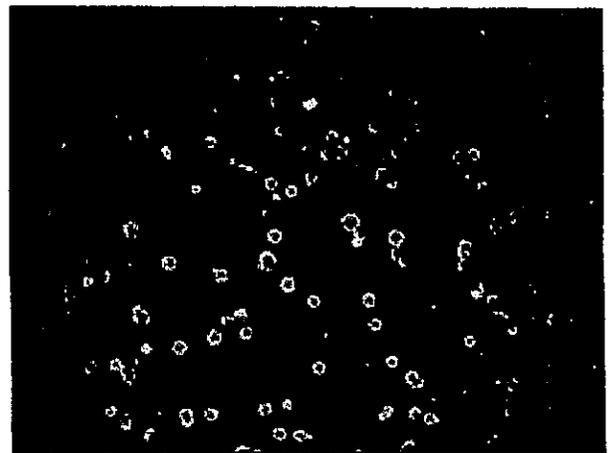


Figura 38. Presencia de Trk A en células  $\beta$  pancreáticas recién obtenidas del páncreas. Las células fueron extraídas del páncreas e inmediatamente después se llevó a cabo la inmunocitoquímica doble contra insulina y Trk A (ver Métodos). (A) Inmunocitoquímica contra insulina y (B) Inmunocitoquímica contra Trk A.

## **E) EFECTO DEL NGF Y DEL dbAMPc SOBRE LA EXPRESIÓN DE Trk A EN CÉLULAS $\beta$ PRIMARIAS.**

Para explorar la posibilidad de que el NGF y/o el dbAMPc alteraran la expresión del RNAm para Trk A, se utilizó la técnica de RT-PCR.

Como ya se mencionó, el primer RT-PCR se llevó a cabo en células RINm5F utilizando oligo d(I) para la transcripción reversa, ya que el número de células que se pueden obtener a partir de cultivos primarios es limitado y que para la realización de la técnica de Northern Blot la cantidad de RNA total requerido es mucho mayor que el que se puede obtener de células de cultivos primarios

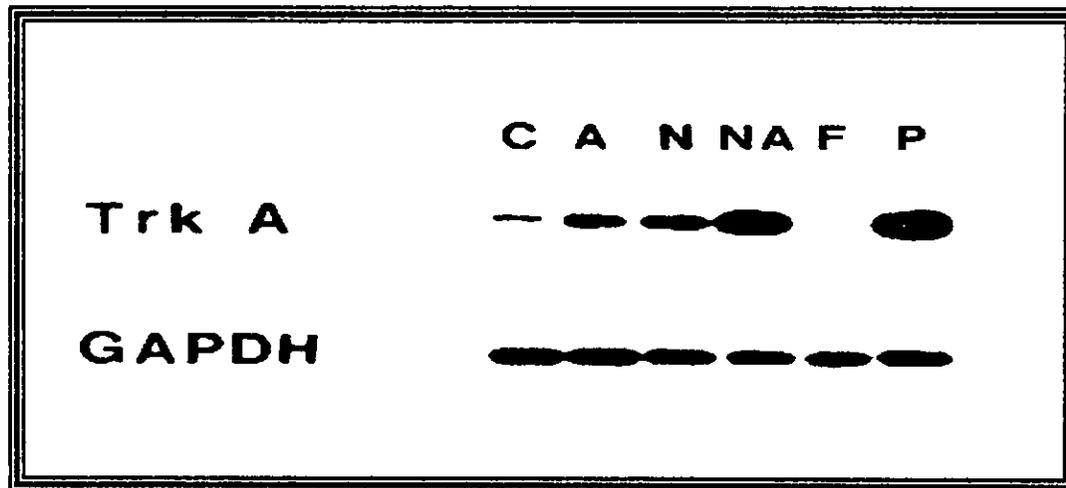
A seguir, se llevó a cabo la reacción con células  $\beta$  y fibroblastos (controles negativos) de islotes pancreáticos provenientes de cultivos primarios, con las células PC12 (controles positivos). En estos experimentos se observó que las células RINm5F expresan RNAm para Trk A. Una vez que se determinó la presencia del Trk A en las células  $\beta$  cultivadas durante 5 días, se consideró importante descartar que la expresión de RNAm para Trk A, fuera un efecto del cultivo y se decidió explorar la posibilidad de que las células recién extraídas del páncreas también expresaran este receptor.

Las células recién extraídas del páncreas y procesadas inmediatamente por la técnica de RT-PCR, también producen RNAm para Trk A. Esto demuestra que la presencia de Trk A no es un efecto del tiempo en cultivo (datos no mostrados).

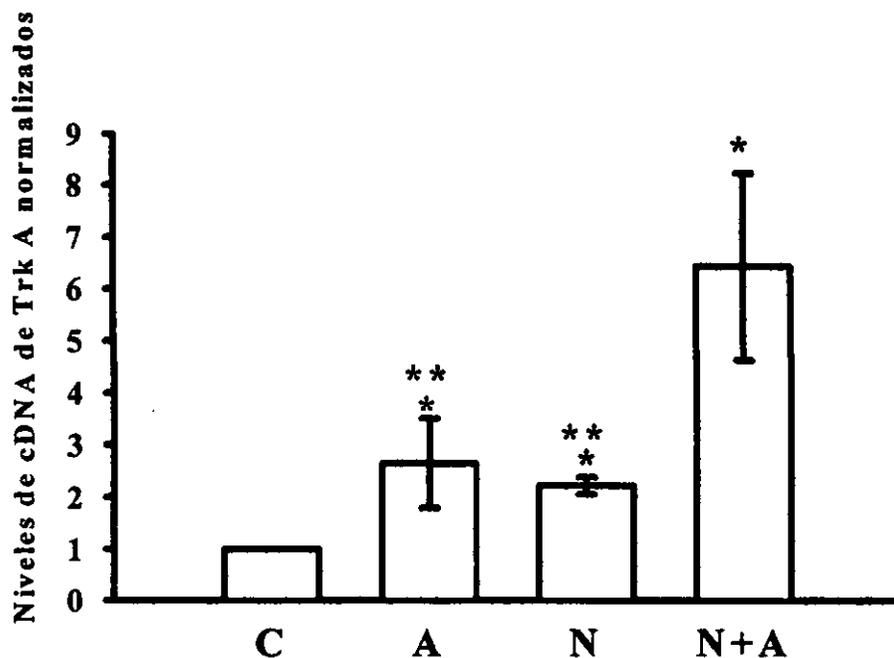
Para probar si el NGF y/o el dbAMPc tienen efecto sobre la expresión de RNAm para Trk A de las células  $\beta$  primarias, éstas fueron cultivadas en presencia de NGF 2.5 S (50 ng/ml), dbAMPc (5 mM) o su combinación durante 5 días, para después extraer el RNA total. En la figura 39B, se muestra que, por medio de la técnica de RT-PCR y a través de la utilización del control interno de expresión que, en este caso, fue el GAPDH, el tratamiento con NGF en conjunto con el dbAMPc aumenta 6 veces los niveles de RNAm para Trk A, en comparación al grupo testigo a los 5 días en cultivo. Además, se observó que el NGF y el dbAMPc por separado, inducen un aumento de 2 veces en los niveles de RNAm para Trk A en las células  $\beta$  primarias; sin embargo,

este aumento es menor que el que se observa cuando las células son cultivadas con ambos factores.

**A**



**B**



**Figura 39.** El NGF y/o el dbAMPc aumentan los niveles de RNAm para Trk A después de 5 días en cultivo. (A) Productos de reacción ara la detección de Trk A bajo diferentes condiciones experimentales.(B) Relación de la señal de Trk A/ GAPDH en respuesta a las diferentes condiciones experimentales. C= Control, A= dbAMPc, N= NGF, NA= NGF + dbAMPc, F= Fibroblastos y P= células PC12. Los datos se expresan como  $X \pm SEM$ . (\* $p < 0.05$  vs. control y \*\* $p < 0.001$  vs. NGF + dbAMPc, prueba de Anova;  $n = 6$ ).

## F) PRESENCIA DE RNAm PARA NGF EN CÉLULAS $\beta$ PANCREÁTICAS Y EFECTO DEL NGF Y DEL dbAMPc SOBRE LOS NIVELES DE RNAm PARA ESTE FACTOR.

Como ya se mencionó, existía la posibilidad de que las células  $\beta$  constituyeran una fuente de NGF. En el laboratorio se determinó la presencia de la proteína para NGF en las células  $\beta$  pancreáticas. Los resultados obtenidos demuestran que todas las células que se tiñen para insulina, se tiñen para NGF. Esto demostraba que las células  $\beta$  eran capaces de sintetizar al NGF. Sin embargo, la modulación del RNAm para NGF por el NGF mismo, el dbAMPc y ambas moléculas en conjunto, no había sido estudiada. Para cumplir con este objetivo, se utilizó la técnica de RT-PCR para demostrar la presencia de RNAm para el factor en las células  $\beta$  pancreáticas, así como su modulación por NGF y/o dbAMPc.

En la figura 40A, se muestran los productos de RT-PCR para la detección de NGF que se llevó a cabo la reacción con células  $\beta$ , con las células PC12 (controles negativos) y con células de la línea glioma C6 (controles positivos). Una vez que se determinó la presencia del NGF en las células  $\beta$  cultivadas durante 5 días, se llevó a cabo la misma reacción en células recién extraídas del páncreas, resultando que las células frescas y procesadas inmediatamente por la técnica de RT-PCR, también producen RNAm para NGF.

Al igual que en el caso del RNAm para Trk A, se determinó el efecto de los tratamientos sobre los niveles de RNAm para NGF en células cultivadas durante 5 días, utilizando nuevamente al GAPDH como control interno de expresión. Como se muestra en la figura 40B, el tratamiento con NGF y NGF y dbAMPc, no inducen cambios en la expresión de RNAm para NGF. Sin embargo, el dbAMPc induce una disminución de alrededor de 50 % en los niveles de RNAm para NGF con respecto al control. Por otro lado, el tratamiento con NGF y NGF + dbAMPc no indujo ningún cambio en los niveles de RNAm para NGF. Esto podría explicarse por un efecto estabilizador del NGF sobre los niveles de RNAm para NGF.

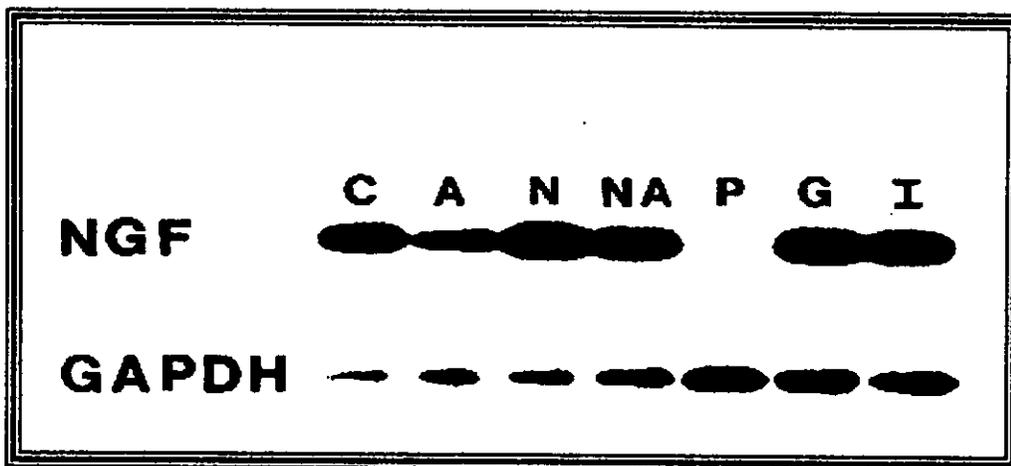
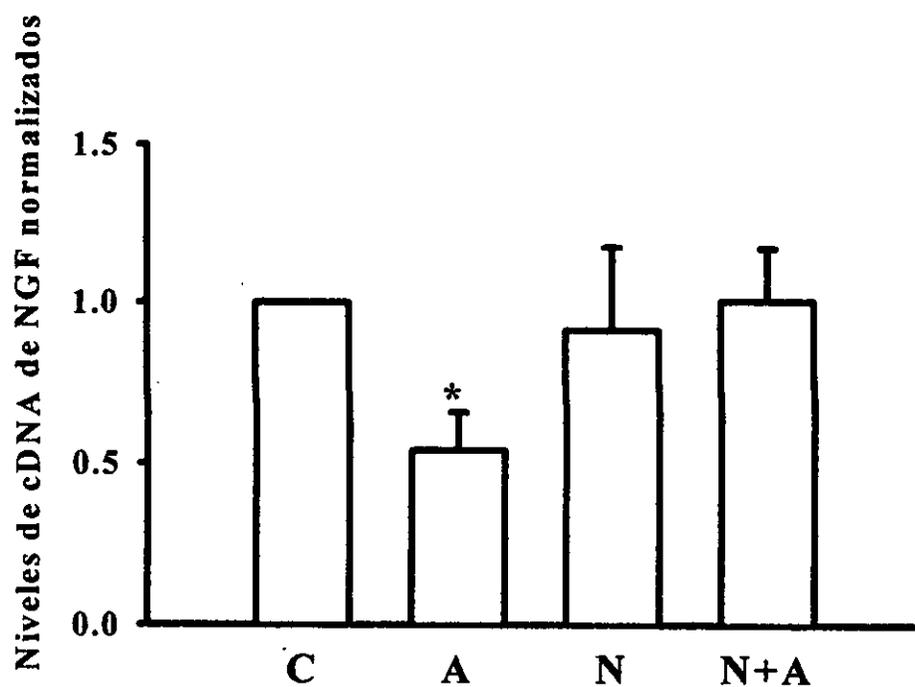
**A****B**

Figura 40. El NGF y /o el dbAMPc aumentan los niveles de RNAm para NGF después de 5 días en cultivo. (A) Productos de reacción para la detección de NGF bajo diferentes condiciones experimentales. (B) Relación de la señal de NGF/GAPDH en respuesta a las diferentes condiciones experimentales. C= Control, A= dbAMPc, N= NGF, NA= NGF + dbAMPc, P= células PC12, G= Glioma C6 e I= células recién aisladas del páncreas. Los datos se expresan como  $X \pm SEM$  (\* $p < 0.01$  vs. Control, prueba de Anova;  $n = 6$ ).

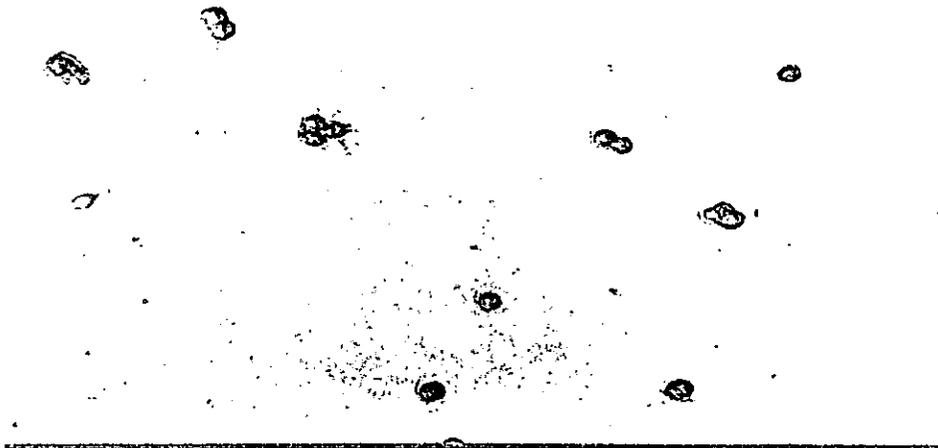
## G) LAS CÉLULAS $\beta$ SECRETAN UN FACTOR CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA COMO LA DEL NGF.

Una vez demostrada la síntesis de NGF por las células  $\beta$  pancreáticas, se procedió a determinar si estas eran capaces de secretar NGF con actividad biológica. Para este fin se utilizó un bioensayo con células PC12 que responden ante el NGF extendiendo neuritas. Las células PC12 fueron cultivadas en presencia del medio que recibieron las células  $\beta$  usando como secretagogo del NGF distintas concentraciones de glucosa. En la figuras 41A y C se observa que la adición del medio condicionado a las células PC12 induce un aumento de 4 veces en el porcentaje de células con neuritas con respecto a las células que no recibieron el medio condicionado de células  $\beta$ . También como se muestra en las figuras 41B y C, este efecto pudo ser bloqueado hasta niveles control por anticuerpos contra NGF.

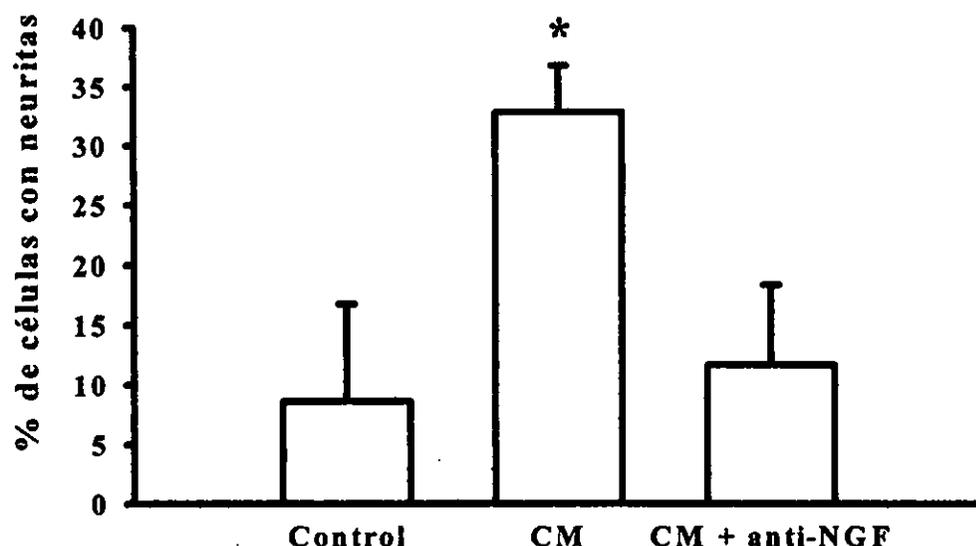
**A**



**B**



C



**Figura 41. Las células  $\beta$  secretan una molécula con actividad biológica parecida a la del NGF. (A)** Las células PC12 cultivadas en presencia del medio condicionado (CM) extienden procesos de tipo neurítico. **(B)** La adición de anticuerpo contra NGF al CM, abole la extensión de neuritas por las células PC12. **(C)** Porcentaje de neurogenización bajo las diferentes condiciones experimentales. Control= medio químicamente definido (20 mM glucosa), CM= medio condicionado (20 mM glucosa) y CM + anti-NGF= medio condicionado (20 mM glucosa) + anticuerpo contra NGF. Los datos se expresan como  $X \pm SEM$  ( $p < 0.01$  vs. control, prueba de Anova;  $n = 4$  experimentos).

#### **H) LAS CÉLULAS $\beta$ SECRETAN NGF EN RESPUESTA A LA GLUCOSA EXTRACELULAR.**

Para determinar si las células  $\beta$  son capaces de secretar al NGF en respuesta a distintas concentraciones de glucosa extracelular y en respuesta a un estímulo despolarizante (KCl 40 mM), así como para cuantificar la cantidad de NGF secretado, se utilizó la técnica de ELISA. En la figura 42 se muestra que las células estimuladas con 20 mM glucosa secretan alrededor de 2.7 veces más NGF (50-80 pg/ml), en comparación con las células estimuladas con 5mM glucosa (20-60 pg/ml). Además, se observa que las células estimuladas con KCl (40 mM) secretan 3 veces más que las células estimuladas con baja glucosa.

Por otro lado, como también se observa en la figura 42, la secreción de NGF con KCl (40 mM) + 11 mM glucosa, fue significativamente distinta de la secreción en 5 mM glucosa, pero no de la secreción en 20 mM glucosa (50-220 pg/ml vs. 50-180 pg/ml).

De manera interesante, el tratamiento con dbAMPc + 11 mM glucosa disminuye la secreción de NGF en un 67 % con respecto al grupo que recibió sólo 11 mM glucosa.

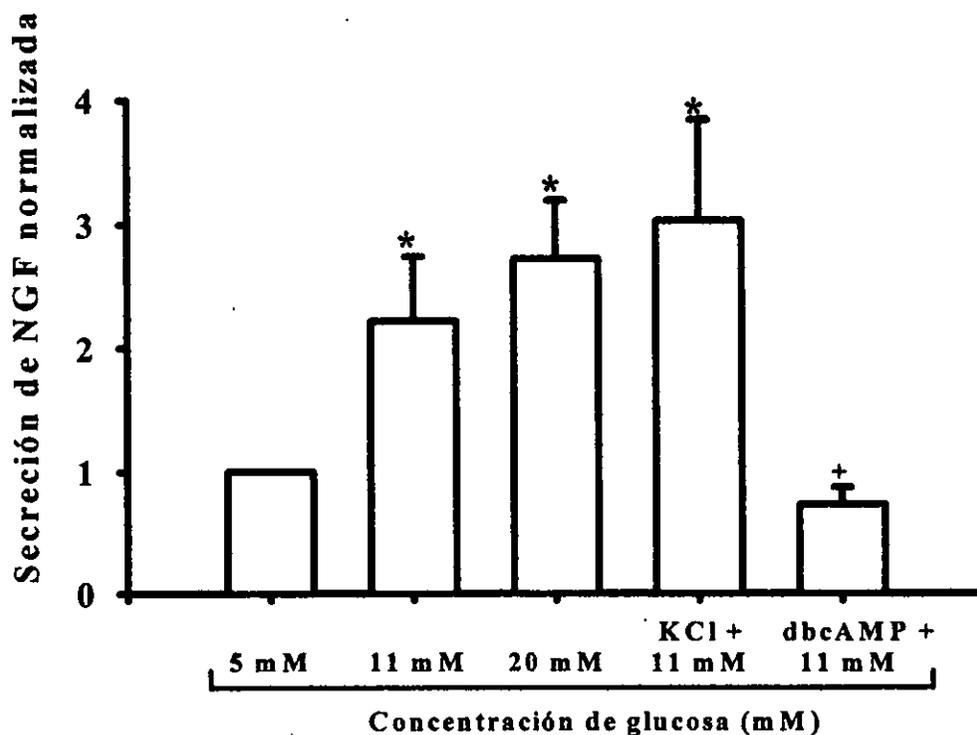
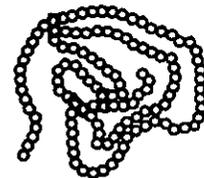


Figura 42. Las células  $\beta$  pancreáticas secretan NGF en respuesta a diferentes concentraciones de glucosa. Los datos se expresan como  $X \pm SEM$  (\* $p < 0.05$  con respecto a 5 mM glucosa y + $p <$  con respecto a 11 mM glucosa, prueba de Anova;  $n = 4$ ).

## DISCUSIÓN



### *1) Efecto del dbAMPc y del NGF sobre las corrientes macroscópicas de Na<sup>+</sup>.*

El factor de crecimiento neuronal ha sido implicado en la sobrevivencia y la diferenciación de sistemas neuronales y no neuronales (Levi-Montalcini, 1987). En particular, induce cambios morfológicos en las células  $\beta$  pancreáticas, incluyendo un aumento en la densidad de corriente de Na<sup>+</sup> dependiente del voltaje (Rosenbaum *et al.*, 1996) y la extensión de procesos de tipo neurítico (Vidaltamayo *et al.*, 1996). Este último efecto es potenciado por el dbAMPc (Vidaltamayo *et al.*, 1996).

Aunque el efecto del NGF sobre la densidad de corriente de Na<sup>+</sup>, ya ha sido descrito (Rosenbaum *et al.*, 1996), resultó interesante determinar el efecto del NGF y del dbAMPc sobre las corrientes de Na<sup>+</sup> de las células  $\beta$  debido a que el cultivo de las células con estas dos moléculas, en conjunto, promueve un efecto mucho mayor sobre la morfología de las células  $\beta$  que cuando son utilizadas por separado. Además, este aumento en la densidad de canales de Na en las células  $\beta$  pancreáticas podría ser importante para el desarrollo de procesos de tipo neurítico inducido por NGF + dbAMPc, ya que se ha demostrado que los canales de Na podrían estar asociados con elementos del citoesqueleto, proveyendo un mecanismo de anclaje para distintas regiones membranales (Mandel, 1992).

Demostramos que el NGF y el dbAMPc, a los 5 días en cultivo, promueven un aumento del 49 % en la densidad de corriente de Na<sup>+</sup> con respecto a las células control ( $44.7 \pm 4.5$  vs.  $67 \pm 6.4$ ; Tabla I ). Este aumento que promueven el NGF y el dbAMPc sobre la densidad de corriente de Na<sup>+</sup>, no es estadísticamente significativo en relación al efecto que promueve el NGF por sí solo sobre la densidad de corriente de Na<sup>+</sup>. Esto último era de esperarse ya que, el dbAMPc por sí mismo, no promueve cambios en la densidad de corriente de Na<sup>+</sup> (Rosenbaum *et al.*, 1996). Es decir que aunque existe un efecto sinérgico entre el NGF y el dbAMPc sobre el crecimiento de neuritas (Vidaltamayo *et al.*, 1996), no existe un efecto sinérgico de estas moléculas sobre la corriente de Na<sup>+</sup>.

Aún cuando se ha sugerido que los canales de Na no contribuyen de manera significativa a la excitabilidad de la célula  $\beta$  pancreática (Ashcroft y Rorsman, 1989), las siguientes evidencias experimentales apoyan la idea de que la corriente de  $\text{Na}^+$  es importante para la generación de la actividad eléctrica y la fisiología de la célula  $\beta$  pancreática (Rosenbaum *et al.*, 1996):

1) La corriente de  $\text{Na}^+$  contribuye a la generación de potenciales de acción durante las fases iniciales de la despolarización inducida por secretagogos (Pressel y Mislser, 1990).

2) La TTX inhibe en un 57 % la secreción de insulina estimulada por altas concentraciones de glucosa (Hiriart y Matteson, 1988) y también la secreción de insulina inducida por carbacol en 5.6 mM glucosa (Hiriart y Ramírez-Medeles, 1993).

3) Hemos demostrado que las células cultivadas con NGF secretan más insulina cuando la concentración de glucosa extracelular es aumentada de 5 a 15 mM. Esta es una propiedad que se pierde en las células control conforme pasa el tiempo en cultivo (Vidaltamayo *et al.*, 1996). El NGF aumenta la densidad de corriente de  $\text{Na}^+$  (Rosenbaum *et al.*, 1996). Por lo tanto, sugerimos que los canales de Na en la membrana de las células  $\beta$  pancreáticas son importantes para la secreción de insulina y que uno de los mecanismos que podría utilizar el NGF para prevenir la pérdida de la sensibilidad a los cambios en la concentración de glucosa extracelular, sea el aumento en la cantidad de canales de Na en la membrana de estas células.

Finalmente, es importante mencionar que en el laboratorio había sido demostrado que el dbAMPc no induce cambios en la corriente macroscópica de  $\text{Na}^+$  (Rosenbaum *et al.*, 1996). Sin embargo, esta molécula aumenta la secreción de insulina y promueve la extensión de procesos de tipo neurítico en las células  $\beta$  pancreáticas (Vidaltamayo *et al.*, 1996). Estos datos sugieren que el dbAMPc induce estos cambios en la secreción de insulina y en la morfología de las células a través de un mecanismo que no es dependiente de un aumento en la cantidad de canales de Na en la membrana de las células y que podría involucrar una vía de activación de PKA.

## **II) Efectos del NGF sobre las corrientes macroscópicas de $Ca^{2+}$ de las células $\beta$ pancreáticas.**

En el laboratorio se ha descrito que el NGF induce cambios en la secreción de insulina cuando las células son expuestas al factor durante una hora. Dado que los canales de Ca juegan un papel importante en la secreción de insulina, se investigó el papel del NGF sobre la corriente de  $Ca^{2+}$ , tanto a corto como a largo plazo.

### **II.a) Efectos del NGF a corto plazo sobre la corriente de $Ca^{2+}$ .**

El NGF induce un aumento del 51 % en la densidad de corriente de  $Ba^{2+}$  total, con respecto al control (Tabla III). Este aumento en la densidad de corriente de bario total se debe a un aumento en la densidad de corriente de  $Ca^{2+}$  tipo L, ya que las corrientes insensibles a nifedipina, tanto en las células control como en las células expuestas al NGF, no son estadísticamente distintas entre sí.

Al utilizar a la nifedipina para bloquear de manera específica a los canales de Ca tipo L, se observó que existe una fracción no sensible a ella tanto en las células expuestas a NGF como en las células control. Esta fracción insensible a nifedipina pudo ser bloqueada con la  $\omega$ -conotoxina GVIA (bloqueador específico de los canales de Ca tipo N).

En la literatura se describe la presencia de dos tipos de canales de Ca en las células  $\beta$  pancreáticas de rata provenientes de cultivos primarios. Estos son los canales de Ca tipo T y L (Hiriart y Matteson, 1988). Sin embargo, la presencia de canales de Ca tipo N sólo había sido descrita en líneas celulares de insulinoma de rata (Pollo *et al.*, 1993; Magnelli *et al.*, 1995) y no en células provenientes de cultivos primarios como se describe en esta tesis.

Se determinó que, en las células control, un 60 % de la corriente de  $Ca^{2+}$  total es corriente de tipo L ( $-45 \pm 12.6$  pA, a +20 mV, figura 12) y que el 40 % restante, es corriente de  $Ca^{2+}$  de tipo N ( $-41.6 \pm 12$  pA, a +20 mV, figura 13). La misma proporción se observó en las células expuestas a NGF, ya que el 60 % de la corriente de  $Ca^{2+}$  es corriente de tipo L ( $-85 \pm$

13.5 pA, a +20 mV, figura 12) y el 40 % es corriente de tipo N ( $-60 \pm 11$  pA, a +20 mV, figura 13).

También se determinó que los efectos del NGF a corto plazo sobre la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$ , se deben a un aumento del 55 % en la densidad de corriente tipo L y que, aunque existe una tendencia a que la corriente tipo N aumente (30 % con respecto al control), esta diferencia no es estadísticamente significativa.

Efectos similares del NGF se han descrito en otros modelos. Por ejemplo, en neuronas de molusco, se ha visto que la aplicación de NGF por 2 minutos a las células induce un aumento en la densidad de corriente entrante a través de los canales de Ca tipo L (Wildering *et al.*, 1995).

La aplicación del NGF durante 5 min a las células no podría promover la síntesis *de novo* de canales. En células epiteliales de retina humana, se ha observado que la activación de las tirosil cinasas lleva a un aumento en las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L a través de mecanismos que, en parte, son dependientes de la actividad de la fosforilación con proteína cinasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (PKC) (Strauss *et al.*, 1997).

Dado que las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L pueden ser aumentadas por la fosforilación de los canales, propusimos que este efecto del NGF a corto plazo, podría deberse a cambios en la fosforilación de los canales tipo L de las células  $\beta$  pancreáticas. Esto, a su vez, podría llevar a cambios en el tiempo medio de apertura de los canales o en la frecuencia de apertura de los mismos.

Se ha reportado que el Bay K 8644 $\pm$  promueve un aumento en el tiempo medio de apertura de los canales (Noceti *et al.*, 1998; Bechem y Hoffman, 1993). Para explorar la posibilidad de que el NGF estuviera promoviendo un aumento en el tiempo medio de apertura de los canales de Ca tipo L, se utilizó un agonista específico de estos, el Bay K 8644 $\pm$ .

En la figura 14 se observa que el Bay K 8644 promueve un aumento comparable al que promueve el NGF en la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L ( $-128.3 \pm 11$  pA con Bay K 8644 y  $-127 \pm 20$

pA con NGF, a +20 mV). Además, la aplicación de NGF y Bay K 8644 en conjunto, no tuvo efectos aditivos sobre la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  total ( $-124.5 \pm 15.2$  pA, a +20 mV).

El Bay K 8644, además produjo un corrimiento de 10 mV a la izquierda de la curva corriente a voltaje con respecto a las células que no estuvieron expuestas al fármaco. Este efecto ha sido observado en otros sistemas celulares tales como el canal de Ca cardiaco (Noceti *et al.*, 1998). El corrimiento de la curva corriente a voltaje inducido por el fármaco se explica por el hecho de que, debido a que aumenta el tiempo medio de apertura de los canales de Ca tipo L, la corriente máxima se alcanza a voltajes más negativos (Bechem y Hoffman, 1993). Tomando todo esto en cuenta, es probable que uno de los mecanismos que utiliza el NGF para inducir sus efectos, sea el de inducir cambios en el tiempo medio de apertura de los canales. Este efecto podría estar mediado por cambios en el estado de fosforilación de los mismos.

Por otro lado, como se observa en la figura 15, la exposición de las células  $\beta$  al NGF, no induce cambios en la constante de desactivación rápida de los canales de Ca, con respecto al control ( $187 \pm 15.8$   $\mu\text{s}$  vs.  $172.6 \pm 14$   $\mu\text{s}$ , tabla IV). Estos datos demuestran que, pese a que el NGF podría estar induciendo cambios en el tiempo medio de apertura de los canales, no afecta la cinética de cierre de los mismos.

Así mismo, también determinamos el efecto del Bay K 8644 sobre la desactivación de los canales de Ca FD. Observamos que la aplicación de este fármaco, solo o en presencia del NGF, produce un alargamiento de la constante de tiempo de cierre de los canales ( $187 \pm 15.7$  vs.  $292.3 \pm 24$   $\mu\text{s}$  y  $280 \pm 20$   $\mu\text{s}$ , respectivamente; figura 16, tabla IV). Este efecto del Bay K 8644 sobre la desactivación de los canales de Ca tipo L ha sido observado en modelos celulares tales como las células cardiacas, células de la pituitaria y cromafines (Bechem y Hoffmann, 1993; Brady *et al.*, 1995; Albillos *et al.*, 1994). Dado que se ha descrito que el Bay K 8644 se une al estado abierto de los canales de Ca tipo L, se ha sugerido que su efecto sobre la cinética de cierre de los canales de Ca se debe a que estabiliza al canal en el estado abierto, haciendo más lenta la transición del canal al estado cerrado (Bechem y Hoffmann, 1993).

Además, se observó que las curvas de activación de la corriente de  $Ba^{2+}$  de las células expuestas al NGF se encuentra desplazada hacia voltajes más negativos, con respecto al control ( $-29.3 \pm 1$  mV vs.  $-37.2 \pm 1.7$  mV; figura 17, tabla V). Esto indica que los efectos del NGF sobre la corriente de  $Ba^{2+}$  se deben, en parte, a cambios en el rango de voltaje en el que se activan los canales. Es decir, el NGF promueve que los canales de Ca empiecen a activarse a potenciales más negativos que los canales de Ca de las células control. En las células expuestas al Bay K 8644 y en las células expuestas al Bay K 8644 y al NGF ( $-36.1 \pm 3.0$  mV y  $-34.4 \pm 3.4$  mV, respectivamente), en conjunto, el  $V_{a_{1/2}}$ , es estadísticamente distinto del  $V_{a_{1/2}}$  de las células control ( $-29.3 \pm 1.0$  mV) (tabla V). Este fenómeno se puede explicar por el hecho de que el agonista de los canales de Ca tipo L, promueve un corrimiento de la relación corriente a voltaje, hacia valores más negativos. Además, el valor del  $V_{a_{1/2}}$  de las células expuestas al NGF, no es estadísticamente distinto del valor de  $V_{a_{1/2}}$  de las células expuestas al Bay K 8644. Esto sugiere, una vez más, que los efectos del NGF sobre las corrientes macroscópicas de  $Ba^{2+}$ , podrían estar mediados a través de un mecanismo similar al del agonista de los canales Ca tipo L.

En las células cardiacas, se ha descrito que el flujo de  $Ca^{2+}$  a través de los canales de Ca tipo L es regulada por la actividad de los receptores del tipo de las tirosil cinasas y que una de las vías involucradas incluye a la proteína Src-c (Hu *et al.*, 1998). También se ha descrito que el aumento en las corrientes de  $Ca^{2+}$  inducido por la activación de las tirosil cinasas, no se debe a un aumento en la conductancia de los canales unitarios sino que se debe a que estos receptores mantienen la disponibilidad de los canales de Ca tipo L para ser activados por el voltaje (Liu y Sperelakis, 1997).

El receptor de alta afinidad al NGF en las células  $\beta$  pancreáticas, posee actividad de tirosil cinasa de tipo A. Por esto se sugiere también que, además de inducir un aumento en el tiempo medio de apertura de los canales de Ca, como ocurre en otros modelos celulares, el NGF pudiera aumentar la disponibilidad de estos canales a ser activados por el voltaje. Sin embargo, para comprobar esta última hipótesis será necesario llevar a cabo experimentos usando la técnica de registro de canales unitarios.

## ***II.b) Efectos del NGF a largo plazo sobre la corriente de $Ca^{2+}$ .***

Las células cultivadas en presencia de NGF durante 5 días mostraron un aumento del 63 % en la densidad de corriente macroscópica de  $Ba^{2+}$ , con respecto al control ( $-8 \pm 1.2$  pA vs.  $-13.5 \pm 1.3$  pA; tabla VI, figura 20).

Al igual que en el caso de los efectos del NGF a corto plazo, nos propusimos determinar sobre qué fracción de canales de Ca ejercía sus efectos el NGF. De manera interesante, al utilizar la nifedipina logramos bloquear en un 100 % las corrientes de  $Ca^{2+}$  (figura 21). Es decir, la fracción sensible a  $\omega$ -conotoxina desaparece con el tiempo en cultivo y el NGF promueve un aumento en la densidad de corriente de  $Ca^{2+}$  tipo L. Este aumento en la densidad de corriente de  $Ca^{2+}$  tipo L podría explicar, en parte, el hecho de que las células  $\beta$  cultivadas en presencia de NGF sean capaces de seguir secretando más insulina ante concentraciones mayores de glucosa extracelular y que las células cultivadas bajo condiciones control pierdan esta capacidad secretora.

Además, sugiere que la actividad de los canales de Ca de tipo N contribuye también a la secreción de insulina ya que este tipo de corriente de  $Ca^{2+}$  ya no es observable con el tiempo en cultivo en las células control, de manera paralela a la pérdida en la sensibilidad a los cambios en la glucosa extracelular.

También se determinó el efecto del NGF sobre la cinética de cierre de los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L de las células cultivadas en presencia del factor durante 5 días. Se observó que no existen diferencias entre las células control y las células cultivadas con el NGF ( $177 \pm 15.4$   $\mu$ s vs.  $193 \pm 17$   $\mu$ s; figura 22 y tabla VII). Tampoco se observaron cambios en el  $V_{a_{1/2}}$  ( $-18.5 \pm 1.9$  mV vs.  $-16 \pm 2.0$  mV) ni en la  $k_a$  de las células tratadas con NGF con respecto a las células control ( $5 \pm 2.0$  vs.  $8.6 \pm 1.1$ ; tabla VIII). Sin embargo, se observó que los valores del  $V_{a_{1/2}}$  de las células control y de las células cultivadas con el factor durante 5 días, son estadísticamente distintos del  $V_{a_{1/2}}$  de las que fueron cultivadas durante 1-3 días (tabla V). Esto puede explicarse por el hecho de que los canales de Ca tipo N desaparecen con el tiempo en cultivo. De esta

forma, el  $V_{a1/2}$  se desplazaría hacia valores más positivos ya que estos canales ya no contribuyen a la corriente total.

Por otro lado, se había observado que un pulso corto de NGF promueve un aumento en la densidad de corriente de bario, probablemente a través de la modulación directa de los canales ya presentes en la membrana de las células  $\beta$ . Este aumento es comparable con el efecto del NGF a largo plazo. Tomando en cuenta lo anterior, fue necesario discriminar si los efectos del NGF sobre las células cultivadas durante 5 días, se debían a un mecanismo como el que usa el factor para promover sus efectos a corto plazo o si se trataba de un aumento en el número de canales en la membrana de las células  $\beta$ , para lo cual las células fueron cultivadas en presencia del factor durante 4 días y deprivadas del mismo durante 24 h para promover que el ligando se disociara del receptor y, de haber fosforilación de los canales, esta fuera eliminada.

En estas condiciones, la corriente de bario, después de 24 horas de deprivación del factor, permanece igual (figura 23). Esto sugiere fuertemente que el efecto a largo plazo del NGF, se debe a un aumento en la síntesis *de novo* de canales de Ca tipo L, de manera similar a lo que ocurre con los canales de Na (Rosenbaum *et al.*, 1996). Esta hipótesis puede ser resuelta usando la técnica de RT-PCR para determinar si existe un aumento en los niveles de RNAm para los canales de calcio tipo L.

Además, se llevó a cabo otro experimento en el cual las células deprivadas del factor durante 24 h, fueron expuestas durante 5 min al NGF. Se esperaba que si el NGF a los 5 días en cultivo induce un aumento en el número de canales de Ca en la membrana, entonces la aplicación aguda del factor provocaría un aumento todavía mayor, ya que promovería un aumento en el tiempo medio de apertura de más canales.

Los resultados de este experimento demuestran que, efectivamente, la aplicación de un pulso corto de NGF promueve un aumento del 60 % en la densidad de corriente de bario con respecto al grupo de células cultivadas con el factor durante 4 días y después deprivadas del mismo durante 24 horas (figura 24). Esto apoya aún más la idea de que el NGF promueve la síntesis *de novo* de canales en las células  $\beta$  cultivadas en presencia del factor durante 5 días.

El aumento en la densidad de canales de Ca tipo L inducido por NGF, ha sido observado en otros modelos celulares tales como las neuronas colinérgicas del cerebro frontal basal y células PC12 (Levine *et al.*, 1995; Cavalie *et al.*, 1994). De hecho, se ha demostrado que el efecto del NGF a largo plazo involucra, en parte, la vía de activación de la proteína p21-ras y de los protooncogenes c-fos y c-jun que constituyen al factor transcripcional AP-1 (Fitzgerald y Dolphin, 1997; Cavalie *et al.*, 1994). Además, se ha visto que las tirosil cinasas son importantes en la regulación de la expresión de los canales de Ca dependientes del voltaje. Por ejemplo, la genisteína, un inhibidor de tirosil cinasas, interfiere con los efectos del NGF sobre el aumento en la densidad de corriente de Ca<sup>2+</sup> de las neuronas de la raíz del ganglio dorsal (Fitzgerald y Dolphin, 1997).

### ***III) El papel de los canales iónicos sobre la extensión de neuritas.***

#### ***III.a) Efecto de la tetrodotoxina (TTX).***

Para determinar el papel que juegan los canales de Na sobre la extensión de procesos citoplásmicos inducidos por NGF + dbAMPc, se utilizó la TTX que bloquea estos canales. La TTX disminuye en un 51 % el porcentaje de células  $\beta$  con neuritas cuando se agrega la toxina a los cultivos con NGF + dbAMPc ( $11.7 \pm 1.6$  % vs.  $24 \pm 1.3$  %, respectivamente; figura 25).

En otros sistemas celulares tales como el de la corteza cerebral, se ha observado que el cultivo de las células con TTX provoca cambios en la tasa de elongación y en la morfología del cono de crecimiento (Ramakers *et al.*, 1991), de manera similar a lo que observamos en las células  $\beta$  pancreáticas.

#### ***III.b) Efecto de la nifedipina***

La nifedipina produjo una disminución del 57 % en el número de células con procesos citoplásmicos de las células cultivadas con NGF + dbAMPc ( $11.6 \pm 1.6$  % vs.  $24 \pm 1.3$  %; figura 26). Cuando se agregaron nifedipina y TTX, en conjunto, a los cultivos tratados con NGF + dbAMPc, se observó una disminución del 76 % en el porcentaje de células con neuritas ( $6.7 \pm 1.6$  % vs.  $26.5 \pm 5.3$  %; figura 26).

En otros modelos celulares como la médula de *Xenopus* se ha descrito que tanto la extensión de las neuritas como la orientación del crecimiento de las mismas es dependiente del flujo de iones a través de los canales de Ca tipo L. También se ha demostrado que una de las vías implicadas en este proceso involucran a la proteína cinasa C y al inositol-3-fosfato (IP3)(Rajnicek y McCaig, 1997; Blair y Marshall, 1997).

En las neuronas de hipocampo de rata se ha visto la activación de las tirosil cinasas por factores de crecimiento como el factor de crecimiento fibroblástico. Así mismo se ha descrito que los canales de Ca tipo L son importantes en el proceso de diferenciación y establecimiento del fenotipo neuronal (Shitaka *et al.*, 1996).

De esta manera, sugerimos que los canales de Ca tipo L son parte importante de la vía de señales necesaria para el crecimiento de los procesos citoplásmicos en las células  $\beta$  pancreáticas. Sin embargo, dado que ni la nifedipina, ni la  $\omega$ -conotoxina son capaces de bloquear en un 100 % el desarrollo de los procesos de tipo neurítico inducido por NGF y dbAMPc, se piensa que además se encuentran involucrados otros mecanismos independientes de la entrada de  $Ca^{2+}$  extracelular a través de los canales de Ca tipo L y N.

Por otro lado, dado que el bloqueo de los canales de Ca tipo L no fue suficiente para inhibir la extensión de procesos de tipo neurítico por parte de las células  $\beta$  pancreáticas, se decidió investigar el papel de los canales de Ca tipo N sobre la extensión de las neuritas.

### ***III.c) Efecto de la $\omega$ -conotoxina.***

La adición de  $\omega$ -conotoxina a los cultivos con NGF + dbAMPc indujo una disminución del 30 % en el porcentaje de células con neuritas ( $16.4 \pm 1.2$  % vs.  $23.1 \pm 1.15$  %). Este efecto es menor que el que se observa con la nifedipina ( $16.4 \pm 1.5$  % vs.  $23.1 \pm 1.1$  %; figura 27). Es decir, parece ser que ambos tipos de canales de Ca juegan un papel importante en la extensión de los procesos neuríticos inducidos por NGF y dbAMPc.

La adición de nifedipina a los cultivos con NGF + dbAMPc +  $\omega$ -conotoxina induce una disminución del 71 % con respecto a su propio control (células cultivadas con NGF + dbAMPc). Es decir, los bloqueadores, en conjunto, tienen efectos aditivos sobre la extensión de las neuritas ( $6.6 \pm 1.5$  % vs.  $23.1 \pm 1.1$  %; figura 27).

En las células PC12 se ha demostrado que los canales de Ca tipo N también juegan un papel importante en la extensión de neuritas (Doherty *et al.*, 1993). Así mismo, se ha visto que el flujo de iones a través de los canales de Ca tipo N y L es necesario para activar una vía de mensajeros celulares que incluye a las cadherinas L1 y N (Williams *et al.*, 1992; Harper *et al.*, 1994).

Tomando en cuenta todo lo anterior, concluimos que los canales de Ca tipo N también son importantes en el desarrollo de los procesos de tipo neurítico inducido por NGF y dbAMPc. Sin embargo, como ya ha sido mencionado, la contribución de estos canales a la extensión de los procesos citoplásmicos, no es tan importante como la de los canales de Ca tipo L. Esto podría ser explicado en términos de la densidad de este tipo de canales en la membrana de las células  $\beta$  ya que, como se demuestra en los experimentos de electrofisiología, la contribución de los canales de Ca tipo N a la corriente de  $Ca^{2+}$  total, es menor que la contribución de los canales de Ca tipo L. Probablemente, la participación más importante de estos canales de Ca tipo N, sea en los primeros días del desarrollo de los conos de crecimiento ya que, con el tiempo en cultivo, este tipo de corriente ya no es observable.

#### ***III.d) La despolarización con KCl (40 mM) induce el crecimiento de procesos citoplásmicos.***

En otros modelos se ha descrito que la despolarización con KCl induce el crecimiento de procesos de tipo neurítico (Hilborn *et al.*, 1997). El KCl, por sí solo, induce un aumento de 20 veces en el porcentaje de células con neuritas con respecto al control ( $0.6 \pm 0.4$  % vs.  $14 \pm 2.3$  %; figura 28). El KCl despolariza a las células  $\beta$  y esta despolarización promueve la apertura de otros tipos de canales como los canales de Na y Ca que, como ya hemos mencionado, son importantes para el crecimiento de las neuritas en las células  $\beta$  pancreáticas. La hipótesis es que la despolarización por KCl es importante para el crecimiento de las neuritas en nuestras

células es apoyada por el hecho de que la adición de TTX a los cultivos con KCl induce una disminución del 70 % en el porcentaje de células con neuritas ( $14 \pm 2.3\%$  vs.  $4.1 \pm 2.3\%$ ; figura 28) y la adición de nifedipina, bloquea el desarrollo de estos en un 100 % (figura 29).

Por otro lado, se observó que los canales de Ca tipo N, bajo estas condiciones, son importantes ya que la adición de  $\omega$ -conotoxina produce una disminución del 60% en el porcentaje de células con neuritas ( $14 \pm 2.3\%$  vs.  $5.6 \pm 0.7\%$ ; figura 29).

Es interesante el hecho de que la adición de KCl a los cultivos con NGF + dbAMPc, induce un aumento del 57 % en el porcentaje de células con neuritas con respecto al grupo de células cultivadas con NGF + dbAMPc solamente ( $26.5 \pm 3\%$  vs.  $56 \pm 0.7\%$ ; figura 30). Esto sugiere que la inducción del crecimiento de neuritas por NGF y dbAMPc puede ser potenciada por la apertura de canales de Na y Ca por la despolarización.

En otros sistemas celulares como el de las células PC12 se ha visto que el KCl es capaz de inducir el crecimiento de neuritas y que la presencia de dbAMPc en estos cultivos promueve un efecto aditivo (Hillborn *et al.*, 1997).

La inducción del crecimiento de neuritas con el tratamiento con KCl + NGF + dbAMPc puede ser bloqueada por la TTX (36 %), por la nifedipina (66 %) y la  $\omega$ -conotoxina (70 %). Esto confirma aún más la hipótesis de que los canales iónicos son importantes para la extensión de los procesos inducida por NGF + dbAMPc (figuras 31 y 32).

Finalmente, es importante mencionar que, aunque es cierto que a los 5 días en cultivo, la corriente de  $Ca^{2+}$  tipo N desaparece, esto no excluye la posibilidad de que estos canales sean importantes en la fase inicial del crecimiento de los procesos citoplásmicos ya que las células los expresan y, luego los pierden con el tiempo en cultivo. De hecho, esto sugiere que la corriente que fluye a través de estos canales es importante en la iniciación del cono de crecimiento.

En conclusión, la despolarización inducida por KCl y, por ende, la entrada de iones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales sensibles a voltaje presentes en la membrana de las células  $\beta$  pancreáticas demuestra que la entrada de iones a través de estos canales es importante para el desarrollo de los procesos de tipo neurítico. Además, el hecho de que el crecimiento de estos procesos inducido por NGF y dbAMPc, sea acentuado por la adición de KCl a los cultivos, apoya aún más la idea de que las corrientes de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  constituyen una parte importante de las vías que activan estas dos moléculas para inducir sus efectos sobre la morfología de las células  $\beta$  pancreáticas.

### *III.e) La actividad de los canales de Ca también afecta la longitud de los procesos de tipo neurítico.*

Además de estudiar el papel de los canales de Ca sobre el porcentaje de células con neuritas, también se estudió el papel de estos sobre la longitud promedio de los procesos. El tratamiento con NGF + dbAMPc induce un aumento del 75 % en la longitud de las neuritas ( $22.2 \pm 9.6 \mu\text{m}$  vs.  $90 \pm 4.7 \mu\text{m}$ ; figura 32) y el KCl del 57 %, con respecto al control ( $50.2 \pm 5.3 \mu\text{m}$ ; figura 33). La adición del KCl a los cultivos tratados con NGF + dbAMPc, induce un aumento del 36% en la longitud de las neuritas ( $140.3 \pm 7 \mu\text{m}$ ), con respecto a su propio control (células cultivadas con NGF + dbAMPc; figura 33).

Por otro lado, la adición de TTX a los cultivos no induce cambios en la longitud de los procesos en ninguno de los casos (figura 34). Es decir, pese a que los canales de Na juegan un papel importante en el porcentaje de células que extienden los procesos, parecen no ser muy importantes en promover cambios en la longitud de los mismos. Sin embargo, cuando las células son tratadas con NGF + dbAMPc +  $\omega$ -conotoxina, se observa una disminución del 31 % en la longitud promedio de los procesos con respecto a su control ( $16.4 \pm 1.2 \mu\text{m}$  vs.  $90 \pm 4.7 \mu\text{m}$ ; figura 35).

En la condición "máxima estimuladora" (KCl + NGF + dbAMPc), la adición de  $\omega$ -conotoxina induce una disminución del 31 % en la longitud de las neuritas ( $88.6 \pm 9.2 \mu\text{m}$  vs.

140.3 ± 7 µm; figura 35). La presencia de nifedipina en estos cultivos, produjo una disminución del 63 % en la longitud de los procesos citoplásmicos (51 ± 8.7 µm).

Es decir que, los canales de Ca tipo L y N, también influyen la longitud de los procesos citoplásmicos. Esto ha sido observado en células cromafines donde el Bay K 8644± promueve un aumento en la longitud de las neuritas (Morgado-Valle *et al.*, 1998).

#### ***IV) Las células β producen y secretan NGF y los niveles de RNAm para este factor y su receptor pueden ser modulados por los distintos tratamientos.***

Los efectos del NGF se encuentran mediados por su interacción con el receptor de alta afinidad Trk A (Hempstead *et al.*, 1991), el cual se ha demostrado que existe en las células β pancreáticas provenientes del insulinoma de rata RINm5F. (Polak *et al.*, 1993; Kanaka-Gantenbein *et al.*, 1995). Hemos sugerido que el NGF es un factor importante en el mantenimiento de la función endocrina de las células β *in vitro* (Vidaltamayo *et al.*, 1996). Sin embargo, el NGF pancreático no había sido detectado. Tomando en cuenta que el NGF puede modificar varios aspectos de la fisiología de las células β pancreáticas, se planteó que una fuente posible de NGF fuera la célula β pancreática misma y que los niveles de RNAm para su receptor podrían ser modulados por el factor mismo y/o por el dbAMPc. Además, es importante mencionar que se ha observado que los niveles endógenos de NGF en pacientes diabéticos tipo II se encuentran disminuidos (Faradji y Sotelo, 1990). Sin embargo, hasta la fecha no se había demostrado ni la síntesis ni la secreción de NGF por células β pancreáticas.

El tratamiento de las células β con NGF o dbAMPc indujo un aumento de 2 y 3 veces respectivamente, en los niveles de RNAm para Trk A. Esto demuestra que el NGF tiene un efecto de regulación positiva sobre su propio receptor. Además, es importante mencionar que el efecto más notable se observó cuando las células fueron cultivadas con NGF y dbAMPc, en conjunto (aumento de 6 veces con respecto al control, figura 39). Este resultado se correlaciona con nuestros datos anteriores donde existe un efecto aditivo del NGF y del dbAMPc sobre la morfología de las células β (Vidaltamayo *et al.*, 1996).

La expresión aumentada del RNAm para Trk A por dbAMPc, sugiere que hay un mayor número de receptores membranales para el NGF en estas células. Esto volvería a las células más sensibles a las acciones del NGF dado que habría una mayor probabilidad de interacción entre receptores y NGF disponible. Además, se ha reportado un efecto positivo del NGF sobre la expresión de su receptor Trk A, por ejemplo, la exposición prolongada a NGF induce un aumento en el RNAm para Trk A en las células PC12 (Kojima *et al.*, 1995) y neuronas colinérgicas (Holtzman *et al.*, 1992). En este caso el NGF puede jugar un papel fundamental en la expresión del gen a Trk A durante el desarrollo.

También se ha demostrado que la hormona de crecimiento induce un aumento en el número de sitios de unión a NGF en la línea de insulinoma INS-1 (Scharfmann *et al.*, 1994). Estos estudios apoyan la hipótesis de un aumento en los sitios de unión de alta afinidad a NGF, podrían volver a las células más sensibles a las acciones del NGF. Esto podría determinarse por medio de la realización de una curva dosis-respuesta a NGF ya que, si el número de receptores a NGF está aumentando, las células se harían sensibles a concentraciones menores del factor de crecimiento.

Hemos demostrado, por primera vez, que las células  $\beta$  pancreáticas sintetizan y secretan NGF. Se observó la presencia de RNAm para NGF en células de islotes recién aisladas y en células cultivadas por 5 días (figura 40). Los experimentos llevados a cabo por otros grupos de investigación no han podido demostrar la presencia de NGF en células  $\beta$  pancreáticas fetales ni en líneas secretoras de insulina (Kanaka-Gantenbein *et al.*, 1995). Esto probablemente se deba al uso de técnicas no lo suficientemente sensibles para detectar bajos niveles de RNAm aunque no se sabe todavía si las células  $\beta$  fetales son capaces de sintetizar NGF, ya que aquí se reporta la presencia de RNAm y de proteína de NGF en células  $\beta$  de animales adultos.

La presencia de una concentración saturante de dbAMPc (5 mM) en el cultivo, induce una disminución del 46% en los niveles de RNAm para NGF. Aunque el NGF no modula los niveles de RNAm para NGF, es capaz de contrarrestar los efectos del dbAMPc (figura 40).

El NGF se secreta en respuesta a cambios en la concentración de glucosa extracelular, de manera muy similar a lo que ocurre con la insulina (figura 42). Este aumento paralelo en la secreción de ambas moléculas sugiere que la despolarización inducida por glucosa lleva a una

entrada de Ca y, finalmente, a la exocitosis y a la secreción. Altas concentraciones de potasio, un conocido secretagogo de la insulina (Ozawa y Sand, 1986), que despolariza a las células  $\beta$ , también lleva a un aumento en la secreción de NGF (figura 42).

Se ha demostrado que los gránulos de insulina son complejos y contienen productos de cerca de 50 productos génicos independientes además de la insulina y el péptido C (Hutton, 1984). Aunque la insulina y el NGF podrían no encontrarse almacenados en los mismos gránulos de secreción, ambas moléculas podrían ser secretadas al mismo tiempo.

El hecho de que las células  $\beta$  secreten y respondan al NGF sugiere un papel autocrino y/o paracrino para el NGF en el páncreas. En este escenario de regulación debe incluirse la regulación del receptor Trk A. Por ejemplo, se ha sugerido que la regulación positiva de los receptores a Trk A en el insulinoma INS-1 y en neuronas colinérgicas de cerebro frontal puede aumentar la sensibilidad al NGF (Scharfmann *et al.*, 1994; Holtzman *et al.*, 1992).

Finalmente, los efectos de regulación negativa del dbAMPc sobre los niveles de secreción y de RNAm para NGF podrían ser contrarrestados por un aumento en el número de receptores a Trk A en la membrana de las células  $\beta$  expuestas a NGF, permitiendo que las células  $\beta$  respondan aunque las concentraciones del factor trófico sean bajas.

La sensibilidad sostenida de las células  $\beta$  al NGF podría ser necesaria para el mantenimiento de la función de las células  $\beta$ . El tratamiento con NGF acentúa la secreción de insulina en células  $\beta$  de rata fetales (Aoyagi *et al.*, 1997) y en la línea celular INS-1 (Frödin *et al.*, 1995) y previene la pérdida de sensibilidad a cambios en la concentración de glucosa extracelular en las células  $\beta$  *in vitro* (Vidaltamayo *et al.*, 1996). El mecanismo de acción del NGF podría ser a través de la vía de la proteína cinasa activada por mitógeno (MAP-cinasa) (Boulton *et al.*, 1991). De hecho, se ha descrito que la secreción de insulina inducida por glucosa involucra a la vía de las MAP cinasas (Frödin *et al.*, 1995). Dado que el NGF también activa a esta vía y que el tratamiento con NGF previene la pérdida de sensibilidad a la concentración externa de glucosa en células  $\beta$  cultivadas *in vitro* (Vidaltamayo *et al.*, 1996), sugerimos que el factor podría potenciar el efecto de la glucosa sobre estas cinasas.

Además, el hecho de que las células  $\beta$  secreten NGF sugiere la existencia de un asa autocrina/paracrina en islote. Además, el NGF ha sido propuesto como un factor importante en la morfogenesis y ontogenia del islote pancreático, porque el uso de un inhibidor de la actividad de las tirosinas cinasas, el K252a, previene la maduración del islote (Kanaka-Gantenbein *et al.*, 1995). Estos datos sugieren que el NGF podría jugar un papel relevante en la función normal del islote pancreático.

El NGF, al igual que la insulina, es secretado en respuesta a aumentos en la concentración extracelular de glucosa, lo cual sugiere papeles autocrinos y endocrinos para el NGF *in vivo*. Finalmente, es posible que una secreción deficiente de NGF por parte de las células  $\beta$  pancreáticas contribuya a los niveles disminuidos de NGF en pacientes con neuropatías diabéticas (Faradji y Sotelo, 1990) y podría, junto con los niveles disminuidos de insulina, estar causalmente relacionado con el desarrollo de la neuropatía diabética.

## CONCLUSIONES

- 1) El NGF y el dbAMPc, en conjunto, promueven un aumento del 49 % en la densidad de corriente de  $\text{Na}^+$  de las células  $\beta$  pancreáticas de rata. Este efecto no es significativamente distinto del que promueve el NGF por sí solo. Sin embargo, este aumento en la densidad de corriente de  $\text{Na}^+$  podría ser relevante en la extensión de procesos de tipo neurítico.
- 2) Las células  $\beta$  pancreáticas expresan canales de Ca tipo N además de los canales de Ca tipo L y T.
- 3) La aplicación de un pulso de 5 min de NGF a las células  $\beta$ , induce un aumento del 51 % en la densidad de corriente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Este aumento se debe a un efecto sobre los canales de Ca tipo L.
- 4) El aumento en la densidad de corriente que promueve el NGF a corto plazo se debe probablemente a cambios en el tiempo medio de apertura de los canales de Ca tipo L.
- 5) El cultivo de las células durante 5 días con NGF, promueve un aumento del 63 % en la densidad de corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L ya que, la corriente de tipo N, ya no se observa conforme transcurre el tiempo en cultivo.
- 6) El efecto del NGF a largo plazo sobre la densidad de corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  se debe, muy probablemente, a las síntesis *de novo* de canales.
- 7) Los canales de Na y de Ca tipo L y N son importantes en el desarrollo de procesos de tipo neurítico inducido por NGF, dbAMPc y/o KCl.
- 8) Las células  $\beta$  pancreáticas de cultivos primarios expresan el receptor de alta afinidad al NGF. Los niveles de RNAm para éste son modulados por el tratamiento con NGF y/o dbAMPc. Los efectos más notables sobre los niveles de RNAm para Trk A se observan cuando las células son cultivadas en presencia de NGF y dbAMPc, en conjunto. Estos datos podrían ser correlacionados con observaciones previas del laboratorio sobre el efecto de estas moléculas

en la morfología de las células.

- 9) Las células  $\beta$  expresan tanto RNAm como proteína de NGF. Los niveles de RNAm para éste factor pueden ser disminuidos por el tratamiento de las células con dbAMPc. El NGF contrarresta los efectos del dbAMPc.
  
- 10) El NGF secretado por las células  $\beta$  pancreáticas, tiene actividad biológica ya que el cultivo de las células PC12 con el medio condicionado de células  $\beta$ , induce el crecimiento de neuritas y, este efecto puede ser bloqueado hasta niveles control con el uso de un anticuerpo específico contra NGF.
  
- 11) Las células  $\beta$  secretan NGF en respuesta a distintas concentraciones de glucosa extracelular y ante otros estímulos despolarizantes (KCl 40 mM). La secreción de NGF puede ser disminuida por dbAMPc.

## PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio abren un campo de estudio nuevo para el papel que juega el NGF en el páncreas, pudiendo ser este, relevante en neuropatías asociadas a la diabetes. En este trabajo se describe que el NGF puede modular varios aspectos de la fisiología de las células  $\beta$  pancreáticas. Este factor es capaz de inducir cambios en la morfología, secreción y corrientes de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  de las células. Además, las mismas células  $\beta$  son capaces de producirlo y secretarlo de manera muy similar a la insulina. Incluso los niveles de RNAm para su receptor pueden ser modulados por el factor mismo. Estos datos sugieren que el NGF podría ser un modulador importante de la fisiología de la célula  $\beta$  pancreática y que, incluso, podría existir una regulación autocrina y/o paracrina por parte del NGF pancreático.

Los resultados obtenidos en este trabajo abren nuevas perspectivas en el campo de estudio del papel del NGF sobre la fisiología de la célula  $\beta$  pancreática. Entre estas perspectivas se considera que será importante estudiar el efecto del NGF y el dbAMPc sobre los niveles de RNAm y proteína para el canal de Na de estas células, así como determinar que vías de señales intracelulares utiliza el NGF para inducir sus efectos sobre el aumento en las densidades de corriente de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Por otro lado, actualmente se están llevando al cabo experimentos para determinar el papel de los canales de Ca tipo N sobre la secreción de insulina ya que, aunque el papel que juegan los canales de Ca tipo L sobre la secreción de insulina se conoce bien, la importancia de los canales de Ca tipo N en este proceso, no ha sido descrita.

Además, se tendrá que evaluar cuál es la vía de señales o cuáles son los procesos involucrados en la extensión de procesos neuríticos inducida por KCl, NGF y/o dbAMPc en éstas células y su relación con los canales iónicos presentes en la membrana de las células  $\beta$  pancreáticas.

Finalmente, será interesante determinar cuál es el mecanismo que utilizan el NGF y/o dbAMPc para inducir el aumento en los niveles de RNAm para Trk A, así como explorar cuál es el

mecanismo que utiliza el dbAMPc para disminuir los niveles de RNAm y la secreción de NGF y determinar su relevancia fisiológica.



## REFERENCIAS

- Albillos, A., Artalejo, A.R., López, M.G., Gandia, L., García, A.G. y Carbone, E. (1994) Calcium channel subtypes in cat chromaffin cells. *J. Physiol. Lond.* **447** (Pt 2): 197-213.
- Aloe, L. y Levi-Montalcini, R. (1977) The effect of nerve growth factor on mast cells. *Brain Res.* **133**: 358-366.
- Alpert, S., Hanahan, D. y Teitelman, G. (1988) Hybrid insulin genes reveal a developmental lineage for pancreatic endocrine cells and imply a relationship with neurons. *Cell* **53**: 295-308.
- Ammälä, C., Eliasson, L., Bokvist, K., Larsson, O., Ashcroft, F.M., Rorsman, P. (1993) Exocytosis elicited by action potentials and voltage-clamp calcium currents in individual mouse pancreatic  $\beta$ -cells. *J. Physiol.* **472**: 665-688.
- Anand, P. (1996) Neurotrophins and peripheral neuropathy. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **351**(1338): 449-454.
- Anglister, L., Farber, I.C., Shahar, A. y Grinvald, A. (1982) Localization of voltage-sensitive calcium channels along developing neurites: Their possible role in regulating neurite elongation. *Dev. Biol.* **94**: 351-365.
- Aoyagi, K., Bergsten, P., Eriksson, U.J., Ebendal, T y Hellerstrom, C. (1997) *In vitro* regulation of insulin release and biosynthesis of fetal rat pancreatic cells explanted on pregnancy day 16. *Biol. Neonate* **71**, 60-68.
- Ashcroft, S.H.J., Hammonds, P. y Harrison, D.E. (1986) Insulin secretory response of a clonal cell line of simian virus 40-transformed  $\beta$ -cells. *Diabetologia* **29** : 727-733.

- Ashcroft, F.M. y Rorsman, P. (1989) Electrophysiology of the pancreatic  $\beta$ -cell. *Adv. Exp. Med. Biol.* **54** : 87-145.
- Atouf, F., Czernichow, P. y Scharfmann, R. (1997) Expression of neuronal traits in pancreatic beta cells. Implication of neuron-restrictive silencing factor/repressor element silencing transcription factor, a neuron-restrictive silencer. *J. Biol. Chem.* **272**(3): 1929-1934.
- Atwater, I., Rojas, E. y Soria, B. (1989) Electrophysiology of the pancreatic  $\beta$ -cell. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* **54**: 87-145.
- Atwater, I., Dawson, C.M., Scott, A., Eddlestone, G. y Rojas, E. (1979) The nature of oscillatory behaviour in electrical activity from pancreatic  $\beta$ -cells. *Horm. Metab. Res. S.* **10**: 100-107.
- Baillyes, E.M., Guest, P.C., y Hutton, J.C. Insulin synthesis. (1992) En: Insulin, Molecular Biology to pathology, Eds. Ashcroft, F.M., y Ashcroft, S.J.H. IRL Press, Oxford University Press, NY, 1<sup>a</sup> Ed., Cap.3, pp 64-92.
- Bechem, M. y Hoffman, H. (1993) The molecular mode of action of the Ca agonist (-) Bay K 8644 on the cardiac Ca channel. *Pflügers Arch.* **424**(3-4): 345-53.
- Blair, L.A. y Marshall, J. (1997) IGF-1 modulates N and L calcium channels in a PI 3-kinase-dependent manner. *Neuron* **19**(2): 421-429.
- Bocchini, V. y Angeletti, P.U. (1969) Nerve growth factor: purification as a 30,000-molecular-weight protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **64**: 787-794.
- Boulton, T.G., Nye, S.H., Robbins, D.J., Ip, N.Y., Radziejewska, E., Morgenbesser, S.D., DePhinho, R.A., Panayotatos, N., Cobb, M.H. y Yancopoulos, G.D. (1991) ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* **65**(4): 663-675.
- Boyd, A.E. III. (1992) The role of ion channels in insulin secretion. *J. Cell. Biochem.* **48**: 234-241.

- Bradley, J.L., Thomas, P.K., King, R.H., Muddle, J.R., Ward, J.D., Tesfaye, S., Boulton, A.J., Tsigos, C. y Young, R.J. (1995) Myelinated nerve fibre regeneration in diabetic sensory polyneuropathy: correlation with a type of diabetes. *Acta Neuropathol. Berl* **90**(4): 403-410.
- Bradshaw, R.A. y Angeletti, R. (1971) Nerve growth factor from mouse submaxillary gland: Amino acid sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**: 2417-2420.
- Brady, K.D., Wagner, K.A., Tashjian, A.H., y Golan, D.E. (1995) Alterations in the frequency and shape of  $Ca^{2+}$  fluctuations in GH4C1 cells induced by thyrotropin-releasing hormone and Bay K 8644±. *Biochem. J.* **306**(Pt 2): 399-406.
- Brewster, W.J., Fernyhough, P., Diemel, L.T., Mohiuddin, L. y Tomlinson, D.R. (1993) Changes in nerve growth factor and preprotachykinin messenger RNA levels in the iris and the trigeminal ganglion in diabetic rats: effects of treatment with insulin or nerve growth factor. *Brain. Res. Mol. Brain. Res.* **29**(1): 131-139.
- Briggs, M.S. y Gierasch, L.M. (1986) Molecular mechanisms of protein secretion: The role of the signal sequence. *Adv. Prot. Chem.* **38**: 109-180.
- Bruecker, E.D. (1948) Implantation of tumors in the hind limb field of the embryonic chick and the mast cells. *FEBS Lett.* **198**: 315-320.
- Calissano, P., Cattaneo, A., Aloe, L. y Levi-Montalcini, R. (1984) The nerve growth factor (NGF). *Horm. Pract. Pept.* **12**:1-56.
- Cavalié, A., Berninger, E., Haas, C.A., García, D.E., Lindholm, D. y Lux, H.D. (1994). Constitutive upregulation of calcium channel currents in rat pheochromocytoma cells: role of c-fos and c-jun. *J. Physiol. Lond.* **479** (Pt 1): 11-27.
- Cohen, S. y Levi-Montalcini, R. (1956) A nerve- growth stimulating factor isolated from snake venom. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **42**: 571-574.

- Cohen, S. (1960) Purification of a nerve-growth factor promoting protein from the mouse salivary gland and its neurocytotoxic serum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **46**: 302-311.
- Davidson, H.W., Rhodes, C.J. y Hutton, J.C. (1988) Intraorganellar calcium and pH control proinsulin cleavage in the pancreatic  $\beta$  cell via two distinct site-specific endopeptidases. *Nature* **333**: 92-96.
- Dean, P.M. y Matthews, E.K. (1970) Electrical activity in pancreatic islet cells. *Nature* **219**: 389-390.
- Ditcher, M.A., Tischler, A.S. y Greene, L.A. (1977) Nerve growth factor-induced increase in electrical excitability and acetylcholine sensitivity of rat pheochromocytoma cell line. *Nature* **268**: 501-504.
- Doherty, P., Ashton, S.V., Moore, S.E. y Walsh, F.S. (1991) Morphoregulatory activities of NCAM and N-cadherin can be accounted for G protein- dependent activation of L- and N-type neuronal  $Ca^{2+}$  channels. *Cell* **67**: 21-33.
- Ecurat, M., Djabali, K., Huc, C., Landov, F., Bécourt, C., Buitard, C., Gros, F. y Portier, F. (1991) Origin of the beta cells of the islets of Langerhans is further questioned by the expression of neuronal intermediate filament proteins, peripherin and NF-L, in the rat insulinoma RINm5F cell line. *Dev. Neurosci.* **13**: 424-432.
- Faradji, V y Sotelo, J. (1990) Low serum levels of nerve growth factor in diabetic neuropathy. *Acta Neurol. Scand.* **81**: 402-406.
- Femyhough, P., Diemel, L.T., Brewster, W.J. y Tomlinson, D.R. (1995) Altered neurotrophin mRNA levels in peripheral nerve and skeletal muscle of experimentally diabetic rats. *J. Neurochem.* **64**(3): 1231-1237.
- Findlay, I. y Dunne, M.J. (1985) Voltage-activated calcium currents in insulin secreting cells. *FEBS Lett.* **189**: 281-285.

- Fitzgerald, E.M. y Dolphin, A.C. (1997) Regulation of rat neuronal voltage-dependent calcium channels by endogenous p21-ras. *Eur. J. Neurosci.* **9**(6): 1252-1261.
- Fontaine, J., y Le Douarin, N.M. (1974) New studies of the neural crest origin of the avian ultimo-branchial glandular cells. Interspecific combinations and cytochemical characterization of cells based on the uptake of biogenic amine precursors. *Histochemistry* **38**: 297-305.
- Fontaine, J., y Le Douarin, N.M. (1977) Analysis of endoderm formation in the avian blastoderm by the use of quail-chick chimeras: The problem of the neuroectodermal origin of the cells of the APUD serie. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **41**: 209-222.
- Fontaine, J., Le Lievre, C. y Le Douarin, N.M. (1977) What is the developmental fate of the neural crest cells which migrate into the pancreas in the avian embryo? *Gen. Comp. Endocrinol.* **33**: 394-404.
- Frazier, W.A., Angeletti, R.H., Sherman, R. y Bradshaw, R.A. (1973) The topography of mouse 2.5S nerve growth factor: The reactivity of tyrosine and tryptophan. *Biochemistry* **12**: 3281-3293.
- Freedman, R.B. (1984) Native disulphide bond formation in protein biosynthesis: evidence for the role of protein disulphide isomerase. *TIBS* **9**: 438-441.
- Frodin, M., Sekine, N., Roche, E., Filloux, C., Prentki, M., Wollheim, C.B. y Van-Obberghen, E. (1995) Glucose, other secretagogues, and nerve growth factor stimulate mitogen-activated protein kinase in the insulin-secreting beta-cell line, INS-1. *J. Biol. Chem.* **270**(14): 7882-7889.
- Fukuda, J. y Kameyama, M. (1979) Enhancement of Ca spikes in nerve cells of adult mammals during neurite outgrowth in tissue culture. *Nature* **279**: 546-548.
- Giordano, T., Pan, J.B., Casuto, D., Watanabe, S. y Americ, S.P. (1992) Thyroid hormone regulation of NGF, NT-3 and BDNF RNA in the adult rat brain. *Brain. Res. Mol. Brain. Res.* **16**(3-4): 239-45.

- Gottmann, K. y Lux, H.D. (1995) Growth cone calcium ion channels: properties, clustering and functional roles. *Perspect. Dev. Neurobiol.* 2: 371-377.
- Gorin, P.D. y Johnson, E.M. (1979) Experimental autoimmune model of nerve growth factor deprivation: Effects on developing peripheral sympathetic and sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5382-5386.
- Greenberg, M.E., Greene, L.A. y Ziff, E.B. (1985) Nerve growth factor and epidermal growth factor induced rapid and transient changes in protooncogene transcription in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 260: 14101-14110.
- Greene, L.A y Tischler, A.S. (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73: 2424-2428.
- Greene, L.A y Tischler, A.S. (1982) PC12 pheochromocytoma cultures in neurobiological research. *Adv. Cell Neurobiol.* 3: 373-414.
- Gunning, P.W., Landreth, G.E., Bothwell, M.A. y Shooter, E.M.(1981) Differential and synergistic actions of nerve growth factor and cyclic AMP in PC12 cells. *J. Cell Biol.* 89: 240-245.
- Harper, S.J., Bolsover, S.R., Walsh, F.S. y Doherty, P. (1994) Neurite outgrowth stimulated by L1 requires calcium influx into neurons but is not associated with changes in steady state levels of calcium in growth cones. *Cell. Adhes. Commun.* 2(5): 441-453.
- Heidemann, S.R., Joshi, H.C., Schechter, A., Fletcher, J.R. y Bothwell, M. (1985) Synergistic effects of cyclic AMP and nerve growth factor on neurite outgrowth and microtubule stability of PC12 cells. *J. Cell Biol.* 100: 916-927.
- Hempstead, L., Martin-Zanca, D., Kaplan, D.R., Parada, L.F. y Chao, M.V. (1991) High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk protooncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature* 350: 678-683.

- Henquin, J.C. y Meissner, H.P. (1984) Significance of ionic fluxes and changes in membrane potential for stimulus-secretion coupling in pancreatic  $\beta$  cells. *Experientia* **40** : 1043-1052.
- Henquin, J.C. (1990) Role of voltage- and  $\text{Ca}^{2+}$  - dependent  $\text{K}^{+}$  channels in the control of glucose-induced electrical activity in pancreatic  $\beta$ -cells. *Pflügers Arch.* **416**: 568-573.
- Hilborn, M.D., Rane, S.G. y Pollock, J.D. (1997) EGF in combination with depolarization or cAMP produces morphological but not physiological differentiation in PC12 cells. *J. Neurosci. Res.* **47**: 16-26.
- Hiriart, M y Matteson, D.R. (1988) Na channel and two types of Ca channels in rat pancreatic  $\beta$  cells identified with the reverse hemolytic plaque assay. *J. Gen. Physiol.* **91** : 617-631.
- Hiriart, M. y Ramírez-Medeles, M.C. (1991) Functional subpopulations of individual pancreatic  $\beta$ -cells in culture. *Endocrinology* **128**(6): 3193-3198.
- Hiriart, M. y Ramírez-Medeles, M.C. (1993) Muscarinic modulation of insulin secretion by single pancreatic  $\beta$ -cells in culture. *Mol. Cell. Endocrinology* **93**: 63-69.
- Hiriart, M. (1997) El páncreas endocrino. En: Libro del Curso Internacional de Actualización en Fisiología. XL Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. México; pp 305.
- Holtzman, D.M., Li, Y., Parada, L.F., Kinsman, S., Chen, C.K., Valletta, J.S., Zhou, J., Long, J.B. y Mobley, W.C. (1992) p140trk mRNA marks NGF-responsive forebrain neurons: evidence that trk gene expression is induced by NGF. *Neuron* **9**: 465-478.
- Hu, X.Q., Singh, N., Mukhopadhyay, D. y Akbarali, H.I. (1998) Modulation of voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels in rabbit colonic smooth muscle cells by c-Src and focal adhesion kinase. *J. Biol. Chem.* **273**(9): 5337-5342.
- Hutton, J.C. (1984) Secretory granules. *Experientia* **40**: 1091-1098.

- Islas-Suárez, L., Gómez-Chavarín, M., Drucker-Colín, R., Hernández-Cruz, A. (1994) Properties of the sodium current in rat chromaffin cells exposed to nerve growth factor in vitro. *J. Neurophysiol.* **72**: 1938-1948.
- Junqueira, I.C., Carneiro, J. y Kelley, R.O. (1989) Basic Histology. Appleton and Lange, NY., USA, 6ª ed, pp 320.
- Kanaka-Gantenbein, C., Dicou, E., Czernichow, P. y Scharfmann, R. (1995) Presence of nerve growth factor and its receptors in an *in vitro* model of islet cell development: implication in normal islet morphogenesis. *Endocrinology* **136**: 3154-3162.
- Kaplan, D.R., Hempstead, B.L., Martin-Zanca, D., Chao, M.V. y Parada, L.F. (1991) The trk protooncogene product: A signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science* **252**: 554-558.
- Kojima, M., Ikeuchi, T., y Hatanaka, H. (1995) Role of nerve growth factor in the expression of trkA mRNA in cultured embryonic rat basal forebrain cholinergic neurons. *J. Neuroscience Res.* **42**, 775-783.
- Kossel, A.H., Williams, C.V., Schweizer, M. y Kater, S.B. (1997) Afferent innervation influences the development of dendritic branches and spines via both activity-dependent and non-activity-dependent mechanisms. *J. Neurosci.* **17**(16): 6314-6324.
- Lacy, P.E. y Kostianovsky, M.D. (1967) Method for isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* **16**: 35-39.
- Le Douarin, N.M. (1988) On the origin of pancreatic endocrine cells. *Cell* **53** : 169-171.
- Levi-Montalcini, R. (1987) The nerve growth factor: Thirty-five years later. *EMBO J.* **6**: 1145-1154.

- Levine, E.S., Dreyfus, C.F., Black, I.B. y Plummer, M.R. (1995) Differential effects of NGF and BDNF on voltage-gated calcium currents in embryonic basal forebrain neurons. *J. Neurosci.* **15**: 3084-3091.
- Lillien, L.E. y Claude, P. (1985) Nerve growth factor is a mitogen for cultured chromaffin cells. *Nature* **317**: 632-634.
- Liu, H. y Sperelakis, N. (1997) Tyrosine kinases modulate the activity of single L-type calcium channels in vascular smooth muscle cells from rat portal vein. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **75**(9): 1063-1068.
- Lively, M.O. (1989) Signal peptidase in protein biosynthesis and intracellular transport. *Curr. Opinion. Cell Biol.* **1**: 1188-1193.
- Magnelli, V., Pollo, E., Carbone, E. (1995) Block of non-L, non-N-type  $Ca^{2+}$  channels in rat insulinoma RINm5F cells by  $\omega$ -agatoxin IVA and  $\omega$ -conotoxin MVIIC. *Pflügers Arch.* **429**: 762-771.
- Malaisse, W.J. y Malaisse-Lagae, F. (1984) The role of cyclic AMP in insulin release. *Experientia* **40**: 1068-1075.
- Mandel, G., Cooperman, S.S., Mauc, R.A., Goodman, R.H., Brehm, P. (1988) Selective induction of brain type II sodium channels by nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**: 924-928.
- Manivannan, S. y Terakawa, S. (1994) Rapid sprouting of filopodia in nerve terminals of chromaffin cells, PC12 cells, and dorsal root neurons induced by electrical stimulation. *J. Neurosci.* **14**: 5917-5927.
- Mattson, M.P. y Kater, S.B. (1987) calcium regulation of neurite elongation and growth cone motility. *J. Neurosci.* **7**: 4034-4043.

- Meakin, S.O. y Shooter, E.M. (1992) The nerve growth factor family of receptors. *TINS* **15**: 323-331.
- Meakin, S.O., Suter, U., Drinkwater, C.C., Welcher, A.A. y Shooter, E.M. (1992) The rat *trk* protooncogene product exhibits properties characteristic of the slow nerve growth factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 2374-2378.
- Meiri, H., Spira, M.E. y Parnas, I. (1981) Membrane conductance and action potential of a regenerating axonal tip. *Science* **211**: 709-712.
- Morgado-Valle, C., Verdugo-Díaz, L., García, D.E., Morales, Orozco, C. y Drucker-Colin, R. (1998) The role of voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels in neurite growth of cultured chromaffin cells induced by extremely low frequency (ELF) magnetic field stimulation. *Cell. Tissue. Res.* **291**: 217-230.
- Neher, E. y Sakmann, B. (1992). The patch clamp technique. *Sci. Am.* **266**(3): 28-35.
- Noceti, F., Olcese, R., Qin, N., Zhou, J. y Stefani, E. (1998) Effect of Bay K 8644 (-) and the  $\beta_2$  subunit on  $Ca^{2+}$ -dependent inactivation in  $\alpha_1C$   $Ca^{2+}$  channels. *J. Gen. Physiol* **111**: 463-475.
- Okada, Y., Taniguchi, H. y Shimada, C. (1976) High concentration of GABA and high glutamate decarboxylase activity in rat pancreatic islets and human insulinoma. *Science* **194**: 620-622.
- Orci, L. y Unger, R.H. (1975) Functional subdivision of islets of Langerhans and the possible role of D-cells. *Lancet* **2**: 1243-1244.
- Ozawa, S. y Sand, O. (1986) Electrophysiology of excitable endocrine cells. *Physiol. Rev.* **66**: 887-952.
- Pearse, A.G.E. (1966) Common cytochemical properties of cells producing polypeptide hormone, with particular reference to calcitonin and the thyroid cells. *Vet. Rec.* **79**: 587-590.

- Pearse, A.G.E. (1976) Peptides in brain and intestine. *Nature* **262**: 92-94.
- Pictet, R. L., Rall, L.B., Phelps, P. y Rutter, W.J. (1976) The neural crest and the origin of the insulin-producing and other gastrointestinal hormone-producing cells? *Science* **191**: 191-192.
- Pipeleers, D., Pipeleers-Marichal, M., Kipnis, D. (1976) Regulation of tubulin synthesis in islets of Langerhans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**: 3188-3191.
- Pipeleers, G.D., Pipeleers, A.M. y Kipnis, M.D. (1987). The biosociology of pancreatic  $\beta$  cells. *Diabetologia* **30**: 277-291.
- Polak, M., Scharfmann, R., Seilheimer, B., Eisenbarth, G., Dressler, D., Verma, I. y Potter, H. (1993) Nerve growth factor induces neuron-like differentiation of an insulin-secreting pancreatic  $\beta$ -cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 5781-5785.
- Pollo, A., Lovallo, M., Biancardi, E., Sher, E., Socci, C. y Carbone, E. (1993) Sensitivity to dihydropyridines,  $\omega$ -conotoxin and noradrenaline reveals multiple high-voltage-activated  $\text{Ca}^{2+}$  channels in rat insulinoma and human pancreatic  $\beta$ -cells. *Pflügers Arch.* **423**: 462-471.
- Pressel, D. y Mislser, S. (1990). Sodium currents contribute to action potential generation in canine and human  $\beta$ -cells. *J. Membrane Biol.* **116**: 273-280.
- Quiroz, G.F. (1990) Intestinos. En: Anatomía Humana. Ed. Porrúa, Vol. II: 203-213.
- Rajnicek, A. y McCaig, C. (1997) Guidance of CNS growth cones by substratum grooves and ridges: effects of inhibitors of the cytoskeleton, calcium channels and signal transduction pathways. *J. Cell. Sci.* **110** (Pt 23): 2915-2924.
- Ramakers, G.J., Oestreicher, A.B., Wolters, P.S., Van-Leeuwen, F.W., De-Graan, P.N. y Gispen, W.H. (1991) developmental changes in B-50 (GAP-43) in primary cultures of cerebral cortex: B-50 immunolocalization, axonal elongation rate and growth cone morphology. *Int. J. Dev. Neurosci.* **9**(3): 215-230.

- Rosenbaum, T., Vidaltamayo, R., Sánchez-Herrera, D. e Hiriart, M. (1996) Nerve growth factor increases sodium current in pancreatic  $\beta$  cells. *J. Memb. Biol.* **153**: 53-58.
- Rosenbaum, T., Vidaltamayo-R., Sánchez-Soto, M.C., Zentella, A. e Hiriart, M. (1998) Pancreatic  $\beta$  cells synthesize and secrete nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 7784-7788.
- Scharfmann, R., Tazi, A., Polak, M., Kanaka, C. y Czernichow, P. (1993) Expression of functional nerve growth factor receptors in pancreatic beta-cell lines and fetal rat islets in primary culture. *Diabetes* **42**: 1829-1836.
- Scharfmann, R., Atouf, F., Tazi, A., y Czernichow, P. (1994) Growth hormone and prolactin regulate the expression of nerve growth factor receptors in INS-1 cells. *Endocrinology* **134**, 2321-2328.
- Schlessinger, J. y Ulrich, A. (1992) Growth factor signalling by receptor tyrosine kinases. *Neuron* **9**: 1405-1411.
- Schubert, D., La Corbiere, M., Whitlock, C. y Stallcup, W. (1978) Alterations in the surface properties of cells responsive to nerve growth factor. *Nature* **273**: 718-723.
- Schuit, F.C., In'tVeld, P.A. y Pipeleers, D.G. (1988) Glucose stimulates proinsulin biosynthesis by a dose-dependent recruitment of pancreatic beta cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 3865-3869.
- Shitaka, Y., Matsuki, N., Saito, H. y Katsuki, H. (1996) Basic fibroblastic growth factor increases functional L-type  $Ca^{2+}$  channels in fetal rat hippocampal neurons: implications for neurite morphogenesis *in vitro*. *J. Neurosci.* **16**(20): 6476- 6489.
- Server, A. y Shooter, E. (1977) Nerve growth factor. *Adv. Protein Chem.* **31**: 339-343.
- Smith, P.A., Rorsman, P. y Ashcroft, F.M. (1989) Modulation of dihydropyridine-sensitive  $Ca^{2+}$  -channels by glucose metabolism in pancreatic  $\beta$ -cells. *Nature* **342**: 550-553.

- Solem, M., Mc Mahon, T. y Messing, R.O. (1995) Depolarization-induced neurite outgrowth in PC12 cells requires permissive, low level NGF receptor stimulation and activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *J. Neurosci.* **15**(9): 5966-5975.
- Steiner, D.F., Bell, G.I. y Tager, H.S. (1989) Chemistry and biosynthesis of pancreatic proteins. En: *Endocrinology* (ed. L.J. De Groot). Saunders Co., Harcourt Brace Jovanovich Inc., Philadelphia. Capítulo 15.
- Strauss, O., Mergler, S. y Wiederholt, M. (1997) Regulation of L-type calcium channels by protein tyrosine kinase and protein kinase C in cultured rat and human retinal pigment epithelial cells. *FASEB J.* **11**: 859-86.
- Streit, J. y Lux, H.D. (1989) Distribution of calcium currents in sprouting PC12 cells. *J. Neurosci.* **9**: 4190-4199.
- Taborsky, G.J. (1989) The endocrine pancreas: Control of secretion. En: *Textbook of Physiology*. Eds. Patton H.D., Fuchs, A.F., Hille, B., Scher, A.M. y Steiner, R. W.B. Saunders Company, Philadelphia, PA. Capítulo 77, pp 1522-1543.
- Teitelman, G., Lee, J.K., Alpert, S. (1987) Expression of cell type-specific markers during pancreatic development in the mouse: Implications for pancreatic cell lineages. *Cell Tissue Res.* **250** : 435-439.
- Teitelman, G. y Evinger, M.J. (1988) Expression of neural antigens by pancreatic islet cells: Developmental implications. En: *Current communications in molecular biology: The pancreatic  $\beta$  cell: Development, cell and molecular biology and immunology*. Cold Spring Harbor, NY ; USA ; 1ª edición ; pp 37-42.
- Teitelman, G. (1990) Insulin cells of pancreas extend neurites but do not arise from the neuroectoderm. *Dev. Biol.* **142** : 368-379.

- Tominaga, M., Komiya, I., Johnson, J.H., Inman, L., Alam, T., Moltz, J., Crider, B., Stefan, Y., Baetens, D., McCorkle, K., Orci, L. y Unger, R.H. (1986). Loss of insulin response to glucose but not arginine during the development of auto immune diabetes in BB/W rats: relationships to islet volume and glucose transport rate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**: 9749-9753.
- Tomlinson, D.R., Fernyhough, P y Diemel, L.T. (1996) Neurotrophins and peripheral neuropathy. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **351**: 455-462.
- Tso, J., Sun, X.H., Kao, T.H., Reece, K.S. y Wu, R. (1985) Isolation and characterization of rat and human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cDNAs: genomic complexity and molecular evolution of the gene. *Nucleic-Acids-Res.* **13**: 2485-502.
- Vidaltamayo, R., Sánchez-Soto, M.C., Rosenbaum, T., Martínez-Merlos, T e Hiriart, M. (1996) Neuron-like phenotypic changes in pancreatic  $\beta$ -cells induced by NGF, FGF, and dbcAMP. *Endocrine* **4** : 19-26.
- Welcher, A.A., Bitler, C.M., Radeke, M.J. y Shooter, E.M. (1991) Nerve growth factor binding domain of the nerve growth factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**: 159-163.
- Wildering, W.C., Lodder, J.C., Kits, K.S. y Bulloch, A.G. (1995) Nerve growth factor (NGF) acutely enhances high-voltage-activated calcium currents in molluscan neurons. *J. Neurophysiol.* **74**: 2778-2781.
- Willard, A.L. (1980) Electrical excitability of outgrowing neurites of embryonic neurons in cultures of dissociated neural plate of *Xenopus laevis*. *J. Physiol. (Lond).* **301**: 115-128.
- Williams, E.J., Doherty, P., Turner, G., Reid, R.A., Hemperly, J.J. y Walsh, F.S. (1992). Calcium influx into neurons can solely account for cell contact-dependent neurite outgrowth stimulated by transfected L1. *J. Cell Biol.* **119**: 883-892.

-Wood, K.M., Srnecki, C., Roberts, T.M. y Blenis, J. (1992) Ras mediated nerve growth factor receptor modulation of three signal-transducing protein kinases: MAP kinase, ras-1, and RSK. *Cell* **68**: 1041-1050.

-Zhou, J., Valletta, J.S., Grimes, M.L., y Mobley, W.C. (1995) Multiple levels for regulation of TrkA in PC12 cells by nerve growth factor. *J. Neurochem.* **65**, 1146-1154.

# Pancreatic $\beta$ cells synthesize and secrete nerve growth factor

TAMARA ROSENBAUM\*<sup>†</sup>, ROMÁN VIDALTAMAYO\*<sup>†</sup>, MA. CARMEN SÁNCHEZ-SOTO\*, ALEJANDRO ZENTELLA<sup>‡</sup>,  
AND MARCIA HIRIART\*<sup>§</sup>

Departments of \*Biophysics and <sup>‡</sup>Cell Biology, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México DF 04510 Mexico

Communicated by Robert E. Forster, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, PA, April 20, 1998 (received for review, January 16, 1998)

**ABSTRACT** Differentiation and function of pancreatic  $\beta$  cells are regulated by a variety of hormones and growth factors, including nerve growth factor (NGF). Whether this is an endocrine or autocrine/paracrine role for NGF is not known. We demonstrate that NGF is produced and secreted by adult rat pancreatic  $\beta$  cells. NGF secretion is increased in response to elevated glucose or potassium, but decreased in response to dibutyryl cAMP. Moreover, steady-state levels of NGF mRNA are down-regulated by dibutyryl cAMP, which is opposite to the effect of cAMP on insulin release. NGF-stimulated changes in morphology and function are mediated by high-affinity Trk A receptors in other mammalian cells. Trk A receptors are present in  $\beta$  cells and steady-state levels of Trk A mRNA are modulated by NGF and dibutyryl cAMP. Taken together, these findings suggest endocrine and autocrine roles for pancreatic  $\beta$ -cell NGF, which, in turn, could be related to the pathogenesis of diabetes mellitus where serum NGF levels are diminished.

Nerve growth factor (NGF) has been implicated in the survival and differentiation of neuronal and non-neuronal systems (1). In particular, it induces morphological and physiological changes in pancreatic  $\beta$  cells, including an increase in voltage-dependent sodium current density (2) and the extension of neurite-like processes. This latter effect is potentiated by dibutyryl cAMP (dbcAMP) (3). Furthermore, pancreatic  $\beta$  cells treated with NGF in culture (5 days) secrete more insulin in response to stimulation with 20.6 mM glucose than with 5.6 mM glucose. In contrast, with increasing time in culture, insulin secretion of control cells tends to be similar in both glucose concentrations (3). The effects of NGF on  $\beta$  cells are mediated through the high-affinity receptor Trk A (4), which has been shown to exist in pancreatic  $\beta$  cells (5, 6).

Together, these data suggest that NGF is an important factor in the maintenance of the endocrine function of  $\beta$  cells *in vitro*. However, pancreatic NGF has not been detected. A possible source is the pancreatic  $\beta$  cell itself, since it has been observed that endogenous NGF levels in diabetic animals (7) and NGF serum levels in type II diabetic patients (8) are decreased. Nevertheless, despite efforts to detect NGF expression in fetal  $\beta$  cells or in  $\beta$  cell lines by Northern blot analysis (9), to date, neither synthesis nor secretion of NGF by  $\beta$  cells has been demonstrated.

In the present study, we demonstrate NGF synthesis and secretion by single adult rat pancreatic  $\beta$  cells. Furthermore, since regulation of the levels of Trk A receptors can modulate responsiveness to NGF (10, 11), we also examined whether NGF and/or dbcAMP modulate  $\beta$  cell Trk A mRNA levels.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Cell Culture.** Animal care was performed according to the *National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (National Institute of Health Publication No. 85-23 revised, 1985). Pancreatic  $\beta$  cells were obtained from young adult male Wistar rats (200–250 g) as described previously (3). Isolated cells from rat pancreatic islets were seeded for 24 h in bacteriological Petri dishes to promote fibroblast attachment. After this period, supernatants with islet cells were recollected and cultured under control conditions in cell culture Petri dishes (Corning) with RPMI 1640 medium (with 11.6 mM glucose) supplemented with 5% fetal bovine serum, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, 100 units/ml penicillin, and 0.25  $\mu$ g/ml Fungizone. Experimental cells were cultured in the presence of either dbcAMP (5 mM), NGF (50 ng/ml), or NGF + dbcAMP (50 ng/ml, 5 mM).

PC12 cells were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% horse serum and 2.5% fetal bovine serum (GIBCO), 100  $\mu$ g/ml streptomycin, 100 units/ml penicillin, and 0.25  $\mu$ g/ml Fungizone.

**Immunocytochemistry.** Freshly isolated single cells or cells cultured for 11 days were processed (3) and incubated overnight with rabbit anti-mouse NGF antibody (Sigma) and guinea pig anti-porcine insulin antibody (Incstar, Stillwater, MN), as recommended by the supplier's technical bulletins. Finally, a second CY5-conjugated (excitation = 650 nm, emission = 670 nm) goat anti-rabbit IgG antibody was added in the case of NGF detection and a fluorescein isothiocyanate-conjugated (excitation = 494 nm, emission = 520 nm) goat anti-guinea pig IgG antibody in the case of insulin detection. Cells were observed under confocal microscopy using the red channel for CY5 (NGF) and the green channel for fluorescein isothiocyanate (insulin).

PC12 cells were stained by the avidin-biotin complex method (3) using a rabbit anti-Trk A antibody (Santa Cruz Biotechnology) as recommended by the supplier, followed by an incubation with biotin-labeled goat anti-rabbit IgG antibody and development with avidin-peroxidase complex and 3,3'-diaminobenzidine as final substrate, to form a brown reaction product.

**Cytoplasmic RNA Isolation and Reverse Transcriptase (RT)-PCR for NGF and Trk A Detection.** Cytoplasmic RNA was extracted from cells cultured for 5 days under the different experimental conditions described above. The TRIzol reagent (catalogue no. 15596-026; GIBCO/BRL) was used as instructed in the technical bulletin. Cells were lysed directly in a culture dish by adding 1 ml of TRIzol reagents per  $1 \times 10^6$  cells (12). Cytoplasmic RNA (200 ng) was reverse transcribed following the supplier's recommended protocol (Perkin-Elmer catalogue no. N808-0143).

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.

© 1998 by The National Academy of Sciences 0027-8424/98/957784-5\$2.00/0  
PNAS is available online at <http://www.pnas.org>.

Abbreviations: NGF, nerve growth factor; dbcAMP, dibutyryl cAMP; RT, reverse transcriptase; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; CM, conditioned medium.

<sup>†</sup>T.R. and R.V. contributed equally to this work.

<sup>§</sup>To whom reprint requests should be addressed. e-mail: mhiriart@ifscun1.ifisioi.unam.mx.

RT-PCR were carried out with 200 ng of total RNA for NGF mRNA detection in  $\beta$  cells. The PC12 pheochromocytoma and the C6 glioma cell lines were used as negative and positive controls, respectively. The reaction was also performed with freshly isolated  $\beta$  cells. A parallel reaction was carried out in the same mRNA sample using the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) housekeeping gene for quantitative purposes.

All oligonucleotide primers were synthesized and used to prime the amplification of the cDNA template. Based on the published sequences of mouse NGF (13), Trk A (14), and *GAPDH* (15), we chose the 5'-GGCATGCTGGACCCAAGC-TC-3' sequence for the sense (5') primer and the 5'-GCGCTT-GCTCCGGTGAGTCC-3' for the antisense (3') primer for NGF mRNA detection, the 5'-GCAAAGCCGTGGAACAG-3' sequence for the sense (5') primer and the 5'-CCCATGGCGCATGTACT-3' for the antisense (3') primer for Trk A mRNA detection, and the 5'-GCCCCATGTTGTGAT-3' sequence for the sense (5') primer and the 5'-GCCCCAGCATCAAAG-GT-3' sequence for the antisense (3') primer in the case of *GAPDH* mRNA amplification. Twenty-five cycles of amplification were performed with an annealing temperature of 59°C for NGF and 57°C for Trk A and *GAPDH*.

Reaction products were sequenced and proved to have a 100% identity with the sequence reported for the *NGF*, *Trk A*, and *GAPDH* genes (13–15). The amplified material was visualized by ethidium bromide staining, following 1% agarose gel electrophoresis. Resolved PCR bands were transferred to a Hybond-N nylon membrane. Membranes were cross-linked by exposure to UV light.

To confirm the specificity of the RT-PCR, internal antisense (3') oligonucleotides were designed with the following sequence: 5'-ATCTAGACTTCCAGGCC-3' for NGF, 5'-GGAGGGCAGAAAGGAAG-3' for Trk A, and 5'-GTGG-ATCTGACATGCCG-3' for *GAPDH*. Hybridizations were carried out with the internal oligonucleotides labeled with [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP using T4 polynucleotide kinase. Band intensities were determined with the use of a PhosphorImager.

**Bioassay with PC12 Cells.** Islet cells were precultured for 24 h under control conditions to ensure proper attachment to culture dishes. After this time, cells were cultured with a chemically defined medium supplemented with 20 mM glucose for 4 h. The chemically defined medium consisted of RPMI 1640 supplemented with insulin–transferrin–sodium selenite solution (1:100; GIBCO), putrescine (100  $\mu$ M), and progesterone (20 nM). PC12 cells were subcultured for 24 h in the supernatants from the  $\beta$  cell-conditioned medium (CM). At the end of this incubation, PC12 cells were stained with rabbit anti-Trk A antibody as described above and the percentage of neurite-bearing cells was counted. A neurite-bearing cell was defined as a cell with one or more processes, at least 10  $\mu$ m long. The length of the processes was measured with the aid of the JAVA video analysis software (Jandel Scientific 1.4, Corte Madera, CA) by projecting the image of the cell on a monitor attached to a video camera and a Nikon Axiophot inverted microscope. To determine specificity of NGF effects, a rabbit anti-mouse NGF-neutralizing antibody (Sigma) was added to the CM.

**Detection of NGF Secretion by Pancreatic  $\beta$  Cells.** Secretion of NGF by pancreatic  $\beta$  cells was determined with a two-site ELISA assay NGF Emax Immunoassay System (catalogue no. G3550; Promega). Experiments were performed as instructed by the technical bulletin using the supernatants of  $\beta$  cells incubated for 4 h in HBSS (Sigma) with 5, 11, or 20 mM glucose as well as in 11 mM glucose with 40 mM KCl or 5 mM dbcAMP.

## RESULTS

**Presence of NGF Protein in Rat Pancreatic  $\beta$  Cells.** The expression of NGF by pancreatic  $\beta$  cells was demonstrated

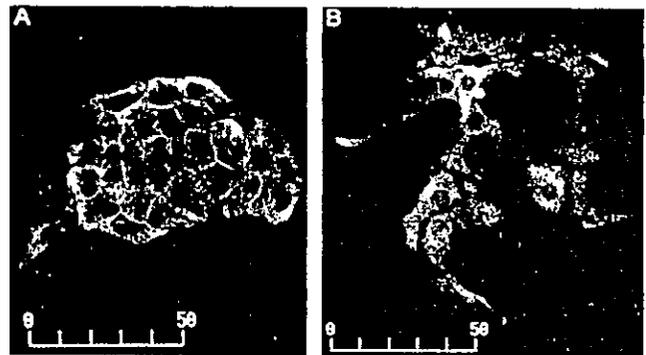


FIG. 1. Presence of NGF in adult  $\beta$  cells.  $\beta$  cells cultured for 11 days with NGF (50 ng/ml) and dbcAMP (5 mM). (A) Cells cultured under control conditions for 11 days. (B) Cells cultured for 11 days in the presence of NGF + dbcAMP. Bar, 50  $\mu$ m.

using immunocytochemistry for protein detection and RT-PCR for detection of mRNA. The latter technique was used because of the limited amount of cytoplasmic RNA that can be obtained from primary cultures. To obtain cytoplasmic RNA from pure islet cells, without fibroblasts a differential seeding technique was performed (as described in *Experimental Procedures*).

Because pancreatic islets contain several cell types, a double labeling technique was used to determine whether  $\beta$  cells express NGF: a CY5 probe (red fluorescence) for NGF and fluorescein isothiocyanate probe (green fluorescence) for insulin. The experiments of Fig. 1 were performed after 11 days of cell culture, when effects of NGF and dbcAMP on  $\beta$  cell morphology were evident (3). The yellow staining, a consequence of colocalized green and red dyes, represents cells positive for both insulin and NGF. All control (Fig. 1A) and treated (Fig. 1B)  $\beta$  cells are NGF positive (red or yellow); of these, approximately 3% of the cells are completely negative

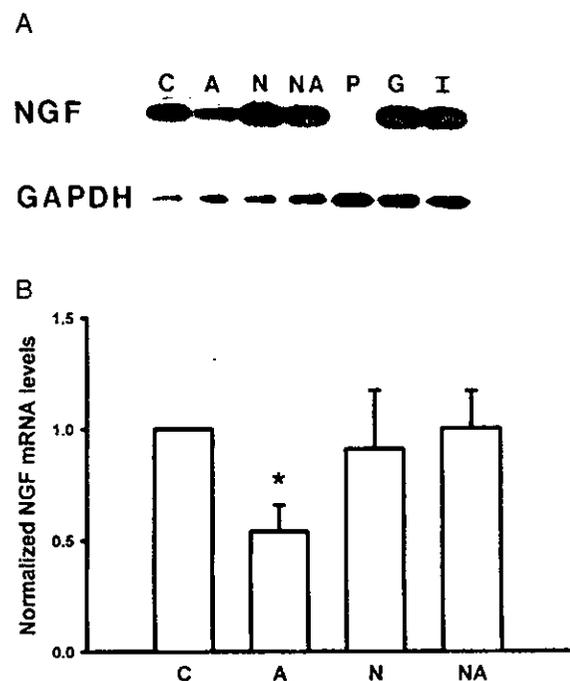


FIG. 2. NGF mRNA levels are dependent on dbcAMP. (A) RT-PCR reaction products from rat pancreatic  $\beta$  cells cultured under different experimental conditions. (B) dbcAMP induced a 46% decrease in NGF mRNA levels ( $n = 6$ ; \* $P < 0.01$ , Student's  $t$  test) with respect to control, whereas treatment with NGF and NGF + dbcAMP had no effect. C, control; A, dbcAMP; N = NGF; N + A, NGF + dbcAMP; P, PC12 cells; G, C6 glioma; I, freshly isolated islet cells.

for insulin (red only). The localization of NGF and insulin staining in the cells was not always in the same areas. This could indicate that NGF and insulin are localized in different secretory granules.

**Effects of NGF and/or dbcAMP on NGF Steady-State mRNA Levels.** mRNA for NGF was present in fresh and cultured isolated pancreatic  $\beta$  cells (Fig. 2), implying that constitutive expression *in vivo* continues during *in vitro* culture. Moreover, the presence of NGF protein and its mRNA was also found in the rat insulinoma cell line RINm5F (data not shown).

We determined the effect of culturing islet cells for 5 days in the presence of NGF and/or dbcAMP on the steady-state

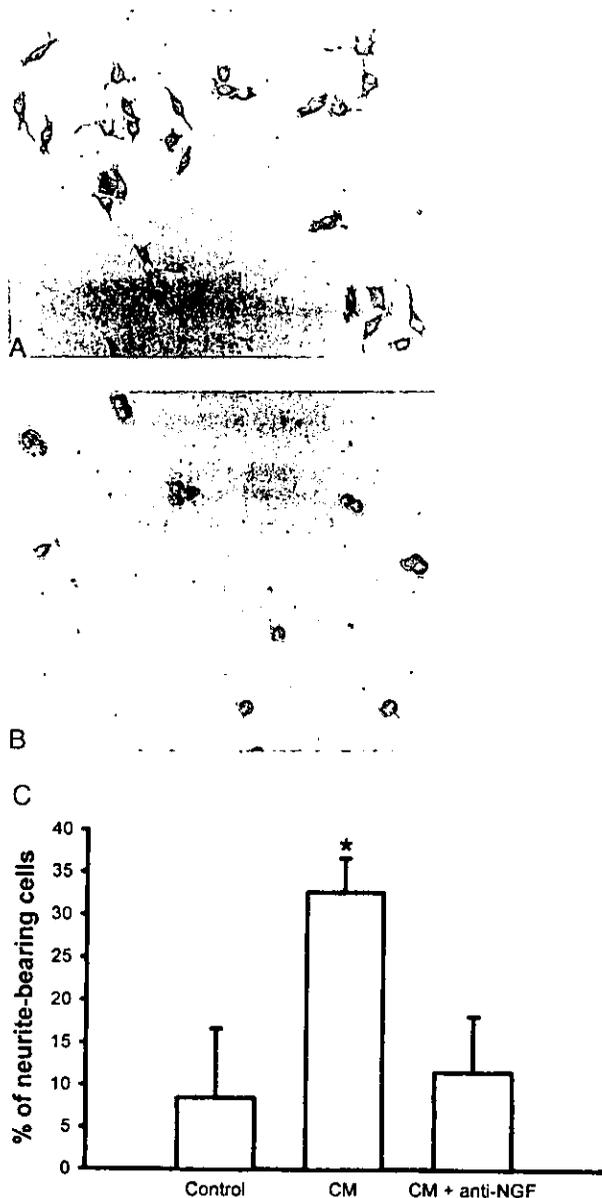


FIG. 3. Pancreatic  $\beta$  cells secrete a molecule with NGF-like biological activity. (A) PC12 cells cultured in the presence of the CM extended neuritic processes. (B) When an NGF-neutralizing antibody was added to the CM, extension of neurites by PC12 was abolished to control levels because cells did not extend neuritic processes and eventually (48 h) detached from the plate. (C) The addition of the CM to PC12 cells induced a fourfold increase in the percentage of neurite-bearing cells ( $n = 4$ ; \* $P < 0.01$ , ANOVA, followed by two-tailed Student's  $t$  test). Control, chemically defined medium (20 mM glucose); CM, conditioned medium (20 mM glucose); CM + anti-NGF, conditioned medium (20 mM glucose) + anti-NGF antibody.

levels of NGF mRNA. We found that although NGF alone has no effect, the presence of a saturating concentration of 5 mM dbcAMP in the culture induces a 46% decrease in the levels of mRNA for NGF. However, when cells were cultured with both compounds, this latter decrease in NGF mRNA was not observed (Fig. 2).

**Pancreatic  $\beta$  Cells Secrete Biologically Active NGF.** The above data demonstrate that  $\beta$  cells contain NGF mRNA and protein. However, they do not indicate whether  $\beta$  cells secrete biologically active NGF. To explore this possibility, we used PC12 responsiveness to NGF as a bioassay because these cells are well known to extend neurites in response to this factor (16). In the bioassay, neurite outgrowth was assessed in PC12 cells grown for 24 h in the presence of a CM from  $\beta$  cells stimulated with 20 mM glucose. Neurite outgrowth in PC12 cells cultured in the  $\beta$  cell CM was fourfold higher than in control cells. The addition of a NGF-neutralizing antibody blocked this effect (Fig. 3). This result indicates that pancreatic  $\beta$  cells secrete a biologically active NGF-like molecule.

**NGF Secretion by Pancreatic  $\beta$  Cells in Response to Increasing Extracellular Glucose Concentrations.** Previous data obtained with the reverse hemolytic plaque assay technique show that insulin secretion in single cells increases nearly three times in 20 mM glucose with respect to 5 mM glucose (17). To identify and measure NGF secretion in single  $\beta$  cells, we used an ELISA.

Pancreatic  $\beta$  cells stimulated with 20 mM glucose secrete 50–180 pg/ml NGF, two to three times more than cells incubated with 5 mM glucose (Fig. 4). Moreover, KCl (40 mM) + 11 mM glucose induces a threefold increase in NGF secretion with respect to cells incubated with 5 mM glucose. On the other hand, the addition of dbcAMP + 11 mM glucose induces a 67% decrease in NGF secretion with respect to the group treated only with 11 mM glucose.

**Effects of NGF and/or dbcAMP on Trk A mRNA Steady-State Levels.** The effects of NGF are mediated by Trk A receptors, which are present in pancreatic  $\beta$  cells (6). Because pancreatic  $\beta$  cells synthesize and secrete NGF and the treatment of  $\beta$  cells with NGF and/or dbcAMP induces the extension of neurite-like processes, we investigated the effects of these molecules on the levels of Trk A mRNA.

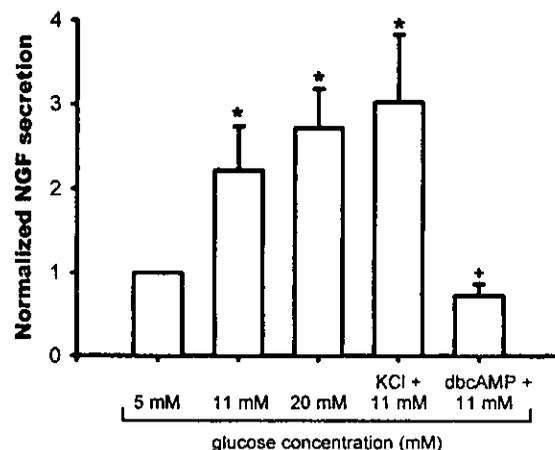


FIG. 4. Pancreatic  $\beta$  cells secrete NGF in response to different glucose concentrations. Cells stimulated with 20 mM glucose secrete 50–180 pg/ml NGF. Cells stimulated with 5 mM glucose secrete 20–60 pg/ml NGF. NGF secretion in KCl (40 mM) + 11 mM glucose was significantly different from secretion in 5 mM glucose, but not from secretion in 20 mM glucose (50–220 pg/ml vs. 50–180 pg/ml). NGF secretion is diminished by 67% when cells are cultured with dbcAMP (5 mM) + 11 mM glucose with respect to 11 mM glucose alone. An \* denotes  $P < 0.05$  with respect to 5 mM glucose; + denotes  $P < 0.05$  with respect to 11 mM glucose (Student's  $t$  test,  $n = 4$ ).

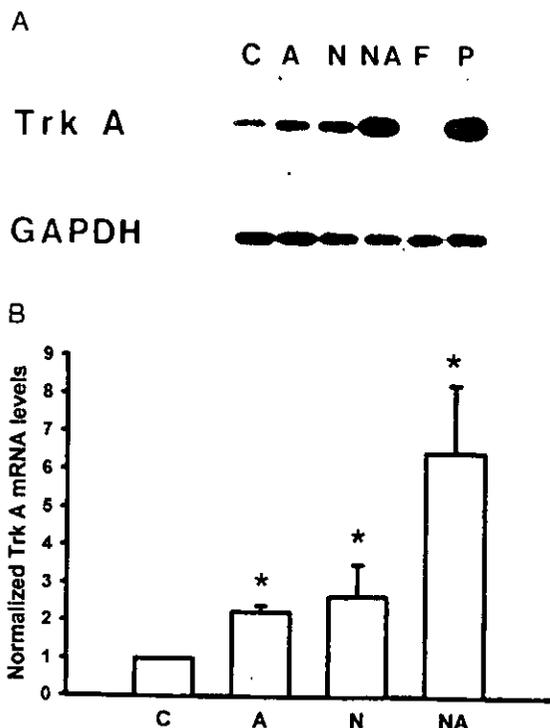


FIG. 5. dbcAMP and/or NGF up-regulate Trk A mRNA levels. (A) RT-PCR reaction products for Trk A detection under different experimental conditions. (B) dbcAMP and NGF each induced a twofold increase in Trk A mRNA levels ( $P < 0.05$ ) with respect to control, whereas treatment with NGF + dbcAMP induced a sixfold increase with respect to control ( $n = 6$ ;  $P < 0.05$ , Student's *t* test). C, control; A, dbcAMP (5 mM); N, NGF (50 ng/ml); NA, NGF + dbcAMP; F, fibroblasts; P, PC12 cells.

The RT-PCR technique was used to determine whether NGF and/or dbcAMP had any effect on the levels of Trk A mRNA. As shown in Fig. 5, treatment of  $\beta$  cells with NGF or dbcAMP induced an increase in Trk A mRNA levels. The most potent enhancement on Trk A mRNA levels was observed when cells were treated with NGF and dbcAMP together. In this case, the increase in Trk A mRNA levels was sixfold with respect to control levels.

## DISCUSSION

In the present study, we have demonstrated for the first time that pancreatic  $\beta$  cells synthesize and secrete NGF. Moreover, biologically active pancreatic NGF is secreted in response to changes in extracellular glucose concentrations similar to the dependence of insulin secretion on external glucose. This parallel increase in the secretion of both molecules suggests that glucose-induced depolarization leads to a calcium influx and finally to exocytosis and secretion. High potassium, a known secretagogue of insulin (18) that depolarizes  $\beta$  cells, also leads to an increase in NGF secretion.

It has been shown that insulin granules are complex and contain products from nearly 50 independent genes besides insulin and peptide C (19). Although our immunocytochemical results suggest that insulin and NGF are not stored in the same compartment, they do not preclude simultaneous secretion of NGF and insulin. However, not all insulin secretagogues have the same effect on NGF release. Our data show that dbcAMP, which increases insulin secretion (20), inhibits NGF secretion induced by 11 mM glucose.

The fact that  $\beta$  cells are both secreting and responding to NGF implicates an autocrine and/or paracrine role for NGF in the pancreas. Such a feedback scenario must include the regulation of the receptor component. For example, it has been

suggested that up-regulation of Trk A receptors in insulinoma INS-1 and forebrain cholinergic neurons can increase sensitivity to NGF (11, 10). Treatment of  $\beta$  cells with NGF or dbcAMP induced an increase in Trk A mRNA levels. The most potent enhancement on Trk A mRNA levels was observed when cells were treated with NGF and dbcAMP together. This result correlates with our previous finding (3) of an additive effect of NGF and dbcAMP on  $\beta$  cell morphology.

The increased expression of Trk A mRNA by dbcAMP-treated cells suggests that a higher number of membrane receptors for NGF may exist in these cells. This would render cells more sensitive to NGF actions due to a higher probability of interaction between the receptors and the available NGF. Prolonged NGF exposure induces an increase of mRNA for Trk A in PC12 cells (21) and in cholinergic neurons (11), where NGF may play a critical role in *Trk A* gene expression during development (22). It has also been shown that growth hormone induces an increase in NGF-binding sites in the insulinoma cell line INS-1 (11). These studies also suggest that the increase in high-affinity NGF-binding sites may render cells more sensitive to the actions of NGF.

On the other hand, we observed the presence of mRNA for NGF in freshly isolated islet cells and in cells cultured for 5 days. Experiments performed by other research groups have not been able to demonstrate the presence of NGF in pancreatic fetal  $\beta$  cells in primary cultures nor in insulin-secreting cell lines (9). This is probably because of the use of techniques not sensitive enough to detect low levels of mRNA; however, we do not know whether fetal  $\beta$  cells synthesize NGF.

We also describe that the presence of a saturating concentration of 5 mM dbcAMP in the culture induces a 46% decrease in the levels of mRNA for NGF. Although NGF itself does not modulate NGF mRNA levels, it apparently protects against the aforementioned down-regulation by dbcAMP. Finally, these down-regulatory effects of dbcAMP on NGF secretion and NGF mRNA steady-state levels could be overcome by the increase on Trk A receptors on the membrane surface of  $\beta$  cells exposed to NGF, permitting  $\beta$  cells to respond even if the concentration of the trophic factor is low.

The sustained sensitivity of  $\beta$  cells to NGF could be necessary for the maintenance of  $\beta$  cell function. NGF treatment enhances glucose-stimulated insulin secretion in fetal rat  $\beta$  cells (23) and in the INS-1 cell line (24), and NGF treatment prevents the loss of sensitivity to external glucose concentration changes in  $\beta$  cells cultured *in vitro* (3). The action mechanism for NGF could be through the mitogen-activated protein kinase pathway (25). It has been described that glucose-induced insulin secretion in INS-1 cells involves this pathway and that NGF can potentiate this effect (24). Moreover, NGF could be necessary for the maintenance of  $\beta$  cell electrical activity, since it induces a 30% increase in sodium current density of adult rat  $\beta$  cells after 5 days in culture (2).

Furthermore, NGF has been implicated in islet morphogenesis and ontogeny because the use of an inhibitor of Trk A activity, K252a, prevents islet maturation (9). These data suggest that NGF may play a relevant role in normal function of pancreatic islet.

NGF, as well as insulin, is secreted in response to increasing glucose concentrations, suggesting both an autocrine and endocrine role for NGF *in vivo*. Finally, it is possible that a deficient secretion of NGF by pancreatic  $\beta$  cells contributes to the decreased serum levels of NGF in patients with diabetic neuropathies (8), and may, along with decreased insulin levels, be causally related to the development of neuropathology.

We are especially thankful to Dr. Carol Deutsch for discussion and corrections to this paper. We are also very thankful to Ma. Elena Larieta for technical assistance; Dr. Fernando López-Casillas, Verónica Ponce, and Valentín Mendoza for sequencing RT-PCR products; and Dr. Lydia Aguilar-Bryan and Alvaro Caso for valuable

comments. This work was supported by CONACyT 3174P-N9607 (Mexico), Direccion General de Personal Academico IN212194, Programa de Apoyo A Las Divisiones de Estudios de Posgrado 30360 and 30369 (Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico), and scholarships from Direccion General de Personal Academico, Universidad Nacional Autónoma de México (to T.R. and R.V.).

1. Levi-Montalcini, R. (1987) *EMBO J.* **6**, 1145–1154.
2. Rosenbaum, T., Vidaltamayo, R., Sánchez-Herrera, D. & Hiriart M. (1996) *J. Membr. Biol.* **153**, 53–58.
3. Vidaltamayo, R., Sánchez-Soto, M.-C., Rosenbaum, T., Martínez-Merlos, T. & Hiriart, M. (1996) *Endocrine* **4**, 19–26.
4. Hempstead, B. L., Martin-Zanca, D., Kaplan, D.-R., Parada, L.-F. & Chao, M.-V. (1991) *Nature (London)* **350**, 678–683.
5. Polak, M., Scharfmann, R., Seilheimer, B., Eisenbarth, G., Dressler, D., Verma, I.-M. & Potter, H. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 5781–5785.
6. Kanaka-Gantenbein, C., Tazi, A., Czernichow, P. & Scharfmann, R. (1995) *Endocrinology* **136**, 761–769.
7. Hellweg, R. & Hartung, H. D. (1990) *J. Neurosci. Res.* **26**, 258–267.
8. Faradji, V. & Sotelo, J. (1990) *Acta Neurol. Scand.* **81**, 402–406.
9. Kanaka-Gantenbein, C., Dicou, E., Czernichow, P. & Scharfmann, R. (1995) *Endocrinology* **136**, 3154–3162.
10. Holtzman, D.-M., Li, Y., Parada, L.-F., Kinsman, S., Chen, C.-K., Valletta, J.-S., Zhou, J., Long, J.-B. & Mobley, W.-C. (1992) *Neuron* **9**, 465–478.
11. Scharfmann, R., Atouf, F., Tazi, A. & Czernichow, P. (1994) *Endocrinology* **134**, 2321–2328.
12. Chomczynski, P. (1993) *Biotechniques* **15**, 532–534.
13. Giordano, T., Pan, J.-B., Casuto, D., Watanabe, S. & Arneric, S.-P. (1992) *Mol. Brain Res.* **16**, 239–245.
14. Meakin, S.-O., Suter, U., Drinkwater, C.-C., Welcher, A.-A. & Shooter, E.-M. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 2374–2378.
15. Tso, J.-Y., Sun, X.-H., Kao, T.-H., Reece, T.-K.-S. & Wu, R.-R. (1985) *Nucleic Acids Res.* **13**, 2485–2502.
16. Greene, L.-A. & Tischler, A.-S. (1982) *Adv. Cell. Neurobiol.* **3**, 373–414.
17. Hiriart, M. & Matteson, D.-R. (1988) *J. Gen. Physiol.* **91**, 617–639.
18. Ozawa, S. & Sand, O. (1986) *Physiol. Rev.* **66**, 887–952.
19. Hutton, J.-C., Penn, E.-J. & Peshavaria, M. (1982) *Diabetologia* **23**, 365–373.
20. Malaisse, W.-J. & Malaisse-Lagac, F. (1984) *Experientia* **40**, 1068–1075.
21. Zhou, J., Valletta, J.-S., Grimes, M.-L. & Mobley, W.-C. (1995) *J. Neurochem.* **65**, 1146–1154.
22. Kojima, M., Ikeuchi, T. & Hatanaka, H. (1995) *J. Neurosci. Res.* **42**, 775–783.
23. Aoyagi, K., Bergsten, P., Eriksson, U.-J., Ebendal, T. & Hellstrom, C. (1997) *Biol. Neonate* **71**, 60–68.
24. Frödin, M., Sekine, N., Roche, E., Filloux, C., Prentki, M., Wollheim, C.-B. & Obberghen, E.-V. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 7882–7889.
25. Boulton, T.-G., Nye, S.-H., Robbins, D.-J., Ip, N.-Y., Radziejewska, E., Morgenbesser, S.-D., DePinho, R.-A., Panayotatos, N., Cobb, M.-H. & Yancopoulos, G.-D. (1991) *Cell* **65**, 663–675.