

03081
10

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



Instituto de Fisiología Celular

EFFECTOS DEL FACTOR DE CRECIMIENTO NEURONAL
SOBRE LOS CANALES DE SODIO DE CELULAS β
PANCREATICAS DE RATA.

T E S I S

Que para obtener el Grado de
DOCTOR EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

p r e s e n t a:

Román Vidal Tamayo Ramírez

Directora de Tesis: Dra. Marcia Hiriart Urdanivía

México, D. F., febrero de 2000

275150



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

A mi Mamá y Papá:

Por marcar la pauta a seguir. Con toda mi admiración y cariño.

A mis hermanos (por orden de aparición) Rafa, Rodrigo y Rosaura:

Por hacer el camino más divertido.

A Laura:

Por la vida que comenzamos a compartir. Con todo mi amor.

A mis abuelos maternos (*In Memoriam*), Mamá Tata y Papá Juan, y mi abuela paterna, Mamá Lupe:

Por ser un ejemplo de perseverancia y por el cariño que me dieron y me dan.

Agradecimientos:

A la Dra. Marcia Hiriart,
directora de esta Tesis, le
agradezco ante todo su amistad y
el que me haya guiado durante
este trabajo y me permitiera llevar
a cabo algunas de mis locuras.
¡Salud, Maestra!

A los Doctores José Bargas y
Mauricio Díaz, miembros de mi
comité tutorial, les agradezco el
apoyo y las discusiones que
enriquecieron este trabajo.

A mis sinodales, los Doctores:
Marcia Hiriart, Luz María Navarro,
Elia Martha Pérez, José Bargas,
Vicente Díaz, Fernando López-
Casillas y Julio Morán, les
agradezco que hayan ocupado su
tiempo en la revisión y discusión
del manuscrito de la Tesis.

Este trabajo fue apoyado por los donativos IN214298, DGAPA, UNAM y 3174P-N9607 del CONACyT.

Durante la realización de este trabajo, el autor fue becario de la DGAPA, UNAM y del SNI.

*Into the distance, a ribbon of black,
stretched to the point of no turning back.
A flight of fancy on a windswept field;
Standing alone my senses reeled.
A fatal attraction holding me fast,
how can I escape this irresistible grasp?*

*Can't keep my eyes from the circling skies,
tongue-tied and twisted; just an earth-bound
misfit, I.*

*Ice is forming on the tips of my wings.
Unheeded warnings, I thought I thought of
everything. No navigator to guide my way home,
unladen, empty and turned to stone*

*A soul in tension that's learning to fly.
Condition grounded but determined to try.
Can't keep my eyes from the circling skies,
tongue-tied and twisted; just an earth-bound
misfit, I.*

*Above the planet on a wing and a prayer.
My grubby halo, a vapour trail in the empty air,
across the clouds I see my shadow fly,
out of the corner of my watering eye.
A dream unthreatened by the morning light.
Could blow this soul right through the roof of the
night.*

*There's no sensation to compare with this.
Suspended animation, a state of bliss.
Can't keep my eyes from the circling skies,
tongue-tied and twisted just an earth-bound
misfit, I.*

Pink Floyd (*Learning To Fly*, 1987).

Título de la tesis:

Efectos del factor de crecimiento neuronal sobre los canales de sodio de células B pancreáticas de rata.

Grado y nombre del tutor o director de tesis:

Dra. Marcia Hiriart Urdanivia

Institución de adscripción del tutor o director de tesis:

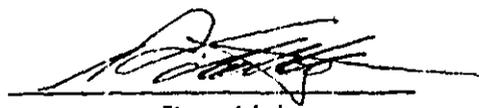
Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Resumen de la tesis: (Favor de escribir el resumen de su tesis a máquina, como máximo en 25 renglones a un espacio, sin salir de la extensión de este cuadro.)

En este trabajo se analizaron los mecanismos involucrados en el aumento en densidad de corriente de Na^+ de células β en respuesta a NGF. Además, se analizó la influencia de la corriente de Na^+ en la actividad eléctrica de las células β y se identificó una fuente de NGF pancreático, a la que pudieran estar expuestas las células β in vivo. Nuestros resultados muestran que el aumento en densidad de corriente es dependiente de la síntesis de proteínas y RNAm. Además, el NGF induce un aumento cercano a 2 veces en el nivel de RNAm para la subunidad α de canal de sodio tipo III. En conjunto, estos resultados sugieren que el aumento de la densidad de corriente de Na^+ de las células β en respuesta a NGF, se debe al aumento en la síntesis de canales de Na^+ . También demostramos que la corriente de sodio contribuye significativamente al disparo de potenciales de acción de células β de rata, ya que los potenciales de acción sobrepasan el nivel de 0mV y son sensibles a tetrodotoxina (TTX). Las células tratadas con NGF son más sensibles a la TTX, lo que se podría deber a que la corriente de Na^+ de estas células representa una fracción mayor de la corriente total. Por último, demostramos que las células β producen y secretan NGF. Esta secreción de NGF depende de la concentración extracelular de glucosa y puede ser inducida mediante la despolarización de la membrana plasmática de las células β , de manera similar a la secreción de insulina. La secreción de NGF por parte de las células β sugiere la existencia de mecanismos de regulación autocrina/paracrina en el islote pancreático, ya que el NGF regula la fisiología de las mismas células que lo producen. Además, el NGF pancreáticos también podría tener efectos endocrinos, al alcanzar la circulación sistémica, lo que podría explicar la disminución del NGF circulante en pacientes diabéticos.

LOS DATOS ASENTADOS EN ESTE DOCUMENTO CONCUERDAN FIELMENTE CON LOS REALES Y QUEDO ENTERADO (QUE, EN CASO DE CUALQUIER DISCREPANCIA, QUEDARÁ SUSPENDIDO EL TRÁMITE DEL EXAMEN

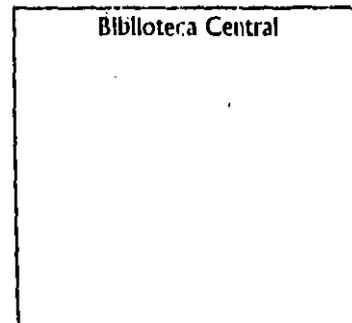
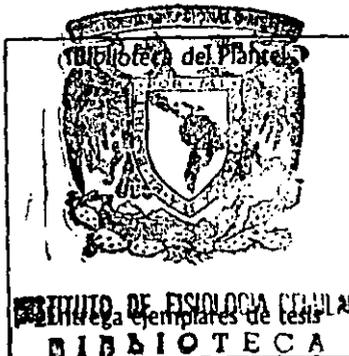
Fecha de solicitud: 25/febrero/2000



Firma del alumno

Acompaño los siguientes documentos:

- Nombramiento del Jurado del examen de grado
- Aprobación del trabajo escrito por cada miembro del jurado
- Copia de la última revisión de estudios
- Comprobante de pago de derechos por registro del grado



In the present study, we characterized the mechanisms involved in the increasing of β -cell Na^+ current in response to NGF. We also assessed the role played by Na^+ current in β -cell electrical activity. Finally, we identified a pancreatic source of NGF, to which β -cells could be exposed in vivo. Our data show that protein and mRNA synthesis is required for NGF to increase β -cell Na^+ current. Moreover, NGF treatment also increased steady state levels of type III Na^+ channel α subunit mRNA. Taken together, our observations suggest that NGF increases β -cell Na^+ current through the increase in the synthesis of β -cell Na^+ channels. Na^+ current plays an important role in the electrical activity, both from control and NGF-treated rat β -cells. In our recording system, the action potentials from rat β cells show overshooting. This trait suggests that Na^+ currents are participating actively in rat β -cell firing. Moreover, rat β cell electrical activity is sensitive to tetrodotoxin (TTX). The action potentials from NGF-treated cells are more sensitive to this toxin and this could be due to the increased Na^+ currents in these cells, since Na^+ current could represent a larger fraction of total depolarizing current in NGF-treated cells than in control ones. Our results demonstrate that β -cells are capable to synthesize and secrete NGF. NGF is secreted from β cells in a glucose-dependent manner. Moreover, β -cell membrane depolarization also induces NGF secretion. These data suggests that NGF and insulin could be secreted through similar systems of exocytosis. Since β cells secrete NGF, it could be proposed an autocrine/paracrine regulation loop in the pancreatic islet. If pancreatic NGF could be secreted to the systemic circulation, it could also have endocrine functions. This endocrine role could be related to the decreases in NGF serum levels observed in diabetic patients. Our results suggests that NGF could be one of the most important modulators of pancreatic β -cell physiology. If NGF secretion is defective, it could affect β -cell function, decreasing insulin secretion and leading to the development of diabetes mellitus.

ÍNDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT	4
ABREVIATURAS MÁS UTILIZADAS	5
I. INTRODUCCIÓN	6
1. ONTOGENIA DEL ISLOTE PANCREÁTICO	7
1.1) Organización estructural del islote pancreático	7
1.2) Desarrollo embrionario del islote pancreático	15
1.3) Mecanismos involucrados en el compromiso de diferenciación pancreática	20
1.4) Desarrollo del islote pancreático	25
2. REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE INSULINA	36
2.1) Síntesis y almacenamiento de insulina	36
A) Transcripción del gene de insulina	37
B) Regulación de la transcripción del RNAm de insulina	42
C) Traducción del RNAm de insulina	45
D) Tránsito postraduccional de la insulina	46
2.2) Regulación del acoplamiento entre el estímulo y la secreción de insulina	50
A) Metabolismo de la glucosa en las células β	51
B) Papel del calcio y las cinasas de proteínas en la regulación de la exocitosis de insulina	55
2.3) Actividad eléctrica de las células β	59
A) Canales de K^+ sensibles a ATP ($K^+(ATP)$)	66
B) Canales de Ca^{2+}	71
C) Canales de Na^+	75
3. EFECTOS DEL FACTOR DE CRECIMIENTO NEURONAL SOBRE LA CÉLULA β PANCREÁTICA	81
3.1) El factor de crecimiento neuronal (NGF)	82

A) Estructura del NGF.....	83
B) Receptores a NGF.	84
3.2) Regulación del fenotipo de las células β por NGF.	90
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	96
III. MATERIAL Y METODOS.....	99
1. MATERIAL.....	99
2. MÉTODOS	100
2.1) Cultivo de células β	100
2.2) Registro electrofisiológico.	101
2.3) RT-PCR para medición de RNAm.....	103
2.4) Inmunocitoquímica.	104
2.5) Detección de secreción de NGF por células β	105
2.6) Bioensayo con células PC12.....	105
2.7) Análisis estadístico.....	106
IV. RESULTADOS	107
1. PAPEL DE LA SÍNTESIS PROTEICA EN EL AUMENTO DE DENSIDAD DE CORRIENTE DE Na^+ DE CÉLULAS β	107
2. PAPEL DE LA TRANSCRIPCIÓN DE RNAm EN EL AUMENTO EN DENSIDAD DE CORRIENTE DE Na^+	111
3. EFECTOS DEL NGF SOBRE LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA DE CÉLULAS β DE RATA.	117
4. PARTICIPACIÓN DE LOS CANALES DE SODIO EN LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA DE CÉLULAS β DE RATA.	123
5. IDENTIFICACIÓN DE UNA FUENTE PANCREÁTICA DE NGF.	127
V. DISCUSIÓN	135
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	150
VII. APÉNDICES	178

RESUMEN

El factor de crecimiento neuronal (NGF) es un regulador importante de la célula β pancreática. El tratamiento durante 5-7 días con este factor induce el crecimiento de neuritas y el aumento en la densidad de corriente de sodio en células β de rata. Estas corrientes de sodio aumentadas presentan características similares a las corrientes de células β testigo, lo que sugiere que el NGF aumenta el número de canales de sodio activables en la membrana de las células tratadas.

En este trabajo se analizaron los mecanismos involucrados en el aumento en densidad de corriente de sodio de células β en respuesta a NGF. Además, se analizó la influencia de la corriente de sodio en la actividad eléctrica de las células β y se identificó una fuente de NGF pancreático, a la que pudieran estar expuestas las células β in vivo.

Nuestros resultados muestran que el aumento en densidad de corriente de sodio en las células β es dependiente de la síntesis de proteínas y RNAm. Además, el NGF induce un aumento cercano a 2 veces en el nivel de RNAm para la subunidad α de canal de sodio tipo III. En conjunto, estos resultados sugieren que el aumento de la densidad de corriente de sodio de las células β en respuesta a NGF, se debe al aumento en la síntesis de canales de sodio.

También demostramos que la corriente de sodio contribuye significativamente durante el disparo de potenciales de acción de células β de rata; ya que a diferencia del ratón, las células β de rata presentan disparos que sobrepasan el nivel de 0mV. Además estos potenciales de acción disparos son sensibles a tetrodotoxina (TTX), tanto los de células testigo como las tratadas con NGF. Sin embargo, las células tratadas son más sensibles a la acción de la toxina, lo que se podría deber a que la corriente de sodio de estas células representa una fracción mayor de la corriente total.

Por último, demostramos que las células β producen y secretan NGF. La secreción de NGF por parte de las células β depende de la concentración extracelular de glucosa y puede ser inducida mediante la despolarización de la membrana plasmática de las células β , de manera similar a la secreción de insulina. Sin embargo, la insulina y el NGF no se encuentran almacenados en los mismos gránulos de secreción, ya que un potenciador de la secreción de insulina, el AMP cíclico, es capaz de inhibir la secreción de NGF en las células β .

La secreción de NGF por parte de las células β sugiere la existencia de mecanismos de regulación autocrina/paracrina en el islote pancreático, ya que el NGF regula la fisiología de las mismas células que lo producen. Además, el NGF pancreáticos también podría tener efectos endocrinos, al alcanzar la circulación sistémica, lo que podría explicar la disminución del NGF circulante en pacientes diabéticos.

Nuestros resultados sugieren que el NGF podría ser uno de los moduladores más importantes de la célula β . La disminución de la secreción de este factor podría llevar a desajustes en la función de la célula β que podrían culminar en la disminución de la secreción de insulina y, con esto, el desarrollo de la diabetes mellitus.

ABSTRACT

Nerve growth factor (NGF) is an important modulator of pancreatic β -cell physiology. Exposure to this factor induces neurite-development in β -cell cultures after 5-7 days. NGF also increases insulin secretion and β -cell sodium current. Since sodium currents from NGF-treated- and control β -cells show similar biophysical traits, the increase in sodium current density could be due to an increase in the number of active sodium channels in β -cell membrane.

In the present study, we characterized the mechanisms involved in the increasing of β -cell sodium current in response to NGF. We also assessed the role played by sodium current in β -cell electrical activity. Finally, we identified a pancreatic source of NGF, to which β -cells could be exposed in vivo.

Our data show that protein and mRNA synthesis is required for NGF to increase β -cell sodium current. Moreover, NGF treatment also increased steady state levels of type III sodium channel α subunit mRNA. Taken together, our observations suggest that NGF increases β -cell sodium current through the increase in the synthesis of β -cell sodium channels.

Sodium current plays an important role in the electrical activity, both from control and NGF-treated rat β -cells. In our recording system, the action potentials from rat β cells show overshooting, as opposed to the action potential of murine β -cells. This trait suggests that sodium currents are participating actively in rat β -cell firing. Moreover, rat β cell electrical activity is sensitive to tetrodotoxin (TTX). The action potentials from NGF-treated cells are more sensitive to this toxin and this could be due to the increased sodium currents in these cells, since sodium current could represent a larger fraction of total depolarizing current in NGF-treated cells than in control ones.

Our results demonstrate that β -cells are capable to synthesize and secrete NGF. NGF is secreted from β cells in a glucose-dependent manner. Moreover, β -cell membrane depolarization also induces NGF secretion. These data suggests that NGF and insulin could be secreted through similar systems of exocytosis. However, these proteins are not stored in the same granules, since an insulin secretion enhancer, cyclic AMP, inhibits β -cell NGF secretion.

Since β cells secrete NGF, it could be proposed an autocrine/paracrine regulation loop in the pancreatic islet. If pancreatic NGF could be secreted to the systemic circulation, it could also have endocrine functions. This endocrine role could be related to the decreases in NGF serum levels observed in diabetic patients.

Our results suggests that NGF could be one of the most important modulators of pancreatic β -cell physiology. If NGF secretion is defective, it could affect β -cell function, decreasing insulin secretion and leading to the development of diabetes mellitus.

ABREVIATURAS MÁS UTILIZADAS

AMPc: Monofosfato cíclico de adenosina (AMP cíclico).

CAM: Molécula de adhesión celular.

dbAMPc: Dibutirato de AMP cíclico.

GABA: Ácido γ -amino butírico.

MAPK: Cinasa de proteínas activada por mitógenos.

NCAM: Molécula de adhesión neuronal.

NGF: Factor de crecimiento neuronal.

PDX1: Pancreatic and Duodenal homeoboX gene-1.

PKA: Cinasa de proteínas A.

PKC: Cinasa de proteínas C.

RT-PCR: Reacción en cadena de polimerasa acoplada a transcripción reversa.

TrkA: Cinasa de tirosinas A (receptor de alta afinidad por NGF).

*"EVERYBODY KNOWS THAT WE LIVE IN A WORLD WHERE
THEY GIVE BAD NAMES TO BEAUTIFUL THINGS
EVERYBODY KNOWS THAT WE LIVE IN A WORLD WHERE
WE DON'T GIVE BEAUTIFUL THINGS A SECOND GLANCE
HEAVEN ONLY KNOWS THAT WE LIVE IN A WORLD WHERE
WHAT WE CALL BEAUTIFUL IS JUST SOMETHING ON SALE".*

MARILLION (*BEAUTIFUL*, 1995)

I. INTRODUCCIÓN

Durante la embriogénesis del mamífero, las células β de los islotes pancreáticos se desarrollan a partir de la capa endodérmica; sin embargo, estas células presentan características consideradas propias de tejidos derivados del neuroectodermo, entre las que destacan: la expresión de moléculas de adhesión neuronal (N-CAM)¹, la capacidad de extender procesos parecidos a neuritas que expresan neurofilamentos² y proteína tau¹ y la expresión del receptor al factor de crecimiento neuronal (NGF)^{3,4}, lo que las hace a los efectos de este factor trófico^{1,3}.

Además de estos marcadores bioquímicos, las células β presentan una actividad eléctrica característica⁵, indispensable para la secreción de insulina⁶. Esta actividad eléctrica depende de la expresión de canales y corrientes iónicas de sodio, calcio y potasio, entre otras. En varios tipos celulares, la expresión de canales iónicos y la preservación de la actividad eléctrica dependen de los efectos de diversos factores de crecimiento⁷. En el caso de las células β , trabajos de nuestro laboratorio han demostrado que el NGF induce un aumento en la densidad de la corriente de sodio sensible a tetrodotoxina⁸.

En este trabajo se estudiarán los mecanismos responsables del aumento en la densidad de corriente de sodio inducido por NGF en células β pancreáticas. Así mismo, se analizará el efecto que pudiera tener este aumento en la actividad eléctrica de las células β , lo cual podría estar relacionado con una potenciación de la secreción de insulina. Estos resultados, en conjunto con otros que han sido obtenidos en nuestro laboratorio, demostrarían que el NGF es un modulador muy importante de la fisiología de las células β . Por esta razón, también se plantea identificar una posible fuente pancreática de NGF, al cual pudieran estar expuestas las células β *in vivo*.

1. ONTOGENIA DEL ISLOTE PANCREÁTICO

1.1) Organización estructural del islote pancreático

El páncreas de los mamíferos es una glándula de función mixta, tanto exocrina como endocrina, compuesta por tres compartimentos celulares: el sistema epitelial ductal, las células acinares y los islotes pancreáticos. El sistema epitelial ductal se encuentra extensamente ramificado y es responsable de conducir y descargar las secreciones de proenzimas digestivas pancreáticas hacia el duodeno. Además, las células del ducto producen y secretan iones bicarbonato, que neutralizan las secreciones ácidas que llegan al duodeno desde el estómago⁹.

Las células exocrinas se encuentran organizadas en acinos, de ahí el nombre de células acinares. En los acinos, cada célula exocrina se encuentra polarizada, de tal forma que los zimógenos de enzimas digestivas son secretados hacia la luz del conducto pancreático. Estos zimógenos viajan por el conducto pancreático hacia el duodeno, donde son activados por el pH bajo que ahí predomina. El incremento en la concentración de iones H^+ induce una proteólisis limitada, que convierte a los zimógenos en proteasas funcionales¹⁰.

La función endocrina es llevada a cabo por los islotes pancreáticos, los cuales se encuentran dispersos entre el tejido acinar (ver figura 1) y son responsables de secretar hormonas involucradas en el metabolismo de carbohidratos, como la insulina y el glucagon, o en la regulación de la exocitosis, como la somatostatina y la amilina. Los islotes están irrigados profusamente por arterias que entran por el centro del islote y se ramifican en estructuras glomerulares. De ahí la sangre pasa a vénulas colectoras, para descargar finalmente en la vena porta, que lleva las hormonas insulares al hígado y al resto del organismo¹¹.

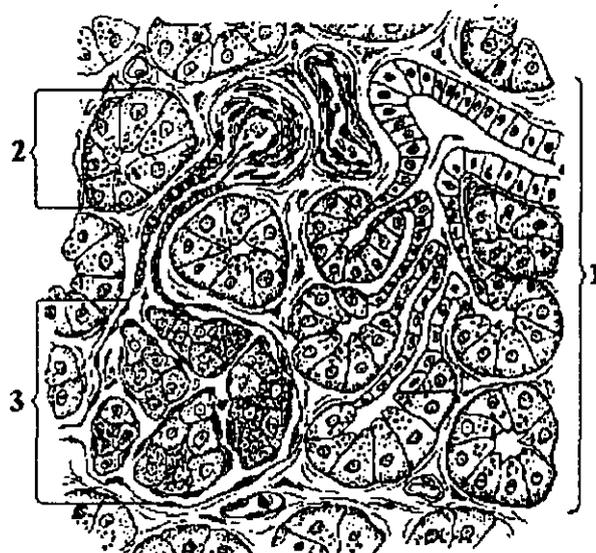


Figura 1. Esquema de organización del tejido pancreático.

El páncreas está organizado en lóbulos (1) que se comunican entre sí a través del conducto pancreático. Estos lóbulos constan de acinos de tejido exocrino (2) y de islotes pancreáticos (3), que se encuentran dispersos entre los acinos y donde se encuentran localizadas las células endocrinas pancreáticas. (Modificado de Yurina, 1985¹⁰)

Las hormonas pancreáticas son sintetizadas y secretadas por tipos celulares distintos. Así, las células α secretan glucagon y se encuentran preferencialmente en la periferia de los islotes y representan alrededor del 10% de las células insulares. El glucagon es una hormona que se secreta en respuesta a una disminución en el nivel sérico de glucosa. El blanco principal del glucagon son los hepatocitos, donde esta hormona induce la

degradación de glucógeno y la activación de la gluconeogénesis, lo que lleva a la producción de glucosa. La glucosa producida así en el hígado, sale por difusión facilitada hacia la sangre, con lo que se recupera el valor normal de glucemia¹².

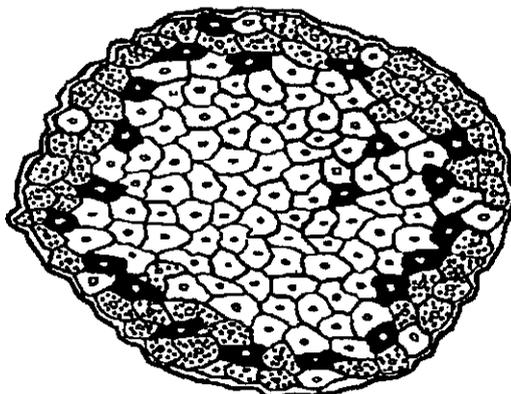
Por su parte, la somatostatina es secretada por las células δ , que constituyen aproximadamente el 8% de las células de los islotes¹³. La somatostatina es una hormona que inhibe la secreción de hormonas proteicas, como la hormona del crecimiento en la hipófisis, por lo que se ha propuesto que podría modular la secreción de insulina y glucagon, al igual que la secreción exocrina pancreática¹⁴.

Las células insulares más escasas son las células PP, que secretan polipéptido pancreático y representan solamente el 3% de las células totales de los islotes. Este tipo celular sólo se encuentra en los islotes localizados en la cabeza del páncreas, que es la región con menor densidad de islotes pancreáticos¹⁵. No se conoce con exactitud el papel biológico del polipéptido pancreático, pero se sabe que induce la secreción gástrica de HCl y podría ser una señal endocrina de saciedad¹⁶.

Las células β representan el 80% de las células en los islotes de rata y por lo general se encuentran en el centro del islote, como se puede ver en la figura 2. Estas células sintetizan y secretan insulina, la principal hormona hipoglucemiante de los mamíferos, ya que induce el ingreso de glucosa a tejidos periféricos como músculo esquelético y tejido adiposo, entre otras acciones.

Además de insulina, las células β sintetizan ácido γ -amino butírico¹⁷ (GABA) y secretan amilina, un polipéptido precursor del depósito amiloide encontrado en los islotes de pacientes afectados por diabetes mellitus tipo II¹⁸. Se ha propuesto que la amilina funciona como un factor insular

antagonista de la insulina, ya que inhibe la secreción de esta hormona e induce resistencia a ella en tejidos periféricos¹⁹.



Célula β ○ insulina
Célula α ● glucagón
Célula δ ● somatostatina

Figura 2. Estructura de los islotes pancreáticos de rata.

En la rata las células β constituyen el 80% de las células insulares y se encuentran localizadas principalmente hacia el centro de los islotes. Las células α y las células delta se encuentran distribuidas en la periferia. Las células PP constituyen apenas el 3% de las células insulares de la rata y no se encuentran presentes en todos los islotes. (Modificado de Orci y Unger¹³)

La organización de las células endocrinas pancreáticas en islotes podría ser importante para modular la producción de las hormonas insulares, mediante interacciones paracrinas entre los distintos tipos celulares, o bien, mediante interacciones célula-célula en el islote pancreático.

La arquitectura de todo tejido depende de adhesiones intercelulares y de adhesiones entre las células y la matriz extracelular que las rodea. En el caso de los islotes pancreáticos, se cree que su organización estructural depende en gran medida de la expresión correcta de la molécula de adhesión celular neuronal (N-CAM).

En ratones carentes (knockout) de N-CAM, la disposición de los distintos tipos celulares del islote es irregular. Por ejemplo, las células α en estos

ratones quedan distribuidas de manera aleatoria en todo el islote, en lugar de ocupar su lugar preferencial en la periferia del mismo²⁰. Además, si se induce el crecimiento de insulinomas en estos ratones carentes de N-CAM, mediante la introducción de un oncogene transgénico controlado por el promotor de insulina (Rip1Tag2), se observa el desarrollo de metástasis diseminadas, mientras que en ratones transgénicos Rip1Tag2 que si expresan N-CAM, los insulinomas quedan restringidos al tejido pancreático²¹.

Sin embargo, la carencia de N-CAM no impide la formación de los islotes durante el desarrollo, lo que implica que existen otras moléculas de adhesión involucradas en la formación de los islotes. Algunas de estas moléculas han sido identificadas, como la molécula de adhesión epitelial (Ep-CAM), responsable de adhesiones intercelulares independientes de calcio²² y las cadherinas E y N, que forman adhesiones intercelulares dependientes de calcio²³.

Se ha encontrado un nivel elevado de expresión de Ep-CAM en células epiteliales de los ductos de primordios pancreáticos fetales, que es un compartimento celular de cual se cree provienen los progenitores de las células insulares (ver la siguiente sección). Estas células con niveles de expresión altos, tienden a formar acúmulos parecidos a islotes; sin embargo, en los islotes de adulto la expresión de Ep-CAM se revierte, siendo más baja en los islotes que en el epitelio del ducto pancreático, lo que podría implicar que Ep-CAM es necesaria para la formación del islote, mas no para mantener la estructura de un islote ya formado.

De hecho, la diferenciación de células epiteliales del ducto hacia células insulares está acompañada por una disminución en la expresión de Ep-CAM; incluso, el bloqueo de la función de Ep-CAM con un anticuerpo

inactivante en acúmulos pancreáticos induce la transcripción y traducción de los genes de insulina y glucagon²².

La adhesión celular dependiente de calcio, a través de cadherinas, también es muy importante para la formación del islote, sobre todo para la agregación de las células β , ya que en ratones transgénicos que expresan cadherina E defectuosa, las células β no se localizan en islotes pancreáticos, sino dispersas entre el tejido acinar como células individuales; mientras que las células α de estos ratones se agregan selectivamente en estructuras parecidas a islotes²³, lo que sugiere que la cadherina E regula las propiedades de adhesividad de las células β y la agregación correcta de las células insulares.

Además de las interacciones intercelulares, se ha propuesto que la interacción de las células insulares con la matriz extracelular es necesaria para la formación de los islotes y para mantener la función de las células insulares, ya que las células de islotes de rata cultivadas sobre colagenasa I forman agregados celulares parecidos a islotes, además de que en las células insulares cultivadas sobre matriz extracelular se preserva mejor su función y supervivencia. Esta interacción con la matriz extracelular también es necesaria para mantener la adhesión de las células insulares a la cápsula de tejido conectivo que rodea al islote²⁴.

La interacción célula-matriz extracelular depende principalmente de las integrinas, proteínas diméricas integrales de membrana que funcionan como receptores a componentes de la matriz extracelular. En islotes pancreáticos, el 50% de los dímeros de integrinas está representado por el dímero alfa 3, beta 1. Anticuerpos específicos contra la subunidad beta 1 inhiben el anclaje y el crecimiento de las células insulares de rata sobre matriz extracelular depositada por fibroblastos bovinos o por la línea murina A-431, lo que sugiere que esta subunidad es la responsable de

conectar la matriz extracelular a la maquinaria intracelular de las células insulares²⁴.

Como se puede ver en la figura 3, las células del islote pancreático no sólo están unidas unas a otras a través de moléculas de adhesión, también existe interacción entre ellas a través de uniones celulares comunicantes (uniones hendidas o gap), que se cree son importantes para la secreción de insulina, al sincronizar las fluctuaciones en los niveles de calcio intracelular entre las células β de un islote²⁵.

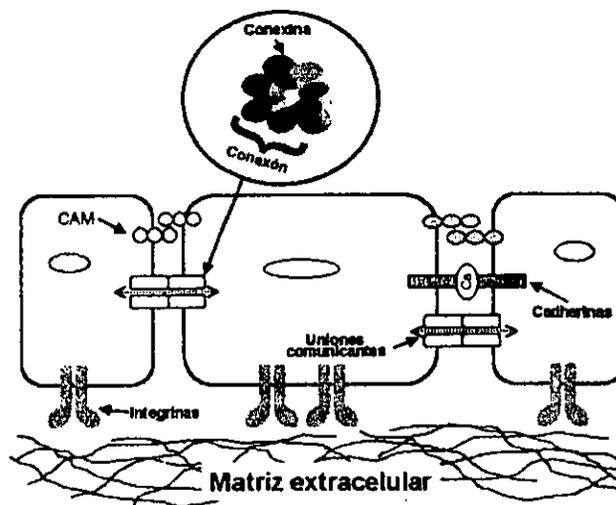


Figura 3. Interacciones intercelulares en la célula β .

Esta figura esquematiza las distintas moléculas de adhesión celular (CAMs, cadherinas, integrinas) que son responsables de mantener la arquitectura del islotes pancreático. En el recuadro se observa la organización de las uniones comunicantes en conexones, los cuales son importantes para la secreción adecuada de insulina (ver texto).

Las uniones comunicantes están formadas por proteínas transmembranales llamadas conexinas. Las conexinas se disponen en hexámeros en las membranas de dos células vecinas; cada célula procesa su propio hexámero, que al unirse al hexámero de la célula vecinas forma un canal de unión comunicante. En los islotes pancreáticos se han identificado al menos 6 transcritos distintos de genes que codifican para

conexinas; pero sólo se ha comprobado la expresión de dos productos proteicos de estos genes, la conexina alfa 1 (también llamada Cx43) y la conexina alfa 6²⁶ (Cx45).

La expresión de la conexina Cx43 contribuye al acoplamiento eléctrico entre las células β y a la producción correcta de insulina; ya que diferentes líneas celulares que secretan insulina de manera anormal (secreción continua, insensibilidad a glucosa, secreción pobre, etc.) no expresan la conexina Cx43 y tampoco están acopladas. Si estas células son transfectadas con cDNA que codifique para esta conexina, de forma que expresen cantidades bajas de Cx43, pero suficientes para observar acoplamiento, aumenta de manera importante la expresión del gene de insulina y el contenido intracelular de esta hormona.

Sin embargo, si se sobreexpresa Cx43, la cantidad de insulina se mantiene disminuida, lo que indica que existen niveles de expresión de la conexina Cx43 y de acoplamiento óptimos para una producción y almacenamiento de insulina adecuados²⁷.

Las uniones comunicantes no sólo existen entre células β , ya que también existen algunas que comunican a estas células con las células α . La interacción de las células endocrinas a través de estas uniones podría ser necesaria para el desarrollo correcto del islote, ya que el patrón de formación de uniones comunicantes durante el desarrollo, es diferente entre las células endocrinas y las células exocrinas ²⁸.

De hecho las uniones comunicantes entre las células acinares, que rodean al islote pancreático, son distintas a las uniones entre células endocrinas; inclusive, no existen uniones comunicantes entre las células exocrinas y endocrinas. Esto se debe a que las células acinares expresan las conexinas Cx26 y Cx32, las cuales no pueden formar conexiones con la conexina

Cx43, que se expresa en las células del islote. Este patrón de expresión de los genes de conexinas, y por lo tanto la falta de esta comunicación estrecha entre las células exocrinas y endocrinas, podría ser responsable de una regulación diferenciada de ambos tipos de secreciones, como se ha observado para algunos secretagogos²⁹.

1.2) Desarrollo embrionario del islote pancreático

El páncreas se forma en el embrión a partir de dos yemas primordiales, una ventral y otra dorsal, que geman desde el epitelio duodenal³⁰. La yema dorsal gema directamente desde la pared duodenal y su aparición antecede a la de la yema ventral, la cual puede ser considerada como una rama independiente de la yema hepática³¹. Conforme avanza el desarrollo, las dos yemas se fusionan para formar el páncreas maduro, y durante esta fusión, normalmente se pierde la conexión entre el duodeno y la yema dorsal, por lo que la comunicación entre el páncreas y el intestino delgado se queda en la yema ventral, a través del conducto biliar común³².

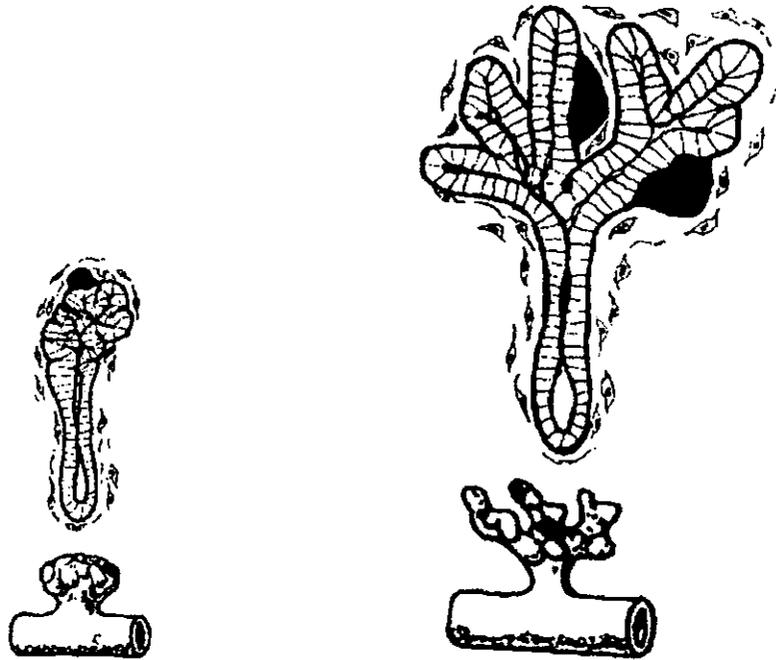
La yema pancreática ventral origina también la cabeza del páncreas, mientras que la yema pancreática dorsal da lugar al cuerpo y a la cola del páncreas, que constituyen la mayor parte de la masa pancreática y donde existe una densidad mayor de islotes pancreáticos¹⁵.

En la rata, los primeros signos de organogénesis pancreática se observan en el día 11 de gestación (estadio de 20 somitas), cuando el mesénquima dorsal se condensa por encima del endodermo intestinal e induce que este se evagine para formar la yema pancreática dorsal (ver figura 4). Esta yema está formada por una monocapa de células epiteliales, cuyos ápices forman un lumen estrecho³¹.



A) Cuando el embrión tiene 10 días de gestación (menos de 20 somitas), las células que originarán la yema pancreática dorsal son indistinguibles del resto de la monocapa celular del epitelio intestinal.

B) Cuando el embrión presenta 20 somitas, el primordio pancreático comienza a gemar desde el epitelio intestinal anterior. Las células endocrinas (en negro) se encuentran dispersas entre el tejido acinar.



C) Con el paso del tiempo, la yema pancreática aumenta de tamaño. Como el aumento en el número de células es mayor al crecimiento en volumen, el primordio se segmenta. Las células endocrinas comienzan a ser excluidas del tejido acinar.

D) El crecimiento del primordio pancreático hacia el mesénquima da lugar a la estructura característica de interdigitaciones de los ductos pancreáticos. Las células endocrinas comienzan a formar acúmulos, que aumentarán de tamaño y originarán los islotes.

Figura 4. Desarrollo embrionario del páncreas.

En esta figura se esquematiza el desarrollo embrionario del páncreas de la rata, entre el día 10 de gestación, cuando el embrión presenta menos de 20 somitas, y el día 15 de gestación, cuando el embrión presenta de 28 a 30 somitas. (Modificada de Pictet y Rutter³¹)

La yema dorsal aumenta de tamaño conforme avanza el tiempo. Este aumento se debe tanto al aumento en el número de células, como al aumento del tamaño de éstas. Las células mesenquimales que rodean a la yema dorsal, principalmente las de la notocorda, parecen proporcionar señales indispensables para el desarrollo del páncreas³¹.

Hacia el estadio de 24 somitas se nota una constricción en las yema pancreática, que la separa en dos lóbulos: uno anterior y otro posterior. Conforme avanza el tiempo estos lóbulos crecen, debido principalmente al aumento en el número celular y a la aparición de los primeros islotes, lo que hace que la superficie de los lóbulos se vuelva cada vez más irregular. El crecimiento de los lóbulos se ve acompañado por la ramificación del lumen del ducto pancreático, el cual es poco visible al principio, dado que existe un gran número de células epiteliales en un espacio muy reducido.

En los días siguientes, los lóbulos de las yemas pancreáticas crecen y se expanden entre el mesénquima, con lo que el lumen del ducto se ensancha y para el día 15 de gestación ya es totalmente evidente, y alcanza su mayor tamaño entre los días 16 y 17 de gestación. El aumento de tamaño de las yemas pancreáticas también las acerca lo suficiente como para fusionarse en el momento en que el lumen del ducto se ensancha. La fusión de las yemas pancreáticas y la aparición del lumen del ducto marca el fin de la organogénesis pancreática³¹.

El desarrollo de la estructura del tejido acinar se ve acompañado por la diferenciación de las células exocrinas. Desde el día 13 de gestación es posible identificar la expresión de RNAm para carboxipeptidasa, mientras que el RNAm para amilasa se puede detectar desde el día 14; sin embargo, las primeras células que contienen gránulos de zimógeno no se detectan sino hasta el día 15-16 de gestación, cuando la producción de enzimas pancreáticas aumenta exponencialmente³³.

El momento preciso de la aparición de las células endocrinas pancreáticas ha sido debatido durante largo tiempo, ya que dependiendo de la técnica que se utilice para determinar la expresión de marcadores endocrinos, se han propuesto dos patrones temporales distintos para la aparición de cada uno de los tipos celulares.

Al utilizar anticuerpos contra hormonas insulares³⁴ o hibridación *in situ*³³, se observa que la primera hormona en ser expresada es el glucagon el cual se expresa entre 0.5 y 1 día después de la evaginación de la yema pancreática dorsal. La expresión de insulina se puede detectar un día después de la de glucagon; mientras que la expresión de somatostatina se detecta hasta el día 16 de gestación, inclusive, la expresión de enzimas exocrinas pancreáticas antecede a la expresión de somatostatina. La última hormona en ser detectada con estos métodos es el polipéptido pancreático, el cual es posible detectarlo sólo hasta el nacimiento.

Sin embargo, si se combina la técnica de microdissección con la amplificación de reacción de polimerasa en cadena acoplada a transcripción reversa (RT-PCR), se ha encontrado que la primera hormona pancreática en ser expresada es la somatostatina, la cual se expresa a lo largo de todo el epitelio intestinal anterior desde el estadio de 8 somitas en el embrión de ratón³⁵ (7.5 días de gestación). La localización de esta hormona a lo largo de todo el epitelio anterior concuerda con la presencia de células endocrinas secretoras de somatostatina en el intestino del animal adulto³⁶.

Este mismo estudio demuestra que la transcripción de los RNAm de glucagon e insulina inicia simultáneamente a partir del estadio de 20 somitas del embrión de ratón (8.5-9 días de gestación); es decir de 10 a 12 horas antes que suceda la condensación del mesénquima que marca el inicio de la gemación de la yema pancreática dorsal, cuando el embrión

cuenta ya con 25 somitas. La localización de los transcritos para glucagon e insulina está restringida a la pared dorsal del duodeno, en la zona que dará lugar precisamente al primordio pancreático. Esta expresión temprana implicaría que existe un compromiso hacia la diferenciación de células endocrinas previo a la morfogénesis pancreática.

La transcripción del gene para polipéptido pancreático se puede detectar por RT-PCR desde el estadio de 30 somitas, es decir entre 8 y 10 horas después de gemación de la yema pancreática dorsal, es decir, 11 días antes que sea posible detectar esta hormona como proteína³⁴. Las diferencias entre estos estudios podrían deberse a la sensibilidad de los métodos utilizados, ya que se ha estimado que la sensibilidad de la amplificación por RT-PCR es 10^8 veces más sensible que los ensayos para proteínas³⁵.

Dado que existe un compromiso de diferenciación celular endocrina previo a la organogénesis pancreática, restringido a una zona del epitelio duodenal, se puede pensar que no cualquier región del intestino embrionario puede dar origen a la yema pancreática. Inclusive, si se cultivan *in vitro* regiones posteriores del epitelio intestinal alejadas de la zona que forma el primordio pancreático, no se puede inducir la expresión de genes marcadores de diferenciación pancreática³⁷.

No se conocen exactamente los genes involucrados en la adopción del compromiso de diferenciación pancreática, pero se sabe que en el embrión de pollo desde el estadio de 13 somitas (día 1 de gestación), la región del epitelio que da lugar a la yema dorsal es capaz de responder a señales de diferenciación emitidas por la notocorda, mientras que zonas posteriores en el epitelio fuera de lo que será el primordio pancreático no responden a estas señales³⁷.

1.3) Mecanismos involucrados en el compromiso de diferenciación pancreática

Se sabe desde hace mucho tiempo, que las interacciones entre el mesénquima y el epitelio son importantes para inducir la diferenciación y morfogénesis pancreática³⁸. En particular, se sabe que es necesaria la interacción del epitelio que da origen a la yema pancreática dorsal con el mesénquima de la notocorda, que es una estructura involucrada en determinar patrones de desarrollo de varios órganos, como el sistema nervioso, en varias especies, desde insectos hasta mamíferos.

La interacción epitelio-mesénquima durante el desarrollo del páncreas parece llevarse a cabo en dos fases: la primera, cuando una parte del epitelio duodenal se compromete a desarrollarse como páncreas, y la segunda, cuando las yemas pancreáticas crecen y desarrollan los conductos pancreáticos, dando lugar a la diferenciación de las células acinares.

La dependencia del desarrollo pancreático en la interacción con el mesénquima se comprueba al analizar experimentos de microdissección, en donde se disecta epitelio pancreático de embriones de ratón de 11.5 días de gestación, se le separa del mesénquima notocordal, y se cultiva bajo distintas condiciones³⁹.

Si el epitelio se cultiva solamente sobre cajas de petri con un medio suplementado con suero, no es posible observar diferenciación celular ni morfogénesis. En cambio, si el epitelio intestinal se cultiva sobre matriz extracelular de membrana basal, es posible observar la formación de estructuras parecidas a ductos pancreáticos, con células que expresan marcadores de células ductales, como la citoqueratina 7. Este papel de inductor de diferenciación de la membrana basal parece depender en gran medida de laminina, uno de los componentes de matriz extracelular⁴⁰.

De manera sorprendente, si el epitelio primordial pancreático es transplantado bajo la cápsula renal de un ratón singénico, se observa el desarrollo de islotes pancreáticos, organizados como islotes maduros, con células α en la periferia y células β en el centro. Esto implica que el epitelio primordial pancreático está programado para diferenciarse hacia islotes de manera automática (default) ya que el desarrollo de los islotes no depende de la interacción con el mesénquima, sino, tal vez, de otras señales como factores difusibles, o bien patrones estructurales de la matriz extracelular o de la capacidad de neovascularización que ofrezca el medio que rodea al epitelio pancreático³⁹.

En este modelo experimental, en la única condición que fue posible observar el desarrollo de tejido acinar, fue al recombinar el epitelio primordial pancreático con el mesénquima de la notocorda, tanto *in vitro* como en transplantes a cápsula renal. Esto implica que el mesénquima es capaz de enviar mensajes hacia el epitelio para determinar su destino de diferenciación. Estos factores mesenquimales necesarios para el desarrollo pancreático no son bien conocidos, pero podrían ser tanto proteínas solubles, como mensajes estructurales, grabados en la matriz extracelular que rodea al epitelio pancreático³⁹.

Algunas de las moléculas que se han implicado como mensajeros entre la notocorda y el epitelio primordial son la activina- β B y algunos miembros de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)⁴¹, los cuales regulan la expresión de algunos genes en el epitelio primordial pancreático, en particular reprimen la expresión del gene *sonic hedgehog* (*shh*), un gene involucrado en la creación de patrones morfogénicos en *Drosophila* y ratón.

El gene *shh* codifica para una proteína de secreción que se une a un receptor de membrana llamado Patched (codificado por el gene *ptc*), con lo

cual induce la transcripción de genes específicos durante el desarrollo embrionario⁴². El gene *shh* no se expresa, de manera inesperada, en el epitelio primordial pancreático, pese a que en regiones del epitelio duodenal rostrales o caudales al páncreas, la expresión de este gene es uniforme⁴³.

Si se induce la expresión de *shh* en el páncreas en etapas tardías del desarrollo, se observan células que expresan insulina, glucagon y amilasa pancreática, pero no se observan islotes ni acinos, inclusive la región del abdomen que debería estar ocupada por el páncreas se encuentra ocupada por una estructura parecida a intestino, con capas musculares lisas rodeándola, lo que implica que la expresión ectópica de *shh* permite la diferenciación de células endocrinas y exocrinas, pero evita una morfogénesis adecuada⁴⁴.

La interacción del epitelio pancreático con la notocorda es necesaria para reprimir la expresión de *shh*, ya que al retirar la notocorda localizada sobre el epitelio que dará lugar al páncreas, se induce la expresión de *shh* y se detiene la transición de la morfología del epitelio intestinal hacia epitelio pancreático⁴¹. Esto implica que la notocorda sintetiza una señal que reprime la expresión de *shh*, lo que se considera uno de los primeros eventos relacionados con el desarrollo del páncreas.

Inclusive, si se bloquea *in vitro* la función de la proteína SHH en cultivos de endodermo pancreático, con anticuerpos inactivantes, se induce la expresión de genes marcadores de desarrollo pancreático, como la insulina y el gene homeótico *pdx1*, el cual es indispensable para el desarrollo del páncreas y la parte posterior del duodeno⁴¹ (ver más adelante). Aún más, si se cultiva epitelio estomacal en presencia de ciclopamina, que es un fármaco inhibidor de la señalización por SHH, se puede inducir la expresión de glucagon e insulina en este epitelio.

Además, si la ciclopamina se administra a embriones de pollo se puede observar el desarrollo de múltiples yemas pancreáticas que expresan insulina y carboxipeptidasa A, tanto en regiones rostrales a la localización normal de la yema pancreática dorsal (estómago), como en regiones intestinales más caudales a ella⁴⁵. Estos experimentos demuestran que la represión de *shh* es necesaria para la formación correcta del páncreas.

Como se dijo con anterioridad, la notocorda debe ser capaz de sintetizar señales que repriman la expresión de *shh*, y se han propuesto al menos dos factores tróficos como candidatos al papel de represor de *shh in vivo*, la activina- β B y el FGF. La activina- β B es una proteína que pertenece a la familia del factor de crecimiento transformante β (TGF β), mientras que los FGF forman una familia de factores de crecimiento, constituida por al menos 18 polipéptidos. Estos factores tróficos son capaces de reprimir la expresión de *shh in vitro*⁴¹ e *in vivo*⁴⁶, y son expresados por la notocorda durante las etapas en las que se desarrolla el páncreas⁴⁷.

Si se cultiva epitelio primordial pancreático en presencia de activina- β B o de concentraciones bajas de FGF2 (1 ng/ml), se observa la represión de la expresión de *shh* y la inducción de la expresión de *pdx1* e insulina⁴¹, que son dos marcadores inequívocos de diferenciación pancreática. Además, una vez que se separa la notocorda del primordio pancreático, por la fusión dorsal de la aorta, la expresión de activina se mantiene en la yema pancreática y parece ser necesaria para la diferenciación del tejido endocrino pancreático, ya que en ratones transgénicos que expresan un receptor a activina no funcional se observa hipoplasia insular y una disminución en el contenido de insulina en el páncreas⁴⁸.

Todos estos datos en conjunto sugieren que estos factores tróficos podrían jugar un papel importante durante el desarrollo pancreático, pero hasta la fecha no se ha podido demostrar esta función *in vivo*, dado que en ratones

a los que se les deletó (knockout) el gene de activina- β B, el páncreas se desarrolla de manera normal. El papel del FGF2 es todavía más difícil de analizar, ya que no se han podido crear ratones que carezcan de FGF2, ya sea porque la delección sea letal o porque algún otro miembro de la familia de FGF suplante la función de este factor trófico⁴⁹.

Sin embargo, en ratones transgénicos en los que se inactivó la función de un subtipo de receptor a FGF, el receptor FGFR2b, se observan malformaciones y reducción del número de acinos en los páncreas. La inactivación *in vitro* de este receptor, con anticuerpos neutralizantes y con oligonucleótidos antisentido, inhibe la proliferación y la diferenciación de tejido exocrino en epitelio pancreático libre de mesénquima; mientras que el tratamiento con FGF1, 7 ó 10, que son agonistas de FGR2b y que son expresados en el primordio pancreático desde etapas tempranas del desarrollo, aumenta la expresión de amilasa, un marcador de diferenciación exocrina. Esto sugiere que algunos miembros de la familia del FGF funcionan como las señales del mesénquima que inducen la diferenciación del tejido acinar pancreático⁵⁰.

Como se dijo anteriormente, uno de los marcadores de diferenciación pancreática es la expresión del gene homeótico *pdx1* (Pancreatic and Duodenal homeobox gene-1). Este gene se expresa, durante el desarrollo, en el epitelio intestinal que origina el duodeno (en particular en la región pilórica), las yemas pancreáticas y el conducto biliar común⁵¹, mientras que en el animal adulto su expresión queda restringida al epitelio duodenal y a las células β del islote pancreático. Se propone que el producto de Pdx1 funciona como un factor de transcripción que regula la expresión de los genes de insulina⁵² y somatostatina⁵³.

De hecho, el desarrollo de un páncreas maduro depende de la expresión correcta de este gene homeótico, ya que si se deleta este gene en ratones

transgénicos, no se desarrolla el páncreas⁵⁴ y se presenta un desarrollo anormal del tercio distal del duodeno⁵¹. En humanos, la delección de un solo nucleótido en la secuencia de *pdx1* tiene como resultado el nacimiento de pacientes con agénesis pancreática⁵⁵, de forma similar a la observada en los ratones transgénicos.

En un principio, se consideró que la falta de *pdx1* inhibía completamente el desarrollo pancreático; sin embargo, un análisis más detallado demostró que en los ratones *pdx1*^{-/-} se alcanzan a desarrollar las yemas pancreáticas. La yema dorsal alcanza a ramificarse para formar una estructura epitelial pequeña, mientras que la yema ventral desaparece con el tiempo. Además, es posible observar en la yema dorsal células que expresan glucagon, pero no se encuentran células que expresen insulina o amilasa pancreática⁵¹.

El desarrollo del páncreas en los ratones *pdx1*^{-/-} se detiene por la falta de crecimiento y proliferación de las células pancreáticas, lo que impide una ramificación mayor del páncreas y una morfogénesis adecuada. Esto sugiere que el gene *pdx1* está implicado en la manutención del compromiso de diferenciación pancreática, pero que deben existir otros mecanismos involucrados en la adquisición de este compromiso, los cuales, como ya se dijo, pudieran estar controlados por el producto del gene *shh*.

1.4) Desarrollo del islote pancreático.

Las células precursoras del islote pancreático son observadas por primera vez desde el estadio de 20-22 somitas (día 11). Este es el primer momento en que las células dispersas en la yema pancreática dorsal, muestran los gránulos de secreción característicos de las células endocrinas pancreáticas, al ser teñidas con azul de metileno³¹. Las células endocrinas primordiales aparecen dispersas entre el tejido de la yema pancreática

dorsal, y aumentan de número entre los estadios de 20 a 30 somitas; sin embargo, el número de células endocrinas no aumenta por división celular; y es muy difícil encontrar figuras mitóticas en estas células²³.

Entre los estadios de 28 y 30 somitas, las células endocrinas se empiezan a encontrar formando pequeños islotes de pocas células. Estas estructuras son excluidas del tejido de la yema pancreática y se recluyen entre el tejido de la matriz de la yema y su lámina basal. La exclusión del tejido endocrino parece deberse a un cambio en el patrón de citocinesis; ya que las células que rodean a los islotes se dividen perpendicularmente al eje del lumen pancreático, al contrario del resto de las células acinares, cuyo eje de división es paralelo al eje del lumen.

Cuando el embrión llega al día 12 de gestación y presenta entre 35 y 40 somitas, la mayoría de las células endocrinas se encuentran en islotes de hasta 12 células. En estos islotes, con el tiempo, aumentará el número celular, pero es probable que este aumento no se deba a la división de las células del islote; ya que es muy difícil encontrar figuras mitóticas entre estas células, cuyos núcleos casi no incorporan timidina tritiada³¹.

Hacia el día 15 de gestación, los islotes forman grupos celulares unidos a uno o más acinos. Varios islotes pequeños se van uniendo para formar islotes cada vez más grandes que, al menos bajo el microscopio de luz, son indistinguibles del tejido acinar, debido a que se mantiene una relación muy estrecha entre los distintos tipos celulares del páncreas. Sólo hasta etapas tardías del desarrollo del feto de rata (20-21 días), se pueden encontrar islotes que no mantienen ningún tipo de unión con el tejido exocrino, y que aparecen con la típica morfología redonda, casi libres del tejido exocrino.

El origen embrionario de las células del islote pancreático ha sido motivo de controversia durante largo tiempo. Debido a que las células insulares, en particular las células β , comparten varias características con células derivadas de la cresta neural, Pearse⁵⁶ propuso que estas células y el resto de las células endocrinas del tracto digestivo compartían un origen común con las neuronas, y formaban un sistema neuroendocrino difuso, caracterizado por la capacidad de las células de incorporar y descarboxilar precursores de aminas⁵⁷ (fenotipo APUD).

Esta hipótesis se vio apoyada por experimentos con ratones transgénicos, a los cuales se les transfectaba el antígeno T grande del virus SV40, un oncogene que dirige la proliferación de las células que lo expresan, acoplado a la región promotora del gene de insulina. En este modelo, se encontró que el transgene solamente se expresaba en la cresta neural y en células insulares, lo que parecía comprobar el origen neuroectodérmico de las células β ⁵⁸.

Sin embargo, un análisis más detallado de la expresión del antígeno T en estos ratones demostró que este oncogene no siempre se expresaba de manera simultánea a la insulina, ya que podía expresarse en células que expresaran otras hormonas pancreáticas, como glucagon^{59,60}. Esto implicaba que la regulación de la expresión de un gene por el promotor de la insulina podía deberse a factores no específicos de amplia distribución en el embrión. Además, en experimentos realizados con quimeras de embriones, en los cuales se transplanta el ectodermo del embrión de una especie hacia el mesodermo y endodermo del embrión de otra, se encontró que las células insulares mantienen el fenotipo del embrión donador del mesodermo y del endodermo, y no el fenotipo del embrión donador de la cresta neural^{61,62}.

Inclusive, si se reseca el ectodermo de embriones de rata antes de la migración de las células de la cresta neural y se cultiva el mesoendodermo restante, se puede observar el desarrollo de islotes pancreáticos en ausencia del ectodermo⁶³. Estos experimentos desechan, en principio, la idea de un origen neuroectodérmico de las células del islote pancreático; sin embargo, en ellos no se pudo descartar una migración neural anterior al momento de la manipulación quirúrgica, debido a que las técnicas de microdissección y cultivo de embriones no estaban completamente refinadas⁶⁴. Experimentos más recientes, que se discuten más adelante, apoyan la teoría de un origen endodérmico común para todos los tipos celulares pancreáticos, tanto células insulares como acinares y ductales.

El hecho que las células β compartan algunas características con las neuronas como la expresión de receptores a factor de crecimiento neuronal⁴ (NGF), la síntesis de ácido gamma-aminobutírico¹⁷ (GABA), la expresión de canales de sodio sensibles a voltaje⁶⁵ y de proteínas de neurofilamentos², puede deberse a la existencia de factores de regulación de la transcripción génica cuya distribución no esté restringida por el patrón de desarrollo embrionario, sino por la conservación de funciones comunes en estas células.

Entre estos reguladores de transcripción comunes entre neuronas y células β encontramos los activadores de transcripción Islet-1⁶⁶, Pax-6⁶⁷ y Beta2⁶⁸. Además, las células β , al igual que las neuronas, no expresan el factor de represión de transcripción llamado factor silenciador de restricción neuronal/ factor silenciador de transcripción del elemento represor (NRSF/REST), que impide la expresión de genes característicos de neuronas en células no neuronales⁶⁹. La falta de este factor silenciador permite que las células β expresen genes que se creían propios de neuronas⁷⁰, que podrían estar involucrados en el desarrollo del islote

pancreático o bien, que podrían cumplir funciones comunes de regulación de exocitosis.

En la actualidad se propone un origen endodérmico para las células pancreáticas y la existencia de una célula precursora común para las células insulares, acinares y ductales. Esta célula progenitora (stem) debería expresar, durante algunas etapas del desarrollo, características mixtas de los tres tipos celulares pancreáticos; sin embargo, hasta la fecha no han sido identificadas ni caracterizadas las células progenitoras pluripotenciales del páncreas⁹.

La existencia de una célula que pueda expresar características mixtas de diferenciación exocrina y endocrina, y que pudiera funcionar como progenitora, se propuso desde 1972; cuando se observaron células pancreáticas que contenían gránulos de zimógeno y al menos un tipo de gránulo endocrino, en pacientes con neoplasias de tejido acinar, o bien en casos graves de diabetes mellitus tipo I, en donde el páncreas se ve expuesto a una agresión autoinmune. Sin embargo, estas células mixtas no se lograron observar en tejido pancreático sano; además, estos estudios no identificaron a nivel molecular el contenido de los gránulos de secreción, lo que es necesario para determinar la expresión de marcadores específicos de diferenciación celular³¹.

Estudios posteriores realizados en una línea celular (AR42J) derivada de un carcinoma acinar, demostraron la existencia de células que pueden expresar marcadores de diferenciación exocrina (amilasa) y endocrina (insulina) simultáneamente. Además, al analizar la regeneración del tejido pancreático adulto posterior a eventos dañinos, como pancreotomía⁷¹, ligación del ducto pancreático⁷² o recubrimiento del páncreas con celofán⁷³, se han observado células ductales que expresan marcadores de

diferenciación exocrina y endocrina, a partir de las cuales se regenera el tejido pancreático.

Estas observaciones llevaron a proponer que las células del ducto pancreático eran las células progenitoras de los tres tipos celulares pancreáticos. Esta hipótesis se apoyó también en la extraordinaria plasticidad de las células ductulares, quienes pueden, incluso, transdiferenciarse hacia hepatocitos en animales sometidos a una dieta baja en cobre⁷⁴.

Sin embargo, estudios más recientes parecen descartar esta hipótesis, ya que el primordio pancreático puede dar lugar a los tres tipos celulares por separado e indistintamente, dependiendo de las condiciones en que sea cultivado, como se mencionó en la sección anterior. Esto implica la existencia de células progenitoras capaces de originar los tres tipos celulares pancreáticos, y por lo tanto, capaces de expresar, bajo condiciones específicas, marcadores de diferenciación mixta. Estas células progenitoras no se han logrado aislar ni caracterizar, aunque se ha logrado identificar las condiciones que permiten el desarrollo de cada uno de los tipos celulares pancreáticos, y se han establecido algunas de las características que deberían presentar estas células progenitoras.

Como se dijo anteriormente, el desarrollo de islotes a partir del epitelio primordial pancreático parece estar relacionado a la capacidad del medio ambiente extracelular de proveer de vascularización y de algunos factores solubles que no se han identificado en su totalidad³⁹. Estos factores podrían ser específicos para determinar la diferenciación de las células progenitoras hacia células β , ya que la diferenciación hacia células alfa podría seguir un patrón automático (default), común al patrón de diferenciación de otras células endocrinas del tracto digestivo que secretan glucagon o derivados del gene de glucagon, como la oxintomodulina⁵¹.

La existencia de este patrón endocrino común del tracto digestivo se propuso a partir de estudiar el desarrollo de los embriones de los ratones transgénicos *pdx1^{-/-}*, en los cuales, de los tipos celulares pancreáticos, solamente se desarrollan las células alfa, tanto en la región duodenal donde debería de existir el páncreas como en otras regiones del intestino más alejadas.

Las células que iniciaron su diferenciación siguiendo este patrón común endocrino podrían ser precursoras tanto de las células alfa, como de las β ; ya que se han observado células que coexpresan glucagon e insulina durante el desarrollo del islote pancreático en rata⁷⁵ y humano⁷⁶. Incluso, se han observado células que coexpresan insulina y somatostatina o polipéptido pancreático. Estos resultados coinciden con las observaciones realizadas en ratones transgénicos que expresan el antígeno T grande de SV40 bajo el control del promotor de insulina, ya que este oncogene se expresa tanto en células β como en células alfa pancreáticas⁶⁰.

Con base en estos datos, se ha propuesto que las células insulares pertenecen a un mismo linaje celular precursor, y que durante la diferenciación, por influencia del medio extracelular, se va restringiendo la expresión génica hacia los genes específicos del fenotipo maduro⁶⁰. Observaciones que apoyan esta hipótesis se han realizado al estudiar insulinomas de rata en cultivo.

Estos insulinomas (línea RIN) fueron inducidos por la exposición de animales a rayos X y fueron caracterizados como insulinomas transplantables a peritoneo, que producían en los animales una hipoglucemia grave acompañada por hiperinsulinemia⁷⁷. Algunos de los trasplantes del insulinoma original produjeron metástasis a hígado, de donde se obtuvo un nuevo cultivo (línea MSL). Esta nueva línea celular

expresa glucagon, polipéptido pancreático y amilina, pero en ella no se detecta la expresión de insulina.

Además, si se retransplanta esta línea en ratas, induce una pérdida de peso importante acompañada por anorexia, sin datos de hiperinsulinemia, lo que corresponde con los signos clínicos de un glucagonoma. Estos resultados implican que se puede obtener un tumor productor de glucagon a partir de un tumor productor de insulina⁷⁸. Se propone que este cambio fenotípico se debe a la pérdida de factores de transcripción implicados en la regulación de la transcripción del gene de insulina, ya que el fenotipo de insulinoma se ve acompañado por la expresión de *pdx1*, mientras que el glucagonoma no expresa este gene⁷⁹.

Esta última observación coincide con lo que pasa en el islote pancreático maduro, donde la expresión de *pdx1* está restringida a las células β , ya que no se expresa en células alfa⁸⁰. Esto sugiere que durante la maduración de las células alfa, se inactiva el gene *pdx1* en el progenitor común de las células insulares. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, estas células sí alcanzan a desarrollarse en los ratones *pdx1*^{-/-}, aunque no se ha descartado que las células que expresan glucagon en estos animales pertenezcan al linaje de las células endocrinas del intestino secretoras de glucagon (células L), y no sean propiamente células insulares⁹.

Análisis de la expresión de hormonas pancreáticas durante la ontogenia del islote también sugieren la existencia de células precursoras pluripotenciales para las células insulares. Se propone que estas células precursoras expresan en un principio un péptido relacionado con el polipéptido pancreático, el péptido YY; ya que en el primer momento en que se detectan células endocrinas en el rudimento pancreático, estas células expresan péptido YY y glucagon⁸¹, poco después aparece una

población de células que se dividen activamente y que expresan péptido YY, glucagon e insulina⁸². También se observa la coexpresión del péptido YY con somatostatina y polipéptido pancreático⁸¹.

Experimentos de ablación dirigida también sugieren precursores comunes para las células del islote. En estos experimentos se transfecta el gene de una proteína citotóxica, la toxina diftérica A, bajo el control de la región promotora del polipéptido pancreático. En los ratones transgénicos que expresan esta construcción, no se desarrollan las células β , δ ni las PP; sin embargo, sí se observa la aparición de células α ⁸³.

Estas observaciones sugieren que los precursores de las células insulares expresan, al menos durante un estadio del desarrollo, el polipéptido pancreático, y que las células alfa pueden provenir de precursores distintos al resto de las células del islote, o bien son las primeras células en divergir del programa común de diferenciación de las células endocrinas pancreáticas.

En resumen, las evidencias experimentales sugieren la existencia de una célula precursora que expresa péptido YY, y que podría estar relacionada con las células endocrinas del intestino, de la cual se derivan el resto de las células insulares. Las primeras células en separarse del resto del linaje insular serían las células alfa, que dejarían de expresar *pdx1* y el resto de las hormonas pancreáticas.

Otra fracción de las células insulares continuaría expresando glucagon y conforme avanza el desarrollo estas células expresarían secuencialmente las otras hormonas pancreáticas: insulina, somatostatina y polipéptido pancreático, para después dar lugar a las células insulares que expresan sólo una hormona.

La célula precursora endocrina podría diferenciarse a partir de células pluripotenciales pancreáticas. No se sabe con exactitud que factores determinan que una célula pluripotencial pancreática se comprometa hacia el linaje endocrino, pero las evidencias experimentales sugieren que la diferenciación endocrina en el páncreas es automática (default), mientras que la diferenciación exocrina requiere de señales del mesénquima.

Las señales del mesénquima serían requeridas en dos momentos: inicialmente, estas señales serían necesarias para inducir el compromiso de diferenciación pancreática en el epitelio intestinal, y posteriormente, serían necesarias para inhibir el programa de diferenciación endocrina e inducir la diferenciación exocrina.

El compromiso de diferenciación exocrina podría implicar la expresión de factores de represión de transcripción, que impidieran la expresión de características endocrinas. De hecho se ha observado que líneas celulares derivadas de adenocarcinomas pancreáticos expresan el factor represor NRSF/REST, el cual no se expresa en células endocrinas, lo que permite que éstas expresen otro conjunto de genes, como se mencionó anteriormente⁷⁰.

La participación de señales mesenquimales como inductores de diferenciación exocrina se demostró en experimentos de cultivo de rudimentos pancreáticos. Cuando estos rudimentos son cultivados *in vitro* libres de mesénquima, la proporción de células productoras de insulina es 5 veces mayor a la observada en rudimentos cultivados con todo y su mesénquima. Si los rudimentos pancreáticos libres de mesénquima son tratados con folistatina, que es un inhibidor endógeno de activina, la proporción de células endocrinas es similar a la observada en los primordios cultivados con mesénquima.

Inclusive, tanto las células endocrinas de primordios completos como las que se desarrollan en presencia de folistatina mantienen características de células β inmaduras, ya que no expresan transportadores de glucosa Glut-2. Además, alrededor del 50% de ellas coexpresa glucagon, mientras que las células endocrinas que se desarrollan en ausencia de mesénquima o folistatina no coexpresan glucagon y sí expresan Glut-2⁸⁴.

Esto sugiere que la folistatina podría ser una de las señales mesenquimales que inhiben la diferenciación endocrina y permiten la diferenciación exocrina. Pero también sugiere que existen señales que inducen la diferenciación endocrina, ya que la folistatina inhibe la función de la activina al unirse a ella e impedir que interactúe con su receptor. Como se vio en la sección anterior, se ha propuesto a la activina como una señal inductora de diferenciación pancreática en el epitelio intestinal, así que esta proteína podría tener los dos tipos de papel propuestos para las señales mesenquimales: induciría en un principio el compromiso de diferenciación pancreático, para después permitir el desarrollo del linaje endocrino.

Existen otros mensajeros involucrados en el desarrollo correcto de los islotes pancreáticos. Entre ellos se encuentra el factor de crecimiento neuronal (NGF), el cual tiene efectos diversos sobre las células β pancreáticas, que se discutirán más adelante. Se ha demostrado que las células de los primordios pancreáticos expresan NGF y su receptor de alta afinidad, conocido como TrkA (ver más adelante), tanto *in vivo*⁴ como *in vitro*⁸⁵.

Si se bloquea *in vitro* la transducción de señales de TrkA con K252A, que es un inhibidor específico de este receptor, en primordios pancreáticos, se observa el desarrollo de un número adecuado de células β ; sin embargo, estas células se mantiene dispersas en el tejido acinar, en lugar de formar

acúmulos redondos, que son los precursores de los islotes pancreáticos. Este efecto del K252A no se debe a toxicidad sobre las células β , ya que al retirar el K252A las células β que ya estaban presentes comienzan a reorganizarse en acúmulos.

La organización de los islotes es importante para la función de las células insulares, porque, como se mencionó con anterioridad, la producción de insulina aumenta cuando las células β están en contacto unas con otras y forman uniones comunicantes²⁷. Estas observaciones implican que el desarrollo de las células insulares y la formación de los islotes pancreáticos son dos procesos independientes, y que existen señales que regulan por separado estos procesos.

Aunque hasta ahora no se han podido identificar todas las señales que inciden en el desarrollo de las células insulares, si conocemos algunos de los mecanismos involucrados en la adquisición del fenotipo endocrino en el páncreas, sobre todo los que regulan la restricción de la expresión génica hacia genes específicos, que es el momento cumbre de la diferenciación celular. En el caso de las células β , esta restricción es notable, ya que en el animal adulto no sólo la expresión de insulina está prácticamente confinada al islote pancreático, sino el mensajero de insulina representa más del 10% del RNAm total de la célula β ⁹.

2. REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE INSULINA

2.1) Síntesis y almacenamiento de insulina

La insulina es la principal hormona hipoglucemiante de los mamíferos. Sus efectos a corto plazo están encaminados a aumentar la captura de glucosa por parte de los tejidos periféricos, como el músculo esquelético y el tejido adiposo, y aumentar el almacenamiento de glucosa en forma de glucógeno en el hígado y el músculo.

La estructura de la insulina está muy conservada a lo largo de la cadena evolutiva. Esta hormona, en su forma madura, está formada por dos cadenas polipeptídicas, la cadena A, constituida por 21 aminoácidos, y la cadena B, que contiene 30 aminoácidos. Estas dos cadenas proteicas se encuentran unidas por dos puentes disulfuro, uno que conecta el aminoácido 7 de la cadena A con el aminoácido 7 de la cadena B, y otro que conecta el aminoácido 20 de la cadena A con el aminoácido 19 de la cadena B. Existe además un puente disulfuro intracatenario que une el aminoácido 6 de la cadena A con el aminoácido 11 de la misma cadena.

Las dos cadenas de la insulina son sintetizadas como parte de una sola cadena proteica precursora, la preproinsulina, la cual contiene, además de la secuencia para estas dos cadenas, una secuencia de aminoácidos que une a las dos cadenas, llamada péptido C y un péptido líder, que dirige a la cadena nascente de preproinsulina hacia el retículo endoplásmico rugoso, donde concluirá su traducción⁸⁶.

A) Transcripción del gene de insulina.

La preproinsulina es codificada por un solo gene en los humanos, que se encuentra localizado en el cromosoma 11; mientras que en la rata y el ratón, existen dos genes que codifican para esta hormona. Se cree que uno de los genes para insulina de roedor (el gene I), surgió de la duplicación del gene ancestral (gene II), en un evento mediado por RNA y retrotranscripción hace unos 25 millones años⁸⁷.

La estructura de los genes para insulina se encuentra conservada en cerca de 50 especies de mamíferos. En general, los genes de insulina están compuestas por 3 exones y 2 intrones⁸⁸ (ver figura 5), con excepción del gene para insulina de rata y ratón I, ya que estos genes carecen del segundo intrón. Este dato sugiere que el gene de insulina de roedor I fue

transcrito a partir del gene II, se comenzó su procesamiento (splicing) y después fue retrotranscrito a cDNA y reincorporado al genoma⁸⁷.

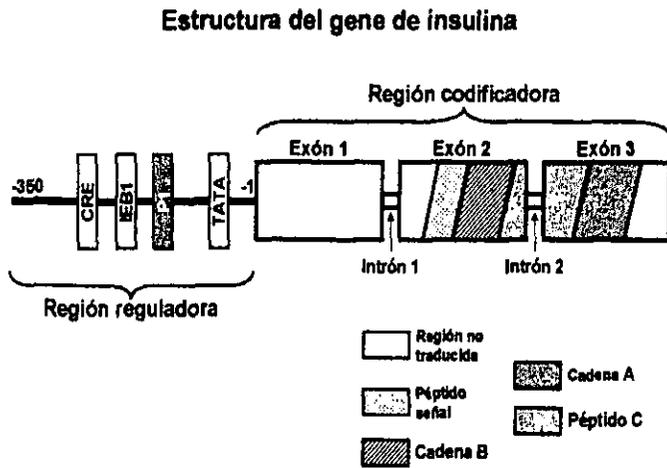


Figura 5. Estructura del gene de insulina

Esta figura esquematiza las regiones reguladora y codificadora del gene de insulina. Dentro de la región reguladora se encuentran secuencias promotoras (caja TATA), secuencias potenciadoras (IEB1) y elementos que responden a señales intracelulares, como la secuencia CRE que responde a AMPc y la secuencia P1, que responde a glucosa. (El esquema no está dibujado a escala)

El exón 1 del gene de insulina codifica para una región 5' del RNAm que no se traduce, mientras que el exón 2 codifica para el péptido señal, la cadena B de la insulina y la región NH-terminal del péptido C y el exón 3 codifica para el COOH-terminal del péptido C, la cadena A y una región que no se traduce del extremo 3' del RNAm para insulina⁸⁹.

La región de regulación 5' del gene de insulina contiene tres tipos de secuencias que regulan la transcripción del RNAm para esta hormona (ver figura 5): una región promotora, una región potenciadora (enhancer) y una región silenciadora (silencer). Tanto la región promotora como las regiones potenciadoras se comportan como elementos de especificidad celular⁹⁰.

Esta especificidad aumenta también por la presencia de la secuencia silenciadora, que impide la expresión del gene de insulina fuera de las células β ⁹¹. La región reguladora del gene de insulina abarca la secuencia de nucleótidos que comienza en el nucleótido número 300 previo

(upstream) al sitio de iniciación de transcripción, hasta el nucleótido número 51 después (downstream) del sitio de iniciación (-300 a +51)⁹².

La región promotora del gene de insulina contiene la secuencia conservada TATAA (caja TATA) entre los nucleótidos -20 a -30 previos al sitio de iniciación de la transcripción. Esta secuencia TATA es la responsable de indicar a la RNA polimerasa II el sitio de iniciación de transcripción en muchos genes, al unirse al factor de transcripción común TFIID. Mutaciones en esta región disminuyen considerablemente (5 veces o más) la expresión de un gene reportero acoplado a la región reguladora del gene de insulina transfectado en líneas celulares β ⁹³.

La región potenciadora del gene de insulina contiene varios tipos de secuencias, entre los que se encuentran secuencias que aumentan y secuencias que suprimen la transcripción del gene. Esta doble función, ya sea positiva o negativa, de la región potenciadora depende del tipo celular donde se encuentre el gene de insulina o del estado metabólico de la célula. Así, las secuencias silenciadoras pueden estar activas aún en células β , sobre todo en situaciones donde las células β están expuestas a condiciones tóxicas, como la hiperglucemia⁹⁴.

En la región potenciadora se encuentra secuencia IEB1 (GCCATCTG), que al ser mutada disminuye 25 veces la transcripción controlada por esta región reguladora. Esta secuencia IEB1 se encuentra alrededor del nucleótido -105 y pertenece a una clase de elementos reguladores conocidos como cajas E. A las cajas E se unen factores de transcripción conocidos como proteínas hélice-asa-hélice. (Helix-Loop-Helix), que forman heterodímeros para unirse al DNA y regular la transcripción. Algunas de las proteínas HLH se expresan en casi todos los tejidos de un organismo, mientras que otras están restringidas de forma específica algunos tipos celulares.

En el caso de las células β , el factor de transcripción que se une a la secuencia IEB está formado por una proteína HLH ubicua y la proteína específica NeuroD/BETA2⁶⁸. NeuroD/BETA2 se expresa en todos los tipos celulares endocrinos del islote pancreático y en neuronas⁹⁵, y se ha visto implicada en determinar el destino de diferenciación de estos dos tipos celulares. En ratones carentes de NeuroD/BETA2 las células insulares se desarrollan en muy baja cantidad, ya que el número de células β disminuye en 75%, mientras que el número de células alfa y delta disminuye en 40 y 20%, respectivamente. Además, las células endocrinas que alcanzan a desarrollarse se encuentran formando pequeños acúmulos, que no llegan a organizarse como islotes maduros⁹⁶.

Se pensaba que la proteína HLH ubicua del complejo que se une a la secuencia IEB era uno de los productos del gene E2A, E47 o bien E12⁹⁷; sin embargo, en ratones en los que se deletó el gene E2A, el desarrollo de células insulares es normal, al igual que los niveles circulantes de insulina y glucosa. Esto implica que ante la falta de E2A, otra proteína HLH puede suplir la función de sus productos, aunque no se puede descartar que en condiciones normales de expresión de E2A, sean E47 o E12 las contrapartes de NeuroD/BETA2⁹⁸.

Pese a que el sitio IEB potencia la expresión del gene de insulina, este sitio no es el responsable de restringir esta expresión a las células β , porque, como ya vimos, el factor de transcripción que se une a IEB se encuentra también en las otras células del islote pancreático. De hecho Neuro D/BETA2 puede regular la expresión de varias hormonas como glucagon⁹⁹ y secretina¹⁰⁰, además de insulina. Esto implica que deben existir factores de transcripción específicos para las células β , o bien que en estas células se expresa una combinación específica de factores de transcripción de distribución ubicua.

Existen por lo menos 3 factores de transcripción cuya expresión está prácticamente restringida a las células β en el animal adulto: PDX1, Pax4 y Nkx6.1. Estos tres proteínas pertenecen a la familia de proteínas que contienen un dominio homeótico (homeobox) y están involucradas en la regulación del desarrollo embrionario de varios tipos celulares¹⁰¹. Como se vio en la sección anterior, la función de PDX1 es necesaria para el desarrollo del páncreas, tanto exocrino como endocrino. En el animal adulto PDX1 regula la expresión de insulina y somatostatina en las células β y delta del islote pancreático; mientras que en células donde no se expresa PDX1, como en los glucagonomas, no es posible expresar genes controlados por el promotor de insulina¹⁰².

En pacientes donde una copia de PDX1 se encuentra mutada, se desarrolla diabetes tipo II en edades tempranas¹⁰³ (conocida también como diabetes del joven que aparece en la madurez: MODY), debido en parte a una producción deficiente de insulina y a una capacidad pobre de sensar aumentos en la glucemia. De manera similar, en ratones transgénicos donde se suprime específicamente la expresión de PDX1 en células β , disminuye tanto la producción de insulina con la edad, como la expresión del transportador de glucosa GLUT-2.

PDX1 se une a una secuencia TAAT, llamada sitio P1, localizada en la posición -77 de la región reguladora del gene de insulina. Para que PDX1 mantenga una función óptima es necesario que interactúe con la secuencia IEB1 mencionada anteriormente, ya que si esta última secuencia es mutada, PDX1 no puede aumentar la expresión del gene de insulina⁸⁰. Esto implica que los factores de transcripción HLH cooperan con PDX1 para mantener una expresión adecuada de insulina.

La expresión del factor de transcripción PAX4 se restringe, en el islote pancreático, a las células β . Su función en estas células no es conocida

totalmente, pero se sabe que es capaz de unirse a regiones del DNA que contengan la secuencia TAAT, de manera similar a PDX1. Además de mantener la expresión del gene de insulina, se cree que PAX4 puede suprimir directa o indirectamente la expresión de glucagon; ya que en ratones transgénicos carentes de PAX4, no se desarrollan las células β ni las células delta de los islote, pero aumenta el número de células productoras de glucagon. Además de comprobar la importancia de PAX4 para obtener el fenotipo de las células β , estos experimentos sugieren que las células β y delta comparten un precursor común¹⁰⁴.

El último factor de transcripción que, hasta ahora, se cree está restringido a las células β es Nkx6.1, una proteína que contiene un dominio homeótico y que fue identificada al analizar la expresión de RNAm específicos de células β por substracción de mensajeros de líneas tumorales de células insulares¹⁰⁵. Nkx6.1 pertenece a la familia de factores de transcripción NK2 y no se conoce su mecanismo de acción; sin embargo, se sabe que la expresión de este factor de transcripción está asociada a la producción de insulina durante la progresión de las células de insulinoma¹⁰⁶, y que en los ratones transgénicos que no cuentan con este gene, no se desarrollan las células β , pese a que el número de las otras células insulares es normal⁴⁹.

B) Regulación de la transcripción del RNAm de insulina.

Los factores de transcripción descritos anteriormente participan, principalmente, en mantener una expresión basal del gene de insulina, que determina el fenotipo de la célula β . Sin embargo, los niveles de RNAm de insulina varían constantemente en la célula β en respuesta a estímulos presentes en el medio. Uno de los principales reguladores de la transcripción del gene de insulina es el AMP cíclico (AMPc) intracelular. Esta molécula se produce como parte de la cascada de transducción de

señales de varios receptores presentes en las células β , como es el caso del receptor de glucagon.

La región reguladora del gene de insulina contiene un elemento de respuesta a AMPc (CRE) en la posición -177. A esta secuencia CRE se une un factor de transcripción llamado CREB, el cual es responsable, al activarse, de aumentar la transcripción del gene de insulina¹⁰⁷. La activación de CREB se debe a una fosforilación catalizada por la cinasa de proteínas regulada por AMPc (PKA). LA PKA, a su vez, se activa cuando aumenta la concentración de AMPc intracelular¹⁰⁸, y de esta forma se conectan las cascadas de transducción de señales de receptores membranales con la expresión génica.

En la célula β , uno de los receptores que induce la producción de AMPc es el receptor a glucagon¹⁰⁹. Esta hormona es capaz de inducir la secreción de insulina *in vitro*¹¹⁰, sin embargo, el papel que juega el glucagon en la regulación de la secreción de insulina *in vivo* es motivo de controversia, ya que no se sabe si el glucagon secretado por las células alfa es capaz de afectar a las células β ^{111,112}. Sin embargo, el receptor de glucagon podría activarse por medio del péptido parecido a glucagon 1 (GLP1), el cual es un potente estimulador de la secreción de insulina y de la transcripción del gene de esta hormona, cuyos efectos se deben a la activación de la adenilato ciclasa, y por la tanto a la producción de AMPc, en las células β ¹¹³.

La glucosa es otra molécula capaz de regular la transcripción del gene de insulina. Esta regulación es la más importante desde el punto de vista fisiológico, ya que asegura que las células β sean capaces de secretar más insulina cuando la concentración de glucosa permanece elevada. Los mecanismos celulares involucrados en la regulación de la transcripción

del gene insulina por glucosa no están completamente esclarecidos, debido a que la glucosa puede incidir en varios niveles de la transcripción.

Anteriormente, se pensaba que el aumento en la transcripción del gene de insulina inducido por glucosa dependía de una exposición prolongada (≥ 2 hrs) a concentraciones elevadas de (≥ 11 mM), mientras que la exposición durante periodos cortos aumentaba la producción de insulina a niveles postranscripcional y traduccional glucosa⁸⁶.

Experimentos recientes han demostrado que exposiciones de corta duración (15 min) a una concentración elevada de glucosa (16 mM) inducen la transcripción del RNAm de insulina¹¹⁴. Estos resultados reflejan una situación más parecida a la situación fisiológica a la que se ven expuestas las células β , ya que después de la ingesta de alimentos, las células β se ven expuestas a una concentración elevada de glucosa sólo durante poco tiempo.

Los efectos de la glucosa sobre la transcripción del RNAm de insulina dependen de la activación de algunos factores de transcripción. Se cree que el efector principal es el factor de transcripción PDX1, ya el aumento en la concentración extracelular de glucosa induce la translocación de este factor desde el citoplasma hasta el núcleo¹¹⁵. Además, esta translocación está acompañada por la activación de PDX1 mediante fosforilación, la cual es necesaria para que este factor se una a su secuencia de reconocimiento en la región reguladora del gene de insulina¹¹⁶.

La fosforilación de PDX1 es llevada a cabo por la cinasa de proteínas activada por estrés (SAPK2), la cual pertenece a la familia de cinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAP cinasas). No se conoce la forma en que se activa SAPK2 en respuesta a glucosa, pero se propone que esta activación depende del aumento en la concentración intracelular de iones

calcio, que puede inducir la activación de alguna isoforma de cinasa de proteínas C¹¹⁷ (PKC) y la 3-cinasa de fosfatidilinositol¹¹⁵ (IP 3-cinasa). El aumento en la concentración de calcio está ligado al metabolismo de la glucosa en la célula β y es uno de los mecanismos responsables de inducir la secreción de insulina, como se verá más adelante. Así, la glucosa es capaz de regular tanto la síntesis como la secreción de insulina.

C) Traducción del RNAm de insulina.

Otro punto de regulación de la síntesis de insulina es la traducción del RNAm hacia proteína. Este proceso inicia con la unión de ribosomas libres al RNAm que codifica para preproinsulina. Cuando se ha traducido a proteína la secuencia del péptido señal, se detiene la traducción momentáneamente y el complejo ribosoma-RNAm es translocado hacia el retículo endoplásmico rugoso (RER). Este arresto de la traducción se debe a la unión de la partícula de reconocimiento de señal (SRP), un complejo de ácido ribonucleico y proteína, que reconoce al péptido señal cuando se han traducido cerca de 50 residuos de aminoácido de la preproinsulina¹¹⁸.

La SRP se une a su receptor en la membrana del RER, con lo cual la cadena nascente de proteína es transferida al receptor de la secuencia señal del retículo, una proteína que se cree forma parte de la maquinaria de translocación de proteínas hacia el lumen del retículo¹¹⁹. El ribosoma, por su parte, queda anclado a la membrana del RER a través del receptor de ribosoma, con lo cual el sistema queda listo para reanudar la síntesis de preproinsulina de manera simultánea a la translocación de esta proteína hacia el lumen del retículo¹²⁰.

El inicio de la traducción de preproinsulina está regulado por diversas señales extracelulares, entre las que destaca la glucosa; ya que el aumento en la concentración extracelular de esta azúcar incrementa de 10 a 20 veces la incorporación a proinsulina de aminoácidos marcados

radiactivamente, mientras que el aumento de otros azúcares, como la fructosa o la ribosa no modifican esta incorporación.

Los mecanismos implicados en la regulación de la traducción de insulina por glucosa no son conocidos; sin embargo, se sabe que es necesario que la glucosa pueda ser metabolizada, ya que solamente análogos metabolizables de esta azúcar aumentan la síntesis de insulina. Además, al inhibir con mannoheptulosa el metabolismo de glucosa se abate el aumento en la síntesis de insulina ¹²¹.

El metabolismo de glucosa también es importante para regular la secreción de insulina, pero la síntesis de esta hormona y la secreción son procesos independientes que pueden ser separados; ya que la biosíntesis de insulina puede ser estimulada por glucosa en medios libres de calcio, en los cuales se inhibe su secreción. Por otra parte, existen moléculas que inducen la secreción de insulina, como la tolbutamida, y no afectan su biosíntesis¹²¹.

D) Tránsito postraducciona l de la insulina.

Durante el proceso de traducción-translocación de la insulina se remueven los aminoácidos del péptido señal, por medio de un complejo proteico conocido como peptidasa de señal¹²². De esta manera, la preproinsulina se transforma en proinsulina, la cual se pliega hacia su configuración más estable en el lumen del RER. Durante el proceso de plegamiento se forman los puentes disulfuro en la cadena de proinsulina, con lo cual la proinsulina está lista para proseguir su tránsito por el retículo endoplásmico hacia el complejo de Golgi y de ahí hacia la vía de secreción regulada.

En el complejo de Golgi, varias proteínas sufren modificaciones postraduccionales, como glucosilaciones o sulfataciones. La proinsulina no

es modificada, sin embargo, en la última porción del Golgi, conocida como red del Trans-Golgi, la proinsulina es separada de las proteínas que llegarán a membrana plasmática y de las proteínas de secreción constitutiva, para ser asignada a gránulos de secreción regulada.

El mecanismo que asegura la distribución de la proinsulina hacia los gránulos de secreción regulada no es completamente conocido, pero es un proceso muy eficiente, ya que bajo condiciones normales, solamente el 1% de la proinsulina escapa de la secreción regulada y es secretada constitutivamente¹²³.

Se cree que la asignación de proteínas hacia los gránulos de secreción regulada depende de la estructura tridimensional que adquieren las proteínas, la cual es reconocida por receptores embebidos en la membrana de la red del Trans-Golgi. En el caso de la insulina, la histidina no. 17 de la cadena B es importante para asegurar una distribución correcta de la proinsulina hacia los gránulos de secreción. Esta histidina es necesaria para coordinar el agrupamiento de moléculas de insulina y proinsulina al formar hexámeros estabilizados por zinc. Si esta histidina es mutada, ya no se forman los hexámeros, y aumenta la cantidad de insulina que es secretada constitutivamente¹²⁴.

La capacidad de formar hexámeros no es la única señal que determina el destino de la proinsulina. Deben existir otro tipo de señales en las moléculas de proinsulina, ya que existen especies de mamíferos, como los cobayos, cuya proinsulina no expresa histidina en la posición B17, por lo cual no forman hexámeros, y sin embargo si se almacenan en los gránulos de secreción regulada⁸⁶.

Además de los receptores para las proteínas de secreción, existe toda una maquinaria celular especializada en acomodar y distribuir a estas

proteínas. Pese a que no se conocen todos los componentes de esta maquinaria, se sabe que los gránulos de secreción regulada se forman a partir de vesículas cubiertas de clatrina, una proteína que induce, por polimerización, la gemación de estas vesículas desde la membrana del Trans-Golgi y que estabiliza momentáneamente las vesículas al inicio de su tránsito por el citoplasma hacia la membrana plasmática¹²⁵.

Durante este tránsito, la proinsulina se convierte en insulina por medio de la acción de endopeptidasas, que cortan la cadena de proinsulina en dos sitios distintos: el primero entre los aminoácidos 63 y 66 de la proinsulina, y el segundo entre los aminoácidos 30 y 33. Estos cortes dan como resultado la separación de las cadenas A y B de la insulina del péptido C. Además, los aminoácidos básicos localizados entre la secuencia del corte quedan separados también del resto de la cadena polipeptídica, por lo que dentro del gránulo permanecen como aminoácidos libres, debido a la acción de una peptidasa terminal conocida como carboxipeptidasa H¹²⁶.

Los sitios de corte de la proinsulina parecen ser sustrato de enzima distintas, ya que se ha observado que los cortes ocurren con diferente temporalidad. El primer corte produce des-64,65 proinsulina, es decir una cadena de proinsulina a la que le faltan los aminoácidos 64 y 65, y sucede en el periodo de tiempo en que la mayoría de la proinsulina recién sintetizada se encuentra todavía en el Golgi. El segundo corte produce des-31,32 proinsulina y de ahí insulina madura y péptido C y se lleva a cabo cuando la proinsulina ya fue transferida a los gránulos de secreción¹²⁷.

Esta separación temporal parece deberse a que la actividad de las dos endopeptidasas es regulada por el pH y la concentración de iones calcio. Ambas endopeptidasas tienen una actividad óptima a pH ácido; sin embargo, mientras que la endopeptidasa tipo 1 tiene un pico de actividad muy marcado en un pH alrededor de 5.5, la endopeptidasa tipo 2 mantiene

el 30% de su actividad aún a pH 7.5. Por esta razón, esta última puede atacar a la proinsulina dentro del Golgi, donde el pH es más neutro, ya que el pH en el interior de los gránulos de secreción va disminuyendo conforme éstos van madurando en su tránsito hacia la membrana plasmática¹²⁷.

La disminución del pH en el interior de los gránulos se debe a la acción de proteínas localizadas en la membrana de los gránulos, que bombean iones H^+ y Ca^{++} hacia el interior del gránulo. Gracias a estas bombas, los gránulos de insulina tienen un pH interno más bajo (alrededor de 5.5) y una concentración más alta de calcio libre (1-10 mM), que otros organelos. La acumulación de calcio también es importante para la función de las endopeptidasas, ya que su actividad depende de la presencia de este ion, y por esta razón pueden ser inhibidas por agentes quelantes de calcio como el EDTA.

Las endopeptidasas también difieren en cuanto a la dependencia al Ca^{++} para su actividad óptima. La endopeptidasa 2 requiere una concentración micromolar (0.1 mM) de este ion para mantener el 50% de actividad, mientras que la endopeptidasa 1 requiere una concentración 25 veces más alta (2.5 mM). Esto también sugiere que estas endopeptidasas actúan en distintos momentos durante la síntesis de la insulina, conforme maduran los gránulos que acarrean esta hormona¹²⁸.

Como se puede apreciar, los gránulos de insulina son estructuras complejas constituidas por varias proteínas. Además de la insulina y el péptido C, que conforman cerca del 75% del contenido proteico de los gránulos, se encuentran en ellos las proteínas que procesan y maduran la insulina, bombas iónicas, proteínas de la maquinaria de distribución y proteínas de la maquinaria de regulación de la secreción.

En total, se han purificado más de 100 polipéptidos diferentes, los cuales muchas veces son derivados de una misma proteína con distintas modificaciones postraduccionales; sin embargo, se han encontrado los productos proteicos de más de 50 genes independientes. Además de la insulina, en estos gránulos se encuentran otras hormonas, como la amilina y la hormona liberadora de tiotropina, las cuales podrían tener un papel como moduladores paracrinos de la secreción de insulina¹²⁹.

Una vez constituidos los gránulos de secreción, que contienen a la insulina ya madura, son almacenados en espera de señales que induzcan su secreción por exocitosis, un mecanismo que es regulado finamente a distintos niveles en la célula β .

2.2) Regulación del acoplamiento entre el estímulo y la secreción de insulina.

La secreción de insulina es regulada por varias moléculas. En general, las moléculas que inducen la secreción de insulina se clasifican en dos grandes grupos: iniciadores y potenciadores. Los iniciadores son aquellas moléculas que aumentan por sí solas la secreción de insulina de manera dependiente de su concentración. Los potenciadores son capaces de aumentar la secreción de insulina solamente cuando son administradas simultáneamente a un iniciador, aunque este último se encuentre en baja concentración.

El iniciador fisiológico principal de la secreción de insulina es la α -D-glucosa. Cuando la concentración extracelular de esta azúcar se encuentra por arriba de 7 mM, induce la secreción de insulina, la cual alcanza un nivel máximo bajo una concentración de glucosa alrededor de 20 mM. Durante algún tiempo, se pensó que existía en las células β un receptor membranal de esta azúcar, que sensaba los cambios en su concentración,

sin embargo este modelo, conocido como "sitio para regulador", ha sido descartado, ya que no se han encontrado estos receptores para glucosa¹³⁰.

Las evidencias experimentales apoyan un modelo donde la glucosa necesita ser metabolizada por la célula β para inducir la secreción de insulina, es decir existe un "sitio para sustrato". Por ejemplo, solamente los análogos metabolizables de glucosa inducen la secreción de insulina; además, otros metabolitos capaces de ingresar vía glucolítica, como el gliceraldehido, son secretagogos eficaces de insulina. Por otra parte, los agentes inhibidores de la glucólisis, como la manoheptulosa, o de la fosforilación oxidativa, como la azida de sodio, inhiben también la secreción de insulina¹³¹.

A) Metabolismo de la glucosa en las células β .

Para que la glucosa pueda ser metabolizada debe ingresar al interior de la célula β . El ingreso de la glucosa se da a través de una proteína transportadora, que permite el flujo del azúcar a través de la membrana plasmática, a favor de su gradiente de concentración. En las células β de la rata y el ratón se expresa principalmente el transportador de glucosa tipo 2¹³² (GLUT2). Este transportador se encuentra presente de manera constitutiva en la membrana plasmática de las células β y los hepatocitos, lo cual facilita la entrada de la glucosa a la célula en cuanto aumenta la concentración extracelular del azúcar.

El GLUT2 es una proteína de doce segmentos transmembranales, con una capacidad de transporte de glucosa alta, pero a la vez una afinidad baja ($K_m=50$ mM). Estos datos sugieren que el GLUT2 es más activo durante el periodo postprandial, cuando la glucosa alcanza su nivel máximo en la sangre. Debido a la actividad del GLUT2 las concentraciones intracelular y extracelular de glucosa tienden a equilibrarse rápidamente. De hecho, la velocidad de transporte de glucosa es más alta que la velocidad de

utilización de esta azúcar en la glucólisis, por lo que se propone que el transporte de glucosa no es el paso limitante para la secreción de insulina¹³³.

Se sabe que en células β de humano se expresa preferencialmente al transportador GLUT1, un transportador de glucosa similar que también se expresa en eritrocitos, donde el transporte de glucosa también es constitutivo, pero con una velocidad más baja y una afinidad mayor¹³⁴. Además, en líneas celulares β de roedor donde se elimina el GLUT2, la expresión de GLUT1 es suficiente para mantener una secreción adecuada de insulina, debido a que la capacidad de transporte del GLUT1 sigue siendo mucho mayor a la capacidad de catabolización de las células β ¹³⁵. Estas observaciones apoyan el modelo mencionado anteriormente, en cual la captación de glucosa no es limitante de la secreción de insulina.

De acuerdo con este modelo, el paso limitante de la secreción de insulina debe encontrarse en la glucólisis, por lo que las enzimas que limiten la entrada de la glucosa a esta vía deberán ser las responsables de regular la velocidad con que se secreta la insulina¹³⁶. Se conocen tres pasos irreversibles en la glucólisis, que limitan la velocidad que puede alcanzar esta vía metabólica. Por esta razón, las enzimas que catalizan estos pasos son buenas candidatas para limitar la tasa de acople entre el metabolismo de glucosa y la secreción de insulina.

La primera reacción irreversible del metabolismo de glucosa es la fosforilación de esta azúcar hacia glucosa 6-P. En las células β existen dos enzimas que pueden catalizar esta reacción, la hexocinasa tipo I y la hexocinasa tipo IV, también conocida como glucocinasa. La hexocinasa I presenta una afinidad alta por la glucosa ($K_m=0.1$ mM) y es probable que su actividad esté saturada en todo el rango fisiológico de concentración de glucosa en sangre¹³⁷; por esta razón, se piensa que la fosforilación de

glucosa es llevada a cabo principalmente por la glucocinasa en las células β .

La glucocinasa es una enzima codificada por un gene único en humanos y ratones. Se expresa en hígado y en páncreas, aunque el RNAm de glucocinasa es más grande en las células β que en los hepatocitos, esto se debe a un procesamiento (splicing) diferente entre estos dos tipos celulares y a la utilización de promotores alternativos¹³⁸. Esta enzima presenta una afinidad baja por la glucosa ($K_m=10$ mM) y su actividad es máxima dentro del rango fisiológico de concentración de glucosa en sangre y presenta una cinética de actividad sigmoidea que correlaciona con el consumo de glucosa en las células β .

Por otra parte, en líneas de células β que carecen de actividad glucocinasa, pero que mantienen la actividad de hexocinasa I, no aumenta la síntesis ni la secreción de insulina en respuesta a incrementos en la concentración de glucosa por arriba de 1 mM¹³⁹. Además, los ratones transgénicos donde se eliminó específicamente en células beta el gene de la glucocinasa, mueren a los pocos días de nacidos por la falta de secreción de insulina¹⁴⁰. También se han asociado defectos en la actividad de glucocinasa con defectos en la secreción de insulina en algunos tipos de diabetes mellitus¹⁴¹.

Estas observaciones sugieren que la glucocinasa es la enzima clave en la regulación de la velocidad del metabolismo de glucosa en la célula β , y en el acoplamiento de este metabolismo con la secreción de insulina. Existen otras observaciones experimentales que apoyan esta hipótesis. Por ejemplo, se ha observado que la actividad máxima de la fosfofructocinasa y la piruvato cinasa, otras dos enzimas que catalizan reacciones irreversibles en la glucólisis, que se puede encontrar en las células β excede, por mucho, la velocidad de la glucólisis. Esto sugiere que la

actividad de estas enzimas está restringida por la disponibilidad de sustratos y/o por otros mecanismos no bien conocidos, como la presencia de metabolitos inhibidores o bien, de ciclos fútiles¹³⁶.

El metabolismo de la glucosa a través de la glucólisis, y de ahí al ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa, lleva a la producción de ATP. Además de su función como reservorio de energía en la célula β , se cree que esta molécula es responsable de acoplar el metabolismo de la glucosa con la secreción de insulina, a través de la actividad eléctrica de la célula β (ver figura 6).

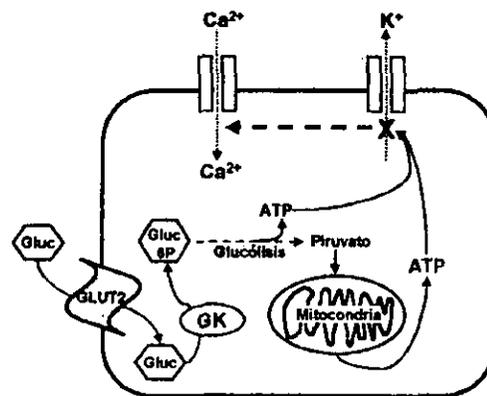


Figura 6. Acoplamiento entre el metabolismo de glucosa y la secreción de insulina.

La glucosa ingresa a la célula β a través de transportadores GLUT2. El metabolismo de esta hexosa produce ATP, el cual promueve el cierre de canales de K^+ en la membrana de la célula β . Esto lleva a la despolarización del potencial de membrana, con lo que aumenta la probabilidad de apertura de canales de calcio sensibles a voltaje. (GK: glucocinasa)

En el modelo más aceptado para explicar el acoplamiento entre el metabolismo de glucosa y la secreción de insulina, se propone que el ATP producido por el catabolismo de glucosa induce el cierre de canales de K^+ presentes en la membrana plasmática de las células β . El cierre de estos canales lleva a la despolarización y, como resultado, al disparo de potenciales de acción por parte de las células β . Durante estos potenciales de acción, se produce una entrada de Ca^{2+} , el cual induce la secreción de

insulina por exocitosis (en la sección 2.3 se discute con mayor profundidad la actividad eléctrica de las células β).

B) Papel del calcio y las cinasas de proteínas en la regulación de la exocitosis de insulina.

El aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} es el punto crítico de regulación de la secreción de insulina, ya que bajo condiciones fisiológicas, no es posible observar secreción de insulina en ausencia de este ion¹⁴². El papel central del Ca^{2+} dentro del mecanismo de acoplamiento entre el metabolismo de glucosa y la secreción de insulina, se demuestra por las siguientes observaciones:

- 1) La eliminación del Ca^{2+} extracelular inhibe la actividad eléctrica de las células β y la secreción de insulina inducida por glucosa¹⁴³.
- 2) El aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por glucosa en las células β es inhibido por bloqueadores de canales de calcio sensibles a voltaje¹⁴⁴.
- 3) El bloqueo del metabolismo celular con azida de sodio inhibe la actividad eléctrica de la célula β y la secreción de insulina¹⁴⁵.

El proceso de inducción de exocitosis por Ca^{2+} no se conoce completamente, ya que existen varios componentes de la maquinaria de exocitosis que son sensibles a este ion. Algunos de estos componentes son capaces de unirse directamente al Ca^{2+} , como es el caso de la sinaptotagmina y la sincolina, que regulan, en conjunto con otras proteínas, la fusión de los gránulos de secreción con la membrana plasmática^{146, 147}.

El Ca^{2+} puede también regular indirectamente otros componentes del aparato excitotico, que son fosforilados por cinasas de proteínas reguladas por este ion. Algunas de las enzimas moduladas por Ca^{2+} interactúan con una proteína capaz de unirse a este ion, la calmodulina, la cual permite la activación de la subunidad activa de la cinasa. Por esta

razón, esta familia de enzimas se ha llamado cinasas de proteínas dependientes de Ca^{2+} -calmodulina (cinasa CaM).

En la célula β se han identificado varias cinasas CaM, pero destaca la tipo II, ya que se ha encontrado asociada a los gránulos de secreción de insulina¹⁴⁸ y su activación por secretagogos es proporcional a la secreción de esta hormona¹⁴⁹. Además, la inhibición de la cinasa CaM II con agentes específicos, sobre todo peptídicos, suprime la secreción de insulina inducida por despolarización¹⁵⁰.

Por desgracia, no se han caracterizado todas las proteínas blanco de la cinasa CaM II, lo que dificulta establecer los puntos de regulación de exocitosis que dependen de ella. Sin embargo, se propone que esta enzima tiene efectos sobre la preparación (priming) de los gránulos para la exocitosis, el reclutamiento de gránulos de insulina y el transporte de éstos sobre el citoesqueleto de la célula β ¹⁵¹.

La respuesta de la maquinaria de exocitosis al calcio puede ser modulada, de forma tal que un aumento similar en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ puede inducir una secreción mayor o menor de insulina, dependiendo de las condiciones en que se encuentre el aparato exocitótico. Los mecanismos que regulan el acople Ca^{2+} -exocitosis en la célula β no son completamente conocidos; sin embargo, se sabe que algunos de ellos implican la activación de diversas cinasas de proteínas, como la PKA y la PKC. La activación de la PKA depende del aumento de AMPc intracelular, mientras que la PKC puede activarse de diversas maneras (existen muchas isoformas de esta enzima), entre las que destaca la activación por diacilglicerol, calcio y fosfolípidos¹⁵².

Se ha propuesto que la sensibilidad de la maquinaria de exocitosis de la célula β al Ca^{2+} aumenta cuando estas cinasas están activas. Por ejemplo,

en células β tratadas con forskolina, que induce la producción de AMPc y por lo tanto la activación de PKA, o bien, con TPA, un análogo de diacilglicerol que activa a la PKC, se observa que la concentración extracelular de Ca^{2+} mínima permisiva para la secreción de insulina es menor que la concentración mínima permisiva de células no tratadas con estos compuestos.

Es decir, en células no tratadas, la secreción de insulina disminuye conforme disminuye la concentración extracelular de Ca^{2+} , hasta que se alcanza una concentración mínima de Ca^{2+} permisiva para la secreción de insulina. Por debajo de esta concentración mínima ya no es posible observar secreción de la hormona. En las células β tratadas con forskolina o TPA, esta concentración permisiva mínima es 30% menor. Inclusive, a una concentración extracelular de Ca^{2+} similar, el tratamiento con activadores de PKA y PKC potencia la secreción insulina¹⁵³.

Este aumento de sensibilidad al Ca^{2+} puede deberse a la fosforilación de proteínas que forman parte del aparato exocitótico; sin embargo, hasta la fecha no se han caracterizado las proteínas blanco de estas fosforilaciones, aunque se ha observado la incorporación de fósforo radiactivo a un gran número de proteínas en células β tratadas con forskolina¹⁵⁴ o TPA¹⁵⁵.

La activación de PKA o PKC puede ser el mecanismo efector que utilizan algunas hormonas (como el GLP-1) y neurotransmisores (como la acetilcolina) para potenciar la secreción de insulina¹⁵⁶, pero el papel de estas enzimas durante la secreción de insulina inducida por glucosa es motivo de controversia. Por una parte, se pensaba que estas cinasas no participaban en este proceso, ya que la secreción de insulina inducida por glucosa se mantiene en presencia de inhibidores de PKA¹⁵⁷ o PKC¹⁵⁸, siempre y cuando la concentración extracelular de Ca^{2+} se mantenga dentro del rango fisiológico.

Sin embargo, estudios recientes han demostrado la existencia de un mecanismo de secreción de insulina independiente de Ca^{2+} . Esta secreción independiente de calcio se observa bajo condiciones experimentales donde se evita un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, con bloqueadores de canales iónicos, o bien donde se disminuye la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ con la inyección intracelular de agentes quelantes de calcio (como el BAPTA). Bajo estas condiciones, la secreción de insulina depende completamente de la activación simultánea de PKA y PKC; ya que si se inhibe cualquiera de estas enzimas, o bien sólo se induce la activación de una de ellas, no es posible observar la exocitosis de insulina¹⁵⁹.

Con base en estos hallazgos, se propuso que la secreción de insulina inducida por glucosa estaba regulada por dos sistemas paralelos simultáneos, uno dependiente de calcio, que es el más estudiado, y otro independiente de calcio, que está regulado por PKA y PKC y que depende de GTP intracelular¹⁶⁰. Sin embargo, se demostró que bajo condiciones fisiológicas, donde la concentración intracelular de Ca^{2+} puede fluctuar libremente, el sistema independiente de calcio no contribuye significativamente para la secreción de insulina estimulada por glucosa¹⁴².

Descartar el papel de la PKA y la PKC, como reguladores centrales de la secreción de insulina no implica descartar que estas enzimas jueguen un papel permisivo para este proceso. Se ha demostrado que la activación de PKA o PKC aumenta tanto el porcentaje de células β aisladas en cultivo que presentan oscilaciones en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en respuesta a glucosa, como el nivel que alcanza esta concentración en cada célula individualmente, lo que se traduce en una mayor cantidad de insulina secretada¹⁶¹. Esto sugiere que estas cinasas son responsables, en parte, de mantener la capacidad de las células β de secretar insulina, probablemente al modular

la función de los canales iónicos implicados en la actividad eléctrica de estas células.

2.3) Actividad eléctrica de las células β .

Como se vio en la sección anterior, la actividad eléctrica de la célula β tiene un papel central en la regulación de la secreción de insulina. Esta capacidad de las células β de disparar potenciales de acción es otra característica compartida entre estas células y las neuronas. De hecho algunos de los canales iónicos expresados en las células β son idénticos a los que se expresan en sistema nervioso central, lo que se debe, en parte, a la existencia de mecanismos de regulación de expresión génica comunes entre estos tejidos.

Los primeros experimentos que describieron esta actividad eléctrica fueron realizados sobre islotes pancreáticos completos mediante el uso de microelectrodos intracelulares⁵. En estos experimentos se observa que cuando los islotes son incubados en concentraciones extracelulares de glucosa por debajo del umbral para la secreción de insulina (<3 mM), el potencial de membrana (V_m) de las células β es estable y se encuentra polarizado a un valor de ≈ -70 mV.

Si aumenta la concentración de glucosa la membrana plasmática se despolariza y el V_m comienza a oscilar. En caso de que la concentración extracelular de glucosa alcance valores que estimulen la secreción de insulina (>7 mM), la despolarización llega al nivel umbral (≈ -50 mV) donde inicia la actividad eléctrica de la célula β .

Esta actividad eléctrica es oscilatoria y rítmica, y esta formada por ráfagas (bursts), que constan de una despolarización lenta, seguida de una despolarización rápida hasta alcanzar un potencial de meseta (≈ -35 mV), donde se superponen trenes de potenciales de acción (espigas), que elevan

el potencial de membrana hasta alrededor de -10 mV. Estas ráfagas tienen una duración cercana a los 10 segundos (ver figura 7).

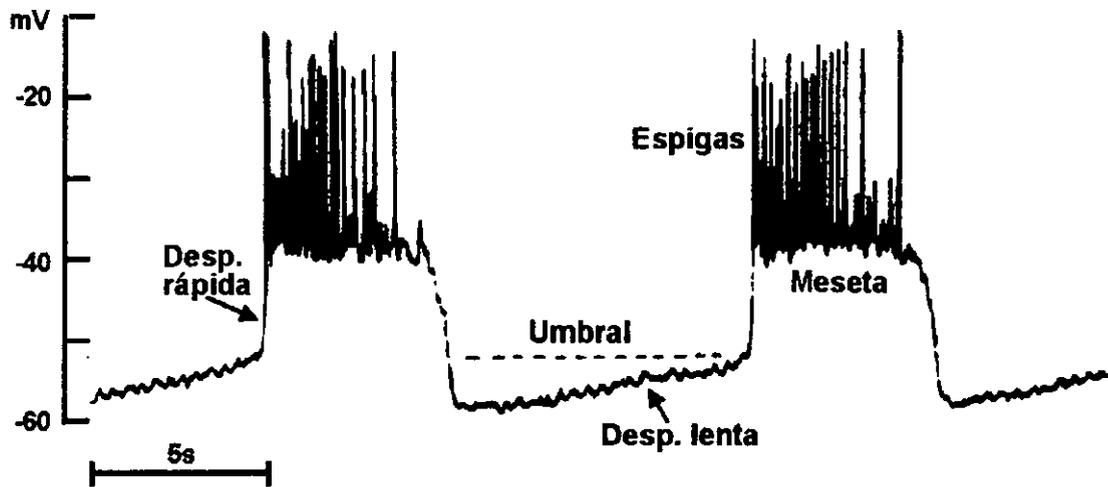


Figura 7. Actividad eléctrica de células β .

En esta figura se observa la actividad eléctrica de células β , registrada por medio de microelectrodos insertados en islotes pancreáticos de ratón. (Modificado de Osawa y Sand¹⁶²)

La frecuencia de aparición de las espigas disminuye hacia el final de las ráfagas, lo que marca el inicio de la repolarización del potencial membranar hacia un potencial un poco más negativo que el potencial umbral (<-50 mV). Si la concentración extracelular de glucosa se mantiene elevada, la célula β continuará disparando estas ráfagas de forma rítmica.

Conforme aumente la concentración extracelular de glucosa, la frecuencia de las ráfagas aumentará, al igual que la permanencia en el potencial de meseta; mientras que el intervalo entre disparo y disparo disminuirá. Como resultado de esto, cuando la concentración extracelular de glucosa es mayor a 20 mM, se observa una actividad eléctrica sostenida y continua⁶.

La despolarización de la célula β inducida por glucosa es un proceso complejo, que involucra múltiples canales iónicos. Inicialmente, esta despolarización se debe al cierre de canales de K^+ sensibles a ATP

(K⁺(ATP)), que es producido por el catabolismo de la hexosa, y a la actividad constitutiva de una corriente catiónica no selectiva (C⁺(NS)).

Durante el estado de reposo, se encuentran activos tanto los canales K⁺(ATP), como los canales catiónicos no selectivos. Esto hace que se cancelen mutuamente los efectos de estas corrientes sobre el potencial de membrana de la célula β. Al cerrarse los canales K⁺(ATP), el flujo de cationes a través de los canales C⁺(NS) induce una despolarización de 10-15 mV, que alcanza un nivel donde aumenta la probabilidad de apertura de canales iónicos sensibles a voltaje¹⁶³.

La activación de corrientes iónicas sensibles a voltaje (cuya naturaleza se discute más adelante), despolariza aún más la membrana de las células β. Gracias a esto, se alcanza un potencial donde aumenta la probabilidad de apertura de nuevos canales iónicos sensibles a voltaje, en particular de canales de calcio activados por alto umbral, los cuales son responsables de las espigas que se observan en las ráfagas. Además, el Ca²⁺ que permea a través de estos canales, es el principal responsable del aumento en la [Ca²⁺]_i en la célula β, necesario para la secreción de insulina¹³⁰.

Este tipo de actividad eléctrica en forma de ráfagas, se ha registrado con microelectrodos introducidos a células β que forman parte de islotes pancreáticos. Cuando se registra la actividad eléctrica de células β individuales aisladas, se observa un cambio en su patrón de disparo, ya que no se presentan ráfagas, sino mas bien potenciales de acción en forma de espigas aisladas¹⁶⁴, que también presentan una despolarización lenta y una rápida, pero donde no se observan espigas montadas sobre un potencial de meseta; por el contrario se observa una repolarización rápida. No se sabe con certeza a que se debe este cambio en el patrón de disparo, pero se ha propuesto que la falta de comunicación intercelular lleva a la desaparición de las ráfagas¹⁶⁵.

Se cree que la aparición de potenciales de acción en forma de ráfagas en células acumuladas, a partir de espigas aisladas de células β individuales, se debe al acoplamiento y sincronización de las células. En principio, cada célula β posee la maquinaria molecular necesaria para disparar ráfagas, ya que, a fin de cuentas, los potenciales de acción se deben a la actividad de los canales iónicos expresados por estas células.

Sin embargo, cuando una célula β se encuentra aislada, la actividad de estos canales iónicos no parece ser la adecuada para el disparo de las ráfagas, ya sea porque no se alcanza un flujo iónico suficiente para mantener, por ejemplo, la despolarización del potencial de meseta¹⁶⁶, o porque las propiedades electrotónicas cambian entre células acumuladas y aisladas¹⁶⁷.

La generación de las ráfagas también puede deberse a la existencia de diferentes tipos de células β , que presenten diferentes formas de disparo potenciales de acción. Algunas de las células serían capaces de disparar ráfagas y guiar al resto en el momento en que estuvieran agregadas¹⁶³. Esto implicaría la existencia de subpoblaciones heterogéneas de células β , las cuales han sido documentadas tanto para la síntesis¹⁶⁸, almacenamiento¹⁶⁹ y secreción de insulina¹⁷⁰.

Recientemente se reportó la existencia de subpoblaciones de células β de ratón aisladas que difieren en el patrón de disparo de potenciales de acción¹⁷¹, lo cual era esperable dado que ya se conocía la heterogeneidad del metabolismo de glucosa entre las células β ¹⁷². Así, el 33% de las células β aisladas presentan potenciales de acción en forma de espigas aisladas. Otro 15% de las células sólo presenta despolarizaciones periódicas hacia un potencial de meseta, sin espigas aparentes, mientras que el 52% de las células β de ratón presentan espigas superpuestas a

potenciales de meseta, semejantes a las ráfagas, pero de menor duración (<5 s).

Los procesos mencionados anteriormente no son excluyentes entre sí y todos podrían participar en la aparición de las ráfagas, con la condición de que las células estén acumuladas. Esto implica que la comunicación intercelular es indispensable para el disparo de potenciales de acción en forma de ráfagas. Este tipo de interacción célula a célula se logra a través de uniones comunicantes (ver primera sección), la cuales son responsables del acoplamiento eléctrico entre las células β de un islote. Este acoplamiento hace que los flujos iónicos de una célula sean "compartidos" por otras, lo que lleva a la sincronización de la actividad eléctrica de varias células.

El modelo de acoplamiento y sincronización¹⁷¹ para la generación de ráfagas plantea que gracias a los flujos iónicos "compartidos", las células β pueden mantener la despolarización durante el potencial de meseta, ya que los cationes que ingresan a una célula con una densidad de corriente mayor pueden inducir la despolarización de las células vecinas, lo que a su vez lleva a un aumento mayor en la concentración intracelular de cationes, lo que llevaría a una mayor despolarización y la aparición de las espigas, por la activación de las corrientes de Ca^{2+} de alto umbral.

Esto implica que se necesita una corriente eléctrica pequeña para inducir a una célula que no dispara ráfagas a presentarlas. Esta corriente pequeña podría ser conducida por uniones comunicantes, ya que se ha observado que cerca del 70% de las células β en cultivo pueden estar acopladas eléctricamente mediante una conductancia de alrededor de 200 pS¹⁷³, lo cual es suficiente para inducir el disparo en ráfaga en modelos matemáticos del potencial de acción de células β ¹⁷⁴.

Esta hipótesis fue comprobada en experimentos recientes donde con corrientes despolarizantes pequeñas, inyectadas por medio de la técnica de fijación dinámica (dynamic clamp), se puede inducir el disparo en forma de ráfagas similares a las de células acumuladas en células β de ratón aisladas¹⁷¹.

Las corrientes que fluyen a través de las uniones comunicantes también sincronizarían el disparo de células β vecinas, lo que es necesario para sobrepasar las restricciones impuestas por la heterogeneidad. Esta sincronización se ha observado tanto en pares de células β vecinas¹⁷⁵, como en células β separadas 100 μ m una de otra¹⁷⁶, registradas simultáneamente dentro de islotes pancreáticos. Inclusive, es posible registrar variaciones oscilatorias y rítmicas del potencial eléctrico de islotes pancreáticos completos, cuya frecuencia aumenta en respuesta al aumento de la concentración extracelular de glucosa, mediante el uso de técnicas de registro extracelular¹⁷⁷.

Para que exista esta sincronización y se puedan compartir los flujos iónicos entre una célula β y otra, es necesario que las uniones comunicantes permanezcan abiertas durante el potencial de acción. Estas uniones no sólo permanecen abiertas, sino que durante la fase de despolarización del potencial de acción, el acoplamiento entre una célula β y otra aumenta, para disminuir durante la fase de repolarización y la fase silente entre una ráfaga y otra¹⁶⁷.

Este aumento en el acoplamiento se debe a una disminución en la resistencia al flujo de corriente entre una célula y otra, lo que también trae como consecuencia un aumento en la constante de espacio de las células, es decir en la distancia que es capaz de avanzar una despolarización, antes de que su valor se reduzca a la mitad¹⁶⁷. Estos resultados muestran

que el acoplamiento eléctrico entre las células β es variable y que, además, aumenta durante la fase de despolarización del potencial de acción.

Sin embargo, este acople eléctrico no es dependiente del voltaje, lo que implica la existencia de otro tipo de señales que regulan la actividad de las uniones comunicantes¹⁷³. Algunas de estas señales podrían producirse a consecuencia del metabolismo de glucosa, ya que se ha observado que el número de uniones comunicantes entre una célula β y sus vecinas aumentan en respuesta al aumento en la concentración extracelular de esta hexosa¹⁷⁸.

En resumen, la actividad eléctrica en forma de ráfagas se construye en los islotes pancreáticos, a partir de la actividad de células β acopladas por medio de uniones comunicantes. Este acoplamiento eléctrico permite que las células compartan flujos iónicos, lo que hace que las corrientes de una célula tengan efecto sobre el potencial de la vecina y las células individuales se sincronicen. Estas corrientes compartidas y la sincronización de la actividad eléctrica sobrepasan las barreras impuestas por la heterogeneidad de las células β , y llevan a disparar ráfagas a células que por sí solas no serían capaces de dispararlas¹⁷¹.

Como se mencionó en la sección anterior, la actividad eléctrica de la célula β ocupa un lugar central en la regulación de la secreción de insulina, dado que el Ca^{2+} que ingresa a la célula β durante los potenciales de acción es el principal inductor de la secreción de insulina. De hecho, existe una correlación positiva entre la actividad eléctrica de las células β y la secreción de insulina: Entre mayor sea la concentración extracelular de glucosa, mayor será el tiempo que las células β permanezcan despolarizadas en el potencial de meseta y más insulina será secretada¹⁷⁹ (ver figura 8).

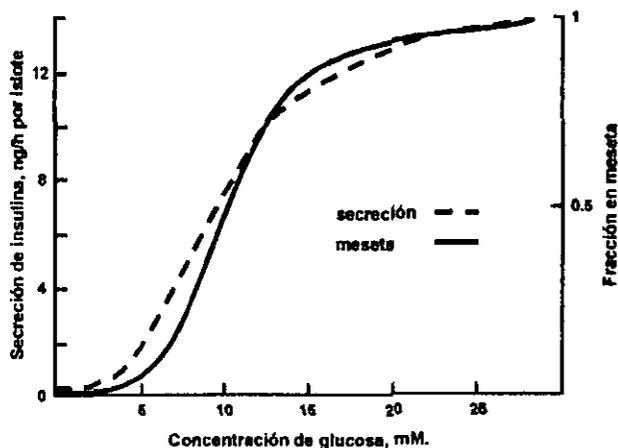


Figura 8. Relación entre la secreción de insulina y el tiempo de permanencia en meseta.

Como se puede ver en la figura, existe una correlación clara entre la cantidad de insulina secretada y el porcentaje del tiempo que las células β permanecen en potencial de meseta.

(Modificado de Osawa y Sand¹⁶²)

Debido a la importancia que tiene para la secreción de insulina, es necesario comprender los mecanismos involucrados en la generación de la actividad eléctrica de las células β , que como hemos visto es un proceso complejo donde participan múltiples tipos de corrientes iónicas. Cada una de estas corrientes y, por ende, los canales responsables de conducirlos son puntos potenciales de regulación de la secreción de insulina, por lo que a continuación se hablará más a fondo de los canales iónicos que han sido identificados como participantes en la actividad eléctrica de las células β .

A) Canales de K^+ sensibles a ATP ($K^+(ATP)$).

Las células β de todas las especies de mamíferos expresan una corriente de K^+ que es sensible a ATP. Esta corriente es conducida por los canales $K^+(ATP)$, que se expresan en las células beta de todas las especies investigadas hasta ahora¹⁸⁰. Estos canales muestran una conductancia unitaria de 50-80 pS y una relación I-V prácticamente lineal al ser registrados bajo concentraciones isométricas de K^+ (140 mM en ambos lados de la membrana).

Sin embargo, si los canales $K^+(ATP)$ son registrados en presencia de Na^+ o Mg^{2+} del lado interno de la membrana, la relación I-V cambia y se aprecia una rectificación entrante pronunciada, ya que la corriente conducida por

estos canales varía muy poco en voltajes mayores a +20 mV¹⁸¹. Se cree que esta rectificación entrante se debe al bloqueo de corriente saliente por parte del Na⁺ y el Mg²⁺, ya que estos iones se unen al canal K⁺(ATP) con afinidades (Kd) de 34 mM y 46 mM, respectivamente, y obstruyen el flujo saliente de K⁺¹⁸².

La actividad de los canales K⁺(ATP) aislados se presenta en aperturas agrupadas en ráfagas de duración variable, separadas por periodos donde los canales permanece silentes. Si se expone estos canales a ATP por el lado intracelular, disminuye la probabilidad de apertura de los canales, lo que se refleja en la disminución de la duración de las ráfagas, ya que se reduce el número de aperturas de los canales en cada ráfaga, y en el aumento de la duración de los intervalos en los que los canales se mantienen en el estado cerrado¹⁸³. Un efecto similar se observa cuando los canales K⁺(ATP) son registrados en células β en presencia de glucosa o tolbutamida, una sulfonilurea que se utiliza como agente hipoglucemiante oral durante el tratamiento de la diabetes.

La inhibición de la actividad de los canales K⁺(ATP) por parte de este nucleótido es independiente del voltaje membranal, lo que indica que el ATP no bloquea el poro por donde fluyen los iones K⁺, ya que este nucleótido posee una fuerte carga negativa que se vería afectada por el potencial de membrana al penetrar al canal¹⁸⁴. Esta inhibición tampoco es consecuencia de la fosforilación de los canales K⁺(ATP), ya que análogos no hidrolizables de ATP, como el ATPγS, también son capaces de inhibir la actividad de estos canales¹⁸⁵. Esto sugiere que existen sitios que reconocen al ATP dentro de la estructura de los canales K⁺(ATP), y que la unión del nucleótido a estos sitios modula la actividad de los canales.

La unión del ATP a estos sitio de regulación no depende únicamente del aumento en la concentración intracelular de ATP, sino mas bien, de la

relación ATP/ADP; ya que se ha observado que si aumenta la concentración de ATP y simultáneamente la de ADP, el canal $K^+(ATP)$ no se cierra¹⁸⁶. Esto podría implicar que el ATP y el ADP compiten por un mismo sitio de unión en el canal y mientras el ATP inhibe la actividad del canal, el ADP la favorece. Sin embargo, el ADP es capaz de inhibir la actividad de los canales $K^+(ATP)$, cuando los canales son registrados en ausencia de Mg^{2+} . De hecho, la presencia de Mg^{2+} es necesaria para evitar que los canales $K^+(ATP)$ desaparezcan por lavado (rundown) de los registros electrofisiológicos¹⁸⁷.

Inclusive, el complejo ATP- Mg^{2+} puede mantener la actividad basal de los canales $K^+(ATP)$, lo que indica que existen al menos dos sitio de unión a nucleótidos en estos canales. Uno de ellos debe estar ocupado por ADP- Mg^{2+} o ATP- Mg^{2+} para mantener la actividad basal del canal, mientras que el otro es responsable de la inhibición de esta actividad al ser ocupado por ATP.

La aparente incongruencia que resulta de los efectos antagónicos de los nucleótidos de adenosina fue resuelta al conocer la estructura molecular del canal $K^+(ATP)$. Para purificar estos canales y clonar los genes que los codifican, se aprovechó la capacidad de las sulfonilureas para unirse a ellos. De esta manera, fue aislada una proteína de 140 kDa que era fotomarcada con glibenclamida iodada.

A esta proteína se le denominó receptor a sulfonilureas (SUR), y al clonarse el gene que la codifica se caracterizó como un polipéptido de 1582 aminoácidos que presenta 17 dominios transmembranales putativos. El SUR está relacionado estructuralmente con la glucoproteína P y el regulador de conductancia transmembranal de la fibrosis quística, que son proteínas que pertenecen a la superfamilia de transportadores con cassettes de unión a ATP (transportadores ABC)¹⁸⁸.

Los transportadores ABC presentan dos sitio de unión a ATP, lo que parecía resolver el dilema de los efectos incongruentes del ADP y el ATP sobre los canales de potasio. Sin embargo, al expresar heterológicamente el SUR se encontró que no era capaz de conducir una corriente de K^{+188} . Esto implicaba la existencia de otra subunidad con capacidad de conducir el flujo de iones de potasio.

Esta segunda subunidad resultó ser un miembro de la familia de canales de potasio rectificadores entrantes, el Kir 6.x, los cuales son proteínas con dos segmentos transmembranales y una región de formación de poro iónico (P), que es homóloga a las regiones P de todos los otros canales iónicos caracterizados hasta la fecha (ver figura 9).

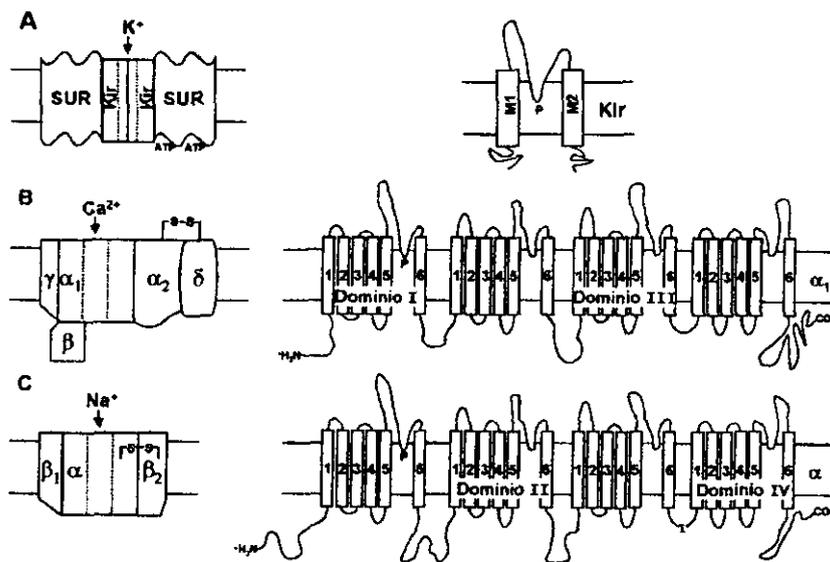


Figura 9. Canales iónicos de células β pancreáticas.

Esta figura esquematiza algunos de los canales iónicos que han sido identificados en células β . A la izquierda se muestra el arreglo de subunidades que se ha propuesto para cada canal y a la izquierda, esquemas del arreglo molecular de las subunidades formadoras del poro iónico **A)** Canal K^+ (ATP), formado por subunidades SUR y Kir. Las subunidades Kir presentan solamente dos segmentos transmembranales y un segmento P. **B)** Canal de Ca^{2+} , formado por cuatro tipos de subunidades. La subunidad α_1 forma el poro iónico y esta organizada en cuatro dominios homólogos. **C)** Canal de Na^+ , formado por tres tipos de subunidades. La subunidad α forma el poro iónico y presenta la partícula de inactivación (I) en el asa intracelular III-IV.

De esta forma, los canales $K^+(ATP)$ están formados por 4 subunidades SUR unidas a 4 subunidades Kir 6.x. Las subunidades Kir se organizan alrededor de sus regiones P, con lo cual forman la vía de conducción iónica para los iones K^+ ¹⁸⁹. La asociación de los SUR con los canales Kir 6.x puede generar una variedad de canales de K^+ sensibles a ATP, ya que existen al menos dos isoformas del SUR, el SUR1 y el SUR2 (que a su vez existe en las variedades A y B) y dos miembros de la familia Kir 6.x, el Kir 6.1 y el Kir 6.2. En la célula β se expresan en mayor cantidad el SUR1 y el Kir 6.2, por lo que se asume que estas isoformas componen los canales $K^+(ATP)$ en el páncreas¹⁸⁸.

Pese a que el SUR1 posee dos sitios de unión a ATP, estos no son responsables de la sensibilidad al nucleótido, ya que si se expresan de manera aislada subunidades Kir 6.2, a las cuales se les eliminaron los últimos 26 aminoácidos del extremo carboxilo, se obtienen corrientes de K^+ sensibles a ATP, similares a las corrientes normales de las células β . Por esta razón, se ha sugerido que el sitio de unión a ATP en Kir 6,2 es responsable de la inhibición de la actividad de los canales $K^+(ATP)$, mientras que la interacción con SUR1 aumenta la afinidad del Kir 6.2 por el ATP¹⁹⁰.

Además, uno de los sitios de unión a nucleótidos en SUR1 parece ser responsable de la activación de los canales $K^+(ATP)$ por ADP-Mg²⁺, ya que mutaciones en este sitio de unión llevan a la expresión de canales $K^+(ATP)$ que siempre están activos, lo que se traduce en pacientes que nacen con hiperinsulinemia e hipoglicemia crónicas. Esto implica que si existen sitios diferentes para diferentes formas de nucleótidos de adenosina, pero todavía no se ha esclarecido como interactúan estos para regular la función de los canales $K^+(ATP)$ ¹⁹¹.

B) Canales de Ca²⁺.

Las espigas presentes en el potencial de acción de célula β son insensibles a tetrodotoxina, un bloqueador de canales de sodio, pero son inhibidas por bloqueadores de canales de calcio, tanto inorgánicos, como el cadmio o el cobalto, como orgánicos, como la nifedipina. Esto implica que estas espigas son producto de la actividad de canales de Ca²⁺ en la membrana de las células β ¹⁹².

En las células β de rata han sido identificadas dos tipos de corrientes de calcio dependientes de voltaje, que se diferencian entre sí por sus características electrofisiológicas. La primera de estas corrientes comienza a activarse a potenciales de membrana de alrededor de -40 mV, y alcanza la mitad de su activación máxima alrededor de -15 mV. Esta corriente presenta una constante de tiempo de desactivación de 2.8 ms, por lo que fue nombrada como corriente de desactivación lenta (SD). Presenta inactivación rápida dependiente de voltaje en respuesta a estímulos sostenidos¹⁹³.

La corriente SD se inactiva rápidamente, alcanza valores similares en presencia de Ca²⁺ y Ba²⁺, no desaparece durante registros largos¹⁹³, y es insensible a dihidropiridinas¹⁹⁴, por lo que se piensa que es conducida por canales de calcio tipo T, los cuales han sido identificados por medio de registro de canales unitarios en membranas de células β de rata¹⁹⁵.

La otra corriente de calcio identificada gracias a las corrientes de cola muestra una constante de tiempo de desactivación de 129 μ s, por lo que fue denominada de desactivación rápida (FD). Esta corriente comienza a activarse alrededor de -20 mV y alcanza la mitad de su activación máxima a potenciales cercanos a +15 mV¹⁹³, por esta razón se le llama también activada por alto voltaje (HVA). A diferencia de la corriente conducida por los canales de Ca²⁺ tipo T, la corriente FD no se inactiva rápidamente en

respuesta a pulso despolarizantes de 100 ms de duración, y cuando es registrada con Ba^{2+} como acarreador de carga, su magnitud es mayor que cuando se registra con calcio¹⁹³.

Las características anteriores implican que la corriente FD es conducida por canales de Ca^{2+} distintos a los canales tipo T. De manera inicial, se pensó que los canales responsables de la corriente FD eran canales de calcio tipo L, ya que gran parte de esta corriente es sensible a dihidropiridinas, tanto inhibitorias¹⁹⁶ (nimodipina), como activadoras¹⁹⁴ (BAY K8644). Sin embargo, una fracción (30%) de la corriente FD es insensible a dihidropiridinas, lo que sugiere la existencia de canales de calcio adicionales, responsables de conducir esta corriente.

En líneas celulares derivadas de insulinoma de rata (RINm5F) se han caracterizado canales de calcio sensibles a ω -conotoxina GVIA, denominados canales tipo N, que también pueden contribuir a la corriente de calcio HVA¹⁹⁷. La existencia de canales de calcio tipo N en células normales de rata fue demostrada tanto por experimentos de análisis de secreción de insulina¹⁹⁸, como por registros electrofisiológicos recientes¹⁹⁹.

Además de los canales de calcio tipo L y N, existen otros canales que pueden contribuir a las corrientes de calcio HVA, ya que las células β de rata presentan una corriente de calcio insensible tanto a dihidropiridinas, como a ω -conotoxina GVIA. Esta corriente es sensible a ω -agatoxina IVA, que es un bloqueador de canales de calcio clase A, llamados así por que expresan una subunidad alfa 1A²⁰⁰.

Esta gran diversidad de canales de calcio en la rata podría explicar, en parte, diferencias entre el patrón de actividad eléctrica de esta especie, con la actividad eléctrica de las células β de ratón. En estas últimas solamente se han detectado canales de calcio tipo L, pero ningún otro canal de calcio

HVA, ni canales tipo T²⁰¹. Sin embargo, la presencia de esta gran variedad de canales de calcio hace que las células β de rata sean un mejor modelo para comparar con las células de humano, ya que éstas también expresan una gran variedad de canales de calcio, tanto tipo T, como tipo L y N²⁰².

Todos estos distintos canales podrían contribuir para la entrada de calcio necesaria para la secreción de insulina. De hecho, la inhibición de esta secreción con dihidropiridinas fue una de las primeras evidencias a favor del papel central que juega la actividad eléctrica para la secreción de esta hormona²⁰³. Como ya se mencionó, el bloqueo de los canales tipo N con ω -conotoxina GVIA también inhibe la secreción de insulina, aunque la combinación de esta toxina con dihidropiridinas antagonistas no es suficiente para inhibir completamente la secreción de insulina en células β de humano²⁰².

Esto podría implicar que tanto los canales T, como otro tipo de canales de calcio HVA, se encuentran involucrados en la secreción de insulina. En este sentido, se ha observado que el bloqueo de los canales T con Ni^{2+} disminuye la cantidad de insulina secretada²⁰⁴. De hecho la actividad de estos canales facilita la secreción de esta hormona, al inducir una despolarización inicial en la membrana de las células β , con la cual se podría alcanzar voltajes suficientes para aumentar la probabilidad de apertura de los canales de calcio HVA, los cuales serían responsables de las espigas del potencial de acción de la célula β ¹⁹³.

La variedad de canales de Ca^{2+} presentes en la célula β se debe a que estas células expresan diversos RNAm que codifican para estos canales. Los canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje son proteínas transmembranales multiméricas de alto peso molecular. Una de las subunidades de estas proteínas, nombrada alfa1, presenta la región de formación del poro, por donde fluye la corriente de Ca^{2+} . La subunidad alfa1 es un polipéptido con

un gran número de regiones transmembranales, que presentan similitudes en su secuencia de aminoácidos. Debido a estas similitudes los segmentos transmembranales han sido organizados en cuatro dominios homólogos (I-IV). Cada dominio homólogo consta de seis segmentos transmembranales (S1-S6) y una región formadora de poro (P) que une el segmento S5 con el S6²⁰⁵ (ver figura 9).

Las células β de rata expresan diversas clases de subunidades alfa1 de canales de Ca^{2+} . Entre éstas se encuentra la subunidad alfa1D, que además de expresarse en las células β se expresa en neuronas y en otros tipos de células endocrinas. La subunidad alfa1D codifica para canales de Ca^{2+} tipo L, sensibles a dihidropiridinas²⁰⁶; sin embargo, en líneas celulares derivadas de insulinoma, cerca del 50% de los canales tipo L también son formados por subunidades alfa1C (cardiacas), lo que podría explicar las diferencias que se observan en la secreción de insulina de estas células, con respecto a las células β normales²⁰⁷.

Además de las subunidades alfa1D, las células β expresan subunidades alfa1A, que codifica para canales de calcio sensibles a ω -agatoxina IVA²⁰⁰. En el islote también se expresan subunidades alfa1E²⁰⁸, que en un principio se pensaba que codificaban para canales de Ca^{2+} tipo T²⁰⁹; sin embargo, en la actualidad se piensa que este tipo de canales son codificados por las subunidades alfa1G, H e I, las cuales fueron clonadas recientemente, por lo que no se ha reportado todavía su expresión en las células β ²¹⁰.

La existencia de todas estos canales de Ca^{2+} en la célula β podría sugerir funciones distintas para cada tipo de canal de calcio, algunos involucrados en el disparo del potencial de acción y otros regulando directamente la secreción de insulina. Dada la importancia del ingreso de Ca^{2+} a la célula β para la secreción de insulina, es posible que con esta variedad de canales

se asegure bajo cualquier circunstancia la entrada de este ion. Por otra parte, cada uno de los tipos de canales de calcio podría jugar papeles diferentes durante el potencial de acción de la célula β ¹⁹³, o bien ser blanco de regulación diferencial en respuesta a cambios en el medio ambiente celular.

C) Canales de Na⁺.

La contribución de los canales de sodio para la actividad eléctrica de la célula β es motivo de controversia, ya que en algunas especies de mamíferos, como el ratón, estos canales parecen no participar significativamente en el disparo de los potenciales de acción, mientras que otras especies, como el humano, la activación de las corrientes de sodio si es importante durante la despolarización inducida por glucosa.

Las corrientes de Na⁺ identificadas en células β de diferentes especies de mamíferos presentan características similares a las corrientes de sodio neuronales, ya que se activan (tiempo en desarrollar el pico ≈ 0.5 ms a 0 mV) e inactivan (cte. de tiempo ≈ 0.8 ms a 0 mV) rápidamente, y son sensibles a tetrodotoxina (TTX). Estas corrientes se activan a potenciales de membrana más positivos que -50 mV y alcanzan una máximo de amplitud entre 0 y +10 mV¹⁹³.

Las diferencias más marcadas entre las corrientes de Na⁺ de diferentes especies se observan en las curvas de inactivación en estado estacionario. Por ejemplo, en células β de ratón, la mitad de la corriente máxima de Na⁺ se encuentra inactivada a un potencial de -110 mV, lo que da como resultado que a potenciales cercanos al potencial de reposo de la célula β (≈ -70 mV), prácticamente toda la corriente de Na⁺ de células murinas esté inactivada²¹¹. En otras especies la inactivación media de la corriente de Na⁺ ocurre en un rango más positivo del potencial de membrana. Así, en

células β humanas y caninas, el 50% de la corriente de sodio se encuentra inactivada a -45 mV y -60 mV, respectivamente²¹².

Por otra parte, en células β de rata adulta el 50% de inactivación de la corriente de Na^+ se observa a un potencial de -75 mV¹⁹³, mientras que células de rata fetal y en el insulinoma de rata RINm5F, la mitad de la inactivación se observa a un potencial \approx -55 mV²¹³. Esto implica que la corriente de sodio puede contribuir de manera distinta al potencial de acción de la célula β , dependiendo de la especie y del estado de desarrollo de las células.

Es de esperarse que la corriente de sodio en células β de ratón no contribuya al potencial de acción²¹⁴, ya que prácticamente toda la corriente de Na^+ se encuentra inactivada en el potencial de reposo, lo que impide el ingreso de sodio por canales sensibles a voltaje y por lo tanto una despolarización en respuesta a esta entrada. Por esta razón, se dice que el potencial de acción de células β de roedor es independiente del sodio²¹².

Inicialmente se llegó a proponer que sólo una pequeña fracción de las células β de ratón expresaba corrientes de Na^+ , y por esa razón los potenciales de acción eran independientes de este ion²¹⁵. Un análisis más detallado demostró que los canales de sodio se encuentran presentes en todas las células β , pero en estado inactivado, lo que impedía observar las corrientes de Na^+ desde potenciales de mantenimiento cercanos al potencial de reposo²¹¹.

Pese a esta inactivación, los canales de sodio de células β murinas si pueden regular la secreción de insulina, ya que el tratamiento con veratridina, que es un agente activador de canales de Na^+ , induce la secreción de insulina en estas células. A partir de estas observaciones se

sugirió que los canales de sodio podían ser un blanco terapéutico para el tratamiento farmacológico de la diabetes mellitus²¹⁶.

Las especies de mamífero cuyos canales de sodio se inactivan a potenciales más positivos presentan potenciales de acción dependientes de Na^+ . Así, en células β caninas, la TTX inhibe completamente el disparo de potenciales de acción, que en esta especie se presentan como espigas individuales de corta duración, sin potencial de meseta aparente²¹⁷. En células β humanas, la TTX también inhibe los potenciales de acción, aunque no de manera total.

Esto se debe a que las células β de humano presentan tres patrones de disparo de potenciales de acción: uno parecido al patrón biestable de células de ratón, que se describió al principio de esta sección, con potenciales de meseta y espigas sobrepuestas; otro más que semeja al disparo de las células caninas, donde se observan espigas aisladas transitorias que, a diferencia de las espigas de los potenciales de ratón, alcanzan voltajes mayores que 0 mV (overshoot); y un tercer patrón de tipo mixto, con potenciales de meseta, donde se superponen tanto espigas que sobrepasan los 0 mV como espigas que no sobrepasan este valor²¹².

De esta manera, la exposición de células β humanas a TTX inhibe completamente el disparo de potenciales de acción parecidos a los de células caninas, al igual que la aparición de espigas que sobrepasan los 0 mV, mientras que los potenciales de acción parecidos a los de células de ratón no se afectan, así como tampoco las espigas que no sobrepasan los 0 mV²¹².

En células β de rata, no se ha estudiado el efecto de la TTX sobre la actividad eléctrica¹⁸⁰. Sin embargo, existen evidencias que apoyan la hipótesis de la participación de las corrientes de Na^+ en los potenciales de

acción de esta especie, ya que la TTX inhibe la secreción de insulina inducida por concentraciones de glucosa ≥ 10 mM, que producen el disparo de potenciales de acción bajo condiciones normales¹⁹³. De manera similar, la TTX también inhibe la potenciación de la secreción de insulina mediada por agonistas muscarínicos, lo cuales inducen una despolarización rápida de la membrana plasmática de la célula β ²¹⁸.

Estas últimas observaciones sugieren que las corrientes de Na^+ si participan en la despolarización del potencial de membrana de las células β de rata y, además, muestran a estas corrientes como un blanco de regulación fisiológica de la secreción de insulina.

Es posible que las diferencias entre las corrientes de sodio de las distintas especies, y sus diversas contribuciones a los potenciales de acción, se deban a la expresión de distintos canales de Na^+ . Estos canales, al igual que los canales de calcio, son proteínas transmembranales multiméricas, con una subunidad responsable de formar la vía de permeabilidad iónica, que en este caso se denomina subunidad alfa²⁰⁵.

Las subunidades alfa de los canales de sodio también presentan cuatro dominios de secuencias homólogas, compuestos de seis segmentos transmembranales y una región P (ver figura 9). Como característica sobresaliente, los canales de sodio expresan una secuencia conservada en el asa (loop) intracelular que une los dominios III-IV, que es responsable de la inactivación rápida²⁰⁵. Existen tres familias principales de subunidades alfa de canales de sodio, aquellas que se expresan en músculo esquelético, las que se expresan en corazón y las que se expresan en cerebro. Estas últimas fueron las primeras en ser clonadas en mamíferos, a partir de muestras de rata, y codifican para canales de Na^+ sensibles a TTX²⁰⁵.

En las células β , humanas, caninas, murinas y de rata, se expresan una subunidad alfa parecida a la tipo III de cerebro de rata, que es una isoforma que se expresa preferencialmente en el sistema nervioso central durante la etapa fetal²¹⁹. En células β caninas se expresa, además, la subunidad alfa tipo II de cerebro de rata.

La expresión de la subunidad alfa tipo III en el páncreas está restringida a los islotes pancreáticos, ya que en el tejido acinar circundante no se detecta la expresión de RNAm para esta subunidad por medio de técnicas de hibridación *in situ*²¹⁹. Dado que las distintas especies de mamífero expresan subunidades alfa similares, es posible que la variaciones en cuanto a la inactivación de las corrientes de sodio se deban a diferencias en la expresión de otras subunidades de los canales de Na^+ , como la subunidad $\beta 1$, cuya expresión modifica la cinética de inactivación de las corrientes de sodio²²⁰.

Sin embargo, la interacción entre las distintas subunidades de los canales de sodio no es bien conocida, lo que dificulta este tipo de análisis, y hasta la fecha no ha sido caracterizada la expresión de subunidades β de canales de Na^+ en células β pancreáticas. Por otra parte, también es posible que, pese a que las secuencias de los genes que codifican las subunidades alfa tipo III son similares entre las especies, existan variaciones funcionales en los canales una vez que son traducidos, ya que no se conocen las características de las corrientes microscópicas de estos canales. Esto se debe a que la expresión de la subunidad alfa tipo III está restringida al cerebro fetal y a las células β insulares.

Esta restricción en la expresión génica es una de las características compartidas entre células β y neuronas. Como se vio en la sección 1.4, esta similitud entre tipos celulares se debe a la falta de expresión de un factor de transcripción (NRSF/REST), que en el resto de los tejidos impide

la expresión de genes neuronales^{69,70}. El hecho que las células β sean parecidas a las neuronas, podría implicar que existen mecanismos comunes de regulación para estos tipos celulares. Esta hipótesis será discutida en la sección siguiente.

En suma, la actividad eléctrica de las células β inicia con la despolarización inducida por el cierre de los canales $K^+(ATP)$ aunado a la actividad constitutiva de un canal catiónico no selectivo. Esta despolarización inicial llevaría al potencial de membrana hacia valores donde aumentaría la probabilidad de apertura de canales de Na^+ , en aquellas especies donde éstos son funcionales, y canales de Ca^{2+} tipo T.

Las corrientes iónicas conducidas por estos canales despolarizarían más la membrana plasmática, hasta alcanzar los niveles donde aumenta la probabilidad de apertura de los canales de calcio HVA, sean éstos tipo L, N o algún otro. La actividad de estos canales sería responsable de las espigas que no sobrepasan 0 mV y de gran parte de la entrada de Ca^{2+} , necesaria para la secreción de insulina.

La inactivación lenta de los canales de Ca^{2+} HVA, en conjunto con la actividad de canales de K^+ rectificadores tardíos y otras corrientes salientes de K^+ , inclusive a través de canales $K^+(ATP)$, permitiría la repolarización desde las espigas hacia el potencial de meseta. La terminación de toda la ráfaga y la repolarización hacia el potencial de reposo de la célula β es un proceso que no se ha esclarecido completamente, aunque se propone que esto se debe a la actividad de canales de K^+ sensibles a Ca^{2+} , que presentan una conductancia grande²²¹.

El desarrollo de los disparos en forma de ráfaga, podría deberse a la sincronización de la actividad eléctrica entre células β vecinas, a partir de compartir flujos iónicos a través de uniones comunicantes. Estos flujos

compartidos serían necesarios para inducir el disparo en células silentes y para evitar que las diferencias entre célula y célula terminen con el potencial de acción.

3. EFECTOS DEL FACTOR DE CRECIMIENTO NEURONAL SOBRE LA CÉLULA β PANCREÁTICA.

Las células β presentan características fenotípicas propias de células derivadas de la cresta neural. Como ya se mencionó, estos rasgos similares los podemos encontrar a todos los niveles: molecular, morfológico y fisiológico; lo cual no demuestra que las células β compartan un origen embrionario con las neuronas.

La actividad eléctrica de las células β fue de la primeras características "neuronales" en ser descrita, y en su momento fue sorprendente ya que eran las primeras células que, fuera de las neuronas y el músculo, disparaban potenciales de acción⁵. Como vimos en la sección anterior, algunos de los canales iónicos responsables de esta actividad eléctrica, en particular los canales de sodio, solamente se expresan en células β y en células derivadas de la cresta neural²¹⁹.

Con el tiempo se fueron encontrando más rasgos que semejaban las células β a las neuronas. Por ejemplo, se observó que las células β sintetizaban y almacenaban un neurotransmisor, el GABA¹⁷, y que además expresaban algunas enzimas de la vía de síntesis de catecolaminas, aunque éstas no llegan a sintetizarse debido a la falta de las enzimas que catalizan los pasos terminales de esta vía²²².

Además cuando las células β son cultivadas *in vitro*, en medios de cultivo suplementados con concentraciones altas de suero bovino fetal (10%), extienden procesos citoplásmicos que expresan neurofilamentos, lo que los hace parecidos a las neuritas de células derivadas de la cresta neural².

Esta última característica, en conjunto con las observadas con anterioridad, llevó a proponer que las células β podían responder a moduladores fisiológicos propios de neuronas, como lo son algunos factores de crecimiento.

Entre estos factores de crecimiento destaca el factor de crecimiento neuronal (NGF), que fue el primer factor trófico de sistema nervioso en ser descrito y es considerado necesario para la regulación de la diferenciación y el desarrollo neuronal²²³.

3.1) El factor de crecimiento neuronal (NGF).

La existencia de un factor que fomentaba la sobrevivencia y el desarrollo de fibras nerviosas simpáticas, se sospechaba desde 1948. En ese año se encontró que el trasplante de un sarcoma murino a embriones de pollo inducía el crecimiento de fibras nerviosas. Dado que no era necesario el contacto del tejido neoplásico con el tejido embrionario, se propuso la existencia de un factor difusible que brindaba las condiciones necesarias para el crecimiento de estas fibras²²⁴.

Al intentar aislar y caracterizar este factor difusible, a partir de extractos del sarcoma murino que promovían el crecimiento de haces nerviosos simpáticos, se encontró una proteína termolábil de masa aproximada de 20 kDa, responsable de este efecto biológico²²⁵. Esta proteína fue denominada factor de crecimiento neuronal (NGF), y fue purificada también de extractos de glándula submaxilar de ratón, que resultó una fuente importante y accesible de este factor²²⁶. Al contar con esta fuente accesible de NGF, se logró clonar el gene que codifica para este factor de crecimiento²²⁷.

A) Estructura del NGF.

El gene de NGF codifica para una proteína de 307 aminoácidos, la cual es hidrolizada postraduccionalmente y da origen a una proteína de 118 aminoácidos. Esta proteína forma un dímero con otra idéntica, con lo que da lugar a la subunidad β del NGF, que es responsable de toda la actividad biológica de este factor de crecimiento²²⁸.

En el ratón el NGF es purificado como una proteína de alto peso molecular, que presenta un coeficiente de sedimentación de 7.1S, por lo que se le denomina NGF7S. El NGF7S es un complejo proteico, en el que la subunidad β se encuentra asociada a otras dos subunidades, α y γ , con las que forma complejo hexamérico²²⁹ (2 α , 2 β y 2 γ). Las subunidades α y γ pertenecen a la familia de proteasas de serina del tipo de la kalikreína; sin embargo, solamente la subunidad γ tiene actividad catalítica, ya que la subunidad α carece de una secuencia aminoácidos necesaria para la actividad enzimática²³⁰.

Aparentemente, la asociación de las subunidades β del NGF con las α y las γ permite que la subunidad γ haga un corte proteolítico en las subunidades β , y con esto maduren postraduccionalmente²³¹. Sin embargo, existen especies animales donde el NGF no forma complejos 7S, lo que podría implicar que la proteólisis postraducciona catalizada por la subunidad γ no es indispensable para la actividad biológica del NGF, o bien, que la formación de complejos 7S es una característica particular del ratón²³².

De hecho, la formación de los complejos 7S disminuye la actividad biológica del NGF, ya que en este complejo la subunidad β queda completamente rodeada por las subunidades α y γ , lo que impide la interacción del NGF con sus receptores. Sin embargo, se cree la formación

del complejo 7S mantiene la estabilidad y protege la molécula de NGF en la saliva del ratón²³³.

La actividad biológica de la subunidad β de NGF se debe a la presencia de secuencias de aminoácidos que le permiten unirse a sus receptores de membrana, de los cuales se hablará en la siguiente sección. Estas secuencias de reconocimiento con receptores han sido clasificadas en dos grupos. El primer grupo es el de secuencias de unión al receptor común de neurotrofinas y está formado por residuos contiguos de aminoácidos cargados positivamente²³⁴.

Como su nombre lo indica, estas cargas positivas están conservadas en la estructura de los miembros de la familia de factores de crecimiento del sistema nervioso, conocida como familia de neurotrofinas. De esta familia se conocen hasta ahora 7 miembros distintos²³⁵, incluyendo al NGF, y además de tener efectos biológicos similares, comparten un receptor membranal común (ver más adelante).

Además de estos aminoácidos cargados positivamente, existe otro grupo de secuencias necesarias para mantener la actividad biológica de la subunidad β del NGF. Estos aminoácidos permiten la unión al receptor específico a NGF y forman una unidad simétrica a ambos lados de la molécula de NGF. Esta unidad de simetría, al parecer, permite que se acerquen dos moléculas de receptor a NGF, al unirse a uno y otro lado del eje de simetría de la molécula de NGF²³⁴. Este acercamiento induce la activación del sistema de transducción de señales del receptor a NGF, y con esto, una respuesta celular (ver más adelante).

B) Receptores a NGF.

El NGF puede unirse a dos sitios en la membrana de sus células blanco, uno de baja afinidad, con una constante de disociación (Kd) de 10^{-9} M, y

otro de alta afinidad, que muestra una K_d de $10^{-11}M$ ²³⁶. Estos sitios de unión se forman a partir de la interacción de dos proteínas transmembranales, el receptor a neurotrofinas^a (p75^{NTR}) y un miembro de la familia de cinasas que fosforilan proteínas en residuos de tirosina (cinasas de tirosina) TrkA (p140^{trk})²³⁷.

Al identificar a nivel molecular estas dos proteínas, se pensó que cada sitio de unión a NGF correspondería a una de ellas. Sin embargo, al analizar la afinidad de p75 y TrkA cuando son expresadas individualmente, se observó que las dos proteínas presentan una K_d similar ($\approx 10^{-9}M$), que corresponde al sitio de baja afinidad; mientras que la expresión simultánea de los dos receptores da lugar a la aparición del sitio de alta afinidad ($K_d=10^{-11}M$)²³⁸. Esto sugiere que la formación de este sitio de alta afinidad se debe a la interacción de las dos proteínas²³⁷.

Se han propuesto dos modelos de interacción entre p75 y TrkA para la formación del sitio de alta afinidad a NGF. El primero de ellos propone que p75 es una proteína presentadora de NGF, que captura al factor de crecimiento debido a su capacidad de asociación rápida, con lo que aumenta la concentración efectiva de NGF en la vecindad de TrkA o bien transfiere el factor hacia TrkA²³⁷, de manera similar al mecanismo de acción propuesto para los receptores a factor de necrosis tumoral²³⁹ (TNF). Este modelo implica que no existe interacción directa entre los dos tipos de receptores, ya que el NGF es compartido por los dos tipos de receptores.

El otro modelo de formación del sitio de alta afinidad a NGF propone que la interacción de p75 con TrkA modifica la conformación tridimensional de

^a Originalmente se denominó receptor a NGF a la proteína p75. Sin embargo, dada su capacidad de unión a todos los miembros de la familia de neurotrofinas, se ha propuesto este cambio de nomenclatura.

este último receptor, con lo cual se crea en TrkA el sitio de alta afinidad²³⁷. Varios hallazgos experimentales apoyan esta hipótesis, ya que se ha demostrado una asociación directa entre los dos receptores (condición indispensable en este modelo).

Esta asociación directa ha sido demostrada por experimento de coprecipitación de p75 y TrkA con anticuerpos²⁴⁰, y al observar que TrkA evita la movilización de p75 en la membrana plasmática. Esta inmovilización de p75 depende de la expresión correcta de su región intracelular, al igual que la expresión correcta del dominio intracelular de TrkA. Aún más, la asociación de p75 y TrkA se lleva a cabo en ausencia de NGF, lo que implica que la presencia de esta molécula no es necesaria para la asociación de sus receptores²⁴¹.

Además de originar los sitios de alta afinidad, la interacción entre los dos tipos de receptores a NGF puede ser necesaria para regular las señales de transducción producidas en respuesta a este factor de crecimiento, ya que cada uno de los receptores posee un sistema de transducción propio. El receptor p75 es una proteína integral de membrana de 400 aminoácidos, que fue la primera proteína con capacidad de unión a NGF en ser identificada.

Pese a esta capacidad de unión, la expresión de p75 era insuficiente para inducir sensibilidad a NGF o al menos la expresión de sitios de unión de alta afinidad²⁴². Debido a esto, se llegó a proponer que el p75 no estaba acoplada a ningún sistema de transducción de señales y solamente funcionaba como correceptor. En la actualidad se ha demostrado que la unión de neurotrofinas a p75 induce la formación de ceramida, un segundo mensajero de naturaleza lipídica, que a su vez induce la activación del factor de transcripción NFκB.

La activación de NFκB por otros sistemas de receptores, como los receptores a TNF, esta relacionada con la inducción del programa apoptótico en las células blanco²⁴³. Algo similar ocurre con el p75, pero sólo en ausencia de TrkA; ya que en células donde se expresa p75 individualmente, el NGF induce muerte celular²⁴⁴. Sin embargo, cuando las células blanco expresan simultáneamente p75 y TrkA, la presencia de NGF impide la apoptosis, mientras que el retiro del factor de crecimiento del medio induce este proceso de muerte celular²⁴⁵. Esto sugiere que existe cierta comunicación (crosstalk) y regulación mutua entre las vías de transducción de señales de ambos receptores.

El receptor TrkA , por su parte, es una proteína transmembranal de 796 aminoácidos. Pertenece a la familia de cinasas de tirosina, que es un sistema de transducción de señales compartido por varios receptores a factores de crecimiento²⁴⁶. TrkA es el receptor responsable de asegurar la especificidad a NGF en las células blanco de este factor, ya que otros miembros de la familia Trk, como TrkB y TrkC, son receptores específicos para otras neurotrofinas. Así, TrkB es el receptor del factor de crecimiento neural derivado del cerebro, mientras que TrkC es el receptor de la neurotrofina 3²³⁶.

La expresión del TrkA es necesaria y suficiente para conferir sensibilidad a NGF en las células blanco, y gracias a esta propiedad fue identificado TrkA como receptor a este factor de crecimiento²⁴⁷. En células que expresan TrkA, el tratamiento con NGF detiene la proliferación, induce el crecimiento de neuritas y hace que las células se hagan dependientes de NGF para su supervivencia²⁴⁸. Esto se debe a la activación de varias cascadas de señales intracelulares acopladas al receptor TrkA.

El paso inicial en la transducción de señales por TrkA es la potenciación de la actividad de cinasa de tirosinas de este receptor. Se cree que esta

actividad se induce mediante el acercamiento de dos o más moléculas de TrkA, para formar dímeros. Esta dimerización es inducida por la unión de NGF, a través de sus secuencias simétricas de aminoácidos (ver sección anterior). Al estar cerca una molécula TrkA de otra, se promueve una transfosforilación, de manera que cada molécula de TrkA fosforila en tirosinas a la molécula vecina. Con esta transfosforilación se eleva al máximo la actividad de cinasa de tirosinas de TrkA²⁴⁹.

La actividad de cinasa de tirosinas es necesaria para propagar algunas señales de la cascada activada por NGF²⁵⁰; sin embargo se cree que los efectores más importantes de esta cascada son activados por complejos proteicos de anclaje a tirosinas fosforiladas. Algunas de las tirosinas que son blanco de transfosforilación en TrkA se encuentran dentro de secuencias de aminoácidos especiales, que sirven como contexto de reconocimiento a otras proteínas de señalización celular.

Estas proteínas de señalización son los activadores de varias cascadas paralelas de señales intracelulares. Todas estas proteínas tienen en común un dominio de unión a tirosinas fosforiladas, denominado SH2, por su homología con un dominio similar en el oncogene *src*²⁵¹. Al menos tres de estas proteínas con dominio SH2 se pueden encontrar asociadas a TrkA: la proteína adaptadora Shc, la fosfolipasa C- γ 1 (PLC- γ 1) y la 3-cinasa de fosfatidilinositol (PI3-cinasa)²⁵².

La unión de Shc al TrkA fosforilado desencadena una cascada de activación de proteínas G pequeñas, Ras en particular, y de cinasas de proteínas, cuyos efectores finales son las cinasas de serina/treonina MAPK y Rsk, que activan reguladores de la transcripción génica²⁵² (vía Shc-Ras). Si se inhibe la vía Shc-Ras, o se suprime alguno de sus componentes, se afecta tanto el crecimiento de neuritas inducido por NGF, como la

supervivencia celular en respuesta a este factor de crecimiento, aunque ninguno de estos dos efectos del NGF es bloqueado completamente²⁵³.

Esto implica que la acción concertada de las diferentes vías de transducción de señales es necesaria para desarrollar completamente las respuestas celulares al NGF. En este sentido, se ha observado que la activación de la vía de PI3-kinasa, en la cual se produce fosfatidilinositol 3,4 bifosfato, el cual activa a la cinasa de serina/treonina Akt, es necesaria para la elongación de los procesos neuríticos; mas no para iniciar el desarrollo de estos²⁵⁴. La activación de Akt también es necesaria para promover la supervivencia (o bien inhibir la apoptosis) en respuesta a NGF²⁵⁵.

Por último, la activación de otras vías de transducción, como la vía de PLC- γ 1 y la vía de la proteína nuclear SNT, que es uno de los principales sustratos de fosforilación directa de TrkA, pudiera ser responsable de regular la expresión de genes específicos en respuesta a NGF. Estos genes, como algunos canales iónicos y componentes de citoesqueleto, están involucrados en mantener un fenotipo neuronal y en el inicio del crecimiento de neuritas²⁵³ (ver figura 10).

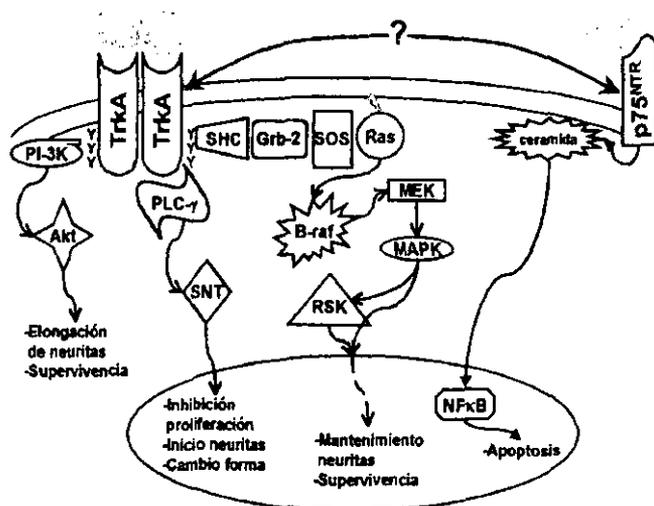


Figura 10. Cascadas de transducción de señales activadas por los receptores a NGF.

TrkA y p75^{NGFR} inducen la activación de diversas cascadas de transducción de señales. Estas vías desencadenan respuestas a nivel citoplásmico y nuclear, por lo que el NGF puede modular la transcripción de diversos genes. Estos receptores pueden interactuar a dos niveles: en membrana, para formar sitios de unión de alta afinidad y por intercomunicación de sus cascadas de transducción. Los mecanismos implicados en la interacción de los tipos de receptores no se conocen con claridad.

Por último, la comprensión de las cascadas transducción de señales en respuesta a NGF se complica todavía más, ya que además de la existencia de dos tipos de receptores con vías de transducción propias y complejas, se observa también una regulación recíproca entre las diferentes cascadas. Los mecanismos involucrados en esta regulación recíproca no son conocidos, pero se sabe que la expresión simultánea de TrkA y p75 inhibe mutuamente la acción de los receptores.

Por ejemplo, tanto TrkA como p75 son capaces de inducir apoptosis en respuesta a NGF si se expresan individualmente; sin embargo, al expresarse simultáneamente, el tratamiento con NGF no sólo inhibe la apoptosis, sino que las células tratadas con este factor de crecimiento se hacen dependientes de él para su supervivencia y mueren cuando el NGF es retirado del medio. Esto sugiere que la cascada de transducción resultante de la activación de TrkA y p75 es distinta a la simple adición de las cascadas individuales de cada receptor²⁵⁶.

Debido a esta complejidad, no se conoce completamente el mecanismo efector del NGF; sin embargo, la expresión de los receptores p75 y/o TrkA hace que distintos tipos celulares sean afectados por este factor de crecimiento. Como se mencionó en un principio, otra característica que comparten las células β pancreáticas con las neuronas es la expresión del receptor TrkA, lo que hace que las células insulares puedan ser reguladas por NGF⁴.

3.2) Regulación del fenotipo de las células β por NGF.

Entre las últimas evidencias que apoyaban un probable origen ectodérmico para las células β pancreáticas se encontraba la observación del crecimiento de procesos parecidos a neuritas, de manera espontánea cuando las células eran cultivadas *in vitro* en medios suplementados con suero. La aplicación de técnicas de biología molecular, como delección de

genes, hibridación *in situ* y RT-PCR, a la observación del desarrollo embrionario, demostró que las células β provenían del endodermo, al igual que los otros tipos pancreáticos² (ver primera sección).

Sin embargo, la relevancia de estos cambios morfológico para la fisiología de la célula β no había sido esclarecida, así como tampoco los mecanismos que regulaban el crecimiento de estos procesos. Por la similitud entre los procesos de células β con las neuritas de células derivadas de la cresta neural, se propuso que los factores neurotróficos podrían modular los cambios morfológicos de las células β .

Dado que el NGF era la neurotrofina mejor conocida, se investigó el efecto de este factor de crecimiento sobre el crecimiento de neuritas en células β . Inicialmente, se demostró que el NGF inducía el crecimiento de neuritas en líneas tumorales de células β de rata³ y más tarde se demostró este efecto en cultivos primarios de células de rata adulta y fetal¹. Esto indicaba que las células β eran sensibles al NGF, lo que sugería que este factor de crecimiento podría regular otros aspectos del fenotipo de la células β . En particular, las acciones del NGF podrían ser relevantes durante el desarrollo de las células β y para la regulación de la secreción de insulina.

Para demostrar la importancia del NGF como modulador fisiológico de la célula, primero se debe demostrar que es la sensibilidad a este factor no es una característica que las células β adquieren al ser disectadas y cultivadas *in vitro*. La expresión de receptores a NGF *in vivo* sugiere que las células pancreáticas son sensibles al NGF durante distintas etapas del desarrollo. De hecho, en etapas tempranas de la ontogenia del páncreas el receptor TrkA se expresa en células ductulares pancreáticas y conforme avanza el desarrollo la expresión se confina a las células insulares; mientras que en la etapa adulta, está expresión esta confinada a las células β ⁴.

La actividad de TrkA es importante para la formación correcta de los islotes pancreáticos; ya que en un modelo de desarrollo de islotes, un inhibidor específico de TrkA retarda significativamente su formación. Esto sugería que el NGF regulaba la acumulación de células endocrinas para formar islotes. Inclusive, se llegó a proponer que el NGF producido por células no endocrinas que rodeaban a los islotes era responsable de esta agregación, actuando como una señal paracrina⁸⁵.

Dado que las células β de rata adulta expresan TrkA, y que son sensibles al NGF, se analizaron los efectos de este factor de crecimiento sobre la secreción de insulina. En un principio, nuestro laboratorio demostró que las células tratadas con NGF continuaban sintetizando insulina y, además, los gránulos de insulina se distribuían tanto en los cuerpos celulares como en las neuritas de las células modificadas morfológicamente¹.

Estas células tratadas no sólo sintetizan insulina, sino continúan secretándola. Más aún, después de 5-7 días en cultivo, en las células β tratadas con NGF la secreción de insulina es mayor en respuesta a una concentración elevada de glucosa (20.6 mM), que en respuesta a una concentración baja (5.6 mM) de la hexosa. Esta capacidad de discriminación entre concentraciones diferentes de glucosa se pierde en las células β no tratadas conforme avanza el tiempo en cultivo¹.

El efecto del NGF sobre la discriminación entre concentraciones de glucosa se observa al tratar a las células β con la isoforma NGF7S, que como se mencionó con anterioridad, es una isoforma con actividad biológica disminuida. Estudios recientes de nuestro laboratorio (C. Sánchez y M. Hiriart, comunicación personal), demuestran que el tratamiento durante cinco días con la isoforma NGF2.5S, que prácticamente está formada por subunidades β puras, aumenta significativamente la secreción de insulina con respecto a la secreción del grupo testigo.

El NGF2.5S también tiene efectos a corto plazo sobre la secreción de insulina, ya que el tratamiento con este factor de crecimiento durante 1 hora potencia la secreción de insulina inducida por glucosa. Esta potenciación de la secreción de insulina a corto y largo plazo se observa tanto en una concentración baja de glucosa (5.6 mM), como en una elevada (20.6 mM). Estos resultados sugieren que el NGF es un modulador importante de la secreción de insulina.

Esta modulación podría darse a distintos niveles, tanto por la interacción de señales intracelulares producidas por la activación de TrkA y por el metabolismo de glucosa, como por efectos del factor de crecimiento sobre la actividad eléctrica de las células β . Existen evidencias que indican que la glucosa y el NGF estimulan la actividad de la cinasa MAPK en la línea celular INS1, derivada de un insulinoma de rata. Este aumento en actividad está relacionado con la potenciación por NGF de la secreción de insulina inducida por una concentración elevada de glucosa²⁵⁷ (15 mM).

La activación de cinasas de proteínas, como MAPK, por glucosa y NGF sugiere una intercomunicación (crosstalking) de las vías de señalización activadas por estas dos moléculas. Esta intercomunicación podría tener injerencia sobre la exocitosis de los gránulos de insulina, y de esta manera explicar la potenciación de la secreción de insulina. Sin embargo, esta potenciación también podría explicarse por efectos de las cinasa de proteínas a otros niveles de la fisiología de la célula β ; ya que MAPK está implicada en la regulación de la expresión génica por NGF. Además, en la cascada de activación de MAPK participa un gran variedad de cinasas de proteínas (como se vio en la sección anterior).

La actividad de estas cinasas de proteínas podría afectar la actividad de canales iónicos en la membrana de la célula β ²⁵⁸. Además, la activación de MAPK podría inducir la transcripción de los genes que codifican para

canales iónicos. Estos dos procesos, en conjunto, modificarían la actividad eléctrica de la célula, un efecto del NGF que ha sido observado en otros tipos celulares²⁵⁹, lo que a su vez modularía la secreción de insulina.

Experimentos de nuestro laboratorio demostraron que el tratamiento durante 5-7 días con NGF aumenta la densidad de corriente de Na⁺ de las células β . Este aumento en densidad de corriente de sodio no es acompañado por cambios en la dependencia al voltaje de la activación ni la inactivación en estado estacionario de la corriente⁸. Estas observaciones sugieren que existe un aumento en el número de canales de sodio presentes en la membrana de las células β en respuesta al NGF (ver figura 11).

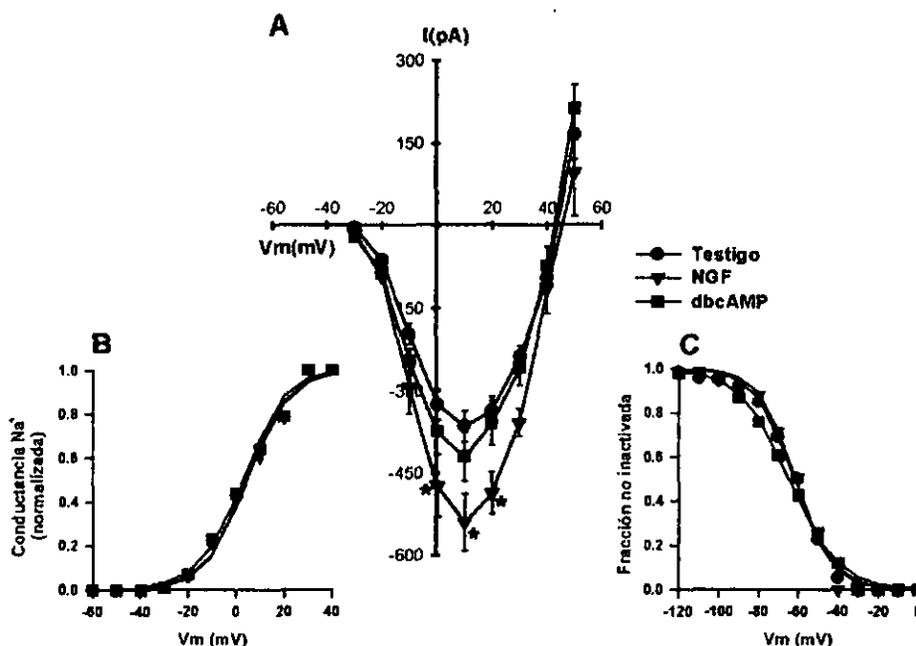


Figura 11. El NGF aumenta la corriente de sodio de células β .

A) Relación I-V de la corriente de Na⁺ de células β después de 5-7 días en cultivo. Las células tratadas con NGF (\blacktriangledown) presentan una corriente de sodio \approx 50% mayor que las células del grupo testigo (\bullet). El tratamiento con dbAMPc (\blacksquare) no modifica significativamente la magnitud de esta corriente (* $P < 0.01$ vs grupo testigo, pruebas de ANOVA y Fisher). B) Dependencia al voltaje de la activación de la corriente de Na⁺. C) Dependencia al voltaje de la inactivación en estado estacionario de la corriente de Na⁺. Ninguno de los tratamientos afecta significativamente estas dos características de la corriente de Na⁺ de células β . Esto sugiere que en los tres grupos, la corriente de Na⁺ es conducida por el mismo tipo de canal iónico. (Modificada de Rosenbaum et al.⁸)

Recientemente, también hemos descrito un aumento en la densidad de corriente de calcio tipo L de las células β inducido por NGF¹⁹⁹. Este aumento se observa en células tratadas durante 5-7 días con el factor de crecimiento, al igual que en células tratadas durante periodos cortos, es decir, en células cultivadas durante 24 horas y expuestas durante 5 minutos previos al registro a NGF (T. Rosenbaum, tesis doctoral).

Los aumentos en las densidades de corrientes iónicas podrían afectar el patrón de disparo del potencial de acción de las células β . Estos posibles cambios en la actividad eléctrica podrían estar relacionados con la potenciación de la secreción de insulina promovida por NGF. Por esta razón, es necesario comprender los mecanismos involucrados en el aumento de la densidad de corrientes iónicas inducido por NGF y analizar los posibles efectos de estas corrientes aumentadas sobre la actividad eléctrica de células β pancreáticas.

"... Y ES QUE NO HAY NADA MEJOR QUE IMAGINAR, LA FÍSICA ES UN PLACER. Y ES QUE NO NADA MEJOR QUE FORMULAR, ESCUCHAR Y OIR A LA VEZ. MIDE EL ÁNGULO FORMADO POR TI Y POR MÍ, ES LA SOLUCIÓN A ALGO MUY COMÚN AQUÍ. AHORA TÚ NO DEJES DE HABLAR; SOMOS COORDENADAS DE UN PAR, INCÓGNITA QUE AÚN FALTA POR DESPEJAR."

NACHA POP (UNA DÉCIMA DE SEGUNDO, 1983)

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Existen muchas evidencias experimentales que sugieren que el NGF es un modulador importante de la fisiología de las células β pancreáticas, en particular, de la secreción de insulina. La potenciación por este factor de crecimiento de la secreción podría deberse a cambios en la actividad eléctrica de las células β , ya que el NGF aumenta la densidad de corriente de sodio, así como la de calcio.

Por lo dicho anteriormente, es necesario conocer los mecanismos responsables de este aumento en densidad de corriente. Así mismo, también es importante evaluar la posibilidad que estas corrientes aumentadas induzcan cambios en el patrón de disparo de potenciales de acción de las células β . En el presente trabajo estudiaremos en particular los mecanismos involucrados en el aumento en densidad de corriente de sodio y el papel que desempeña esta corriente durante el disparo del potencial de acción de las células β , ya que recientemente hemos demostrado que el NGF modula esta corriente⁸.

Además, es indispensable saber si estas células pueden estar expuestas al NGF in vivo, con el fin de saber que tan relevante es el papel de este factor de crecimiento como regulador de la célula β en el islote pancreático.

En este trabajo nos proponemos estudiar los procesos celulares involucrados en el aumento de densidad de corriente de sodio inducido por NGF en las células β . Este aumento podría deberse a un incremento en el número de canales activables en la membrana plasmática de las células β , de manera similar a lo sucedido en otros tipos celulares sensibles a NGF²⁶⁰.

También evaluaremos la participación de la corriente de sodio, la cual no ha sido esclarecida hasta ahora, en el potencial de acción de células β pancreáticas de rata, ya es probable que una corriente de sodio aumentada modifique el patrón de disparo de estos potenciales de acción.

Por último, nos proponemos identificar una fuente pancreática de NGF, al cual pudieran estar expuestas las células β in vivo; ya que en muchos sistemas celulares, esta neurotrofina actúa a distancias cortas, de manera paracrina²²³.

Para llevar a cabo esto, planteamos los siguientes objetivos:

1. Analizar el papel que desempeña la síntesis de canales de sodio en el aumento en densidad de corriente inducido por NGF.
 - 1.1. Evaluar el efecto de inhibidores de síntesis proteica sobre este aumento en densidad de corriente.
 - 1.2. Evaluar el efecto de inhibidores de transcripción sobre este aumento en densidad de corriente.
 - 1.3. Analizar el efecto del NGF sobre la transcripción de RNAm que codifica para canales de sodio de células β .

2. Evaluar la participación de la corriente de sodio aumentada en el potencial de acción de las células β .
 - 2.1. Caracterizar el potencial de acción de células β de rata bajo la técnica de registro de "parche perforado".
 - 2.2. Analizar la participación de la corriente de sodio en el potencial de acción de las células β .
 - 2.3. Analizar la participación de la corriente de sodio en el potencial de acción de células β tratadas con NGF.
3. Identificar una fuente pancreática de NGF.
 - 3.1. Analizar la expresión de NGF en cultivos primarios de células β pancreáticas.
 - 3.2. Caracterizar la secreción de NGF en cultivos primarios de células β pancreáticas.

*"WELL I'LL SPEAK TO MACHINES WITH THE VOICE OF HUMANITY,
SPEAK TO THE WISE WITH THE VOICE OF INSANITY, SPEAK TO
THE PRESENT IN THE PAST AND FUTURE TENSE. I'LL SPEAK TO A
SLAVE WITH THE VOICE OF OBEDIENCE.*

*I STOLE A FIRE BUT IT BURNED UP MUCH TOO SOON,
I TOOK A LEAP AND I LANDED ON THE MOON."*

MARILLION (*MAN OF A THOUSAND FACES*, 1997)

III. MATERIAL Y METODOS

1. MATERIAL

Los reactivos se obtuvieron de las siguientes fuentes:

Colagenasa tipo IV de Worthington (Freehold, NJ, USA); suero bovino fetal (SBF), solución salina balanceada de Hanks (HBSS) y soluciones de gentamicina y penicilina-estreptomina de Gibco (Grand Island, NY, USA); albúmina de suero bovino (BSA), medio RPMI 1640, D-[+]-glucosa, solución dispersante, sal de Spinner-Eagle, NGF 2.5S y antisueros contra NGF 2.5S de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA); antisuero contra insulina de Incstar Corp. (Stillwater, Mi, USA); reactivos para inmunocitoquímica de Vector Labs. (Burlingame, CA, USA); Anestosal (Pentobarbital sódico) de Smith Kline (Norden de México); reactivos para reacción de polimerasa de Perkin Elmer de México (México, D.F.); reactivos para prueba de ELISA de NGF de Promega (USA).

2. MÉTODOS

2.1) Cultivo de células β .

Los islotes pancreáticos fueron obtenidos de ratas Wistar machos de 250-280 g de peso, siguiendo un protocolo descrito con anterioridad¹. El cuidado de los animales se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo publicado en "NIH guide for the care and use of laboratory animals" (National Institute of Health Publication No. 85-23, revisada 1985).

El protocolo consiste, de manera abreviada, en lo siguientes: Los páncreas son insuflados con solución salina balanceada de Hanks, con 0.1 % (peso/vol) de albúmina sérica bovina y gentamicina. Después, los páncreas son macerados mecánicamente y digeridos con colagenasa tipo IV (0.5 mg/ml), para posteriormente someter el tejido a un gradiente de Ficoll. De este gradiente se recupera la interfase superior, que contiene a los islotes pancreáticos libres de tejido acinar.

Los islotes son lavados con solución de Hanks y digeridos con tripsina (2.5 mg/ml) disuelta en solución salina balanceada de Spinner, durante 10 minutos. Una vez que las células insulares están dispersas, son cultivadas en medio RPMI-1640, suplementado con 5 % de suero bovino fetal (SBF), 200 U/ml de penicilina G, 200 μ g/ml de estreptomicina y 0.5 μ g/ml anfotericina B.

Con el fin de obtener cultivos en donde predominarán las células insulares y con un bajo número de fibroblastos, las células se precultivaron durante una noche en cajas de cultivo que ofrecen baja adherencia a las células del islote. De esta manera los fibroblastos quedarán adheridos a las cajas y las células insulares podrán ser cosechadas y sembradas en cajas que ofrecen alta adherencia por el resto del tiempo en cultivo.

Para estudiar los efectos del NGF sobre los canales de sodio, las células fueron tratadas con 50 ng/ml de NGF 2.5S, que corresponden aproximadamente a una concentración de 1.7 nM. En algunos experimentos las células fueron tratadas con 5 mM de monofosfato cíclico de dibutiriladenosina (dbAMPc), o la mezcla de las dos moléculas. Estas concentraciones son las más utilizadas en otros modelos celulares para observar los efectos de estos dos factores sobre la fisiología celular¹.

La concentración de NGF utilizada se encuentra dentro del rango de la constante de afinidad de los receptores de NGF (10^{-11} - 10^{-9} M); mientras que la concentración de dbAMPc permitió realizar los experimentos sin afectar la viabilidad celular, porque con concentraciones mayores se observa mortandad celular. El grupo testigo no recibió tratamiento alguno.

2.2) Registro electrofisiológico.

Se llevaron a cabo registro electrofisiológicos mediante la técnica de fijación eléctrica en microáreas de membrana (patch-clamp), tanto para registros de voltaje, como de corriente. Los registros se llevaron a cabo en células cultivadas durante 5 días en condiciones testigo o con NGF. Se fabricaron microelectrodos de registro 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 M Ω .

Se utilizaron dos configuraciones de la técnica de fijación: de célula completa (whole cell) y de parche perforado (perforated patch). La configuración de célula completa consiste en formar un sello de alta resistencia (gigaohms) 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, lo que hace posible el registro de las corrientes iónicas macroscópicas.

Para la configuración de parche perforado se hace un sello de alta resistencia de manera similar, pero la continuidad entre el interior de la pipeta y la célula se logra por medio de anfotericina B, la cual forma pequeños poros en la membrana que permiten el registro electrofisiológico. Esta técnica evita el intercambio de todo el contenido celular por el medio interno de la pipeta, por lo que el metabolismo celular permanece intacto, a diferencia de la configuración de célula completa.

La generación de pulsos y la adquisición de datos fue controlada por medio de un amplificador Axopatch 200A, conectado por una interfaz Tl-200 a una computadora. Los datos fueron adquiridos y analizados con el programa Pclamp, versión 6.2.

Para la obtención de las relaciones entre corriente y voltaje (curvas I-V), se aplicaron pulsos despolarizantes de -40 mV a +40 mV con incrementos de +10 mV, desde un potencial de mantenimiento de -80 mV. Para el registro de potencial de membrana mediante la técnica de fijación de corriente se utilizaron estímulos de 2nA.

Las soluciones de registro fueron las siguientes:

Solución externa: 130 mM NaCl, 5 mM KCL, 2.5 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, pH=7.4, 295-300 mosm/kg. Para el registro de fijación de voltaje esta solución contenía además 10 mM glucosa, mientras que para el registro de fijación de corriente contenía 10 mM glucosa o bien 20 mM. En este último caso se ajustaba la osmolaridad disminuyendo 10 mM de KCL.

Solución interna para registro en célula completa: 120 mM CsAsp, 10 mM NaCl, 5 mM CsF, 10 mM HEPES, 2.5 mM BAPTA, pH=7.35, 290-295 mosm/kg. El uso de Cs⁺ permite el registro de corrientes catiónicas entrantes al bloquear las corrientes salientes de K⁺.

Solución interna para registro en parche perforado: 140 mM KCl, 5 mM NaCl, 5 mM NaF, 2 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, 0.25mg/ml Anfotericina B.

2.3) RT-PCR para medición de RNAm.

Se utilizó la técnica de RT-PCR para determinar la expresión de NGF y para evaluar los efectos del tratamiento con NGF sobre los niveles en estado estacionario de RNAm para la subunidad α tipo III de canal de sodio. El RNA de células β fue obtenido al lisar a las células en reactivo TRizol²⁶¹ (1ml/10⁶ células). De manera breve, la técnica de RT-PCR consiste en realizar una transcripción reversa de RNA a DNA con la enzima transcriptasa reversa.. Posteriormente, se lleva a cabo una amplificación del cDNA de interés utilizando la polimerasa Taq y los oligonucleótidos específicos para cada gene.

Para establecer la identidad del producto de amplificación y realizar mediciones de niveles de RNAm, los productos fueron separados por electroforesis; para después ser transferidos a una matriz de nylon, para poder ser hibridados con un oligonucleótido interno. La secuencia de este oligonucleótido interno está incluida dentro del producto de amplificación.

Se diseñaron oligonucleótidos de 17-20 bases a partir de las secuencias reportadas para los genes de NGF, subunidad α tipo III y GAPDH. Este último gene se utilizó como control interno de expresión, con el fin de llevar a cabo reacciones semicuantitativas.

Se llevaron a cabo 25 ciclos de amplificación para asegurar la cuantificación de la cantidad inicial de RNAm para cada uno de los genes, ya que bajo estas condiciones, la reacción de amplificación no alcanza la meseta de saturación.

Las secuencias utilizadas fueron las siguientes:

Para la subunidad α tipo III, la secuencia del oligonucleótido en sentido (5') fue 5'-GCCGAAATGGTCCTTAA-3'; mientras que la secuencia antisentido (3') fue 5'-GGGTGGAGCAAGATCAA-3'. La temperatura de alineamiento para este par de oligonucleótidos fue de 57° C. La secuencia del oligonucleótido interno para hibridación fue 5'-ACGGGCATCGAAATAAG-3'.

Para NGF, la secuencia sentido fue 5'-GGCATGCTGGACCCAAGCTC-3' y la secuencia antisentido fue 5'-GCGCTTGCTCCGGTGAGTCC-3'. La temperatura de alineamiento para este par de oligonucleótidos fue de 59° C. La secuencia interna para hibridación fue 5'-ATCTAGACTTCCAGGCC-3'.

Para GAPDH, la secuencia sentido fue 5'-GCCCCCATGTTTGTGAT-3' y la secuencia antisentido fue 5'-GCCCCAGCATCAAAGGT-3'. La temperatura de alineamiento para este par de oligonucleótidos fue de 57° C. La secuencia del oligonucleótido para hibridación fue 5'-GTGGATCTGACATGCCG-3'.

2.4) Inmunocitoquímica.

Las células insulares fueron fijadas en paraformaldehído al 4% (peso/vol) en solución salina amortiguada por fosfatos (PBS). Posteriormente, se permeabilizaron con Tritón X100 al 0.01% (vol/vol) en solución salina amortiguada por TRIS (TBS). Una vez permeabilizadas, las células fueron incubadas durante una noche con antisuero de conejo contra NGF y antisuero de cobayo contra insulina, a las concentraciones recomendadas por los fabricantes.

Posteriormente, las células fueron incubadas durante 1 hora con antisuero de cabra contra IgG de conejo marcado con CY5 (excitación=650 nm, emisión=670 nm), para la detección de NGF y con antisuero de cabra contra IgG de cobayo marcado con FITC (excitación=494 nm, emisión=520 nm), para la detección de

insulina. Las células fueron observadas bajo microscopía confocal, utilizando el canal rojo para el CY5 (NGF) y el canal verde para FITC (insulina).

2.5) Detección de secreción de NGF por células β .

La secreción de NGF se determinó por medio de análisis inmunoenzimático (ELISA) de dos sitios. Las mediciones se realizaron de acuerdo con el protocolo del fabricante, utilizando los sobrenadantes de cultivos de células β o de islotes pancreáticos, incubados por 4h en solución salina de Hanks, con glucosa 5 mM, 11 mM o 20 mM de glucosa.

El protocolo de ELISA consiste, de manera breve, en incubar durante 16 horas placas de plástico con una solución de antisuero contra NGF (10 μ g/ml) en solución amortiguadora de carbonatos (pH=8.7). Posteriormente estas placas son lavadas con TBS adicionado con Tween-20 0.5% (vol/vol), para después añadir los sobrenadantes de cultivos e incubarlos en las placas durante 16 horas. Al día siguiente, las placas son lavadas de nuevo con TBS-Tween e incubadas durante 2 horas con un anticuerpo monoclonal contra NGF unido a peroxidasa. La reacción se revela con 3,3',5,5' tetrametil bencidieno (TMB) y se lee a 450 nm.

2.6) Bioensayo con células PC12.

Las células β fueron precultivadas durante 24 horas bajo condiciones testigo, para asegurar la adhesión a las cajas de cultivo. Posteriormente, las células fueron cultivadas 24 horas más en un medio químicamente definido, con el fin de obtener un medio condicionado por células β . El medio definido consistió en medio RPMI 1640 suplementado con solución de insulina-transferrina-selenita de sodio (1:100), putrescina (100 μ M) y progesterona (20nM).

Se cultivaron células PC12 durante 24 horas en los medios condicionados por células β y al final de esta incubación, las células PC12 fueron teñidas por

inmunocitoquímica para TrkA y se contó el porcentaje de células que extendieron neuritas. Para determinar la especificidad de los efectos biológicos, algunos cultivos de células PC12 se realizaron con medios condicionados en presencia de un anticuerpo contra NGF.

2.7) Análisis estadístico.

Todos los datos se expresan como la media \pm error estándar de la media (ESM). Para la validación estadística de los experimentos se utilizó el programa Number Cruncher Statistical System (NCSS v 4.2, Dr. Jerry L. Hintze, Kaysville, UT, USA, 1983), llevando a cabo las pruebas de análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía, seguida por la prueba de Fisher. También se evaluó la significancia estadística con la prueba *t* de Student para datos no apareados.

*"AND ALL THAT IS NOW
AND ALL THAT IS GONE
AND ALL THAT'S TO COME
AND EVERYTHING UNDER THE SUN IS IN TUNE
BUT THE SUN IS ECLIPSED BY THE MOON."
PINK FLOYD (ECLIPSE, 1973)*

IV. RESULTADOS

1. PAPEL DE LA SÍNTESIS PROTEICA EN EL AUMENTO DE DENSIDAD DE CORRIENTE DE Na⁺ DE CÉLULAS β .

El NGF induce un aumento de aproximadamente el 70% en la densidad de corriente de células β , con respecto al grupo testigo (ver figura 11). Esta corriente aumentada presenta la misma dependencia al voltaje en la activación y la inactivación en estado estacionario que la corriente de Na⁺ de células del grupo testigo. Esto sugiere que en ambos grupos, las corrientes de sodio son conducidas por el mismo tipo de canales y que el aumento en densidad de corriente inducido por NGF se debe al incremento en el número de canales activables en la membrana plasmática de las células β .

El incremento en el número de canales podría deberse a la síntesis de nuevos canales, que se insertaran en la membrana y contribuyeran a una corriente de Na⁺ mayor, tal como sucede en otros tipos celulares sensibles a NGF. Para analizar esta primera hipótesis, registramos las corrientes de sodio de células β cultivadas durante 5-7 días en presencia de NGF y cicloheximida (10 μ g/ml), que es un inhibidor de síntesis proteica²⁶².

Como se puede ver en la figura 12, el tratamiento con cicloheximida (CHX) inhibe el efecto del NGF sobre la corriente de sodio de células β , ya que no existen diferencias significativas entre la relación corriente-voltaje (I-V) de células β del grupo testigo y la relación de células tratadas con NGF+CHX.

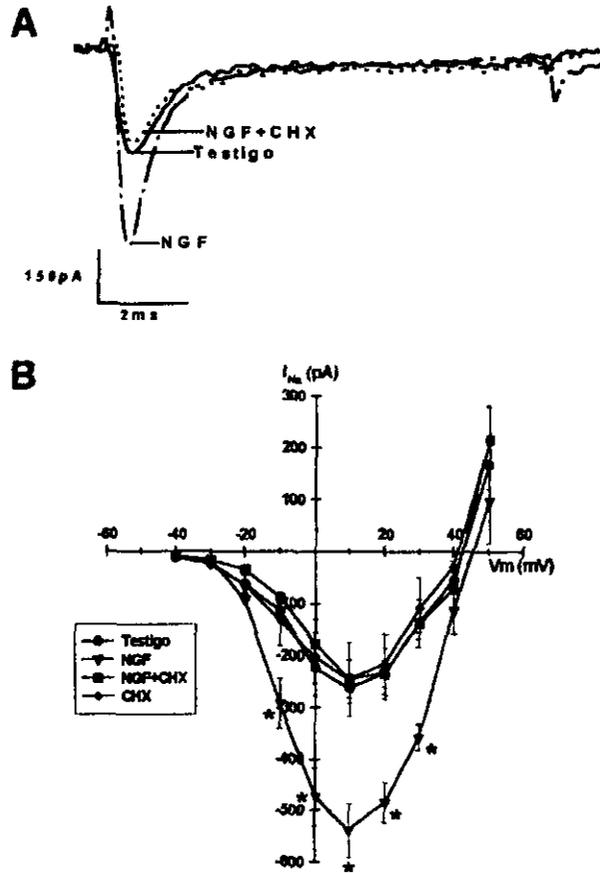


Figura 12. Efectos de la cicloheximida sobre el aumento de densidad de corriente de Na^+ inducido por NGF en células β pancreáticas.

Las células β fueron cultivadas durante 5-7 días bajo condiciones testigo o bien bajo tratamiento con NGF y/o CHX. A) Corrientes de Na^+ de células β , producidas en respuesta a un pulso despolarizante a +10 mV. Se observan registros representativos de los diferentes grupos experimentales. B) Relación I-V de las células en los diferentes grupos experimentales. Como se puede ver, la CHX inhibe el aumento en la corriente de Na^+ inducido por NGF. (* $P < 0.01$ vs todos los grupos; pruebas de ANOVA y Fisher)

El tratamiento con CHX sola no afecta la corriente de Na^+ de células β , ya que tampoco existen diferencias significativas entre la relación I-V del

grupo de células testigo y la de células tratadas con CHX, lo que indica que el efecto de la CHX es debido a la inhibición de la síntesis proteica y no a un bloqueo de canales de sodio. El efecto antagónico entre la CHX y el NGF sobre la magnitud de la corriente macroscópica de sodio se refleja en la densidad membranal de esta corriente. Esto se debe a que el tratamiento con CHX no induce cambios en la capacitancia de las células β (ver Tabla 1).

Tabla 1. Efectos de CHX y ActD sobre la densidad de corriente de sodio.

Grupo	Capacitancia (pF)	Densidad (pA/pF)	n
Testigo	8.3 ± 0.6	-31.8 ± 5.6	27
NGF	8.6 ± 0.8	-62.7 ± 7.2*	27
CHX	8.7 ± 0.8	-28.6 ± 7.9	14
ActD	8.4 ± 0.4	-31.1 ± 2.9	13
NGF+CHX	8.3 ± 0.3	-29.7 ± 4.4	14
NGF+ActD	8.5 ± 0.6	-30.5 ± 3.5	13

Esta tabla muestra el efecto del tratamiento con CHX y ActD sobre la densidad de corriente de sodio de células β cultivadas durante 5-7 días. (n=número de células registradas para cada grupo; * $P < 0.01$ vs todos los grupos; pruebas de ANOVAS y Fisher)

Además, el tratamiento con CHX no modifica la dependencia al voltaje de la activación, ni la inactivación en estado estacionario de la corriente de sodio. Esto sugiere la corriente de sodio es conducida por los mismos canales (ver figura 13). Estos resultados, en conjunto, demuestran que la síntesis de proteínas es necesaria para que el NGF induzca el aumento en

densidad de corriente de sodio, lo que apoya la hipótesis que el NGF promueve la síntesis de más canales de sodio en las células β .

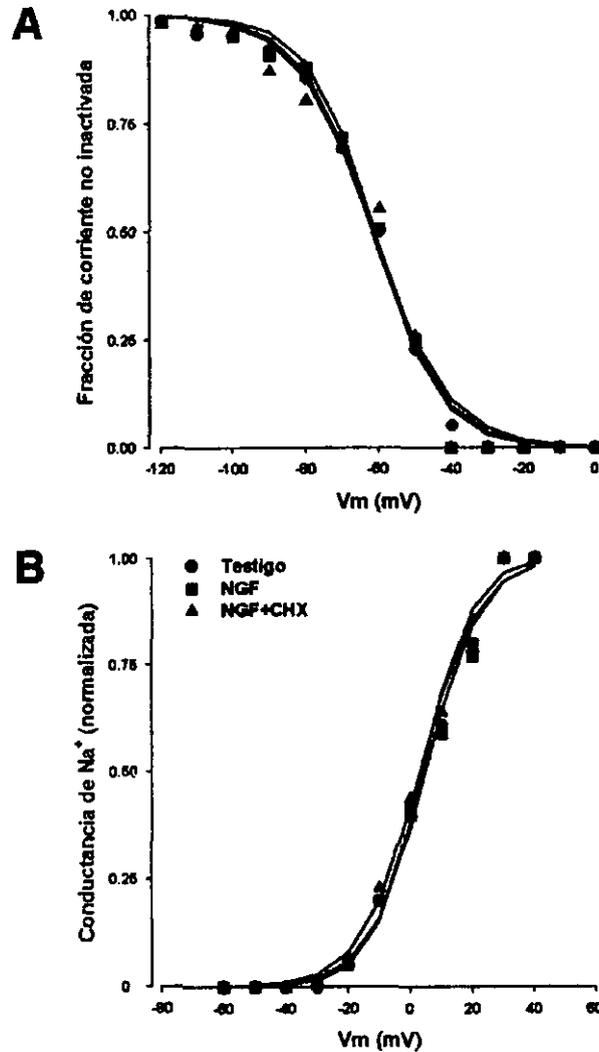


Figura 13. Efectos de la CHX sobre la activación e inactivación en estado estacionario de la corriente de Na^+ de células β .

Como muestra esta figura, no existen diferencias significativas entre las curvas de activación o inactivación en estado estacionario de células β testigo, tratadas con NGF o con NGF y CHX. A) Activación de la corriente de sodio. B) Inactivación en estado estacionario de la misma corriente.

2. PAPEL DE LA TRANSCRIPCIÓN DE RNAm EN EL AUMENTO EN DENSIDAD DE CORRIENTE DE NA⁺.

Dado que la síntesis proteica es necesaria para que el tratamiento con NGF aumente la densidad de corriente de sodio, decidimos analizar la contribución de la transcripción génica en este proceso, ya que el NGF podría inducir un incremento en la cantidad de RNAm para canales de sodio, que al traducirse darían lugar a un mayor número de canales de sodio en la membrana plasmática de las células β .

En primera instancia, analizamos el efecto de un bloqueador de transcripción sobre el aumento en densidad de corriente de Na⁺ inducido por NGF. Para esto, cultivamos a las células β durante 5-7 días en presencia de NGF y/o 4 μ g/ml actinomicina D²⁶², que es un inhibidor de la transcripción génica.

Como se puede ver en la figura 14, el tratamiento con ActD impide que el NGF aumente la corriente de sodio de células β . Así mismo, no se observan cambios significativos con respecto al grupo testigo en la relación I-V de células tratadas solamente con ActD.

Como era esperable, el tratamiento con ActD impide el aumento en densidad de corriente de sodio inducido por NGF, ya que no existen diferencias significativas entre la capacitancia promedio de las células de cada grupo experimental, es decir células testigo, células tratadas con ActD o NGF, o bien con NGF+ActD (ver Tabla 1).

El tratamiento con ActD tampoco modifica la dependencia al voltaje de la activación ni de la inactivación en estado estacionario de la corriente de sodio (ver figura 15), lo que sugiere que la corriente de sodio es conducida por los mismos canales de sodio. Estos resultados, en conjunto,

demuestran que la transcripción génica es necesaria para el aumento en densidad de corriente de sodio.

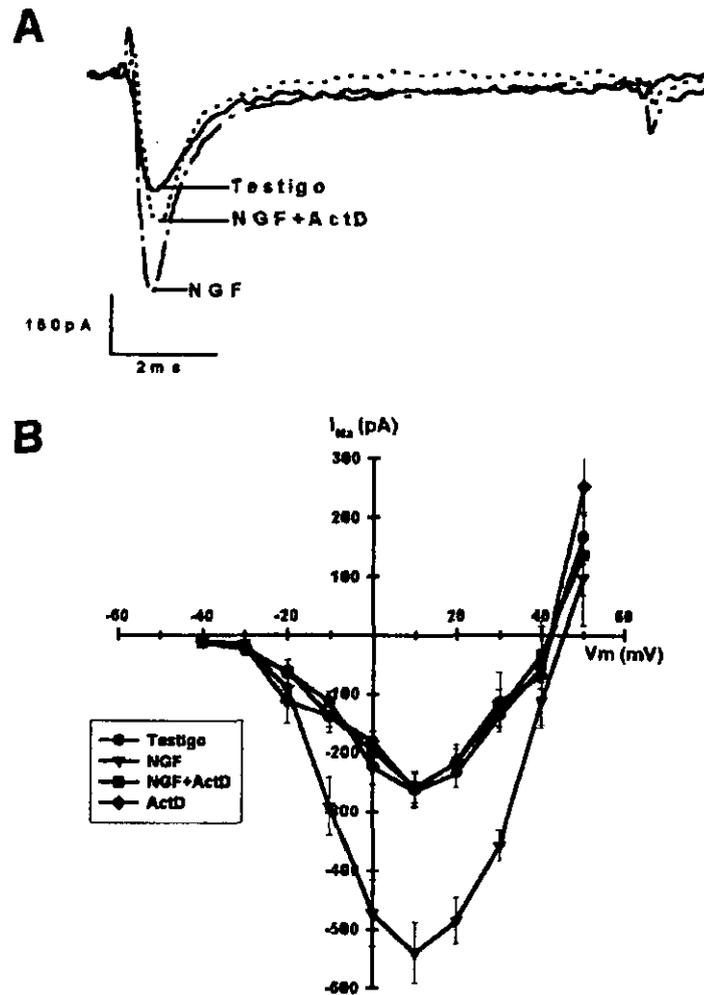


Figura 14. Efectos de la actinomicina D sobre el aumento de densidad de corriente de Na⁺ inducido por NGF en células β pancreáticas.

Las células β fueron cultivadas durante 5-7 días bajo condiciones testigo o bien bajo tratamiento con NGF y/o ActD. A) Corrientes de Na⁺ de células β , producidas en respuesta a un pulso despolarizante a +10 mV. Se observan registros representativos de los diferentes grupos experimentales. B) Relación I-V de las células en los diferentes grupos experimentales. Como se puede ver, la ActD inhibe el aumento en la corriente de Na⁺ inducido por NGF. (* $P < 0.05$ vs todos los grupos; pruebas de ANOVA y Fisher)

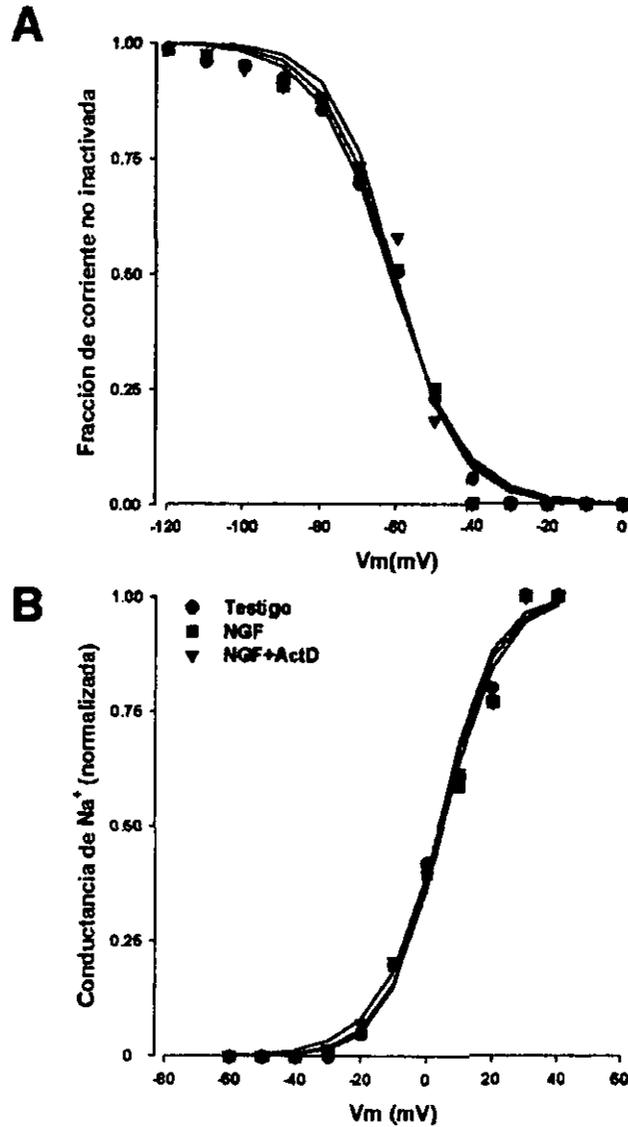


Figura 15. Efectos de la ActD sobre la activación e inactivación en estado estacionario de la corriente de Na⁺ de células β .

Como muestra esta figura, no existen diferencias significativas entre las curvas de activación o inactivación en estado estacionario de células β testigo, tratadas con NGF o con NGF y ActD. A) Activación de la corriente de sodio. B) Inactivación en estado estacionario de la misma corriente.

Los resultados de registro electrofisiológico en células tratadas con CHX o ActD demuestran que la síntesis proteica y la transcripción génica son necesarias para que el NGF induzca el incremento en la densidad de corriente de sodio; sin embargo, estos registros no demuestran que el NGF afecte la síntesis de canales de sodio. Esto se debe a que el NGF podría estar induciendo la síntesis de una proteína accesoria o bien, una moduladora, que modificara la actividad de los canales de sodio en la membrana plasmática de las células β . Ante la falta de esta proteína, por el tratamiento con los inhibidores, no sería posible observar el aumento en densidad de corriente de sodio.

Por esta razón, resultaba indispensable analizar el efecto del NGF sobre la síntesis de canales de sodio. Sin embargo, en nuestro modelo experimental resulta prácticamente imposible medir la producción de las proteínas que forman los canales de sodio, ya que para esto se necesita purificar grandes cantidades de proteína, lo cual no es sencillo en cultivos primarios.

Debido a esta dificultad técnica, decidimos analizar el efecto del NGF sobre el nivel en estado estacionario de RNAm para la subunidad α de canales de sodio de células β . Esta subunidad es la responsable de formar el poro iónico y por ello, es la única subunidad indispensable para la expresión de los canales de sodio. Además, los experimentos con actinomicina D sugerían que el aumento en la síntesis de canales de sodio podría comenzar desde la transcripción génica.

Para poder analizar este efecto del NGF, decidimos utilizar la técnica de reacción en cadena de polimerasa acoplada a transcripción reversa (RT-PCR), que es una técnica semicuantitativa que permite analizar el nivel de un RNAm específico a partir de cantidades pequeñas ($<1\mu\text{g}$) de RNA total. Las reacciones de RT-PCR se llevaron a cabo con 200ng de RNA total extraído de células β cultivadas durante 5-7 días bajo condiciones testigo o

bien, tratadas con NGF y/o dbAMPc. Esta última molécula se utilizó debido a que es un análogo permeable de AMPc, que al igual que el NGF induce el crecimiento de procesos parecidos a neuritas en células β ; pero no induce el aumento en densidad de corriente de sodio (ver figura 11).

Como cebadores (primers), se utilizaron oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia reportada para la subunidad α tipo III de canales de sodio de cerebro de rata, ya que la expresión de este tipo de subunidad α ya había sido reportada en células β de rata²¹⁹.

Como se puede ver en la figura 16, el NGF aumenta ≈ 2 veces el nivel de RNAm para la subunidad α tipo III. Esto demuestra que el NGF modifica específicamente la cantidad de RNAm para subunidad α tipo III. Esta mayor cantidad de RNAm, al ser traducido, sería responsable de una síntesis elevada de canales de sodio. Este mayor número de canales serían a su vez responsables del aumento en densidad de corriente de sodio, al ser llevados a la membrana plasmática de las células β .

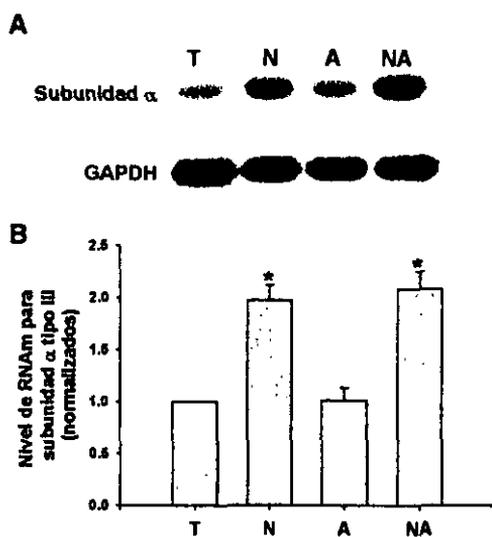


Figura 16. Efectos del NGF sobre los niveles en estado estacionario de RNAm para subunidad α tipo III de canal de sodio.

A) Reacción de RT-PCR para subunidad α tipo III y GAPDH a partir de RNA total de los cuatro grupos experimentales (T=testigo, N=NGF, A=dbAMPc, NA=NGF+ dbAMPc). **B)** Niveles de RNAm para subunidad α tipo III en los cuatro grupos, normalizados con respecto al grupo testigo. La reacción de RT-PCR para GAPDH se utilizó para normalizar la cantidad de RNA total en las reacciones para subunidad α . No existe diferencia significativa entre los grupos N y NA (* $P < 0.01$ vs T y A; prueba *t* de Student; $n=5$).

Por su parte, el tratamiento con dbAMPc no modificó significativamente el nivel de RNAm para subunidad α tipo III. Este resultado correlaciona con los registro electrofisiológicos, ya que el dbcAMP no aumenta la densidad

de corriente de sodio. Inclusive, tampoco existen diferencias significativas en el nivel de RNAm para subunidad α entre el grupo tratado con NGF y dbAMPc simultáneamente y el grupo tratado sólo con NGF. Esto también correlaciona con los hallazgos electrofisiológicos, ya que no hay diferencias significativas en la densidad de corriente de sodio de estos grupos (T. Rosenbaum y M. Hiriart, comunicación personal).

Esto implica que un efecto específico del NGF sobre el RNAm de subunidad α tipo III. Para corroborar que el aumento en el nivel de RNAm de esta subunidad se debe a la activación de la cascada de transducción de señales del NGF, las células β fueron cultivadas durante 5-7 días en presencia de estaurosporina (ver figura 17). A esta concentración, la estaurosporina inhibe la actividad de cinasas de proteínas de serina y treonina, así como la de cinasas de tirosina. Este espectro amplio de inhibición asegura bloquear las diferentes vías de transducción de señales que se activan en respuesta al NGF (ver introducción sección 3.).

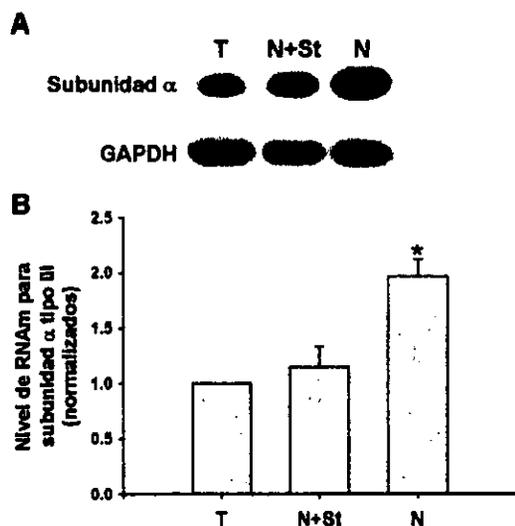


Figura 17. Efecto de la estaurosporina sobre el nivel de RNAm para subunidad α tipo III de canal de sodio.

A) Reacción de RT-PCR para subunidad α tipo III y GAPDH (T=testigo, N+St= NGF+ estaurosporina, N=NGF). **B)** Niveles de RNAm para subunidad α tipo III normalizados con respecto al grupo testigo. La reacción de RT-PCR para GAPDH se utilizó para normalizar la cantidad de RNA total en las reacciones para subunidad α . (* $P < 0.01$ vs T y N+St; prueba *t* de Student; $n=5$).

La estaurosporina inhibe el incremento en el nivel de RNAm para subunidad α tipo III inducido por NGF. Esto demuestra que la actividad de cinasas de tirosinas es necesaria para que el NGF induzca este aumento. Estos resultados, en conjunto con los resultados electrofisiológicos,

indican que el NGF induce un incremento en la síntesis de canales de sodio a través de un aumento en el nivel del RNAm que codifica para estos canales. Esta síntesis elevada se refleja en el aumento en densidad de corriente de células β .

3. EFECTOS DEL NGF SOBRE LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA DE CÉLULAS β DE RATA.

Con base en las observaciones anteriores decidimos evaluar la participación de los canales de sodio en la actividad eléctrica de células β , ya que, al igual que sucede en otros tipos celulares, la corriente conducida por estos canales podría modificar el patrón de disparo de potenciales de acción en estas células endocrinas.

Para esto, registramos la actividad eléctrica de células β cultivadas durante 5-7 días bajo condiciones testigo o tratadas con NGF, mediante la técnica de parche perforado (perforated patch). Inicialmente, caracterizamos la actividad eléctrica en respuesta a dos distintas concentraciones extracelulares de glucosa, una cercana al umbral de secreción de insulina (10.6 mM) y otra por encima de este umbral (20.6 mM), cercana a la concentración de glucosa que induce secreción máxima.

Mediante la técnica de parche perforado se pueden registrar en la misma célula tanto corrientes iónicas (fijación de voltaje), como el cambio del voltaje membranal (fijación de corriente). El registro se comienza en la configuración de fijación de voltaje, para asegurar, mediante el registro de corrientes iónicas, que se tiene acceso a la célula, como se puede ver en la figura 18.

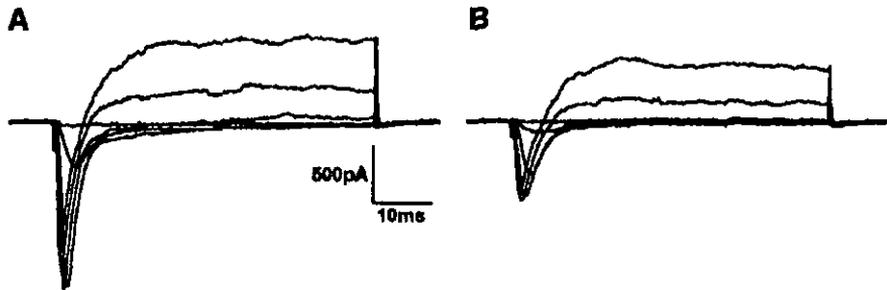


Figura 18. Familias de corrientes iónicas de células β .

Esta figura muestra dos familias de corrientes iónicas de células β , registradas en la configuración de fijación de voltaje de la técnica de parche perforado. Estas familias de corrientes se obtuvieron en respuesta a un estímulo que variaba de -40 a $+10$ mV, en incrementos de 10 mV, desde un potencial de mantenimiento de -80 mV. **A)** Familia de corrientes de una célula β tratada con NGF. **B)** Familia de corrientes de una célula del grupo testigo. En ambos casos se observa un componente entrante transitorio, que corresponde a la corriente de Na^+ , y un componente saliente sostenido, que corresponde a una corriente de K^+ . La corriente de calcio queda enmascarada por el componente de potasio¹⁹³.

Una vez establecido el acceso al célula, se registro la actividad eléctrica en respuesta a glucosa y un estímulo de 0.2nA . Para caracterizar los efectos del NGF sobre la actividad eléctrica de las células β decidimos evaluar tres parámetros. El primero de estos parámetros fue la fracción de tiempo de permanencia en potencial de meseta, la cual está correlacionada con la cantidad de insulina secretada.

El segundo parámetro fue el número de disparos por registro, es decir la frecuencia con que dispara cada célula, la cual también correlaciona con la secreción de insulina, ya que a mayor frecuencia de disparo se observa mayor secreción de esta hormona²⁶³. El tercer parámetro evaluado fue el área bajo los potenciales de acción de las células β , ya que esto estima tanto el tiempo de duración de los potenciales como la magnitud de la despolarización.

En primera instancia, evaluamos el efecto del aumento en la concentración extracelular de glucosa sobre la actividad eléctrica de las células β , ya que el disparo de potenciales de acción de estas células depende del metabolismo de la hexosa (ver figura 8). Como se puede ver en la figura 19, el aumento en la concentración de glucosa induce cambios en el patrón de disparo de las células β testigo.

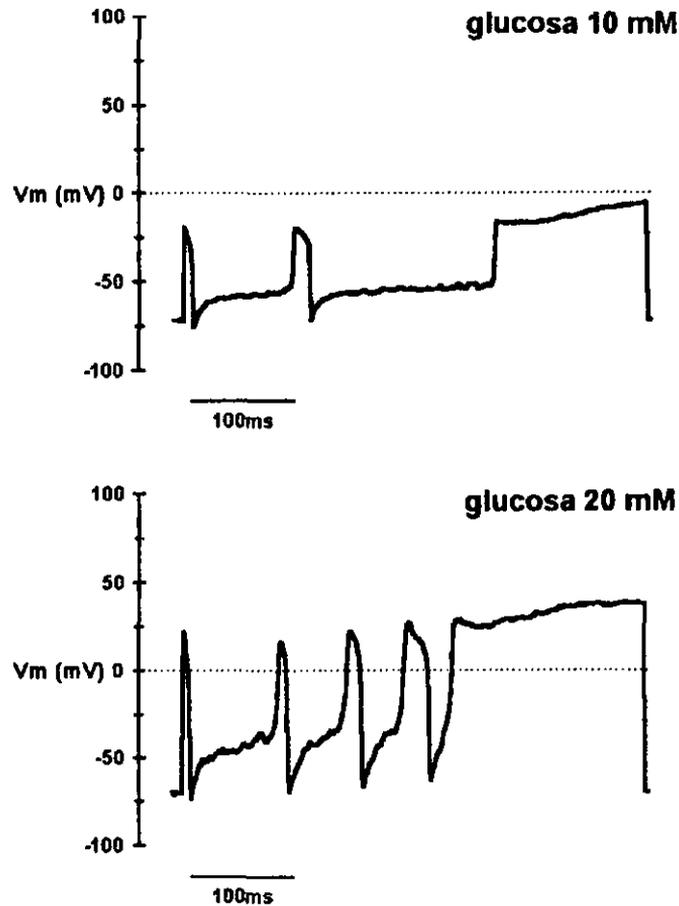


Figura 19. Efectos de la glucosa sobre el patrón de disparo de células β .

Esta figura muestra que el aumento en la concentración extracelular de glucosa induce un cambio en el patrón de disparo en las células β del grupo testigo, después de 5-7 días en cultivo. Tanto en glucosa 10 mM (panel superior), como en glucosa 20 mM (panel inferior), los disparos presentan un componente de despolarización lenta, seguida de un componente de despolarización rápida. Algunas células presentan disparos en forma de espigas que sobrepasan el nivel de 0 mV (overshoot); mientras que otras presentan despolarizaciones más sostenidas, en forma de meseta.

Bajo nuestras condiciones de registro, existe una actividad eléctrica más sostenida en presencia de glucosa 20 mM, que en presencia de glucosa 10 mM. Además, en las células registradas en la concentración alta se presentaban ocasionalmente disparos que sobrepasaban el nivel de 0 mV (overshoot), mientras que los disparos en glucosa 10 mM nunca sobrepasaron este valor.

El tratamiento con NGF también induce cambios significativos en el patrón de disparo de las células β , tanto en glucosa 10 mM, como en glucosa 20 mM (ver figura 20); ya que la actividad de células tratadas con NGF es sostenida por más tiempo que la de células testigo. Además, El NGF induce la aparición de disparos que sobrepasan los 0 mV en respuesta a glucosa 10 mM.

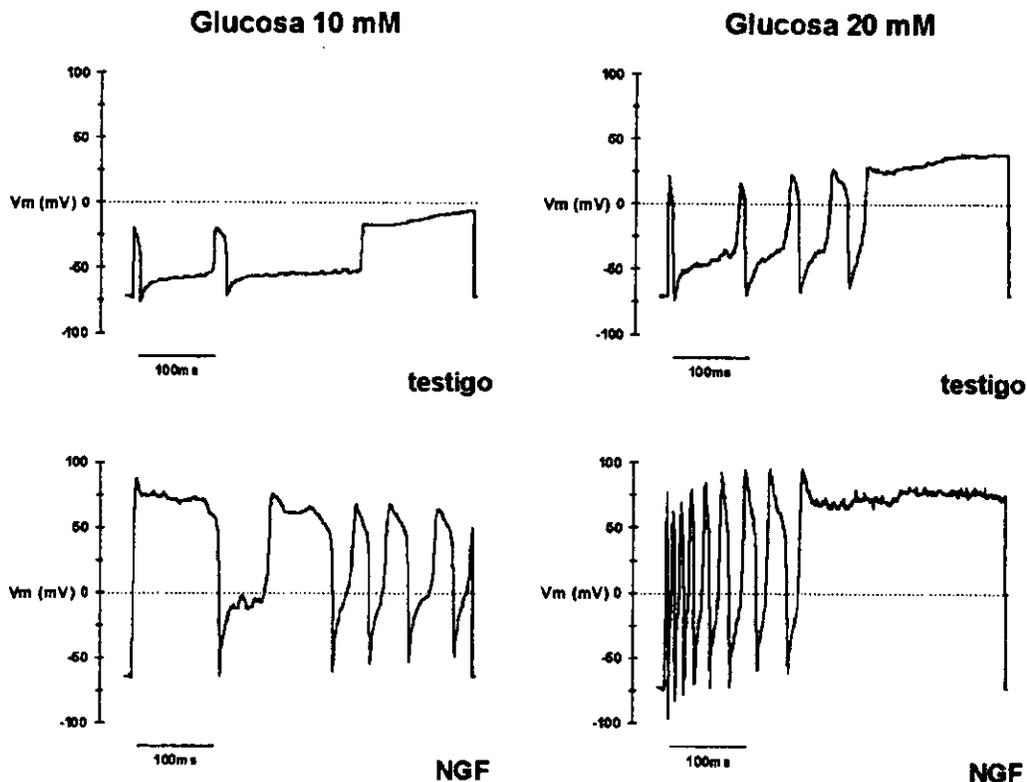


Figura 20. Efectos del NGF sobre el patrón de disparo de células β .

El tratamiento con NGF (parte inferior) durante 5-7 días induce cambios en el patrón de disparo de las células β , tanto en respuesta a glucosa 10 mM (derecha), como en respuesta a glucosa 20 mM (izquierda).

Las células β tratadas con NGF también son sensibles al aumento en la concentración extracelular de glucosa, ya que en este grupo experimental el patrón de disparo en glucosa 10 mM es diferente del que se observa en glucosa 20 mM. Es decir, las células tratadas con NGF conservan la capacidad de discriminar entre dos concentraciones distintas del azúcar.

La elevación de la concentración extracelular de glucosa induce, tanto en células β testigo como en las tratadas con NGG, incrementos significativos en los tres parámetros evaluados: fracción de tiempo en meseta (figura 21), número de disparos por registro (figura 22) y área bajo los potenciales de acción (figura 23).

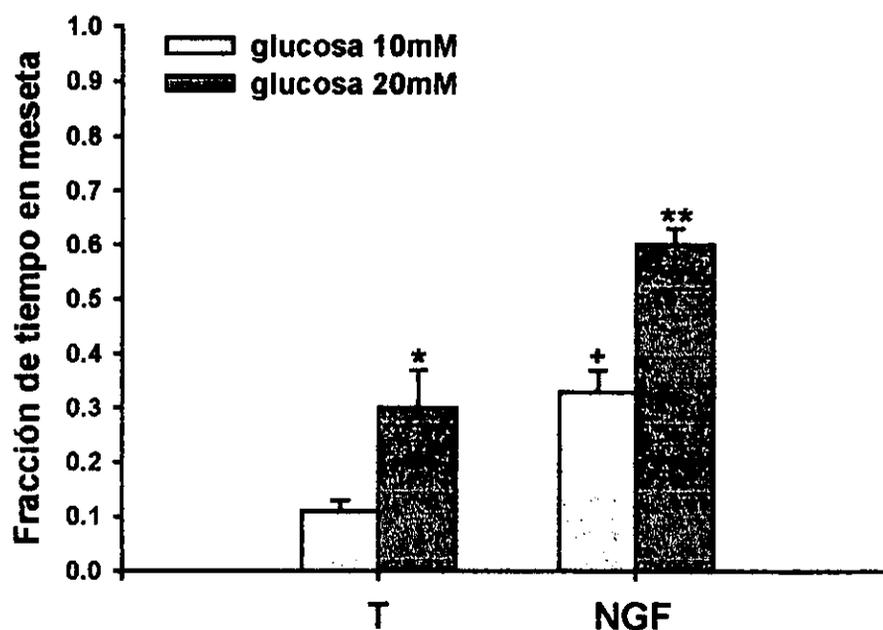


Figura 21. Tiempo de permanencia en meseta de la actividad eléctrica de células β .

La elevación de la concentración extracelular de glucosa induce que la fracción de tiempo de permanencia en meseta aumente, tanto en los potenciales de acción de células β testigo, como en los de células tratadas con NGF. Además, las células tratadas con NGF permanecen más tiempo en este potencial de meseta que las células testigo, en las dos concentraciones de glucosa. El tiempo de permanencia en meseta se midió a partir del momento en que comienza la despolarización rápida y hasta el inicio de la fase de repolarización del potencial de acción, sumando cada uno de estos periodos y dividiendo entre la duración total del registro. (** $p < 0.01$ vs todos los grupos; * $p < 0.05$ vs glucosa 10 mM; + $p < 0.01$ vs T; pruebas de ANOVA y Fisher; $n = 17$)

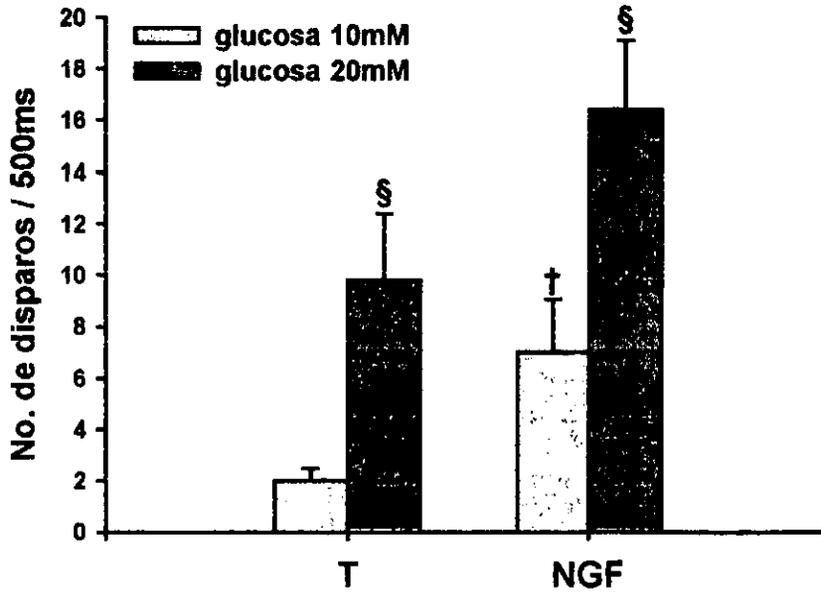


Figura 22. Número de disparos por registro de la actividad eléctrica de células β .

La elevación de la concentración extracelular de glucosa induce el aumento en el número de disparos por cada registro (duración: 500 ms) en la actividad eléctrica del grupo de células testigo y el grupo tratado con NGF. El tratamiento con NGF induce un aumento en esta frecuencia de disparo bajo glucosa 10 mM. Bajo glucosa 20 mM, la frecuencia tiende a aumentar pero la diferencia no es significativa. (§ P <0.05 vs glucosa 10 mM; † P <0.05 vs T; pruebas de ANOVA y Fisher; $n=17$)

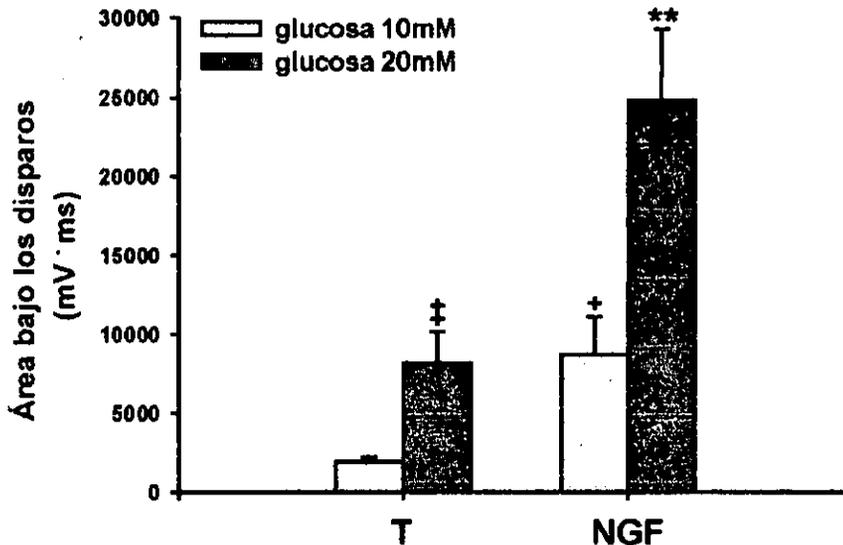


Figura 23. Área bajo los potenciales de acción de células β eléctrica de células β .

La elevación de la concentración extracelular de glucosa induce el aumento el área bajo los disparos en el grupo de células testigo y el grupo tratado con NGF. El tratamiento con NGF induce un aumento significativo en esta área con respecto al grupo testigo, tanto en glucosa 10 mM, como en glucosa 20 mM. (** P <0.01 vs todos los grupos; + P <0.01 vs T; ‡ P <0.01 vs glucosa 10 mM; pruebas de ANOVA y Fisher; $n=17$)

En las células tratadas con NGF, el aumento en la fracción de tiempo de permanencia en meseta en respuesta a glucosa 20 mM fue más marcado que en las células del grupo testigo. Esto implica que las células tratadas con NGF discriminan mejor entre una concentración de glucosa y otra, lo cual concuerda con nuestras observaciones de secreción de insulina¹.

Las células β tratadas con NGF permanecen más tiempo en potencial de meseta que las células testigo, en ambas concentraciones de glucosa. Este aumento en la fracción de permanencia en meseta se refleja en potenciales de mayor duración; el cual, en combinación con despolarizaciones de mayor magnitud, se traduce en un aumento en el área bajo los potenciales de acción de las células tratadas con NGF. Nuestros resultados demuestran que este factor de crecimiento potencia la actividad eléctrica de las células β inducida por glucosa.

4. PARTICIPACIÓN DE LOS CANALES DE SODIO EN LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA DE CÉLULAS β DE RATA.

La potenciación de la actividad eléctrica podría ser responsable del aumento en la secreción de insulina inducido por NGF, y podría estar relacionada con el incremento en la densidad de corriente de sodio. Por esta razón, decidimos analizar la participación de los canales de sodio durante el disparo del potencial de acción de células β de rata.

Para esto, registramos la actividad eléctrica de células β en presencia de tetrodotoxina (TTX), la cual bloquea la corriente de sodio de estas células¹⁹³. La TTX fue aplicada a través de un sistema de perfusión directa a presión (pico-spritzer), a una concentración de 10 μ M, en pulsos de 20 ms de duración.

La actividad eléctrica se registró en células β cultivadas durante 5-7 días bajo condiciones testigo o tratadas con NGF, a una concentración elevada

de glucosa (20.6 mM). A esta concentración de glucosa, la corriente de sodio participa de manera importante durante la secreción de insulina, ya que la administración de TTX disminuye la cantidad de insulina secretada¹⁹³.

Como se puede ver en la figura 24, la exposición a TTX modifica el patrón de disparo de las células β . Esta toxina reduce la magnitud de las despolarizaciones alcanzadas por los potenciales de acción de las células β , tanto en el grupo testigo como en las tratadas con NGF, lo que se refleja en una disminución en el área bajo los disparos (figura 25).

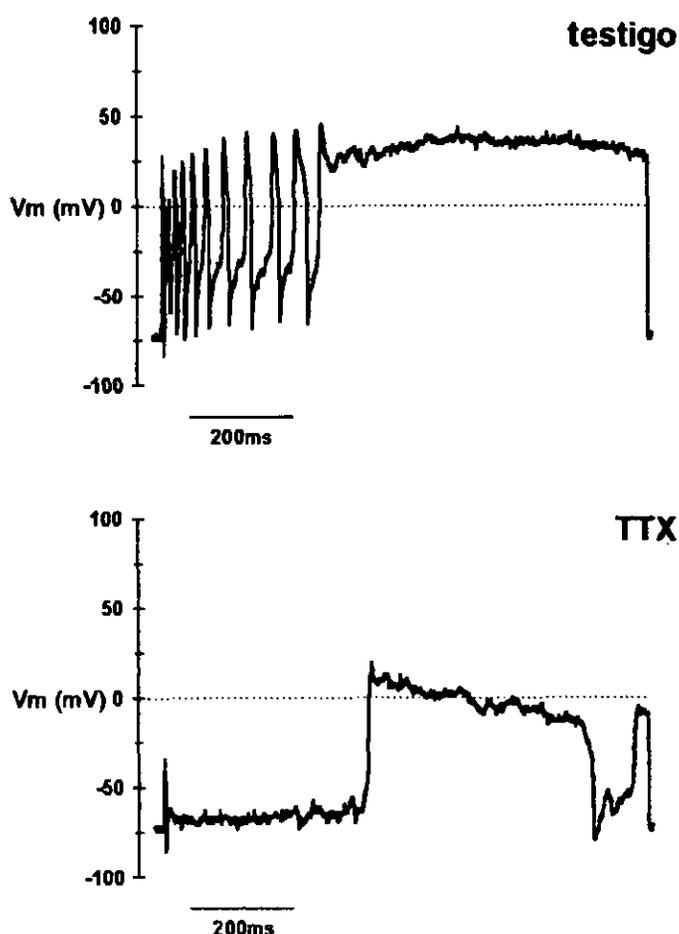


Figura 24. Efecto de la tetrodotoxina (TTX) sobre el patrón de disparo de células β .

Esta figura muestra el registro de fijación de corriente de una célula representativa del grupo tratado con NGF, antes (panel superior) y después (panel inferior) de la aplicación de TTX (10 μ M/20 ms).

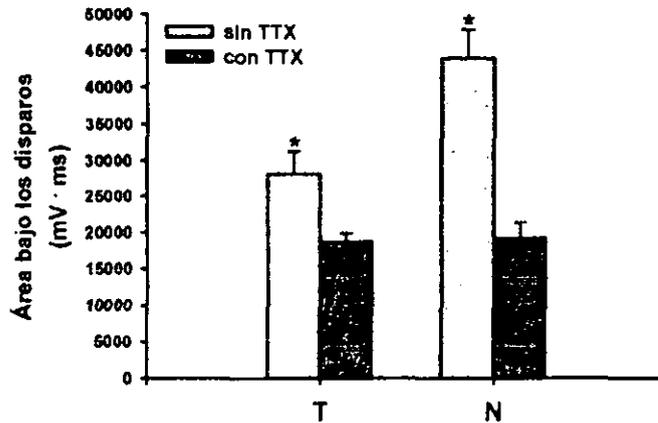


Figura 25. La TTX disminuye el área bajo los disparos de células β .

La exposición a TTX disminuye significativamente el área bajo los disparos de células β testigo y tratadas con NGF. Se observa un efecto más marcado en las células tratadas con NGF. (* $P < 0.01$ vs TTX; prueba t de Student; $n=6$)

En el grupo testigo la disminución en el área bajo los disparos se debe a que los potenciales de acción presentan magnitudes menores en presencia de TTX. En las células tratadas con NGF, la TTX también reduce la magnitud de los potenciales, pero además disminuye significativamente la duración de los disparos, ya que estas células permanecen menos tiempo en potencial de meseta (figura 26). Debido a esto, se observa un efecto más marcado de la TTX en las células tratadas con NGF.

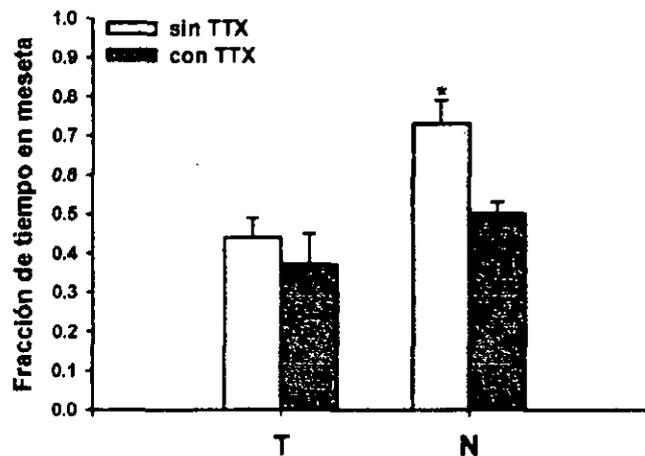


Figura 26. Efecto de la TTX sobre el tiempo de permanencia en meseta de la actividad eléctrica de células β .

La exposición a TTX no modifica significativamente la fracción de tiempo en meseta en células del grupo testigo; sin embargo, en células tratadas con NGF, la TTX disminuye significativamente este parámetro. (* $P < 0.05$ vs todos los grupos; prueba t de Student; $n=6$)

Estos resultados sugieren que la corriente de sodio juega un papel más importante durante el disparo de potenciales de acción de células tratadas con NGF que en las células testigo, ya que los efectos de la TTX son mas notorios en el primer grupo experimental.

En ambos grupos, la corriente de sodio no parece determinar la frecuencia de disparo de las células β , ya que la exposición a TTX no modifica significativamente el número de disparos por registro (figura 27).

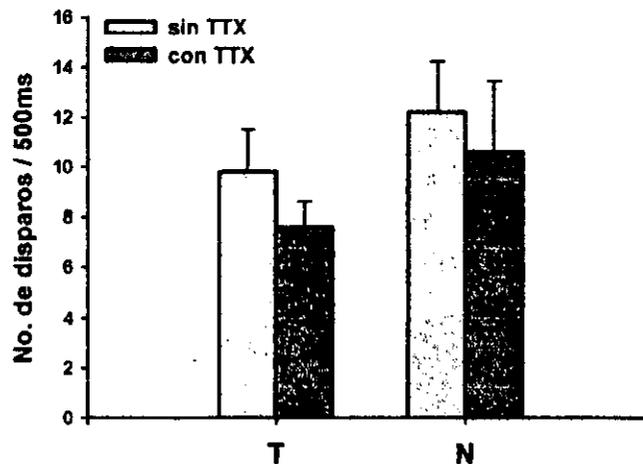


Figura 27. La TTX no modifica la frecuencia de disparo de las células β .

La exposición a TTX no modifica significativamente la frecuencia de disparo de células β de ambos grupos experimentales.

Estos resultados demuestran que la corriente de sodio si participa durante el disparo de potenciales de acción de células β de rata. Esta corriente parece tener mayor relevancia en el disparo de células tratadas con NGF, ya que en estas células la corriente de sodio determina la magnitud y la fracción de tiempo en meseta; mientras que en las células del grupo testigo, la corriente de sodio solamente determina la magnitud de los potenciales de acción.

Esta participación diferenciada de la corriente de sodio podría deberse a que las células tratadas con NGF presentan una corriente de mayor magnitud, y por está razón contribuya más a la despolarización que se produce durante el potencial de acción.

En ambos grupos, la corriente de sodio no está implicada en la determinación de la frecuencia de disparo de los potenciales de acción. Esta observación en conjunto con el dato que demuestra que no existen diferencias entre el número de disparos de células testigo y tratadas con NGF (ver figura 22), correlaciona con los hallazgos de fijación de voltaje; en donde se observa que la inactivación en estado estacionario de la corriente de sodio es similar en ambos grupos (ver figura 11).

5. IDENTIFICACIÓN DE UNA FUENTE PANCREÁTICA DE NGF.

Los resultados anteriores muestran que el aumento en la densidad de corriente de sodio inducido por NGF esta ligado a una mayor actividad eléctrica de células β . Esta actividad, a su vez, podría ser responsable de la potenciación de la secreción de insulina por NGF. Esto sugiere que este factor de crecimiento podría jugar un papel muy importante en la regulación de la fisiología de las células β , si estas células pudieran estar expuestas *in vivo* al NGF.

Por esta razón, decimos identificar una fuente insular de NGF. En primera instancia, analizamos la expresión de NGF en cultivos primarios de células insulares de rata, por medio de técnicas de inmunocitoquímica. Para esto, se utilizó la técnica de doble marcaje fluorescente, para NGF e insulina, lo que permite identificar el tipo celular que exprese NGF.

Como se puede ver en la figura 28, las células insulares expresan NGF. La tinción para esta factor coincide con la tinción para insulina, lo que indica que las células β son capaces de sintetizarlo. Aproximadamente 3% de las células positivas para NGF son negativas para insulina. Esto implica que, además de las células β , existe otra pequeña población de células insulares capaz de sintetizar este factor de crecimiento.

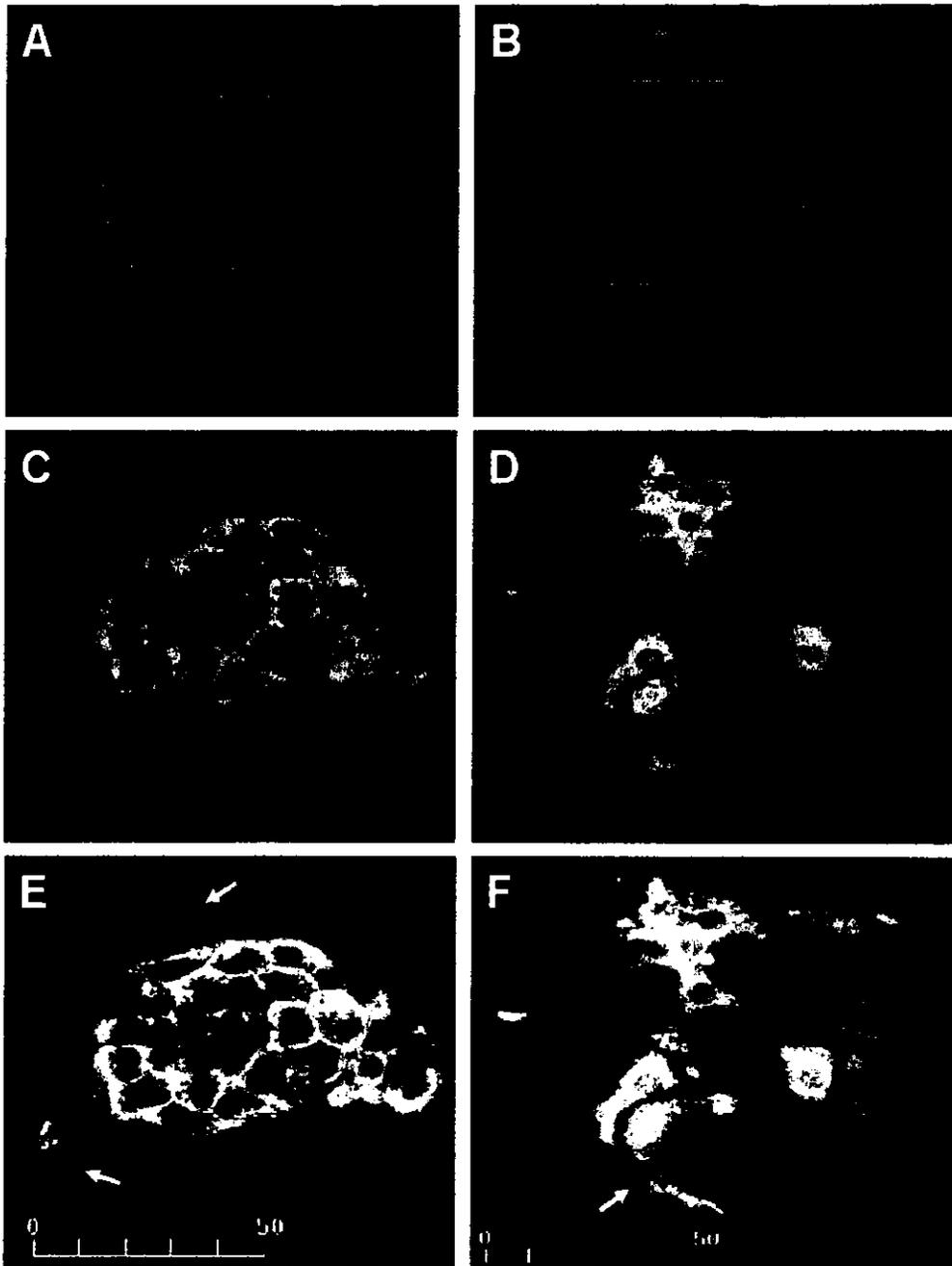


Figura 28. Inmunofluorescencia para NGF e insulina en cultivos primarios de células β .

Esta figura muestra una doble tinción por inmunofluorescencia para NGF (rojo) e insulina (verde). Se puede apreciar que el 100% de las células que se tiñen para insulina, también se encuentran marcadas para NGF (amarillo). Una pequeña proporción de células (3%) son positivas para NGF, pero negativas para insulina (flechas). **A, C y E)** Células β testigo después de 5-7 días en cultivo. **B, D y F)** células tratadas con NGF y dbAMPC.

La distribución intracelular de la tinción de NGF no siempre coincide con la de insulina. Esto sugiere que los gránulos que contienen al factor de crecimiento son entidades separadas de los gránulos de insulina. Además, al amplificar digitalmente las regiones donde las dos tinciones coinciden, se observan puntos de colores discretos separados (verde y rojo) y no puntos de color mezclado (amarillo), lo cual apoya la idea de la existencia de gránulos distintos.

La señal positiva a NGF se encuentra tanto en células testigo, como en las tratadas con NGF y dbAMPc,. Esto indica que la expresión de este factor de crecimiento es una propiedad intrínseca de las células β , y que no se está tiñendo el NGF que capturan las células desde el medio de cultivo en el grupo tratado.

Con el fin de corroborar esto, decidimos analizar la expresión de RNAm para NGF en cultivos prácticamente puros de células β , tanto primarios, al llevar a cabo un precultivo de 24 horas (ver métodos), como en la línea celular RINm5F, que proviene de un insulinoma de rata. Como se puede ver en la figura 29A, las células β expresan RNAm para NGF. Esto comprueba la especificidad de la síntesis del factor de crecimiento.

Además de comprobar la síntesis de NGF en las células β , la técnica de RT-PCR nos permite analizar el efecto del tratamiento con NGF o bien dibutilil AMPc (dbAMPc), sobre el nivel en estado estacionario del RNAm para este factor de crecimiento. Como se puede ver en la figura 29B, el tratamiento con dbAMPc durante 5-7 días reduce aproximadamente en 50% el nivel de RNAm para NGF.

El tratamiento con NGF no afecta significativamente este nivel, sin embargo, revierte el efecto del dbAMPc. Esto sugiere que el NGF es capaz de mantener la expresión de su propio RNAm mensajero, lo que podría ser

importante como mecanismo de regulación autocrina/paracrina en el islote pancreático.

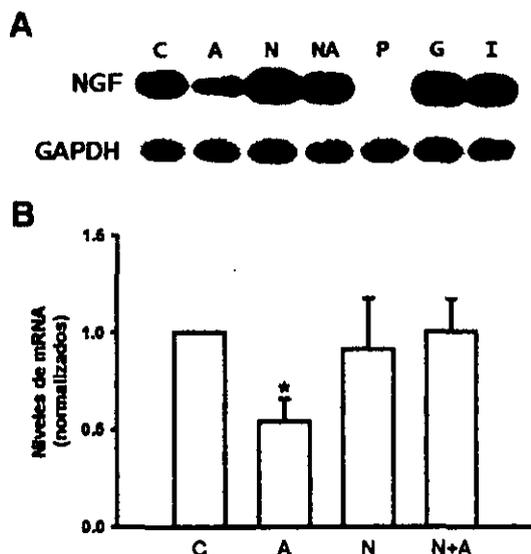


Figura 29. Expresión de RNAm para NGF en células β pancreáticas.

A) RT-PCR para RNAm de NGF, a partir de RNA total de células β cultivadas durante 5-7 días bajo condiciones testigo (C), o bajo tratamiento con dbAMPc (A), NGF (N) o ambas moléculas (NA). Para corroborar la especificidad de la reacción, la RT.PCR se llevó cabo con RNA total de células de feocromocitoma PC12 (P), como control negativo, y células de glioma G6 (G), como control positivo. La reacción también se realizó con RNA total de células insulares recién aisladas en células (F). **B)** Niveles en estado estacionario de RNAm para NGF en células β después de 5-7 días en cultivo. Se muestran los niveles de RNAm para NGF, normalizados con respecto al grupo testigo (C), de células tratadas con dbAMPc (A), NGF (N) o NGF+dbAMPc (NA). El tratamiento con dbAMPc disminuye el nivel en estado estacionario de RNAm para NGF en las células β , después de 5-7 días en cultivo. El tratamiento con NGF sólo no afecta significativamente este nivel, sin embargo, revierte el efecto del dbAMPc. (* $P < 0.01$ vs C; prueba t de Student; n=6)

La comprobación de la síntesis de NGF por las células β no demuestra que las células sean capaces de secretar este factor, lo cual sería indispensable para que ejerciera sus efectos biológicos. Por esto, decidimos analizar la secreción de NGF por parte de las células β . Para ello, utilizamos dos estrategias experimentales paralelas. La primera de ellas demostraría que las células β secretan NGF biológicamente activo, mientras que la segunda evaluaría la cantidad de NGF secretada en respuesta a diferentes estímulos.

Como primera estrategia utilizamos un bioensayo, basado en la sensibilidad a NGF de la línea tumoral PC12, derivada de feocromocitoma de rata, las cuales desarrollan procesos neuríticos en respuesta al tratamiento con este factor de crecimiento. Las células PC12 fueron cultivadas durante 24 horas en medio condicionado (MC) por células β . El MC se obtuvo incubando células insulares durante 4 horas en un medio químicamente definido, que contenía glucosa a una concentración de 20 mM.

Decidimos utilizar esta hexosa como secretagogo, ya que induce la despolarización del potencial de membrana plasmática y el ingreso de calcio a las células β . El aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} podría inducir la exocitosis de NGF, tal como sucede con la insulina.

Como se puede ver en la figura 30, bajo estas condiciones, las células β secretan un factor que induce el crecimiento de neuritas en células PC12, cuya actividad es bloqueada por un antisuero dirigido contra NGF. Esto indica que las células β son capaces de secretar el NGF que ellas mismas producen.

Como segunda estrategia experimental, y con el fin de caracterizar mejor la secreción de NGF por las células β , utilizamos la técnica de ELISA de dos sitios. Como estímulo para la secreción de NGF, se utilizaron diferentes concentraciones de glucosa (5, 11 y 20 mM), para analizar el papel de esta azúcar como secretagogo del factor de crecimiento en células β .

Además, se expuso a las células a una concentración extracelular despolarizante de KCl (40 mM), para estudiar la posibilidad que la secreción de NGF estuviera ligada a la actividad eléctrica de las células β . Por último, se trató a las células con dbAMPc, con el fin de caracterizar los efectos de esta molécula sobre la secreción de NGF; ya que nuestros

resultados anteriores demostraban que a largo plazo, el dbAMPc reduce el nivel de RNAm para NGF.

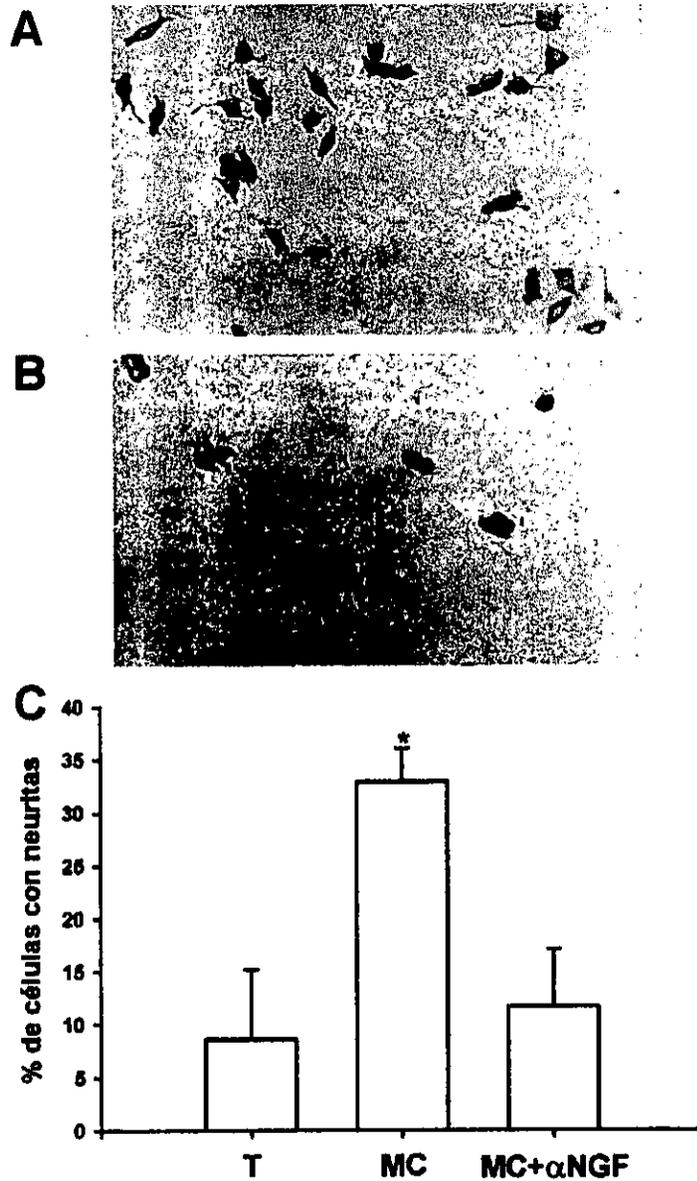


Figura 30. Las células β secretan un factor similar al NGF.

A) Las células PC12 cultivadas durante 24 horas en medio condicionado (MC) por células β extienden neuritas. B) La adición de antisuero contra NGF (α NGF) inhibe el crecimiento de los procesos. C) El MC induce un aumento de 4 veces en el número de células PC12 que desarrollan neuritas. T, condiciones testigo (medio químicamente definido, glucosa 20 mM); MC, medio condicionado por células β (glucosa 20 mM); MC+ α NGF, medio condicionado + antisuero contra NGF. (* $P < 0.01$ vs todos los grupos; prueba t de Student; $n=4$)

Como se puede ver en la figura 31, el aumento en la concentración extracelular de glucosa induce el incremento de la cantidad de NGF secretado. Mientras que el grupo expuesto a glucosa 5 mM secreta 20-60pg/ml de NGF, el grupo expuesto a glucosa 20 mM secreta 50-180pg/ml. Bajo glucosa 11 mM no se observan diferencias significativas con respecto al grupo en glucosa 20 mM. Esto indica que la secreción de NGF por las células β podría estar alcanzando un máximo entre estas dos concentraciones.

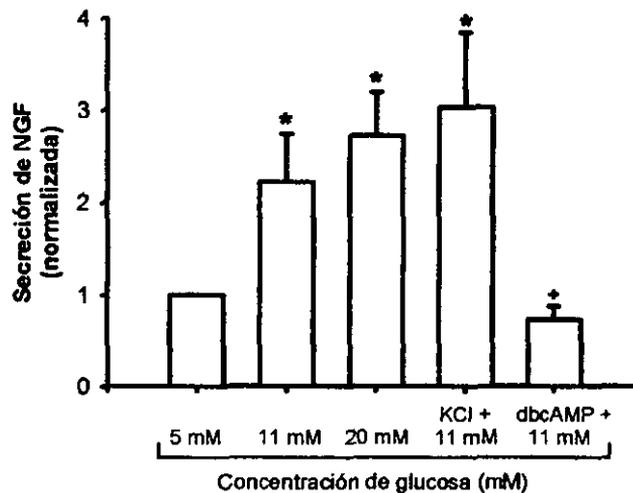


Figura 31. Secreción de NGF por células β en respuesta a diferentes concentraciones de glucosa.

Las células expuestas a glucosa 20 mM secretan casi 2.5 veces más NGF que las células expuestas a glucosa 5 mM. No existen diferencias significativas entre las cantidades de NGF secretadas por células expuestas a glucosa 11 mM y glucosa 20 mM. La despolarización con KCl (40 mM) también induce un aumento significativo en la secreción de NGF, mientras que el tratamiento con dbAMPc reduce en 67% la cantidad de insulina secretada en respuesta a glucosa 11 mM. (* $P < 0.05$ vs glucosa 5 mM, + $P < 0.05$ vs glucosa 11 mM; prueba *t* de Student; $n=4$)

La despolarización con KCl también induce el aumento en la secreción de NGF, lo que sugiere que la secreción de este factor de crecimiento también es dependiente de la actividad eléctrica de las células β , de manera similar a lo observado para la secreción de insulina. Sin embargo, la regulación de

la exocitosis de estas dos proteínas no es idéntica, ya que el AMPc reduce la secreción de NGF, al contrario de lo que sucede con la insulina²⁶⁴.

Esta regulación diferenciada de la secreción de NGF e insulina sugiere que las dos proteínas son almacenadas en distintos gránulos. Esta hipótesis también es apoyada por los hallazgos de microscopía confocal. Al estar almacenadas en diferentes gránulos, la secreción de estas proteínas podría ser separada en respuesta a diferentes estímulos, dependiendo de las necesidades fisiológicas de las células insulares.

*"I ACT THE ROLE IN CLASSIC STYLE OF
A MARTYR CARVED WITH A TWISTED SMILE.
TO BLEED THE LYRIC FOR THIS SONG
TO WRITE THE RITES TO RIGHT MY WRONGS".
MARILLION (SCRIPT FOR A JESTER'S TEAR, 1983)*

V. DISCUSIÓN

Mecanismos involucrados en el aumento de densidad de corriente de sodio en células β .

Nuestros resultados de registro electrofisiológico demuestran que la síntesis proteica y la transcripción génica son necesarias para que la densidad de corriente de sodio de células β aumente en respuesta a NGF; ya que agentes inhibidores de estos procesos, como la cicloheximida y la actinomicina D, impiden que la densidad de corriente aumente.

La síntesis de proteínas podría participar en dos niveles distintos durante el aumento de la corriente de Na^+ ; ya que el NGF podría inducir directamente el incremento en la síntesis de canales de Na^+ o bien, la síntesis y activación de una proteína reguladora, que propiciara que más canales de sodio pudieran ser activados por los estímulos eléctricos.

Una de las proteínas que regula la actividad de canales iónicos es la cinasa de proteínas A (PKA). Esta cinasa es necesaria para que el tratamiento con NGF induzca la aparición de corrientes de Na^+ en células de feocromocitoma de rata; ya que en líneas celulares derivadas de PC12,

carentes de los genes de las dos isoformas de PKA (PKAI y PKAII), la exposición al factor de crecimiento no modifica la densidad de corriente de sodio, al contrario de lo que pasa en la línea PC12 original. Sin embargo, el NGF sí induce en esta línea mutante el aumento en el número de canales de sodio presentes en la membrana plasmática, pero estos canales no son funcionales, ya que requieren ser fosforilados por PKA²⁶⁵.

Es poco probable que este sistema NGF-PKA sea responsable del aumento de corriente de sodio en células β , ya que estas células expresan una subunidad α tipo III, mientras que las células PC12 expresan una subunidad α tipo II/IIA²⁶⁰, lo que da lugar a canales de sodio distintos, que pueden ser regulados de manera diferentes. Además, en las células PC12, el AMPc induce el aumento de la corriente de Na⁺, al igual que el NGF²⁶⁶; mientras que en las células β , el AMPc no modifica significativamente esta corriente⁸. Esto descarta la participación de la PKA en el aumento en densidad de corriente de sodio en las células β .

Por otra parte, nuestros resultados demuestran que el tratamiento con NGF aumenta el nivel de RNAm para la subunidad α tipo III de canal de sodio. Esto sugiere que el efecto del NGF sobre la corriente de sodio se debe a un efecto directo sobre la síntesis de canales, cuyo número podría estar aumentando debido a la traducción de más moléculas de RNAm. Inclusive, estos resultados también descartan la participación de la PKA durante el aumento en densidad de corriente, ya que el tratamiento con AMPc no modifica el nivel de RNAm para subunidad α , lo cual correlaciona con los hallazgos electrofisiológicos.

El aumento en el nivel de RNAm para la subunidad α puede deberse, a su vez, a la estabilización del mensajero o al aumento de su tasa de transcripción. Nuestros experimentos electrofisiológicos sugieren que el incremento en la síntesis de canales de sodio inicia desde la transcripción

de RNAm, ya que la actinomicina D inhibe el efecto del NGF sobre la corriente de sodio de células β .

Para caracterizar a fondo el efecto del NGF sobre la transcripción de la subunidad α en las células β , es necesario realizar ensayos con RNA nuclear, que son difíciles de llevar a cabo en nuestro modelo experimental. Esto se debe a que se necesitan grandes cantidades de células, para obtener cantidades suficientes de RNA para ensayos de síntesis (*run on*) y degradación (*run off*).

A partir de los cultivos primarios no es posible obtener tales cantidades de células β . Por esta razón, sería necesario analizar la estabilidad y la tasa de transcripción del RNAm para subunidad α tipo III en líneas tumorales derivadas de insulinomas, a partir de las cuales se pueden obtener cantidades razonables de RNA nuclear.

Nuestros resultados también muestran que el incremento del nivel de RNAm para la subunidad α tipo III depende de la activación de cinasas de proteínas, ya que el tratamiento con estaurosporina inhibe el efecto del NGF sobre el RNAm para la subunidad α . Esto implica la participación de las cascadas de transducción de señales acopladas al receptor de NGF.

Bajo nuestras condiciones de cultivo, las células β expresan el receptor a NGF de alta afinidad TrkA (T. Rosenbaum, tesis doctoral) y, aparentemente no expresan el receptor p75^{NTR} (resultados preliminares). Por esta razón, es probable que el aumento en densidad de corriente de sodio se deba a la activación de TrkA.

En otros modelos, como las células PC12, el NGF aumenta la transcripción de RNAm de canales de sodio por medio de dos mecanismos: uno inmediato, que requiere incubaciones con NGF de corta duración (≤ 1 min), y otro que requiere incubaciones por mayor tiempo ($\approx 1-2$ horas mínimo).

El mecanismo de respuesta inmediata regula la transcripción génica a través de proteínas transductoras de señales activadoras de transcripción (STAT). Las STAT son factores de transcripción capaces de translocarse hacia el núcleo desde el citoplasma en respuesta a NGF. Por esta razón la respuesta es prácticamente inmediata, ya que solamente se necesita la activación de un efector, para que la señal de la cascada de transducción alcance sus blancos en el genoma. Una vez que se encuentran en el núcleo, las STAT dirigen la transcripción génica, en particular de algunos subtipos de subunidades α de canales de sodio, como PN1²⁶⁰.

El mecanismo de respuesta a NGF de largo plazo involucra la activación de una serie de cinasas de proteínas y de proteínas G pequeñas, parecidas a Ras, que culmina con la activación de la cinasa de proteínas activada por mitógenos (MAPK). MAPK es capaz de fosforilar varios factores de transcripción, por lo que funciona como regulador central de la transcripción génica. A través de esta cascada, el NGF regula la expresión de subunidades α de canales de sodio, en particular de la subunidad α tipo II/IIA²⁶⁷.

En células PC12, el aumento en densidad de corriente de sodio depende de la activación sostenida de MAPK²⁶⁸. En esta activación sostenida se encuentra implicada la cinasa B-Raf, la cual es activada por la proteína G pequeña Rap1. Si se inhibe la activación de Rap1, no se observa el aumento en densidad de corriente característica de la respuesta a NGF en estas células. A su vez, la activación de Rap1 en células PC12 depende de la proteína intercambiadora de nucleótidos de guanosina C3G, quien es activada por proteínas adaptadoras de la familia CRK²⁶⁹.

En las células β , el aumento la transcripción de subunidad α de canal de sodio tipo III, podría deberse a alguno de estos dos mecanismos, la vía MAPK o la vía STAT. Para discernir entre estas dos vías, sería necesario

analizar, en primera instancia, el efecto que tiene el NGF en incubaciones de corta duración sobre la transcripción de la subunidad α tipo III, para comprobar o descartar la participación de la vía STAT.

Después de eso, sería indispensable analizar la activación de las cinasas de proteínas de la vía MAPK. Para esto, sería necesario realizar experimentos en líneas tumorales de células β , ya que se requiere purificar grandes cantidades de proteína para caracterizar los patrones de fosforilación proteica.

Caracterización de la actividad eléctrica de las células β de rata.

La regulación de la corriente de sodio por NGF podría ser relevante como mecanismo de modulación de la actividad eléctrica de las células β . Por esta razón decidimos caracterizar el patrón de disparo de potenciales de acción de las células β de rata, que en esta especie no había sido descrito¹⁸⁰.

Nuestros resultados demuestran que después de 5-7 días en cultivo, las células β de rata presentan una actividad eléctrica dependiente de la concentración extracelular de glucosa. Bajo una concentración de glucosa 10 mM, esta actividad consta de potenciales de acción que presentan una fase de despolarización lenta, seguida de una fase de despolarización rápida y abrupta del potencial de membrana. Después de la fase rápida, el potencial membranal permanece en un nivel despolarizado de manera sostenida, que podría ser equiparable a al nivel de meseta de los potenciales de acción de las células β de ratón.

Cuando la concentración extracelular de glucosa aumenta a 20 mM, la actividad eléctrica de las células β de rata se hace más sostenida, dado que se observan incrementos en la frecuencia de disparo de potenciales de acción y en la duración y magnitud de ellos. Inclusive, bajo esta

concentración de glucosa, los potenciales de acción rebasan el nivel de 0 mV, a diferencia de los potenciales de células β de ratón, en donde no se observa overshoot²¹². Esto sugiere que en la actividad eléctrica de estas dos especies participan conductancias iónicas diferentes.

En particular, la existencia de potenciales que sobrepasan el nivel de 0 mV en las células β de rata sugiere que en estas células, la contribución de la conductancia de sodio para la despolarización es mayor que en las células de ratón. De hecho, registro de actividad eléctrica con overshoot han sido descritos para células β caninas y humanas y en estas dos especies, el disparo de potenciales de acción depende de la actividad de canales de sodio²¹².

En el caso de las células β de rata, la actividad de los canales de sodio permitiría que los potenciales de acción rebasaran el nivel de 0 mV en glucosa 20.6 mM, debido a que la despolarización inicial del potencial de membrana es rápida, lo que permitiría que aumentara la probabilidad de apertura de los canales de sodio sensibles a voltaje.

En contraparte, bajo glucosa 10.6 mM despolarización inicial es más lenta, lo cual podría llevar a la inactivación de los canales de sodio y de esta manera evitar que la conductancia a este ion contribuya para el disparo. Esto podría explicar el porque las células β testigo no presentan overshoot en sus potenciales de acción bajo la concentración baja de glucosa (ver más adelante).

Efectos del NGF sobre la actividad eléctrica de células β .

La caracterización del patrón de disparo de las células β de rata nos permitió analizar el efecto del tratamiento con NGF sobre esta actividad eléctrica. Nuestros resultados muestran que después de 5-7 días en cultivo, las células β tratadas con el factor de crecimiento presentan una

actividad eléctrica más sostenida, tanto en 10.6 mM como en 20.6 mM de glucosa.

Los potenciales de acción de las células tratadas presentan despolarizaciones mayores. Inclusive, es posible observar despolarizaciones que rebasan el nivel de 0 mV en células tratadas con NGF en respuesta a una concentración extracelular de glucosa de 10.6 mM, los cuales no se observan en las células del grupo testigo.

Además, el tratamiento con NGF aumenta la fracción de tiempo de permanencia en potencial de meseta, bajo las dos concentraciones de glucosa. Este aumento, en conjunto con el incremento en la magnitud de las despolarizaciones alcanzadas por los potenciales de acción se traduce en un aumento muy marcado en el área bajo los disparos de las células β tratadas. Esto indica que la cantidad de carga que ingresa a las células tratadas con NGF es mayor.

Debido a que una fracción importante de la carga que ingresa a las células β durante el disparo de potenciales de acción es acarreada por iones de calcio, la concentración de este ion podría alcanzar un nivel más elevado en las células tratadas con NGF que en las células del grupo testigo, lo que llevaría al aumento de la secreción de insulina, el cual hemos observado en células β después de 5-7 días en cultivo.

Relevancia de la corriente de sodio para el disparo de potenciales de acción de células β .

La potenciación de esta actividad eléctrica inducida por glucosa podría deberse al aumento de densidad de corrientes iónicas en respuesta al NGF. Por esta razón, decidimos analizar la contribución de la corriente de sodio para la actividad eléctrica de células β de rata.

Nuestros experimento de fijación de corriente sugerían que la corriente de sodio juega un papel importante durante el disparo de potenciales de acción en esta especie; ya que, a diferencia de las células β de ratón, las células de rata presentaron despolarizaciones que sobrepasaron el nivel de 0 mV. Este overshoot solamente ha sido descrito en especies donde la actividad eléctrica de las células β depende de sodio y calcio, como el humano y el perro²¹².

Al registrar la actividad eléctrica de las células β de rata en presencia de tetrodotoxina (TTX) observamos una disminución en la magnitud de los potenciales acción, tanto en las células del grupo testigo como en las tratadas con NGF, que se refleja en la disminución del área bajo los disparos. Esto demuestra que la corriente de sodio determina el nivel máximo de despolarización que puede alcanzar el potencial de acción de las células β , al menos en los disparos inducidos por una concentración extracelular de glucosa de 20.6 mM.

Las células β tratadas con NGF son más sensibles al bloqueo por TTX, ya que en las células testigo, la TTX disminuye aproximadamente 30% los parámetros de la actividad eléctrica (23% el tiempo de permanencia en meseta y 34% el área bajo los disparos). En las células tratadas con NGF, por su parte, la TTX disminuye aproximadamente 50% estos parámetros (32% el tiempo de permanencia en meseta y 58% el área bajo los disparos). Esto podría deberse a que la corriente de sodio de las células tratadas con NGF representa una fracción mayor de las corrientes catiónicas despolarizantes que la corriente de Na^+ de células testigo.

Sin embargo, en ambos grupos experimentales la corriente de sodio podría determinar la cantidad final de carga que ingresa a las células, dado que la TTX disminuye la magnitud de los potenciales de acción. La disminución de la carga que ingresa a las células β podría llevar también a que

disminuyera el influjo de Ca^{2+} . Es decir, el bloqueo de la corriente de Na^+ impediría que el potencial de membrana se despolarizara de manera eficiente como para que se desarrollara la corriente de Ca^{2+} en su totalidad.

Al no activarse completamente la corriente de Ca^{2+} , la concentración intracelular de este ion no llegaría al nivel necesario para mantener la secreción de insulina, y de esta manera la TTX inhibiría la secreción de insulina inducida por concentraciones elevadas de glucosa¹⁹³.

Las diferencias que observamos entre la actividad eléctrica de las células β de rata y células de ratón podrían deberse a que la contribución de las corrientes de sodio para el disparo de potenciales de acción es distinta en estas especies. De hecho las corrientes de sodio de células β de ratón se inactivan a potenciales más negativos que las corrientes de rata: Mientras que cerca del 100% de la corriente de sodio de células β de ratón se encuentra inactivada a -60 mV, en la rata, solamente se encuentra inactivada el 50% de la corriente de sodio a este voltaje.

Es decir, en el ratón la corriente de sodio está inactivada en el potencial de reposo de la célula β y, por esta razón, no contribuiría significativamente para despolarización del potencial de acción. En la rata, la corriente de sodio sí podría contribuir significativamente al disparo de potenciales de acción, en particular en las células tratadas con NGF, en donde el valor absoluto de la corriente de sodio es mayor que el de corrientes de células testigo.

Por esta razón, el aumento de la corriente de sodio podría ser uno de los mecanismos involucrados en la potenciación de la actividad eléctrica inducida por glucosa en las células β . Sin embargo, esta potenciación por NGF podría deberse también al aumento en la densidad de otras corrientes

iónicas, como las corrientes de calcio tipo L y N¹⁹⁹. La contribución de otras corrientes a la potenciación de la actividad eléctrica de células β , en respuesta a NGF, deberá ser analizada utilizando bloqueadores específicos de canales de calcio.

Producción y secreción de NGF pancreático.

En conjunto, las observaciones anteriores demuestran que el NGF es un modulador importante de la actividad eléctrica de las células β , a través del aumento de corrientes iónicas. Por esta razón, resultó importante identificar una fuente de NGF a la cual pudieran estar expuestas las células β en el islote pancreático.

Nuestros experimentos de inmunocitoquímica y Biología molecular demuestran que las células β sintetizan NGF. Además, por medio del bioensayo con células PC12 y de la técnica de ELISA, demostramos que además de sintetizarlo, las células β secretan NGF biológicamente activo. Esto implica que las células β sí pueden estar expuestas al NGF *in vivo*, aún más, que este factor de crecimiento podría ser un regulador autocrino o paracrino de la fisiología de estas células, ya que ellas expresan también el receptor TrkA y son sensibles a NGF.

De hecho, se puede plantear la existencia de un sistema de regulación por retroalimentación en el islote pancreático, ya que el tratamiento con NGF mantiene elevado el nivel de su propio RNAm y el de su receptor¹⁹⁹ (TrkA), lo que aseguraría que el NGF mantuviera sus efectos sobre las células β aún a baja concentración. Si este sistema de regulación llegara a fallar, la función de las células β podría verse afectada, ya que como lo muestran los resultados de este trabajo y otros obtenidos por nuestro laboratorio, el NGF puede incidir sobre varios aspectos de la fisiología de la célula β .

Es posible también que el NGF pancreático tenga efectos endocrinos, de manera que esta neurotrofina podría engrosar la lista de hormonas pancreáticas. En apoyo a esta hipótesis, se ha observado que en ratas diabéticas disminuye el nivel tisular endógeno de NGF²⁷⁰, y que en pacientes diabéticos con neuropatía disminuye el nivel sérico circulante de este factor²⁷¹.

La disminución de NGF en estados diabéticos podría deberse a una secreción pobre o inadecuada de NGF desde el páncreas, tal como sucede con la deficiencia de insulina en la diabetes mellitus. Inclusive, el NGF pancreático podría afectar la producción y/o secreción de NGF en otros tejidos, ya que esta neurotrofina es capaz de regular su propia secreción²⁷² y producción, como lo demuestran nuestros resultados de RT-PCR.

La regulación de la secreción de NGF por glucosa sugiere que existen mecanismos comunes de exocitosis de estas dos proteínas en la célula β . Es posible que el regulador principal de la secreción de NGF sea, al igual que para la insulina, el Ca^{2+} que ingresa a la célula β durante la fase de meseta de la actividad eléctrica inducida por glucosa. De hecho, al despolarizar a las células mediante el aumento de la concentración extracelular de K^+ también aumenta la secreción de NGF.

Sin embargo, esto no implica que la insulina y el NGF se encuentren almacenados dentro de los mismos gránulos de secreción; ya que al menos un potenciador de la secreción de insulina, el AMPc, inhibe la secreción de NGF inducida por 11.6 mM de glucosa. Además, al analizar por microscopía confocal y amplificación digital las zonas donde se coexpresan insulina y NGF, observamos puntos (píxeles) discretos para cada una de las tinciones. Esto es, que las zonas de superposición de color (amarillo) se construyen a partir de dos colores separados (verde y rojo) y no por puntos de color mezclado.

En conjunto, los resultados de secreción y microscopía confocal muestran que la insulina y el NGF son almacenados en gránulos distintos. Esto implicaría que puede existir secreción diferenciada de estas proteínas en el islote pancreático: en respuesta a algunos estímulos se cosecretarían la insulina y el NGF, mientras que otro tipo de señales podría inducir la secreción de una u otra proteína.

Dado que las células β secretan NGF, ¿cómo se explica el aumento en densidad de corriente de Na^+ en respuesta a este factor?. Es decir, si las células β pueden secretar NGF, en especial en respuesta a glucosa 11.6 mM que es la concentración encontrada en el medio RPMI 1640, ¿por qué aumenta esta corriente?, ¿acaso no debería mantenerse siempre en el mismo nivel?.

Es posible que el NGF secretado por las células β en cultivo se diluya en el medio, ya que, para los experimentos de registro electrofisiológico, las células se cultivan a una densidad de 10^5 células/ml, mientras que para los experimentos de secreción de NGF, se cultivan a una densidad de 10^6 células/ml. A esta densidad de células, fuimos capaces de detectar concentraciones de NGF cercanas a 200pg/ml/4 horas; es decir, en periodos de 48 horas, tiempo al cual se cambia al medio en nuestros cultivos, el nivel de NGF alcanzaría 24 ng/ml (si la secreción fuera sostenida y constante).

Una concentración de 24ng/ml equivale a $0.5 \times 10^{-9}\text{M}$, en otras palabras, al 50% de la Kd para NGF del receptor TrkA. Tomando en cuenta que los experimentos de registro electrofisiológico se llevan a cabo en cultivos a una densidad 10 veces menor, podemos entender porque el NGF endógeno no afecta la corriente de sodio de las células β .

Sin embargo, en el islote pancreático la concentración que puede alcanzar el NGF llegaría a ser significativamente mayor, debido a las restricciones que impone la arquitectura insular al volumen de dilución del NGF. Es posible, también, que la interconexión celular, a través de uniones comunicantes o de otro tipo, permita que las células β secreten más NGF *in vivo* que *in vitro*, tal como sucede con la insulina²⁷. Debido a esto, el efecto del NGF endógeno podría ser más importante en el islote que en cultivo.

Siguiendo esta línea, es probable que el NGF sea necesario para mantener una expresión adecuada de canales iónicos, capaces de sostener la actividad eléctrica y, con ello, la secreción de insulina. Ante la falta de una concentración adecuada de NGF, la densidad de canales iónicos disminuiría con el tiempo en cultivo, por lo que las corrientes iónicas también serían de menor tamaño, en las células cultivadas en ausencia de NGF exógeno.

Las células expuestas al NGF exógeno por su parte, mantendrían una expresión adecuada de canales y, por lo tanto, corrientes iónicas de mayor tamaño, lo que explicaría nuestros hallazgos electrofisiológicos (ver figura 32). Para comprobar esta hipótesis, sería necesario realizar un análisis de las variaciones de las corrientes iónicas, tanto de sodio como de calcio, con respecto al tiempo en cultivo. Si la densidad de corriente es mayor inmediatamente después de la obtención de las células, que después de transcurridos algunos días en cultivo, entonces podríamos pensar que el NGF es responsable de mantener estas corrientes a niveles adecuados.

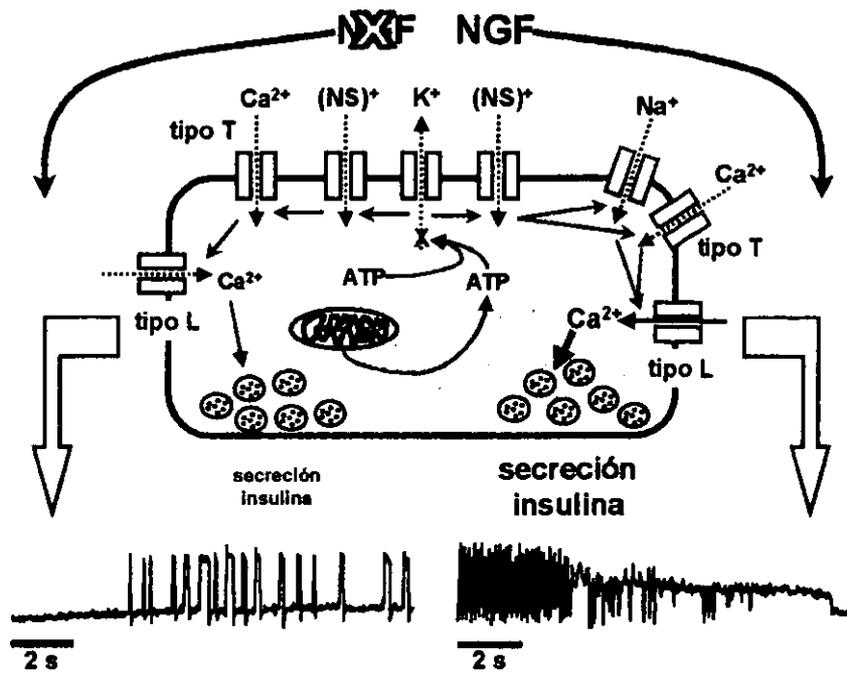


Figura 32. El NGF como modulador de la actividad eléctrica de las células.

Esta figura esquematiza el modelo que proponemos de la acción del NGF sobre la actividad eléctrica de las células β y la secreción de insulina. Este modelo propone que las células β pueden estar expuestas continuamente *in vivo* al NGF, dado que ellas mismas secretan este factor (porción derecha). El NGF mantiene una expresión adecuada de canales iónicos y con ello, una actividad eléctrica suficiente para mantener la secreción adecuada de insulina. Ante la falta de NGF, ya sea por deficiencias en los mecanismos de exocitosis, o bien, por las condiciones de cultivo *in vitro*, la expresión de canales iónicos disminuye. Esto lleva a una actividad eléctrica atenuada, que es insuficiente para sostener la secreción de insulina.

Por lo expuesto anteriormente, podemos concluir que el NGF es uno de los moduladores más importantes de la fisiología de la célula β , ya que ante la deficiencia de este factor de crecimiento, disminuiría la actividad eléctrica de las células β , y con ello la secreción de insulina. De esta manera, el eje autocrino/paracrino NGF-insulina podría estar relacionado causalmente con la patogenia de la diabetes mellitus: Si disminuye la secreción de NGF, entonces disminuye la secreción de insulina.

Por otra parte, en caso de que existan deficiencias en la regulación de la exocitosis de la célula β , podría afectarse tanto la secreción de insulina, como la de NGF, lo cual agravaría el cuadro diabético. Ante la posibilidad

que estos escenarios ocurran, es necesario caracterizar completamente el papel del NGF como modulador autocrino/paracrino de las células del islote pancreático, lo que podría fructificar en nuevas estrategias de terapia farmacológica para la diabetes mellitus.

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Vidaltamayo R, Sánchez-Soto MC, Rosenbaum T, Martínez-Merlos MT e Hiriart M. (1996) "Neuron-like phenotypic changes in pancreatic β -cells induced by NGF, FGF and dbAMPc". *Endocrine* **4**:19-26.
2. Teitelman G. (1990) "Insulin cells of pancreas extend neurites but do not arise from the neuroectoderm". *Dev. Biol.* **142**:368-379.
3. Polak M, Scharfmann R, Seilheimer B, Eisenbarth G, Dressler D, Verma I-M 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.
4. Kanaka-Gantenbein C, Tazi A, Czernichow P y Scharfmann, R. (1995) "In vivo presence of the high affinity nerve growth factor receptor Trk-A in the rat pancreas: differential localization during pancreatic development". *Endocrinology* **136**: 761-769.
5. Dean PM y Matthews EK. (1968) "Electrical activity in pancreatic islet cells". *Nature* **219**:389-390.
6. Henquin J-C y Meissner HP. (1984) "Significance of ionic fluxes and changes in membrane potential for stimulus-secretion coupling in pancreatic β -cells". *Experientia* **40**:1043-1052.
7. Chew LJ y Gallo V. (1998) "Regulation of ion channel expression in neural cells by hormones and growth factors". *Mol. Neurobiol.* **18**:175-225.
8. Rosenbaum T, Vidaltamayo R, Sánchez-Herrera D e Hiriart M. (1996) "Nerve Growth Factor increases sodium current in pancreatic β cells". *J. Memb. Biol.* **153**: 53-58.
9. Madsen OD, Jensen J, Blume N, Petersen HV, Lund K, Karlsen C, Andersen FG, Jensen PB, Larsson LI y Serup P. (1996) "Pancreatic development and

- maturation of the islet B cell: studies of pluripotent islet cultures". *Eur. J. Biochem.* **242**:435-445.
10. Yurina, NA. (1985) "Sistema Digestivo" en Histología, Eliseiev VG, Afanasiev YU y Yurina NA, Eds. MIR, Moscú, URSS; primera edición en español; pp. 414-498.
 11. Bonner-Weir S y Orci L. (1982) "New perspectives on the microvasculature of the islets of Langerhans in the rat". *Diabetes* **31**:883-889.
 12. Norman AW y Litwack G. (1997) Hormones; Academic Press, San Diego, USA; 2ª Edición; Capítulo 7, pp. 193-227.
 13. Orci L y Unger RH. (1975) "Functional subdivision of islets of Langerhans and the possible role of D-cells". *Lancet* **2**:1243-1244.
 14. Samols E y Stagner JI. (1990) "Islet somatostatin - microvascular, paracrine and pulsatile regulation". *Metabolism* **39**(Suppl. 2):55-60.
 15. Hellman B. (1970) "Methodological approaches to studies on the pancreatic islets". *Diabetologia* **6**:110-117.
 16. Larsson LI. (1978) "Endocrine pancreas tumors". *Hum. Pathol.* **9**:401-416.
 17. Okada Y, Tanoguchi 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.
 18. Cooper GJS, Willis AC, Clark A, Turner RC, Sim RB y Reid KBM. (1987) "Purification and characterization of a peptide from amyloid-rich pancreases of Type 2 diabetic patients". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:8628-8632.
 19. Ludvik B, Kautzky-Willer A, Prager R, Thomaseth K y Pacini G. (1997) "Amylin: history and overview". *Diabet. Med.* **14**(Suppl. 2):S9-13.
 20. Esni F, Taljedal IB, Perl AK, Cremer H, Christofori G y Semb H. (1999) "Neural cell adhesion molecule (N-CAM) is required for cell type segregation and normal ultrastructure in pancreatic islets". *J. Cell Biol.* **144**:325-337.

21. Perl AK, Dahl U, Wilgenbus P, Cremer H, Semb H y Christofori G. (1999) "Reduced expression of neural cell adhesion molecule induces metastatic dissemination of pancreatic beta tumor cells". *Nat. Med.* **5**:286-29
22. Cirulli V, Crisa L, Beattie GM, Mally MI, Lopez AD, Fannon A, Ptaszniak A, Inverardi L, Ricodi C, Deerinck T, Ellisman M, Reisfeld RA y Hayek A. (1998) "KSA antigen Ep-CAM mediates cell-cell adhesion of pancreatic epithelial cells: morphoregulatory roles in pancreatic islet development". *J. Cell Biol.* **140**:1519-1534.
23. Dahl U, Sjodin A y Semb H. (1996) "Cadherins regulate aggregation of pancreatic β -cells in vivo". *Development* **122**:2895-2902.
24. Katengwa S, Baetens D, Sadoul K, Buck CA, Halba PA y Rouiller DG. (1997) "Identification and characterization of alpha 3 beta 1 integrin on primary and transformed rat islet cells". *Exp. Cell Res.* **237**:394-402.
25. Cao D, Lin G, Westphale EM, Beyer EC y Steinberg TH. (1997) "Mechanisms for the coordination of intracellular calcium signaling in insulin-secreting cells". *J. Cell Sci.* **110**:497-504.
26. Charollais A, Serre V, Mock C, Cogne F, Bosco D y Meda P. (1999) "Loss of alpha 1 connexin does not alter the prenatal differentiation of pancreatic β cells and leads to the identification of another islet cell connexin". *Dev. Genet.* **24**:13-26.
27. Vozzi C, Ullrich S, Charollais A, Philippe J, Orci L y Meda P. (1995) "Adequate connexin-mediated coupling is required for proper insulin production". *J. Cell Biol.* **131**:1561-1572.
28. Yamamoto M, Kataoka K. (1988) "An electron microscope study of the development of the exocrine and endocrine pancreas with special reference to intercellular junctions". *Arch. Histol. Cytol.* **51**:315-325.
29. Meda P. (1996) "Gap junction involvement in secretion: the pancreas experience". *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **23**:2053-1057.

30. Pictet RL, Clark WR, Williams RH y Rutter WJ. (1972) "An ultrastructural analysis of the developing embryonic pancreas". *Dev. Biol.* **29**: 436-467.
31. Pictet R y Rutter WJ. (1972) "Development of the embryonic endocrine pancreas". En *Handbook of Physiology*, Sec. 7, vol. 1; Steiner DF y Frenkel M, Eds. American Physiology Society, Washington, D.C., USA; pp. 25-66.
32. Watanabe S, Abe K, Anbo Y y Katoh H. (1995) "Changes in the mouse exocrine pancreas after pancreatic duct ligation: a qualitative and quantitative histological study". *Arch. Histol. Cytol.* **58**: 365-374.
33. Han JH, Rall L y Rutter WJ. (1986) "Selective expression of rat pancreatic genes during embryonic development". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:110-114.
34. Teitelman G, Joh TH y Reis DJ. (1981) "Linkage of the brain-skin-gut axis: islet cells originate from dopaminergic precursors". *Peptides* **2**(Suppl 2):157-168.
35. Gittes GK y Rutter WJ. (1992) "Onset of cell-specific gene expression in the developing mouse pancreas". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:1128-1132.
36. Alumets J, Sundler F y Hakanson R. (1977) "Distribution, ontogeny and ultrastructure of somatostatin immunoreactive cells in the pancreas and gut". *Cell Tissue Res.* **185**:465-479.
37. Kim S, Hebrok M y Melton DA. (1997) "Notochord to endoderm signaling is required for pancreas development". *Development* **124**:4243-4252.
38. Golosow N y Grobstein C. (1962) "Epitheliomesenchymal interaction in pancreatic morphogenesis". *Dev. Biol.* **4**: 242-255.
39. Gittes GK, Galante PE, Hanahan D, Rutter WJ y Debas HT. (1996) "Lineage-specific morphogenesis in the developing pancreas: role of mesenchymal factors". *Development* **122**:439-447.
40. Schuger L, O'Shea KS, Nelso BB y Varani, J. (1990) "Organotypic arrangement of mouse embryonic lung cells on a basement membrane extract: involvement of laminin". *Development* **110**: 1091-1099.

41. Hebrok M, Kim SK y Melton, DA. (1998) "Notochord repression of endodermal Sonic hedgehog permits pancreas development". *Genes Dev.* **12**: 1705-1713.
42. Johnson RL y Scott MP. (1998) "New players and puzzles in the Hedgehog signaling pathway". *Curr. Op. Gen. Dev.* **8**: 450-456.
43. Ahlgren U, Pfaff TM, Jesell T, Edlund T y Edlund, H. (1997). "Independent requirements for ISL1 in formation of pancreatic mesenchyme and islet cells". *Nature* **385**: 257-260.
44. Apelqvist A, Ahlgren U y Edlund, H. (1997) "Sonic hedgehog directs specialised mesoderm differentiation in the intestine and pancreas". *Curr. Biol.* **7**: 801-804.
45. Kim, SK y Melton, DA. (1998) "Pancreas development is promoted by cyclopamine, a Hedgehog signaling inhibitor". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 13036-1304
46. Levin M, Johnson RL, Stern CD, Kuehn M y Tabin C. (1995) "A molecular pathway determining left-right asymmetry in chick embryogenesis". *Cell* **82**: 803-814.
47. Connolly D, Patel K, Seleiro E, Wilkinson D y Cooke, J. (1995) "Cloning, sequencing and expressional analysis of the chick homologue of follistatin". *Dev. Genet.* **17**: 65-77.
48. Yamaoka T, Idehara C, Yano M, Matsushita T, Yamada T, Ii S, Moritani M, Hata J, Sugino H, Noji S e Itakura, M. (1998) "Hypoplasia of pancreatic islets in transgenic mice expressing activin receptor mutants". *J. Clin. Invest.* **102**: 294-30
49. Edlund H. (1998) "Transcribing pancreas". *Diabetes* **47**: 1817-1823.
50. Miralles F, Czernichow P, Ozaki K, Itoh N y Scharfmann, R. (1999) "Signaling through fibroblast growth factor receptor 2b plays a key role in the development of the exocrine pancreas". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 6267-6272.

51. Offield MF, Letton TL, Lobosky PA, Ray M, Stein RW, Magnuson MA, Hogan BLM y Wright CVE. (1996) "PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum". *Development* **122**: 983-995.
52. Ohlsson H, Karlsson K y Edlund T. (1993) "IPF1, a homeodomain-containing transactivator of the insulin gene". *EMBO J.* **12**: 4251-4259.
53. Leonard J, Peers B, Johnson T, Ferreri K, Lee S y Montminy, M. (1993) "Characterization of somatostatin transactivating factor-1, a novel homeobox factor that stimulates somatostatin expression in pancreatic islet cells". *Mol. Endocrinol.* **7**: 1275-1283.
54. Jonsson J, Carlsson L, Edlund T y Edlund, H. (1994) "Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice". *Nature* **371**: 606-609.
55. Stoffers DA, Zinkin NT, Stanojevic V, Clarke WL y Habener JF. (1997) "Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence". *Nat. Genet.* **15**: 106-110.
56. Pearse AGE. (1982) "Islet cell precursors are neurons". *Nature* **295**: 96-97.
57. Pearse AGE. (1966). "Peptides in brain and intestine". *Nature* **262**: 92-94.
58. Hanahan D. (1985) "Heritable formation of pancreatic β -cell tumors in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes". *Nature* **315**: 115-122.
59. 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.
60. Guz Y, Montminy MR, Stein R, Leonard J, Gamer LW, Wright CVE y Teitelman G. (1995) "Expression of Stf-1, a putative insulin gene transcription factor, in b-cells of pancreas, duodenal epithelium and pancreatic exocrine and endocrine progenitors during ontogeny". *Development* **121**: 11-18.
61. Le Douarin NM y Teillet MA. (1973) "The migration of neural crest to the wall of the digestive tract in avian embryo". *J. Embryol. Exp. Morphol.* **30**: 31-36.

62. Fontaine J y le Douarin NM. (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 series". *J. Embryol. Exp. Morphol.* **41**: 209-222.
63. Pictet R, Rall LB, Phelps P y Rutter WJ. (1976) "The neural crest and origin of the insulin-producing and other gastrointestinal hormone-producing cells". *Science* **191**: 191-193.
64. Le Douarin NM. (1988) "On the origin of pancreatic endocrine cells". *Cell* **53**: 169-177
65. Philipson LH, Kusnetsov A, Larson T, Zeng Y y Westermark G. (1993) "Human, rodent, and canine pancreatic β -cells express a sodium channel alpha 1-subunit related to a fetal brain isoform". *Diabetes* **42**: 1372-1377.
66. Karlsson O, Thor S, Norbert T, Ohlsson H y Edlund T. (1990) "Insulin gene enhancer binding protein Isl-1 is a member of a novel class of proteins containing both a homeo- and a Cys-His domain". *Nature* **344**: 879-882.
67. Turque N, Plaza S, Radvanyi F, Carriere C y Saule S. (1994) "Pax-QNR/Pax-6, a paired box- and homeobox-containing gene expressed in neurons, is also expressed in pancreatic endocrine cells". *Mol. Endocrinol.* **8**: 929-938.
68. Naya FJ, Stellrecht CM y Tsai MJ. (1995) "Tissue-specific regulation of the insulin gene by a novel basic helix-loop-helix transcription factor". *Genes Dev.* **9**: 1009-1019.
69. Chong JA, Tapia-Ramirez J, Kim S, Toledo-Aral JJ, Zeng Y, Boutros MC, Altshuler YM, Frohman MA, Kraner SD y Mandel G. (1995) "REST: a mammalian silencer protein that restricts sodium channel gene expression to neurons". *Cell* **80**: 949-957.
70. 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**: 1929-1934.

71. Bonner-Weir S, Baxter LA, Schuppin GT y Smith FE. (1993) "A 2nd for regeneration of adult exocrine and endocrine pancreas - a possible recapitulation of embryonic-development". *Diabetes* **42**: 1715-1720.
72. Wang RN, Klöppel G y Bouwens L. (1995) "Duct-cell to islet-cell differentiation and islet growth in the pancreas of duct-ligated adult rats". *Diabetologia* **38**: 1404-141
73. Rosenberg L y Vitnik AI. (1992) "Trophic stimulation of the ductular islet cell axis: a new approach to the treatment of diabetes". *Adv. Exp. Med. Biol.* **321**: 95-104.
74. Rao MS, Yeldandi AV y Reddy JK. (1990) "Stem cell potential of ductular and periductular cells in the adult pancreas". *Cell Differ. Dev.* **29**: 155-163.
75. Hashimoto T, Kawano H, Daikoku S, Shima K, Taniguchi H y Baba S. (1988) "Transient coappearance of glucagon and insulin in the progenitor cells of the rat pancreatic islets". *Anat. Embryol.* **178**: 489-497.
76. DeKrijger RR, Aanstoot HJ, Kranenburg G, Reinhard M, Visser WJ y Bruining GJ. (1992) "The midgestational human fetal pancreas contains cells coexpressing islet hormones". *Dev. Biol.* **153**: 368-375.
77. Chick WL, Warren S, Chute RN, Like AA, Lauris V y Kitchen KC. (1977) "A transplantable insulinoma in the rat". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 628-632.
78. Madsen OD, Larsson L-I, Rehfeld JF, Schwartz T, Lemmark A, Labrecque A y Steiner DF. (1986) "Cloned cell lines from a transplantable insulinoma are heterogeneous and express cholecystokinin in addition to islet hormones". *J. Cell Biol.* **103**: 2025-2034.
79. Jensen J, Serup P, Karlsten C, Funder TF y Madsen OD. (1996) "mRNA profiling of rat islet tumors reveals Nkx 6.1 as a β -cell specific homeodomain transcription factor". *J. Biol. Chem.* **271**: 18749-18758.
80. Serup P, Petersen HV, Petersen EE y Madsen OD. (1995) "The homeodomain protein IPF1/STF1 is expressed in a subset of islet cells and promotes rat

insulin 1 gene expression dependent on an intact E1 helix-loop-helix factor binding site". *Biochem. J.* **310**: 997-1003.

81. Upchurch BH, Aponte GW y Leiter AB (1994) "Expression of peptide YY in all four islet cell types in the developing mouse pancreas suggests a common peptide YY-producing progenitor". *Development* **120**: 245-252.
82. Jackerott M, Oster A y Larsson LI. (1996) "PYY in developing murine islet cells: comparisons to development of islet hormones, NPY and BrdU incorporation". *J. Histochem. Cytochem.* **44**: 809-817.
83. Herrera PL, Huarte J, Zufferey R, Nichols A, Mermillod B, Philippe J, Muniesa P, Sanvito F, Orci L y Vasalli JD. (1994) "Ablation of islet endocrine cells by targeted expression of hormone-promoter-driven toxigenes". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 12999-13003.
84. Miralles F, Czernichow P y Scharfmann R. (1998) "Follistatin regulates the relative proportions of endocrine versus exocrine tissue during pancreatic development". *Development* **125**: 1017-1024.
85. 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.
86. Bailyes EM, Guest PC y Hutton JC. (1992) "Insulin synthesis". En *Insulin*; Ashcroft, FM y Ashcroft, SJH. Eds.; Oxford University Press New York, USA; 1ª Edición; pp. 64-92.
87. Soares MB, Schon E, Henderson A, Karathanasis SK, Cate R, Zeitlin S, Chirgwin J y Efstratiadis A. (1985) "RNA-mediated gene duplication: the rat preproinsulin gene is a functional retroposon". *Mol. Cell. Biol.* **5**: 2090-2103.
88. Bell GI, Pictet R, Rutter WJ, Cordell B, Tischer E y Goodman HM: (1980) "Sequence of the human insulin gene". *Nature* **284**: 26-32.

89. Clark, AR y Docherty, K. (1992) "The insulin gene". En *Insulin*. Ashcroft, FM y Ashcroft, SJH. Eds.; Oxford University Press, New York, USA; 1ª Edición; pp. 37-63.
90. Edlund T, Walker MD, Barr PJ y Rutter WJ. (1985) "Cell specific expression of the rat insulin gene: evidence for the role of two distinct 5' flanking sequences". *Science* **230**: 912-916.
91. Clark AR, Wilson ME, Leibiger I, Scott V y Docherty K. (1995) "A silencer and an adjacent positive element interact to modulate the activity of the human insulin promoter". *Eur. J. Biochem.* **232**:627-32.
92. Walker MD, Edlund T, Boulet AM y Rutter WJ. (1983) "Cell-specific expression controlled by the 5' flanking region of insulin and chymotrypsin genes". *Nature* **306**: 557-56
93. Docherty K y Clark AR. (1994) "Nutrient regulation of insulin gene expression". *FASEB J.* **8**:20-27.
94. Seufert J, Weir GC y Habener JF. (1998) "Differential expression of the insulin gene transcriptional repressor CCAAT/enhancer-binding protein beta and transactivator islet duodenum homeobox-1 in rat pancreatic beta cells during the development of diabetes mellitus". *J. Clin. Invest.* **101**:2528-39.
95. Lee JE, Hollenberg SM, Snider L, Turner DL, Lipnick N y Weintraub H. (1995) "Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein". *Science* **268**: 836-844.
96. Naya FJ, Huang HP, Qiu Y, Mutoh H, DeMayo FJ, Leiter AB y Tsai MJ. (1997) "Diabetes, defective pancreatic morphogenesis and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/NeuroD-deficient mice". *Genes Dev.* **11**: 2323-2334.
97. Aronheim A, Ohlsson H, Park CW, Edlund T y Walker MD. (1991) "Distribution and characterisation of helix-loop-helix enhancer binding proteins from pancreatic beta-cells and lymphocytes". *Nucleic Acid Res.* **19**:3893-3899.

98. Itkin-Ansari P, Bain G, Beattie GM, Murre C, Hayek A y Levine F. (1996) "E2A gene products are not required for insulin gene expression". *Endocrinology* **137**:3540-3543.
99. Dumonteil E, Laser B, Constant I y Philippe J. (1998) "Differential regulation of the glucagon and insulin I gene promoters by the basic helix-loop-helix transcription factors E47 and BETA2". *J. Biol. Chem.* **273**: 19945-19954.
100. Mutoh H, Naya FJ, Tsai MJ y Leiter AB. (1998) "The basic helix-loop-helix protein BETA2 interacts with p300 to coordinate differentiation of secretin-expressing enteroendocrine cells". *Genes Dev.* **12**:820-830.
101. Yamaoka T e Itakura M. (1999) "Development of pancreatic islets". *Intl. J. Mol. Med.* **3**: 247-26
102. Serup P, Jensen J, Andersen FG, Jorgensen MC, Blume N, Holst JJ y Madsen OD. (1996) "Induction of insulin and islet amyloid polypeptide production in pancreatic islet glucagonoma cells by insulin promoter factor ". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:9015-9020.
103. Stoffers DA, Ferrer J, Clarke WL y Habener JF. (1997). "Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY 4) linked to IPF1". *Nat. Genet.* **17**:138-139.
104. Sosa-Pineda B, Chowdhury K, Torres M, Oliver G y Gruss P. (1997) "The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing beta cells in the mammalian pancreas". *Nature* **386**:399-402.
105. Jensen J, Serup P, Karlsen C, Nielsen TF y Madsen OD. (1996) "mRNA profiling of rat islet tumors reveals Nkx 6.1 as a bet-cell specific homeodomain transcription factor". *J. Biol. Chem.* **271**:18749-18758.
106. Madsen OD, Jensen J, Petersen HV, Pedersen EE, Oster A, Andersen FG, Jorgensen MC, Jensen PB, Larsson LI y Serup P. (1997). "Transcription factors contributing to the pancreatic β -cell phenotype". *Horm. Metab. Res.* **29**: 265-270.
107. Philippe J y Missoten M. (1990) "Functional characterization of a AMPc-responsive element of the rat insulin I gene". *J. Biol. Chem.* **265**: 1465-1469.

108. Karin M y Smeal T. (1992) "Control of transcription factors by signal transduction pathways: the beginning of the end". *Trends Biochem. Sci.* **17**: 418-422.
109. Van Schravendijk CFH, Foriers A, Hooghe-Peters EL, Rogiers V, De Meyts P, Sodoyez J-C y Pipeleers DG. (1985) "Pancreatic hormone receptors on islet cells". *Endocrinology* **117**: 841-848.
110. Samols E, Marri G y Marks V. (1965) "Promotion of insulin secretion by glucagon". *Lancet* **2**: 415-416.
111. Bonner-Weir S y Orci L. (1982) "New perspectives on the microvasculature of the islets of Langerhans in the rat". *Diabetes* **31**: 883-889.
112. Satagner JI, Samols E y Bonner-Weir S. (1988) "b-a-d pancreatic islet cellular perfusion in dogs". *Diabetes* **37**: 1715-172
113. Fehmann H-C y Habener JF. (1992) "Galanin inhibits proinsulin gene expression stimulated by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide 1 (7-37) in mouse insulinoma β TC-1 cells". *Endocrinology* **130**: 2890-2896.
114. Leibiger B, Moede T, Schwarz T, Brown GR, Köehler M, Leibiger IB y Berggren P-O. (1998) "Short-term regulation of insulin gene transcription by glucose". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 9307-9312.
115. Macfarlane WM, McKinnon CM, Felton ZA, Cragg H, James RFL, y Docherty K. (1999) "Glucose stimulates translocation of the homeodomain transcription factor PDX1 from the cytoplasm to the nucleus in pancreatic β -cells". *J. Biol. Chem.* **274**: 1011-1016.
116. Macfarlane WM, Smith SB, James RFL, Clifton AD, Doza YN, Cohen P y Docherty K. (1997) "The p38/reactivating kinase mitogen-activated protein kinase cascade mediates the activation of the transcription factor insulin upstream factor 1 and insulin gene transcription by high glucose in pancreatic beta-cells". *J. Biol. Chem.* **272**: 20936-20944.
117. Benes C, Poitout V, Marie JC, Martin-Perez J, Roisin MP y Fagard R. (1999) "Mode of regulation of the extracellular signal-regulated kinases in the

- pancreatic β -cell line MIN6 and their implication in the regulation of insulin gene transcription". *Biochem. J.* **340**: 219-225.
118. Okun MM, Eskridge EM y Shields D. (1990) "Truncations of a secretory protein define minimum lengths required for binding to signal recognition particle and translocation across the endoplasmic reticulum membrane". *J. Biol. Chem.* **265**: 7478-7484.
119. Wiedmann M, Goerlich D, Hartmann E, Kurzchalia TV y Rapaport TA. (1989) "Photocrosslinking demonstrates proximity of a 34 kDa membrane protein to different portions of preprolactin during translocation through the endoplasmic reticulum". *FEBS Lett.* **257**: 263-268.
120. Savitz AJ y Meyer DI. (1990) "Identification of a ribosome receptor in the rough endoplasmic reticulum". *Nature* **346**: 540-544.
121. Ashcroft SJH, Bunce J, Lowry M, Hansen SE y Hedekov CJ. (1978) "The effect of sugars on (pro)insulin biosynthesis". *Biochem. J.* **174**: 517-526.
122. Shelness GS y Blobel G. (1990) "Two subunits of the dog canine signal peptidase complex are homologous to yeast SEC11 protein". *J. Biol. Chem.* **265**: 9512-9519.
123. Rhodes CJ y Halban PA. (1987) "Newly synthesised proin-sulin/insulin and stored insulin are released from pancreatic B cells predominantly via a regulated rather than a constitutive pathway". *J. Cell Biol.* **105**: 145-153.
124. Carrol RJ, Hammer RE, Chan SJ, Swift HH, Rubenstein AH y Steiner DF. (1988) "A mutant human proinsulin is secreted from the islets of Langerhans in increased amounts via an unregulated pathway". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 8943-8947.
125. Pearse BMF y Robinson MS. (1990) "Clathrin, adaptors and sorting". *Ann. Rev. Cell Biol.* **6**:151-17
126. Davidson HW y Hutton JC. (1987) "The insulin secretory-granule carboxypeptidase H". *Biochem. J.* **245**: 575-582.

127. Davidson HW, Rhodes CJ y Hutton JC. (1988) "Intraorganelar calcium and pH control proinsulin cleavage in the pancreatic B cell via two distinct site-specific endopeptidases". *Nature* **333**: 93-96.
128. Steiner DF, Michael J, Houghten R, Mathieu M, Gardner PR, Ravazzola M y Orci L. (1987) "Use of synthetic peptide antigen to generate antisera reactive with a proteolytic processing site in native human proinsulin: Demonstration of cleavage within clathrin-coated (pro)secretory vesicles". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 6184-6188.
129. Hutton JC, Penn EJ y Peshavaria M. (1982) "Isolation and characterisation of insulin secretory granules from a rat islet cell tumour". *Diabetologia* **23**: 365-373.
130. Ashcroft FM y Ashcroft SJH. (1992) "Mechanism of insulin secretion". En *Insulin*; Ashcroft, FM y Ashcroft, SJH. Eds.; Oxford University Press, New York, USA; 1ª Edición; pp. 97-150.
131. Meglasson MD y Matschinsky FM. (1986) "Pancreatic islet glucose metabolism and regulation of insulin secretion". *Diabetes/Metabolism Rev.* **2**:163-214.
132. Johson JH, Newgard CB, Milburn JL, Lodish HF y Thorens B. (1990) "The high Km glucose transporter of islets of Langerhans is functionally similar to the low affinity transporter of liver and has an identical primary sequence". *J. Biol. Chem.* **265**:6548-655
133. Tal M, Liang Y, Najafi H, Lodish HF, Matschinsky FM. (1992) "Expression and function of GLUT-1 and GLUT-2 glucose transporter isoforms in cells of cultured rat pancreatic islets". *J. Biol. Chem.* **267**:17241-17247.
134. De Vos A, Heimberg H, Quartier E, Huypens P, Bouwens L, Pipeleers D, Schuit F. (1995) "Human and rat beta cells differ in glucose transporter but not in glucokinase gene expression". *J. Clin. Invest.* **96**:2489-2495.

135. Liang Y, Cushman SM, Whitesell RR, Matschinsky FM. (1997) "GLUT1 is adequate for glucose uptake in GLUT2-deficient insulin-releasing beta-cells". *Horm. Metab. Res.* **29**:255-260.
136. Efrat S, Tal M, Lodish HF. (1994) "The pancreatic β -cell glucose sensor". *Trends Biochem. Sci.* **19**:535-538.
137. Meglasson MD, Burch PT, Berner DK, Najafi H, Wogin AP y Matchinsky FM. (1983) "Chromatographic resolution and kinetic characterization of glucokinase from islets of Langerhans". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**:5-9.
138. Ineydjian PB, Pilot P-R, Nospikel T, Milburn JL, Quaade C, Hughes S, Ucla C y Newgard CB. (1989) "Differential expression and regulation of the glucokinase gene in liver and islets of Langerhans". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:7838-7842.
139. German MS. (1993) "Glucose sensing in pancreatic islet beta cells: the key role of glucokinase and the glycolytic intermediates". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:1781-1785.
140. Postic C, Shiota M, Niswender KD, Jetton TL, Chen Y, Moates JM, Shelton KD, Lindner J, Cherrington AD, Magnuson MA. (1999) "Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic β cell-specific gene knock-outs using Cre recombinase". *J. Biol. Chem.* **274**:305-315.
141. Velho G, Froguel P. (1998) "Genetic, metabolic and clinical characteristics of maturity onset diabetes of the young". *Eur. J. Endocrinol.* **138**:233-239.
142. Sato Y, Nenquin M y Henquin JC. (1998) "Relative contribution of Ca^{2+} -dependent and Ca^{2+} -independent mechanisms to the regulation of insulin secretion by glucose". *FEBS Lett.* **421**:115-119.
143. Wollheim CB y Sharp WG. (1981) "Regulation of insulin secretion by calcium". *Physiol. Rev.* **61**:914-973.

144. Grapengiesser E, Gylfe E y Hellman B. (1989) "Three types of cytoplasmic Ca^{2+} oscillations in stimulated pancreatic β -cells". *Arch. Biochem. Biophys.* **268**:404-407.
145. Mislér S, Barnett DW, Falke LC. (1992) "Effects of metabolic inhibition by sodium azide on stimulus-secretion coupling in β -cells of human pancreatic islets of Langerhans". *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **418**:121-123.
146. Lang J, Fukuda M, Zhang H, Mikoshiba K y Wollheim CB. (1997) "The first C2 domain of synaptotagmin is required for exocytosis of insulin from pancreatic β -cells: action of synaptotagmin at low micromolar calcium". *EMBO J.* **16**:5837-5846.
147. Edwardson JM, An S y Jahn R. (1997) "The secretory granule protein syncollin binds to syntaxin in a Ca^{2+} -sensitive manner". *Cell* **90**:325-333.
148. Mohlig M, Wolter S, Mayer P, Lang J, Osterhoff M, Horn PA, Schatz H, Pfeifer A. (1997) "Insulinoma cells contain an isoform of Ca^{2+} /Calmodulin-dependent protein kinase II delta associated with insulin secretory vesicles". *Endocrinology* **138**:2577-2584.
149. Wenham RM, Landt M, Easom RA. (1994) "Glucose activates the multifunctional Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase in isolated rat pancreatic islets". *J. Biol. Chem.* **269**:4947-4952.
150. Ammala C, Eliasson L, Bokvist K, Larsson O, Ashcroft FM y Rorsman P. (1993) "Exocytosis elicited by action potentials and voltage-clamp calcium currents in individual mouse pancreatic β -cells". *J. Physiol.* **472**:665-688.
151. Easom RA. (1999) "CaM II kinase: A protein kinase with extraordinary talents germane to insulin exocytosis". *Diabetes* **48**:675-684.
152. Nishizuka Y. (1988) "The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation". *Nature* **334**:661-665.
153. Hughes SJ, Christie MR y Ashcroft SJH. (1987) "Potentiators of insulin secretion modulate Ca^{2+} sensitivity in rat pancreatic islets". *Mol. Cell Endocrinol.* **50**:231-236.

154. Christie MR y Ashcroft SJH. (1985) "Substrates for cyclic AMP-dependent protein kinase in islets of Langerhans : studies with forskolin and catalytic subunit". *Biochem. J.* **227**:727-736.
155. Hughes SJ y Ashcroft SJH. (1988) "Effects of phorbol ester and clomiphene on protein phosphorylation and insulin secretion in rat pancreatic islets". *Biochem. J.* **249**:825-830.
156. Howell SL, Jones PM, Persaud SJ. (1994) "Regulation of insulin secretion: the role of second messengers". *Diabetologia* **37**(suppl. 2):S30-S35.
157. Persaud SJ, Jones, PM y Howell SL. (1990) "Glucose-stimulated insulin secretion is not dependent on activation of protein kinase A". *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **173**:833-839.
158. Howell SL, Jones PM y Persaud SJ. (1990) "Protein kinase C and the regulation of insulin secretion". *Biochem. Soc. Trans.* **18**:114-116.
159. Komatsu M, Schermerhorn T, Noda M, Straub SG, Aizawa T, Sharp GW. (1997) "Augmentation of insulin release by glucose in the absence of extracellular Ca²⁺: new insights into stimulus-secretion coupling". *Diabetes* **46**:1928-1938.
160. Komatsu M, Noda M, Sharp GW. (1998) "Nutrient augmentation of Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent pathways in stimulus-coupling to insulin secretion can be distinguished by their guanosine triphosphate requirements: studies on rat pancreatic islets". *Endocrinology* **139**:1172-83.
161. Wang JL, Corbett JA, Marshall CA y McDaniel M. (1993) "Glucose-induced insulin secretion from purified β -cells: a role for modulation of Ca²⁺ influx by AMPc- and protein kinase C-dependent signal transduction pathways". *J. Biol. Chem.* **268**:7785-779
162. Osawa S y Sand O. (1986) "Electrophysiology of excitable endocrine cells". *Physiol. Rev.* **66**:887-952.

163. Cook DL, Satin LS, Ashford MLJ y hales CN. (1988) "ATP-sensitive K⁺ channels in pancreatic β -cells: a spare channel hypothesis". *Diabetes* **37**:495-498.
164. Smolen PD, Rinzel J y Sherman A. (1993) "Why pancreatic islets burst but single β cells do not: the heterogeneity hypothesis". *Biophys. J.* **64**:1668-1680.
165. Sherman A. (1997) "Contributions of modeling to understanding stimulus-secretion coupling in pancreatic β -cells". *Am. J. Physiol.* **271**:E362-E372.
166. Sherman A, Rinzel J y Keizer J. (1988) "Emergence of organized bursting in clusters of pancreatic β -cells by channel sharing". *Biophys. J.* **54**:411-425.
167. Andreu E, Soria B y Sanchez-Andres JV. (1997) "Oscillation of gap junction electrical coupling in the mouse pancreatic islets of Langerhans". *J. Physiol.* **498**:753-76
168. Schuit FC, In't Veld PA, Pipeleers DG. (1988) "Glucose stimulates proinsulin biosynthesis by a dose dependent recruitment of pancreatic β cells". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:3865-3869.
169. Orci L, Ravazzola M, Amherdt M, Madsen O, Vasalli JD y Perrelet A. (1985) "Direct identification of prohormone conversion site in insulin-secreting cells". *Cell* **42**:671-68
170. Hiriart M y Ramírez-Medeles MC. (1991) "Functional subpopulations of individual pancreatic B-cells in culture". *Endocrinology* **128**:3193-3198.
171. Kinard TA, de Vries G, Sherman A y Satin LS. (1999) "Modulation of the bursting properties of single pancreatic β cells by artificial conductances". *Biophys. J.* **76**:1423-1435.
172. Van De Winkel M y Pipeleers D. (1983) "Autofluorescence-activated cell sorting of pancreatic islet cells: purification of insulin-containing B-cells according to glucose-induced changes in cellular redox state". *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **114**:835-842.

173. Perez-Armendariz M, Roy C, Spray DC y Bennett MVL. (1991) "Biophysical properties of gap junctions between freshly dispersed pairs of mouse pancreatic beta cells". *Biophys. J.* **59**:76-92.
174. Sherman A y Rinzel J. (1991) "Model for synchronization of pancreatic beta-cells by gap junction coupling". *Biophys. J.* **59**:547-559.
175. Meissner HP. (1976) "Electrophysiological evidence for coupling between pancreatic islet cells". *Nature* **262**:502-504.
176. Eddelstone GT, Goncalves JA, Bangham JA y Rojas EJ. (1984) "Electrical coupling between cells in islets of Langerhans from mouse". *J. Membr. Biol.* **77**:1-14.
177. Palti Y, Ben David G, Lachov E, Mika YH, Omri G y Schatzberg R. (1996) "Islets of Langerhans generate wavelike electric activity modulated by glucose concentration". *Diabetes* **45**:595-60
178. Meda P, Perrelet A y Orci L. (1979) "Increase of gap junctions between pancreatic β -cells during stimulation of insulin secretion". *J. Cell Biol.* **82**:441-448.
179. Meissner HP y Preissler M. (1979) "Possible ionic mechanisms of the electrical activity induced by glucose and tolbutamide in pancreatic β -cells". En *Diabetes. International Congress series 500*. Waldhäusl WK, Ed., Excerpta Medica, Amsterdam, pp. 169-172.
180. Ashcroft FM y Rorsman P. (1991) "Electrophysiology of the pancreatic β -cell". *Prog. Biophys. Molec. Biol.* **54**:87-143.
181. Ashcroft SJH y Ashcroft FM. (1990) "ATP-regulated K-channels". *Cellular Signaling* **2**:197-214.
182. Ciani S y Ribalet B. (1988) "Ion permeation and rectification in ATP-sensitive channels from insulin-secreting cells (RINm5F): effects of K^+ , Na^+ , and Mg^{2+} ". *J. Membr. Biol.* **103**:171-180.

183. Isenberg C, Schröter K y Trube G. (1988) "Kinetics of ATP-dependent K⁺-channels in the membrane of murine pancreatic β -cells". *Pflügers Arch. Eur. J. Biophys.* **411**:R11
184. Sturgess NC, Hales CN y Ashford MLJ. (1986) Single channel recordings of potassium currents in an insulin-secreting cell line". *J. Endocrinol.* **109**:201-207.
185. Ashcroft FM y Kakei M. (1989) "ATP-sensitive K⁺-channels in rat pancreatic β -cells: modulation by ATP and Mg²⁺ ions". *J. Physiol.* **416**:349-367.
186. Dunne MJ, west-Jordan JA, Abraham RJ, Edwards RHT y Petersen OH. (1988) "The gating of nucleotide-sensitive K⁺ channels in insulin -secreting cells can be modulated by changes in the ratio ATP⁴⁻/ADP³⁻ and by non hydrolyisable analogues derivatives of both ATP and ADP". *J. Membr. Biol.* **104**:165-167.
187. Findlay I. (1987) The effects of magnesium upon the adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in a rat ATP-sensitive K⁺ channel in an insulin-secreting cell line ". *J. Physiol.* **391**:611-629.
188. Aguilar-Bryan L, Nichols CG, Wechsler SW, clement JP IV, Boyd AE III, González G, Herrera-Sosa H, Nguy K, Bryan J y Nelson DA. (1995) "Cloning of the β -cell high affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion". *Science* **268**:423-426.
189. Miki T, Nagashima K y Seino S. (1999) "The structure and function of the ATP-sensitive K⁺ channel in insulin-secreting pancreatic β -cells". *J. Mol. Endocrinol.* **22**:113-123.
190. Tucker SJ, Gribble FM, Zhao C, Trapp S y Ashcroft FM. (1997) "Truncation of Kir6.2 produces ATP-sensitive K⁺ channels in the absence of the sulphonylurea receptor". *Nature* **387**:179-183.
191. Aguilar-Bryan L, Bryan J. (1999) "Molecular biology of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels". *Endocr. Rev.* **20**:101-35.

192. Ribalet B y Beigelman PM. (1980) "Calcium action potentials and potassium permeability activation in pancreatic B-cells". *Am. J. Physiol.* **239**:C124-C133.
193. Hiriart M y Matteson DR. (1988) "Na channels and two types of Ca channels in rat pancreatic B cells identified with the reverse hemolytic plaque assay". *J. Gen. Physiol.* **91**:617-639.
194. Ashcroft FM, Kelly RP y Smith PA. (1990) "Two types of Ca channel in rat pancreatic B-cells". *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **415**:504-506.
195. Sala S y Matteson DR. (1990) "Single-channel recordings of two types of calcium channels in rat pancreatic β -cells". *Biophys. J.* **58**:567-57
196. Keahey HH, Rajan AS, Boyd AE III, Kunze DL. (1989) "Characterization of voltage -dependent calcium channels in a β -cell line". *Diabetes* **38**:188-193.
197. Sher E, Biancardi E, Pollo A, Carbone E, Li G, Wollheim CB, Clementi F. (1992) "omega-Conotoxin-sensitive, voltage-operated Ca^{2+} channels in insulin-secreting cells". *Eur. J. Pharmacol.* **216**:407-14.
198. Ramanadham S, Turk J. (1994) "omega-Conotoxin inhibits glucose- and arachidonic acid-induced rises in intracellular $[Ca^{2+}]$ in rat pancreatic islet beta-cells". *Cell Calcium* **15**:259-64.
199. Rosenbaum T, Vidaltamayo R e Hiriart M. (1998) "Effects of NGF on Ca and Na currents of pancreatic β cells". *Biophys. J.* **74**:A327.
200. Ligon B, Boyd AE 3rd, Dunlap K. (1998) "Class A calcium channel variants in pancreatic islets and their role in insulin secretion". *J. Biol. Chem.* **273**:13905-1
201. Rorsman P, Ashcroft FM. (1988) "Single Ca channel currents in mouse pancreatic B-cells". *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **412**:597-603.
202. Davalli AM, Biancardi E, Pollo A, Socci C, Pontiroli AE, Pozza G, Clementi F, Sher E, Carbone E. (1996) " Dihydropyridine-sensitive and -insensitive voltage-operated calcium channels participate in the control of glucose-

- induced insulin release from human pancreatic beta cells". *J. Endocrinol.* **150**:195-203.
203. Malaisse-Lagae F, Mathias PCF y Malaisse WJ. (1984) "Gating and blocking of calcium channels by dihydropyridines in the pancreatic β -cell". *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **123**:1062-1068.
204. Bhattacharjee A, Whitehurst RM Jr, Zhang M, Wang L, Li M. (1997) "T-type calcium channels facilitate insulin secretion by enhancing general excitability in the insulin-secreting beta-cell line, INS-1". *Endocrinology* **138**:3735-40.
205. Catterall W, Epstein PN. (1992) "Ion channels". *Diabetologia* **35**(Suppl. 2):S23-S33.
206. Seino S, Chen L, Seino M, Blondel O, Takeda J, Johnson JH, Bell GI. (1992) "Cloning of the alpha 1 subunit of a voltage-dependent calcium channel expressed in pancreatic beta cells". *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **89**:584-588.
207. Safayhi H, Haase H, Kramer U, Bihlmayer A, Roenfeldt M, Ammon HP, Froschmayr M, Cassidy TN, Morano I, Ahlijanian MK, Striessnig. (1997) "L-type calcium channels in insulin-secreting cells: biochemical characterization and phosphorylation in RINm5F cells". *J. Mol. Endocrinol.* **11**:619-629.
208. Vajna R, Schramm M, Pereverzev A, Arnhold S, Grabsch H, Klockner U, Perez-Reyes E, Hescheler J, Schneider T. (1998) "New isoform of the neuronal Ca^{2+} channel alpha1E subunit in islets of Langerhans and kidney: distribution of voltage-gated Ca^{2+} channel alpha1 subunits in cell lines and tissues". *Eur. J. Biochem.* **257**:274-285.
209. Piedras-Renteria ES, Chen CC, Best PM. (1997) "Antisense oligonucleotides against rat brain alpha1E DNA and its atrial homologue decrease T-type calcium current in atrial myocytes". *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **94**:14936-1494
210. Talley EM, Cribbs LL, Lee JH, Daud A, Perez-Reyes E, Bayliss DA. (1999) "Differential distribution of three members of a gene family encoding low voltage-activated (T-type) calcium channels." *J. Neurosci.* **19**:1895-191

211. Plant TD. (1988) "Na⁺ currents in cultured mouse pancreatic β -cells". *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **414**:S71-S75.
212. Mislér S, Barnett DW, Gillis KD y Pressel DM. (1992) "Electrophysiology of stimulus-secretion coupling in human β -cells". *Diabetes* **41**:1221-1228.
213. Rorsman P, Arkhammar P y Berggren P-O. (1986) "Voltage-activated Na⁺-currents and their suppression by phorbol ester in the clonal insulin-producing RINm5F-cells". *Am. J. Physiol.* **251**: C912-C919.
214. Ribalet B y Beigelman PM. (1982) "Effects of sodium on B-cell electric activity". *Am. J. Physiol.* **242**:C296-C303.
215. Rorsman P y Trube G. (1986) "Calcium and delayed potassium currents in mouse pancreatic B-cells under voltage-clamp conditions". *J. Physiol.* **374**:531-550.
216. Pace CS. (1979) "Activation of Na⁺-channels in islet cells: metabolic and secretory events". *Am. J. Physiol.* **237**:E130-E135.
217. Pressel DM, Mislér S. (1990). "Sodium channels contribute to action potential generation in canine and human pancreatic islet B cells". *J. Membr. Biol.* **116**:273-80 .
218. Hiriart M y Ramirez-Medeles MC. (1993) "Muscarinic modulation of insulin secretion by single pancreatic β -cells". *Mol. Cell. Endocrinol.* **93**:63-69.
219. Philipson LH, Kusnetsov A, Larson T, Zeng Y, Westermark G. (1993) "Human, rodent, and canine pancreatic beta-cells express a sodium channel alpha1-subunit related to a fetal brain isoform". *Diabetes* **42**:1372-1377.
220. Cannon SC, McClatchey AI, Gusella JF. (1993) "Modification of the Na⁺ current conducted by the rat skeletal muscle alpha subunit by coexpression with a human brain beta subunit". *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **423**:155-157.
221. Velasco JM y Petersen OH. (1987) "Voltage-activation of high conductance K⁺-channel in the insulin-secreting cell line RINm5F is dependent on local extracellular Ca²⁺ concentration". *Biochem. Biophys. Acta* **896**:305-32

222. Teitelman G, Lee JK. (1987) "Cell lineage analysis of pancreatic islet cell development: Glucagon and insulin cells arise from catecholaminergic precursors present in the pancreatic duct". *Dev. Biol.* **121**:454-466.
223. Levi-Montalcini R. (1987) "The nerve growth factor: Thirty-five years later". *EMBO J.* **6**:1145-1154.
224. Bruecker ED. (1948) "Implantation of tumors in the hind limb field of the embryonic chick and the developmental response of the lumbosacral nervous system". *Anat. Rec.* **102**:369-390.
225. Cohen S y Levi-Montalcini R. (1956) "A nerve-stimulating factor isolated from sarcomas 37 and 180". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **40**:1014-1018.
226. Cohen s. (1958) "Purification of a nerve-growth promoting protein form the mouse salivary gland and its neurocytotoxic serum". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **46**:302-31
227. Scott J, Selby M, Urdea M, Quiroga M, Bell G y Rutter WJ. (1983) "Isolation and nucleotide sequence of a cDNA encoding the precursor of mouse nerve growth factor". *Nature* **302**:538-540.
228. Server A y Shooter E. (1977) "Nerve growth factor". *Adv. Prot. Chem.* **31**:339-343.
229. Varon S, Nomura J y Shooter E. (1967) "The isolation of the mouse nerve growth factor protein in a high molecular weight form". *Biochemistry* **6**:2202-2209.
230. Ronne H, Anundi H, Rask L, Peterson PA . (1984) "7S Nerve growth factor alpha and gamma subunits are closely related proteins". *Biochemistry* **23**:1229-1234.
231. Evans BA, Richards RI. (1985) " Genes for the alpha and gamma subunits of mouse nerve growth factor are contiguous". *EMBO J.* **4**:133-138.
232. Meier R, Becker-Andre M, Gotz R, Heumann R, Shaw A, Thoenen H. (1986) "Molecular cloning of bovine and chick nerve growth factor (NGF): delineation

- of conserved and unconserved domains and their relationship to the biological activity and antigenicity of NGF". *EMBO J.* **5**:1489-1493.
233. Bax B, Blundell TL, Murray-Rust J, McDonald NQ. (1997) "Structure of mouse 7S NGF: a complex of nerve growth factor with four binding proteins". *Structure* **5**:1275-1285.
234. Ibanez CF. (1994) "Structure-function relationships in the neuro-trophin family". *J. Neurobiol.* **25**:1349-136
235. Nilsson AS, Fainzilber M, Falck P, Ibanez CF. (1998) "Neurotrophin-7: a novel member of the neurotrophin family from the zebrafish". *FEBS Lett.* **424**:285-290.
236. Meakin SO y Shooter EM. (1992) "The nerve growth factor family of receptors". *Trends Neurosci.* **15**:323-33
237. Chao MV y Hempstead BL. (1995) "p75 and Trk: a two receptor system". *Trends. Neurosci.* **18**:321-326.
238. Hempstead BL, Martin-Zanca D, Kaplan DR, Parada LF y Chao MV. (1991) "High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor". *Nature* **350**:678-683.
239. Tartaglia LA, Pennica D y Goeddel DV. (1993) "Ligand passing: the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor". *J. Biol. Chem.* **268**:18542-18548.
240. Huber LJ y Chao MV. (1995) " A potential interaction of p75 and trkA NGF receptors revealed by affinity crosslinking and immunoprecipitation". *J. Neurosci. Res.* **40**:557-563.
241. Wolf DE, McKinnon CA, Daou MC, Stephens RM, Kaplan DR, Ross AH. (1995) " Interaction with TrkA immobilizes gp75 in the high affinity nerve growth factor receptor complex". *J. Biol. Chem.* **270**:2133-2138.
242. Chao MV. (1994) "The p75 neurotrophin receptor". *J. Neurobiol.* **25**:1373-1385.

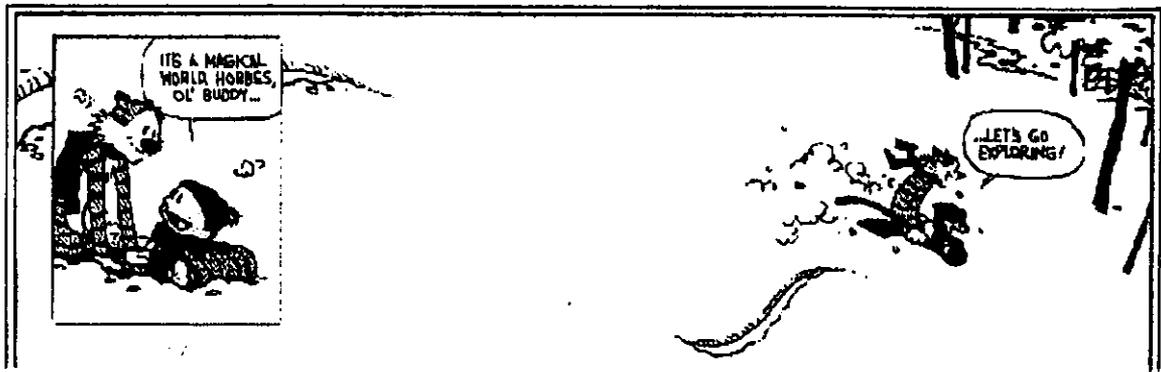
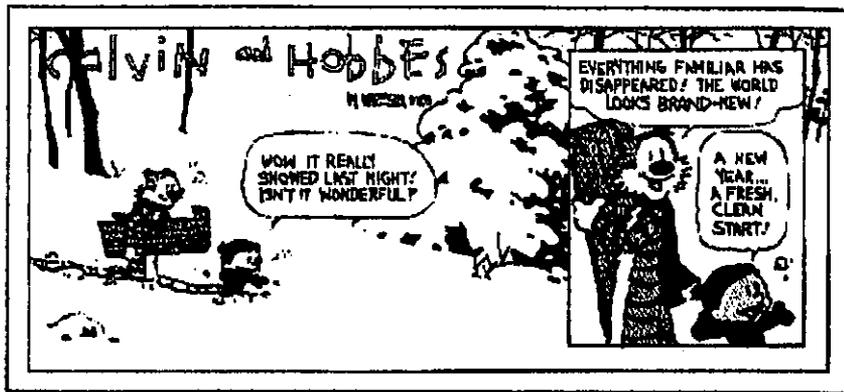
243. Chapman BS. (1995) "A region of the 75 kDa neurotrophin receptor homologous to the death domains of TNFR-I and Fas". *FEBS Lett.* **374**:216-220.
244. Cassacia-Bonnefil P, Carter BD, Dobrowsky RT y Chao MV. (1996) "Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75". *Nature* **383**:716-719.
245. Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. (1995) "Opposing effects of Erk and JNK-p38 map kinases on apoptosis". *Science* **270**:1326-133
246. McInnes C, Sykes BD. (1997) "Growth factor receptors: Structure, mechanism, and drug discovery". *Biopoly.* **43**:339-366.
247. Kaplan DR, Hempstead BL, Martin-Zanca D y Parada LF. (1991) "The *trk* proto-oncogene product: a signal transduction receptor for nerve growth factor". *Science* **252**:554-558.
248. Greene LA y Tischler AS. (1982) "PC12 pheochromocytoma cells in neurobiological research". *Adv. Cell. Neurobiol.* **3**:373-414.
249. Jing S, Tapley P y Barbacid M. (1992) "Nerve growth factor mediates signal transduction through *trk* homodimer receptors". *Neuron* **9**:1067-1079.
250. Cunningham ME, Stephens RM, Kaplan DR y Greene LA. (1997) "Autophosphorylation of activation loop tyrosines regulates signaling by the TRK nerve growth factor receptor". *J. Biol. Chem.* **272**:10957-10967.
251. Pawson T y Gish GD. (1992) "SH2 and SH3 domains: from structure to function". *Cell* **71**:359-362.
252. Greene LA y Kaplan DR. (1995) "Early events in neurotrophin signaling via *trk* and p75 receptors". *Curr. Opin. Neurobiol.* **5**:579-587.
253. Kaplan DR y Miller FD. (1997) "Signal transduction by the neurotrophin receptors". *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**:213-22
254. Kaplan DR. (1998) "Studying signal transduction in neuronal cells: the Trk/NGF system". *Prog. Brain Res.* **117**:35-46.

255. Dudek H, Datta Sd, Franke TF, Birnbaum MJ, YaoR, Cooper GM, Segal RA, Kaplan DK, Greenberg ME. (1997) "Regulation of neuronal survival by the serine-threonine kinase Akt". *Science* **275**:661-665.
256. Bredesen DE y Rabizadeh S. (1997) "p75NTR and apoptosis: trk-dependent and Trk-independent effects". *Trends Neurosci* **20**:287-290.
257. Frödin M, sekine N, Roche E, Filloux C, Prentki M, Wollheim CB y Van Obberghen E. (1995) "Glucose, other secretagogues, and nerve growth factor stimulate mitogen-activated protein kinase in the insulin-secreting β -cell line, INS-1". *J. Biol. Chem.* **270**:7882-7889.
258. Ashcroft SJ. (1994) "Protein phosphorylation and beta-cell function". *Diabetologia* **37**(Suppl. 2):S21-S29.
259. Ditcher MA, Tischler AS y Greene LA. (1977) "Nerve growth factor-induced increase in electrical excitability and acetylcholine sensitivity of rat pheochromocytoma cell line". *Nature* **268**:501-504.
260. D'Arcangelo G., Paradiso K., Shepherd D., Brehm P., Halegoua S. y Mandel G. (1993) "Neuronal growth factor regulation of two different sodium channel types through distinct signal transduction pathways", *J. Cell Biol.* **4**:915-2
261. Chomczynski P. (1993) "A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples". *Biotechniques* **15**:532-534.
262. Eizirik DL, Bendtzen K, Sandler S. (1991) "Short exposure of rat pancreatic islets to interleukin-1 beta induces a sustained but reversible impairment in beta-cell function: influence of protease activation, gene transcription, and protein synthesis". *Endocrinology* **128**:1611-1616.
263. Bordin S, Boschero AC, Carneiro EM y Atwater I. (1995) "Ionic mechanisms involved in the regulation of insulin secretion by muscarinic agonists". *J. Memb. Biol.* **148**:177-184.
264. Yajima H, Komatsu M, Schermerhorn T, Aizawa T, Kaneko T, Nagai M, Sharp GW, Hashizume K. (1999) "cAMP enhances insulin secretion by an

action on the ATP-sensitive K⁺ channel-independent pathway of glucose signaling in rat pancreatic islets". *Diabetes* **48**:1006-1012.

265. Ginty DD, Fanger GR, Wagner JA, Maue RA. (1992) "The activity of AMPc-dependent protein kinase is required at a posttranslational level for induction of voltage-dependent sodium channels by peptide growth factors in PC12 cells". *J. Cell Biol.* **116**:1465-1473.
266. Kalman D, Wong B, Horvai AE, Cline MJ, O'Lague PH. (1990) "Nerve growth factor acts through AMPc-dependent protein kinase to increase the number of sodium channels in PC12 cells". *Neuron* **4**:355-366.
267. Hilborn MD, Rane SG, Pollock JD. (1997) "EGF in combination with depolarization or AMPc produces morphological but not physiological differentiation in PC12 cells". *J. Neurosci. Res.* **47**:16-26.
268. Marshall CJ. (1995) "Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated activation". *Cell* **80**:179-185.
269. York RD, Yao H, Dillon T, Ellig CL, Eckert SP, McCleskey EW y Stork PJS. (1998) "Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor". *Nature* **392**:622-626.
270. Fernyhough P, Diemel LT, Brewster WJ, Tomlinson DR. (1995) "Altered neurotrophin mRNA levels in peripheral nerve and skeletal muscle of experimentally diabetic rats". *J. Neurochem.* **64**:1231-1237.
271. Faradji V, Sotelo J. (1990) "Low serum levels of nerve growth factor in diabetic neuropathy". *Acta Neurol. Scand.* **81**:402-406.
272. Sherer TB, Neff PS, Tuttle JB. (1998) "Increased nerve growth factor mRNA stability may underlie elevated nerve growth factor secretion from hypertensive vascular smooth muscle cells". *Brain Res. Mol. Brain Res.* **62**:167-174.

VII. APÉNDICES



Neuron-Like Phenotypic Changes in Pancreatic β -Cells Induced by NGF, FGF, and dbcAMP

Román Vidaltamayo, Ma. Carmen Sánchez-Soto, Tamara Rosenbaum, Teresa Martínez-Merlos, and Marcia Hiriart

Department of Bioenergetics, Institute of Cellular Physiology, Universidad Nacional Autónoma de México, México

We studied the effects of nerve growth factor (NGF), fibroblast growth factor (FGF), and dibutyl-8-cyclic adenosine monophosphate (dbcAMP) on rat pancreatic β -cell morphology and of NGF and dbcAMP on insulin secretion. After 2 wk in culture, nearly 3% of β -cells extended neurite-like processes spontaneously; when cells were treated with NGF, almost 30% of them extended processes. In the presence of dbcAMP, almost all β -cells flattened, and the extension of neurite-like processes was more pronounced in fetal than in adult cells. The most prominent effect, regardless of age, was observed in cells treated with NGF and dbcAMP together, since the percentage of neurite-like bearing β -cells increased to 50%. β -cells cultured under these conditions maintained their immunoreactivity to insulin and nearly all β -cells and their neurite-like processes were also positive to GABA, tubulin, tau protein, and N-CAM. FGF increased the percentage of adult β -cells bearing neurite-like processes to 13%, and FGF and dbcAMP applied together to 40%. β -cells treated with NGF and dbcAMP for 5 to 7 d preserved their capability to secrete the hormone in response to different extracellular glucose concentrations. Insulin secretion of dbcAMP-treated β -cells was 2.5-fold higher than in control cells. NGF-treated cells were able to discriminate between different glucose concentrations, a property lost in control cells with time in culture.

Key Words: NGF; cAMP; FGF; pancreatic β -cells; insulin secretion; tau protein.

Introduction

Nerve growth factor (NGF) is of critical importance in the development and maintenance of sensory and sympa-

thetic neurons. Other cell types that respond to NGF include chromaffin adrenal cells (reviewed by Levi-Montalcini, 1987), and the tumoral cell lines PC12, derived from a rat pheochromocytoma (Greene and Tischler, 1976) as well as different insulin-secreting cell lines (Polak et al., 1993; Scharfmann et al., 1993; Tazi et al., 1995).

Phenotypical changes promoted by NGF include the extension of neurite-like processes; these changes are enhanced by a combined treatment with NGF and cAMP in normal and tumoral cells derived from the adrenal medulla (Schubert and Whitlock, 1977; Heidemann et al., 1985; Pacheco Cano et al., 1990).

Other important trophic factors are those derived from fibroblasts. Fibroblast growth factors (FGF) are capable of mimicking many actions of NGF in hippocampal neurons and in cerebral cortical neurons, as well as in the PC12 cell-line (Rydel and Greene, 1987).

It has been described that mice β -cells are able to extend neurite-like processes spontaneously. These processes contain neurite-specific intermediate filament proteins (Teitelman, 1990). However, the effects of NGF, FGF, and cAMP have not been fully characterized in normal pancreatic β -cells.

Recent reports show that cell lines RINm5F, INS-1, as well as rat β -cells, express high- and low-affinity nerve growth factor receptors, *trk-A* and *p75^{ngf}*, respectively (Scharfmann et al., 1993; Kanaka-Ganteinbein et al., 1995a), and that RINm5F cells respond to NGF extending neuron-like processes (Polak et al., 1993).

Although β -cells express NGF receptors, it has not been studied if NGF induces neuron-like processes or physiological changes in normal β -cells, nor if the sensitivity to the factor depends on the age of cells.

In the present study, we investigated the effects of NGF and dbcAMP on the phenotype of rat adult and fetal pancreatic β -cells in primary culture, and of FGF on adult β -cells. We also evaluated the initial effects of NGF and dbcAMP on β -cell physiology, focusing on the insulin secretory response of treated cells to different glucose concentrations.

Received September 5, 1995; Revised October 19, 1995; Accepted November 20, 1995.

Author to whom all correspondence and reprint requests should be addressed: Dr. Marcia Hiriart, Department of Bioenergetics, Institute of Cellular Physiology, U.N.A.M., Mexico D.F., 04510 Mexico.

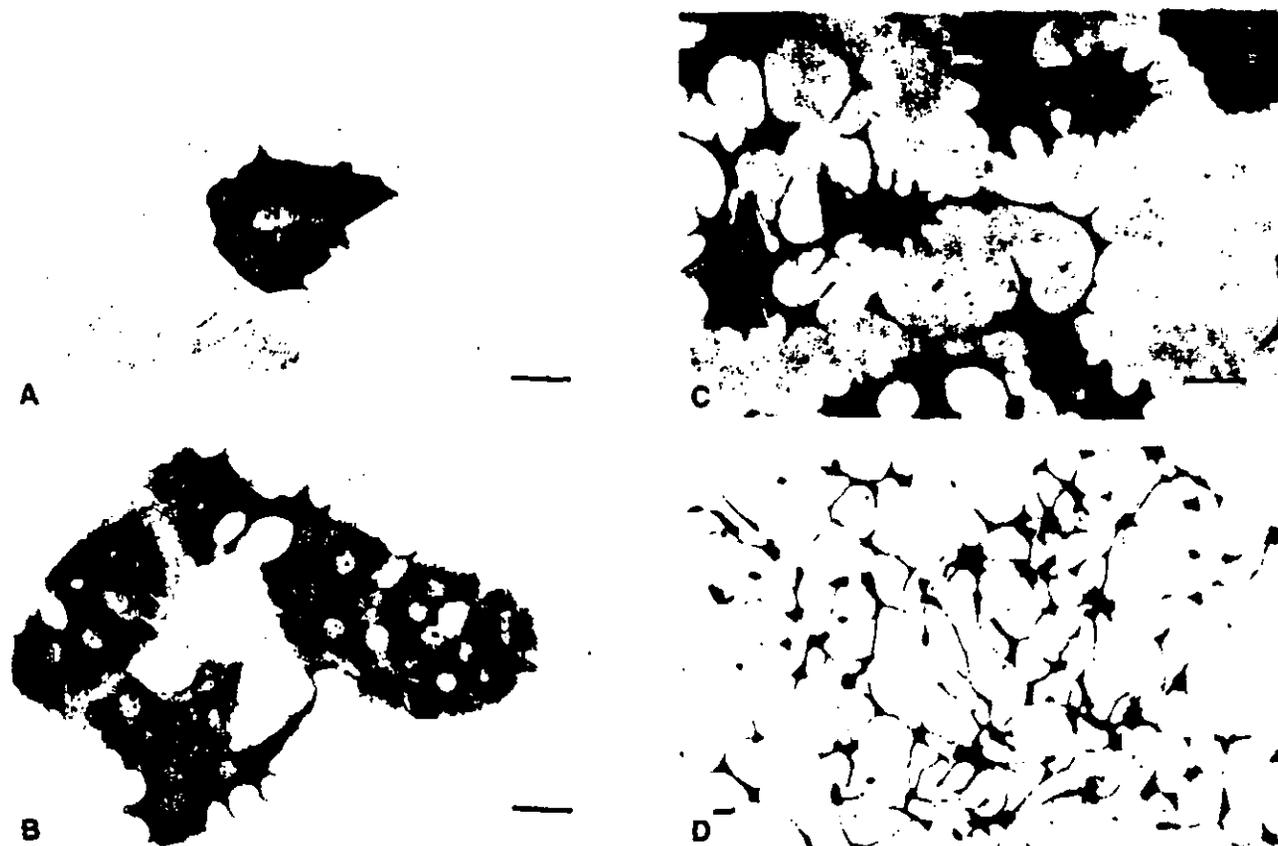


Fig. 1. Effect of NGF and cAMP on pancreatic β -cell morphology. Isolated adult islet cells were cultured for 2 wk, and processed for insulin immunocytochemistry. Culture conditions were as follows: (A) Control cells. (B) Cells treated with 5 mM dbcAMP. (C, D) Cells treated with 2.5S NGF (40 ng/mL) and 5 mM dbcAMP. Bar, 20 μ m.

Results

NGF and dbcAMP

Induce Phenotypical Changes in β -cells

After 2 wk in culture, control β -cells showed a characteristic round appearance and formed small clusters, as shown in Fig. 1A. A small percentage of control β -cells developed neurite-like processes spontaneously (Table 1).

The percentage of adult β -cells bearing neurite-like processes did not significantly increase when cells were exposed during 2 wk to the complete molecule of NGF (7S NGF). Instead, when cells were cultured with the biologically active NGF β -subunit (2.5S NGF) (Angeletti and Bradshaw, 1971), 26% of adult β -cells developed neurite-like processes, as shown in Table 1.

In contrast, 29% of fetal β -cells developed neurite-like processes when exposed to 7S NGF for the same period (Table 1).

It has been shown in other cell types that permeable analogues of cAMP can partially mimic the effects of NGF and act synergistically with NGF to promote neurite outgrowth (Schubert and Whitlock, 1977; Heidemann, et al., 1985). As shown in Fig. 1B, most of the β -cells exposed in culture to 5 mM dbcAMP, flattened, acquired

stellate-like forms, and tended to converge forming monolayers, not clumps. Under this condition, 18.8% of adult cells and 30.5% of fetal cells extended neurite-like processes (Table 1).

We observed the most dramatic changes in adult and fetal β -cells when they were cultured with both NGF (7S or 2.5S) and dbcAMP. In this case, most β -cells from both ages flattened and converged, forming large groups of cells in which peripheral β -cells developed long neurite-like processes (Fig. 1C, D). Nearly 50% of adult and fetal β -cells extended neurite-like processes (Table 1).

In fetal β -cells, we did not observe an increase in neurite-like process length. However, in adult β -cells, the processes were 50% longer when treated with 7S NGF and dbcAMP, and 117% longer when treated with 2.5S NGF and dbcAMP, as compared to control cells (Table 1). These results suggest different but synergistic effects for NGF and dbcAMP on β -cell morphology.

Also, to determine whether the modified insulin-positive cells were also synthesizing GABA, we processed cultures of islet cells for double immunocytochemical visualization of insulin and GABA antibodies. Almost all treated and untreated β -cells, as well as the neurite-like processes, were doubly labeled, as shown in Fig. 2.

Table 1
Morphological Changes of Pancreatic β -Cells
Stimulated by NGF and dbcAMP

Group	% Neurite Bearing Cells	Neurite Length, μ m
Adult Cells		
Control (9) ^a	3.7 \pm 0.4	46.3 \pm 1.4
dbcAMP (9)	18.8 \pm 3.4 ^b	61.2 \pm 0.5 ^c
NGF 7S (5)	5.2 \pm 0.9	50.8 \pm 1.4
NGF 2.5S (4)	26.15 \pm 2.2 ^b	57.9 \pm 0.7
NGF 7S + dbcAMP (5)	50.2 \pm 8.3 ^b	69.2 \pm 0.3 ^c
NGF 2.5S + dbcAMP (4)	43 \pm 3.5 ^b	100.7 \pm 1.2 ^b
FGF (4)	12.6 \pm 1.4 ^b	61.3 \pm 1.0 ^c
FGF + dbcAMP (4)	40 \pm 3.0 ^b	81 \pm 10.4 ^c
Fetal Cells		
Control (4)	2.5 \pm 1.5	36.7 \pm 8.5
dbcAMP (4)	30.5 \pm 7.7 ^c	28 \pm 0.4
NGF 7S (4)	29 \pm 3.0 ^b	50.8 \pm 0.7
NGF 7S + dbcAMP (4)	51.5 \pm 11.5 ^b	42 \pm 0.3

^a The number in parentheses denotes the number of independent experiments assessed, each one per duplicate.

^b $P < 0.01$, with respect to the control.

^c $P < 0.05$, with respect to the control.

Microtubule Involvement in Neurite-Like Extension in β -Cells

The outgrowth and maintenance of neurite-like processes require the assembly of microtubules. Tau protein is a microtubule-associated protein (found primarily in neuronal tissue) that promotes microtubule assembly and stabilization (Olmsted, 1986; Matus, 1988).

We searched for β -tubulin (data not shown) and tau presence in insulin positive- β cells, by double staining with ICC and indirect IF. As shown in Fig. 3, in cells treated with NGF and dbcAMP, insulin and tau were present in the cell body and the neurite-like processes. However, both antigens were also present in control cells, but no quantitative experiments to detect if the concentration of these molecules was modified by the treatment were performed.

N-CAM Expression in β -Cells

The neural adhesion molecule (N-CAM) is a cell surface glycoprotein expressed in a variety of cell types, including neurons and glia, that has been implicated in the cell-to-cell recognition process during development. NGF has been described to induce a four- to fivefold increase in relative levels of N-CAM in PC12 cells (Prentice et al., 1987). We assessed the expression of N-CAM in β -cells under different treatments. In Fig. 4, we show cells treated with NGF and dbcAMP double labeled for insulin and N-CAM. It is clear that all insulin-positive cells also contain N-CAM (in both the cell body and the neurite-like processes); however, control cells also contained N-CAM, and we did not evaluate to see if the relative levels of N-CAM were modified by NGF.

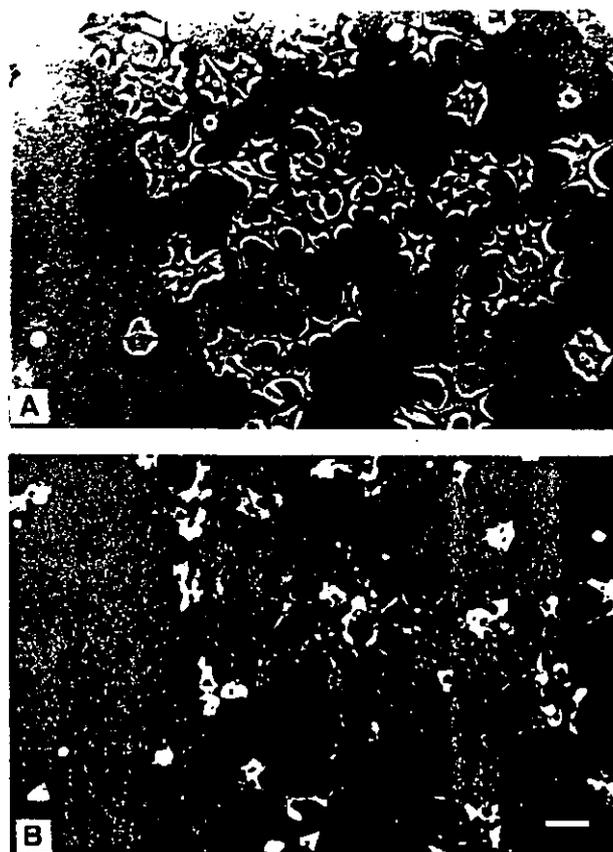


Fig. 2. Presence of GABA in adult β -cells. β -cells cultured for 2 wk with 2.5S NGF and dbcAMP. (A) Immunocytochemistry for insulin. (B) Immunofluorescence for GABA at a light wavelength of 450–490 nm. Bar, 20 μ m.

FGF Also Induces Morphological Changes in Adult β -Cells

As stated, after 2 wk in culture, 3% of adult β -cells developed neurite-like processes spontaneously under control conditions, and when cells were treated with dbcAMP, the percentage raised to 19% (Table 1).

In the presence of FGF, 13% of cells developed neurite-like processes, and when dbcAMP was also included with FGF, 40% of the cells were modified (Table 1). Neurite-like processes were 30% longer in cells treated with FGF, and 75% longer when treated with FGF and dbcAMP, as compared to control cells (Table 1), suggesting again that dbcAMP has a synergistic effect with FGF on β -cell morphology.

Insulin Secretion by Single Adult β -Cells Treated with NGF and dbcAMP

In order to determine if the initial phenotypical changes were associated to functional modifications, insulin secretion of isolated β -cells exposed to the different NGF and dbcAMP conditions was measured with a reverse hemolytic plaque assay (Neill and Frawley, 1983). We decided to use β -cells between d 5 and 7 in culture because phenotypic

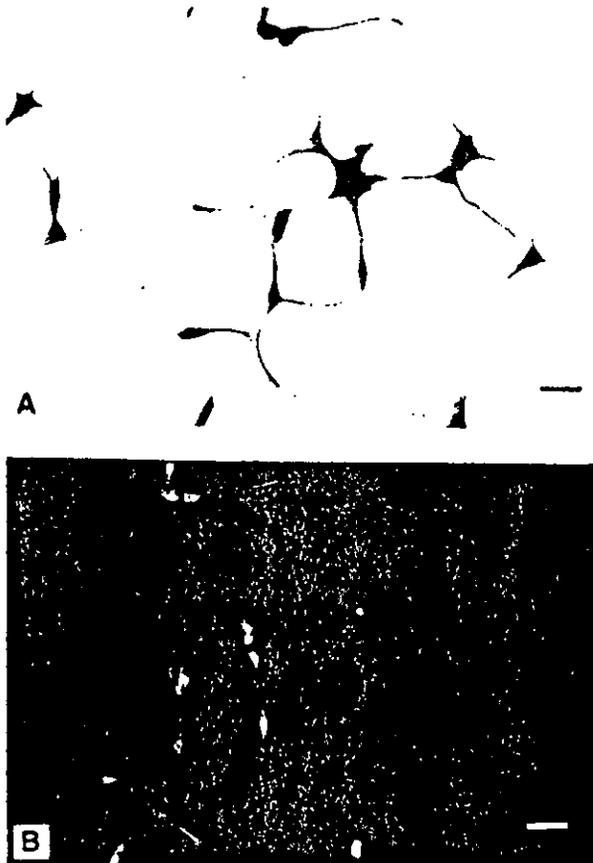


Fig. 3. Tau protein is present in β -cells. Adult islet cells were cultured for 2 wk in the presence of 2.5S NGF and dbcAMP. (A) Immunocytochemistry for insulin. Bar, 25 μ m. (B) Immunofluorescence for tau protein. Bar, 20 μ m.

changes are mild at this time, and it is possible to detach cells from Petri dishes and assay them for insulin secretion, thereby avoiding cell damage.

The effect of NGF and dbcAMP on total insulin secretion index of adult β -cells after 5–7 d in culture is shown in Fig. 5. Control cells secreted insulin in response to glucose stimulation; however, their capability to discriminate between different concentrations of glucose declined, as their response to 20.6 mM glucose was not significantly different from the basal secretion (in 5.6 mM glucose).

Insulin secretion by NGF-treated cells was not significantly different from that of control cells; however, NGF-treated cells were more sensitive to glucose concentration changes, as the insulin secretion index in 20.6 mM glucose was 79% higher than in 5.6 mM glucose.

The response to glucose of dbcAMP cultured β -cells was remarkable, even though the compound was not present during the assay. The response of the dbcAMP-treated β -cells to 5.6 mM and 20 mM glucose was in both cases nearly threefold higher than in control cells. Moreover, the insulin secretion index in dbcAMP-treated cells increased 39% in high glucose to basal glucose, respectively.

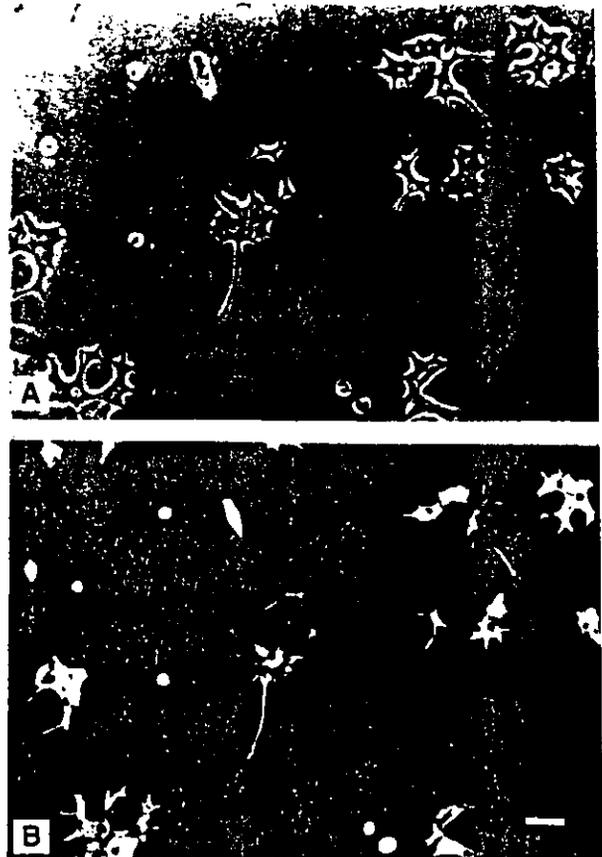


Fig. 4. N-CAM presence in β -cells. Adult islet cells were cultured for 2 wk in the presence of 2.5SNGF and dbcAMP. (A) Immunocytochemistry for insulin. (B) Immunofluorescence for N-CAM. Bar, 20 μ m.

Finally, total insulin secretion of β -cells cultured with NGF and dbcAMP was very similar to that of cells cultured with dbcAMP only. The cellular mechanism that explains the increase in insulin secretion by dbcAMP involves the amplification of hormone secretion by individual cells, and the increase in the percentage of plaque-forming cells, in both glucose concentrations (Table 2).

Discussion

Pancreatic β -cells manifest an extraordinary morphological plasticity in vitro. Teitelman (1990) observed that 10–20% of β -cells from adult CD-1 mice developed neuritic processes spontaneously and demonstrated that the cytoplasmic elongations were positive to neurofilament antibodies. In our experiments, only 3% of rat β -cells developed neurite-like processes spontaneously; the differences between the two studies could be owing to species variation and/or the percentage of fetal bovine serum used in the culture media (10 vs 1% in our experiments). It is important to note that rat pancreatic islet cells survive better in the presence of 10% fetal bovine serum (FBS) in the culture

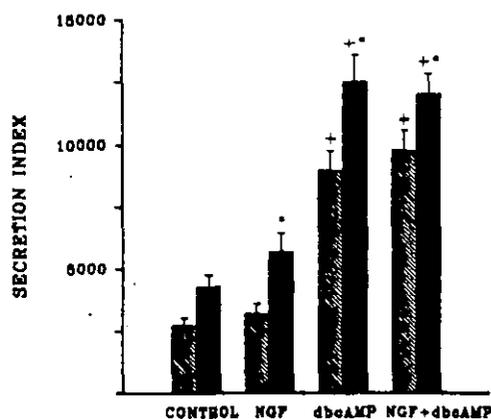


Fig. 5. Effect of 7S NGF and dbcAMP on insulin secretion by isolated adult β cells. Islet cells were cultured for 5 d under the different above-mentioned conditions and were harvested and challenged with 5.6 mM (▨) and 20.6 mM (■) glucose concentrations for 1 h. Insulin secretion of isolated β -cells was measured with the RHPA. Each bar represents the mean \pm SEM of 5 separate experiments. *Denotes the significance level with respect to control cells ($P < 0.01$). +Denotes significance level of 20.6 mM glucose with respect to 5.6 mM glucose in the respective group ($P < 0.01$).

medium; however, we used only 1% FBS to minimize serum factors that could modify the neurite-like processes outgrowth by β -cells (Ziller, et al., 1983).

After two weeks in culture, the effects of NGF on β -cell morphology were clear and the differential responses of adult and fetal β -cells to the trophic factor are interesting.

In adult β -cells, 7S NGF could only stimulate neurite-like processes outgrowth in the presence of dbcAMP; however, 2.5S NGF alone was sufficient to induce the phenotypic changes described above.

In contrast, fetal β -cells did respond to 7S NGF indicating that β -cell responsiveness to trophic factors changes with the developmental age of the cell. Differences in β -cell plasticity depending on age could be due, in part, to a low expression of NGF receptors in adult cells, which could be overcome using the active β -subunit of NGF.

Similar to what has been observed in other cell types (Gunning et al., 1981), dbcAMP partially mimics the effects of the trophic factors on β -cell morphology and acts synergistically with them to induce process outgrowth; since β -cells were cultured with NGF or FGF and dbcAMP together, nearly 50% and 40%, respectively, extended neurite-like processes.

This synergistic action between trophic factors and dbcAMP is also observed on the increase of the neurite-like process length. In adult β -cells cultured with 7S NGF and dbcAMP, the processes were 50% longer than those present in control cultures. Moreover, when cells were exposed to 2.5S NGF and dbcAMP the processes were 117% longer. Comparably, we observed a 75% increase in the process length with FGF and dbcAMP.

Table 2
Insulin Secretion by Single β Cells
Cultured with NGF and dbcAMP

Treatment	Glucose, mM	% of plaque-forming cells	Plaque area, μM	n
Control	5.6	62 \pm 3.7	4415 \pm 499	5
	20.6	71 \pm 5.2	6015 \pm 696	5
NGF	5.6	63 \pm 1.5	5039 \pm 663	4
	20.6	74 \pm 3.2 ^a	7691 \pm 1031	4
dbcAMP	5.6	75 \pm 2.9 ^b	11977 \pm 1095 ^b	5
	20.6	83 \pm 2.3 ^b	15075 \pm 1278 ^b	5
NGF+	5.6	79 \pm 1.5 ^b	12413 \pm 1014 ^b	5
	20.6	85 \pm 1.5 ^b	14139 \pm 981 ^b	5

^a Denotes significance level with respect to 5.6 mM glucose of the same group of β -cells, $P < 0.05$.

^b Denotes the significance level with respect to control cells, $P < 0.01$.

On the other hand, the length of the neurite-like processes in fetal β -cells tended to increase with NGF and with dbcAMP, but it was not statistically different from control cells that infrequently developed neurite-like processes. Surprisingly, the mean length of the processes in fetal cells was near one-half the mean length reached by adult cells. This difference could be owing to the developmental stage, since immature cells generate less stable microtubules, as it has been observed in the developing brain (Nunez, 1986; Matus, 1988).

This synergy between dbcAMP and NGF or FGF on neurite-like extension by β -cells could be owing to an increase in intracellular cAMP; this could indicate the activation of cAMP-dependent protein-kinases (PKA) or other signal transduction mechanisms. However, the question of whether PKAs play a crucial role in the actions of these trophic factors remains controversial (Ginty et al., 1991; Tan et al., 1994).

DbcAMP could induce cell adhesion and spreading, and therefore facilitate the effects of the trophic factors, as well as increase the stability of the neurite-like microtubules, as it has been observed in PC12 cells (Heidemann et al., 1985).

Morphological changes are determined by microtubule assembly and stabilization, and an increase in the levels of tubulin and several microtubule associated proteins (MAPs), which has been observed following long-term NGF treatment (Drubin et al., 1985). One of these MAPs, tau protein, has been generally associated to neurons (reviewed by Nunez, 1986), where it is known to induce tubulin assembly and to stabilize microtubules (Drubin and Kirschner, 1986). We observed that most of the adult insulin-positive cells and their neurites are also positive to β -tubulin and tau protein antibodies. However, we were not able to determine if the concentration of these molecules was higher in treated cells with respect to the control cells, which also expressed them. It is likely for NGF and

dbcAMP to induce the synthesis of tubulin, tau, and probably other MAPs that participate in the development of the processes.

Insulin secretion is not modified by culturing the cells for 5 d in the presence of NGF, compared to control cells. However, whereas control cells partially lost their glucose sensitivity, NGF-treated cells secreted more insulin in response to a high glucose concentration than control cells.

We have previously observed that after 1 or 2 d in culture in 10% FBS supplemented RPMI-1640, single β -cells secreted threefold more insulin in response to 15.6 mM glucose than to 5.6 mM glucose (Hiriart and Ramirez-Medeles, 1991). In this model, the secretory response to high glucose concentrations decreases with time in culture (Hiriart, 1988). Moreover, when β -cells are cultured in the presence of only 1% FBS, this decline is more pronounced and can be observed earlier in culture. Our data suggest that NGF treatment could sustain the capability of single β -cells to discriminate between different extracellular glucose concentrations.

On the other hand, the effect of culturing β -cells with dbcAMP on insulin secretion was remarkable, since even when dbcAMP was not present during the hormone assay, β -cells treated with this molecule dramatically increased their response to different glucose concentrations. This could be explained by the fact that cAMP is one of the second messengers on insulin secretion (Hedekov, 1980) and because tubulin comprises part of the exocytotic machinery of the cells, and it has been shown that tubulin synthesis in β -cells is stimulated by this factor (Pipeleers et al., 1976).

It is not known if β cells are exposed to NGF in vivo during embryonic development or in the adult state. A recent report demonstrated the expression of Trk-A in islet cells and the secretion of NGF by nonendocrine adjacent cells in an in vitro model of developing fetal pancreatic islet (Kanaka-Gantenbein et al., 1995b). Moreover, Trk-A is also present in adult rat pancreas (Kanaka-Gantenbein et al., 1995a), and our data indicate that NGF could be an important trophic factor for adult β -cells.

It is interesting to note that the heterogeneity among β -cells, which has been shown in different studies, prevails in the response of the cells to trophic factors, as only 40–50% of cultured cells exhibit phenotypical changes when cultured with FGF or NGF and dbcAMP. It is then conceivable that differences in cell plasticity may correlate to the existence of β -cell subpopulations, as it has been shown for insulin secretion (Hiriart and Ramirez-Medeles, 1991, 1993).

Materials and Methods

Reagents were obtained from the following sources: collagenase type IV from Worthington (Freehold, NJ); guinea-pig insulin antisera for RHPA and rabbit GABA (glutaraldehyde conjugate) antisera, from Biodesign Inter-

national (Kennebunkport, ME); guinea-pig insulin histochemical antisera from Incstar (Stillwater, MI); NGF from submaxillary glands 7S-NGF and 2.5S-NGF; FGF from bovine pituitary glands; monoclonal anti- τ (tau); monoclonal anti- β tubulin; monoclonal anti-N-CAM (neural cell adhesion molecule); bovine serum albumin (BSA) (fraction V); chromium chloride; staphylococcal protein A; HEPES; poly-L-lysine hydrobromide (mol wt > 380,000); RPMI-1640 salts; Spinner-Eagle's salts; 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride; tissue culture dishes (Corning, Cat. No. 25000-35) from Sigma (St. Louis, MO); fetal bovine serum (FBS); guinea-pig complement; Hanks' balanced salt solution (HBSS); penicillin-streptomycin solutions from GIBCO (Grand Island, NY); Biotin/Avidin Vectastain ABC kit; and Texas red avidin D from Vector Laboratories (Burlingame, CA).

Animals and Pancreatic Islet Cell Cultures

Animal care was performed according to the *NIH guide for the care and use of laboratory animals* (National Institute of Health Publication No. 85-23, revised, 1985).

Young adult male Wistar rats (200–250 g), or pregnant rats in the 18th d of gestation, were obtained from the local animal facility, maintained in a 14-h light (06:00–20:00 h), 10-h dark cycle, and allowed free access to standard laboratory rat chow and tap water.

Adult and fetal pancreatic islet cells were isolated as described previously (Hiriart and Ramirez-Medeles, 1991), with minor modifications. Briefly, pancreatic islets were separated from the acinar tissue by collagenase digestion and a Ficoll gradient centrifugation, clean islets were then hand-picked. Dissociation of the cells was achieved by incubating the cells in a shaker bath, for 10 min, at 37°C in calcium-free Spinner's solution, with 15.6 mM glucose, 0.5% BSA, and 0.01% trypsin, followed by mechanical disruption. Isolated islet cells were cultured in RPMI-1640, CaCl₂ (600 μ M) was added to give a final concentration of 1.2 mM, and supplemented with 1% FBS, 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, and 0.25 μ g/mL fungizone, on standard tissue culture dishes. Experimental cells were cultured with either 7S NGF (50 ng/mL) or 2.5S NGF (40 ng/mL), dbcAMP 5 mM, or both NGF and dbcAMP. Cultures were maintained at 37°C, in a humidified incubator (5% CO₂ in 95% air) for 2 wk, changing the medium every other day.

Immunohistochemistry

After 12 d in culture, β -cells were identified with immunocytochemistry (ICC) against insulin. Briefly, cells were fixed overnight, at 4°C, in a solution of 4% paraformaldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4), washed three times in 0.1 M tris buffer solution (pH 7.4), perforated for 30 min with 0.3% of Triton X-100 in tris buffer, and incubated for 48 h at 4°C, with the primary antiserum. Dilution of antisera was as follows: insulin 1:4000, tau protein 1:1000, β -tubulin 1:500, GABA 1:2000, and N-CAM 1:100.

Usually, the first ICC was performed to detect insulin with a secondary peroxidase-antiperoxidase antibody and 3,3'-diaminobenzidine as final substrate, to form a brown reaction product. After this procedure, double antigenic staining to detect either tau, β -tubulin, N-CAM, or GABA was accomplished, using a secondary biotinylated antibody and Texas red-labeled streptavidin. Cells were observed under a Nikon fluorescent microscope at a wavelength of 450–490 nm. We avoided spurious labeling of cells with the second antibody by using antibodies raised in different species.

Morphological changes were evaluated measuring two parameters: (1) the percentage of neurite-bearing cells and (2) the average length of neurite-like processes. A neurite-bearing cell is defined as a cell with one or more processes, at least two times longer than the perinuclear diameter. We measured the length of neurite-like processes by projecting the image of the cell on a monitor attached to a video camera and a Nikon Axiophot inverted microscope, with the aid of the JAVA video analysis software (Jandel Scientific, Version 1.40, Corte Madera, CA).

During culture, cells tended to form clusters, the neurites were measured only in isolated β -cells, or in cells from the periphery of a cluster that could be clearly distinguished from the rest. At least 150 cells were measured per culture dish and all experiments were done by duplicate. At any given condition, a minimum of four separate cultures were evaluated.

Reverse Hemolytic Plaque Assay (RHPA)

Insulin secretion from individual beta cells was analyzed, after 5–7 d in culture under different experimental conditions, with a reverse hemolytic plaque assay (RHPA) (Neill and Frawley, 1983), as previously described (Hiriart and Matteson, 1988; Hiriart and Ramirez-Medeles, 1991).

We chose d 5–7 in culture to evaluate the initial secretory changes of the cells under the different treatments because phenotypical changes were mild at this time. In the RHPA, it is necessary to detach cells from the Petri dishes to mix them with the red blood cells and seed them together on the Cunningham chambers. Using cells in the first week of culture thus obviated mechanical injury of β -cells with long neuritic processes, that are observed in the cultures on subsequent days.

Briefly, islet cells were detached from culture dishes by incubating them for 10 min in calcium-free Spinner's solution, with 15.6 mM glucose, 0.5% BSA; equal volume of cells were mixed with protein A-coated sheep red blood cells, introduced into Cunningham chambers treated with poly-L-lysine to promote cell attachment, and incubated for 45 min. Then the chambers were rinsed and filled with Hanks balanced salt solution, which contained 5.6 or 20.6 mM glucose, and incubated for an hour in the presence of insulin antiserum. The monolayer was further incubated for 30 min with guinea-pig complement. Insulin released during the

incubation time with the insulin antiserum was revealed by the presence of hemolytic plaques around the secretory cells, which result from the complement-mediated lysis of red blood cells bearing insulin-anti-insulin complexes bound to protein A.

We measured the size of plaques with the same equipment used to measure neurite-like processes length (see Immunohistochemistry section), and plaque size was expressed as area. At least 60 cells were measured per experimental condition. We also counted the number of cells that formed plaques, and these results were expressed as percentage of insulin-secreting cells; at least 100 cells were counted per experimental condition. All the experiments were carried out in duplicate.

The overall secretory activity of β -cells under a given experimental condition was expressed as a secretion index, calculated by multiplying the average plaque area by the percentage of plaque-forming cells (Smith et al., 1986; Hiriart and Ramirez-Medeles, 1991).

Statistical Analysis

Significant differences between data were evaluated by analysis of variance (ANOVA), followed by Fisher's multiple range test or by two-tailed Student's *t*-test for unpaired data, using the Number Cruncher Statistical System (NCSS, 4.2, Dr. Jerry L. Hintze, Kaysville, UT, 1983). All results are expressed as mean \pm SEM.

Acknowledgments

We are very grateful to Carol Deutsch for reading and discussing some parts of the manuscript. This work was supported by Grants IN206291 and IN212194 from DGAPA, UNAM, Mexico, and by a scholarship to Roman Vidaltamayo and Tamara Rosenbaum by DGAPA, UNAM.

References

- Angeletti, R. H. and Bradshaw, R. A. (1971). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**, 2417–2420.
- Drubin, D. G. and Kirschner, M. W. (1986). *J. Cell Biol.* **103**, 2739–2746.
- Drubin, D. G., Feinstein, S. C., Shooter, E. M., and Kirschner, M. W. (1985). *J. Cell Biol.* **101**, 1799–1807.
- Ginty, D. D., Glowacka, D., De Franco, C., and Wagner, J. A. (1991). *J. Biol. Chem.* **266**, 15,325–15,333.
- Greene, L. A. and Tischler, A. S. (1976). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 2424–2428.
- Gunning, P. W., Landreth, G. L., Bothwell, M. A., and Shooter, E. M. (1981). *J. Cell Biol.* **89**, 240–245.
- Hedeskov, C. J. (1980). *Physiol. Rev.* **60**, 442–509.
- Heidemann, S. R., Joshi, H. C., Schecheter, A., Fletcher, J. R., and Bothwell, M. (1985). *J. Cell Biol.* **100**, 916–927.
- Hiriart, M. and Matteson, D. R. (1988). *J. Gen. Physiol.* **91**, 617–639.
- Hiriart, M. (1988). Secretory behavior of individual pancreatic beta cells in culture. *Diabetes* **37**, 99 (Abstract).

- Hiriart, M. and Ramirez-Medeles, M. C. (1991). *Endocrinology* **128**, 3193-3198.
- Hiriart, M. and Ramirez-Medeles, M. C. (1993). *Mol. Cell Endocrinol.* **93**, 63-69.
- Kanaka-Gantenbein, C., Tazi, A., Czernichow, P., and Scharfmann, R. (1995a). *Endocrinology* **136**, 761-769.
- Kanaka-Gantenbein, C., Dicou, E., Czernichow, P., and Scharfmann, R. (1995b). *Endocrinology* **136**, 3154-3162.
- Levi-Montalcini, R. (1987). *EMBO J.* **6**, 1145-1154.
- Matus, A. (1988). *Ann. Rev. Neurosci.* **11**, 29-44.
- Neill, J. D. and Frawley, L. S. (1983). *Endocrinology* **112**, 1135-1137.
- Nunez, J. (1986). *Dev. Neurosci.* **8**, 125-141.
- Olmsted, J. B. (1986). *Ann. Rev. Cell Biol.* **2**, 421-457.
- Pacheco-Cano, M. T., Garcia-Hernandez, F., Hiriart, M., Komisaruk, B. R., and Drucker-Colin, R. (1990). *Brain Res.* **531**, 290-293.
- Pipeleers, D. G., Pipeleers-Marichal, M. A., and Kipnis, D. M. (1976). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 3188-3191.
- Polak, M., Scharfmann, R., Seilheimer, B., Eisenbarth, G., Dressler, D., Verma, I. M., and Potter, H. (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 5781-5785.
- Prentice, H. M., Moore, S. E., Dickson, J. G., Doherty, P., and Walsh, F. S. (1987). *EMBO J.* **6**, 1859-1863.
- Rydel, E. R. and Greene, L. A. (1987). *J. Neurosci.* **7**, 3639-3653.
- Scharfmann, R., Tazi, A., Polak, M., Kanaka, C., and Czernichow, P. (1993). *Diabetes* **42**, 1829-1836.
- Schubert, D. and Whitlock, C. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 4055-4058.
- Smith, P. F., Luque, E. H., and Neill, J. D. (1986). *Methods Enzymol.* **124**, 443-465.
- Tan, Y., Low, K. G., Boccia, C., Grossman, J., and Comb, M. J. (1994). *Mol. Cell. Biol.* **14**, 7546-7556.
- Tazi, A., Czernichow, P., and Scharfmann, R. (1995). *J. Neuroendocrinol.* **7**, 29-36.
- Teitelman, G. (1990). *Dev. Biol.* **142**, 368-379.
- Ziller, C., Dupin, E., Brazeau, P., Paulin, D., and Le Douarin, N. M. (1983). *Cell* **32**, 627-638.

Nerve Growth Factor Increases Sodium Current in Pancreatic β Cells

T. Rosenbaum, R. Vidaltamayo, D. Sánchez-Herrera, M. Hiriart

Department of Neurosciences, Institute of Cellular Physiology, Universidad Nacional Autónoma de México, México D. F. 04510

Received: 12 March 1996/Revised: 2 May 1996

Abstract. Nerve growth factor (NGF) induces neurite-like process outgrowth in cultured adult pancreatic β cells. DbcAMP partially mimics this effect on cell morphology, and both compounds act synergistically to promote neurite-like process outgrowth. To determine if NGF- and dbcAMP-induced differentiation was accompanied by changes in β cell electrical activity, we studied the macroscopic Na current of adult rat β cells identified with the reverse hemolytic plaque assay and cultured for one week with these factors.

After 5–7 days, β cells cultured in the presence of 2.5S NGF exhibited a 48% increase on the macroscopic Na current, which was due to an increase on Na current density. We did not observe changes on voltage dependence of current activation, nor on steady-state inactivation. Although dbcAMP also promotes changes on β cell morphology, it did not affect the Na current density.

Key words: NGF—Na channels—Pancreatic β -cells—cAMP—Reverse hemolytic plaque assay

Introduction

Nerve growth factor (NGF) regulates growth, survival and morphological plasticity of sensory and sympathetic neurons (reviewed by Levi-Montalcini, 1987). In other cell types, like chromaffin adrenal cells and rat pancreatic β cells, NGF induces the extension of neurite-like processes (Vidaltamayo, et al., 1996). This effect of NGF is potentiated by permeable analogues of cAMP (like dibutyryl-cAMP) (Gunning et al., 1981; Pacheco-Cano et al., 1990; Vidaltamayo et al., 1996).

Moreover, concomitantly to the morphological changes induced in different cell types, in the rat pheo-

chromocytoma cell line PC12, NGF also promotes changes in cell excitability, enabling them to generate action potentials (Dichter, Tischler & Greene, 1977). In these cells, NGF induces an increase both on the Na peak current and the Na channel density (Mandel et al., 1988; Pollock et al., 1990). These effects are also observed in primary cultures of rat chromaffin cells (Islas-Suárez et al., 1994).

Pancreatic β -cells have Na channels that are important in electrical activity and insulin secretion stimulated by high glucose concentrations (Hiriart & Matteson, 1988; Pressel & Misler, 1990). This current can be identified by its rapid activation and inactivation during a sustained depolarization and by its sensitivity to the Na-channel blocker tetrodotoxin (TTX) (Hiriart & Matteson, 1988; Plant, 1988; Pressel & Misler, 1990).

Since sodium channel modulation and activity are important features in neuron-like differentiation and in β cell physiology, we decided to investigate if NGF and dbcAMP treatment has an effect on Na current of pancreatic β cells, identified with the reverse hemolytic plaque assay.

Materials and Methods

Materials were obtained from the following sources: Insulin antibody from Biodesign International (Kennebunkport, ME); collagenase class IV from Worthington (Freehall, NJ); fetal calf serum, antibiotics and guinea pig complement from Gibco (Grand Island, NY); tetrodotoxin from Calbiochem (La Jolla, CA); all salts, protein A, RPMI-1640, glucose, dbcAMP and NGF 2.5S from Sigma Chemical (St. Louis, MO).

PANCREATIC β -CELL CULTURE

Animal care was performed according to the *NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (National Institutes of Health Publication No. 85-23, revised, 1985).

Young adult male Wistar rats (200–250 g) were obtained from the

Correspondence to: M. Hiriart

local animal facility, maintained in a 14-hr light (06:00–20 hr), 10-hr dark cycle, and allowed free access to standard laboratory rat chow and tap water.

Pancreatic β -cells were obtained following the technique previously described (Hiriart & Ramírez-Medeles, 1991). Briefly, pancreas were separated from the acinar tissue by collagenase digestion and a Ficoll gradient centrifugation. Islet cells were then dissociated with trypsin (2.5 mg/ml in Spinner salt solution). Single cells were cultured for 5–7 days in RPMI-1640 supplemented with 5% fetal calf serum, 200 U/ml penicillin G, 200 μ g/ml streptomycin and 0.5 μ g/ml amphotericin B. Experimental cells were treated for 5–7 days with either NGF 2.5S (50 ng/ml) or dbcAMP (5 mM), control cells did not receive any treatment.

REVERSE HEMOLYTIC PLAQUE ASSAY

To identify insulin-secreting cells, a reverse hemolytic plaque assay (RHPA) was performed as described by Hiriart and Ramírez-Medeles (1991). We chose to evaluate the initial change of the cells under the different treatments after 5 to 7 days in culture because phenotypical changes were mild at this time. In the RHPA it is necessary to detach cells from the Petri dishes to mix them with red blood cells and seed them together on Cunningham chambers. Thus, using cells after one week of culture obviated mechanical injury of β cells with long neuritic processes, which are observed in cultures on subsequent days.

Previous to the assay, sheep red blood cells (SRBC) were coupled to Staphylococcal protein-A using chromium chloride. These SRBCs were incubated with islet cells, harvested from culture dishes by incubating with dissociation cell solution, in the presence of glucose (20.6 mM) and insulin antibody for 1 hr. Following this incubation, guinea pig complement was added to induce the lysis of the SRBC. β Cells were identified as those surrounded by a lysis halo.

ELECTROPHYSIOLOGICAL RECORDINGS AND ANALYSIS

Whole-cell patch-clamp recordings (Hamill et al., 1981), were made at a temperature of 20–22°C using an Axopatch 200 amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA). Patch electrodes were pulled from capillary tubes KIMAX-51 (Kimble Products) and had a resistance of 1.5 to 3 M Ω . Electrode tips were coated with Sylgard (Dow Corning).

In each cell, the capacity transient of the pipette was canceled before accessing the cell and total cell capacitance was determined by digital integration of capacitive transients with pulses of 10 mV, from a holding potential of –80 mV.

Capacity transients were canceled and series resistance was compensated using the internal voltage-clamp circuitry. Remaining linear capacity transients as well as leakage currents were subtracted by a P/2 procedure.

The pulse protocol used for the analysis of the peak I_{Na} consisted in applying depolarizing test pulses of 15 msec, from –30 to +60 mV in 10 mV steps, from a holding potential of –80 mV.

Na current activation curves were obtained by converting the peak-current values to conductances. We used the equation:

$$g_{Na} = I_{Na} / (V_m - E_{Na})$$

where I_{Na} is the peak sodium current, V_m the command pulse potential and E_{Na} is the reversal potential observed in the I - V relationships obtained from cells where 15 mM NaCl was included in the internal solution. That in average was +43 mV (varied from +42 to +45 mV).

Conductance values were normalized and fitted to a Boltzmann relation:

$$g/g_{max} = \{1 + \exp [-(V - V_{a1/2})/ka]\}^{-1}$$

where g is the Na peak conductance, g_{max} the maximal Na conductance $V_{a1/2}$ the midpoint of the activation curve and ka the activation steepness factor.

For the steady-state I_{Na} inactivation curve, a two-pulse protocol was used. A 35-msec prepulse, starting at –120 to –30 mV with 10 mV steps, was used to inactivate Na channels. This pulse was followed by a test pulse at +10 mV, the peak current from the test pulse was plotted as a function of the prepulse potential, and a steady-state inactivation curve was obtained by normalizing the current values and fitting data with a Boltzmann equation:

$$I/I_{max} = \{1 + \exp [(V - V_{i1/2})/ki]\}^{-1}$$

where I is the peak current, I_{max} is the peak current from a prepulse to –120 mV, V is the prepulse potential, $V_{i1/2}$ is the half-inactivation value and ki is the inactivation steepness parameter.

Recording Solutions

External Solution (mM)	Internal Solution (mM)
130 NaCl	120 CsAsp
5 KCl	10 CsCl
5 CaCl ₂	10 BAPTA
2 MgCl ₂	10 HEPES
10 HEPES	5 CsF
10 Glucose	2 ATP-Mg

In 15 experiments, 15 mM NaCl was added to the internal solution in order to obtain the reversal potential of the Na current.

STATISTICAL ANALYSES

All data are reported as the mean \pm SEM; n denotes the number of cells studied. The statistical significance was obtained with the one way ANOVA test using the Number Cruncher Statistical System (Dr. J. L. Hintze, Kaysville, UT, 1983).

Results

NA CHANNEL DENSITY INCREASES IN NGF-TREATED ADULT β CELLS

Figure 1A and B illustrates families of whole-cell currents recorded from control and β -cells treated with NGF (50 ng/ml) for 5–7 days, respectively, in response to depolarizing voltage steps. β -cells were identified with a RHPA. In both conditions, the I_{Na} rapidly activates to a peak and then inactivates during maintained depolarization.

The peak current-voltage relationships for I_{Na} in control cells and NGF-treated cells are shown in Fig. 1C. In both cases, currents activated near –30 mV and reached a maximum around +10 mV. Maximum Na current in NGF-treated cells was, in average, 48% ($P < 0.01$) larger than in control cells.

In 15 cells, 15 mM NaCl was included in the internal solution. In this condition, the currents reversed direc-

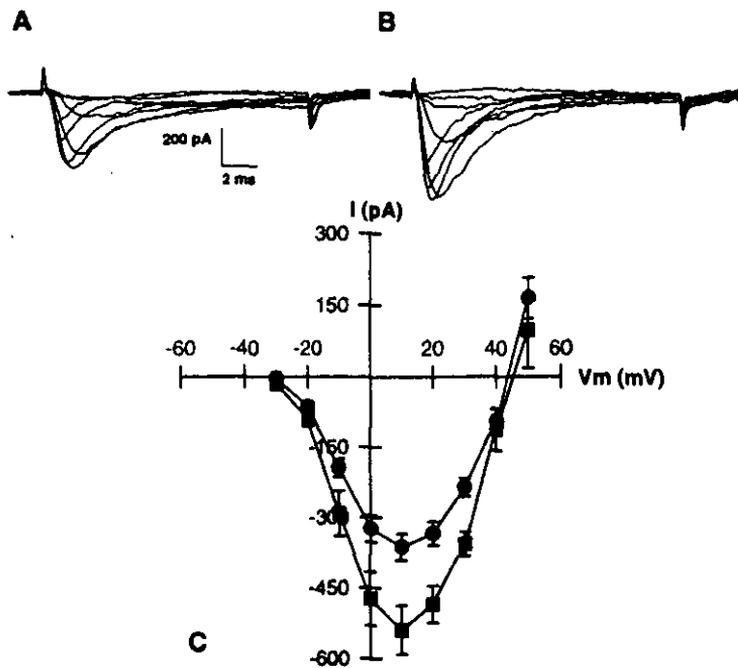


Fig. 1. Comparison of Na currents and Na current-voltage relationships between control and β cells treated during one week with NGF (50 ng/ml). (A) Control β cells, (B) NGF treated β -cells. Representative Na current families, which were recorded during 10-msec steps to different voltages, from a holding potential of -80 mV (see Materials and Methods). (C) The mean-peak Na current was plotted as a function of voltage, under control conditions (circles), $n = 28$ and in NGF-treated cells (squares), $n = 27$. Error bars represent SE. In both conditions, the last two points were obtained from experiments with 15 mM NaCl in the internal solution ($n = 15$), hence the reversal potential is around $+43$ mV.

tion from inward to outward at about $+43$ mV (Fig. 1C), which is close to the calculated sodium Nernst potential ($E_{Na} = +47$ mV, at 20°C).

When 5 mM CoCl_2 was added to the external solution to block Ca currents, the peak Na current amplitude was not altered by the treatment (*data not shown*). Moreover, the currents were completely blocked by 100 nM TTX in both control and NGF-treated β cells (*data not shown*), as previously observed in rat β -cells (Hiriart & Matteson, 1988).

The increase in sodium current amplitude in β cells exposed to NGF does not result from changes on the voltage dependence of current activation, nor on the steady-state inactivation of the current, as shown in Figs. 2 and 3.

In Fig. 2, the voltage dependence of peak sodium conductances was calculated and used to construct a Boltzmann relationship (as described in Materials and Methods), for control and NGF-treated β -cells. NGF-treatment did not modify the midpoint of activation ($V_{i/2}$), nor the steepness ka of the curves (Table 1).

Figure 3 shows the steady-state fraction of noninactivated Na channels plotted as a function of membrane potential. In both conditions, half-inactivation ($V_{i/2}$) was around -60 mV and the inactivation was practically complete at voltages positive to -40 mV. The steepness parameter ki did not change with NGF treatment (Table 1).

The increase in Na current could not be attributed to a difference in cell surface area, average cell capacitance

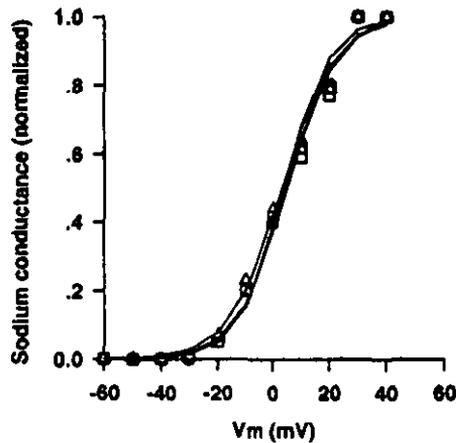


Fig. 2. Voltage dependence of Na current activation. At each voltage the Na conductance was calculated, as described in Materials and Methods, and plotted as a function of voltage. Experimental data are plotted as symbols: control β -cells (circles), NGF-treated β -cells (squares) and dbcAMP-treated β -cells (triangles); and the smooth curve represents a Boltzmann fit to the data (see Materials and Methods and Table 2).

in NGF-treated cells increased by 6.8% and in dbcAMP treated cells, average cell capacitance increased by 9%, although these increments were not statistically significant (Table 2). Moreover, in Fig. 5 individual data from control, NGF- and dbcAMP-treated β cells were pooled, it is clear that there is no direct relationship between cell

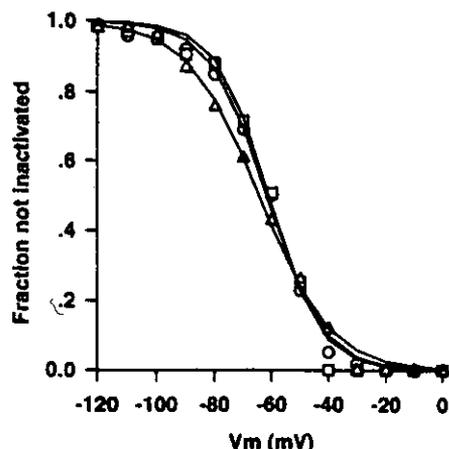


Fig. 3. Voltage dependence of Na current inactivation. A 35-msec prepulse was used to inactivate Na channels to a steady-state level. The Na currents recorded during a test pulse to +10 mV were used to determine the fraction of noninactivated channels. The Na current during the test pulse was normalized and plotted as a function of the prepulse voltage. Experimental data are plotted as symbols: control β -cells (circles), NGF-treated β -cells (squares) and dbcAMP-treated β -cells (triangles); and the smooth curve represents a Boltzmann fit to the data (see Materials and Methods and Table 2).

Table 1. Effects of NGF and dbcAMP on β -cell peak Na current

Treatment	Capacitance (pF)	Density (pA/pF)	Peak current (pA)
Control	8.8 \pm 0.4	-44.7 \pm 4.5	-363.7 \pm 2.8
NGF	9.4 \pm 0.3	-58.1 \pm 5.7*	-539.5 \pm 5.2*
dbcAMP	9.6 \pm 0.6	-47.3 \pm 6.7	-419.4 \pm 4.5

* $P < 0.01$, † $P < 0.05$.

Table 2. Boltzmann parameters of β -cell sodium currents

	$V_{1/2}$	k_a	$V_{1/2}$	k_i
Control	4.04 \pm 1.0	9.12 \pm 0.2	-62.57 \pm 2.3	10.49 \pm 0.2
NGF	4.45 \pm 1.2	8.95 \pm 0.4	-62.52 \pm 2.3	9.93 \pm 0.6
dbcAMP	3.03 \pm 1.1	9.62 \pm 0.3	-60.64 \pm 2.8	9.08 \pm 1.4

size (that is closely related to capacitance) and sodium channel density. Together, these data indicate that NGF increased β -cell Na current density by approximately 30% ($P < 0.05$).

EFFECT OF DBCAMP ON NA CURRENT OF β CELLS

Since dbcAMP also induced the outgrowth of neuritelike processes in β cells, we also tested the effect of this agent on the Na peak current of these cells. Figure 4 shows

families of whole-cell Na currents for a control cell (A) and a dbcAMP-treated cell (B).

The peak current-voltage relationships of Na currents for control cells and dbcAMP-treated cells are shown in Fig. 4C. Both for control and dbcAMP-treated cells, the currents activate around -30 mV and reach a maximum near +10 mV. Nevertheless, no significant effects of dbcAMP could be observed on the peak Na current, nor on voltage dependence activation or steady-state inactivation of β cells (Tables 1 and 2; Figs. 2, 3 and 4).

Discussion

This study represents the first description of the effects of NGF on the electrical properties of a nonneural-crest-derived cell type. We observed that NGF treatment increases Na channel density in pancreatic β -cells.

Adult and fetal pancreatic β -cells, as well as insulin-producing cell lines like RINm5F and INS-1, express both types of NGF receptors; high affinity Trk-A and low affinity p75^{NGFR} (Kanaka-Gatenbein et al., 1995a,b, and Scharfmann et al., 1993). We have observed that cultured rat β -cells undergo neuronallike phenotypic changes in response to NGF and dbcAMP (Vidaltamayo et al., 1995), in a way similar to what has been observed in chromaffin cells and PC12 cells (Greene & Tischler, 1976, Schubert & Whitlock, 1977; Heidenmann et al., 1985 and Pacheco Cano et al., 1990).

We evaluated the effect of culturing islet cells for five to seven days in the presence of NGF or dbcAMP, on Na current of β cells identified with the reverse hemolytic plaque assay.

We observed that NGF treatment in culture induces, on the average, an increase of 48% on the Na peak current. This increment on Na current may be due to an increase in the number of Na channels in the membrane of β cells, since the membrane capacitance of NGF-treated cells and control cells is not significantly different, these data represent a 30% increase on the Na current density.

It has been well documented that phenotypical responses to NGF by chromaffin cells and PC12 cells, involve an increased synthesis and expression of functional Na channels (Islas-Suárez et al., 1994; Mandel et al., 1988; Pollock et al., 1990). This is what probably happens in our model, since it is not likely that NGF induces the expression of a different type of Na channel in β cells, because the voltage dependence of Na current, the kinetics of activation and the steady-state inactivation and TTX sensitivity, show no differences between control and experimental cells.

This increase in Na channel density in β cells could be important for the NGF-induced sprouting of the neuritelike process, since it has been shown that Na channels

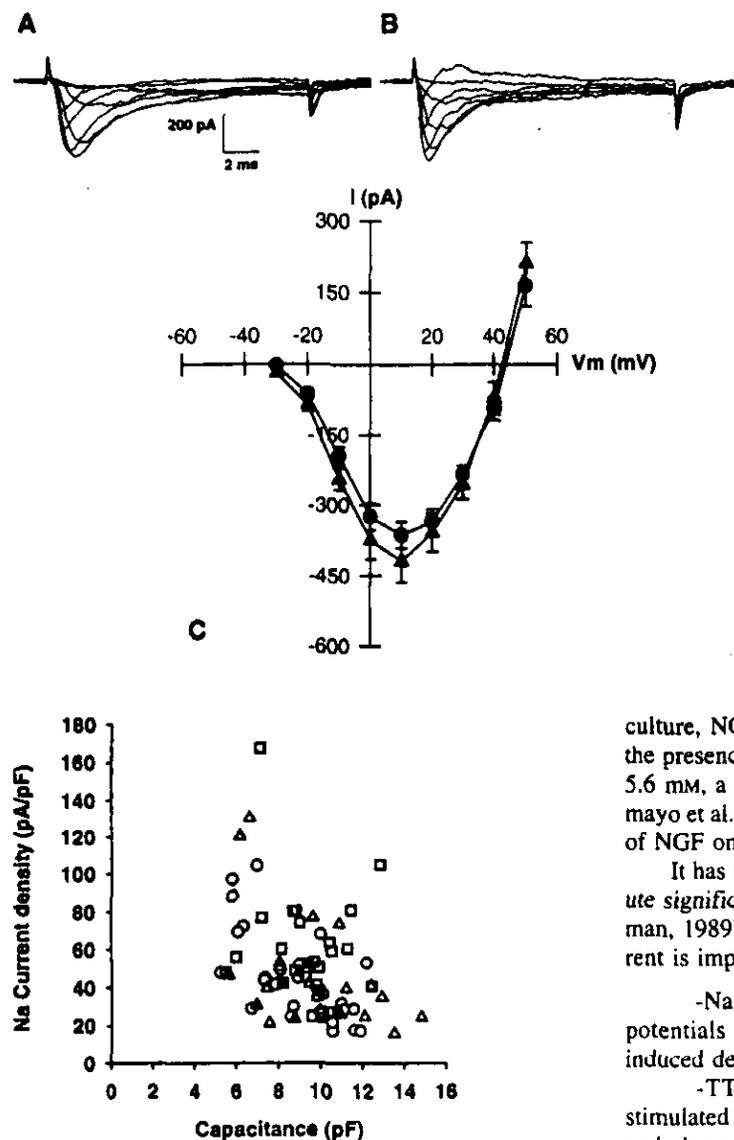


Fig. 4. Comparison of Na currents and Na current-voltage relationships between control and β cells treated during one week with dbcAMP (5 mM). (A) Control β cells, (B) dbcAMP-treated β -cells. Na current families were recorded during 10-msec steps to different voltages, from a holding potential of -80 mV (see Materials and Methods). (C) The peak Na current was plotted as a function of voltage, under control conditions (circles), $n = 28$, and in dbcAMP-treated cells (triangles) $n = 21$. Error bars represent SE. In both conditions, the last two points were obtained from experiments with 15 mM NaCl in the internal solution ($n = 15$), hence the reversal potential is around $+43$ mV.

Fig. 5. Relationship between peak Na current density and cell capacitance. Individual peak Na current densities at 10 mV were plotted against the respective cell capacitance. Circles denote control cells, triangles denote NGF-treated cells and squares denote dbcAMP-treated cells.

could be associated with cytoskeletal elements, providing a potential anchoring mechanism for different membrane regions (reviewed by Mandel, 1992).

Although there is a synergistic effect between NGF and dbcAMP on β -cell process outgrowth (Vidaltamayo et al., 1996), there is no direct effect of dbcAMP treatment on Na current density, nor on the Na current behavior. Similar results have also been observed in PC12 cells (Pollock et al., 1990).

We have previously shown that after one week in

culture, NGF enables β cells to secrete more insulin in the presence of 20.6 mM glucose than in the presence of 5.6 mM, a property that is lost in control cells (Vidaltamayo et al., 1996). This could be due in part to the effect of NGF on β cell Na current.

It has been alleged that Na current does not contribute significantly to β cell excitability (Ashcroft & Rorsman, 1989). However several data support that Na current is important for β cell physiology:

-Na current contributes to the generation of action potentials during the initial phases of secretagogue-induced depolarization (Pressel & Mislér, 1990).

-TTX inhibits up to 57% of high glucose-stimulated insulin secretion (Hiriart & Matteson, 1988) and also carbachol-induced insulin secretion in 5.6 mM glucose (Hiriart & Ramírez-Mendeles, 1993).

-Finally, the fact that the NGF-treated β cells secrete insulin more efficiently than control cells (Vidaltamayo et al., 1986) could be explained by a faster and stronger depolarization due to the presence of more Na channels on the β -cell membrane.

Finally, it is important to note that since NGF has been implicated in islet morphogenesis (Kanakagatenbein et al., 1995b), it is also possible that NGF increases β -cell excitability during development by modulating Na channel expression.

This work was supported by Grants IN212194 from DGAPA, UNAM, Mexico; and a scholarship to Roman Vidaltamayo and Tamara Rosenbaum by DGAPA, UNAM. We are very thankful to Alvaro Caso and Mustafa Emirbayer for proofreading this manuscript and to Carmen Sánchez-Soto for technical assistance.

References

- Ashcroft, F.M., Rorsman, P. 1989. Electrophysiology of the pancreatic β -cell. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **54**:87-145
- Dichter, M.A., Tischler, A.S., Greene, L.A. 1977. Nerve growth factor-induced increase in electrical excitability and acetylcholine sensitivity of a rat pheochromocytoma cell line. *Nature* **268**:501-504
- Greene, L.A., 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
- Gunning, P.W., Landreth, G.L., Bothwell, M.A., Shooter, E.M. 1981. Differential and synergistic actions of nerve growth factor and cyclic AMP. *J. Cell Biol.* **89**:240-245
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., F.J. Sigworth. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pfluegers Arch.* **391**:85-100
- Heidemann, S.R., Joshi, H.C., Schecheter, A., Fletcher, J.R., 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
- Hiriart, M., Matteson, D.R. 1988. Na channel and two types of calcium channels in rat pancreatic β cells identified with reverse hemolytic plaque assay. *J. Gen. Physiol.* **91**:617-639
- Hiriart, M., Ramirez-Medeles, M.C. 1991. Functional subpopulations of individual pancreatic β -cells in culture. *Endocrinology* **128**:3193-3198
- Hiriart, M., Ramirez-Medeles, M.C. 1993. Muscarinic modulation of insulin secretion by single pancreatic beta-cells. *Mol. and Cell Endocrinology* **93**:63-69
- Islas-Suárez, L., Gómez-Chavarrín, 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
- Kanaka-Gantenbein, C., Dicou, E., Czernichow, P., Scharfmann, R. 1995b. 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
- Kanaka-Gantenbein, C., Tazi, A., Czernichow, P., Scharfmann, R. 1995a. In vivo presence of the high-affinity NGF receptor Trk-A in the rat pancreas: differential localization during pancreatic development. *Endocrinology* **136**:761-769
- Levi-Montalcini, R. 1987. The nerve growth factor: thirty-five years later. *EMBO J.* **6**:1145-1154
- Mandel, G. 1992. Tissue-specific expression of the voltage-sensitive sodium channel. *J. Membrane Biol.* **125**:193-205
- Mandel, G., Cooperman, S.S., Maue, R.A., Goodman, R.H., Brehm, P. 1988. Selective induction of brain type II sodium channels by nerve growth factor. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **85**:924-928
- Pacheco-Cano, M.T., Garcia-Hernandez, F., Hiriart, M., Komisaruk, B.R., Drucker-Colin, R. 1990. Dibutyryl cAMP stimulates analgesia in rats bearing a ventricular adrenal medulla transplant. *Brain Res.* **531**:290-293
- Plant, T.D. 1988. Sodium currents in cultured mouse pancreatic β cells. *Pfluegers Arch.* **411**:429-435
- Pollock, J.D., Krempin, M., Rudy, B. 1990. Differential effects of NGF, FGF, EGF, cAMP and dexamethasone on neurite growth and sodium channel expression in PC12 cells. *J. Neuroscience* **10**:2626-2637
- Pressel, D., Misler, S. 1990. Sodium channels contribute to action potential generation in canine and human β -cells. *J. Membrane Biol.* **116**:273-280
- Scharfmann, R., Tazi, A., Polak, M., Kanaka, C., Czernichow, P. 1993. Expression of functional nerve growth factor receptors in pancreatic β -cell lines and fetal rat islets in primary culture. *Diabetes* **42**:1829-1836
- Schubert, D., Whitlock, C. 1977. Alterations of cellular adhesion by nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:4055-4058
- Vidaltamayo, R., Sánchez-Soto, C., Rosenbaum, T., Martínez-Merlos, T., Hiriart, M. 1996. Neuron-like phenotypic changes in pancreatic β -cells induced by NGF, FGF and dbcAMP. *Endocrine* **4**:19-26

Pancreatic β cells synthesize and secrete nerve growth factor

TAMARA ROSENBAUM*[†], ROMÁN VIDALTAMAYO*[†], MA. CARMEN SÁNCHEZ-SOTO*, ALEJANDRO ZENTELLA[‡],
AND MARCIA HIRIART*[§]

Departments of *Biophysics and [‡]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 β 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 β 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 β 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 β -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 β 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 β 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 β cells are mediated through the high-affinity receptor Trk A (4), which has been shown to exist in pancreatic β cells (5, 6).

Together, these data suggest that NGF is an important factor in the maintenance of the endocrine function of β cells *in vitro*. However, pancreatic NGF has not been detected. A possible source is the pancreatic β 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 β cells or in β cell lines by Northern blot analysis (9), to date, neither synthesis nor secretion of NGF by β cells has been demonstrated.

In the present study, we demonstrate NGF synthesis and secretion by single adult rat pancreatic β 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 β 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 β 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 μ g/ml streptomycin, 100 units/ml penicillin, and 0.25 μ 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 μ g/ml streptomycin, 100 units/ml penicillin, and 0.25 μ 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 (Inctar, Stillwater, MN), as recommended by the supplier's technical bulletins. Finally, a second CYS-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 CYS (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 1×10^6 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.

[†]T.R. and R.V. contributed equally to this work.

[§]To whom reprint requests should be addressed. e-mail: mhirart@ifscun1.ifisiol.unam.mx.

RT-PCR were carried out with 200 ng of total RNA for NGF mRNA detection in β 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 β 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'-CCCATGGCGCA-TGTACT-3' for the antisense (3') primer for Trk A mRNA detection, and the 5'-GCCCCATGTTTGTGAT-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 [γ -³²P]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 μ M), and progesterone (20 nM). PC12 cells were subcultured for 24 h in the supernatants from the β 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 μ 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 β Cells. Secretion of NGF by pancreatic β 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 β 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 β Cells. The expression of NGF by pancreatic β cells was demonstrated

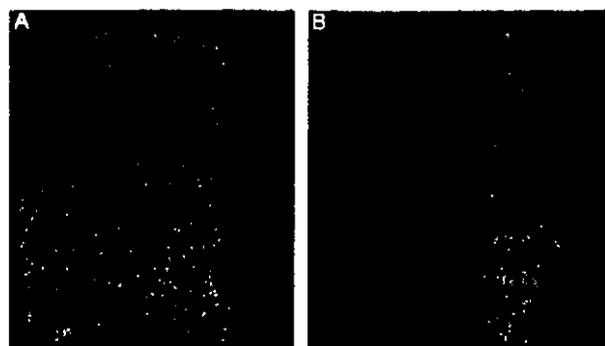


FIG. 1. Presence of NGF in adult β cells. β cells cultured for 11 days with NGF (50 ng/ml) and dbcAMP (5 mM). (A) Cells cultured under control conditions for 11 days. (B) Cells cultured for 11 days in the presence of NGF + dbcAMP. Bar, 50 μ m.

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 β 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 β 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) β cells are NGF positive (red or yellow); of these, approximately 3% of the cells are completely negative

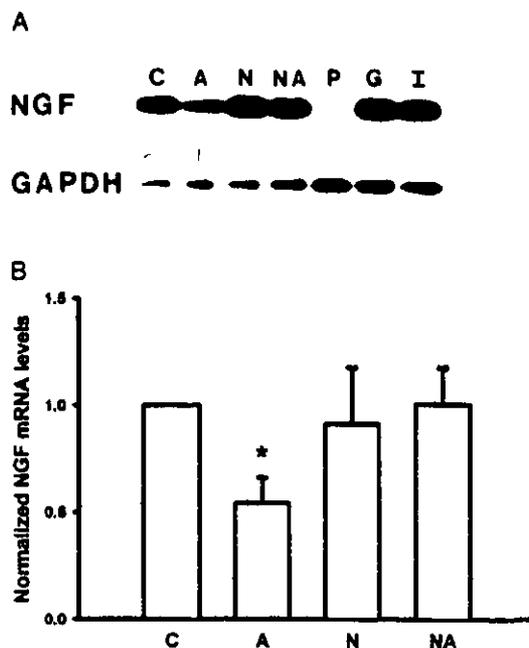


FIG. 2. NGF mRNA levels are dependent on dbcAMP. (A) RT-PCR reaction products from rat pancreatic β cells cultured under different experimental conditions. (B) dbcAMP induced a 46% decrease in NGF mRNA levels ($n = 6$; * $P < 0.01$, Student's t test) with respect to control, whereas treatment with NGF 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 β 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

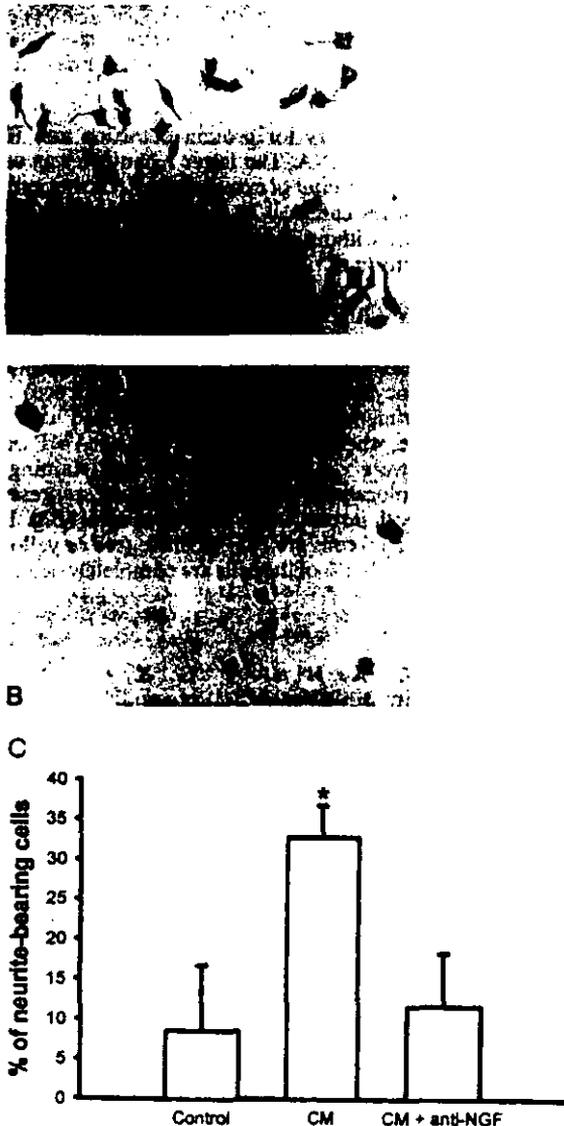


FIG. 3. Pancreatic β cells secrete a molecule with NGF-like biological activity. (A) PC12 cells cultured in the presence of the CM extended neuritic processes. (B) When an NGF-neutralizing antibody was added to the CM, extension of neurites by PC12 was abolished to control levels because cells did not 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 β Cells Secrete Biologically Active NGF. The above data demonstrate that β cells contain NGF mRNA and protein. However, they do not indicate whether β 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 β cells stimulated with 20 mM glucose. Neurite outgrowth in PC12 cells cultured in the β 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 β cells secrete a biologically active NGF-like molecule.

NGF Secretion by Pancreatic β 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 β cells, we used an ELISA.

Pancreatic β 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 β cells (6). Because pancreatic β cells synthesize and secrete NGF and the treatment of β 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.

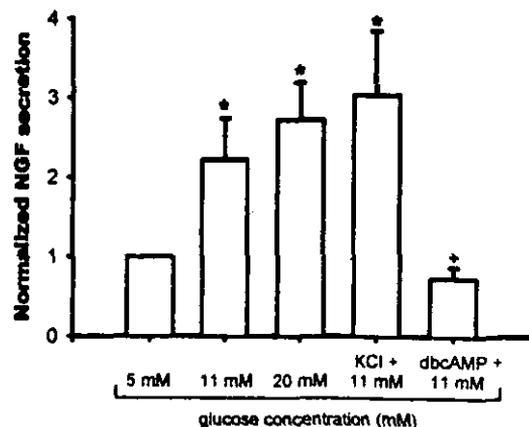


FIG. 4. Pancreatic β cells secrete NGF in response to different glucose concentrations. Cells stimulated with 20 mM glucose secrete 50–180 pg/ml NGF. Cells stimulated with 5 mM glucose secrete 20–60 pg/ml NGF. NGF secretion in KCl (40 mM) + 11 mM glucose was significantly different from secretion in 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, $n = 4$).

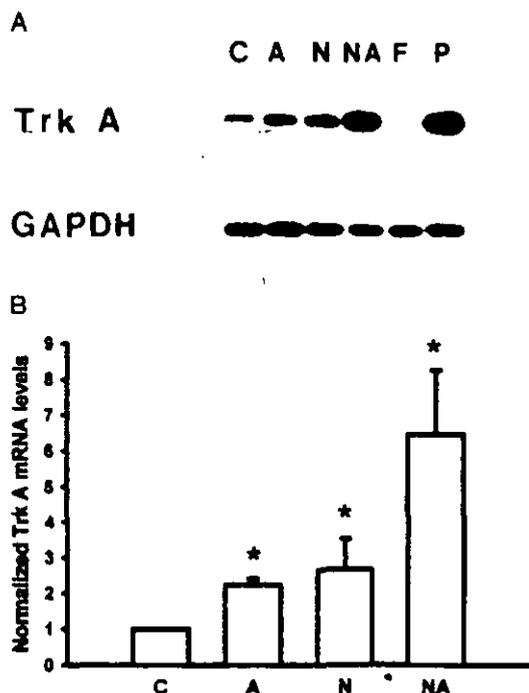


FIG. 5. dbcAMP and/or NGF up-regulate Trk A mRNA levels. (A) RT-PCR reaction products for Trk A detection under different experimental conditions. (B) dbcAMP and NGF each induced a twofold increase in Trk A mRNA levels ($P < 0.05$) with respect to control, whereas treatment with NGF + dbcAMP induced 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 β 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 β 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 β 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 β 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 β 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 β 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 β 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 β 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 β cells exposed to NGF, permitting β cells to respond even if the concentration of the trophic factor is low.

The sustained sensitivity of β cells to NGF could be necessary for the maintenance of β cell function. NGF treatment enhances glucose-stimulated insulin secretion in fetal rat β cells (23) and in the INS-1 cell line (24), and NGF treatment prevents the loss of sensitivity to external glucose concentration changes in β 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 β cell electrical activity, since it induces a 30% increase in sodium current density of adult rat β 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 β 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 Larrieta 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., Martín-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. & Armeric, 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-Lagae, 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., Eberdal, T. & Hellerstrom, 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.