

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

Análisis de la expresión de insulina y del factor de crecimiento neuronal (NGF) pancreáticos en diabetes experimental asociada a la destrucción de las células beta

T E S I S

Que para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

P r e s e n t a :

María Elena Larrieta Carrasco

Directora de Tesis: Dra. Marcia Hiriart Urdanivia

México, D. F. enero de 2007.



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.

Agradecimientos

A la Directora de esta Tesis: Dra. Marcia Hiriart Urdanivia

A los miembros de mi comité tutorial: Dr. Alejandro Zentella Dehesa y Dr. Guillermo Robles Díaz

A mis sinodales:

Dr. David Kershenobich Stalnikowitz

Dra. Teresa Tusié Luna

Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes

Dra. Leticia Verdugo Díaz

Dra. Marcia Hiriart Urdanivia

Dra. Irma Villalpando Fierro

Dr. Guillermo Robles Díaz

Por su participación en la revisión y discusión del manuscrito de esta Tesis.

Agradecimientos

A la Unidad de Microscopía Confocal y Electrónica del Instituto de Fisiología Celular por la facilitación y el uso del microscopio confocal.

Al Bioterio del Instituto de Fisiología Celular por la facilitación de animales para experimentación.

A la Unidad de Cómputo Académico del Instituto de Fisiología Celular por su apoyo técnico.

A la Biblioteca del Instituto de Fisiología Celular por la facilitación y préstamo de libros y revistas.

Al Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes por su apoyo y colaboración en la realización de los experimentos de biología molecular.

Al Dr. Horacio Merchant Larios por la facilitación y el uso del microscopio confocal a su cargo.

A la Dra. Cristina Fernández Mejía por la oportunidad de realizar una estancia Posdoctoral en su laboratorio y por el apoyo y las facilidades que me brindó durante los trámites para la obtención del grado.

Durante la realización de este trabajo, el autor fue becario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y de la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP), UNAM.

ÍNDICE

I.	RESUMEN.....	1
II.	ABSTRACT.....	3
III.	INTRODUCCIÓN.....	4
	1. Anatomía de páncreas.....	4
	2. Páncreas exocrino.....	5
	3. Páncreas endocrino.....	6
	4. Regulación de la secreción de insulina.....	8
	4.1. Estructura de la insulina.....	8
	4.2. Transcripción del gen de insulina.....	9
	4.3. Regulación de la transcripción del gen de insulina.....	12
	4.4. Síntesis de Insulina.....	13
	4.5. Modificaciones postraduccionales de la insulina.....	14
	4.6. Acoplamiento entre el estímulo y la secreción de insulina.....	16
	5. Metabolismo de la glucosa en las células β pancreáticas.....	16
	6. Acciones biológicas y moleculares de la insulina.....	19
	6.1. Receptor a insulina.....	19
	6.2. Cascadas de señalización generadas por la unión de insulina a su receptor.....	22
	6.2.1. Señalización a través de PI3K.....	23
	6.2.2. Señalización a través de Grb2.....	26
	7. Diabetes <i>mellitus</i>	30

8.	El factor de crecimiento neuronal (NGF).....	33
8.1.	Estructura del NGF.....	33
8.2.	Receptores a NGF.....	36
8.2.1.	Receptor p75.....	36
8.2.2.	Receptor TrkA.....	37
8.3.	Cascada de señalización a través del receptor p75.....	39
8.4.	Cascada de señalización a través del receptor TrkA.....	40
8.4.1.	Señalización a través Ras.....	41
8.4.2.	Señalización a través PI3K.....	41
8.4.3.	Señalización a través PLC- γ y PKC.....	42
8.5.	Efectos del NGF.....	45
9.	Modelo experimental de diabetes.....	46
9.1.	Estreptozotocina (STZ).....	46
IV.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	49
V.	HIPÓTESIS.....	50
VI.	OBJETIVOS.....	51
VII.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	51
1.	Materiales.....	52
2.	Métodos.....	53
2.1.	Administración de ratas con STZ.....	53
2.2.	Extracción de sangre, obtención de suero y medición de glucosa sanguínea.....	53

2.3. Obtención de islotes pancreáticos y cultivo de células β aisladas.....	54
2.4. Ensayo de secreción de insulina y de NGF.....	55
2.5. Mediciones de insulina y de NGF.....	56
2.6. Obtención de RNA total de islotes pancreáticos y RT-PCR para la detección de <i>insulina</i> y de <i>NGF</i>	58
2.7. Medición de viabilidad celular.....	59
2.8. Medición de apoptosis.....	59
2.9. Histología.....	60
2.10. Inmunofluorescencia.....	60
2.11. Análisis morfométrico.....	62
2.12. Análisis estadístico.....	62
VIII. RESULTADOS.....	63
1. Efectos del daño <i>in vivo</i> inducido por STZ en ratas.....	63
1.1. La STZ aumentó la concentración de glucosa sanguínea.....	63
1.2. La STZ disminuyó el peso corporal.....	65
1.3. La STZ disminuyó la concentración de insulina en suero.....	65
2. Efectos del daño <i>in vivo</i> inducido por STZ sobre las células β e islotes pancreáticos aislados.....	67
2.1. La STZ <i>in vivo</i> disminuyó la concentración de insulina secretada y aumentó la concentración de NGF secretado por las células β aisladas	67

2.2. La STZ <i>in vivo</i> disminuyó el nivel de RNAm de insulina y aumentó el nivel de RNAm de NGF	69
3. Efectos del daño <i>in vitro</i> inducido por STZ sobre las células β pancreáticas aisladas.....	71
3.1. La STZ <i>in vitro</i> disminuyó la concentración de insulina secretada y aumentó la concentración de NGF secretado por las células β aisladas.....	71
3.2. La STZ <i>in vitro</i> disminuyó la sobrevivencia y aumentó la apoptosis de las células β aisladas.....	72
4. Análisis histológico de páncreas de ratas después de 4 horas de la administración de STZ.....	75
5. Análisis morfométrico de páncreas de ratas después de 4 semanas de la administración de STZ.....	75
IX. DISCUSIÓN.....	78
X. CONCLUSIONES.....	85
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	87

I. RESUMEN

En esta tesis investigamos los efectos de la estreptozotocina (STZ) *in vivo* e *in vitro* sobre la fisiología de las células β pancreáticas. Ratas Wistar macho se administraron con 75 mg/kg de STZ y a las 4 h, 1, 2, 3 y 4 semanas, se midieron las concentraciones de glucosa e insulina en sangre. Después de 4 h de la administración de STZ, se aislaron las células β pancreáticas y se cultivaron durante 16 h. Se analizó su secreción de insulina y del factor de crecimiento neuronal (NGF) en respuesta a 5.6 o 15.6 mM de glucosa así como la expresión relativa de RNAm de *insulina* y de *NGF*. Paralelamente, células β aisladas de ratas control se expusieron *in vitro* a 1 mM de STZ durante 1, 2 o 4 h para analizar su secreción en las mismas concentraciones de glucosa. A las 4 h posteriores a la administración de STZ, las ratas mostraron hiperglucemia (~250 mg/dl) y una disminución del 70 % en los niveles de insulina en suero comparado con las ratas control, estas condiciones se fueron agudizando en las siguientes semanas. Aunque la secreción de insulina de las células β aisladas de las ratas administradas con STZ disminuyó más de 80 %, la secreción de NGF aumentó 10 veces en ambas concentraciones de glucosa. Adicionalmente, la expresión relativa del RNAm de *NGF* aumentó 30 % comparado con el control. Resultados similares se obtuvieron cuando las células β se expusieron *in vitro* a STZ. Nuestros datos son, para nuestro conocimiento, los primeros en demostrar un incremento temprano en la producción y secreción de NGF por las células β pancreáticas en respuesta al daño inducido por la STZ. Este incremento podría

ser parte de una respuesta endógena protectora para mantener la sobrevivencia celular. Sin embargo, en nuestros modelos *in vivo* e *in vitro*, el daño a las células β con STZ no es reparado y entonces se desarrolla diabetes *mellitus*.

II. ABSTRACT

We investigated *in vivo* and *in vitro* effects of streptozotocin (STZ) on physiology of pancreatic β cells. Male Wistar rats were administrated with STZ (75 mg/kg) and after 4 h, 1, 2, 3 and 4 weeks, blood glucose and insulin were measured. After 4 h of the STZ administration, β cells were isolated and cultured for 16 h. Insulin and NGF secretion was analyzed in response to 5.6 or 15.6 mM glucose and the expression of the mRNA of insulin and nerve growth factor (NGF) was analyzed. In addition, β cells from control rats were exposed *in vitro* 1 mM STZ for 1, 2 or 4 h to analyze its secretion in the same glucose concentrations. After 4 h of the STZ administration, rats showed hyperglycemia (~250 mg/dl) and a 70 % decrease in serum insulin levels as compared to controls. While insulin secretion by isolated β -cells from STZ-administrated rats was reduced by more than 80 %, NGF secretion by the same cells increased 10-fold in both glucose concentrations. Moreover, NGF mRNA expression increased by 30 % as compared to controls. Similar results were obtained in β cells exposed *in vitro* to STZ. Our data are, to our knowledge, the first to demonstrate an early increase in NGF production and secretion by pancreatic β cells in response to STZ damage. This increase could be an endogenous protective response to maintain cell survival. However, in our models *in vivo* and *in vitro*, β -cell damage with STZ is not repaired and then diabetes is developed.

III. INTRODUCCIÓN

1. Anatomía del páncreas

El páncreas es un órgano alargado localizado en la parte posterior del estómago. Está dividido en tres partes: cabeza, cuerpo y cola. La cabeza pancreática colinda con la segunda parte del duodeno, mientras que la cola se extiende hacia el bazo. El conducto pancreático corre a lo largo del páncreas y se vacía en la segunda parte del duodeno, en la ampulla de Vater. El conducto biliar común se une al conducto pancreático (figura 1) (1).

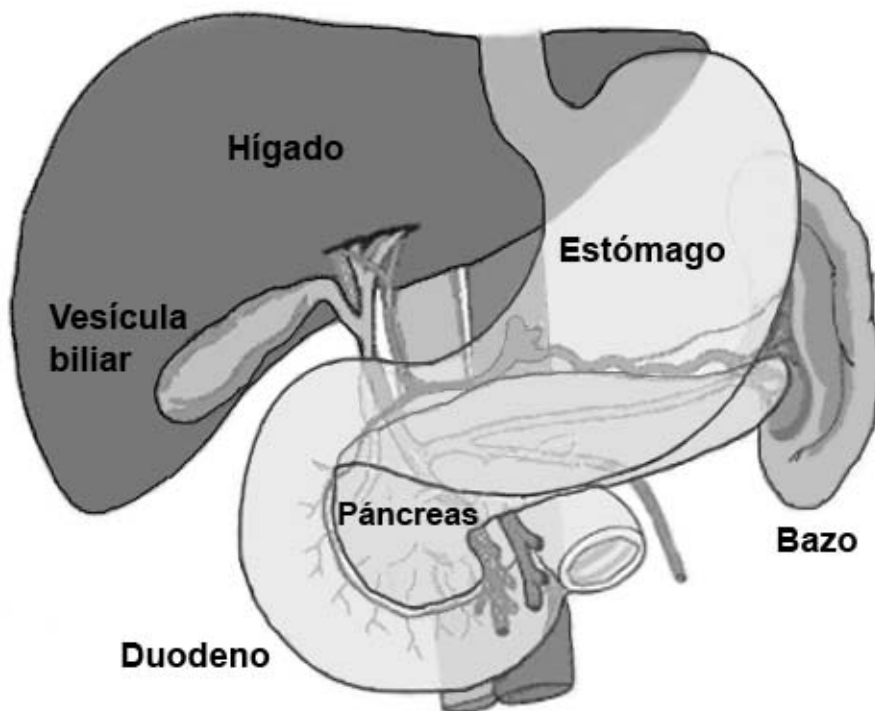


Figura 1. Localización del páncreas. Modificada de Universidad de Liverpool, 2003.

El páncreas está irrigado por las arterias pancreaticoduodenales, las cuales se ramifican de la arteria mesentérica superior. El drenaje venoso es a través de las venas pancreaticoduodenales, las cuales terminan en la vena porta. La vena porta está formada por la unión de la vena mesentérica superior y la vena esplénica posterior al cuerpo del páncreas (1).

El páncreas de los mamíferos es una glándula de función exocrina y endocrina.

2. Páncreas exocrino

El páncreas exocrino está conformado por las células acinares y el sistema epitelial de conductos. Las células acinares sintetizan las principales enzimas digestivas: tripsina, quimiotripsina, lipasa y amilasa. Estas células se encuentran organizadas en acinos en donde cada célula se encuentra polarizada, y los gránulos de precursores de las enzimas digestivas inactivas (zimógenos) se localizan en el área subapical de las células.

Después de su fusión con la membrana apical, los zimógenos se secretan al lumen de los acinos, de ahí pasan a los conductillos y viajan por el conducto pancreático principal que finalmente se descargan en el duodeno, donde son activados por las enterocinasas y la tripsina. Las células del conducto también producen y secretan iones bicarbonato que neutralizan las secreciones ácidas que llegan al duodeno desde el estómago (2).

3. Páncreas endocrino

La función endocrina del páncreas es realizada por los islotes, los cuales se encuentran dispersos en el tejido acinar y están conformados a su vez por cuatro tipos celulares: las células α , las células δ , las células PP y las células β (figura 2). Las células α que secretan glucagon, se encuentran en la periferia de los islotes y conforman alrededor del 10 % de las células del islote. Las células α secretan glucagon en respuesta a la disminución de la concentración de glucosa en la sangre (3).

En el hígado, el glucagon induce la degradación de glucógeno y la activación de la gluconeogénesis, lo que lleva a la producción de glucosa, la cual al salir a la sangre restablece la glucemia normal (3).

Las células δ secretan somatostatina, y constituyen aproximadamente el 8 % de las células del islote (4). La somatostatina es potente modulador paracrino que inhibe la secreción de insulina y glucagon de los islotes (5). La inhibición es mediada por los receptores a somatostatina (SSTR)-1 y -5 en las células β y SSTR-2 en las células α (6, 7, 8).

Las células PP secretan polipéptido pancreático (PP) y representan sólo el 3 % de las células del islote. Este tipo celular sólo se encuentra en los islotes localizados en la cabeza del páncreas, que es la región con menor densidad de islotes (9). El PP es secretado en respuesta a la ingesta de alimento. La

secreción postprandial del PP está mediada por los reflejos vagales y las vías colinérgicas locales (10).

La función fisiológica del PP es inhibir la secreción de enzimas pancreáticas (11). El polipéptido pancreático inhibe el vaciado gástrico de alimentos sólidos y retrasa el aumento postprandial de la glucosa y la insulina en plasma. Se ha sugerido que el polipéptido pancreático tiene un papel fisiológico en la contrarregulación postprandial pancreática del vaciado gástrico y la secreción de insulina (12).

Las células β conforman el 80 % de las células en los islotes de rata y se localizan en el centro del islote. Estas células sintetizan y secretan insulina, la principal hormona hipoglucemiante, ya que induce la entrada de glucosa a los tejidos periféricos como el músculo esquelético y el tejido adiposo. Además de la insulina, las células β sintetizan ácido γ -amino butírico (GABA) (13) y amilina. Se ha propuesto que la amilina funciona como un factor insular antagonista de la insulina, ya que inhibe su secreción e induce resistencia a ella en tejidos periféricos (14).

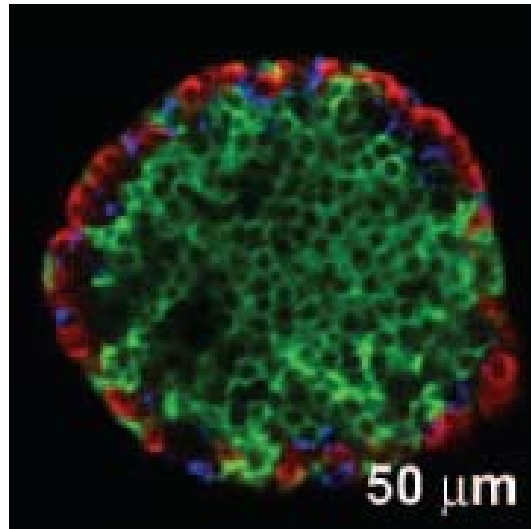


Figura 2. Imagen confocal de un islote pancreático de ratón. Las células α (rojo) y δ (azul) se localizan en la periferia del islote rodeando a las células β que se encuentran en el centro (verde). Tomada de Brissova et al, 2005 (15).

Los islotes pancreáticos 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 pancreáticas al hígado y a todo el organismo (16).

4. Regulación de la secreción de insulina

4.1. Estructura de la insulina

La forma madura de la insulina 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 un puente disulfuro intracatenario que une el aminoácido 6 con el aminoácido 11 de la cadena A (figura 3a) (17).

Las dos cadenas de la insulina son sintetizadas como parte de una sola proteína precursora, la preproinsulina, la cual contiene una secuencia de aminoácidos que une a las dos cadenas, llamada péptido C y un péptido señal, el cual dirige a la preproinsulina naciente hacia el retículo endoplásmico rugoso (18). Posteriormente el péptido señal es removido y se forma la proinsulina (figura 3b).

4.2. Transcripción del gen de insulina

La preproinsulina es codificada por un sólo gen 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 el gen I de insulina de roedor surgió de la transcripción del gene II ancestral que inició su procesamiento (splicing) y después fue retrotranscrito a cDNA y reincorporado al genoma (19).

La estructura de los genes de insulina se encuentra conservada en cerca de 50 especies de mamíferos. Los genes de insulina están compuestos por 3 exones y 2 intrones (figura 4A) (20), con excepción del gen I de insulina de rata y ratón que carece del segundo intrón.

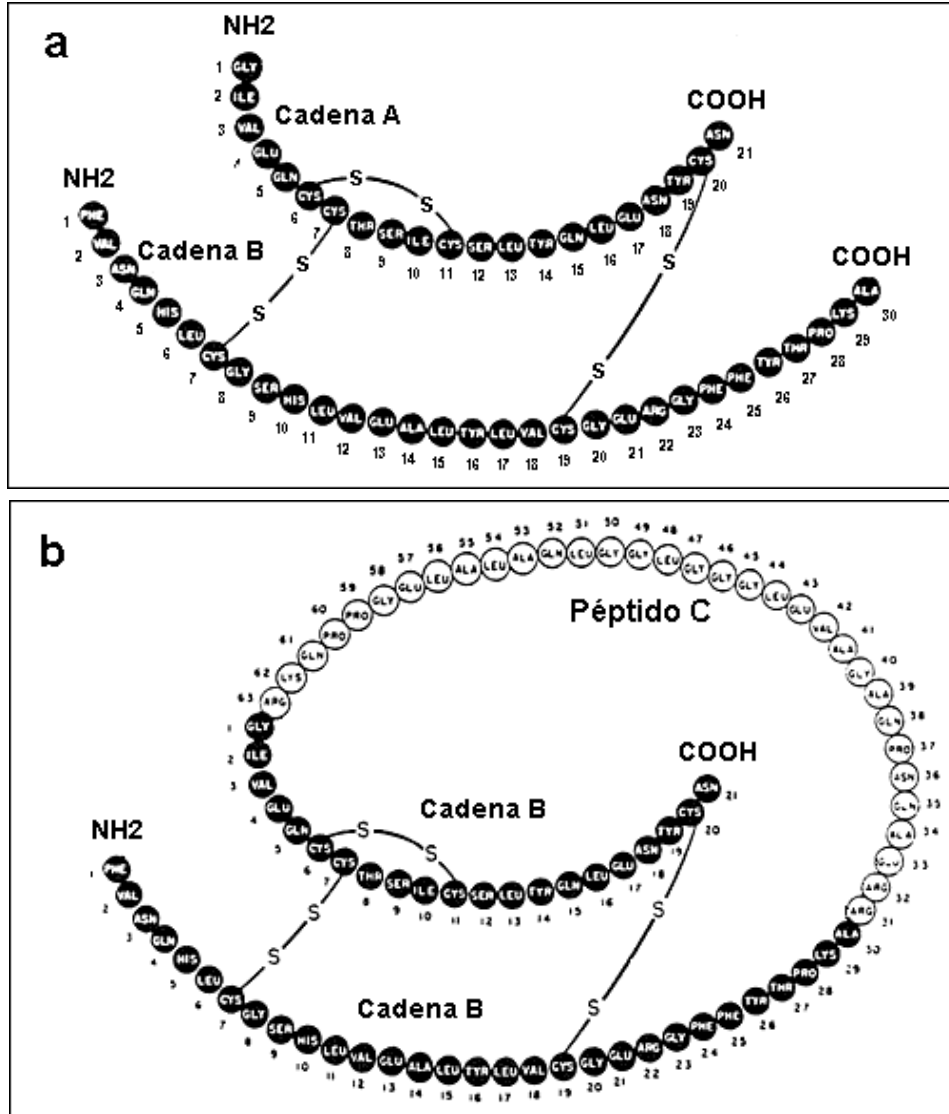


Figura 3. Secuencias de aminoácidos de: a) insulina madura y b) proinsulina.

Modificada de Pittman, Philipson y Steiner, 2004 (17).

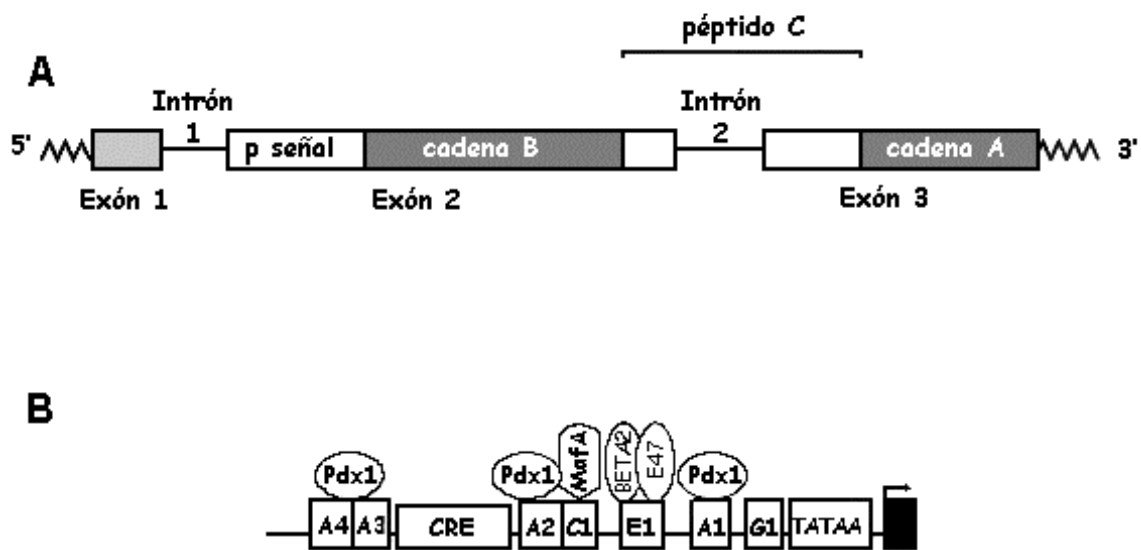


Figura 4. A) Estructura del gene de insulina y B) Región reguladora del gen de insulina. Modificada de Poitout et al, 2006 (20).

El exón 1 codifica para una región 5' del RNA mensajero (RNAm) que no se traduce, mientras que el exón 2 codifica para el péptido señal, la cadena B y la región amino-terminal del péptido C y el exón 3 codifica para el carboxilo-terminal del péptido C, la cadena A y una región del extremo 3' del RNAm que no se traduce (figura 4A) (21). La región de regulación 5' del gen de insulina tiene 3 tipos de secuencias que regulan la transcripción del RNAm: una región promotora, una región potenciadora (enhancer) y una región silenciadora (silencer). Las tres secuencias confieren especificidad celular, que impide que el gen de insulina se exprese en células que no sean β pancreáticas (22, 23).

La región promotora del gen de insulina contiene la secuencia conservada TATAA (caja TATA) que es la que indica a la RNA polimerasa II el sitio de iniciación de transcripción. En la región potenciadora se encuentra la secuencia IEB1 que es un elemento regulador conocido como caja E1, así como los sitios A3 y C1. A estas secuencias se unen factores de transcripción bHLH (basic-Helix-Loop-Helix) para regular la transcripción del gen (21) (figura 4B).

El factor de transcripción Pdx1 es una proteína homeodominio que se une al sitio A3 e interactúa con proteínas de la familia bHLH que se unen a la caja E1. Entre estas proteínas están E47 y Beta2. Además Pdx1 y Pax4 se unen a una secuencia TAAT, llamada sitio P1 localizada en la región reguladora para mantener la expresión del gen de insulina (24). Al sitio C1 se une el activador recientemente identificado como MafA. La proteína Nkx6.1 es un factor de transcripción NK2 y no se conoce su mecanismo de acción, sin embargo su expresión está asociada con la producción de insulina en el desarrollo de las células β de ratón (25). Pdx1, MafA y Beta2 no actúan de una manera aislada, ya que interactúan con otros factores para inducir activación sinérgica de la transcripción del gen de insulina.

4.3. Regulación de la transcripción del gen de insulina

Uno de los principales reguladores de la transcripción del gen de insulina es el AMP cíclico (AMPc) intracelular. La región reguladora tiene un elemento de respuesta a AMPc llamado CRE, al cual se une el factor de transcripción CREB

activado y aumenta la transcripción del gen de insulina. CREB se activa tras ser fosforilado por la cinasa de proteínas regulada por AMPc (PKA). La PKA se activa cuando la concentración intracelular de AMPc aumenta (26).

La glucosa es otra molécula reguladora de la transcripción del gen de insulina. La exposición por tiempo corto a una concentración elevada de insulina (16 mM) aumenta la transcripción del gen de insulina (27). La glucosa promueve la unión de Pdx1 al sitio A3, así como la translocación de Pdx1 del citoplasma al núcleo (28). La expresión y unión del factor de transcripción MafA son también activadas directamente por glucosa. La glucosa aumenta la transcripción del gen de insulina por mecanismos complementarios que incluyen el reclutamiento de factores de transcripción a los sitios reguladores, modificaciones de histonas e iniciación de la transcripción.

4.4. Síntesis de insulina

La traducción del RNAm de insulina inicia con la unión de ribosomas libres al RNAm que codifica para la preproinsulina. Se traduce primero la secuencia del péptido señal, la cual es reconocida por la partícula de reconocimiento de señal (SRP) que interrumpe la traducción cuando se han sintetizado cerca de 50 aminoácidos (29). La SRP se une a su receptor en la membrana del retículo endoplásmico rugoso (RER), y el péptido señal se transloca al lumen del RER y el ribosoma se queda anclado en la membrana del RER y se reanuda la traducción de la preproinsulina (figura 5).

4.5. Modificaciones postraduccionales

En este proceso se remueve el péptido señal por la peptidasa de señal, para formar la proinsulina. Durante el plegamiento de la proinsulina en el lumen del RER se forman los puentes de disulfuro para proseguir su tránsito hacia el aparato de Golgi. En la región trans del Golgi, la proinsulina es empaquetada en gránulos de secreción y separada de las proteínas de membrana y de secreción constitutiva (figura 5) (30).

Los gránulos de secreción se forman a partir de vesículas cubiertas de clatrina, una proteína que induce la gemación de estas vesículas de la membrana de trans-Golgi y las estabiliza durante su tránsito hacia la membrana plasmática (30). Durante este tránsito, la proinsulina se convierte en insulina por medio de la acción de endopeptidasas que cortan la cadena en dos sitios: uno entre los aminoácidos 63 y 66 y otro entre los aminoácidos 30 y 33. De esta manera se separan las cadenas A y B del péptido C (figura 5). Las endopeptidasas tienen actividad óptima a pH ácido que coincide con el pH en el interior de los gránulos que van madurando en su tránsito hacia la membrana citoplasmática (31).

La disminución del pH y el aumento en la concentración de calcio libre en el interior de los gránulos se debe a la acción de proteínas de membrana de los gránulos que bombean iones H^+ y Ca^{2+} hacia el interior del gránulo. La actividad de las endopeptidasas también está determinada por la concentración de Ca^{2+} . Además de la insulina y del péptido C, los gránulos secretores contienen

enzimas que maduran la insulina, bombas iónicas y otras hormonas como la amilina (32).

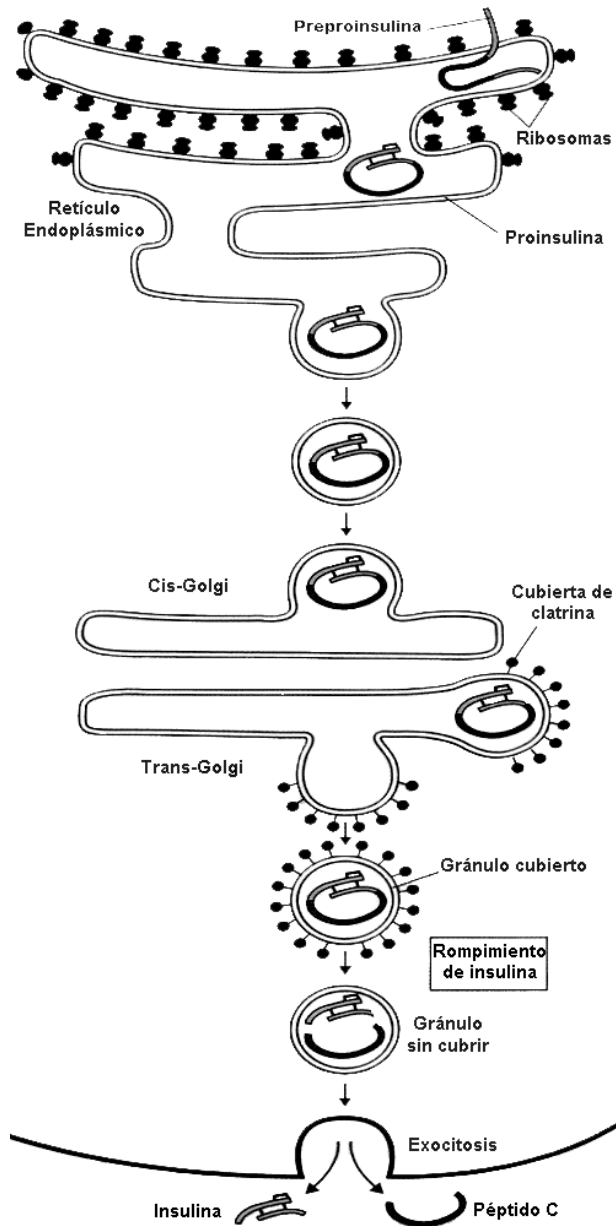


Figura 5. Proceso de síntesis y secreción de insulina en la célula β pancreática.

Modificada de Bishop y Polak, 2003 (33).

4.6. Acoplamiento entre el estímulo y la secreción de insulina

La secreción de insulina está regulada por diversas moléculas. Las moléculas que inducen la secreción de insulina son de 2 tipos: iniciadores y potenciadores. Los iniciadores estimulan la secreción de insulina de manera dependiente de su concentración. Los potenciadores aumentan la secreción de insulina sólo cuando son administrados simultáneamente con un iniciador. El principal iniciador fisiológico de la secreción de insulina es la α -D glucosa, cuya concentración extracelular aumenta arriba de 7 mM, estimula la secreción de insulina que alcanza un máximo a 20 mM de glucosa (32).

5. Metabolismo de la glucosa en las células β pancreáticas

La glucosa ingresa al interior de la célula β a través de una proteína membranal transportadora de glucosa a favor de su gradiente de concentración. Las células β de rata y ratón expresan constitutivamente el transportador de glucosa tipo 2 (GLUT2) (34). El GLUT2 es una proteína con una capacidad alta de transporte de glucosa, pero a la vez con una afinidad baja ($K_m = 50$ mM). Esto sugiere que la actividad máxima del GLUT2 se da cuando la glucosa en sangre alcanza su punto máximo, es decir, en el periodo posprandial.

Las células β de humano expresan preferencialmente el transportador de glucosa tipo 1 (GLUT1) el cual actúa a una velocidad más baja pero con una afinidad mayor por la glucosa ($K_m = 3$ mM) (35).

Una vez que la glucosa ha ingresado al interior de la célula, es fosforilada para formar glucosa 6-fosfato, en las células β existen dos enzimas que fosforilan a la glucosa, la hexocinasa I y la hexocinasa IV esta última conocida como glucocinasa. La hexocinasa I tiene una afinidad alta por la glucosa ($K_m = 0.1$ mM) y es probable que su actividad esté saturada a la concentración fisiológica de la glucosa en sangre (36).

La glucocinasa tiene una afinidad baja por la glucosa ($K_m = 10$ mM) y su actividad máxima se da en la concentración fisiológica de glucosa en sangre. Esta enzima constituye el paso determinante en el metabolismo de la glucosa (37). Una vez fosforilada la glucosa es metabolizada por glucólisis para producir piruvato, NADH citosólico y ATP. El piruvato y NADH entran a la mitocondria y son metabolizados para producir ATP y NADH mitocondrial en el ciclo de Krebs (figura 6) (38).

El NADH citosólico y mitocondrial estimulan la cadena de transporte de electrones para bombear iones H^+ fuera de la matriz mitocondrial generando una diferencia de potencial electroquímico de H^+ . La ATP sintasa utiliza esta diferencia de potencial para producir ATP a partir de ADP. El ATP producido en la mitocondria es transportado al citosol aumentando su concentración y la relación ATP/ADP (38).

Además de su función como reservorio de energía en las células β , se cree que el ATP es responsable de acoplar el metabolismo de la glucosa con la secreción de insulina a través de la actividad eléctrica de la célula β . El mecanismo más aceptado para explicar el acoplamiento entre el catabolismo de la glucosa y la secreción de insulina propone que el aumento en la relación ATP/ADP induce el cierre de canales de K^+ membranales (KATP) de la célula β (39).

El cierre de estos canales lleva a la despolarización de la membrana a un potencial en el cual aumenta la probabilidad de apertura de canales de Na^+ y Ca^{2+} , con lo cual se produce la entrada de Ca^{2+} a la célula. El aumento de la concentración intracelular induce la secreción de insulina por exocitosis (figura 6) (39, 40). Este mecanismo es referido como la vía dependiente del KATP, ya que este canal es la clave en la transducción de los efectos de la glucosa (figura 6).

Ha sido descrito un segundo mecanismo que es independiente de KATP, usando diazóxido, para abrir el KATP y concentraciones altas de K^+ para despolarizar la membrana y aumentar la concentración intracelular de Ca^{2+} . Bajo estas condiciones, la glucosa no aumentó más la concentración intracelular de Ca^{2+} , pero potenció el efecto estimulador del sobre la exocitosis (41, 42).

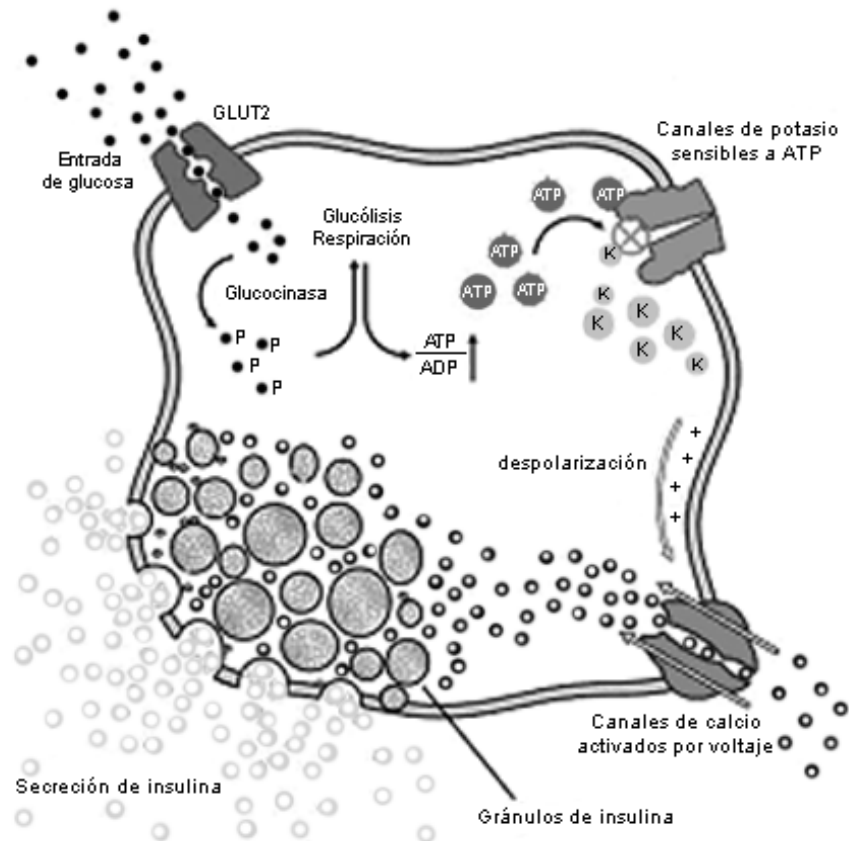


Figura 6. Mecanismo del acoplamiento entre el catabolismo de glucosa y la secreción de insulina en las células β pancreáticas. Modificada de Beta Cell Biology Consortium, 2004 (43).

6. Acciones biológicas y moleculares de la insulina

6.1. Receptor a insulina

El receptor a insulina pertenece a la superfamilia de receptores transmembranales cinasas de residuos de tirosina. Esta familia incluye a los receptores monoméricos a el factor de crecimiento epidérmico (EGF), a el factor

de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), a eritropoyetina (Epo), a el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y a el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y cerca de 10 familias más de receptores cinasas de residuos de tirosina (44). A la subfamilia del receptor a insulina pertenecen el receptor 1 al factor de crecimiento tipo insulina (IGF-1R) y el receptor relacionado al receptor de insulina (IRR) (45).

El receptor a insulina es una glucoproteína transmembranal compuesta de dos subunidades α unidas por puente disulfuro a dos subunidades β , formando un heterotetrámero $\alpha_2\beta_2$ (figura7). El receptor a insulina es sintetizado como un prorreceptor que es procesado, glucosilado plegado y dimerizado para dar un receptor maduro (46). Las subunidades α son completamente extracelulares, mientras que las subunidades β contienen una porción extracelular, un dominio transmembranal y una parte intracelular que incluye el dominio cinasa de residuos de tirosina y los sitios de interacción proteína-proteína (45).

El dominio cinasa de residuos de tirosina cataliza la transferencia del fosfato γ del ATP al grupo hidroxilo de la cadena lateral de los residuos de tirosina en las proteínas sustrato, las cuales incluyen el mismo receptor (autofosforilación) (44). La porción extracelular del receptor a insulina tiene un arreglo lineal de módulos unidos por puentes disulfuro, tales como son: los dos dominios globulares homólogos L1 y L2 separados por el dominio rico en cisteína y finalmente los tres dominios fibronectina tipo III (FnIII). El segundo dominio FnIII contiene un

dominio de estructura desconocida que tiene el sitio de división entre las subunidades α y β (46).

Después del dominio transmembranal, en la porción intracelular de la subunidad β está la región llamada juxtamembranal, que está relacionada con el atracamiento de los sustratos del receptor a insulina (IRS) 1-4 y Shc así como en la internalización del receptor. Posteriormente se encuentra el dominio de cinasa de residuos de tirosina y finalmente la región carboxilo terminal. Todas las regiones de la porción intracelular contienen residuos de tirosina que son autofosforilados después de la unión de la insulina a su receptor (figura 7) (44, 46).

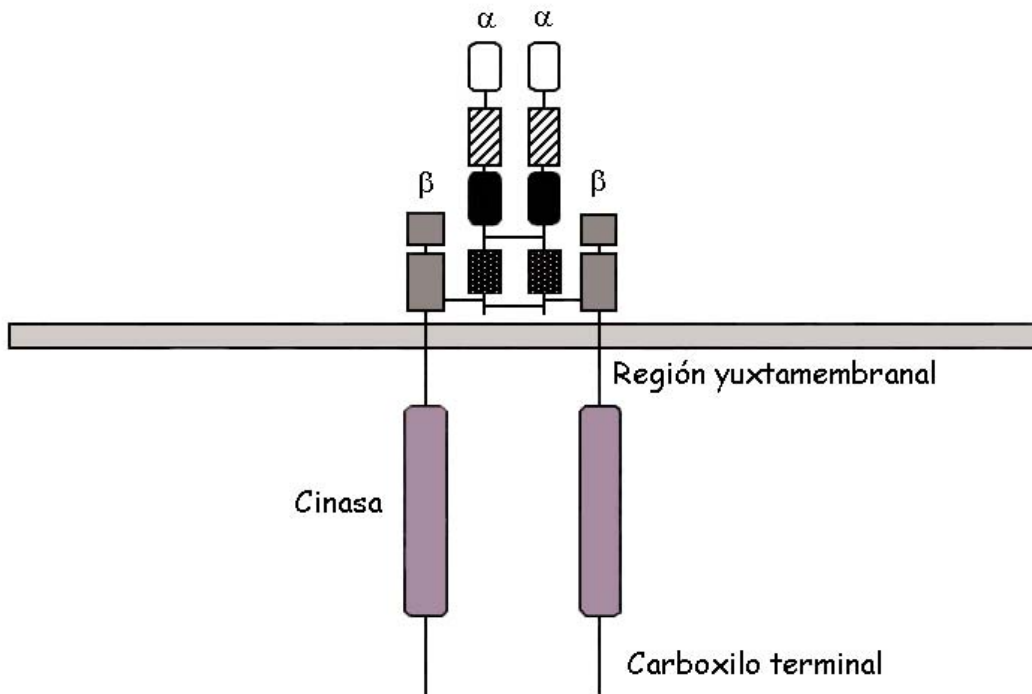


Figura 7. Esquema del receptor a insulina. Modificada de Chang et al, 2004 (50).

6.2. Cascadas de señalización activadas por la unión de insulina a su receptor

La unión de la insulina a su receptor genera una serie compleja de cascadas de señalización que implica más de 50 proteínas-enzimas. Al unirse la insulina a la subunidad α de su receptor, al parecer acerca a las dos subunidades α , este cambio conformacional permite la unión de ATP al dominio extracelular de la subunidad β . La unión de ATP activa la autofosforilación del receptor, el cual a su vez habilita la actividad cinasa del receptor sobre los residuos de tirosina de las proteínas sustratos y la creación de sitios de atracamiento para las proteínas de señalización (47).

Hay numerosos sitios de autofosforilación en el dominio intracelular de la subunidad β . La autofosforilación de los tres residuos en el loop de activación del dominio cinasa de residuos de tirosina lleva a la estimulación de la actividad cinasa del receptor. La fosforilación de los dos residuos en el carboxilo terminal puede tener un papel en la actividad mitogénica (47).

La autofosforilación del residuo en la región yuxtamembranal es importante en la interacción del receptor con las proteínas sustratos que contienen dominios de reconocimiento de fosfotirosinas, tales como el dominio de homología a Src 2 (SH2) o el dominio de unión a fosfotirosina (PTB) (44). Tal interacción provee sitios de atracamiento para incrementar la estabilidad del complejo receptor/sustrato.

Además de unir insulina, el receptor a insulina puede unir factores de crecimiento tipo insulina 1 y 2 (IGF-1 e IGF-2). Estos factores tienen una afinidad 100-1000 veces menor que la insulina (47).

Una vez activada la cinasa de residuos de tirosina del receptor a insulina, ésta fosforila a las proteínas sustratos del receptor de insulina (IRS). La familia de proteínas IRS está compuesta de 6 miembros. IRS-1 e IRS-2 se expresan en tejidos importantes en la homeostasis de glucosa y de lípidos como músculo, hígado, tejido adiposo e islotes pancreáticos, aunque IRS-1 es más importante en el metabolismo en músculo, IRS-2 lo es en hígado y en las células β pancreáticas (48).

IRS1 posee 21 residuos de tirosina potenciales de fosforilación y 6 residuos de serina-treonina potenciales de fosforilación. IRS1 e IRS-2 fosforilados interactúan y activan proteínas con dominios SH2 como la subunidad reguladora de la cinasa de 3 fosfatidil inositol (PI3K), la proteína adaptadora Grb2 y la fosfatasa de residuos de tirosina SHP2 (48). La activación de estas proteínas activa a su vez vías de transducción de señales específicas (figura 8).

6.2.1. Cascada de señalización a través de PI3K

La PI3K está compuesta por una subunidad reguladora, de la cual existen varias isoformas (p85- α , p85- β , p55/AS53, p55^{PIK} y p50) y una subunidad catalítica p110 (47). La subunidad p110 de la PI3K cataliza la adición de fosfato en la

posición 3' del anillo de lípidos de fosfoinositol (PI) encontrados en la membrana plasmática. La PI3K genera 3,4,5-trifosfato de fosfatidilinositol (PIP₃) a partir de 4,5-bifosfato de fosfatidilinositol (PIP₂) y 3,4-bifosfato de 4-fosfato de fosfatidilinositol (47, 49).

Los inosítidos fosforilados en la posición 3' actúan como mensajeros intracelulares que activan proteínas que contienen dominios de homología a plekstrina (PH), entre ellas la cinasa 1 dependiente de fosfoinosítidos (PDK1) que fosforila residuos serina-treonina y Akt (PKB). PDK1 fosforila y activa otras cinasas como Akt, PKC ζ/λ atípicas (PKCa) y la cinasa inducible por glucocorticoides y suero (SGK) (49, 50). AS160, un sustrato de Akt tiene un papel no definido en la translocación del transportador de glucosa GLUT4 a través de su dominio activador de GTPasa-Rab (50).

Sin embargo, existe una segunda vía de translocación de GLUT4 que es independiente de la actividad de PI3K. En esta vía el receptor a insulina se localiza en microdominios balsa de lípidos en la membrana plasmática, los cuales son ricos en colesterol, esfingolípidos, proteínas de señalización modificadas por lípidos, proteínas ancladas a glucosilfosfatidilinositol y glucolípidos (50).

El receptor de insulina activado fosforila la proteína Cbl a través de la proteína APS, Cbl interactúa con la proteína asociada a Cbl (CAP), esta última se une a

la proteína de balsa de lípidos, flotilina. De esta manera Cbl es reclutada a la balsa de lípidos y a través de sus tirosinas fosforiladas recluta el complejo CrkII/C3G, C3G es un factor intercambiador de GDP por GTP en la proteína asociada a balsas de lípidos, TC10. Una vez activada TC10 con GTP unido interactúa con moléculas efectoras como CIP4, Exo70 y Par6/Par3/PKC λ que participan en la translocación de GLUT4 a la membrana (figura 8) (49, 50).

Tanto Akt como las PKCa ζ/λ activadas a través de PI3K son requeridas para el transporte de glucosa en músculo y tejido adiposo. Sin embargo, Akt1 y Akt2 son necesarias en la regulación por insulina de la síntesis de glucógeno en el músculo, tejido adiposo e hígado y en la gluconeogénesis y liberación de glucosa en el hígado (51). Akt fosforila e inactiva la cinasa 3 de la sintasa de glucógeno (GSK3), lo que promueve la desfosforilación de la sintasa de glucógeno incrementando su actividad (52).

Por su parte, las PKCa ζ/λ son los principales mediadores del aumento en la expresión de la proteína 1c de unión al elemento regulador de esterol (SREBP-1c) inducido por insulina en el hígado (53). Esta proteína, es un factor de transcripción que se ha propuesto como un mediador clave de los efectos transcripcionales de la insulina (54). SREBP-1c activa la batería de genes que controlan la síntesis de lípidos en el hígado: la sintasa de ácidos grasos (FAS) y la carboxilasa de acetil-coenzima A (ACC) (51).

Por otro lado, la insulina inhibe la gluconeogénesis y la glucogenólisis en el hígado a través del factor de transcripción FoxO1, que es fosforilado por Akt. Sin estímulo de insulina, FoxO1 desfosforilado se localiza en el núcleo, en donde forma un complejo con el coactivador 1 del receptor activado proliferador de peroxisoma (PGC1) (55) y Cbp/p300 (56). Este complejo promueve la transcripción de la fosfatasa de la glucosa 6-fosfato y la carboxilasa de fosfoenolpiruvato, que es la enzima limitante de la gluconeogénesis. Al ser fosforilado, FoxO1 se disocia del complejo y sale del núcleo, inhibiéndose así la transcripción de los genes de estas enzimas (57).

En adipocitos, la insulina inhibe la lipólisis a través de la inhibición de la lipasa sensible a hormonas. Akt activa la fosfodiesterasa 3B específica de AMPc, con lo que se reducen los niveles de AMPc y la lipasa disminuye su actividad (58).

6.2.2. Cascada de señalización a través de Grb2

Grb2 es una de las proteínas adaptadoras SH2 mejor caracterizadas. En respuesta a insulina, mediante sus dominios SH2, Grb2 forma complejos estables con dos proteínas con tirosinas fosforiladas. Una es IRS1 y la otra es la proteína oncogénica que contiene dominios SH2, Shc (figura 8)(59).

Grb2 está asociada constitutivamente a la proteína Sos, que es un factor intercambiador de nucleótido guanina para la proteína Ras unida a la membrana plasmática. El atracamiento de Grb2 a las proteínas IRS recluta Sos a Ras

activando su GTPasa. Ras es una proteína G que pasa a un estado activo al intercambiar GDP por GTP, después de un tiempo su actividad de GTPasa promueve la hidrólisis de GTP convirtiéndolo en GDP con lo que Ras regresa a su estado inactivo (59).

Una vez activada, Ras estimula la cascada de cinasas de residuos de serina a través de la activación de Raf, MEK y ERK. ERK activado se transloca al núcleo, donde fosforila factores de transcripción que modulan la expresión de genes que llevan a la proliferación o diferenciación celulares (figura8) (60, 61).

El complejo Grb2/Sos no parece estar fijado fuertemente a la membrana en respuesta a insulina, lo cual puede contribuir al relativamente débil efecto mitogénico de la insulina comparado con la señalización dependiente de factor de crecimiento. Grb2 también se asocia con otros factores intercambiadores de nucleótido guanina como C3G, el cual puede estar relacionado a la activación de la cinasa c-Jun (59).

La vía de señalización a través de Grb2 no interviene en los efectos de la insulina en el metabolismo de la glucosa, sin embargo, ejerce funciones importantes en la estimulación de la síntesis de proteínas, expresión de genes, diferenciación y proliferación celular (51).

Con una red tan diversa de respuestas biológicas mediadas por insulina, no es sorprendente que el mal funcionamiento del sistema de señalización pueda llevar a la manifestación de una variedad de desordenes fisiológicos o complicaciones resultado del desarrollo de diabetes, en las que se incluyen neuropatía, neuropatía, retinopatía y enfermedades cardiovasculares.

El sistema de señalización de la insulina puede dividirse en tres componentes: insulina y su producción, receptor a insulina y todos los elementos acoplados a la cinasa del receptor a insulina. El metabolismo normal de los carbohidratos depende de un complejo y finamente balanceado juego entre los tres componentes (45).

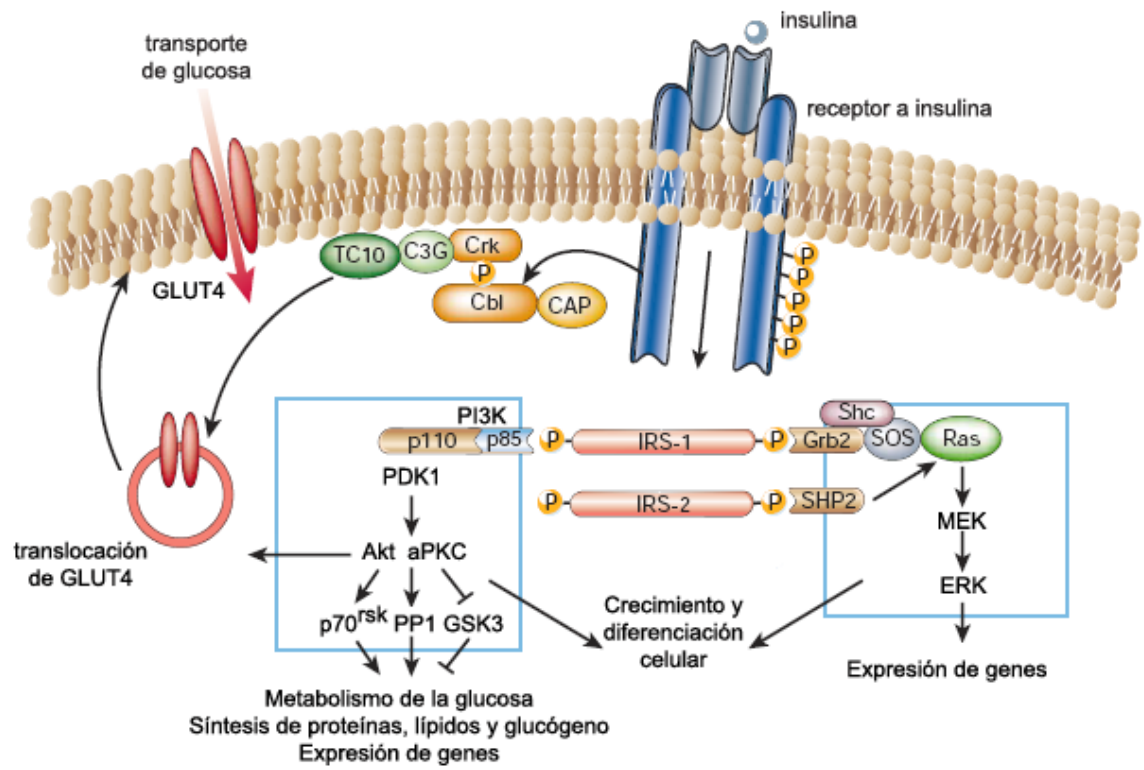


Figura 8. Cascadas de señalización activadas por insulina. Modificada de Kido et al, 2001 (47).

7. Diabetes mellitus

La diabetes *mellitus* es definida por la Asociación Americana de Diabetes como un conjunto de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglucemia variante o persistente, la cual resulta de la secreción o acción defectuosa de la insulina. Existen dos principales tipos de diabetes: tipo 1 y tipo 2 (62).

La diabetes *mellitus* tipo 1, comúnmente conocida como juvenil o dependiente de insulina se caracteriza por la destrucción autoinmune de las células β pancreáticas, la cual lleva a la deficiencia absoluta de insulina. La diabetes tipo 2 conocida como del adulto, es la forma más común y se caracteriza por la presencia de resistencia de los tejidos periféricos a la acción de la insulina y/o defectos secretorios de insulina (62).

Existen otros tipos específicos de diabetes que se deben a defectos genéticos de la función de las células β o de la acción de la insulina, enfermedades del páncreas exocrino, endocrinopatías, infecciones, a fármacos o productos químicos, a otros síndromes genéticos (63).

Entre los defectos genéticos de la función de las células β , se encuentran las mutaciones en diferentes genes y se conocen comúnmente como diabetes tipo 2 o del adulto de aparición en la juventud (MODY, maturity-onset diabetes of the young) y se clasifican según el gen mutado:

1. *Glucocinasa*: MODY tipo 2
2. Factor nuclear hepático 4 α (*HNF4 α*): MODY1
3. Factor nuclear hepático 1 α (*HNF1 α*): MODY3
4. Factor nuclear hepático 1 β (*HNF1 β*): MODY5
5. Factor promotor de insulina (*IPF-1*): MODY4
6. Factor de diferenciación neurogénica 1/ β 2 (*NEUROD/1 β 2*): MODY6

Otro tipo específico es la diabetes gestacional que aparece entre 2 y 5 % de las mujeres embarazadas, es temporal y tratable, pero si no se trata puede causar problemas con el producto, incluyendo macrosomía (alto peso al nacimiento), mayor riesgo de malformaciones congénitas e hipoglucemia después del nacimiento (63).

Una complicación frecuente de la diabetes *mellitus* es la polineuropatía periférica diabética que se define como desórdenes degenerativos de los nervios de los sistemas somatosensorial y autonómico (64). Las neuronas simpáticas y sensoriales derivadas de la cresta neural consisten de fibras pequeñas mielinizadas y no mielinizadas que se afectan en una etapa temprana de la diabetes *mellitus* (65).

En algunos estudios se encontró una asociación entre la patogénesis de la neuropatía diabética y las alteraciones en el contenido endógeno del factor de crecimiento neuronal (NGF) (65, 66). En pacientes con diabetes *mellitus* crónica

que presentan neuropatía periférica y en un modelo de ratones diabéticos por STZ, la concentración de NGF en suero es menor que en los controles (67, 68). Se ha observado que los niveles endógenos de NGF en órganos productores, dependientes o transportadores de NGF son marcadamente alterados durante la diabetes inducida por estreptozotocina (STZ) en ratas (65).

En la glándula submaxilar, que es un órgano productor de NGF, disminuye el contenido de NGF después de la administración de STZ. Lo mismo ocurre en el las neuronas simpáticas periféricas o sensoriales derivadas de la cresta neural que transportan o que dependen de NGF para sobrevivir, como el nervio sciático y el ganglio cervical superior. Sin embargo, después de más de 2 semanas de diabetes, los órganos que son blanco de la inervación simpática como corazón, vaso y próstata aumentan su contenido de NGF (65). No obstante, por otro lado, en el nervio sciático aumenta la expresión del RNAm de NGF las 12 semanas de diabetes (69).

La neuropatía autonómica diabética está acompañada por alteraciones en neuronas aferentes viscerales y autonómicas, lo cual lleva a trastornos cardiovasculares, desordenes tracto alimentarios y problemas en el control de la respiración. En particular, las complicaciones cardiovasculares pueden ser resultado del deterioro del nervio vago, el cual presenta lesiones y axones desmielinizados (70). El contenido de NGF en el nervio vago de ratas diabéticas aumenta de 8 a 16 semanas de diabetes, pero disminuye su transporte

retrógrado (64). Se encontró también un aumento del contenido de NGF en el ganglio mesentérico superior prevertebral que inerva el intestino delgado (70).

8. El factor de crecimiento neuronal

El factor de crecimiento neuronal (NGF) es un factor neurotrófico esencial para la sobrevivencia, desarrollo y mantenimiento de neuronas periféricas simpáticas y sensoriales embrionarias y de neuronas colinérgicas en el sistema nervioso central y más tarde por su papel trófico, en la prevención de la muerte celular por apoptosis en poblaciones específicas de neuronas en el sistema nervioso periférico (71, 72, 73).

El NGF pertenece a la familia de las neurotrofinas entre los que también se incluyen el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), la neurotrofina 3 (NT-3) y la neurotrofina 4/5 (NT 4/5).

8.1. Estructura del NGF

El gen del NGF codifica para una proteína de 307 aminoácidos, la cual es hidrolizada postraduccionalmente y da origen a una proteína de 118 aminoácidos. Esta proteína, denominada subunidad β del NGF (figura 9) forma un dímero con otra idéntica para conformar la forma activa, que es la responsable de la actividad biológica (74).

El NGF purificado de la glándula submaxilar de ratón es una proteína de alto peso molecular con un coeficiente de sedimentación de 7.1S, por lo que se le denomina NGF7S. En el complejo proteico NGF7S, la subunidad β está asociada con otras dos subunidades, α y γ formando un hexámero (2α , 2β y 2γ) (75). Las subunidades α y γ pertenecen a la familia de proteasas de residuos de serina del tipo de calicreína; sin embargo, sólo la subunidad γ tiene actividad catalítica (76).

Al parecer la subunidad γ realiza un corte proteolítico en las subunidades β para madurarlas postraduccionalmente; sin embargo, en otras especies animales y también en otros órganos el NGF no forma complejos 7S. Esto sugiere que la actividad de la subunidad γ no es indispensable para la función del NGF, o bien, que la formación de complejos es característica de la glándula submaxilar del ratón para mantener la estabilidad y proteger al NGF de la saliva del ratón (77).

La actividad biológica de la subunidad β del NGF se debe a la presencia de secuencias de aminoácidos que le permiten unirse a sus receptores de membrana. Estas secuencias han sido clasificadas en dos grupos: el primero es de unión al receptor común de neurotrofinas y está formado por aminoácidos cargados positivamente (79).

El segundo grupo comprende aminoácidos que promueven la unión al receptor específico a NGF y permiten que se acerquen dos moléculas de receptor a NGF

para formar una unidad simétrica a ambos lados de la molécula de NGF. Esta unidad induce la activación del sistema de transducción de señales del receptor a NGF (79).

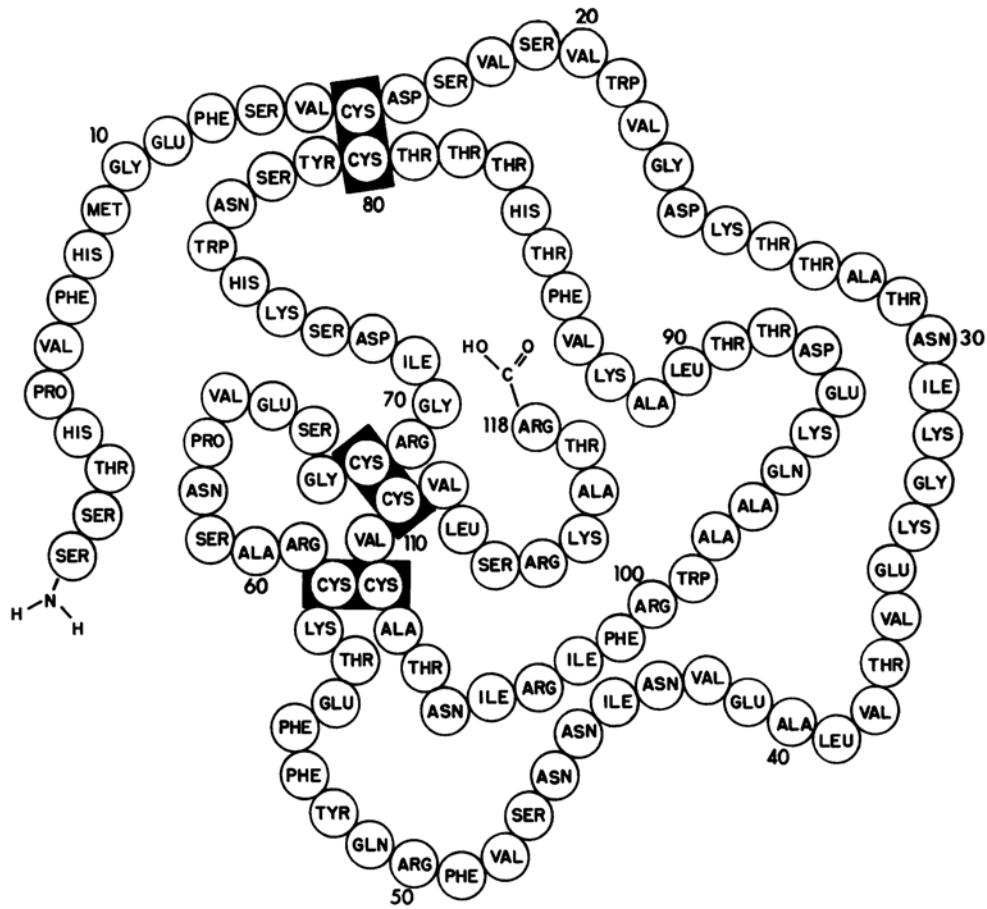


Figura 9. Secuencia de aminoácidos de la subunidad β del factor de crecimiento neuronal (NGF). Tomada de Angeletti y Bradshaw, 1971 (78).

8.2. Receptores a NGF

Los efectos biológicos del NGF son mediados por dos tipos de receptores de membrana: el receptor p75 y el receptor TrkA con actividad de cinasa de residuos de tirosina (80, 81, 82).

8.2.1. Receptor p75

El receptor p75, clásicamente conocido como el receptor de baja afinidad a NGF, fue el primer miembro de la superfamilia del receptor al factor de necrosis tumoral (TNF), la cual consta de 25 receptores en los que se incluyen TNFR1, TNFR2, Fas, RANK y CD40 (83).

El receptor p75, así como todos los receptores de esta superfamilia contienen en su porción extracelular cuatro módulos repetidos de seis cisteínas (84). Cada uno de estos módulos presentan tres puentes disulfuro intracatenarios, los cuales crean la estructura elongada del receptor (figura 10). El receptor p75 es capaz de unir a todas las neurotrofinas con la misma afinidad, sin embargo, no posee actividad enzimática intrínseca (83).

La porción intracelular del receptor p75 está formada por el dominio yuxtamembranal y el carboxilo terminal, los cuales son importantes en la señalización a través de su interacción con proteínas adaptadoras citoplásmicas. Sin embargo, el dominio intracelular más característico del receptor p75 es el

dominio de muerte, el cual interactúa con proteínas adaptadoras que llevan a la activación de caspasas y se le ha asociado con funciones pro-apoptóticas (83).

8.2.2. Receptor TrkA

La porción extracelular del receptor TrkA está formada por tres dominios ricos en residuos de leucina, los cuales están flanqueados por dos dominios de residuos en cisteína. Posteriormente se encuentran dos dominios tipo inmunoglobulina que son seguidos del dominio transmembranal y la porción intracelular. Esta última contiene el dominio cinasa de residuos de tirosina y segmentos con varios residuos de tirosina similares a los presentes en otros receptores cinasa de residuos de tirosina (figura 10) (85).

La fosforilación de los residuos de tirosina citoplásmicos en el receptor TrkA regula la actividad de la cinasa de residuos de tirosina y provee el reclutamiento dependiente de fosforilación de sitios para moléculas adaptadoras y enzimas que median la iniciación de la cascada de señalización intracelular (85).

8.2.3. Interacciones entre los receptores p75 y TrkA

p75 y TrkA unen independientemente NGF con baja afinidad, con una constante de disociación (K_d) de 10^{-9} M. Sin embargo, cuando su expresión es simultánea se producen sitios de unión a NGF de alta afinidad con una K_d de 10^{-11} M (86). El mecanismo molecular preciso por el cual el receptor p75 aumenta la unión de NGF a TrkA, no es conocido, pero existen varias hipótesis.

Se ha propuesto al receptor p75 como un co-receptor que captura al NGF por su capacidad de asociación rápida con lo que aumenta la concentración de NGF en la vecindad de TrkA o que lo presenta a TrkA en una conformación favorable para la unión. Lo anterior implica que no existe interacción directa entre los dos receptores. Otro modelo sugiere que el receptor p75 tiene un efecto alostérico sobre el receptor TrkA, modificando su conformación tridimensional y convirtiéndolo en un sitio de alta afinidad a NGF. Este modelo sugiere la interacción de los dos tipos de receptores (83).

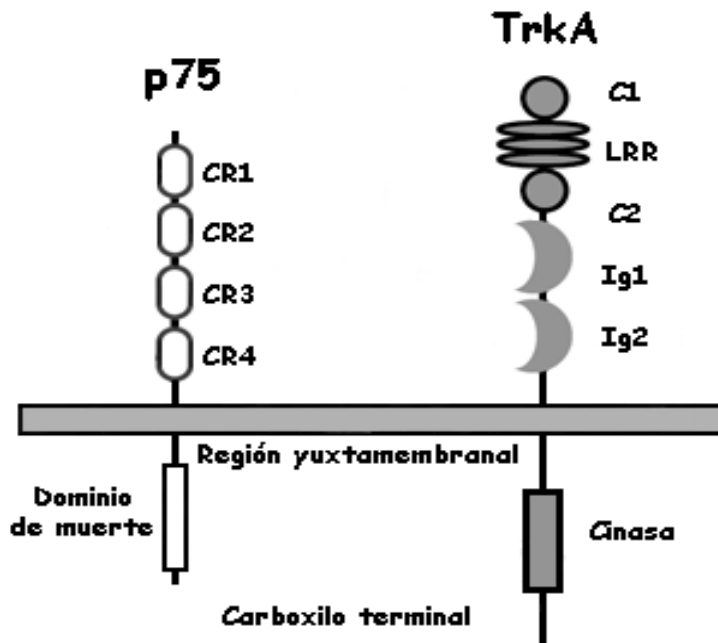


Figura 10. Receptores a NGF. El receptor TrkA posee dominios extracelulares de grupos de cisteína (C1 y C2), repeticiones ricas en leucina (LRR) y dominios tipo inmunoglobulina (Ig1 e Ig2). Así mismo, contiene un dominio intracelular con actividad de cinasa de residuos de tirosina. El receptor p75 contiene 4 dominios extracelulares repetidos de cisteína (CR1-4) y un dominio intracelular de muerte. Modificada de Huang y Reichardt, 2003 (85).

8.3. Cascadas de señalización a través del receptor p75

La unión de NGF y de las otras neurotrofinas al receptor p75 promueve la sobrevivencia de algunas células y apoptosis de otras. Las vías de pro-sobrevivencia activadas por el receptor p75 incluyen NF κ B y Akt. Las vías pro-apoptóticas incluyen la cascada de señalización de la cinasa Jun, el recambio de esfingolípidos y la asociación con diversos adaptadores como NRAGE y NADE, los cuales activan directamente el arresto del ciclo celular y apoptosis (figura 11) (85).

El NGF promueve la asociación de la proteína adaptadora TRAF6 con la región yuxtamembranal del receptor p75 y la cinasa asociada al receptor de interleucina 1 (IRAK) se une para formar un complejo al que se le une la proteína cinasa atípica C ι (PKC α ι) junto con la p62. La cinasa I κ B β (IKK β) es un sustrato de la PKC α ι , lo que lleva a la fosforilación y degradación de I κ B que a su vez induce la activación de NF κ B (figura 11) (83, 85).

En la señalización apoptótica, al unirse NGF al receptor p75 se activa la esfingomielinasa, que hidroliza esfingomielina, generando la acumulación de ceramida, un segundo mensajero lipídico. La ceramida promueve la apoptosis y respuestas mitogénicas en diferentes tipos celulares a través de vías de señalización que incluyen Erk, PI3K y PKCa. La ceramida se une a Raf formando un complejo inactivo Ras-Raf con lo que se inhibe la vía de señalización de Erk (figura 11) (83, 85).

8.4. Cascada de señalización a través del receptor TrkA

El receptor TrkA pertenece a la familia de cinasas de residuos de tirosina y a diferencia de p75 es específico para NGF. La unión de NGF al receptor TrkA induce el acercamiento de dos receptores, es decir, la dimerización de TrkA, lo cual promueve la transfosforilación de los residuos de tirosina de las subunidades citoplásmicas (87).

Una vez activado TrkA inicia la fosforilación de los dominios de unión a los residuos de tirosinas fosforiladas, llamados SH2, por su homología con un dominio similar en el oncogen *src* (88). Existen al menos tres proteínas con dominios SH2 que son fosforiladas por TrkA activado: la proteína adaptadora Shc, la fosfolipasa C- γ 1 (PLC- γ 1) y la cinasa de 3-fosfatidil inositol (PI3K) (figura 12) (89).

8.4.1. Señalización a través Ras

Una vez fosforilado y unido a TrkA, Shc atrae al complejo Grb2-Sos. El reclutamiento de Sos a la membrana, lo acerca a Ras donde actúa como intercambiador de GTP y activa a Ras, la cual une y activa a Raf. Raf es una cinasa de residuos serina-treonina que fosforila MEK, la cual fosforila y activa a Erk1/2. Erk1/2 fosforilado transloca al núcleo, donde fosforila al factor de transcripción Elk-1 o fosforila la cinasa Rsk (figura 12) (83, 89).

La fosforilación de Elk-1, le permite interactuar con un factor de transcripción accesorio SRF, el cual se une al elemento de respuesta a suero (SRE), dentro de la región promotora *c-fos* y contribuye a la iniciación de la transcripción. Por su parte, Rsk fosforilada se transloca al núcleo y fosforila a CREB, el cual se une a la proteína coactivadora transcripcional CPB que a su vez se une al complejo SRF-Elk. Todo el complejo de factores transcripcionales formado lleva a la transcripción de *c-fos* (83, 89).

8.4.2. Señalización a través PI3K

La PI3K cataliza la producción de 3-fosfoinosítidos, incluyendo el PIP₃, el cual se une y activa a la PDK1. PDK1 fosforila a la Akt, la cual se une y fosforila a Bad. La familia de proteínas Bcl está compuesta de dos grupos: uno que promueve la sobrevivencia celular e incluye a Bcl-2 y Bcl-X_L y la otra que promueve la muerte celular e incluye Bad y Bax (83, 89).

Bad fosforilado se asocia con la proteína 14-3-3, la cual lo secuestra y previene de su unión a Bcl-2 y Bcl-X_L, por lo que induce la sobrevivencia celular (figura 11). Las señales de Bad no fosforilado promueven la muerte celular por la formación de heterodímeros con Bcl-X_L y la generación de homodímeros de Bax. Estos homodímeros se insertan en la membrana mitocondrial y provocan la producción de especies reactivas de oxígeno citotóxicas (89).

8.4.3. Señalización a través PLC- γ y PKC

El receptor TrkA fosforilado activa la PLC γ , la cual hidroliza 4,5-bifosfato de fosfatidilinositol (PIP₂) generando inositol 1,4,5-trifosfato de inositol (IP3) y diacilglicerol (DAG). El IP3 interactúa con su receptor en el retículo endoplásmico para inducir la liberación de Ca²⁺ intracelular, lo cual activa a las proteínas dependientes de Ca²⁺. Por su parte, el DAG activa diferentes isoformas de la proteína cinasa C de residuos serina-treonina dependiente de calcio (PKC). El DAG coopera con fosfatidilserina y ácidos grasos cis-insaturados para activar las isoformas δ y ϵ de PKC nuevas. PKC δ es importante en la activación de la señalización de Erk (figura 12) (89).

La señalización generada por el receptor TrkA modula la señalización inducida por el receptor p75. En ausencia de la activación del receptor TrkA, el receptor p75 induce apoptosis. Se han identificado proteínas adaptadoras que forman complejos multiproteicos con ambos receptores a través de los cuales p75 y TrkA interactúan recíprocamente. Entre ellos están los adaptadores desplegados en membrana ricos en repeticiones de ankirina (ARMS), la caveolina y el complejo proteico que conduce a la activación de NF κ B (figura 11) (85).

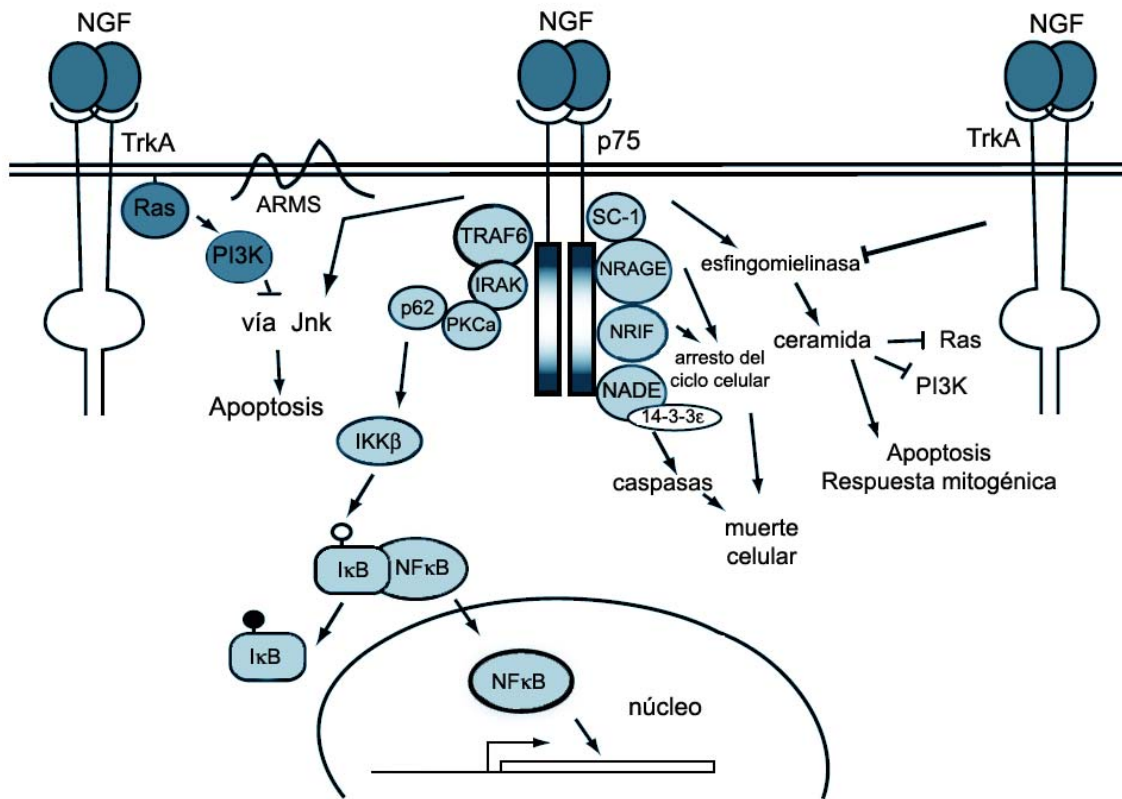


Figura 11. Cascada de señalización de NGF a través del receptor p75. Modificada de Huang y Reichardt, 2003 (85).

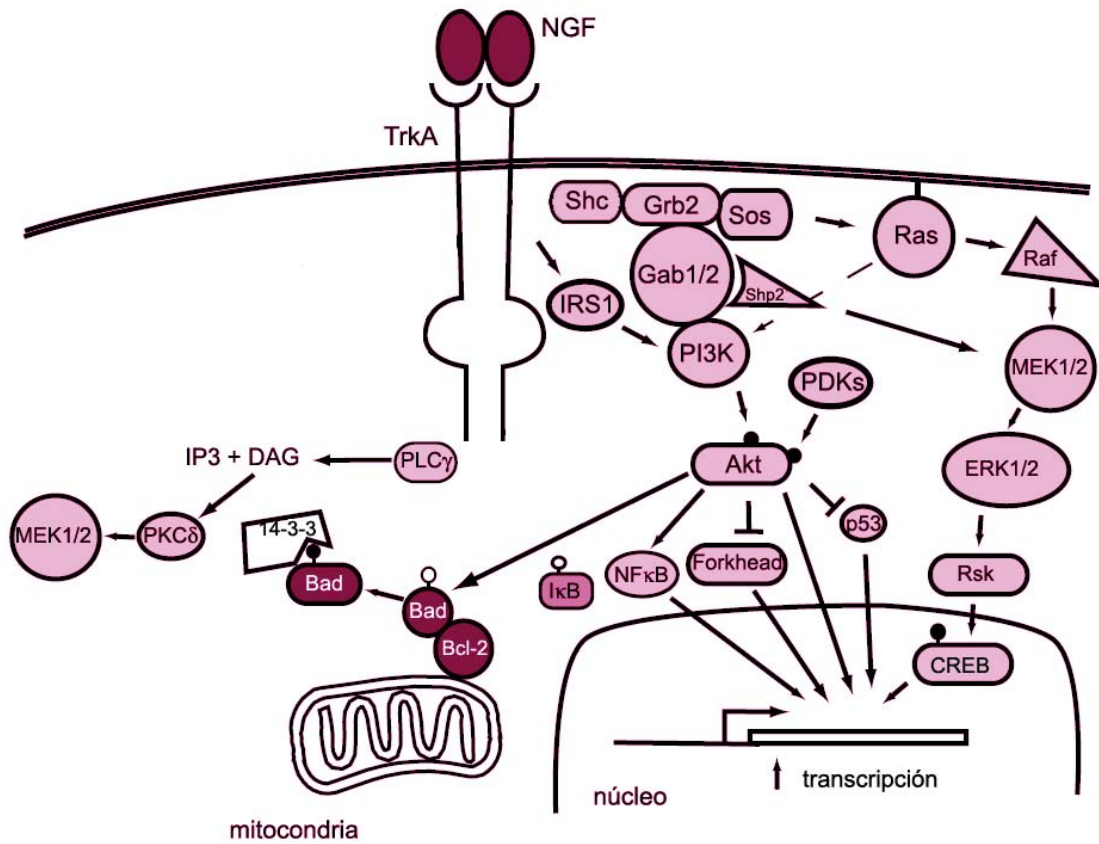


Figura 12. Cascada de señalización de NGF a través del receptor TrkA. Modificada de Huang y Reichardt, 2003 (85).

8.5. Efectos del NGF

En la década pasada se encontraron evidencias que sugieren fuertemente que las acciones biológicas del NGF se extienden más allá de las que originalmente se le atribuían. En el sistema nervioso central parece tener actividades específicas en la plasticidad sináptica, en el aprendizaje y en la memoria (90-95).

Ahora se sabe que el NGF también tiene efectos en una variedad de células de los sistemas inmune y endocrino (96, 97). El NGF modula el sistema inmune, afectando neutrófilos, monocitos, basófilos y linfocitos (98-104). Adicionalmente, el NGF regula el eje hipotálamo-pituitaria-adrenocortical durante el estrés (105).

En las células β pancreáticas de rata el NGF induce el crecimiento de procesos citoplásmicos parecidos a neuritas después de 10 días en cultivo (106). Así mismo, el NGF también potencia la secreción de insulina a corto (107) y largo plazo estimulada por distintas concentraciones de glucosa de células β aisladas (108).

Experimentos de nuestro laboratorio demostraron que el tratamiento a largo plazo de las células β con NGF aumenta la densidad de la corriente de Na^+ (109), y de Ca^{2+} tipo L (110) y después de periodos cortos de tratamiento aumenta la corriente de Ca^{2+} tipo L (107). Posteriormente, en el laboratorio se demostró que las células β pancreáticas de ratas adultas expresan el RNA mensajero y la proteína de NGF, así mismo se comprobó que el NGF secretado

por estas células es biológicamente activo (111). Los datos anteriores sugieren que el NGF podría tener un efecto autocrino y/o paracrino importante en la fisiología de la célula β .

9. Modelo experimental de diabetes

Existen diferentes modelos experimentales de diabetes (112). El modelo más utilizado se produce a través del efecto citotóxico de la estreptozotocina (113, 114).

9.1. Estreptozotocina

La estreptozotocina (STZ, 2-desoxi-2-(3-(metil-3-nitrosoureido)-D-glucopiranososa) (figura 13) es sintetizada por *Streptomyces achromogenes*) y es usada ampliamente para inducir diabetes experimental en animales. La STZ entra a la célula β a través del transportador Glut2 (115).

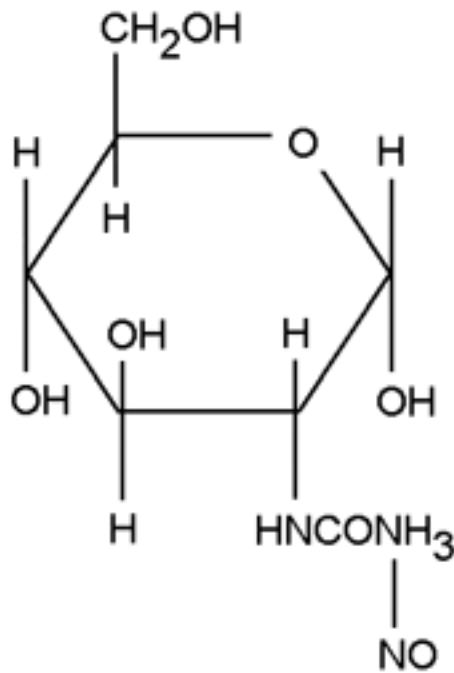


Figura 13. Estructura química de la estreptozotocina. Bolzan y Bianchi, 2002 (116).

La STZ induce cambios en el DNA de la célula β pancreática como su fragmentación (117, 118) y alquilación (119, 120). La actividad alquilante de la STZ está relacionada con su molécula nitrosoarea, y ocurre especialmente en la posición del O^6 de la guanina (121).

Cuando la STZ es metabolizada dentro de la célula se libera óxido nítrico (NO), el cual se ha propuesto como una molécula que contribuye al daño del DNA (121, 122). Las células β expuestas a STZ incrementan la actividad de la guanilato ciclasa inducida por NO, lo cual aumenta la formación de GMP cíclico (122).

Por otro lado, al disminuir la concentración de NO en células del islote pancreático por inhibición de la forma inducible de la sintasa de NO, disminuye parcialmente el rompimiento del DNA producido por la STZ (123). Sin embargo, el NO no es la única molécula responsable del efecto citotóxico de STZ. La STZ genera especies reactivas de oxígeno, las cuales contribuyen a la fragmentación del DNA, como son la formación de aniones superóxido en mitocondria e incremento en la actividad de la oxidasa de xantina (124).

La STZ inhibe el ciclo de Krebs (122) y disminuye el consumo de oxígeno por la mitocondria (125), y aumenta la desfosforilación de ATP con lo que se incrementa el suministro de sustrato para la oxidasa de xantina (las células β poseen una gran actividad de esta enzima) y aumenta la producción de ácido úrico, que es el producto final de la degradación de ATP. Otros productos de esta reacción son el anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo (126).

El DNA dañado por la STZ induce la activación de la poli ADP-ribosilación (127), este proceso lleva a la depleción de NAD^+ celular y en consecuencia se produce una reducción del contenido de ATP (128) lo que a su vez conduce a la disminución de la síntesis y secreción de insulina (125).

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El NGF es importante en la patogénesis de la neuropatía diabética ya que su expresión en los nervios periféricos, así como su concentración en sangre están disminuidos en pacientes y animales diabéticos. Sin embargo, el contenido de NGF pancreático durante el desarrollo de la diabetes no ha sido determinado, por lo tanto es importante analizar la expresión y la secreción del NGF de las células β pancreáticas después del daño con STZ *in vivo* e *in vitro*.

V. HIPÓTESIS

Dado que el contenido de NGF endógeno disminuye en la glándula submaxilar, en el nervio sciático y en el ganglio simpático, pero aumenta en el nervio vago, en el ganglio mesentérico superior prevertebral y en tejidos blanco de NGF en ratas diabéticas inducidas con STZ, entonces la producción de NGF pancreático se alterará en las células β en respuesta al daño con STZ *in vivo* e *in vitro*.

VI. OBJETIVOS

1. Objetivo general

Analizar la producción de NGF en la respuesta al daño de las células β pancreáticas con STZ.

2. Objetivos particulares

2.1 Analizar la secreción de NGF y de insulina por las células β aisladas en respuesta al daño *in vivo* con estreptozotocina a corto plazo.

2.2 Analizar los niveles de expresión de RNAm de NGF y de insulina en islotes pancreáticos en respuesta al daño *in vivo* con estreptozotocina a corto plazo.

2.3 Analizar la secreción de NGF y de insulina por las células β aisladas en respuesta al daño *in vitro* con estreptozotocina a corto plazo.

2.4 Analizar la morfología y morfometría de páncreas es respuesta al daño *in vivo* con estreptozotocina a largo plazo.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

Los reactivos se obtuvieron de las siguientes fuentes: STZ, albúmina sérica bovina (BSA, fracción V), Ficoll 400, tripsina, tritón X-100, citrato de sodio, azul tripano, poli-L-lisina, trizma y antisuero de ratón contra glucagon de Sigma-Aldrich Aldrich (Saint Louis, MO, USA); colagenasa tipo IV de Worthington (Freehold, NJ); suero bovino fetal de Equitech-bio (Ingram, TX, USA); RPMI-1640, penicilina G, estreptomicina, fungizona, solución salina balanceada de Hank's (HBSS), gentamicina, Spinner y reactivo TRIzol de GIBCO (Grand Island, NY, USA); inhibidores de proteasas Complete Mini y kit para detección de apoptosis TUNEL de Roche Molecular Biochemical (Mannheim, Alemania); kit para el análisis inmunoenzimático (ELISA) de insulina de rata ultra sensible de ALPCO Diagnostics (Windham, NH, USA); kit para ELISA de NGF de Promega (Madison, WI, USA), placas de ELISA de Costar; kit para PCR de Applied Biosystems (Foster City, CA, USA); parafina paraplast de Sherwood Company (Saint Louis, MO, USA); glucómetro de Precision QID, MediSense, Inc. Abbott Laboratories Company (México, D. F.); lector de ELISA de Bio-Rad, Laboratories (Richmond, CA, USA); antisuero de cobayo contra insulina de Incstar (Stillwater, MI, USA); antisuero contra IgG de cobayo marcado con FITC y antisuero contra IgG de ratón marcado con CY5 de Jackson Immuno Research Laboratories Inc. (Baltimore, MD, USA); medio de montaje para fluorescencia de DAKO y anestésico (pentobarbital sódico) de Smith Kline (México, D. F.).

2. Métodos

2.1. Administración de estreptozotocina a ratas

Las ratas Wistar machos (250-300 g) se obtuvieron del bioterio del Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. Fueron mantenidas en un ciclo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad y tuvieron acceso libre a agua y alimento durante el experimento; excepto durante el ayuno. Las ratas se trataron con una dosis única intraperitoneal de 75 mg/kg de peso de estreptozotocina (STZ) recién disuelta en una solución amortiguadora de citratos (0.1 M, pH 4.5), a las ratas control se les administró un volumen equivalente de la solución amortiguadora de citratos.

2.2. Extracción de sangre, obtención de suero y medición de glucosa sanguínea

Después de 4 h de la administración de STZ, las ratas se mantuvieron en ayuno durante 4 h, se anestesiaron con éter y se les extrajo 1-2 ml de sangre por punción con un tubo capilar del plexo intraorbital retrobulbar. Las muestras de sangre se recolectaron en tubos de polipropileno y se centrifugaron a 10 000 x g a 4 °C durante 10 min.

Los sueros recolectados se mantuvieron a -20 °C hasta su análisis para determinar las concentraciones de insulina. La extracción de sangre se realizó 1 día antes y 4 h después de la inyección de STZ y durante las siguientes 4

semanas, una vez por semana y después de 4 h de ayuno. La concentración de glucosa sanguínea de las ratas se midió con un glucómetro estándar.

2.3. Obtención de islotes pancreáticos y de células β aisladas

Los islotes y las células β se obtuvieron de páncreas de a) ratas control y administradas con STZ después de 4 h y b) ratas sin tratamiento. Los páncreas se infiltraron con solución salina balanceada de Hanks (HBSS) suplementada con 0.1 % de albúmina sérica bovina (BSA) y 0.01 mg/ml de gentamicina. Después, los páncreas se cortaron y se digirieron con 0.5 mg/ml colagenasa tipo IV en un baño de agua a 37 °C en agitación durante 15 min.

Posteriormente se sometió el tejido a un gradiente de Ficoll 400 y se centrifugó a 2 000 rpm durante 10 min. Los islotes se recolectaron de la interfase superior del gradiente, se lavaron y centrifugaron 3 veces con HBSS a 890 rpm durante 5 min. La mitad de ellos se procesaron para extracción de RNA total.

La otra mitad de los islotes fueron incubados en una solución de Spinner sin Ca^{2+} con 15.6 mM de glucosa, 0.5 % de BSA y 0.01 % de tripsina en un baño de agua a 37 °C con agitación durante 10 min. Las células insulares fueron separadas mecánicamente con una pipeta pasteur, lavadas y centrifugadas 3 veces a 980 rpm durante 10 min con RPMI-1640 suplementado con 10 % suero bovino fetal, 200 unidades/ml de penicilina G, 200 mg/ml estreptomycin y 0.05 mg/ml fungizona.

Grupos de 50 000 células β fueron sembrados en cubreobjetos de vidrio tratados previamente con una solución de 0.5 mg/ml poli-L-lisina en una solución amortiguadora de Trizma (0.15 M, pH 8.2) y cultivadas durante 16 h en el mismo medio de cultivo RPMI-1640 para dejarlas recuperar de la disociación enzimática.

El aislamiento de los islotes pancreáticos para medir la expresión de RNAm y de las células β para la secreción de insulina y NGF fueron realizados después de 4 h de la inyección de STZ porque después de tiempos más prolongados no fue posible obtener suficientes islotes para hacer las mediciones requeridas.

Las células β aisladas de ratas sin tratamiento fueron cultivadas durante 1, 2 o 4 h con 1 mM de STZ en RPMI-1640 suplementado con 1 % suero bovino fetal, 200 unidades/ml de penicilina G, 200 mg/ml estreptomina y 0.05 mg/ml fungizona. En experimentos preliminares cultivamos a las células β con 1 y 5 mM de STZ y encontramos que ambas concentraciones inhiben de igual manera la secreción de insulina, por lo tanto utilizamos la concentración menor para los siguientes experimentos.

2.4. Ensayo de secreción de insulina y de NGF

Antes de realizar el ensayo de secreción, las células β fueron preincubadas durante 30 min a 37 °C en HBSS con 5.6 mM de glucosa suplementada con 0.1 % BSA. Esta solución fue remplazada con HBSS que contenía 5.6 (basal) o 15.6

mM (estimuladora) de glucosa y las células β fueron incubadas durante 3 h a 37 °C. Al final del tiempo de incubación, los sobrenadantes fueron recolectados y suplementados con una mezcla de inhibidores de proteasas Complete Mini y se mantuvieron a -20 °C hasta su análisis para determinar las concentraciones de insulina y de NGF.

2.5. Mediciones de insulina y de NGF

La concentración de insulina se determinó por medio del análisis inmunoenzimático (ELISA) de insulina de rata ultra sensible. Se colocaron los calibradores de la curva estándar, los sueros de las ratas y los sobrenadantes de células β en la placa de 96 pozos que tiene unido a cada pozo un anticuerpo monoclonal contra insulina.

Posteriormente, las muestras se incubaron con un anticuerpo monoclonal de ratón contra insulina conjugado con peroxidasa durante 2 h en agitación a temperatura ambiente (18-25 °C). Al término de la incubación, los pozos se lavaron 6 veces con una solución de lavado y se incubaron con el sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) durante 30 min. La reacción enzimática fue detenida con una solución de ácido sulfúrico (0.5 M). Las absorbancias fueron medidas a 450 nm usando un lector de ELISA. Todas las determinaciones fueron hechas por duplicado.

La concentración de NGF secretado por las células β aisladas fue determinada usando un ELISA de NGF. Los pozos de una placa de ELISA se incubaron con un anticuerpo de cabra contra NGF (dilución 1:1000) diluido en una solución amortiguadora de carbonatos (0.05 M, pH 9.7) durante 14-18 h a 4 °C. Al término de la incubación, los pozos se lavaron con una solución de lavado (TBST) y se incubaron con una solución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente.

Posteriormente, se agregaron a los pozos las soluciones de la curva estándar y las muestras de los sobrenadantes las cuales se incubaron durante 6 h a temperatura ambiente en agitación constante. Después de la incubación, los pozos se lavaron 5 veces con TBST y se incubaron con un segundo anticuerpo contra NGF (dilución 1:4000) durante 16-20 h a 4 °C sin agitación. Posteriormente, se lavaron los pozos 5 veces con TBST y se incubaron con un anticuerpo contra IgG de rata conjugado con peroxidasa (dilución 1:2000) durante 2.5 h a temperatura ambiente en agitación.

Al término de la incubación, los pozos se lavaron 5 veces con TBST y se incubaron con el sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) durante 10 min en agitación. La reacción enzimática fue detenida con ácido clorhídrico (1 N). Las absorbancias de las reacciones colorimétricas fueron medidas en un lector de ELISA y convertidas al nivel de proteína de NGF normalizando con la curva estándar. Cada muestra fue analizada por duplicado.

2.6. Obtención de RNA total de islotes pancreáticos y RT-PCR para la detección de insulina y de NGF

El RNA total de islotes pancreáticos de ratas control y después de 4 h de la administración de STZ se extrajo usando TRIzol. Los islotes se lisaron con 500 μ l de TRIzol. Posteriormente, se agregó cloroformo y se centrifugó a 12 000 x g durante 15 min a 4 °C, se extrajo la fase acuosa superior, la cual se mezcló con isopropanol y se centrifugó a 12 000 x g durante 15 min a 4 °C para precipitar el RNA. La pastilla de RNA se lavó con etanol al 75 % centrifugando a 7 500 x g durante 8 min a 4 °C. Por último, la pastilla se resuspendió en agua tratada con dietilpirocarbonato y se midió por espectrofotometría la concentración de RNA total extraído a 260 nm.

Las RT-PCR fueron hechas con 400 ng de RNA total para la detección de RNAm de *insulina*, *NGF* y *β actina* siguiendo el protocolo del fabricante. Las secuencias de oligonucleótidos utilizadas para el sentido 5': 5'-AAGAGCCATCAGCAAGC-3' y para el antisentido 3': 5'-GAGCAGATGCTGGTGCAGC-3' para la detección del RNAm de *insulina*. Las secuencias para el sentido 5': 5'-GGCATGCTGGACCCAAGCTC-3' y para el antisentido 3': 5'-GCGCTTGCTCCGGTGAGTCC-3' para la detección del RNAm de *NGF* y la secuencia para el sentido 5'-GGGTCAGAAGGATTCCTATG-3' y la secuencia antisentido 5'-GGTCTCAAACATGATCTGGG-3' para la amplificación del RNAm de *β actina*. Se amplificaron durante 30 ciclos a una temperatura de alineado a 56 °C para *insulina* y *β actina* y a 59 °C para *NGF*. Los productos de reacción

fueron visualizados por tinción con bromuro de etidio en un gel de agarosa al 2 % y el análisis densitométrico se realizó con Scion Image Beta 4.02.

2.7. Medición de viabilidad celular

Viabilidad fue medida por medio de la tinción de exclusión con azul tripano. Después del ensayo de secreción, las células β incubadas con STZ fueron incubadas con azul tripano al 0.04 % en una solución isotónica de Krebs-Ringer durante 10 min. Se contaron las células teñidas (células muertas) y no teñidas (células vivas) para calcular el porcentaje de sobrevivencia, se contaron por lo menos 300 células por condición experimental.

2.8. Medición de apoptosis

Las células apoptóticas fueron detectadas usando el método de TUNEL. Después del ensayo de secreción, las células β control y incubadas con STZ fueron fijadas durante 30 min en una solución de paraformaldehído al 4 % en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) (0.1 M, pH 7.4). Después las células se permeabilizaron con tritón X-100 (0.1 %) en una solución de citrato de sodio (0.1 %, pH 7.4) durante 2 min en hielo. Se lavaron 3 veces con PBS, y se incubaron durante 1 h con la mezcla de reacción de TUNEL a 37 °C en una cámara húmeda protegida de la luz.

Las células positivas fueron contadas en un microscopio invertido Nikon Axiophot conectado a una lámpara de fluorescencia usando una longitud de

onda de excitación de 490 nm y de detección de 520 nm. Se contaron por lo menos 300 células por condición experimental y los resultados fueron expresados como el porcentaje de células apoptóticas.

2.9. Histología

Los páncreas se extrajeron de las ratas anestesiadas con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (40 mg/Kg) y se fijaron con paraformaldehído al 4 %, posteriormente se deshidrataron con alcoholes en el siguiente orden: etanol al 50, 70, 80, 96 %, absoluto y xilol. Después los páncreas se embebieron en parafina paraplast para formar bloques y por último se seccionaron en un microtomo en rebanadas de 5 μ m, las cuales se montaron en laminillas de vidrio tratadas previamente con una solución de 0.5 mg/ml poli-L-lisina.

2.10. Inmunofluorescencia

Antes de iniciar la inmunohistoquímica los cortes se desparafinaron a 60 °C durante 20 min y se rehidrataron. Después se incubaron con una solución de permeabilización y bloqueo con tritón al 1 % y suero normal de cabra al 3 % en solución amortiguadora de Tris (TBS 0.1 M, pH 7.4) durante 1 h.

Posteriormente los cortes de páncreas se incubaron durante una noche a 4 °C con antisuero de cobayo contra insulina (dilución 1:4000). Al día siguiente, se lavaron 3 veces con TBS y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con

el antisuero contra cobayo marcado con FITC para la detección de insulina (dilución 1:100).

Al término de la incubación, los cortes se lavaron 3 veces con TBS y se incubaron durante 3 h a temperatura ambiente con el antisuero de ratón contra glucagon (dilución 1:6000). Se lavaron 3 veces con TBS y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con el antisuero contra ratón marcado con CY5 para la detección de glucagon (dilución 1:50).

Después los cortes fueron contrateñidos con 10 µg/ml de yoduro de propidio para facilitar la identificación nuclear. Los controles negativos fueron hechos incubando los cortes de páncreas con los antisueros preabsorbidos previamente con un exceso de cada hormona. Finalmente, los cortes fueron mantenidos en medio de montaje para fluorescencia.

Los islotes pancreáticos fueron identificados por inmunofluorescencia a insulina y glucagon, utilizando un sistema de escaneo de imágenes Bio-Rad MRC 1024 equipado con un láser criptón/argón (Bio-Rad) acoplado a un microscopio invertido Nikon TMD 300 con objetivo 40X de inmersión en aceite (Nikon). Las imágenes fueron adquiridas por dos canales fotomultiplicadores separados, el canal rojo para CY5 (excitación 650 nm, emisión 670 nm) y el canal verde para FITC (excitación 494 nm, emisión 520 nm) usando LaserSharp 3.2 (Bio-Rad). La potencia de láser utilizada fue de 3 %, la apertura del iris de 2.5 a 3 y la ganancia

de 1200-1500. Las imágenes adquiridas se procesaron con el programa Confocal Assistant 4.02.

2.11. Análisis morfométrico

El análisis morfométrico de páncreas fue hecho usando un sistema de análisis de imagen asistido por computadora Laser Pix 4.0.0.13, 1993 (Bio-Rad) para calcular el área de islote, área de células teñidas para insulina y glucagon. El porcentaje del área β en el páncreas fue calculado dividiendo el área de todas las células positivas a insulina en un corte por el área total del corte y multiplicando esta relación por 100. Sólo se midieron los islotes que contenían 15 o más células endocrinas.

2.12. Análisis estadístico

Datos son presentados como promedio \pm error estándar. Las comparaciones múltiples entre los diferentes grupos fueron hechas por ANOVA de una vía y la prueba de Fisher PLSD para calcular la diferencia significativa entre los grupos (Statview 4.57.0.0).

VIII. RESULTADOS

1. Efectos del daño *in vivo* inducido por STZ en ratas

1.1. La STZ aumentó la concentración de glucosa sanguínea

La concentración promedio basal de la glucosa sanguínea después de 4 h de ayuno fue de 137 ± 2 mg/dl. Después de 8 h de ayuno y 4 h de la administración del vehículo, la concentración promedio de glucosa sanguínea de las ratas control no cambió y fue de 148 ± 6 mg/dl ($n = 4$). Con estos resultados constatamos que la concentración de glucosa sanguínea no varía entre 4 y 8 h de ayuno. En las ratas control esta concentración se mantuvo durante las siguientes 4 semanas del experimento.

Sin embargo, después de 4 h de la administración de las ratas con 75 mg/kg de STZ, la concentración de glucosa sanguínea en ayuno aumentó a 251 ± 8 mg/dl. Este resultado sugiere que después de un periodo corto, la STZ causa daño severo a las células β , el cual se refleja por la hiperglucemia registrada desde las primeras 4 h de su administración.

Después de 24 h de la administración, la concentración de glucosa sanguínea en ayuno aumentó a 399 ± 20 mg/dl, alcanzando su punto máximo de 449 ± 11 mg/dl después de 4 semanas de la inyección de STZ.

Tabla 1. Concentración de glucosa sanguínea y peso corporal de ratas control y administradas con 75 mg/kg de STZ

	Glucosa sanguínea		Peso corporal	
	(mg/dl)		(g)	
	Control	STZ	Control	STZ
0 h	135 ± 2	138 ± 2	300 ± 11	283 ± 14
4 h	145 ± 4	251 ± 8*†	300 ± 11	283 ± 14
24 h	140 ± 9	399 ± 20*†	300 ± 11	283 ± 14
1 sem	139 ± 5	378 ± 9*†‡	331 ± 12	263 ± 11‡
2 sem	144 ± 5	401 ± 12*†‡	356 ± 11*	244 ± 11†‡
3 sem	138 ± 6	421 ± 13*†‡	380 ± 11*	239 ± 10†‡
4 sem	147 ± 4	449 ± 11*†‡	415 ± 13*	238 ± 13†‡

Los datos son el promedio ± error estándar.

En la concentración de glucosa sanguínea: $P < 0.0001$ * comparado con STZ a 0 h, † comparado con el control en cada tiempo y ‡ comparado con STZ a 4 h.

En el peso corporal: $P < 0.02$ * comparado con control en 0 h, † comparado con STZ a 0 h y ‡ comparado con control en cada semana (sem). n = 16 en cada grupo.

1.2. La STZ disminuyó el peso corporal

El peso corporal de las ratas control aumentó gradualmente ~9 % cada semana y a la cuarta semana pesaron 43 % más de peso inicial. En contraste, las ratas administradas con STZ a pesar de que comieron más que las control no sólo no crecieron de manera normal, sino que además perdieron el ~7 % en la primera semana y el 15 % entre la segunda y cuarta semana comparado con el peso inicial. Además el peso corporal de las ratas inyectadas con STZ fue ~37 % más bajo que el de las control después de la segunda semana de estudio (Tabla 1).

1.3. La STZ disminuyó los niveles de insulina en suero

La concentración de insulina en el suero de las ratas es muy variable. Después de 4 h de la inyección de STZ, los niveles de insulina en suero fueron 70 % más bajos, comparados con su nivel inicial control. La figura 14 muestra que en las siguientes semanas los niveles continuaron disminuyendo. Esta disminución se correlaciona con la hiperglucemia en los mismos tiempos analizados (Tabla 1).

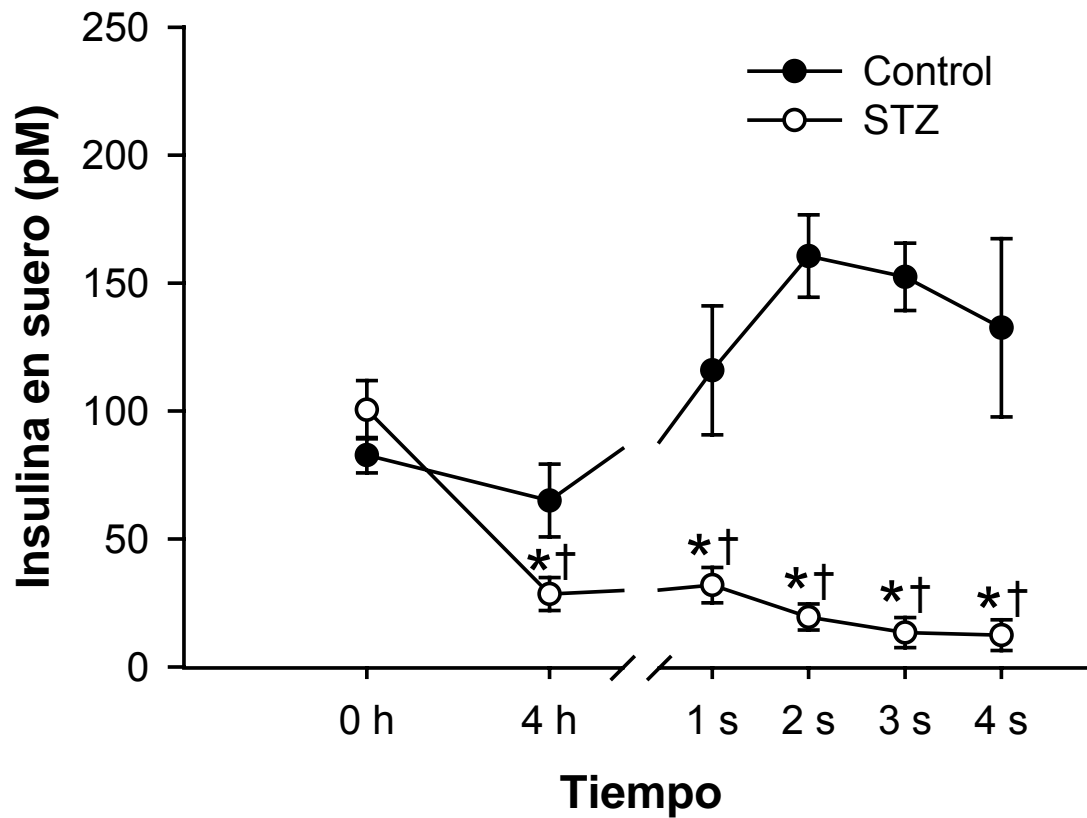


Figura 14. La STZ disminuyó la concentración de insulina en suero. Los datos son el promedio \pm error estándar. $P < 0.05$ * comparado con 0 h (horas) y † comparado con las ratas control en cada semana (s). $n = 8$ en cada grupo.

2. Efecto del daño *in vivo* inducido por STZ sobre las células β e islotes pancreáticos aislados

2.1. La STZ *in vivo* disminuyó la concentración de insulina secretada y aumentó la concentración de NGF secretado por las células β aisladas

Las concentraciones de insulina y de NGF secretados por las células β aisladas de ratas control y administradas con STZ fueron medidas en respuesta a las concentraciones basal (5.6 mM) o estimuladora (15.6 mM) de glucosa durante 3 h. Como se muestra en la figura 15A, la concentración de insulina secretada por las células β control en respuesta a la concentración estimuladora de glucosa fue 3 veces más alta que en la concentración basal de glucosa.

La exposición *in vivo* a STZ indujo una disminución del 85 % en la concentración de insulina secretada por las células β pancreáticas en respuesta a las concentraciones basal y estimuladora de glucosa (figura 15A). De manera interesante observamos que la STZ provocó que las células β secretaran 10 veces más NGF que las controles en ambas concentraciones de glucosa (figura 15B).

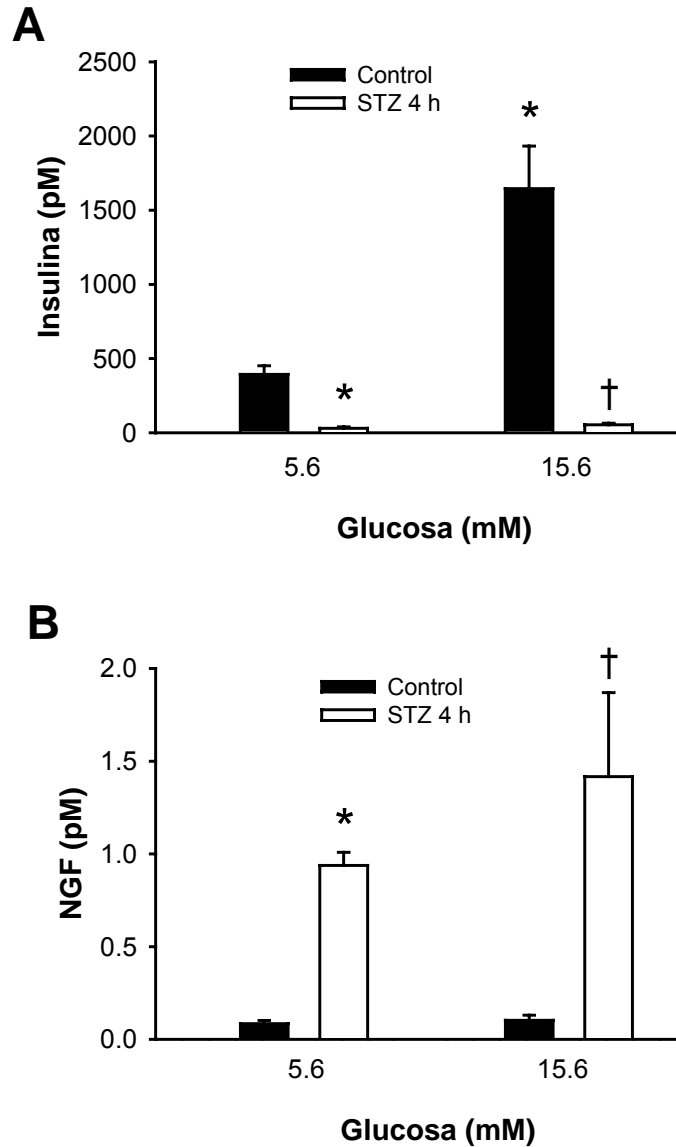


Figura 15. Concentraciones de Insulina y de NGF secretados por células β aisladas.

A: La exposición *in vivo* a STZ disminuyó la concentración de insulina secretada por las células β en respuesta a las concentraciones basal y estimuladora de glucosa.

B: La exposición *in vivo* a STZ aumentó la concentración de NGF secretado por las células β en respuesta a las concentraciones basal y estimuladora de glucosa. Los datos son el promedio \pm error estándar de 3 experimentos, $P < 0.002$ * comparado con los controles en 5.6 mM de glucosa y † comparado con los controles en 15.6 mM de glucosa.

2.2. La STZ *in vivo* disminuyó el nivel de RNAm de *insulina* y aumentó el nivel de RNAm de *NGF*

La expresión del RNAm de *insulina* en islotes de ratas administradas con STZ fue 55 % menor comparado con los controles (figura 16). Estos resultados sugieren que no solamente la STZ disminuye la secreción de insulina sino también la expresión del gen de insulina.

La disminución en la expresión del RNAm de *insulina* podría explicar parcialmente la caída de los niveles de insulina en suero ya que estas mediciones fueron hechas de las mismas ratas. Además, estos resultados correlacionan con la baja secreción de insulina de las células β aisladas provocada por la exposición *in vivo* a STZ.

En contraste la expresión del RNAm de *NGF* en los islotes de ratas administradas con STZ fue 30 % mayor que en los islotes de ratas control (figura 16B).

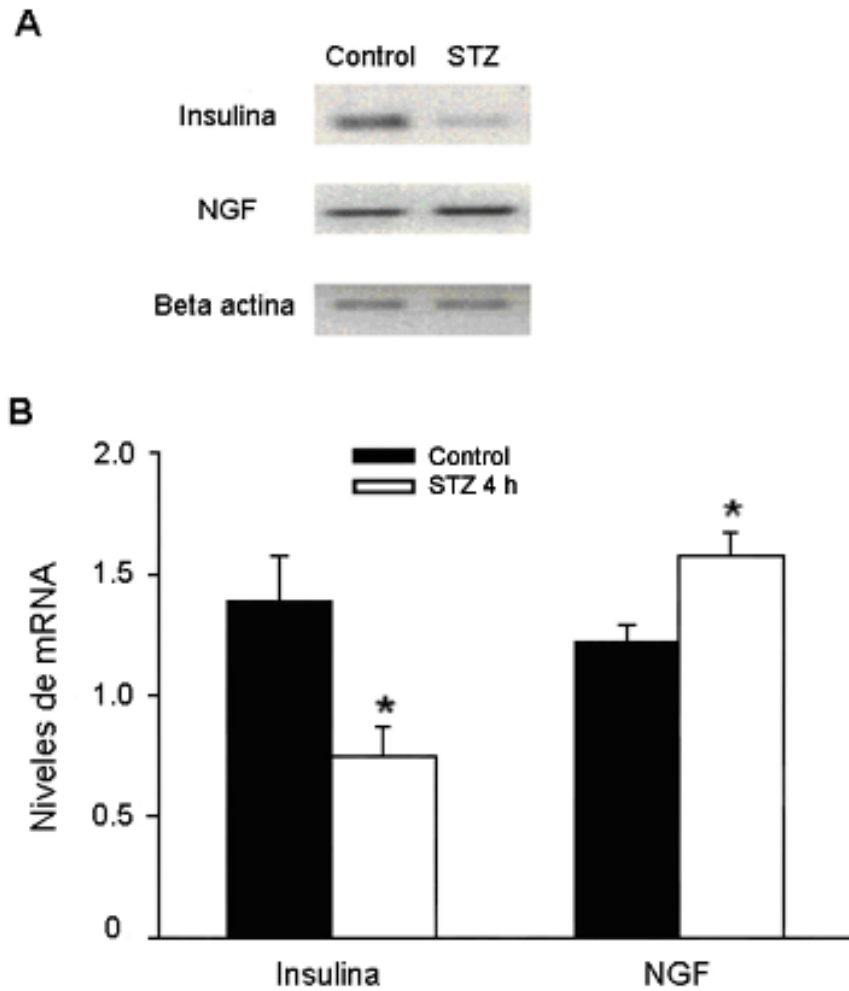


Figura 16. Expresión de RNAm de insulina y de NGF en islotes pancreáticos.

A: Productos de RT-PCR de islotes de 6 ratas control y ratas administradas STZ-4h.

B: La STZ disminuyó el nivel de RNAm de *insulina* y disminuyó el de *NGF*. Los niveles de RNAm de *insulina* y de *NGF* fueron normalizados a β actina. Los datos son el promedio \pm error estándar de 4 experimentos. * $P < 0.05$ comparado con las ratas control.

3. Efectos del daño *in vitro* inducido por STZ sobre las células β pancreáticas aisladas

3.1. La STZ *in vitro* disminuyó la concentración de insulina secretada y aumentó la concentración de NGF secretado por las células β aisladas

Las concentraciones de insulina y de NGF secretados fueron medidas de las células β expuestas *in vitro* a 1 mM de STZ durante 1, 2 o 4 h. Los ensayos de secreción fueron realizados en respuesta a las concentraciones basal (5.6 mM) o estimuladora (15.6 mM) de glucosa durante 3 h. Como se muestra en la figura 17A, la concentración de insulina secretada por las células β control en respuesta a 15.6 mM de glucosa fue 2.3 veces mayor que a 5.6 mM de glucosa.

La exposición *in vitro* a STZ no modificó la secreción de insulina por las células β en respuesta a la concentración basal de glucosa. Sin embargo, a 15.6 mM de glucosa, las células β expuestas a STZ durante diferentes periodos secretaron 1.3 veces menos insulina que las células control (figura 17A). Sólo se muestra una barra de células control para cada concentración de glucosa porque no hay diferencias entre los periodos.

En todos los periodos de exposición, la STZ aumentó la concentración de NGF secretado por las células β en respuesta a las dos concentraciones de glucosa

comparada con la de las células β control (figura 17B). La máxima concentración de NGF secretado fue después de 1 h de exposición a STZ.

3.2. La STZ in vitro disminuyó la sobrevivencia y aumentó la apoptosis de las células β aisladas

Después de los ensayos de secreción de insulina y de NGF, se midieron la sobrevivencia y la apoptosis de las células β control y expuestas a 1 mM de STZ durante 1, 2 o 4 h. El porcentaje de sobrevivencia en las células expuestas a STZ fue de ~60 % comparado con 80-90 % de las células control.

La figura 18 muestra que la mayor parte de la muerte observada fue por un mecanismo apoptótico. El porcentaje de apoptosis aumentó de manera dependiente del tiempo de exposición a STZ. En las células control el porcentaje de apoptosis no fue diferente entre los diferentes periodos, por lo que sólo se muestra una barra de células control para cada concentración de glucosa.

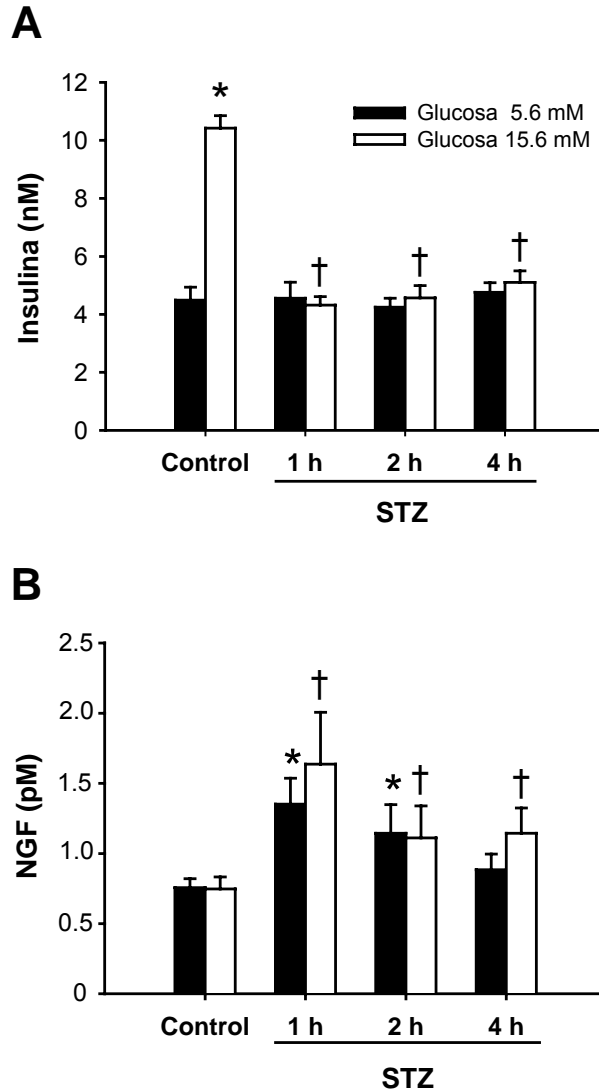


Figura 17. Concentraciones de Insulina y de NGF secretados por las células β expuestas *in vitro* a STZ. Las células β pancreáticas fueron expuestas a 1 mM de STZ durante 1, 2 o 4 h.

A: La STZ disminuyó la secreción de insulina estimulada a 15.6 mM de glucosa, por las células β aisladas. $P < 0.001$ * comparado con el control en 5.6 mM de glucosa y † comparado con el control en 15.6 mM de glucosa.

B: La STZ aumentó la secreción de NGF en las dos concentraciones de glucosa. $P < 0.05$ * comparado con el control en 5.6 mM de glucosa, † comparado con el control en 15.6 mM y ‡ comparado con STZ durante 1 h en 5.6 mM de glucosa. Los datos son el promedio \pm error estándar de 3-4 experimentos.

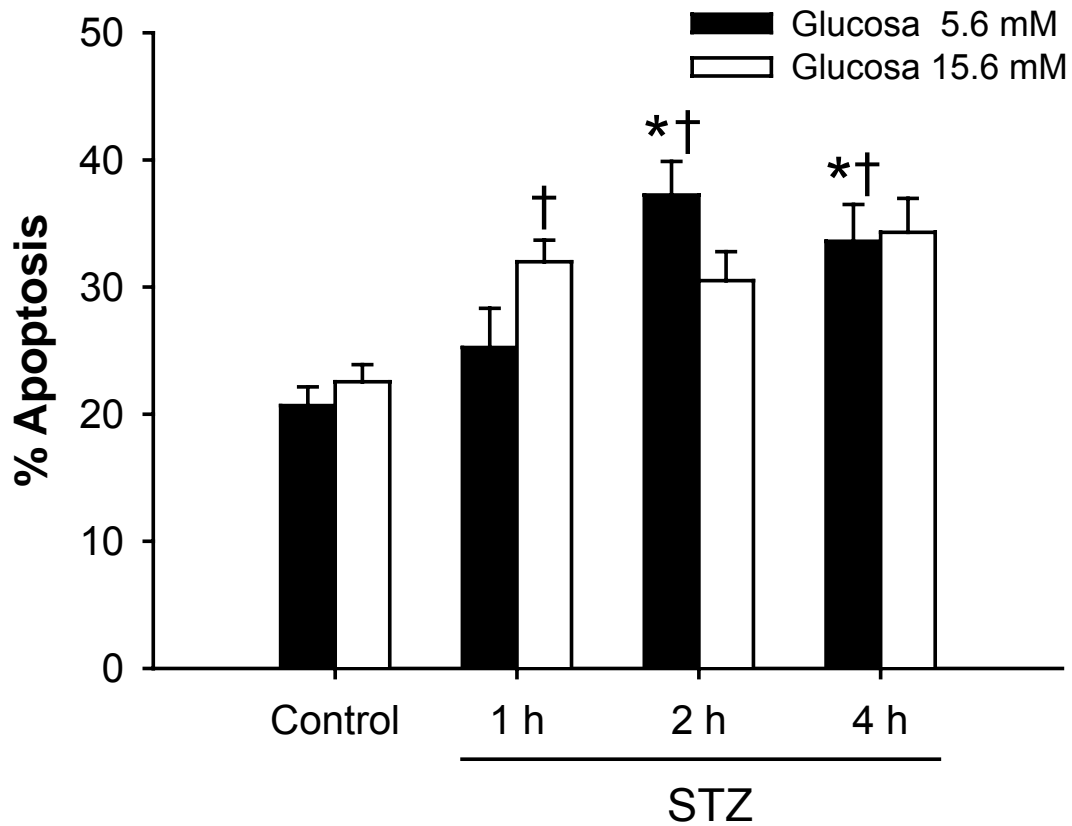


Figura 18. Apoptosis de células β pancreáticas expuestas *in vitro* a STZ. Las células fueron expuestas a 1 mM de STZ durante 1, 2 o 4 h, se les realizó un ensayo de secreción y después se midió la apoptosis. La STZ aumentó el porcentaje de apoptosis de células β incubadas en 5.6 o 15.6 mM de glucosa. $P < 0.05$ * comparado con el control en 5.6 mM de glucosa, † comparado con el control en 15.6 mM de glucosa. Los datos son promedio \pm error estándar de 3-4 experimentos.

4. Análisis histológico de páncreas de ratas después de 4 h de la administración de STZ

En el páncreas de las ratas control encontramos islotes de diferentes tamaños. El área va desde 120 hasta 3473 μm^2 , mientras que en el tejido de las ratas administradas con STZ, el tamaño promedio de los islotes es menor, el área varía entre 26 y 2067 μm^2 . Esta variación en el tamaño de los islotes podría deberse a una fase temprana de destrucción de las células β .

En cortes de páncreas de ratas administradas con STZ observamos que los núcleos celulares de los islotes están totalmente condensados y fuertemente teñidos con hematoxilina a diferencia de los tejidos controles, cuyos núcleos son redondos y menos teñidos. Estos resultados sugieren que la STZ causa muerte celular de las células β pancreáticas desde etapas muy tempranas posteriores a su administración.

5. Análisis morfométrico de páncreas de ratas después de 4 semanas de la administración de STZ

En los páncreas de ratas control encontramos la organización básica de los islotes que consiste en un núcleo central formado por células β que expresan insulina (verde), rodeadas por células α inmunoteñidas para glucagon en la periferia (azul) (figura 19A). Después de 4 semanas de la administración de STZ, los islotes son irregulares, con límites poco definidos y en su mayoría están

compuestos por células α y algunas células β remanentes distribuidas en todo el islote (figura 19B).

En los páncreas de ratas administradas con STZ, el área de los islotes en relación al área total del páncreas fue 80 % menor que el de las ratas control. Esta diferencia fue principalmente por la pérdida del 97 % de las células β , sin embargo, permanecen algunas con una tinción débil en el páncreas diabético (figura 19C).

Con la disminución del área de las células β , el área de las células α aumentó 3 veces en los islotes pancreáticos. Sin embargo, no existe diferencia significativa en el área de las células α en relación al área total del corte (figura 19C). Además el número de islotes en el corte de páncreas de ratas administradas con STZ fue casi 50 % menos que en las ratas control (figura 19D).

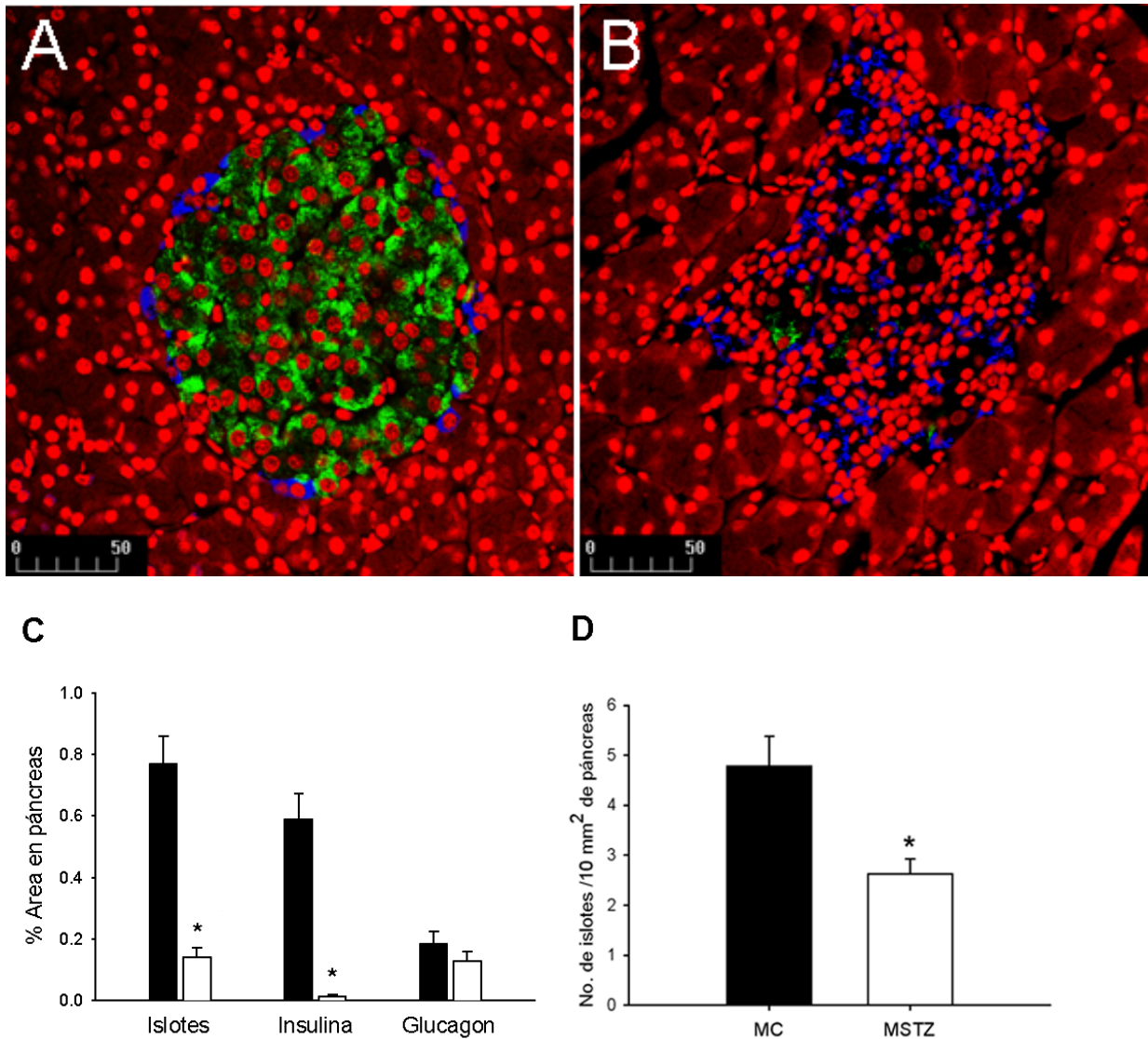


Figura 19. Análisis morfométrico de páncreas después de 4 semanas de la administración de STZ.

A, B: Islotes pancreáticos inmunoteñidos para insulina (verde), glucagon (azul) y núcleos celulares (rojo) de ratas control (A) y administradas con STZ (B). Barra = 50 μ m.

C: % Área de islotes, insulina y glucagon en páncreas de ratas control y administradas con STZ. Los datos son el promedio \pm error estándar. * $P < 0.0005$ comparado con las ratas control.

D: Número de islotes/mm² de páncreas de ratas control y administradas con STZ. Los datos son el promedio \pm error estándar. * $P < 0.02$ comparado con el control.

IX. DISCUSIÓN

Está ampliamente documentado que la estreptozotocina (STZ) produce destrucción de las células β pancreáticas, lo cual conduce a hiperglucemia e hipoinsulinemia generando un modelo experimental de diabetes a largo plazo (112). Sin embargo no se conocen los efectos de la STZ a corto plazo sobre la fisiología pancreática. Resultados obtenidos en esta tesis demuestran que después de 4 h de la inyección intraperitoneal de 75 mg/kg de STZ, las ratas tienen concentraciones de glucosa en sangre marcadamente elevadas y una severa disminución en los niveles de insulina en suero. Estas condiciones se acompañaron de la disminución del peso corporal de las ratas, las cuales persistieron durante 4 semanas y no hubo evidencia de recuperación del daño (129).

Estos resultados sugieren que la STZ causa daño severo a las células β después de un periodo corto, el cual se refleja en la hiperglucemia e hipoinsulinemia registradas desde las primeras 4 h posteriores a su administración. En un estudio previo observamos que la STZ induce apoptosis en los islotes pancreáticos de rata 6 h después de su inyección (130). Un trabajo adicional reveló que el daño de las células β inicia después de las 6 h de la administración de la STZ (131), sin embargo las dosis utilizadas en ambos trabajos son diferentes a la empleada en el presente estudio.

Las respuestas tempranas de las células β pancreáticas al daño de la STZ no están completamente comprendidas. En esta tesis analizamos los cambios tempranos en la fisiología del páncreas de rata adulta y en células β aisladas expuestas a STZ. Determinamos que la STZ *in vivo* a corto plazo disminuye la secreción de insulina y el nivel de expresión del RNAm de *insulina* de las células β (129).

La disminución en la expresión del RNAm de *insulina* podría explicar en parte la secreción baja de insulina de las células β expuestas *in vivo* a STZ a corto plazo. A su vez lo anterior podría ser la razón de la caída de los niveles de insulina en suero ya que estas mediciones fueron hechas de las mismas ratas. Además, estos resultados son consistentes con la disminución de la secreción de insulina por las células β expuestas *in vitro* a STZ.

Sin embargo, al parecer la STZ tuvo efectos más severos sobre la fisiología de la célula β pancreática *in vivo* que *in vitro*. *In vivo*, la STZ redujo en un 85% la secreción de insulina en 5.6 mM de glucosa (basal) y ~10 veces en 15.6 mM de glucosa (estimulada). *In vitro* no modificó la secreción basal de insulina y la estimulada con 15.6 mM de glucosa sólo la disminuyó 1.3 veces.

Por otro lado, la STZ *in vivo* a corto plazo aumentó ~10 veces la secreción de NGF de las células β aisladas y 40% el nivel de expresión de RNAm de *NGF* en los islotes (figuras 15B y 16). Estos resultados son consistentes con el aumento

de 100% de la secreción de NGF en el modelo de daño celular por STZ *in vitro* independientemente de la concentración de glucosa a la que estuvieron expuestas (figura 17). En este modelo encontramos que el 40% de las células mueren y el 20% de ellas lo hacen por apoptosis (29). Los datos anteriores sugieren que a pesar de que alrededor del 60% de las células β sobrevivieron al efecto tóxico *in vitro* de la STZ, ya no secretaron insulina en respuesta a una concentración estimuladora de glucosa (15.6 mM) (figura 17A). De manera contraria, si secretan NGF y en concentraciones muy elevadas.

Las diferencias encontradas en la magnitud de la disminución de la secreción de insulina y del aumento de la secreción de NGF en los modelos *in vivo* e *in vitro*, pueden atribuirse a los factores adicionales que pueden intervenir y alterar la respuesta *in vivo* a la STZ. Es probable que la concentración neta de STZ a la que se expusieron las células β *in vivo* haya sido mayor, a pesar que administramos una dosis fija de STZ, desconocemos la cantidad que llega a la sangre y de ahí a las células pancreáticas. Es importante considerar que las células expuestas *in vivo* a STZ posteriormente fueron sometidas a tratamientos enzimáticos para su aislamiento y obtención, los cuales podrían ejercer daño adicional.

Este es el primer estudio que evidencia la sobreproducción de NGF pancreático después del daño provocado por STZ. Esta observación es muy interesante ya que se ha propuesto que el NGF tiene un papel muy importante en la respuesta

de fase aguda después del daño (132). La producción de NGF pancreático como una respuesta primaria al daño puede ser análoga a las respuestas de NGF en el sistema nervioso.

Se ha demostrado que los niveles de NGF en el cerebro incrementan después de daño hipóxico y/o isquémico (133), por administración de neurotoxinas (134-136) y por lesiones excitotóxicas (137, 138). Además, también se reportaron niveles elevados de NGF después de ataques (139, 140) y trauma cerebral (141). En el sistema nervioso periférico después de 6 h del corte del nervio sciático hay un gran aumento del nivel de RNAm de *NGF* en las células Schwann y fibroblastos en los segmentos proximal y distal a la lesión (142).

Los factores neurotróficos son reguladores importantes de la sobrevivencia neuronal y diferenciación durante el desarrollo embrionario. Sin embargo, estas moléculas también actúan sobre neuronas completamente maduras y ha sido demostrado que pueden rescatar a las células después de un daño cerebral y en la progresión de enfermedades degenerativas (143, 144).

En nuestro laboratorio se demostró que las células β pancreáticas sintetizan y secretan NGF (111). Pierucci et al (145) demostró que la privación de NGF induce apoptosis en las células β humanas cultivadas y en la línea celular β TC6-F7. En el laboratorio también se demostró que la apoptosis de las células β de rata aumenta cuando la regulación autocrina en la célula β se bloquea con

anticuerpos contra insulina y NGF (146). Entonces es posible que una respuesta primaria de las células β a la exposición a STZ sea sobreproducir NGF como se muestra en las figuras 12, 13 y 14 con el fin de protegerlas del daño, ya que el NGF endógeno promueve la sobrevivencia de las células β pancreáticas (146).

La insulina y el NGF son proteínas que poseen propiedades funcionales parecidas ya que sus receptores tienen actividad cinasa de residuos de tirosina. Ambos receptores activan cascadas de señalización de fosforilación que convergen en proteínas efectoras tales como PI3K y Akt, las cuales están asociadas con sistemas anti-apoptóticos en diferentes tipos celulares (147, 148).

Los datos presentados en este estudio indican que el aumento en la expresión del RNAm y la secreción de NGF después del daño pueden formar parte de un mecanismo protector o reparador endógeno para mantener la sobrevivencia celular en tejido dañado, como ha sido observado en el sistema nervioso. En nuestro modelo, el aumento local del NGF no fue suficiente para reparar el daño generado por STZ, sin embargo, podría ser una señal temprana del daño de las células β durante la progresión e instalación de la diabetes *mellitus*.

La muerte celular por apoptosis generada por el efecto tóxico *in vitro* de la STZ correlaciona con el análisis histológico de páncreas de ratas después de 4 h de haber sido administradas con STZ, en donde se muestran alteraciones

morfológicas de los islotes pancreáticos. Estas alteraciones podrían deberse a la inducción de muerte de las células β por apoptosis en la fase temprana del daño.

Por otra parte, después de 4 semanas de la administración de STZ, observamos que la hiperglucemia se agudiza y los niveles de insulina en suero son casi indetectables. El 60% de células β que sobrevivieron al efecto tóxico primario de la STZ, la mayor parte ellas no permanecieron después de las 4 semanas. En el análisis morfométrico de páncreas, encontramos una reducción en el área de inmunorreactividad a insulina debido a la ausencia de la mayoría de las células β , lo que alteró la forma del islote y las escasas células β sobrevivientes se mezclaron con las células α .

En los islotes, el área de células α fue mayor que en las ratas control y su distribución se alteró ya que no formó la capa que cubre al núcleo de las células β . Sin embargo, no hubo diferencias en el área de células α en relación al páncreas completo. Estos resultados concuerdan con los datos reportados previamente en rata, ratón y humano (149, 150, 151).

Nuestros resultados fueron obtenidos de modelos experimentales que probablemente no reflejen completamente los eventos que se llevan a cabo en diabetes humana. Sin embargo, pueden contribuir a la comprensión de las respuestas tempranas del desarrollo de la diabetes inducido por STZ que apoyen al futuro desarrollo de nuevas y mejores estrategias terapéuticas para el

tratamiento de la diabetes *mellitus*. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para comprender el papel del NGF pancreático en la respuesta al daño de las células β pancreáticas y su repercusión a largo plazo.

X. CONCLUSIONES

La STZ *in vivo* induce hiperglucemia e hipoinsulinemia en ratas, desde las 4 horas posteriores a su administración. Estas condiciones se agudizaron durante las siguientes 4 semanas y estuvieron acompañadas de pérdida de peso corporal.

La hiperglucemia y la hipoinsulinemia después de las 4 h de la administración de la STZ son resultado de la disminución de la expresión del RNAm y de la secreción basal y estimulada de insulina por las células β . Sin embargo la STZ *in vitro* solo disminuye la secreción de insulina estimulada por glucosa.

La STZ *in vivo* e *in vitro* aumenta expresión del RNAm y la secreción de NGF por las células β aisladas.

La STZ *in vitro* provoca el 40% de muerte celular y el 20% de las células β mueren por apoptosis. El 60% de las células que sobreviven al daño por STZ, no secretan insulina en respuesta a glucosa, pero aumentan en gran medida la producción de NGF.

Después de 4 semanas, la STZ *in vivo* agudizó la hiperglucemia y la hipoinsulinemia probablemente debido a la disminución en el área de células β y el área y número de islotes en páncreas.

El NGF pancreático promueve la supervivencia de las células β , es probable que su sobreproducción sea parte de un mecanismo protector o reparador para mantener la supervivencia celular.

La sobreproducción temprana de NGF por las células β dañadas no fue suficiente para rescatarlas de la muerte inducida por STZ. Sin embargo, podría ser una señal temprana del daño de las células β durante la progresión e instalación de la diabetes *mellitus*.

XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Henry Gray. Anatomy of the human body. 20a Edición New York: Bartleby. com, 2000.
2. Madsen OD, Jensen J, Blume N, Petersen HV, Lund K, Karlsen C, Andersen FG, Jensen PB, Larsson LI y Serup P. Pancreatic development and maturation of the islet B cell: studies of pluripotent islet cultures. *Eur J Biochem* 242:435-445, 1996.
3. Norman AW y Litwack G. Hormones; Academic Press, San Diego, USA; 2ª Edición; Capítulo 7, pp 193-227, 1997.
4. Orci I y Unger RH. Functional subdivision of islets of Langerhans and possible role of D-cells. *Lancet* 2:1243-1244, 1975.
5. Kino T, Gospel SO, Riesman P, Wake M. Cellular function in multicultural system for hormone-secretion: electrophysiological aspect of studies on α - , β - and δ -cells of the pancreatic islet. *Neurosci Res* 42:79-90, 2002.
6. Rossowski WJ, Coy DH. Specific inhibition of rat pancreatic insulin or glucagon release by receptor-selective somatostatin analogs. *Biochem Biophys Res Commun* 205:341-346, 1994.
7. Strowski MZ, Parmar RM, Blake AD, Schaeffer JM. Somatostatin inhibits insulin and glucagon secretion via two receptors subtypes: an in vitro study of pancreatic islets from somatostatin receptor 2 knockout mouse. *Endocrinology* 141:111-117, 2000.

8. Cejvan K, Coy DH, Efendic S. Intra-islet somatostatin regulates glucagon release via type 2 somatostatin receptors in rats. *Diabetes* 52:1176-1181, 2003.
9. Larsson LI, Sundler F y Hakanson R. Pancreatic polypeptide - a postulated new hormone: identification of its cellular storage site by light and electron microscopic immunocytochemistry. *Diabetologia* 12:211-226, 1976.
10. Schwartz TW. Pancreatic polypeptide: a hormone under vagal control. *Gastroenterology* 85:1411-1425, 1983.
11. Louie DS, Williams JA, Owyang C. Action of pancreatic polypeptide on rat pancreatic secretion: in vivo and in vitro. *Am J Physiol.* 249:G489-95, 1985.
12. Schmidt PT, Naslund E, Gryback P, Jacobsson H, Holst JJ, Hilsted L y Hellstrom PM. A role for pancreatic polypeptide in the regulation of gastric emptying and short-term metabolic control. *J Clin Endocrinol Metab* 90:5241-6, 2005.
13. Okada Y, Tanoguchi H y Shimada C. High concentration of GABA and high glutamate decarboxylase activity in rat pancreatic islets and human insulinoma. *Science* 194:620-622, 1976.
14. Ludvik B, Kautzky-Willer A, Prager R, Thomaseth K y Pacini G. Amylin: history and overview. *Diabet Med* 14 (Suppl. 2):S9-13, 1997.
15. Brissova M, Fowler MJ, Nicholson WE, Chu A, Hirshberg B, Harlan DM y Powers AC. Assessment of Human Pancreatic Islet Architecture and

- Composition by Laser Scanning Confocal Microscopy. *J Histochem & Cytochem* 53:1087-1097, 2005.
16. Bonner-Weir S y Orci L. New perspectives on the microvasculature of the islets of Langerhans in the rat. *Diabetes* 31:883-889, 1982.
17. Pittman IV, Philipson LH y Steiner DF. Insulin biosynthesis, secretion structure and structure-activity relationships. Capítulo 3, 2004. http://www.endotext.com/diabetes/diabetes3_new/diabetes3.htm
18. Bailyes EM, Guest PC y Hutton JC. Insulin synthesis. En Insulin; Ashcroft FM y Ashcroft SJH. Eds.; Oxford University Press New York, USA; 1a Edición; pp. 64-92, 1992.
19. Soares MB, Schon E, Henderson A, Karathanasis SK, Cate R, Zeitlin S, Chirwin J y Efstratiadis A. RNA-mediated gene duplication: the rat preproinsulin gene is a functional retroposon. *Mol Cell Biol* 5:2090-2103, 1985.
20. Poitout V, Hagman D, Stein R, Artner I, Robertson RP y Harmon JS. Regulation of the Insulin Gene by Glucose and Fatty Acids. *J Nutr* 136: 873–876, 2006.
21. Clark AR y Docherty K. The insulin gene. En Insulin. Ashcroft, FM y Ashcroft SJH. Eds.; Oxford University Press, New York, USA; 1a Edición; pp. 37-63, 1992.
22. Edlund T, Walker MD, Barr PJ y Rutter WJ. Cells specific expression of the rat insulin gene: evidence for the role of two distinct 5' flanking sequences. *Science* 230:912-916, 1985.

23. Clark AR, Wilson ME, Leibiger I, Scott V y Docherty K. A silencer and an adjacent positive element interact to modulate the activity of the human insulin promoter. *Eur J Biochem* 232:627-632, 1995.
24. Sosa-Pineda B, Chowdhury K, Torres M, Oliver, G y Gruss P. The Pax4 gene is essential to differentiation of insulin-producing beta cells in the mammalian pancreas. *Nature* 386:399-402, 1997.
25. Edlund H. Transcribing pancreas. *Diabetes* 47:1817-1823, 1998.
26. Karin m y Smeal T. Control of transcription factors by signal transduction pathways: the beginning of the end. *Trends Biochem Sci* 17:418-422, 1992.
27. Leibiger B, Moede T, Schwarz T, Brown GR, Köehler M, Leibiger IB y Berggren P-O. Short-term regulation of insulin gene transcription by glucose. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:9307-9312, 1998.
28. Macfarlane WM, McKinnon CM, Felton ZA, Cragg H, James RFL y Docherty K. 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, 1999.
29. Okun MM, Eskridge EM y Shields D. 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, 1990.
30. Pearse BMF y Robins MS. Clathrin, adaptors and sorting. *Ann Rev Cell Biol* 6:151-157, 1990.

31. Davidson HW, Rodees CJ y Hutton JC. Intraorganelar calcium and pH control proinsulin cleavage in the pancreatic B cell via two distinct site specific endopeptidases. *Nature* 333:93-96, 1998.
32. Hutton JC, Penn EJ y Pershavarria M. Isolation and characterisation of insulin secretory granules from a rat islets cell tumour. *Diabetologia* 23:365-373, 1982.
33. Bishop AE y Polak JM. The anatomy, organization and ultrastructure of the islets of Langerhans. En Textbook of Diabetes. Pickup JC and Williams G Eds.; Blackwell Science, Massachussets, USA 3ª. Edición, Volumen 10 pp. 10.1, 2003.
34. Johson JH, Newgard CB, Milburn JL, Lodish HF y Thorens B. The high Km glucose transporter of islets of Langerhans is functionally similar to the low affinity transporter of liver and has an identical primary sequense. *J Biol Chem* 265:6548-6555, 1990.
35. De Vos A, Heimberg H, Quartier E, Huypens P, Bouwens L, Pipeleers D y Schuit F. Human and rat beta cells differ in glucose transporter but not in glucokinase gene expresión. *J Clin Inv* 96:2489-2495, 1995.
36. Meglasson MD, Burch PT, Berner DK, Najafi H, Vogin AP y Matschinsky FM. Chromatographic resolution and kinetic characterization of glucokinase from islets of Langerhans. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:5-9, 1983.

37. Matschinsky FM. Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes* 45, 223-241, 1996.
38. Eto K, Tsubamoto Y, Terauchi Y, Sugiyama T, Kishimoto T, Takahashi N, Yamauchi N, Kubota N, Murayama S, Aizawa T, Akanuma Y, Aizawa S, Kasai H, Yazaki Y y Kadowaki T. Role of NADH shuttle system in glucose-induced activation of mitochondrial metabolism and insulin secretion. *Science* 283:981-985, 1999.
39. Rorsman P. The pancreatic beta cell as a full sensor. An electrophysiologist's viewpoint. *Diabetologia* 40:487-495, 1997.
40. Lang J. Molecular mechanisms and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion. *Eur J Biochem* 259:3-17, 1999.
41. Gembal M, Detimary P, Gilon P, Gao ZY y Henquin JC. Mechanisms by which glucose can control insulin release independently from its action on ATP-sensitive K¹ channels in mouse B-cells. *J Clin Invest* 91:871–880, 1993.
42. Sato Y, Anello M y Henquin JC. Glucose Regulation of Insulin Secretion Independent of the Opening or Closure of Adenosine Triphosphate-Sensitive K⁺ Channels in β Cells. *Endocrinology* 140:2252–2257, 1999.
43. Beta Cell Biology Consortium, 2004 <http://www.betacell.org/>
44. Hubbard SR. Structural analysis of receptor tyrosine kinases. *Progr Biophys Mol Biol* 71:343-358, 1999.

45. Ottensmeyer FP, Beniac DR, Luo RZ-T y Yi CC. Mechanism of Transmembrane Signaling: Insulin Binding and the Insulin Receptor. *Biochemistry* 39:12103-12112, 2000.
46. De Meyts P. Insulin and its receptor: structure, function and evolution. *BioEssays* 26:1351-1362, 2004.
47. Kido Y, Nakae J y Accili D. Clinical Review 125. The Insulin Receptor and Its Cellular Targets. *J Clin Endocrinol Metab* 86:972-979, 2001.
48. Cai D, Dhe-Paganon S, Melendez PA, Lee J y Shoelson SE. Two New Substrates in Insulin Signaling, IRS5/DOK4 and IRS6/DOK5. *J Biol Chem* 278:25323-25330, 2003.
49. Khan AH y Pessin JE. Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways. *Diabetologia* 45:1475-1483, 2002.
50. Chang L, Chiang SH y Saltiel AR. Insulin Signaling and the Regulation of Glucose Transport. *Mol Med* 10:65-71, 2004.
51. Farese RV, Sajan MP y Standaert ML. Insulin-Sensitive Protein Kinases (Atypical Protein Kinase C and Protein Kinase B/Akt): Actions and Defects in Obesity and Type II Diabetes. *Exp Biol Med* 230:593-605, 2005
52. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M y Hemmins BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378:785-789, 1995.

53. Azzout-Marniche D, Becard D, Guichard C, Foretz M, Ferre P y Foufelle F. Insulin effects on sterol regulatory-element-binding protein-1c (SRBEP1c) transcriptional activity in rat hepatocytes. *Biochem J* 350:389-393, 2000.
54. Foufelle F y Ferre P. New perspectivas in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose; a role for transcriptional factor sterol regulatory element binding protein-1c. *Biochem J* 366:377-391, 2002.
55. Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, Kitamura Y, Altomonte J, Dong H, Accili D y Spiegelman BM. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1 alpha interaction. *Nature* 423:550-555, 2003.
56. Rena G, Guo S, Cichy SC, Unterman TG y Cohen P. Phosphorylation of the transcription factor forkhead family member FKHR by protein kinase B. *J Biol Chem* 274:17179-17183, 1999.
57. Barthel A y Schmolli D. Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285:E685-692, 2003.
58. Kitamura T, Kitamura Y, Kuroda S, Hino Y, Ando M, Kotani K, Konishi H, Matsuzaki H, Kikkawa U, Ogawa W y Kasuga M. Insulin-induced phosphorylation and activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B by the serine-threonine kinase Akt. *Mol Cell Biol* 19:6286-6296, 1999.
59. Virkamäki A, Ueki K y Kahn CR. Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 103:931-943, 1999.

60. Skolnik EY, Lee C-H, Batzer A, Vicentini LM, Zhou M, Daly R, Myers M.J, Backer JM, Ullrich A, White MF y Schlessinger J. The SH2/SH3 domain-containing protein GRB2 interacts with tyrosine-phosphorylated IRS1 and Shc: implications for insulin control of ras signaling. *EMBO J* 12:1929-1936, 1993.
61. Saltiel AR y Kahn CR. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414:799-806, 2001.
62. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 28 Suplemento 1:S5-S10.
63. Balkau B y Eschwege E. The diagnosis and classification of diabetes and impaired glucose regulation. En *Textbook of Diabetes*. Pickup JC y Williams G Eds.; Blackwell Science, Massachusetts, USA 3a Edición, Volumen 1 pp. 2.7, 2003.
64. Lee PG, Hohman TC, Cai F, Regalia J y Helke CJ. Streptozotocin-induced diabetes causes metabolic changes and alterations in neurotrophin content and retrograde transport in the cervical vagus nerve. *Exp Neurol* 170:149-161, 2001.
65. Hellweg R y Hartung HD. Endogenous levels of nerve growth factor (NGF) are altered in experimental diabetes mellitus: a possible role for NGF in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *J Neurosci Res* 26:258-267, 1990.

66. Tomlinson DR, Fernyhough P y Diemel LT. Neurotrophins and peripheral neuropathy. *Philos Trans Royal Soc. London, series b: Biol Sci* 351: 455, 1996.
67. Faradji V y Sotelo J. Low serum levels of nerve growth factor in diabetic neuropathy. *Acta Neurol Scand* 81:402-406, 1990.
68. Ordoñez G, Fernández A, Pérez R y Sotelo J. Low contents of nerve growth factor in serum and submaxillary gland of diabetic mice. A possible etiological element of diabetic neuropathy. *J Neurol Sci* 121:163-166, 1994.
69. Fernyhough P, Diemel LT, Brewster WJ y Tomlinson DR. Altered neurotrophin mRNA levels in peripheral nerve and skeletal muscle of experimentally diabetic rats. *J Neurochem* 54:1231-1237, 1995.
70. Schmidt RE, Dorsey DA, Roth KA, Parvin CA, Hounsom L y Tomlinson DR. Effect of streptozotocin-induced diabetes on NGF, p75^{NTR} and TrkA content of prevertebral and paravertebral rat sympathetic ganglia. *Brain Res* 867:149-156, 2000.
71. Levi-Montalcini R. The nerve growth factor: its mode of action on sensory and sympathetic nerve cells. *Harvey Lecture* 60:217-259, 1966.
72. Levi-Montalcini R. The nerve growth factor 35 years later. *Science* 237:1154-1162, 1987.
73. Whittemore SR, Ebendal T, Larkfors L, Olson L, Seiger A, Stromberg I y Persson H. Development and regional expression of beta nerve growth

- factor messenger RNA and protein in the rat central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:817-821, 1986.
74. Server A y Shooter E. Nerve growth factor. *Adv Prot Chem* 31:339-343, 1977.
75. Varon S, Nomura J y Shooter E. The isolation of the mouse nerve growth factor protein in a high molecular weight form. *Biochemistry* 6:2202-2209, 1967.
76. Ronne H, Anundi H, Rask L y Peterson PA. 7S Nerve growth factor alpha and gamma subunits are closely related proteins. *Biochemistry* 23:229-1234, 1984.
77. Bax B, Blundell TL, Murria-Rust J y McDonald NQ. Structure of mouse 7S NGF: a complex of nerve growth factor with four binding proteins. *Structure* 5:1275-1285, 1997.
78. Angeletti RH y Bradshaw RA. Nerve growth factor from mouse submaxillary gland: amino acid sequence. *Proc Natl Acad Sci USA*. 68:2417-20, 1971.
79. Ibáñez CF. Structure-function relationships in the neurotrophin family. *J Neurobiol* 25:1349-1356, 1994.
80. Chao MV y Hempstead BL. p75 and Trk: a two receptor system. *Trends Neurosci* 18:321-326, 1995.
81. Sutter A, Riopelle RJ, Harris-Warrick RM y Shooter EM. Nerve growth factor receptors. Characterization of two distinct classes of binding sites

- on chick embryo sensory ganglia cells. *J Biol Chem* 254:5972-59782, 1979.
82. Martín-Zanca D, Oskam R, Mitra G, Copeland T y Barbacid M. Molecular and biochemical characterization of the human trk proto-oncogene. *Mol Cell Biol* 9:24-33, 1989.
83. Roux PP y Barker PA. Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Progr Neurobiol* 67:203–233, 2002.
84. Baldwin AN, Bitler CM, Welcher AA y Shooter EM. Studies on the structure and binding properties of the cysteine-rich domain of rat low affinity nerve growth factor receptor (p75NGFR). *J Biol Chem* 267: 8352–8359, 1992.
85. Huang EJ and Reichardt LF. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 72:609–642, 2003.
86. Hempstead BL, Martin-Zanca D, Kaplan DR, Parada LF y Chao MV. High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature* 350:678-683, 1991.
87. Cunningham ME, Stephens RM, Kaplan DR y Green LA. Autophosphorylation of activation loop tyrosines regulates signaling by the TRK nerve growth factor receptor. *J Biol Chem* 272:10957-10967, 1997.
88. Pawson T y Gish GD. SH2 and SH3 domains: from structure to function. *Cell* 71:359-362, 1992.

89. Sofroniew MV, Howe CL y Mobley WC. Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu Rev Neurosci* 24:1217–281, 2001.
90. Escobar ML, Jimenez N, Lopez-Garcia JC, Tapia R y Bermudez-Rattoni F. Nerve growth factor with insular cortical grafts induces recovery of learning and reestablishes graft choline acetyltransferase activity. *J Neural Transplant Plast* 4:167-72, 1993
91. Escobar ML, Russell RW, Booth RA y Bermudez-Rattoni F. Accelerating behavioral recovery after cortical lesions. I. Homotopic implants plus NGF. *Behav Neural Biol* 61:73-80, 1994.
92. Russell RW, Escobar ML, Booth RA y Bermudez-Rattoni F. Accelerating behavioral recovery after cortical lesions. II. *In vivo* evidence for cholinergic involvement. *Behav Neural Biol* 61:81-92, 1994.
93. Diaz-Cintra S, Rivas P, Cintra L, Aguilar A, Gutierrez G, Perez E, Escobar M y Bermudez-Rattoni F. Morphometric study of fetal brain transplants in the insular cortex and NGF effects on neuronal and glial development. *Cell Transplant* 4:505-13, 1995.
94. Gutierrez H, Miranda MI y Bermudez-Rattoni F. Learning impairment and cholinergic differentiation after cortical nerve growth factor deprivation. *J Neurosci* 17:3796-803, 1997.
95. Ormsby CE, Ramirez-Amaya V y Bermudez-Rattoni F. Long-term memory retrieval deficits of learned taste aversions are ameliorated by cortical fetal brain implants. *Behav Neurosci* 112:172-1823-9, 1998.

96. Levi-Montalcini R, Aloe L y Alleva E. A role for nerve growth factor in nervous, endocrine and immune systems. *Prog Neuroendocrinoimmunol* 3:1-10, 1990.
97. Missale C. Nerve growth factor in the neuroendocrine system. *Neurosci Res Comm* 24:61-70, 1999.
98. Bischoff SC y Dahinden CA. Effect of nerve growth factor on the release of inflammatory mediators by mature human basophils. *Blood* 79:2662-2669, 1992.
99. Leon A, Buriani A, Dal Toso R, Fabris M, Romanello S, Aloe L y Levi-Montalcini R. Mast cells synthesize, store, and release nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:3739-3743, 1994.
100. Otten U, Ehrhard P y Peck R. Nerve growth factor induces growth and differentiation of human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:10059-10063, 1989.
101. Tsuda T, Wong D, Dolovich J, Bienenstock J, Marshall J y Denburg JA. Synergistic effects of nerve growth factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on human basophilic cell differentiation. *Blood* 77:971-979, 1991.
102. Horigome K, Bullock ED y Johnson EM. Effects of nerve growth factor on rat peritoneal mast cells. Survival promotion and immediate-early gene induction. *J Biol Chem* 269:2695-2702, 1994.

103. Ehrhard PB, Ganter U, Stalder A, Bauer J y Otten U. Expression of functional trk protooncogene in human monocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:5423-5427, 1993.
104. Melamed I, Turner CE, Aktories K, Kaplan DR y Gelfand EW. Nerve growth factor triggers microfilament assembly and paxillin phosphorylation in human B lymphocytes. *J Exp Med* 181:1071-1079, 1995.
105. Tagliatela G, Angelucci L, Scaccianoce S, Foreman PJ y Perez-Polo JR. Nerve growth factor modulates the activation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis during the stress response. *Endocrinology* 129:2212-2218, 1991.
106. Vidaltamayo R, Sánchez-Soto MC, Rosenbaum T, Martínez-Merlos MT e Hiriart M. Neuron-like phenotypic changes in pancreatic β cells induced by NGF, FGF, and dbcAMP. *Endocrine* 4:19-26, 1996.
107. Rosenbaum T, Sanchez-Soto MC e Hiriart M. Nerve growth factor increases insulin secretion and barium current in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 50:1755-62, 2001.
108. Rosenbaum T, Vidaltamayo R e Hiriart M. Effects of NGF on Ca^{2+} and Na^{+} currents of pancreatic β cells. *Biophys J* 74:A327, 1998.
109. Rosenbaum T, Vidaltamayo R, Sánchez-Herrera D e Hiriart M. Nerve growth factor increases sodium current in pancreatic beta cells. *J Memb Biol* 153:53-58, 1996.

110. Rosenbaum T, Castanares DT, López-Valdes HE e Hiriart M. Nerve growth factor increases L-type calcium current in pancreatic beta cells in culture. *J Membr Biol* 186:177-184, 2002.
111. Rosenbaum T, Vidaltamayo R, Sánchez-Soto MC, Zentella A e Hiriart M. Pancreatic beta cells synthesize and secrete nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:7784-7788, 1998.
112. Sima AAF y Shafrir E. Animal Models of Diabetes. Harwood Academic Publishers. Singapore, 2001.
113. Rakieten N, Rakieten MC, Nadkarn MV. Studies on the diabetogenic action of Streptozotocin (NSC-37917). *Cancer Chemotherapy Res* 29:91-98, 1963.
114. Like AA, Rossini AA. Streptozotocin induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes *mellitus*. *Science* 193:415-417, 1976.
115. Schnedl WJ, Ferber S, Jonson JH y Newgard CB. STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. *Diabetes* 43:1326-1333, 1994.
116. Bolzan AD y Bianchi MS. Genotoxicity of streptozotocin. *Mutat Res* 512:121-134, 2002.
117. Yamamoto H, Uchigata Y y Okamoto H. Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly(ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. *Nature* 294:284-286, 1981.

118. Morgan NG, Cable HC, Newcombe N y Williams GT. Treatment of cultured pancreatic B-cells with streptozotocin induces cell death and by apoptosis. *Biosci Rep* 14:243-250, 1994.
119. Delaney CA, Dunger A, Di Mateo M, Cunninham JM, Green MH y Green IC. Comparison of inhibition of glucose-stimulated insulin secretion in rat islets of Langerhans by streptozotocin and methyl and ethyl nitrosoureas and methanesulphonates. Lack of correlation with nitric oxide-releasing or O⁶-alkylating ability. *Biochem Pharmacol* 50:2015-2020, 1995.
120. Elsner M, Guldbakke B, Tiedge M, Munday R y Lenzen S. Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. *Diabetologia* 43:1528-1533, 2000.
121. Kröncke KD, Fehsel K, Sommer A, Rodríguez ML y Kolb-Bachofen V. Nitric oxide generation during cellular metabolization of the diabetogenic N-methyl-N-nitrosourea streptozotocin contributes to islet cell DNA damage. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 376.179-185, 1995.
122. Turk J, Corbett JA, Ramanadham S, Boher A, McDaniel ML. Biochemical evidence of nitric oxide formation from streptozotocin in isolated pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun* 197.1458-1464, 1993.
123. Bedoya FJ, Solano F, Lucas M, N-monomethyl-arginine and nicotinamide prevent streptozotocin-induced double strand DNA break formation in pancreatic rat islets. *Experientia* 52.344-347, 1996.

124. Matsumoto S, Koshiishi I, Inoguchi T, Nawata H y Utsumi H. Confirmation of superoxide generation via xanthine oxidase in streptozotocin-induced diabetic mice. *Free Radic Res* 37:767-72, 2003
125. Nukatsuka M, Yoshimura Y, Nishida M y Kawada J. Importance of the concentration of ATP in rat pancreatic beta cells in the mechanism of streptozotocin-induced cytotoxicity. *J Endocrinol* 127:161-165, 1990.
126. Nukatsuda M, Yoshimura Y, Nishida M y Kawada J. Allopurinol protects beta cells from the cytotoxic effect of streptozotocin: *in vitro* study. *J Pharmacobiodyn* 13:259-262, 1990.
127. Sandler S y Swenne I. Streptozotocin, but not alloxan, induces DNA repair síntesis in mouse pancreatic islets *in vitro*. *Diabetologia* 25:444-447, 1983.
128. Heller B, Burkle A, Radons J, Fengler E, Jalowy A, Muller M, Burkart V y Kolb H. Analysis of oxygen radical toxicity in pancreatic islets at the single cell level. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 375:597-602, 1994.
129. Larrieta ME, Vital P, Mendoza-Rodríguez A, Cerbón M e Hiriart M. Nerve Growth Factor Increases in Pancreatic β Cells After Streptozotocin-Induced Damage in Rats. *Exp Biol Med* 231:396-402, 2006.
130. Morimoto S, Mendoza-Rodríguez CA, Hiriart M, Larrieta ME, Vital P y Cerbón MA. Protective effect of testosterone on early apoptotic damage induced by streptozotocin in rat pancreas. *J Endocrinol* 187:217-24, 2005.

131. West E, Simon O y Morrison EY. Streptozotocin alters pancreatic beta-cell responsiveness to glucose within six hours of injection into rats. *West Indian Med J* 45:60-62, 1996.
132. Nonogaki K, Moser A H, Shigenaga J, Feingold KR y Grunfeld C. Beta-nerve growth factor as a mediator of the acute phase response *in vivo*. *Bioch Biophys Res Comm* 219:956–961, 1996.
133. Lorez H, Keller F, Ruess G y Otten U. Nerve growth factor increases in adult brain after hypoxic injury. *Neurosci Lett* 98:339-344, 1989.
134. Hutter P, Johansson M, Saria A y Humpel C. Acute and chronic noradrenergic regulation of neurotrophin messenger RNA expression in rat hippocampus: evidence from lesions and organotypic culture. *Neurosci* 70:15-29, 1996.
135. Yu J, Pizzo DP, Hutton LA, Pérez-Polo RJ. Role of cholinergic system in the regulation of neurotrophin synthesis. *Brain Res* 705:247-254, 1995.
136. Yu J, Wiley RG, Pérez-Polo RJ. Altered NGF protein levels in different brain areas after immunolesion. *J Neurosci Res* 43:213-223, 1996.
137. Nitta A, Furukawa Y, Hayashi K, Hiramatsu M, Kamayama T, Hasegawa T y Nabeshima T. Denervation of dopaminergic neurons with 6-hydroxydopamine increases nerve growth factor content in rat brain. *Neurosci Lett* 144:152-156, 1992.

138. Strauss S, Otten U, Joggerst B, Pluss K y Volk B. Increased levels of nerve growth factor (NGF) protein and mRNA and reactive gliosis following kainic acid injection into the rat stratum. *Neurosci Lett* 168:193-196, 1994.
139. Enfors P, Bengzon J, Kokaia Z, Persson H y Lindvall O. Increased levels of messenger RNAs for neurotrophic factors in the brain during kindling epileptogenesis. *Neuron* 7:165-176, 1991.
140. Lauterborn JC, Isackson PJ y Gall CM. Seizure-induced increases in NGF mRNA exhibit different time courses across forebrain regions and are biphasic in hippocampus. *Exp Neurol* 125:22-40, 1994.
141. DeKosky ST, Goss JR, Miller PD, Styren SD, Kochanek PM y Marion D. Upregulation of nerve growth factor following cortical trauma. *Exp Neurol* 130:173-177, 1994.
142. Heumann R, Korsching S, Bandtlow C y Thoenen H. Changes of nerve growth factor synthesis in nonneuronal cells in response to sciatic nerve transection. *J Cell Biol* 104:1623-1631, 1987.
143. Shetty AK, Rao MS, Hattiangady B, Zaman V, Shetty GA. Hippocampal neurotrophin levels after injury: Relationship to the age of the hippocampus at the time of injury. *J Neurosci Res* 78:520-532, 2004.
144. Chiaretti A, Genovese O, Riccardi R, Di Rocco C, Di Giuda D, Mariotti P, Pulitano S, Piastra M, Polidori G, Colafati GS, Aloe L. Intraventricular nerve growth factor infusion: a possible treatment for

- neurological deficits following hypoxic-ischemic brain injury in infants. *Neurol Res* 27:741-746, 2005.
145. Pierucci D, Cicconi S, Bonini P, Ferrelli F, Pastore D, Matteucci C, Marselli L, Marchetti P, Ris F, Halban P, Oberholzer J, Federici M, Cozzolino F, Lauro R, Borboni P y Marlier LN. NGF-withdrawal induces apoptosis in pancreatic beta cells *in vitro*. *Diabetologia* 44:1281-1295, 2001.
146. Navarro-Tableros V, Sánchez-Soto M C, Sánchez A, García S e Hiriart M. Autocrine regulation of single pancreatic β cell survival. *Diabetes* 53:2018–2023, 2004.
147. Hetman M y Xia Z. Signaling pathways mediating anti-apoptotic action of neurotrophins. *Acta Neurobiol Exp* 60:531-545, 2000.
148. Leibiger IB, Leibiger B y Berggren PO. Insulin feedback action on pancreatic β -cell function. *FEBS Lett* 532:1-6, 2002.
149. Patel YC, Cameron DP, Bankier A, Malaisse-Lagae F, Ravazzola M, Studer P y Orci L. Changes in somatostatin concentration in pancreas and others tissues of streptozotocin diabetic rats. *Endocrinology* 103:917-923, 1978.
150. Li Z, Karlsson FA y Sandler. Islet loss and alpha cell expansion in type 1 diabetes induced by multiple low-dose streptozotocin administration. *J Endocrinol* 165:93-99, 2000.
151. Rahier J, Goebbels RM, Henquin JC. Cellular composition of the human diabetic pancreas. *Diabetologia* 24:366-371, 1983.