

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA, ESTRUCTURAL Y
FUNCIONAL DE CÉLULAS ALFA Y BETA
PANCREÁTICAS DURANTE LA LACTANCIA EN RATAS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA

CRISTINA AGUAYO MAZZUCATO

Tutor Académico: DRA. MARCIA HIRIART URDANIVIA

MÉXICO DF

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

Agradezco a la **Dra. Marcia Hiriart**, mi tutora académica y a los miembros del comité tutorial, la **Dra. Verónica Guarner Lans** y el **Dr. Gabriel Gutierrez Ospina** por todo lo que han hecho por mí durante estos seis años. Siempre fueron generosos con su tiempo y sus ideas se ven reflejadas en cada una de las partes de esta tesis. Su apoyo, sugerencias y todas las oportunidades brindadas facilitaron e hicieron mucho más grato el desarrollo de este trabajo.

Al **Dr. Flavio M Mena Jara**, **Dra. Diana María Escalante Alcalde**, **Dr. Flavio Benito Robles Díaz**, **Dr. Alfonso Carabez Trejo** y **Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes** miembros del jurado. Sus opiniones enriquecieron y beneficiaron la estructura final de esta tesis. Sus comentarios contribuyeron visiblemente a llenar los vacíos que de otro modo hubieran prevalecido.

Al **Dr. Alejandro Zentella Dehesa**, **Dra. Maria Eugenia Mendoza Garrido**, **Dra. Carmen Aceves Velasco**, **Dr. Agustín Guerrero Hernández** y **Dra. Cristina Fernández Mejía** del Comité de Candidatura que a la mitad del camino abrieron un espacio de reflexión y confianza que me permitieron llegar al final de este proceso.

Al **Dr. Mario Calcagno** y la **Dra. Myriam M. Altamirano** por abrirme las puertas a la Investigación y enseñarme que hay que amar lo que se hace.

A **Carmen Sánchez Soto** por todo su apoyo durante todo este tiempo.

A los siguientes **Departamentos del Instituto de Fisiología Celular** de la **UNAM** por todo su apoyo: **Bioterio, Microscopía, Cómputo, Biblioteca, Histología y Biología Molecular.**

A mis compañeros de laboratorio: **Román, Víctor, Ricardo, Siraam, Elvira, Elena, Paz, Victoria, Raquel, Liz, Tanya, Santiago, Álvaro, Alejandro, Félix, Pedro, Gabriela, Samuel, Laura** por hacerlo todo, siempre, más divertido.

A CONACYT y DGEP por el financiamiento.

ÍNDICE

RESUMEN.....	5
ABSTRACT.....	6
I. INTRODUCCIÓN.....	7
1. LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA.....	7
1.1 Regulación plasmática de glucosa.....	9
1.1.1 Insulina.....	9
1.1.2 Glucagon.....	14
1.3 Desarrollo de la homeostasis de la glucosa.....	15
2. EL PÁNCREAS.....	17
2.1 Anatomía.....	17
2.2 Desarrollo embrionario.....	17
2.3 Estructura.....	19
3. LA CÉLULA BETA.....	21
3.2 Función.....	23
3.2.1 Regulación de la síntesis de insulina.....	23
3.2.2 Secreción de insulina.....	28
3.2.3 El desarrollo de la secreción de insulina.....	35
3.3 Productos de secreción.....	40
3.3.1 Insulina.....	40
3.3.2 GABA.....	44
3.3.3 Factor de crecimiento neuronal (NGF).....	48
4. LA CÉLULA ALFA.....	63
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	65
III. METODOLOGÍA.....	67
IV. RESULTADOS.....	77
1. CRECIMIENTO DURANTE EL PRIMER MES DE VIDA.....	77
2. CAMBIOS FISIOLÓGICOS.....	79
3. REORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL DEL ISLOTE.....	86
4. CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES.....	98
5. EFECTO DEL NGF SOBRE LAS CÉLULAS BETA.....	106
V. DISCUSIÓN.....	120
VI. CONCLUSIONES.....	139
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	141

RESUMEN

Las ventanas críticas se caracterizan por cambios estructurales y funcionales de los órganos en desarrollo. En este trabajo estudiamos la lactancia en ratas como una posible ventana crítica en el desarrollo posnatal del páncreas endocrino.

Analizamos los cambios en los niveles sanguíneos de glucosa y hormonas durante este periodo y su asociación con cambios morfológicos y funcionales en las poblaciones de células alfa y beta. Al día 20 (d20), los niveles plasmáticos de insulina eran el doble que los observados al d6 mientras que los niveles de glucosa eran seis veces mayores que en el d6. Este período de hyperglucemia e hyperinsulinemia se acompañó de una resistencia periférica a la insulina. Simultáneamente observamos una reorganización estructural de islotes, cambios en la masa de células endocrinas y cambios en el tamaño de agregados de células alfa y beta.

Exploramos al factor de crecimiento neuronal (NGF) como factor de maduración funcional de células beta. Al d20 las células beta en cultivo secretaban la misma cantidad de insulina en 5.6 mM glucosa, 15.6 mM glucosa y la presencia de NGF no alteraba esta relación. Al d28 las células beta duplicaron y triplicaron la secreción de insulina en respuesta a glucosa y NGF. El NGF triplicó la expresión del gene de insulina.

Estos resultados sugieren que la lactancia en ratas es una ventana crítica en el desarrollo posnatal del páncreas y que el NGF es uno de los factores de maduración funcional de células beta.

ABSTRACT

A critical window is a period of important structural and functional changes during organ development. We explored the lactation period as a possible critical window in the postnatal development of the endocrine pancreas.

The changes in blood glucose and hormones and their association with morphological and functional changes of alpha and beta cell populations were studied during this period.

At day 20 (d20), insulin and glucose plasma levels were two- and six-fold higher, respectively, as compared to d6. This reflects a period of physiological hyperglycemia and hyperinsulinemia, where peripheral insulin resistance and a high plasmatic concentration of glucagon were also observed. These functional changes were paralleled by reorganization of islet structure, cell mass and aggregate size of alpha and beta cells.

Cultured beta cells from d20 secreted the same amount of insulin in 15.6 mM glucose than in basal conditions (5.6 mM). However, beta cells from d28 were already glucose sensitive.

We explored if NGF could be a trophic factor that promotes the maturation of beta cell function in postnatal life. By d28 beta cells increased insulin secretion by three-fold in response to NGF which also increased insulin mRNA by three-fold.

These results suggest that the lactation period in rats is a critical window and that NGF is a functional maturation factor for beta cells during postnatal development.

I. INTRODUCCIÓN

1. HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA

La glucosa es la principal fuente de energía en organismos eucariontes y juega un papel central en la homeostasis metabólica y celular del cuerpo ya que actúa como una fuente primaria para generar adenosina-5'-trifosfato (ATP) (Gould GW et al., 1993; Joost HG et al., 1994).

Es importante mantener los niveles de glucosa dentro de rangos fisiológicos ya que la falta de este azúcar deriva en convulsiones, pérdida de la conciencia y daño celular irreversible. En el otro extremo, concentraciones elevadas de glucosa sanguínea tienen un efecto negativo, conocido como glucotoxicidad, que puede resultar en ceguera, insuficiencia renal, nefropatía, enfermedad cardíaca y vascular (Sheperd PR et al., 1999, Kaiser N et al., 2003); todos ellos complicaciones de la *Diabetes mellitus*, patología caracterizada por niveles elevados de glucosa circulante.

El páncreas es un órgano esencial en la homeostasis de la glucosa ya que produce hormonas que controlan el metabolismo celular y orquestan los niveles sanguíneos del metabolito. La insulina es la principal hormona hipoglucemiante, su acción es anabólica y los tejidos sobre los cuales tiene mayor efecto son el hígado, el músculo y el tejido adiposo. Esta hormona es secretada por las células beta pancreáticas que responden a la glucosa como principal estímulo de la secreción (Fig. 1). Concentraciones elevadas de glucosa durante tiempos prolongados tienen efectos negativos sobre la función de las células beta con un incremento en la sensibilidad a glucosa, secreción

basal de insulina elevada, reducción en la respuesta máxima secretora y una depleción gradual de las reservas celulares de insulina (Kaiser N et al 2003).

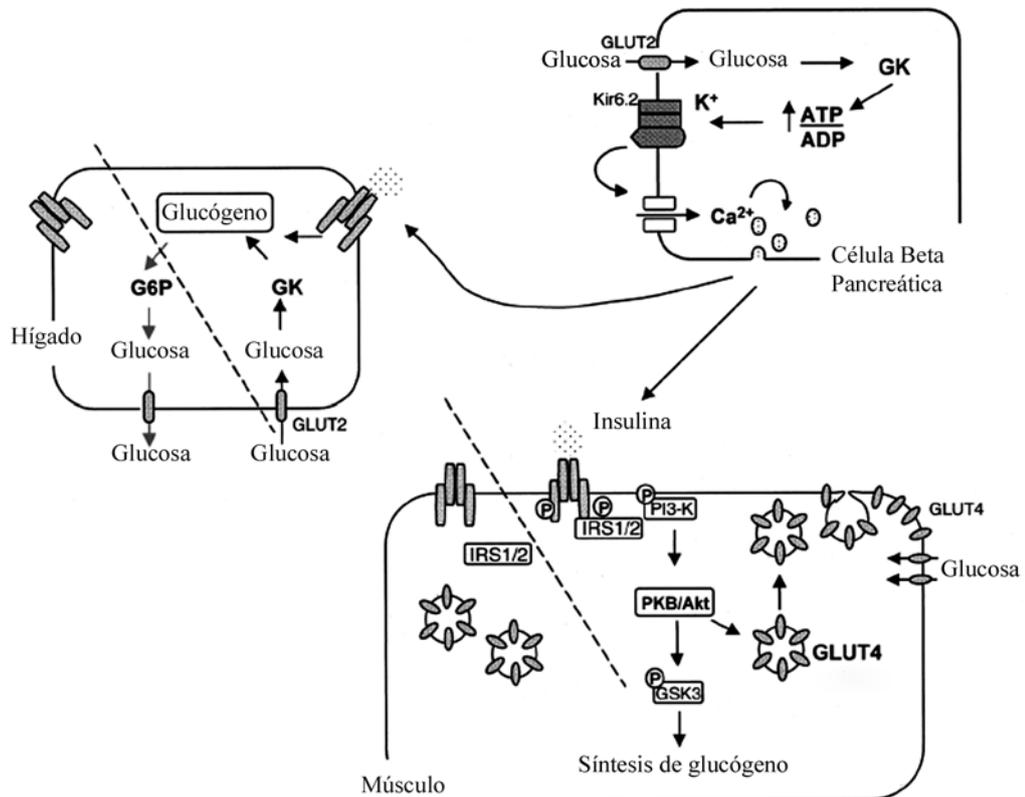


Fig. 1 Mecanismo de la secreción de insulina inducida por glucosa en células beta y sus efectos en tejidos periféricos. *Modificado de Scheepers A 2004*

Las células alfa pancreáticas producen glucagon, una de las hormonas contrarreguladoras de la insulina. El glucagon mantiene los niveles de glucosa durante el ayuno a través de sus efectos sobre el hígado. La diabetes se caracteriza por niveles elevados de glucagon lo que agrava la hiperglucemia que se observa en esta patología.

1.1 Regulación plasmática de glucosa

1.1.1 Insulina

Existe una estrecha relación entre los niveles de glucosa circulante y la insulina presente en el torrente sanguíneo (Fig. 2). Al incrementar la glucosa sanguínea en el período posprandial, también los niveles de insulina permanecen elevados hasta que los efectos periféricos de la hormona reducen la glucosa plasmática a valores basales.

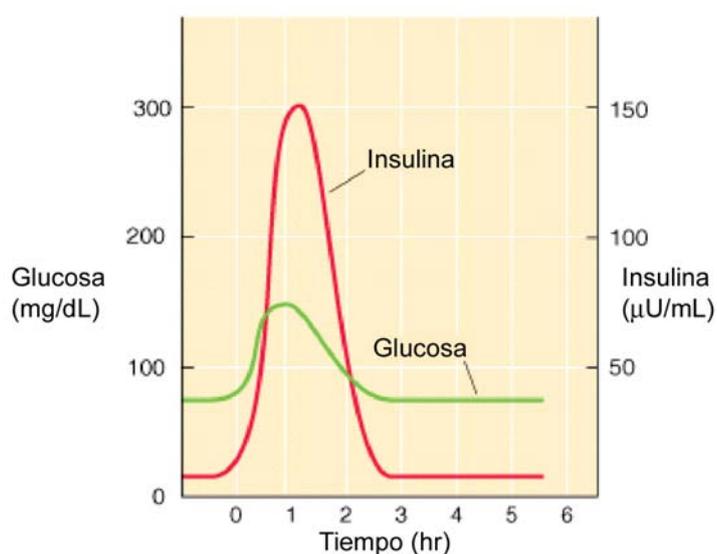


Fig. 2 Prueba oral de tolerancia a la glucosa en humanos adultos. En respuesta a una carga oral de glucosa (75 g) la concentración plasmática de glucosa incrementa de forma paulatina lo que refleja la captura intestinal de glucosa. En respuesta, las células beta pancreáticas secretan insulina por lo que los niveles plasmáticos de la hormona incrementan rápidamente. *Modificado de Boron et al. 2003*

Resulta interesante resaltar que después de una inyección intravenosa de glucosa, la secreción de insulina sigue una secreción bifásica característica (Fig. 3). La interpretación de esta cinética secretora implica a los gránulos anclados en la membrana de la célula beta como responsables de la primera fase de la secreción mientras que la segunda obedece a insulina que está siendo sintetizada y procesada mientras los niveles de glucosa permanecen elevados.

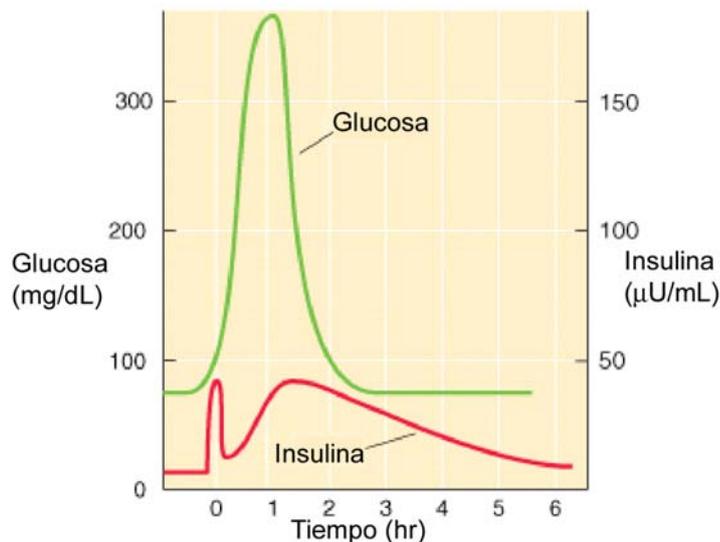


Fig. 3 Prueba intravenosa de tolerancia a la glucosa en humanos adultos. Tras una infusión intravenosa de glucosa (0.5 g glucosa/kg peso corporal en una solución de glucosa al 25%) el incremento de glucosa plasmática es mucho más rápido que tras una carga oral. En respuesta a este incremento la secreción de insulina es bifásica. Las células beta primero liberan los depósitos de insulina almacenada que explica la fase aguda tras lo cual sigue la fase crónica que puede durar mientras duren los niveles elevados de glucosa. IV, intravenosa. *Modificado de Boron et al. 2003*

La insulina ejerce sus efectos sobre tejidos periféricos a través de sus receptores cuya estructura es heterotetramérica formada por dos cadenas alfa extracelulares y dos cadenas transmembranales beta. La unión de insulina se lleva a cabo en la región rica en cisteínas de las cadenas alfa. La porción intracelular del receptor tiene actividad de cinasa de tirosinas.

El receptor activado traduce la señal (Fig. 4) a través de la fosforilación de residuos de tirosina dentro del receptor, en la familia de substratos del receptor de insulina (IRS-1, 2, 3,4) y otras proteínas citosólicas como SHC. Existen dos vías de transducción principales. La primera involucra la activación de la cinasa de fosfatidil inositol 3 (PI3K) que promueve la inserción de los transportadores GLUT4 en la membrana plasmática y promueve la síntesis de glucógeno.

La segunda vía el receptor de insulina fosforila a SHC en residuos de tirosina los que estimula a SOS y la vía de las MAPK.

La vía de señalización de insulina en músculo y tejido adiposo aumenta la localización membranal de GLUT4 aumentando la captura de glucosa por estos tejidos (Simpson IA et al., 1986, Sheperd PR et al, 1999). Si se altera la expresión de GLUT4 los efectos de la insulina sobre las concentraciones plasmáticas de glucosa serán inefectivos (Wallberg-Henriksson H et al., 2001). Se ha propuesto que en la diabetes mellitus tipo 2 una alteración en el transportador GLUT4 puede explicar parcialmente la resistencia periférica a la insulina que se observa en esta patología (Cline GW et al., 1999).

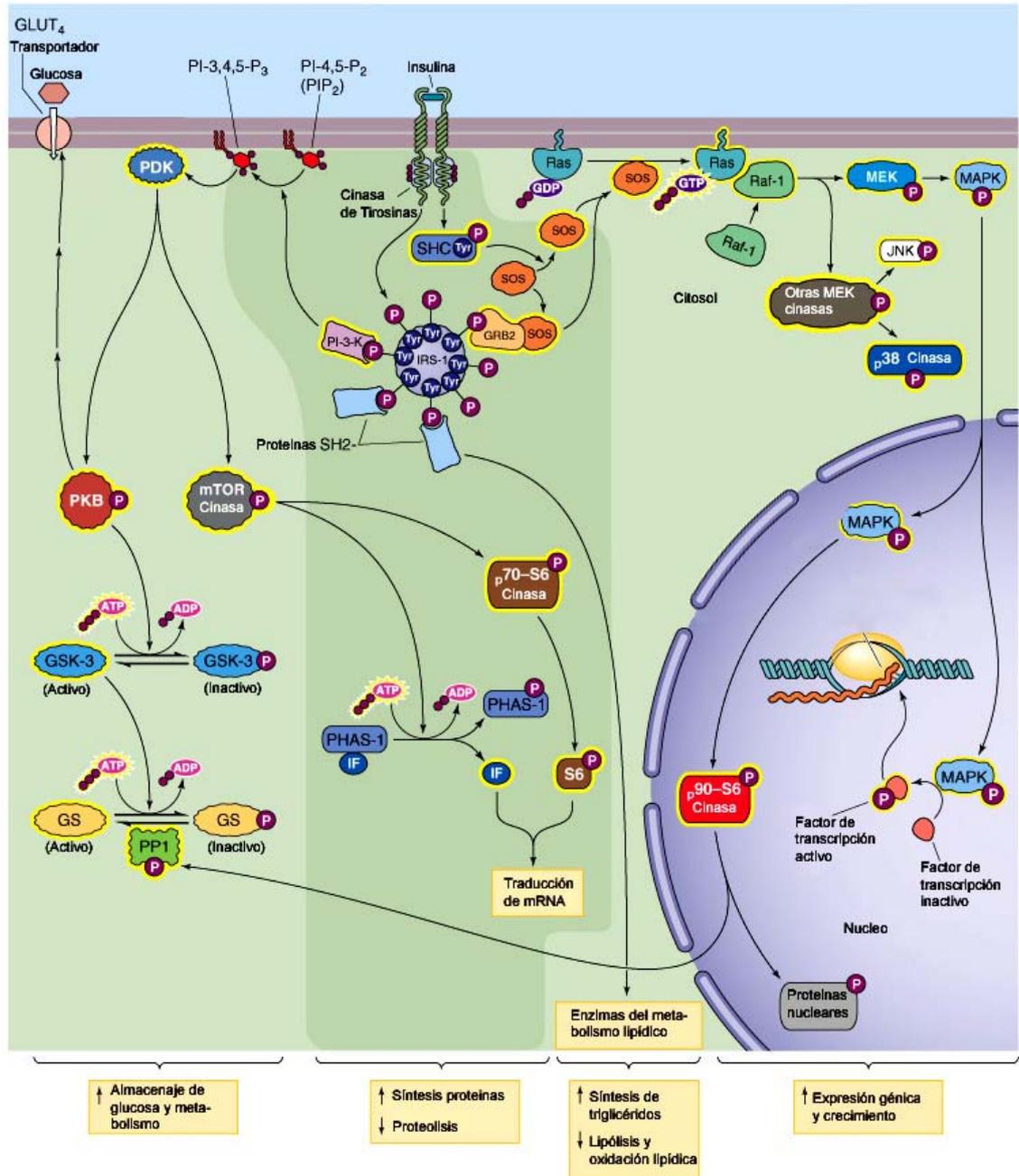


Fig. 4 Vía de traducción de la insulina al unirse a su receptor de la familia de cinasa de tirosinas. Modificado de Boron et al. 2003

Efectos periféricos de la insulina

Los efectos periféricos de la glucosa se estudian principalmente en tres tejidos, hígado, músculo y tejido adiposo donde se regula el metabolismo de carbohidratos, proteínas y grasas en respuesta a la insulina plasmática.

La insulina tiene cuatro efectos principales sobre las células hepáticas:

1. Promueve la síntesis de glucógeno e inhibe la degradación de glucógeno.
2. Promueve la glucólisis y la oxidación de la glucosa.
3. Promueve la síntesis y almacenamiento de lípidos e inhibe su oxidación.
4. La insulina promueve la síntesis de proteínas e inhibe su degradación.

Los efectos de la insulina en el músculo son los siguientes:

1. La insulina promueve la captura de glucosa a través de la traslocación de GLUT4 a la membrana plasmática.
2. Promueve la síntesis de glucógeno a partir de glucosa.
3. Promueve la glucólisis y la oxidación de carbohidratos. Estas acciones son similares a las que la insulina tiene sobre el hígado sin embargo en músculo no hay gluconeogénesis.
4. Promueve la síntesis de proteínas e inhibe su degradación.

Existen cuatro efectos de la insulina sobre los adipocitos.

1. La hormona aumenta la captura de glucosa del tejido adiposo al favorecer la inserción de GLUT4 en la membrana plasmática.
2. Promueve la glucólisis y promueve la conversión de piruvato a ácidos grasos libres.
3. Promueve la síntesis y almacenamiento de triglicéridos.
4. Promueve la captura de ácidos grasos por el adipocito.

1.1.2 Glucagon

El glucagon es una hormona contrarreguladora de la insulina con efectos hiperglucemiantes (Fig. 5). La secreción de glucagon aumenta en periodos de la hipoglucemia y es controlada por nutrientes como amino ácidos, hormonas y neurotransmisores (Pipeleers et al., 1985, Rorsman P 1991 et al., Brunicardi et al., 1995).

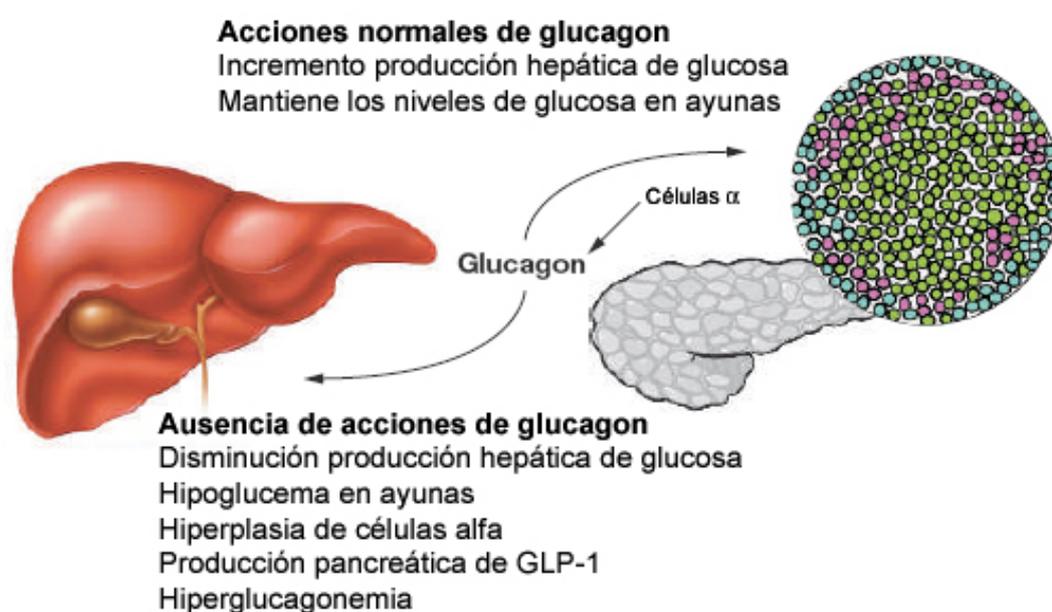


Fig 5. Representación de las acciones normales del glucagon en el hígado y páncreas. GLP-1- péptido parecido al glucagon. *Modificado de Drucker DJ 2005*

El glucagon ejerce sus acciones a través de un receptor acoplado a una proteína G_s , activando la cascada de adenil ciclasa/ AMP_c /PKA.

Las acciones dominantes del glucagon pancreático convergen en la regulación de la producción hepática de glucosa. El glucagon en el hígado promueve la degradación de glucógeno, estimula la gluconeogénesis y la oxidación de grasa.

En la diabetes tipo 2 se observan niveles elevados de la hormona que aunado a la deficiencia de insulina contribuye a la hiperglucemia (Unger RH et al., 1975).

1.3 El desarrollo de la homeostasis de la glucosa

La orquestación de la regulación de la glucosa requiere la sincronización de mecanismos complejos que se determinan, en parte, durante el desarrollo del organismo.

El desarrollo del páncreas resulta de particular importancia ya que los niveles sanguíneos de glucosa son regulados por hormonas del islote pancreático secretadas por células alfa y beta. Para alcanzar un control glucémico efectivo en el adulto es importante el desarrollo posnatal del páncreas.

Los órganos pasan etapas conocidas como ventanas críticas del desarrollo. Estos períodos de tiempo se caracterizan porque existen cambios importantes en la estructura y función del órgano. Así mismo, se ha observado que durante las ventanas críticas los órganos son especialmente vulnerables a cambios en el ambiente o agresiones externas las cuales interfieren con los cambios en estructura y función teniendo repercusiones que permanecen en la vida adulta (Lucas A 1998). Resulta importante identificar y caracterizar estas ventanas críticas como una herramienta para entender varias de las patologías crónico degenerativas que se presentan en los adultos.

El páncreas podría tener una ventana crítica durante el primer mes de vida de la rata lo que tendría repercusiones en la regulación corporal de

glucosa y podría ser un elemento a considerar en la fisiopatología de la *diabetes mellitus*.

En la rata, este periodo inicia al nacimiento y es seguido por el período de lactancia hasta el destete al d21. La alimentación en esta etapa esta constituida por leche materna la cual está formada predominantemente por grasas.

En ratas, si la dieta es cambiada por una rica en carbohidratos, se desarrolla hiperinsulinemia y obesidad en la etapa adulta (Aalinkeel R et al., 1999, Aalinkeel R et al., 2001, Srinivasan M et al., 2003). En este modelo de alimentación también se observan cambios en el tamaño, número y distribución de los islotes (Petrik J et al., 2001), así como un incremento en la secreción de insulina *in vitro* (Srinivasan M et al., 2000). Estas alteraciones derivan en mayor riesgo de diabetes mellitus tipo 2 en la edad adulta (Aalinkeel R et al., 2001, Srinivasan M et al., 2003).

2. EL PÁNCREAS

2.1 Anatomía

El páncreas se divide en cabeza, cuerpo y cola. La cabeza se localiza en la curva del duodeno; el cuerpo se localiza en la parte posterior del estómago y la cola se proyecta hacia el ligamento esplenorenal hacia el hilio del bazo.

2.2 Desarrollo embrionario del páncreas

Los tres tipos celulares del páncreas (endocrino, exocrino y ductal) se derivan de células endodérmicas de la región duodenal superior. El desarrollo inicia con la formación de una yema ventral y otra dorsal del epitelio intestinal. La yema ventral se forma como una evaginación del divertículo hepático proximal y da lugar al conducto pancreático principal, el proceso uncinado y a la porción inferior de la cabeza del páncreas. La yema dorsal, que en la rata aparece en el día 11 de gestación, proviene de una evaginación de la porción proximal del duodeno y forma el conducto pancreático accesorio así como la cola, cuerpo y porción superior de la cabeza del páncreas (Johnson KE 1988).

Aún no se han esclarecido los factores que controlan el reclutamiento de dichas células en la formación final del páncreas. Sin embargo se han identificado varios factores de transcripción importantes en la diferenciación de dicho órgano (Tabla 1).

Tabla 1. Desarrollo pancreático en roedores. *Modificado de Jensen J*

2004.

Día	Evento	Morfología	Expresión génica
Gastrulación E6.5-E7.5	Formación de capas germinales	Formación de mesodermo y endodermo	Foxa2 en endodermo
6-10 somitas E8-8.5(ratón) E10-10.5(rata)	Determinación y transición primaria	Identificación de intestino primitivo, páncreas no es visible. Contacto del endodermo con la notocorda. La señalización es necesaria.	Isl1 es expresado en el mesénquima dorsal.
10-20 somitas E8.5-9.5(ratón) E10.5-11(rata)	Rotación del embrión	Formación de la aorta dorsal. Movimiento ventral del endodermo. Se acumulan células del mesodermo formando el mesodermo esplácnico.	Isl1 e Isl2 en el mesodermo. Activación de Pdx1. Expresión de HlxB9
20-25 somitas E9.5-10(ratón) E11-11.5(rata)	Protrusión	Engrosamiento de las paredes dorsales y ventrales del intestino seguido por la protrusión dorsal. Mesodermo pancreático se acumula dorsalmente.	Nkx6.1 se activa. Acúmulos de células positivas a glucagon. Expresión de Isl1 y Pax6 en células endocrinas. Expresión de ngn3.
26-30 somitas E10(ratón) E11.5(rata)		Acumulación de mesodermo en la parte izquierda del intestino primitivo genera asimetría. Se estrecha la base de la protrusión dorsal. Aparece protrusión ventral cerca de la protrusión hepática.	Pitx2 involucrado en determinar derecha/izquierda del intestino primitivo.
>30 somitas E10.5-11(ratón) E12-12.5(rata)		Protrusión epitelial continúa. Inicia la ramificación. Mitosis alcanza un pico en el mesénquima e inicia la innervación (50 somitas)	NeuroD, Ptf1a se expresan. Epitelio expresa E-caderina y beta-catenina
E12(ratón) E14(rata)	Ramificación visible	Separación de mesénquima y epitelio.	Hnf6 en el epitelio.
E14(ratón) E15.5(rata)	Expansión epitelial	Protodiferenciación del epitelio	Nkx6.1, Pdx1, Nkx2.2 se expresan de manera homogénea en el epitelio.
		Expresión baja de marcadores terminales como insulina, amilasa y CPA	Pax6 y NeuroD esparcidas
		Fusión del páncreas dorsal y ventral	Notch 1,2, Hes1 en el epitelio
		Porcentaje alto de mesénquima que disminuye gradualmente por crecimiento epitelial. Vascularización.	
<i>La expansión epitelial se sobrepone al inicio de la transición secundaria.</i>			
E13.5(ratón) E15(rata)	Transición secundaria	Diferenciación terminal de células beta y compartimientos exocrinos	>100 veces la expresión de insulina y genes exocrinos
		Aparecen gránulos de cimógenos. Aparición esparcida de células beta maduras.	Pdx1, Nkx6.1, Nkx2.2 se restringen a células beta. Activación de Pax4. Pico de expresión de ngn3.
E15-E19(ratón) E17-21(rata)	Isletogénesis	Células endocrinas se agregan en islotes de Langerhans. Se alcanza la ultraestructura del páncreas exocrino. Órgano funcional al nacimiento.	Aparición de células delta (aprox. E15) y de células PP
P1-P30	Crecimiento	Incremento en masa de tejido. El alto porcentaje de células endocrinas en la fase posnatal tardía es sustituido por tejido conectivo el cual crece masivamente en este período y se organiza en acinos compactos.	Activación de tripsina y CPB (P1)

E- día embrionario; P- día posnatal

2.3 Estructura

El páncreas es una glándula mixta con tres tipos celulares principales: endocrinas, exocrinas y del conducto pancreático (Bullock et al., 1991).

Las células del conducto pancreático forman una extensa red por cuya luz circulan las secreciones acinares hacia el duodeno. Al mismo tiempo, dichas células secretan jugo pancreático con un alto contenido de bicarbonato (HCO_3^-).

Las células exocrinas se encuentran agrupadas en acinos y constituyen la mayoría de la masa total del páncreas. Producen varias proenzimas digestivas que se secretan a la luz de los conductos responsables de la digestión de macromoléculas presentes en la dieta y activadas en el duodeno (Cotran RS et al., 1994).

El páncreas endocrino está constituido por los islotes pancreáticos, que forman cerca del 2% del tejido del páncreas y su secreción es hacia la circulación sanguínea. Se han identificado cuatro tipos celulares que los constituyen (Tresguerres JAF 1993) (Fig. 6):

1.- Células alfa. Representan el 15% de las células insulares y secretan glucagon, proteína de 29 amino ácidos con acción hiperglucemiante mediante la estimulación de glucogenólisis y gluconeogénesis hepática.

2.- Células beta. Constituyen el 70% de las células del islote y son responsables de la síntesis y secreción de insulina así como de otros compuestos como es el factor de crecimiento neuronal (NGF) y GABA. La célula beta se tratará con mayor detalle posteriormente.

3.- Células delta. Forman el 5% del islote y son la fuente de somatostatina, un tetradecapéptido que actúa como regulador paracrino e inhibidor de la secreción de diferentes hormonas.

4.- Células pp. Comprenden el 5% de las células del islote y se encuentran en los islotes de la cabeza del páncreas en donde hay una menor proporción de células alfa y en su lugar hay células pp. Sintetizan un polipéptido de 36 amino ácidos, el polipéptido pancreático. Su papel biológico no se conoce con exactitud, pero se sabe que inhibe la secreción de insulina y somatostatina sin afectar al glucagon. Sobre el páncreas exocrino tiene un efecto inhibitorio sobre la secreción de tripsinógeno y bicarbonato. Sobre el sistema gastrointestinal hace más lentos los procesos digestivos (Bullock J 2001).

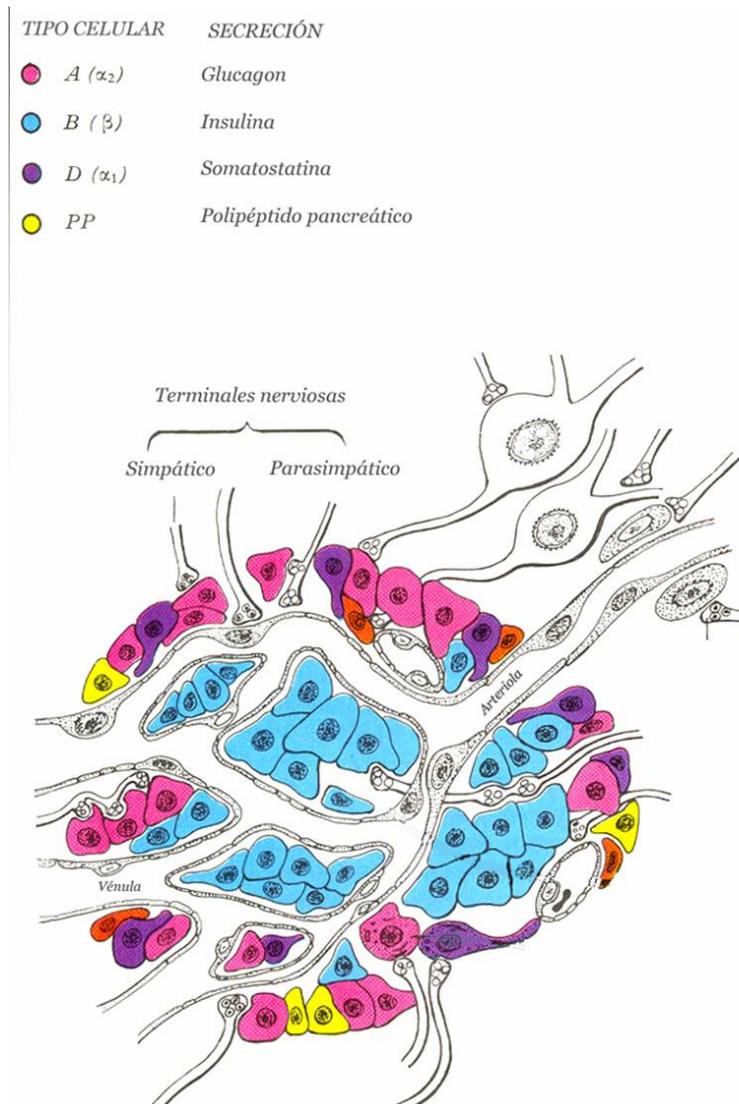


Fig. 6. Islote pancreático y distintos grupos celulares que lo comprenden. *Modificado de Williams PL et al. 1989*

3. LA CÉLULA BETA

Existen evidencias de renovación constante de células beta en el páncreas a lo largo, tanto de su desarrollo y maduración, como en el adulto. Para que sean posibles los cambios en la masa y población de células beta, existen tres procesos que subyacen el dinamismo de células pancreáticas (Bonner-Weir S 2001, Scaglia et al., 1997; Kassem S et al., 2000).

1. La neogénesis, en la cual se forman islotes nuevos a partir de células progenitoras que se localizan en el sistema ductal pancreático (Bonner-Weir S et al., 2000a). Estas células troncales son positivas a nestina y tienen la capacidad de dar origen a tejido pancreático exocrino y endocrino en la vida postnatal (Zulewsky et al., 2001). Las células progenitoras también han sido identificadas dentro de los islotes pancreáticos maduros (Hunziker E et al., 2000), sin embargo no se ha determinado el papel que juega la neogénesis en el desarrollo posnatal. La nestina es un filamento intermedio que se usa como marcador de células progenitoras neurales (Lumelsky N et al., 2001). En cultivo, estas células positivas a nestina mantienen la capacidad de proliferar y son capaces de expresar genes característicos de diferenciación hepática y pancreática exocrina y endocrina sugiriendo que podría tratarse de las células progenitoras del páncreas adulto.

2. Proliferación celular. La replicación de células beta neonatales es de aproximadamente 18% y disminuye diariamente hasta alcanzar un índice en el adulto de 2-3% al día. Por otro lado, la masa de células beta en relación a la masa total del páncreas incrementa hasta los 20 meses. Algunos trabajos sugieren que la división de células beta es la principal fuente de renovación celular tras pancreatectomía y durante la vida adulta. (Dor Y et al., 2004).

3. Apoptosis Durante el periodo neonatal se reporta la presencia de apoptosis de 1.5% (tres veces mayor que en el adulto). Entre los días 13 y 17, la apoptosis incrementa aún más (3.6%), disminuyendo posteriormente hasta alcanzar los índices observados en el adulto (0.47%) (Scaglia et al., 1997, Kassem S et al., 2000, Bonner-Weir S 2000b).

La contribución de estos procesos a la dinámica de la población de las células beta en el primer mes de vida no ha sido estudiada sin embargo se inducen varias implicaciones importantes: 1. en cualquier momento habrá células beta de diferentes edades; 2. cualquier limitación en el reemplazo de las células beta tendrá consecuencias directas sobre la homeostasis de la glucosa durante la vida adulta.

3.2 Función

Funcionalmente, las células beta se conocen principalmente por la síntesis y secreción de insulina. Sin embargo, las células beta también contienen otros productos de secreción entre los que se encuentran el ácido aminobutírico gama (GABA), el factor de crecimiento neuronal (NGF) y el polipéptido amiloideo del islote.

3.2.1 Regulación de la síntesis de insulina

La síntesis de insulina es regulada a varios niveles. Uno de los más estudiados es la regulación génica por distintos factores de transcripción. Entre ellos destaca el factor de transcripción PDX-1 (pancreatic duodenal homeobox-1).

El PDX-1 es uno de los factores de transcripción más importantes para el desarrollo pancreático durante la etapa fetal y para la síntesis de insulina en células beta adultas. El factor de transcripción PDX-1 también ha sido llamado IUF-1, IPF-1, IDX-1, STF-1 y GSF.

El PDX-1 se localiza en las células beta y delta del páncreas así como en células endocrinas dispersas en el duodeno y en el cerebro en desarrollo (Perez-Villamil B et al., 1999).

Es una proteína de 283 amino ácidos con una masa de 31 kilodaltones. Tiene un homeodominio de interacción con ADN (Ohlsson H et al., 1993, Lu M et al., 1996) y una estructura modular con dominios funcionales separados (Fig. 7). En la región intermedia tienen un homeodominio con motivo de antena rodeado por regiones ricas en prolina. Este homeodominio se une al DNA e interactúa con otras proteínas.

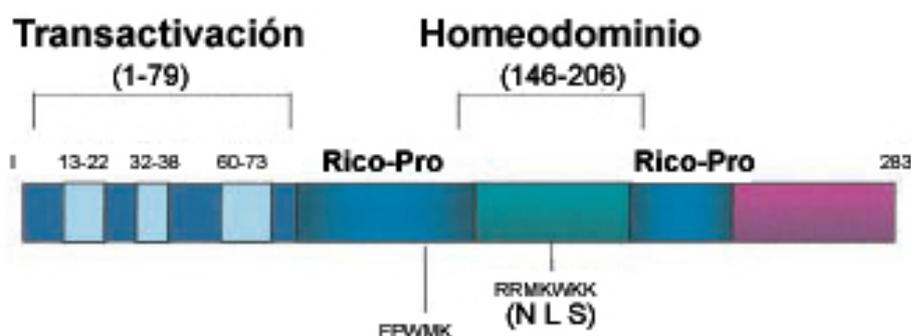


Fig. 7 Estructura de PDX-1. Representación esquemática de la estructura predicha de PDX-1 que muestra el homeodominio con motivo de antena y las dos regiones ricas en prolina. El extremo amino terminal es el dominio de activación con tres subdominios. NLS- señal de localización nuclear rica en residuos básicos dentro de la hélice tres. La secuencia carboxilo-terminal (144-283) también tiene propiedades de transactivación. *Modificado de McKinnon CM et al. 2001.*

El PDX-1 regula la expresión de varios genes encargados de mantener la identidad y función de las células beta como: insulina (Ohlsson H et al., 1993), GLUT-2 (Waeber G et al., 1996), glucocinasa (Watada H et al., 1996) y polipéptido amiloideo del islote (Serup P et al., 1996, Carty MD et al., 1997, Bretherton-Watt D et al., 1996). También regula la expresión del gene de somatostatina en las células delta del islote (Leonard J et al., 1993) y del cerebro en desarrollo (Schwartz PT et al., 2000). Se ha propuesto que autorregula su expresión (Marshak S et al., 2000) (Fig. 8).

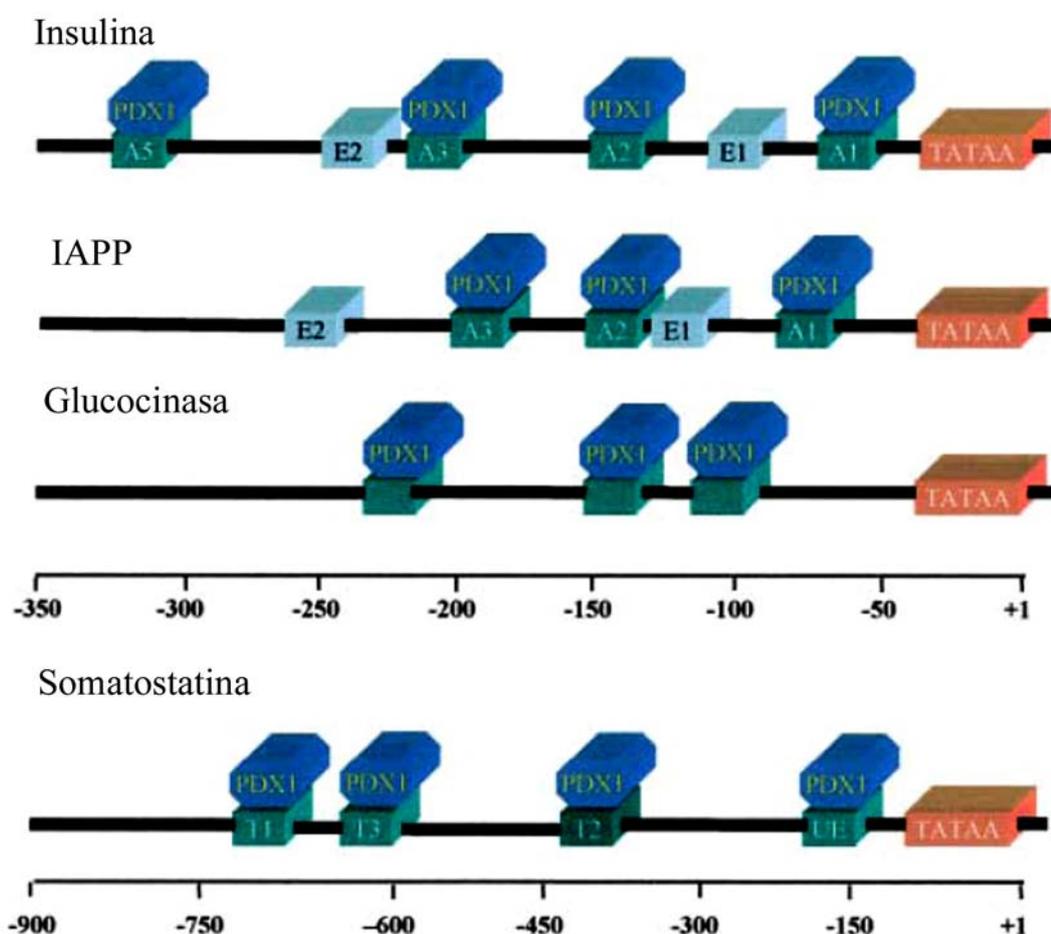


Fig. 8 Sitios de unión de PDX-1 en promotores de varios genes: insulina, AIPP, glucocinasa y somatostatina. *Modificado de McKinnon CM 2001*

Para regular su acción transcripcional, PDX-1 interactúa con otros factores de transcripción, por ejemplo con E47 y Neuro D1 para activar el promotor de insulina (Peers B et al., 1994, Glick E et al., 2000, Ohneda K et al., 2000).

La regulación del gene de PDX-1 es compleja e involucra a HNF3beta (Wu KL et al., 1997, Sharma S et al., 1997, Gerrish K et al., 2000), PDX-1 (Marshak S et al., 2000), E47/NeuroD1 (Sharma S et al., 1997), HNF1alfa y SP1/3 (Etti BS et al., 2001).

La glucosa entre otros nutrientes y hormonas regulan a PDX-1 (Macfarlane WM et al., 1997) (Fig 9).

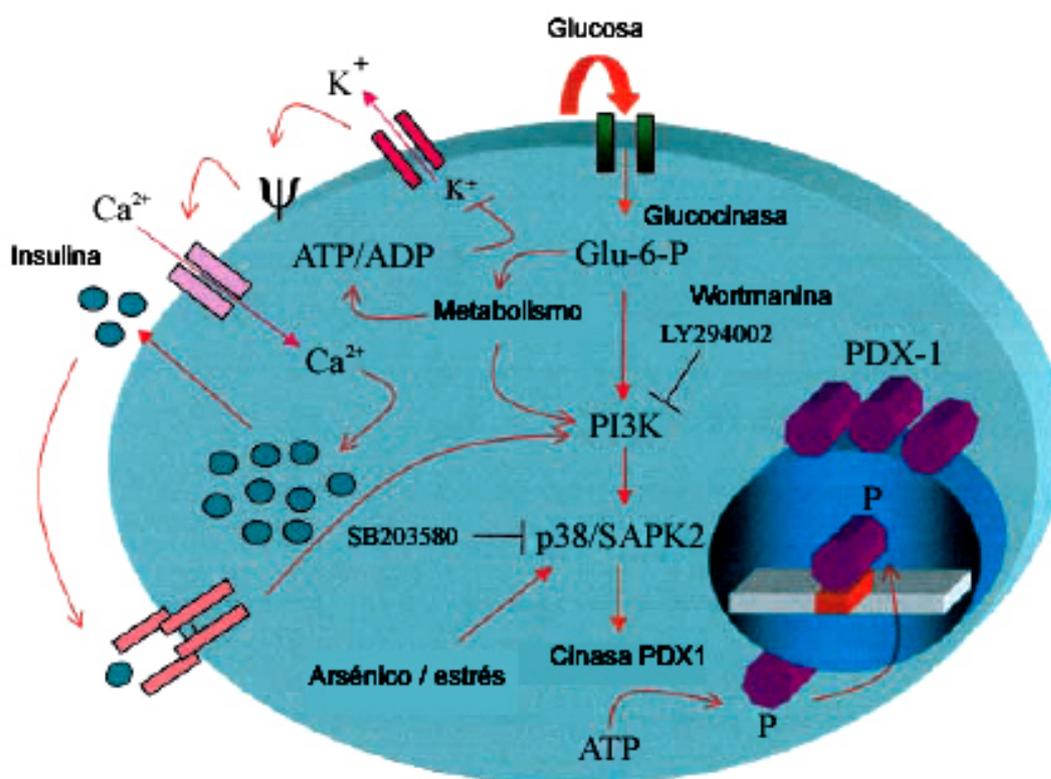


Fig. 9 Regulación propuesta de PDX-1 por glucosa e insulina. Glucosa e insulina regulan PDX-1 a través de p38/SAPK2 por una vía inhibida por wortmanina y LY294002. Involucra PI3K. También puede ser activado por arsénico y estrés a través de p38/SAPK2 sin ser afectado por wortmanina y LY294002. *Modificado de McKinnon CM 2001*

La glucosa estimula la fosforilación de PDX-1 (Serup P et al., 1996, Macfarlane WM et al., 1999), y la distribución intracelular del mismo (Macfarlane WM et al., 1999, Rafiq I et al., 1998). En concentraciones bajas de glucosa el factor de transcripción se encuentra en la periferia nuclear y en concentraciones altas de glucosa es trasladado al nucleoplasma (Rafiq I et al., 1998). Se ha observado que la translocación celular del PDX-1 es dependiente de fosforilación en respuesta a cambios en la concentración extracelular de glucosa e insulina (Elrick LJ et al., 2001).

Otras hormonas como GLP-1 y TGFbeta tienen efectos sobre la unión de PDX-1 al ADN o en la expresión del gene (Buteau J et al., 1999, Wang X et al., 1999, Perfetti R et al., 2000, Stoffers DA et al., 2000, Sayo Y et al., 2000)

El PDX-1 es importante para el desarrollo pancreático. En el ratón se detecta al día embrionario 8.5 en la región dorsal del intestino, en el duodeno y primordio pancreático (Jonsson et al. 1994, Offield MF et al. 1996). En el páncreas adulto Pdx-1 está restringido en las células beta, delta y células aisladas dentro de los ductos pancreáticos.

En animales con deleciones homocigóticas del gene (pdx-1 -/-) existe agenesia pancreática, anomalías duodenales y mueren después del nacimiento con altas concentraciones de glucosa urinaria (Jonsson J et al., 1994, Offield MF et al., 1996).

La deleción condicional del gene permite la formación del páncreas con ausencia de Pdx-1 en las células beta (Ahlgren et al., 1998). Esto deriva en una secreción de insulina defectuosa y el desarrollo diabetes.

3.2.2 *Secreción de insulina*

Para mantener niveles constantes de glucosa plasmática, se requieren mecanismos glucosensores que mantengan la homeostasis glucídica. El mejor sistema de detección descrito es el constituido por las células beta pancreáticas que controla la secreción de insulina. Estas células acoplan el estímulo por glucosa con la secreción de insulina. Para esto es necesario el transportador de glucosa GLUT2 (Thorens B 2003), la enzima glucocinasa (Postic C et al., 2001) y un canal de potasio sensible a ATP (K_{ATP}) (Seino S et al., 2000).

El principal estímulo para la secreción de insulina es la glucosa. El acoplamiento entre el estímulo por glucosa y la secreción de insulina inicia con el transporte pasivo de la glucosa al interior de la célula beta a través de un transportador específico, GLUT2 (Fig. 10). En el interior de la célula, la glucosa es metabolizada través de la glucólisis y el ciclo de ácido tricarbóxico (ciclo de Krebs) que derivan en la producción de trifosfato de adenosina (ATP). El incremento que resulta en la proporción ATP:ADP cierra los K_{ATP} en la membrana lo cual inicia la despolarización de la misma. Cuando se alcanza el potencial de apertura de los canales de calcio tipo L, éstos permiten la entrada de calcio al citoplasma provocando la exocitosis de los gránulos secretores que contienen insulina.

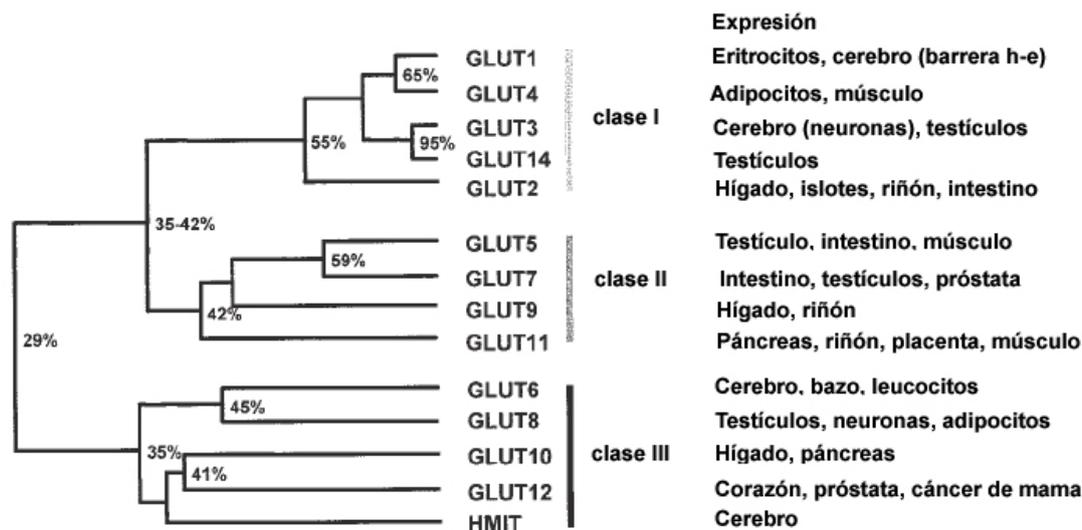


Fig. 11 Familia de los transportadores de glucosa humanos. Porcentajes representan la similitud. *Modificado de Scheepers A 2004*

Hay dos diferentes tipos de proteínas transportadoras, uno acoplado a un acarreador de Na^+ (SGLT por sus siglas en inglés) y los de transporte facilitado (GLUT) (Bell GI et al., 1990, Carruthers A 1990).

La familia GLUT (Fig 11) en el genoma humano tiene 14 miembros que se dividen en tres clases por la similitud de secuencias y sus características (Joost HG et al., 2001). Su expresión es tejido específica y difieren en sus características funcionales como los valores de K_m y la afinidad con las que se unen a inhibidores.

Clase 1. Los transportadores de glucosa de la clase 1 incluyen a las isoformas mejor caracterizadas GLUT 1, GLUT 2, GLUT3 y GLUT4 así como al recientemente descrito GLUT 14.

El GLUT1 (Mueckler M et al., 1985) es responsable del aporte basal de glucosa a eritrocitos y a células endoteliales del cerebro. Su K_m es variable y oscila entre los 5-30 mM.

El GLUT2 (Fukumoto H et al., 1988) es un transportador con baja afinidad, K_m 23-48 mM. Se expresa en células beta, hígado, riñón y la membrana basolateral del intestino. La captura de glucosa en estos tejidos depende de la elevación de los niveles de glucosa sanguíneos. El GLUT2 también transporta fructosa (Wood S et al., 2003) y glucosamina (Uldry M et al., 2002).

Los ratones transgénicos que no expresan GLUT2 (GLUT2 $-/-$) desarrollan diabetes y tienen un desarrollo alterado de los islotes en la etapa posnatal. Estos ratones tienen hiperglucemia, hipoinsulinemia, hiperglucagonemia, glucosuria y mueren durante las primeras 3 semanas de vida. El páncreas endocrino de estos animales muestra una pérdida de la primera fase de secreción de insulina estimulada por glucosa y un incremento en la proporción de células alfa/beta (Guillam MT et al., 1997).

El GLUT3 (Kayano T et al., 1988) es un transportador de glucosa de alta afinidad con expresión predominante en tejidos con alta demanda de glucosa como el cerebro.

El GLUT4 (Fukumoto H et al., 1989) tiene una alta afinidad por la glucosa (2.5-5 mM) que se expresa en tejidos sensibles a la insulina como el corazón, músculo esquelético y tejido adiposo. La insulina estimula la traslocación de GLUT4 del citoplasma a la membrana plasmática lo que incrementa el transporte de glucosa de 10 a 20 veces (Simpson IA et al., 1986, Sheperd PR et al., 1999, Bryant NJ et al., 2002). La hipoxia y la contracción muscular también aumentan la localización membranal de GLUT4. (Cartee GD et al., 1991, Lund S et al., 1995).

El GLUT14 tiene una similitud del 95% con el GLUT3 y se expresa en tejido testicular (Wu X et al., 2002).

Clase 2. Los transportadores de clase 2 incluyen a GLUT5, GLUT7, GLUT9 y GLUT11. Su localización se muestra en la figura 11. Los tres primeros son transportadores preferenciales de glucosa, el GLUT11 transporta fructosa preferentemente (Doege H et al., 2001, Gaster M et al., 2000).

Clase 3. En este grupo se incluyen a GLUT6, GLUT8, GLUT 10, GLUT12 Y HMIT. Este grupo es diferente a los transportadores clases 1 y 2 por cambios estructurales y modificaciones postraduccionales (Joost HG et al., 2001). Mutaciones en GLUT10 se han asociado a la diabetes tipo 2 (McVie-Wylie AJ et al., 2001, Andersen G et al., 2003). El GLUT12 está involucrado en la manutención de neoplasias prostáticas y de mama (Macheda ML et al., 2002, Chandler JD et al., 2003, Rogers S et al., 2003). El transportador HMIT (transportador de mioinositol acoplado a H^+) transporta mio-inositol (Uldry M et al., 2001).

Las células beta presentan actividad eléctrica asociada con el funcionamiento de diversos canales iónicos en la membrana plasmática. En ausencia de glucosa, las células beta están polarizadas, su potencial de reposo es de alrededor de -70mV . Cuando las células son estimuladas con glucosa

presentan un patrón característico, que está directamente relacionado con la secreción hormonal (ver fig. 12) (Hiriart M 1997a).

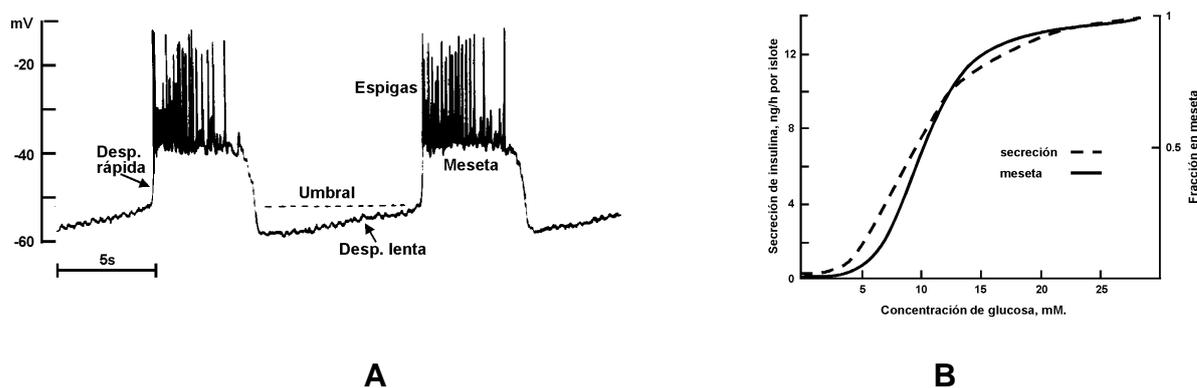


Fig. 12 A. Cuando la concentración de glucosa es estimuladora, la célula presenta una despolarización lenta, le sigue una despolarización rápida hasta un nivel de meseta en el cual se superponen trenes de potenciales de espigas. Posteriormente la célula se repolariza. Si la concentración de glucosa sigue siendo alta, se inicia otro ciclo de actividad eléctrica. **B.** El tiempo que la célula permanece despolarizada, en el nivel de la meseta disparando potenciales de acción, está estrechamente correlacionado con la concentración extracelular de glucosa y con la secreción de insulina (Modificado de Ozawa S et al., 1986)

La despolarización de la célula beta inducida por glucosa, inicialmente se debe al cierre de canales de K^+ sensibles a ATP ($K^+(ATP)$), que es producido por el catabolismo de la hexosa, y a la actividad constitutiva de una corriente catiónica no selectiva ($C^+(NS)$). Al cerrarse los canales $K^+(ATP)$ el flujo de cationes no selectivo induce una despolarización la cual aumenta la probabilidad de apertura de canales iónicos sensibles a voltaje de sodio y de calcio tipo T. Estas corrientes despolarizan aún más la membrana alcanzando un potencial donde se aumenta la probabilidad de apertura de canales de calcio tipo L, los cuales son responsables de las espigas observadas en las

ráfagas. Este mismo incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ es indispensable para la secreción de insulina (fig 13) (Hiriart M et al., 1988).

Otros canales iónicos con una función importante en la actividad eléctrica de las células beta son los de sodio, los cuales se ha visto, están implicados en la potenciación de la actividad eléctrica inducida por incrementos sostenidos en la concentración plasmática de glucosa u otros potenciadores, específicamente (Vidaltamayo R et al., 2002).

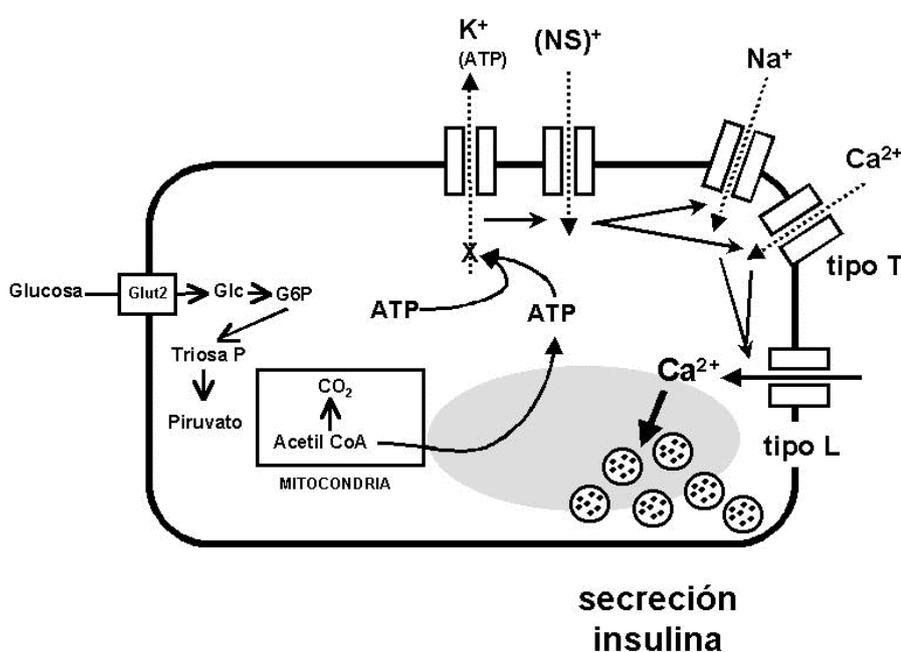


Fig. 13 Canales iónicos en la membrana de las células beta responsables de la actividad eléctrica durante el acoplamiento entre el estímulo y la secreción (Modificado de Hiriart M 1997a).

3.2.2 El desarrollo de la secreción de insulina.

La secreción de insulina en células beta funcionalmente maduras es principalmente estimulada por el incremento en la concentración plasmática de glucosa.

Las células beta adultas se consideran maduras funcionalmente porque incrementan la secreción de insulina en respuesta a concentraciones altas de glucosa en una respuesta bifásica (Espinosa MMA et al., 1970) y robusta. Sin embargo, las células beta fetales y neonatales son inmaduras funcionalmente (Tuch BE et al., 1993, Heinze E et al., 1971, Hughes SJ 1994, Asphund K 1973, Dudek RW et al., 1980, Schuit F et al., 2002) porque no incrementan la secreción de insulina en respuesta a glucosa y su secreción es poco robusta (Hole RL et al., 1988, Rhoten WB 1980, Milner RDG et al., 1971, Maitland JE et al., 1980). En un afán por comprender los mecanismos bioquímicos y moleculares que subyacen a esta inmadurez funcional, se han comparado los diferentes pasos del acoplamiento entre el estímulo y la secreción en células beta a diferentes edades (Ktorza A et al., 1985).

Las diferencias entre células beta maduras e inmaduras se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Diferencias bioquímicas entre células beta fetales/neonatales y adultas.

Componente de la célula beta	Función	Fetal/Neonatal	Adultas*
GLUT2	Transporte intracelular de glucosa	Menor expresión que las adultas	Expresión robusta
Glucocinasa	Enzima limitante de la vía glucolítica	Expresión del transcrito de 2.8 kb	Expresión del transcrito de 4.4 kb
Fosforilación oxidativa	Formación de ATP	Disminuída	Normal
Utilización de glucosa	Reflejo des metabolismo de glucosa	Disminuída	Normal
Canal K ⁺ _{ATP}	Acoplamiento metabo-eléctrico	Insensible a la estimulación con glucosa	Sensible a la estimulación con glucosa
Canales de calcio activados por voltaje	Exocitosis de gránulos de insulina inducida por despolarización membranar	Normal	Normal
Transportadores de NADPH: -mGPDH -m MDH	Transporte de substratos de metabolismo oxidativo del citoplasma a la mitocondria para la cadena de transporte de electrones.	Actividad y concentración disminuídas	Actividad y concentración normal
Contenido celular de ATP	Estado energético de la célula. Reflejo del acoplamiento metabo-eléctrico celular.	No incrementa tras la exposición a concentraciones altas de glucosa.	Incrementa en respuesta a concentraciones altas de glucosa.

La presencia de GLUT2 se detectó en páncreas de ratas fetales al final de la gestación (Brinn JE 1991) aunque su expresión es menor que en ratas lactantes (Tiedge M et al., 1993) lo cual sugiere que ya en etapas tempranas el transporte de glucosa al interior de la célula se realiza a través del transportador de glucosa.

La utilización de glucosa por células beta fetales es normal y la actividad de la glucocinasa, que cataliza el paso limitante de la vía glucolítica, no presenta diferencias (Tu J et al., 1996). Por lo tanto, se asume la glucólisis en células beta fetales está intacta.

Sin embargo existe una diferencia entre la glucocinasa fetal y adulta: el transcrito que codifica la enzima. En el páncreas neonatal se expresa un transcrito de 2.8kb mientras que la células adultas expresan un transcrito de 4.4 kb (Tiedge M et al., 1993). Hasta ahora se desconocen las implicaciones funcionales de esta transcripción diferencial aunque resulta interesante especular sobre posibles diferencias funcionales entre estos dos transcritos que pudieran explicar parcialmente las diferencias observadas entre la función de células maduras e inmaduras.

Se ha observado una reducción en la fosforilación oxidativa de la glucosa en células beta fetales (Rorsman P et al., 1989a). El contenido de ATP en estas células no incrementa tras ser estimuladas con glucosa, lo cual sí ocurre en células beta adultas.

La producción de moléculas de ATP es un proceso que involucra varias reacciones bioquímicas en diferentes compartimentos celulares y requiere de la función de muchas proteínas. Por lo tanto para estudiar la etiología de los niveles disminuidos de ATP es necesario considerar diferentes pasos en su formación.

El ciclo del ácido tricarboxílico parece ser normal en células beta fetales las cuales son capaces de incrementar su secreción de insulina al ser estimuladas con amino ácidos gluconeógenicos, como la leucina, que son incorporados como sustratos en el ciclo de Krebs (Weinhaus AJ et al., 1995).

Aunque durante el periodo neonatal el lactato es el principal sustrato metabólico (Medina JM et al., 1992), los niveles de deshidrogenasa láctica son bajos en células beta adultas (Sekine N et al., 1994) por lo que una falta de

substrato del ciclo de Krebs secundario a la acumulación del lactato parece poco probable.

La mayor parte del ATP requerido para la secreción de insulina estimulada por glucosa es producido por los transportadores de NADH. Se han estudiado la deshidrogenasa mitocondrial de glicerol fosfato (mGPDH) y la deshidrogenasa mitocondrial de malato (mMDH) dos enzimas clave en el transporte de NADH. El nivel de expresión de ambas enzimas es más bajo en células fetales como muestran experimentos de transfección génica que al incrementar los niveles celulares de ambos transportadores aumenta la secreción de insulina de células beta inmaduras (Tan C et al., 2002).

Los pasos finales en la secreción de insulina estimulada por glucosa como lo son el cierre del K_{ATP} (Rorsman P et al., 1989a) y la apertura de los canales de calcio (Weinhaus AJ et al., 1995), han demostrado ser normales en células beta fetales.

A partir de estos resultados se propone que la inmadurez funcional de las células beta durante el período fetal y neonatal está dada por alteraciones en la fosforilación oxidativa y la consecuente producción de ATP (Fig. 15)

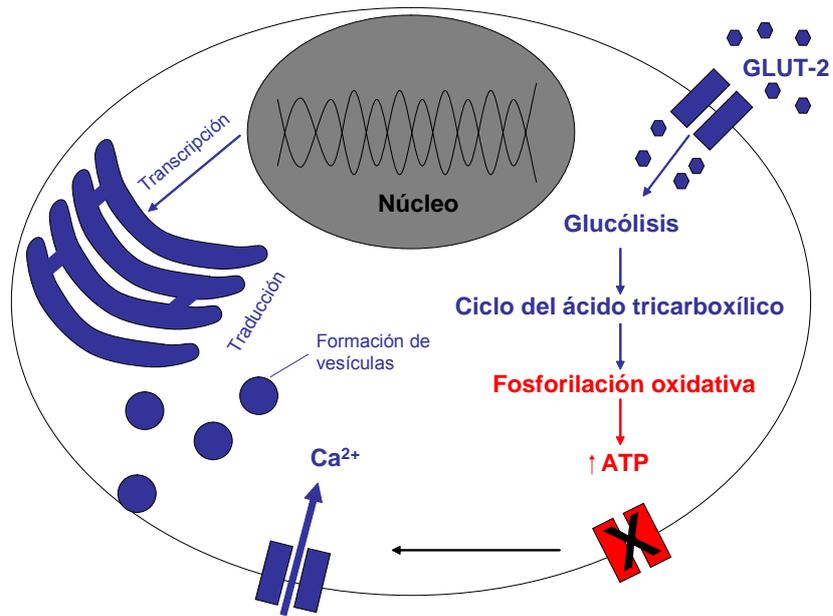


FIGURA 15. Célula beta funcionalmente inmadura. Comparación entre la síntesis de insulina y el acoplamiento entre el estímulo y la secreción entre células beta adultas y fetales/neonatales. La mayor parte de los pasos son iguales en células adultas y fetales (azul) sin embargo existen algunos pasos que difieren en las dos etapas del desarrollo (rojo). Adaptado de la Tabla 3.

3.3 Productos de secreción

3.3.1 Insulina

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

La insulina está formada por 51 amino ácidos que forman dos cadenas polipeptídicas, la cadena A, constituida por 21 aminoácidos y la cadena B, que contiene 30 aminoácidos; estas dos cadenas están unidas por dos puentes disulfuro, hay un tercer puente S-S intracatenario (A).

El RNAm maduro del gene de insulina contiene una región no traducida en el extremo 5'(UTR), una secuencia de nucleótidos que codifican una secuencia líder de 24 amino-ácidos así como los dominios B,C y A del péptido así como una región 3'UTR. La proinsulina está formada por la secuencia líder y las cadenas B,C y A. Durante la traducción del RNAm la secuencia líder es cortada en el lumen del retículo endoplásmico rugoso. Queda la proinsulina que consiste de las cadenas B,C y A. En el Golgi trans las proteasas cortan la proinsulina en dos sitios liberando el péptido C y la molécula madura de insulina que contiene las cadenas B y A conectadas por dos puentes disulfuro. El gránulo secretor contiene cantidades equimolares de insulina y péptido C así como pequeñas cantidades de proinsulina. Todos estos componentes se liberan al espacio extracelular durante la secreción (Fig.14)

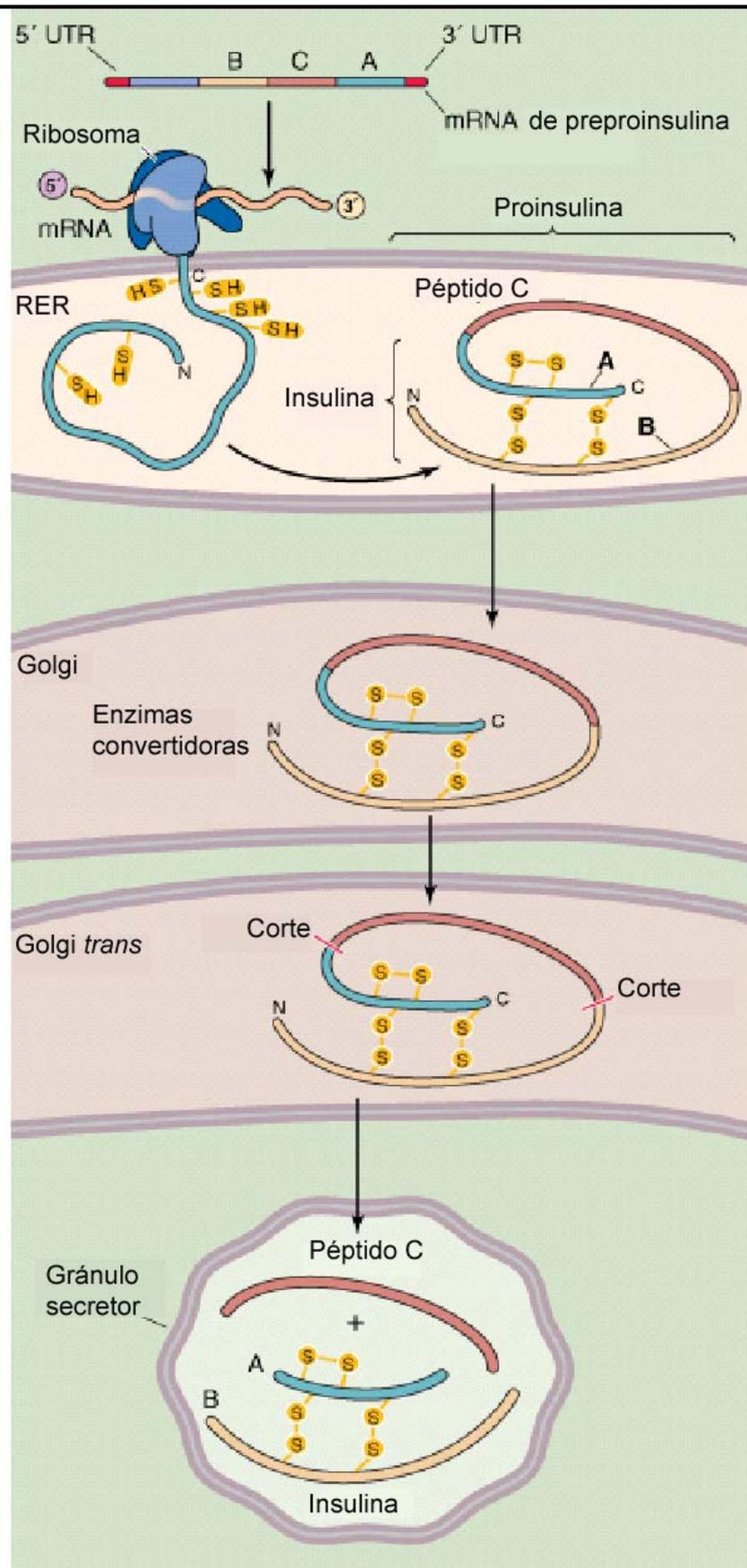


Fig 14. Síntesis de insulina. RER- retículo endoplásmico rugoso, mRNA – RNA mensajero. *Modificado de Boron et al. 2003*

Regulación de la secreción de insulina

Las sustancias que estimulan la secreción de insulina se pueden dividir en iniciadores y potenciadores de la secreción (Tabla 2). Los iniciadores son capaces de estimular la secreción de insulina *per se*, y son nutrientes metabolizados por la célula beta como la glucosa, sustancias que estimulan el metabolismo de nutrientes endógenos o fármacos como las sulfonilureas.

Los potenciadores, en cambio, aumentan la secreción de insulina en presencia de los iniciadores, ejemplos de éstos los constituyen el glucagon, el péptido inhibitorio gastrointestinal, el péptido intestinal vasoactivo y la acetilcolina.

La secreción de insulina puede ser inhibida por hormonas como la somatostatina, la galanina y la adrenalina y por fármacos como los agentes alfa 2 adrenérgicos.

Tabla 2. Regulación de la secreción de insulina de células beta

Iniciadores	Potenciadores	Inhibidores
Glucosa Manosa Leucina Estimulación vagal Sulfonilureas	Hormonas entéricas: Péptido parecido al glucagon I (GLP-I) Péptido inhibitorio gástrico Colecistocinina Secretina gastrina Estimulación beta- adrenérgica Arginina NGF	Estimulación alfa-adrenérgica Somatostatina Diazóxido Fenitoína Vinblastina Colchicina

Subpoblaciones funcionales de células beta

Se ha demostrado la existencia de subpoblaciones funcionales de células beta en rata (Hiriart M et al., 1991). Su caracterización *in vitro* ha demostrado diferencias en:

1.- Sensibilidad a glucosa. Esto da como resultado el reclutamiento de células inicialmente inactivas hacia una población secretora de insulina conforme incrementa la concentración extracelular de glucosa.

2.- Tasa de secreción de insulina. Lo cual implica que en respuesta a una concentración fija de glucosa, una subpoblación funcional secretará más insulina que otra. Se han clasificado en dos subgrupos de acuerdo a su tasa de secreción, evaluada con el ensayo hemolítico inverso (RHPA): células formadoras de placas pequeñas (SP) área de placa $< 2000 \mu\text{m}^2$ y células formadoras de placas grandes (LP) área de placa $> 2000 \mu\text{m}^2$.

3.- Sensibilidad de células beta a agentes diabetogénicos y diferentes mecanismos de defensa tras la exposición a citotóxicos.

Así mismo, se ha reportado una secreción de insulina considerablemente menor en células beta fetales y neonatales (Hiriart M et al., 1997b). Esto sugiere que la capacidad de secreción de insulina se ve modificada a lo largo de la vida de la célula beta a través de un proceso de maduración.

3.3.2 GABA

El ácido gama aminobutírico (GABA) funciona como neurotransmisor en el sistema nervioso central y se ha descrito su presencia en los islotes de Langerhans. Así mismo se ha demostrado la descarboxilasa de glutamato (GAD) la principal enzima de la síntesis de GABA (Fig.16) y existe una asociación con el inicio de diabetes mellitus tipo 1 en donde se han descrito la presencia de anticuerpos contra la GAD 65.

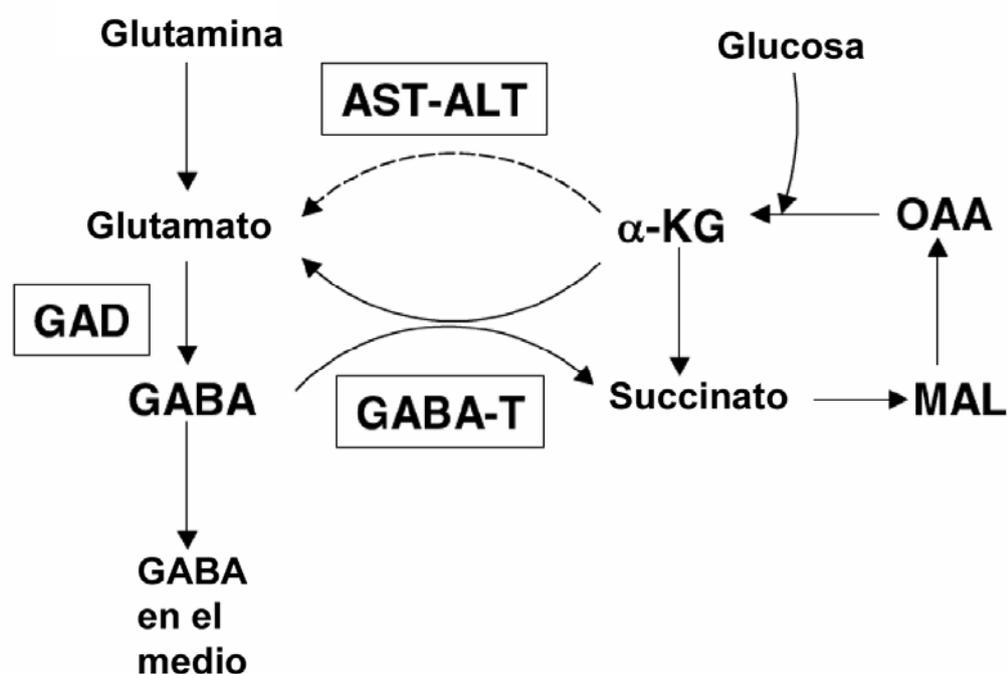


Fig. 16 Síntesis de GABA en el islote pancreático. *Modificado de Wang C 2006.*

En el sistema nervioso central el GABA tiene una función inhibitoria al incrementar la permeabilidad a cloro y generar un potencial inhibitorio posináptico.

La síntesis de GABA requiere del ciclo del ácido tricarboxílico y las enzimas de GABA: GABA-T (4-aminobutirato-2-oxaglutarato aminotransferasa) y GAD (L-glutamato descarboxilasa). El primer paso en la formación de GABA

es la transaminación del alfa-cetoglutarato por GABA-T para formar ácido glutámico. Éste es carboxilado por GAD para formar GABA el cual es transportado a vesículas sinápticas en contra de un gradiente electroquímico (Thomas-Reetz et al., 1994).

El catabolismo de GABA requiere de GABA-T y alfa-cetoglutarato que transamina GABA y forma semialdehído de succinato el cual es convertido a ácido succínico por la deshidrogenasa de ácido succínico (SSADH) lo cual permite la entrada de los metabolitos de GABA al ciclo del ácido tricarboxílico.

Existen dos tipos de receptores a GABA en el sistema nervioso central, los ionotrópicos, GABA_A y GABA_C, y el metabotrópico GABA_B. que son determinados por su sensibilidad a diferentes agentes farmacológicos. El receptor GABA_A se ha clonado (Bernard EA et al., 1987) y está constituido por cuatro dominios de unión y regula la conductancia al cloro. Se unen a él el GABA, las benzodiazepinas, la picrotoxina y los barbitúricos. La bicuculina es un antagonista competitivo de GABA a este tipo de receptores.

El receptor GABA_B (Hill DR et al., 1984, Corda MG et al., 1983) está acoplado a canales de calcio y se actúa a través de proteínas G inhibiendo la liberación presináptica de GABA lo cual inhibe canales de calcio sensibles a voltaje (Kaupmann K et al., 1998) y es insensible a bicuculina.

La presencia de GABA se ha demostrado en muchos órganos periféricos (Erdo SL et al., 1990) como el intestino, sistema reproductivo, vesícula biliar, vejiga y vasos sanguíneos. El páncreas endocrino también contiene GABA (Thomas-Reetz et al., 1994) predominantemente en la zona central del islote donde se localizan las células beta (Sorenson RL, et al., 1991, Thomas-Reetz et al., 1994, Chessler SD et al., 2002). Durante mucho tiempo la función de

GABA en las células beta ha sido intrigante para los científicos, y un mayor interés fue despertado cuando se descubrió que la GAD 65 es uno de los autoantígenos más importantes en la diabetes mellitus tipo 1 en donde las células beta son destruidas por mecanismos autoinmunes (Yoon et al., 1999). Existe evidencia que sugiere que el GABA en células beta está localizado en microvesículas sinápticas (SLMVs) y es exocitado de manera regulada (Thomas-Reetz AC et al., 1994).

Así mismo, se ha demostrado la expresión de GAD65 en células beta que la expresan de manera heterogénea y que es parcialmente regulada por la glucosa extracelular (Sánchez-Soto MC et al., 1999)

Se ha demostrado la presencia de receptores GABA_A en el islote, específicamente en células alfa y delta (Rorsman P et al., 1989b). Así mismo se han identificad receptores GABA_B por RT-PCR y western blot en islotes humanos y células MIN6 (Brice NL et al., 2002).

Los estudios sobre la liberación de GABA de las células beta aún están inconclusos pero se ha visto que existe un incremento en la secreción de GABA en concentraciones altas de glucosa (Gerber JC et al., 1980).

Se ha sugerido que el GABA tiene una función inhibitoria sobre la secreción de insulina a través de un efecto de receptores GABA_B que disminuyen el calcio citosólico en respuesta a la glucosa (Gu XH et al., 1993) (Fig. 17).

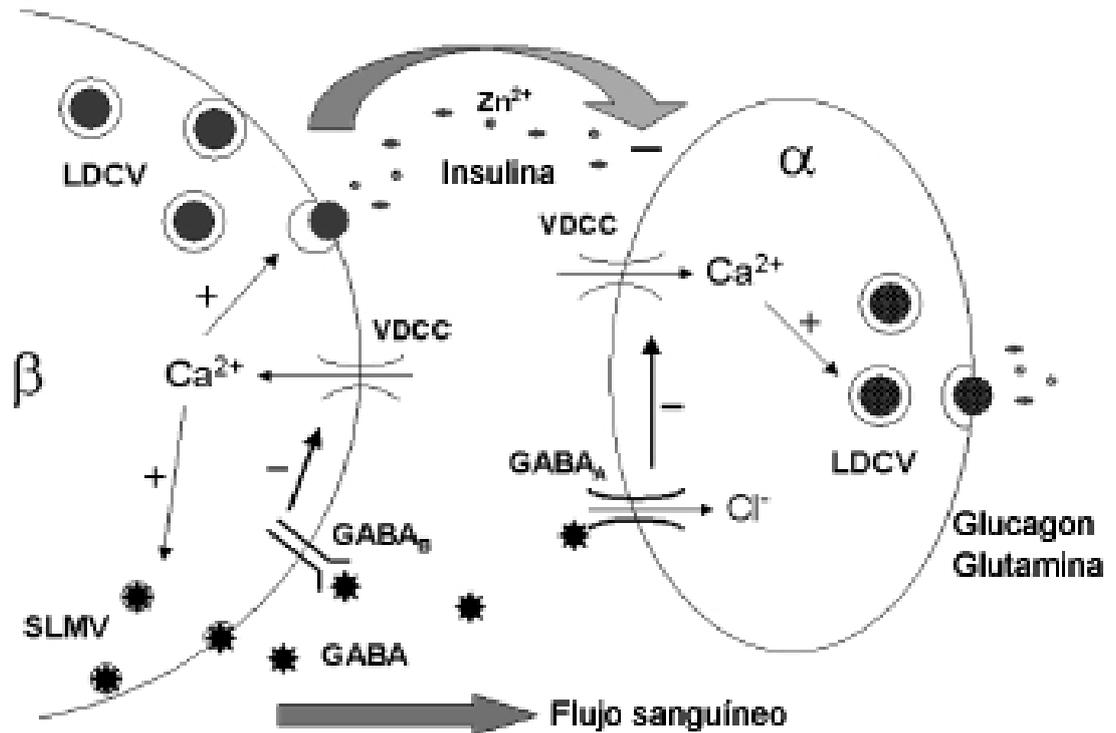


Fig. 17. Regulación de la liberación de GABA de células beta pancreáticas. Vías putativas de la inhibición de la secreción de células beta y células alfa a través de la inhibición de los canales de calcio. En el caso del receptor $GABA_A$ es por una despolarización de la membrana plasmática. También en células delta el GABA disminuye la secreción de somatostatina. *Modificado de Franklin IK 2004.*

Sobre las células alfa el GABA inhibe la secreción de glucagón estimulada por arginina a través de un receptor $GABA_A$ (Rorsman P et al., 1989b, Gilon P et al., 1991) (Fig. 17).

Sobre las células delta, el GABA tiene un efecto inhibitorio sobre la secreción de somatostatina (Robbins MS et al., 1981).

3.3.3. FACTOR DE CRECIMIENTO NEURONAL (NGF)

El desarrollo estructural y funcional de los órganos está regulado por diferentes factores. Uno de los factores que podría participar en estos procesos dentro del páncreas endocrino es el factor de crecimiento neuronal (NGF). Existen evidencias que el NGF es importante en el desarrollo embrionario del páncreas y en la fisiología de las células beta adultas, por lo tanto resulta interesante esclarecer su participación durante el desarrollo posnatal temprano.

El factor de crecimiento neuronal (NGF) pertenece al grupo de las neurotrofinas que se identificaron inicialmente como factores de supervivencia neuronal (Purves D et al., 1988, Oppenheim RW et al., 1991) aunque se ha probado que actúan en una amplia gama de respuestas como la regulación del neuroblasto y proliferación de crestas neurales, crecimiento de neuritas, modulación sináptica y apoptosis (Lewin GR et al., 1996, Bibel M et al., 2000, Huang EJ et al., 2001).

A estas familias de neurotrofinas pertenecen el NGF, el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y las neurotrofinas NT-3 y NT-4/5 (Snider WD 1994). Los cuatro genes de neurotrofinas en mamíferos codifican precursores glucosilados (31-35 kDa) que son cortados por convertasas, que incluyen a furina y las convertasas 1 y 2 (PC1 y PC2) que dan lugar a neurotrofinas maduras.

El gene para el NGF está muy conservado en diferentes especies y la proteína también es conservada en la escala filogenética (McKay S et al., 1999). La estructura primaria del NGF de ratón es muy similar a la del ser humano, sólo 12 de los 118 aminoácidos son diferentes (Barde Y 1989).

El NGF se ha aislado y purificado a partir de la glándula submaxilar de ratón, que constituye la fuente natural más abundante de esta proteína (Angeletti R et al., 1971). Esta proteína está constituida por un complejo pentamérico con dos subunidades alfa, una subunidad beta y dos subunidades gama, todas asociadas no covalentemente (fig. 18). La subunidad beta, que es la responsable de la actividad biológica del NGF, es un homodímero de 118 aminoácidos y 26.5 kDa. La proteína comienza en la porción amino terminal. Cada cadena del homodímero presenta tres puentes disulfuros intracatenarios y se asocia con la otra cadena a través de interacciones no covalentes (Angeletti R et al., 1971).

Se ha comunicado que las subunidades alfa y gama podrían estar vinculadas con la regulación de los procesos de liberación y degradación de la subunidad beta del NGF brindándole protección contra la acción de proteasas.

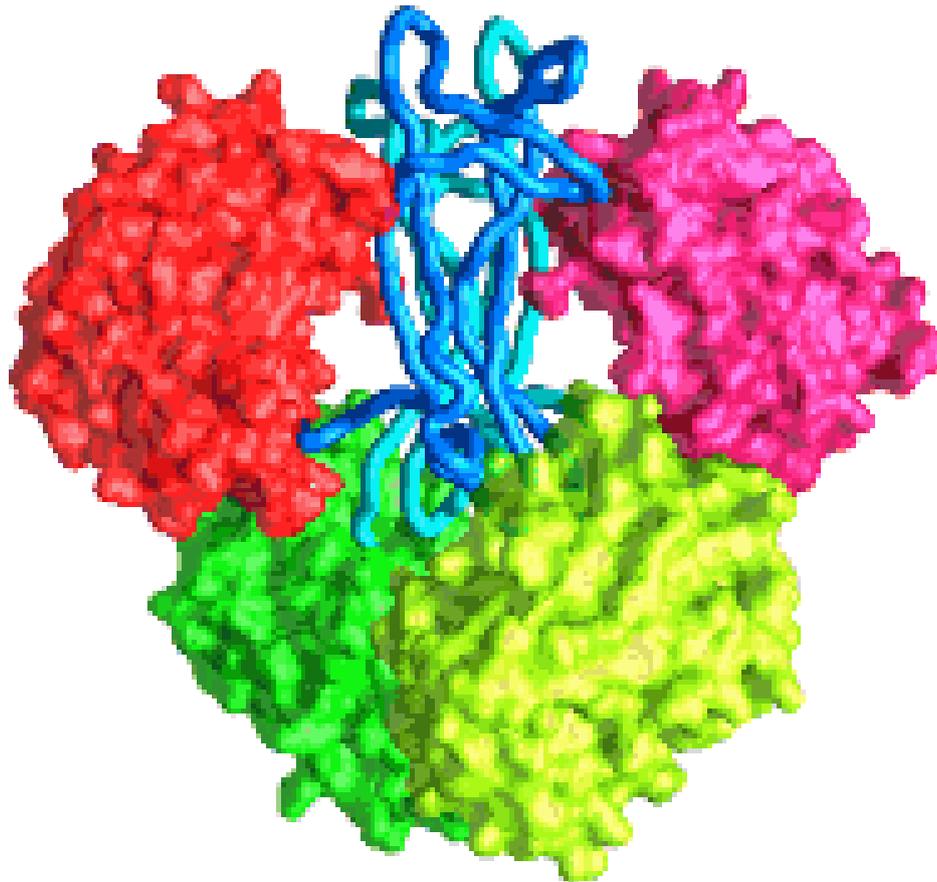


Fig. 18. Estructura cristalográfica del NGF 7S. Se muestra el complejo ensamblado alrededor del dímero beta del NGF (azul). las subunidades alfa (rojo) están en contacto con las subunidades beta y gamma, pero no entre ellas. Las subunidades gamma (verde) están en contacto entre ellas y cada una tiene contacto con una subunidad alfa mediada por un ion de Zn^{2+} . Aunque las secuencias alfa y gama son similares, no son intercambiables en el complejo (Bax B 1997).

Receptores del NGF

Al igual que las otras neurotrofinas, NGF ejerce sus efectos biológicos a través de la interacción con un receptor específico en la membrana celular. Se han caracterizado dos tipos de receptores para las neurotrofinas, uno de baja afinidad, el p75 y el de alta afinidad que pertenece a la familia de cinasas de tirosina (Trk) y muestra una gran especificidad por los diversos miembros de las neurotrofinas.

TrkA

La activación de los receptores TrkA por neurotrofinas lleva a varias respuestas biológicas (Fig. 19) que incluyen proliferación, supervivencia, crecimiento y remodelación axonal y dendrítico como resultado de modificaciones al citoesqueleto, tráfico membranal y modificaciones de las funciones sinápticas. Se ha descrito comunicación entre TrkA y otros receptores como p75, receptores acoplados a proteínas G (GPCR), receptor vaniloide y c-Ret (revisado en Huang EJ et al., 2003).

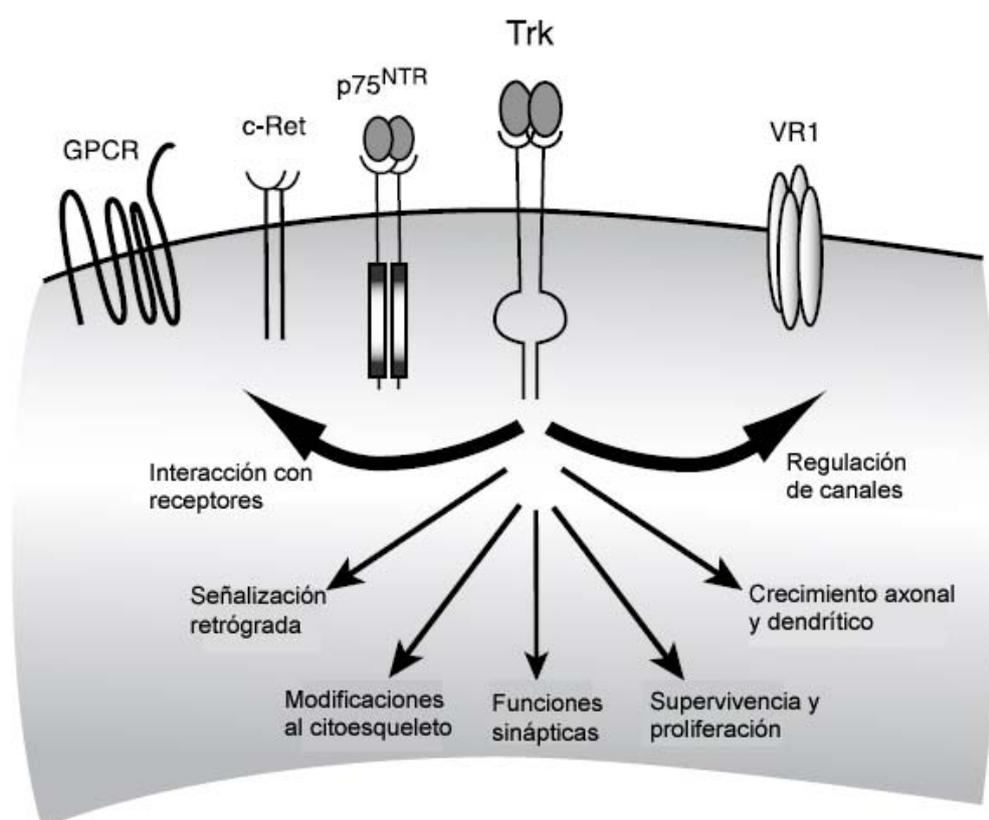


Fig. 19 Principales funciones de los receptores Trk. La activación de Trk inducida por neurotrofinas tiene varias funciones biológicas, que incluyen el ensamblaje y remodelación del citoesqueleto, tráfico membranal y modificaciones de las funciones sinápticas. Además se ha reportado interacción con receptores como p75, receptores acoplados a proteínas G (GPCR), receptores de vaniloides (VR1) y c-Ret. *Modificada de Huang EJ et al., 2003.*

El receptor TrkA se une a NGF, el TrkB a BDNF y a la NT4/5 y los TrkC a la NT3. (Lorigados-Pedre L et al., 2004, Froestl W 2000).

Todos los receptores Trk son proteínas transmembranales cuya porción extracelular contiene los sitios de unión al ligando, mientras que el dominio intracelular contiene una unidad de señalización con actividad de cinasa de tirosinas (Friedman WJ et al., 1999) (Fig. 20).

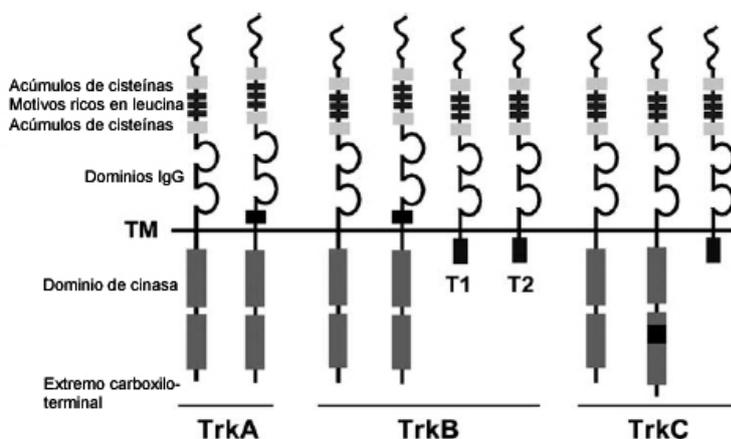


Fig. 20. Isoformas de la familia de receptores Trk. Tres genes, *trkA*, *trkB* y *trkC* codifican receptores completos y varias isoformas de edición alternativa. La edición da lugar a receptores TrkA y TrkB que no tienen una secuencia de aminoácidos en los dominios extracelulares. También hay receptores TrkB y TrkC que no tienen el dominio intracelular de cinasa, así como un receptor de TrkC con una inserción en el dominio de cinasa. *Modificado de Roux PP 2002.*

La unión de las neurotrofinas ocasiona la dimerización del receptor, autofosforilación en residuos de tirosina (Y) (Jing S et al., 1992, Heldin CH 1995, Cunningham ME et al., 1997). Los residuos fosforilados de tirosina actúan como sitios de anclaje para moléculas de señalización que regulan el crecimiento y la supervivencia a través de vías de Ras, cinasa de fosfatidilinositol-3 (PI3K) y fosfolipasa C gama (PLCgama) (Segal RA et al., 1996, Kaplan DR et al., 2000). (Fig. 21)

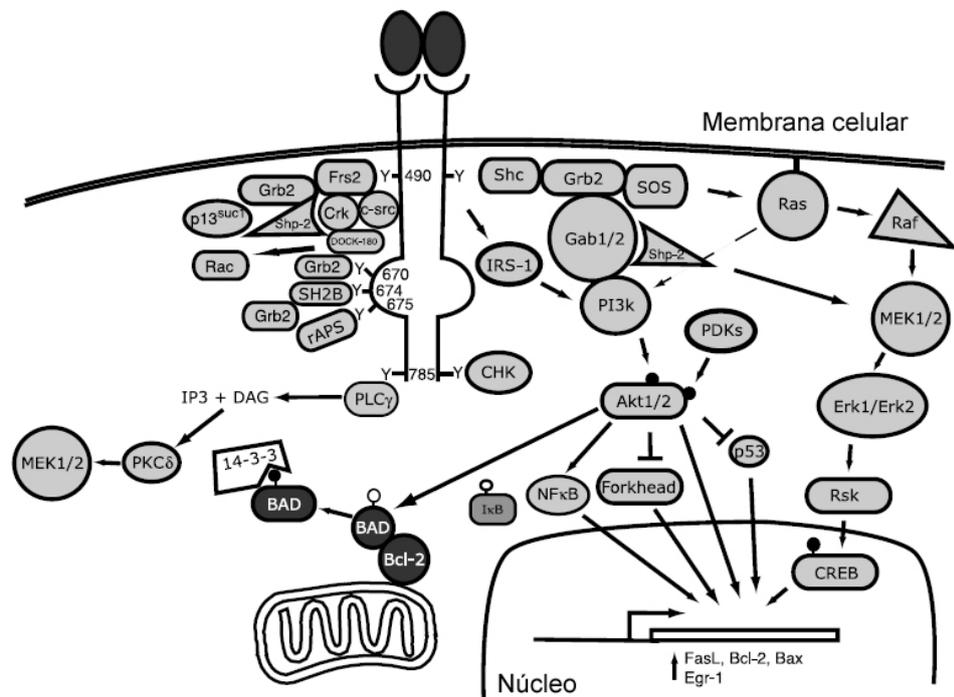


Fig. 21. Vía de traducción de señales de TrkA. La unión de neurotrofinas recluta proteínas que interactúan con residuos de fosfotirosina específicos en el dominio citoplásmico del receptor. Esto ocasiona la activación de distintas vías de señalización como la de Ras, PI3K y PLC gamma lo que resulta en regulación génica, supervivencia celular y crecimiento de neuritas. *Modificado de Huang EJ 2003*

Señalización a través de Ras

La vía de señalización de Ras regula la supervivencia neuronal y diferenciación a través de la activación de cinasas de proteínas de mitosis activadas (MAPK) y por la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK) (Grewal SS et al., 1999, Ballif BA et al., 2001). Las proteínas adaptadoras Shc se unen a Y490 en TrkA que recluta a Grb2 y a SOS (son of sevenless) en la membrana, lo que conlleva a la activación de Ras y activación río abajo de la vía de señalización que incluye c-Raf/B-Raf/ERK1/ERK2 y p38MAPK

(Stephens RM et al., 1994, Xing J et al., 1996, Meakin SO et al., 1999, Atwal JK et al., 2000).

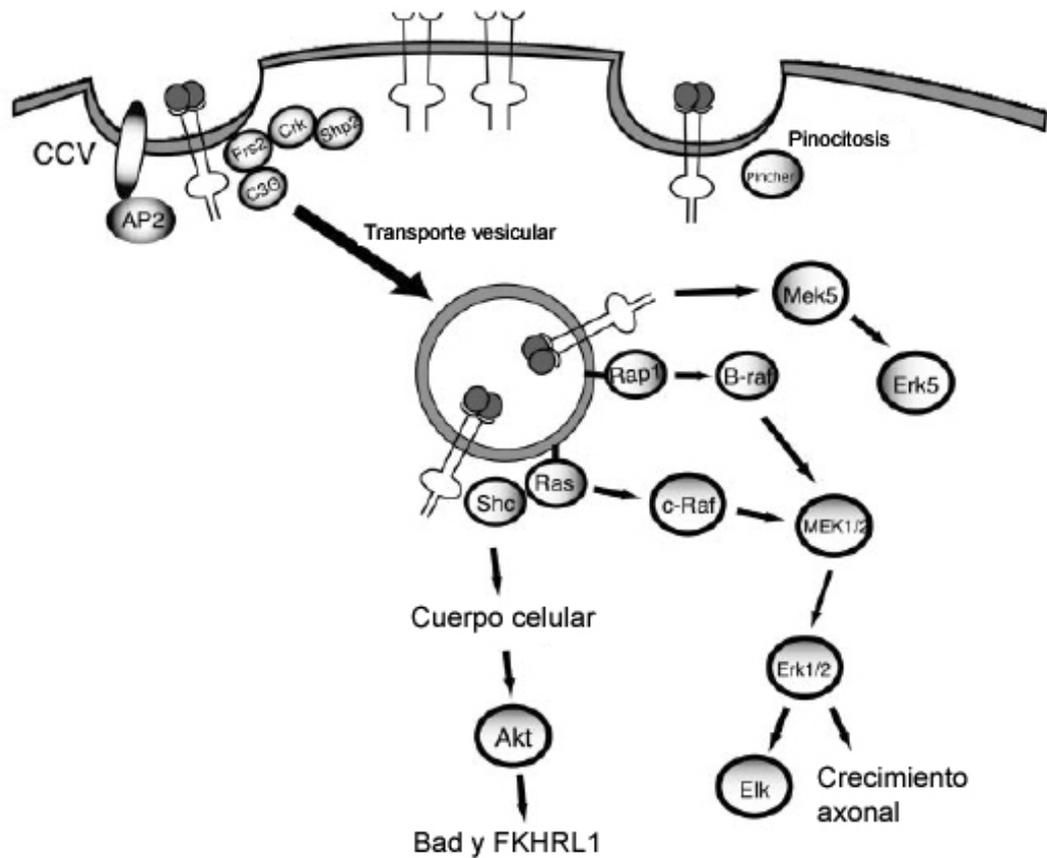
Señalización a través PI3K

La PI3K juega un papel importante en la supervivencia celular dependiente de Trk. La activación de la cinasa puede ser dependiente o independiente de Ras a través de la fosforilación de substratos que regulan la supervivencia celular como miembros de la familia Bcl2 como Bad (Datta SR et al., 1997, del Peso L et al., 1997), Caspasa 9 (Cardone MH et al., 1998, Rohn JL et al., 1998), cinasa de la glucógeno sintasa 3 (GSK3)(Cross DA et al., 1995, Shaw M et al., 1997, Pap M et al., 1998, van Weeren PC et al., 1998) y miembros de la familia forkhead (FKHR) (Biggs III WH et al., 1999, Brunet A et al., 1999, Guo S et al., 1999, Kops GJ et al., 1999).

La señalización a través de PLCgama induce crecimiento de neuritas y activación de la cascada de ERK (Corbit KC et al., 1999).

Así mismo se han descrito vías de señalización vesicular ya que los receptores Trk se encuentran en zonas de la membrana ricas en caveolas (Huang CS et al., 1999). La unión del ligando a estos receptores estimula su internalización por vesículas cubiertas de clatrina y por macropinocitosis de la superficie celular (Beattie EC et al., 2000, Shao Y et al., 2002) (Fig. 22). Tras su internalización, las neurotrofinas se localizan en endosomas que también contienen los intermediarios de señalización como Shc y PLCgama (Howe CL

et al., 2001) y las vías de señalización permanecen activas en el citoplasma celular.



22. Señalización de TrkA por vesículas. El transporte vesicular puede ser por endocitosis mediada por clatrina o por pinocitosis promovida por Pincher, una proteína inducida por NGF en células PC12. Modificado de Huang EJ 2003

p75

El p75NTR es el receptor de baja afinidad para las neurotrofinas las cuales son el único ligando conocido de este receptor en mamíferos (revisado en Roux PP et al., 2002).

El p75ntr es un péptido de 399 aminoácidos, es transmembranal con un carbohidrato en la posición 33 unido por asparagina y varios carbohidratos yuxtamembranales (Large TH et al., 1989) (Figura 23).

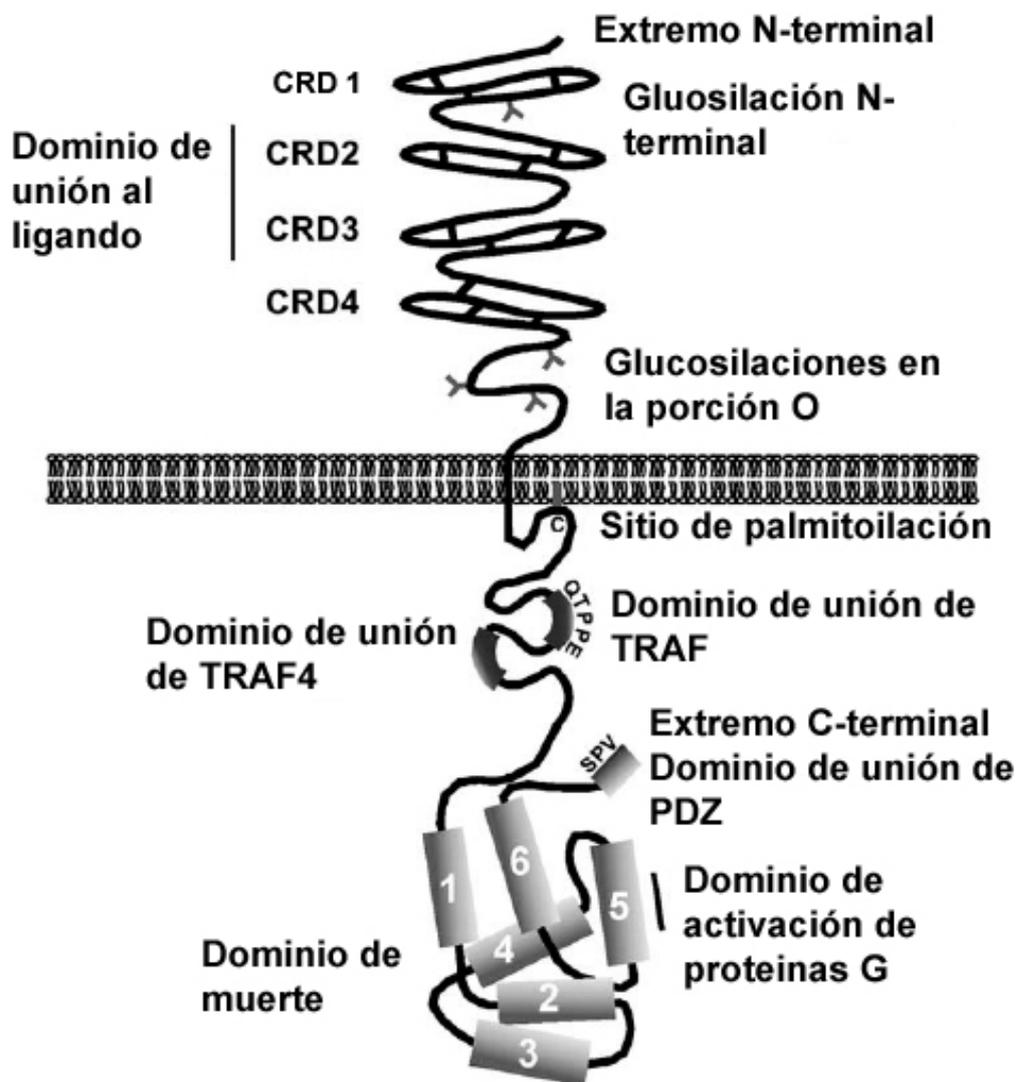


Fig 23. Estructura de p75. Receptor transmembranal con un dominio extracelular que contiene cuatro dominios ricos en cisteínas y varios sitios de glucosilación. El dominio intracelular contiene un sitio de palmitoilación en la cisteína 279, dos sitios de unión a TRAF, un dominio de unión a proteínas G y a PDZ así como un dominio de muerte. *Modificado de Roux et al., PP 2002*

El receptor contiene cuatro dominios ricos en cisteínas (CRD1-CRD4 a partir del extremo amino terminal) (Yan H et al., 1991, Baldwin AN et al., 1992). Cada uno de estos dominios contiene tres puentes disulfuro intracatenarios que le dan al receptor una estructura alargada (Smith CA et al., 1994). Estudios estructurales sugieren que la interacción con las neurotrofinas se da en el

dominio CRD3 (Yan H et al., 1991, Baldwin AN et al., 1992, Chapman BS et al., 1995, Shamovsky IL et al., 1999).

El receptor p75 no tiene actividad enzimática intrínseca por lo que la señalización ocurre a través de asociaciones con proteínas adaptadoras que se encuentran en el citoplasma. Se une a factores TRAFs (TNFR-associated factors) (Ye X et al., 1999). Es característico el dominio de muerte, un módulo de aproximadamente 80 aminoácidos que se caracteriza por sus funciones proapoptóticas al interactuar con proteínas que llevan a la activación de la cascada de las caspasas (Feinstein E et al., 1995).

La expresión de p75 es en el sistema nervioso central en el desarrollo se da en una amplia variedad celular (Buck CR et al., 1987, Ernfors P et al., 1988, Schatteman GC et al., 1988, Escandon E et al., 1989, Large TH et al., 1989, Cotrina ML et al., 2000) como el tubo neural, la retina y en las tres capas germinales (Thomson TM et al., 1988). Se restringe conforme avanza la diferenciación.

Las lesiones inducen la expresión de p75 en varios tipos celulares en respuesta a lesiones mecánicas, isquemia, encefalomiелitis, convulsiones, esclerosis múltiple, neuropatía diabética (Conti G et al., 1997), enfermedad de Alzheimer (Yaar M et al., 1997) y tumores (Krygier S et al., 2001).

Funciones del p75

Es indispensable estudiar las interacciones del p75 para entender sus funciones. Hasta ahora se han identificado varias proteínas que interactúan con el receptor (Fig. 24) y que han aclarado algunas de las funciones del receptor *in*

vivo. Aún así siguen siendo sujetos de estudio las implicaciones biológicas del receptor.

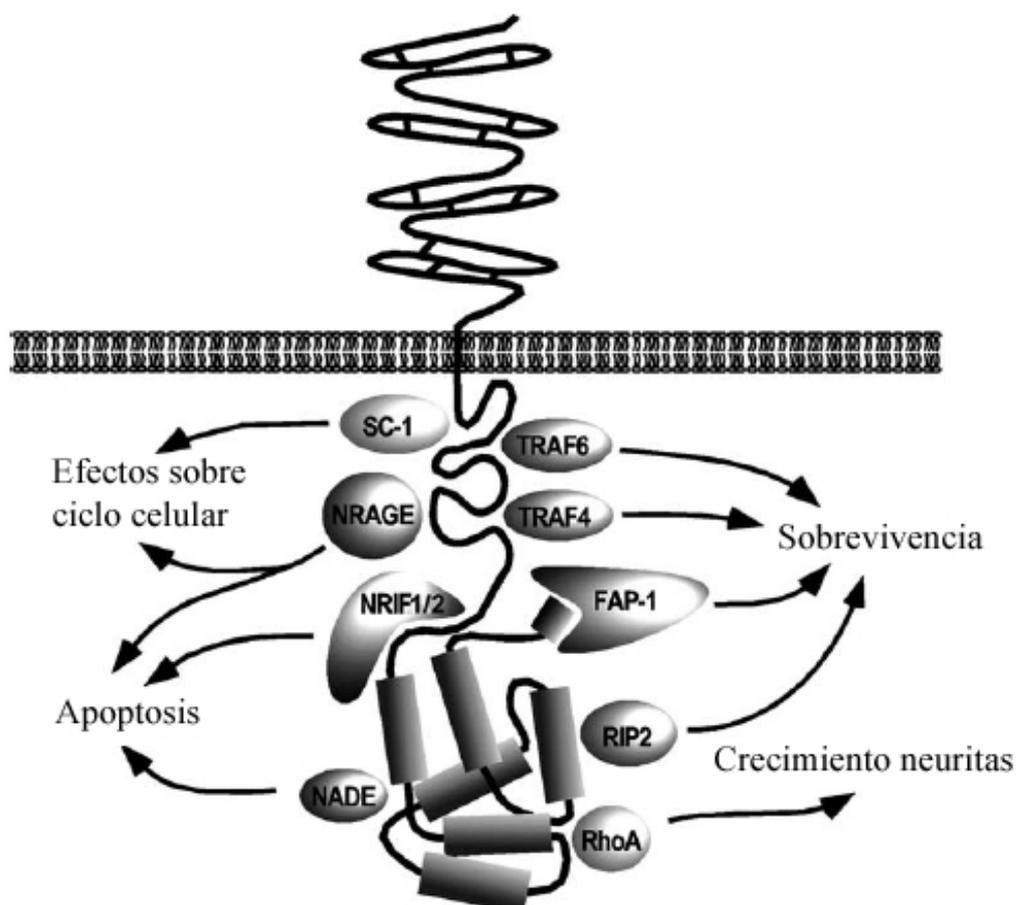


Fig 24. Proteínas acopladoras involucradas en la señalización por el receptor p75. La interacción es con la región intracelular del receptor. NRAGE, SC-1, TRAF4 y TRAF6 se unen al dominio yuxtamembranal. NRIF interactúa con la región yuxtamembranal y el dominio de muerte. NADE, RIP2 y RhoA se unen al dominio de muerte. *Modificado de ROUX PP 2002*

El p75 interactúa con diferentes proteínas acopladoras que se mencionan a continuación.

1. NRIF1 Y NRIF2. Interactúan con el dominio yuxtamembranal y de muerte (Casademunt E et al., 1999, Benzel I et al., 2001) y se cree que funcionan como represores transcripcionales (Benzel I et al., 2001).

2. NRAGE. Interactúa con la región yuxtamembranal del receptor (Salehi AH et al., 2000) y está involucrada en la apoptosis mediada por el receptor y facilita la salida del ciclo celular de muchos tipos celulares (Salehi AH et al., 2000).

3. NADE. Se une al dominio de muerte del receptor de forma dependiente de NGF, activa a la vía de las caspasas e induce apoptosis (Park JA et al., 2000).

4. TRAF. La TRAF4 (Krajewska M et al., 1998) y TRAF6 (Khursigara G et al., 1999) se unen a p75 y activan las vías de JNK y NF-kappaB (revisado en Wajant H et al., 2001).

5. RIP-2. Proteína adaptadora que contiene un dominio de cinasa de serina/treonina y un dominio de reclutamiento de caspasas. Se une al dominio de muerte del p75 de manera dependiente de NGF (Khursigara G et al., 2001).

6. FAP-1. Se une al extremo carboxilo terminal de p75 (Sato T et al., 1995, Irie S et al., 1999). Se desconoce su función pero su unión al receptor se relaciona con un incremento en la activación de NF-kappaB y muerte celular.

7. ARMS. Proteína grande con cuatro dominios transmembranales que también interactúa con TrkA y se fosforila en residuos de tirosina en respuesta a la activación de TrkA, TrkB o Efrina B2. Se considera un componente integral del complejo Trk-p75.

8. SC-1. Tiene un dominio de dedos de zinc y comparte motivos estructurales que pueden actuar como represores transcripcionales. Su sobreexpresión detiene el ciclo celular.

9. RhoA. Interactúa con el dominio intracelular de p75 (Yamashita T et al., 1999) y pertenece a la familia de las GTPasas y está involucrado en varios

aspectos de morfogénesis neuronal como migración, polaridad, crecimiento axonal, plasticidad dendrítica y formación sináptica (Luo L 2000).

10. Ceramidas. La unión de neurotrofinas al receptor p75 induce la activación de esfingomielinasa e hidrólisis de esfingomielina conlleva a la acumulación de ceramidas (Dobrowsky RT et al., 1994,1995, Blochl A et al., 1996). La producción de ceramidas se correlaciona con activación de JKK y apoptosis (Casaccia-Bonnet P et al., 1996).

Interacción entre p75 y TrkA

Recientemente se han identificado adaptadores que forman complejos multiproteicos que incluyen a p75 y Trk permitiendo la interacción entre ambos receptores. Uno de estos, llamado ARMS (ankyrin repeat-rich membrane spanning adaptors) interactúa con ambos receptores y es fosforilado tras la activación por neurotrofinas (Kong H et al., 2001). También la caveolina representa una plataforma de las interacciones entre ambos receptores (Bilderback TR et al., 1999) así como un complejo multiproteico requerido para la activación de NFkappaB (Wooten MW et al., 2001)

Funcionalmente, la activación de Trk suprime la activación por p75 de la esfingomielinasa acídica en dominios ricos en caveolina (Dobrowsky RT et al., 1995, Bilderback TR et al., 2001) lo cual previene la apoptosis causada por esta vía y permite los efectos de supervivencia y diferenciación de las neurotrofinas.

La presencia de Trk también inhibe la activación de la cascada de Jnk inducida por p75 que produce apoptosis a través de la elevación de p53 (Miller FD et al., 2001).

Las señales proapoptóticas inducidas por p75 son fuertemente inhibidas por señales mediadas por Trk a través de Raf y Akt (Fig. 25). El p75 mejora la especificidad de los receptores Trk por sus ligandos.

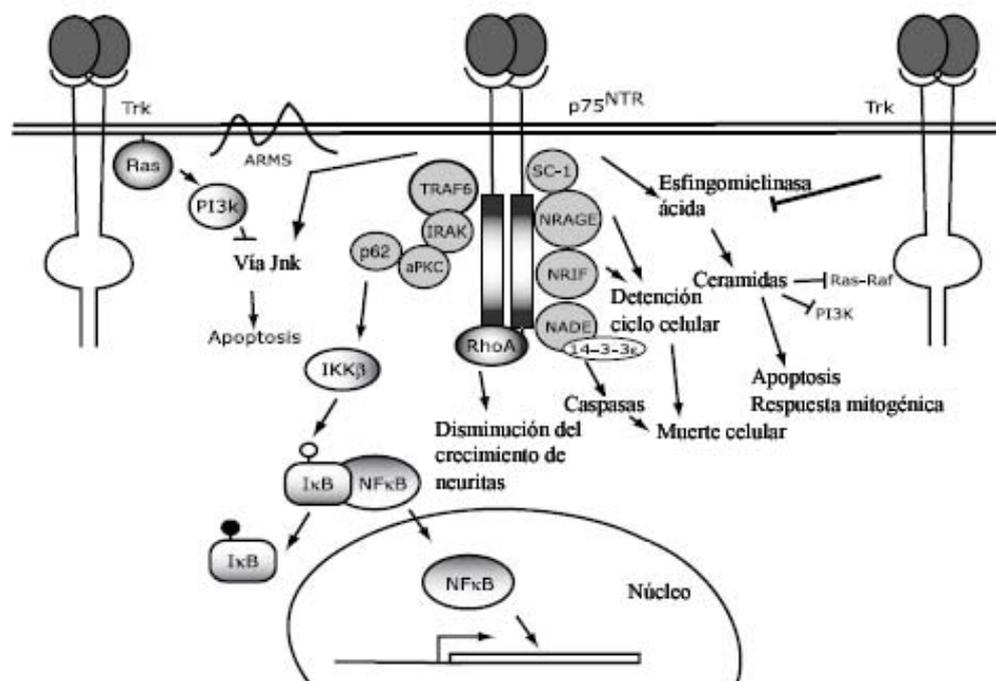


Fig. 25. Interacción de los receptores TrkA y p74. Se activan las proteínas TRAF6, RhoA, NRAGE, SC-1 y NRIF y regulan la expresión génica, el ciclo celular, la apoptosis, respuestas mitogénicas y crecimiento de neuritas. La activación de la vía de Jnk por p75 es inhibida por los receptores Trk. También la activación de la esfingomielinasa ácida y la consecuente producción de ceramidas son inhibidas por Trk. *Modificado de Huang EJ et al., 2003*

3.3.3.3 NGF en células beta

Las células beta adultas sintetizan y secretan NGF y tienen el receptor TrkA, lo que sugiere al NGF como un factor de regulación autocrina de la función de las células beta (Rosenbaum T et al., 1998).

El NGF tiene diversos efectos sobre la morfología y función de células beta adultas en cultivo. Este factor incrementa la secreción de insulina en respuesta a distintas concentraciones de glucosa (Rosenbaum T et al., 2001) a

través de un incremento de calcio y sodio (Rosenbaum T et al., 2001, Vidaltamayo R et al., 2002). Además se observa un aumento de la densidad de corrientes de sodio (Rosenbaum T et al., 1996) y calcio. El NGF también induce cambios morfológicos al inducir la extensión de procesos citoplásmico en las células beta (Hiriart M et al., 1996).en células beta fetales y adultas cultivadas durante 10 días (Vidaltamayo R et al., 1996).

El papel del NGF durante el desarrollo de la estructura y función de los islotes pancreáticos en la etapa posnatal se desconoce. Sin embargo estudios previos sugieren que puede jugar un papel importante ya que si se bloquea farmacológicamente su efecto a través de K252a se observan defectos en la formación de los islotes pancreáticos (Kanaka- Gantenbein 1995b). Así mismo, se ha descrito que el TrkA se expresa inicialmente en las células del sistema ductal y más tarde en las células beta (Kanaka-Gantenbein et al., 1995a) lo que sugiere una actividad del NGF en el desarrollo pancreático.

4. LA CÉLULA ALFA

Las células alfa pancreáticas secretan glucagon, la principal hormona catabólica del cuerpo. El glucagon es un péptido de 29 amino-ácidos con un peso molecular de 3485 daltones cuyo gene se encuentra en el cromosoma 2 de los humanos. El producto inicial del gene de glucagon es el RNAm que codifica al proglucagon cuya edición postraducciona en células alfa pancreáticas da como resultado al glucagon y a un polipéptido no procesado conocido como “fragmento mayor de proglucagon” (MPGF)(Patzelt C et al., 1984) (Fig. 26). Sin embargo, en las células intestinales L el proglucagon produce glicentina y oxintomodulina (Drucker DJ 2005). La convertasa de prohormona 2 (PC2) es indispensable para la liberación del glucagon pancreático y la delección de esta enzima en ratones causa hipoglucemia en ayunas y una mejor tolerancia a la glucosa (Furuta M et al., 1997) consistente con una disminución en los niveles circulantes de glucagon.

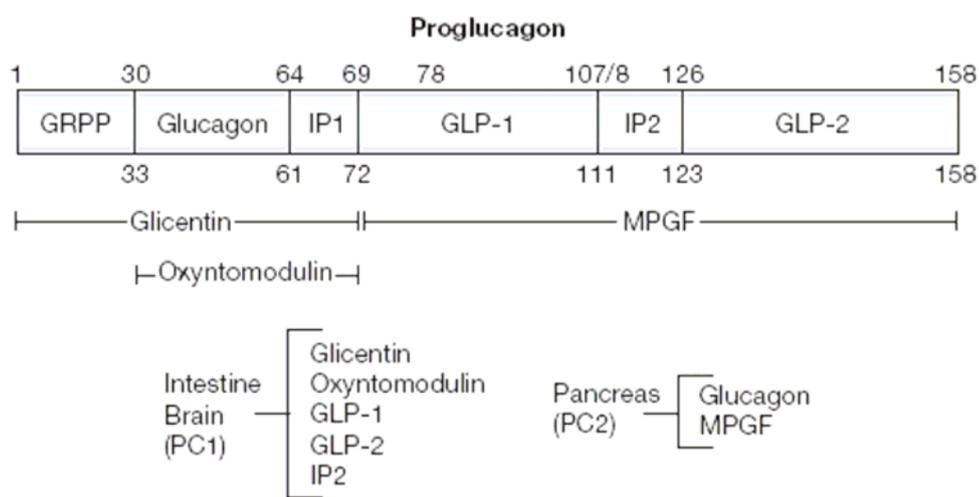


Fig. 26. Estructura del proglucagon y los péptidos derivados del glucagon. Los números se refieren a la posición de aminoácidos en el proglucagon empezando en el extremo amino-terminal. El transcrito sufre edición alternativa con corte de aminoácidos. GLP- péptido parecido al glucagon. GRPP-polipéptido pancreático relacionado a la glicentina. IP- intervening peptide, MPFG- fragmento mayor de proglucagon, PC- convertasa de prohormonas. *Modificado de Drucker DJ 2005*

Acoplamiento entre el estímulo y la secreción

Se sabe que la secreción de glucagon está relacionada con la actividad eléctrica de las células alfa que generan potenciales de acción dependientes de sodio y calcio en la ausencia de glucosa (Rorsman P et al., 1988). La exocitosis de los gránulos de glucagon es un proceso dependiente de calcio. En condiciones basales la exocitosis se correlaciona con el influjo de calcio a través de canales de calcio tipo N. La adrenalina, un potente secretagogo a través de sus efectos en los receptores beta, estimula el influjo de calcio a través de canales de calcio tipo L. También sensibiliza a la maquinaria secretora que potencia el incremento intracelular de calcio y por lo tanto la exocitosis hormonal. Se ha propuesto que en condiciones basales el 65 % de los gránulos de glucagon están cerca de los canales de calcio tipo N y los incrementos localizados de calcio que dan como resultado una secreción hormonal basal. En la presencia de secretagogos la corriente de calcio incrementa como resultado de la activación de canales de calcio y que los dominios de incremento citoplásmico de calcio se hacen mayores. Así mismo incrementa la cantidad de gránulos cercanos a los canales de calcio con lo que el 80 % de los gránulos están expuestos a cambios de calcio por los canales tipo L (Gromada J et al., 1997).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los cambios dietéticos durante el primer mes de vida son importantes en la determinación de la estructura y función del páncreas adulto. Por lo tanto, en este trabajo nos preguntamos si el primer mes de vida es una ventana crítica en el desarrollo posnatal del páncreas en la rata. Así mismo nos preguntamos si se correlaciona con cambios estructurales del islote y con la maduración de la función secretora de las células beta. Finalmente nos planteamos si el NGF es uno de los factores que se relacionan con los cambios en la estructura y la función del páncreas endocrino durante este período.

HIPÓTESIS

- Si, como muestran los antecedentes, la dieta durante el primer mes de vida es un factor determinante en la estructura y función del páncreas endocrino adulto entonces este período será una ventana crítica en el desarrollo posnatal de este órgano que correlacionará con cambios en la fisiología de la homeostasis de la glucosa.
- Si el primer mes de vida es una ventana crítica en el desarrollo del páncreas entonces habrá una importante remodelación estructural y funcional del páncreas endocrino.
- Si existe una remodelación estructural y funcional del páncreas endocrino durante el primer mes de vida entonces el NGF será uno de los factores que regulan los cambios en la estructura y la función del páncreas en este período.

El **objetivo general** de este trabajo es evaluar los cambios fisiológicos en la homeostasis de la glucosa durante el primer mes de vida de la rata y los procesos de remodelación estructural y funcional de los islotes pancreáticos que los subyacen; así como la posible contribución del NGF en los mismos.

OBJETIVOS PARTICULARES

A los 6, 12, 20, 28 y 90 días de vida de la rata se realizaron los siguientes objetivos:

1. Evaluar los niveles circulantes de glucosa, insulina y glucagon.
2. Evaluar la sensibilidad periférica a la glucosa.
3. Establecer la distribución de los islotes en las distintas regiones pancreáticas.
4. Evaluar la masa de células beta y alfa en la cabeza y cola pancreática.
5. Definir el porcentaje y distribución de células beta y alfa dentro del islote.
6. Determinar la secreción basal y estimulada de insulina de las células beta aisladas.
7. Evaluar el efecto del NGF sobre la secreción de insulina de células beta aisladas.
8. Correlacionar las características funcionales de las células beta al final del primer mes con la expresión de genes determinados: insulina, glucagon, NGF, TrkA, PDX-1 y GAD65.

III. MÉTODOS

1. Animales.

Los experimentos se realizaron en ratas Wistar macho en los días 6, 12, 20, 28 y 90 de vida posnatal. A los 90 días de edad las ratas se consideraron adultas. Los animales nacieron en el bioterio del Instituto de Fisiología Celular (UNAM) y se criaron en ciclos de 14 h luz/ 10 h oscuridad con acceso libre a agua y comida; el destete se realizó al día 21. Los cuidados y procedimientos de los animales se llevaron a cabo de acuerdo a la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio de los institutos nacionales de salud (NIH número 85-23, revisado 1985). Las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico intraperitoneal (40 mg/kg, dosis de eutanasia) antes de los procedimientos.

2. Concentración plasmática de glucosa, insulina, glucagon y cortisol.

La medición de glucosa y hormonas sanguíneas se realizó a las 13 h en animales tras 4 h de ayuno y la obtención de muestras se realizó mediante punción cardiaca. La concentración de glucosa sanguínea se determinó utilizando un sistema de monitoreo convencional (MediSense Blood glucose Sensor Precision QID) (n=12 animales/ edad). Los niveles de insulina (n=12 animales /edad) (ALPCO, Windham, NH) y glucagon (n= 6 animales/ edad) (Wako Chemicals, Osaka, Japón) en plasma se determinaron por ELISA.

Se midieron los niveles séricos de cortisol por tratarse de una de las principales hormonas contrarreguladoras de la insulina y elevarse durante

períodos de estrés como podría serlo un cambio de dieta durante el destete. Los niveles de cortisol en plasma (n= 4 animales / edad) se determinaron utilizando el ensayo de cortisol sérico TDx Abbott (revisado en Ayers GJ et al., 1989). Las concentraciones plasmáticas también se expresan por gramo de tejido corporal para compensar el crecimiento durante este periodo.

3. Curvas de tolerancia a la glucosa

Las ratas del d20 y adultas se anestesiaron con éter y se les cateterizó la vena femoral para la inyección intravenosa de glucosa (2 g/kg de peso corporal). Para la medición periférica de glucosa se obtuvieron muestras sanguíneas de la cola a los 0, 30, 60, 90 y 120 minutos y se utilizó un glucómetro convencional para procesar las muestras.

4. Curvas de tolerancia a la insulina

Las ratas del d20 y adultas se anestesiaron con éter y se cateterizó la vena femoral derecha. Se extrajeron muestras sanguíneas a los 0, 30, 60, 90 y 120 minutos después de una inyección de insulina lispro (0.2 U/kg; Human Lispro insulin, Lilly, Fegerheim, France). Las muestras sanguíneas se tomaron de la cola para la medición de glucosa.

5. Inmunohistoquímicas.

Las ratas se perfundieron mediante punción cardiaca con solución de Bouin. Posteriormente se extrajo el páncreas separando la cabeza y la cola que fueron post-fijados por separado durante 24 h en solución de Bouin a 4° C.

Las muestras de tejido se incluyeron en parafina y se realizaron cortes longitudinales seriados (7 μm grosor cada 200 μm de tejido). Se desparafinaron con gradientes de alcohol decrecientes (100 %, 96 %, 85 %, 70 % y 50 %) y se permeabilizaron utilizando una solución de Tris base 0.1 M, Tritón X-100 0.3 % y suero normal de cabra 1% durante 1 h a temperatura ambiente. Los cortes se incubaron con anticuerpos primarios siguiendo el protocolo especificado en la tabla 4.

Tabla 4. Condiciones de anticuerpos primarios utilizados en inmunocitoquímicas.

Antígeno	Anticuerpo levantado	Concentración	Incubación (Horas)	Temperatura (°C)	Marca
Insulina	Cobayo	1:2000	4	TA	ICN
Glucagon	Ratón	1:6000	16	4	Sigma
Nestina	Ratón	1:500	16	4	Chemicon
GLUT-2	Conejo	1:200	16	4	Chemicon

La detección de anticuerpos primarios se hizo con anticuerpos biotinilados (1:100), durante una hora a temperatura ambiente y revelado con el complejo avidina-peroxidasa (Vector, Burlingame, CA). También se utilizaron anticuerpos secundarios acoplados a FITC (excitación = 494 nm, emisión = 520 nm) o a CY5 (excitación = 650 nm, emisión = 670 nm) en una concentración 1:100 durante una hora a temperatura ambiente. Las muestras se observaron con un microscopio confocal utilizando el canal rojo para CY5 y el canal verde para FITC.

Cuantificación membranal de GLUT2.

Se hicieron dobles inmunohistoquímicas para GLUT2 e insulina y se obtuvieron 10 imágenes/porción pancreática por rata en el microscopio confocal. Para calcular el porcentaje de GLUT2 membranas se midió la colocalización del transportador con insulina asumiendo que la localización de esta proteína es predominantemente citoplásmica. Para esto se utilizó un programa de análisis de imágenes Image Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics Inc. Silver Springs, MD, EUA).

6. Inmunocitoquímicas.

Se fijaron las células en cultivo con paraformaldehído 4 %, pH 7.4 durante 16 h a 4 °C. Se permeabilizaron con una solución de TBS 0.1M, SNC 3% y Tritón x-100 0.3% durante 1h a temperatura ambiente y se incubaron con el anticuerpo primario contra insulina (levantado en cobayo, 1:4000) durante 48 h a 4°C en cámara húmeda. Posteriormente se añadió el anticuerpo primario contra NGF (levantado en conejo, 1:500) durante 72 h a 4°C en cámara húmeda. Se reveló la presencia de anticuerpos primarios con anticuerpos secundarios acoplados a CY5 (1:100) y FITC (1:100) y se observaron en un microscopio confocal.

Así mismo, se hicieron una serie de controles negativos con los que rectificamos la especificidad y sensibilidad de los anticuerpos, tanto primarios como secundarios, que utilizamos.

1.3 Controles negativos.

- a. Anticuerpo de cobayo contra insulina (1:4000) bloqueado con insulina (0.5 mg/ml). Revelado con

anticuerpo de cabra contra cobayo marcado con CY5 (1:100).

b. Anticuerpo de conejo contra NGF (1:500) bloqueado con NGF (50ng/ml). Revelado con anticuerpo de cabra contra conejo marcado con FITC (1:100).

c. Incubación con anticuerpo secundario de cabra contra conejo marcado con FITC, sin previa incubación con anticuerpo primario (conejo contra NGF).

d. Incubación con anticuerpo secundario de cabra contra cobayo marcado con CY5, sin previa incubación con anticuerpo primario (cobayo contra insulina)

e. Anticuerpo de conejo contra NGF revelado con anticuerpo de cabra contra cobayo marcado con CY5.

f. Anticuerpo de cobayo contra insulina revelado con anticuerpo de cabra contra conejo marcado con FITC.

7. Análisis morfométrico de células beta y alfa.

Para estimar el porcentaje del área pancreática ocupada por células alfa o beta, la masa de células beta y el tamaño de agregados celulares, se dibujaron los contornos de las secciones pancreáticas así como de los agregados inmunoteñidos utilizando una cámara lúcida acoplada a un microscopio Optiphot Nikon. Estos dibujos se escanearon, digitalizaron y se midió el área pancreática así como de los agregados inmunoteñidos de células beta y alfa utilizando un sistema de análisis de imágenes (Scion Image, Scion Corporation). El porcentaje de células pancreáticas ocupado por células alfa o beta se estimó utilizando la siguiente relación matemática:

Volumen relativo (%) = $(\Sigma \text{ área de agregados inmunoteñidos} \times 100) / \Sigma$
área pancreática total

La masa de células beta o alfa se calculó de la siguiente manera:

Masa celular (g) = Volumen relativo (%) x Peso pancreático correspondiente (Bonner-Weir S et al., 2001).

En el análisis morfométrico de las células beta se contaron 9216 agregados celulares de un promedio de 8 animales por edad. Para el análisis de células alfa se contaron 1730 agregados celulares de un promedio de 4 animales por edad.

8. Cultivo de células beta.

Se extrajeron los páncreas, se incubaron con colagenasa tipo IV (Worthington, Freehold, NJ) a 37°C y se obtuvieron células aisladas como se describió previamente (Vidaltamayo R et al., 1996). Se cultivaron células aisladas a 37°C en RPMI 1640 (11.6 mM glucosa) suplementado con suero bovino fetal 1%, penicilina G 200 U/mL, estreptomina 200 mg/mL y anfotericina B 0.5 mg/mL. Los experimentos de secreción de insulina *in vitro* se llevaron a cabo en células beta cultivadas durante 48 h.

9. Secreción de insulina *in vitro*.

Se midió la concentración de insulina en los sobrenadantes de medio recolectado de cultivos de células beta de 20 días de edad expuestos a: 1) 5.6 mM glucosa, 2) 5.6 mM glucosa + 40 mM KCL, 3) 5.6 mM glucosa + 10 mM L-leucina o 4) 15.6 mM glucosa, 5) 5.6 mM glucosa + 50 ng/mL NGF durante 1 h a 37°C. Todos los cultivos celulares fueron equilibrados con solución de Hanks (5.6 mM glucosa) durante 1 h a 37°C previo a los experimentos. La concentración de insulina se determinó por el ensayo de inmunoabsorción

acoplado a enzimas (ELISA) (ALPCO, Windham, NH). Los resultados expresados se obtuvieron de 4 experimentos diferentes por duplicado.

10. Ensayo hemolítico inverso (RHPA).

Para identificar las células secretoras de insulina y medir la secreción individual de células aisladas a los 28 días, utilizamos el ensayo hemolítico inverso como se describió previamente (Hiriart M,1991). Se eligió este método para evaluar la secreción de insulina al d20 y d28 porque permite evaluar la respuesta individual de las células beta a la glucosa así como las subpoblaciones funcionales. Brevemente, células beta aisladas se estimularon en presencia de suero anti-insulina (1:20) (Biogenesis, Sandown, NG) durante 1 h con 5.6 o 15.6 mM glucosa; con o sin K252a como antagonista de TrkA en una dosis de 200 nmol/l. Se incubaron posteriormente con complemento de cobayo durante 30 min (Life Technologies, Grand Island, NY). La insulina liberada durante la incubación se reveló por la presencia de placas hemolíticas alrededor de las células beta secretoras de insulina. Se calculó la actividad secretora global de las células beta en una condición experimental y se expresó como índice de secreción. Este índice se calculó multiplicando el área de inmunoplaaca que es proporcional a la cantidad de insulina secretada, por el porcentaje de células formadoras de placa.

Para identificar las subpoblaciones funcionales de células beta se hizo un histograma de frecuencias utilizando las áreas de placas de hemólisis. Con el anticuerpo contra insulina que estamos utilizando, clasificamos las áreas de la siguiente manera: células formadoras de placas pequeñas (SP inmunoplaacas $\leq 4000 \mu\text{m}^2$), y células formadoras de placas grandes (LP; inmunoplaacas >4000

μm^2). Los resultados expresados son el promedio de 4 experimentos realizados por duplicado.

Para cuantificar el número de células beta y alfa en los experimentos hicimos inmunocitoquímicas para insulina y glucagon. En estos experimentos se llevó a cabo el RHPA en cubreobjetos marcados con letras para identificar las células individuales y poder hacer una correlación entre secreción e inmunotinción. Las células fueron fijadas con paraformaldehído y procesadas como se describió previamente.

11. RT-PCR

Con el fin de evaluar la transcripción del gene de insulina y NGF durante el primer mes del desarrollo, así como el efecto del NGF en cultivo sobre la misma, se realiza una medición semicuantitativa de la expresión de los genes de insulina, glucagon, NGF, TrkA, PDX-1, GAD65 y GAPDH como control interno de expresión.

El mRNA de células beta fue obtenido al lisar a las células en cultivo de 48 h, condiciones control y NGF, en reactivo TRIzol (1 ml/10⁶ células).

De manera breve, la técnica de RT-PCR consiste en realizar una transcripción reversa de RNA a DNA con la enzima transcriptasa reversa en un ciclo de 15 min a 42°C y 5 min a 99°C. Posteriormente, se lleva a cabo una amplificación del cDNA de interés utilizando la polimerasa Taq y los oligonucleótidos específicos para cada gene, con el fin de llevar a cabo reacciones semicuantitativas.

Las secuencias utilizadas son las mostradas en la tabla 5 y las condiciones a las que se corrieron las reacciones de polimerasa en cadena se muestran en la tabla 6.

Tabla 5. Secuencias de oligonucleótidos utilizados en las reacciones de RT-PCR semicuantitativo.

GENE	Oligo (5') sentido	Oligo (3') antisentido
GAPDH	5'-GCCCCCATGTTTGTGAT-3'	5'-GCCCCAGCATCAAAGGT-3'
Insulina	5'-AAGAGCCATCAGCAAGC-3'	5'-GAGCAGATGCTGGTGCAGC-3'
NGF	5'-GGCATGCTGGACCCAAGCTC-3'	5'-GCGCTTGCTCCGGTGAGTCC-3'
TrkA	5'-GCAAAGCCGTGGAACAG-3'	5'-CCCATGGCGCATGTACT-3'
PDX-1	5'-GCTCACCTCCACCACCACCTT-3'	5'-GCAGTACGGGTCCCTTGTTTTCC-3'
Glucagon	5'-GAATTCATTGCTTGGCTGGT-3'	5'-CATTTCAAACATCCCACGTG-3'
GAD 65	5'-ATTGGATCCCATCCCCGATATTTAATCAGC-3'	5'-CCACTTGTGTTTCCGAGACATCAG-3'

Los productos de la reacción de PCR se visualizaron en un gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio. Las bandas se transfirieron a una membrana de nylon Hybond-N. Se fijan con exposición a luz UV. Se lleva a cabo la hibridación con un oligonucleótido marcado con ATP (gamma-32P) usando una cinasa de polinucleótido T4. La intensidad de las bandas se determinó utilizando el PhosphorImager.

Tabla 6. Condiciones de las reacciones de amplificación para los diferentes DNAC durante el RT-PCR.

GENE	Temperatura de alineamiento (°C)	Número de ciclos
GAPDH	57	26
Insulina	56	26
NGF	61	35
TrkA	57	35
PDX-1	62	35
Glucagon	56	30
GAD 65	59	35

12.- Análisis estadístico.

Los resultados se expresan como promedio \pm error estándar (ES). Los datos se evaluaron estadísticamente con ANOVA de una vía seguido por prueba de Fisher o t-Student, utilizando el programa Statview 4.57 (Abacus Concepts, Cary, NC).

IV. RESULTADOS

1. Crecimiento durante el primer mes de vida posnatal.

Se midió el peso corporal y pancreático al d6, d12, d20, d28 y d90 posnatal de las ratas (Fig. 27 y Tabla 7). Se observó que el primer mes de vida es un periodo caracterizado por un crecimiento corporal importante durante el cual el peso corporal y pancreático se duplicó cada semana.

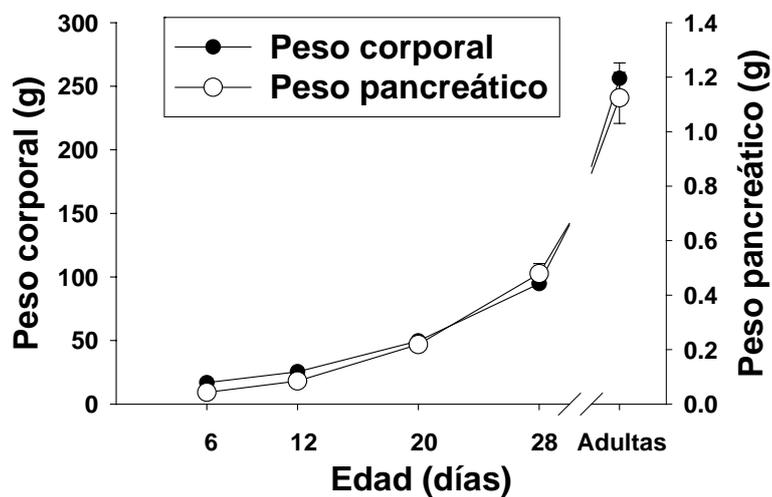


Figura 27. Peso corporal y pancreático durante el primer mes de vida de las ratas. n =

En la Fig. 28 se muestra la adquisición de peso pancreático en función de la adquisición del peso corporal y se observa que la relación entre ambos es lineal y directamente proporcional. A partir de esto se puede inferir que el crecimiento del páncreas está en función del crecimiento corporal y no existe un crecimiento independiente de la glándula.

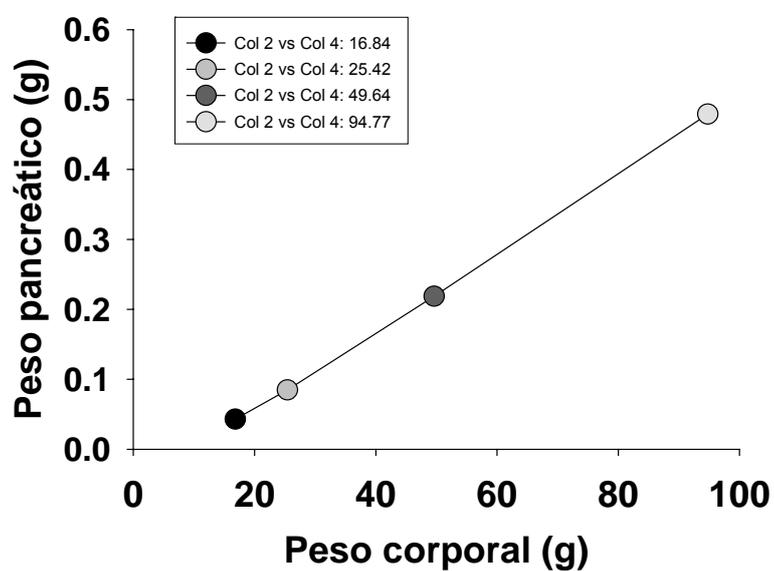


Figura 28. Relación entre peso pancreático y peso corporal durante los primeros 28 días de vida posnatal de la rata.

2. Cambios fisiológicos durante el primer mes de vida

Cambios en los niveles plasmáticos de glucosa, insulina, glucagon y cortisol durante el primer mes de vida.

Los niveles plasmáticos de glucosa incrementaron consistentemente durante las tres primeras semanas de vida alcanzando valores de 223 mg/dL al d20 (Fig. 29)

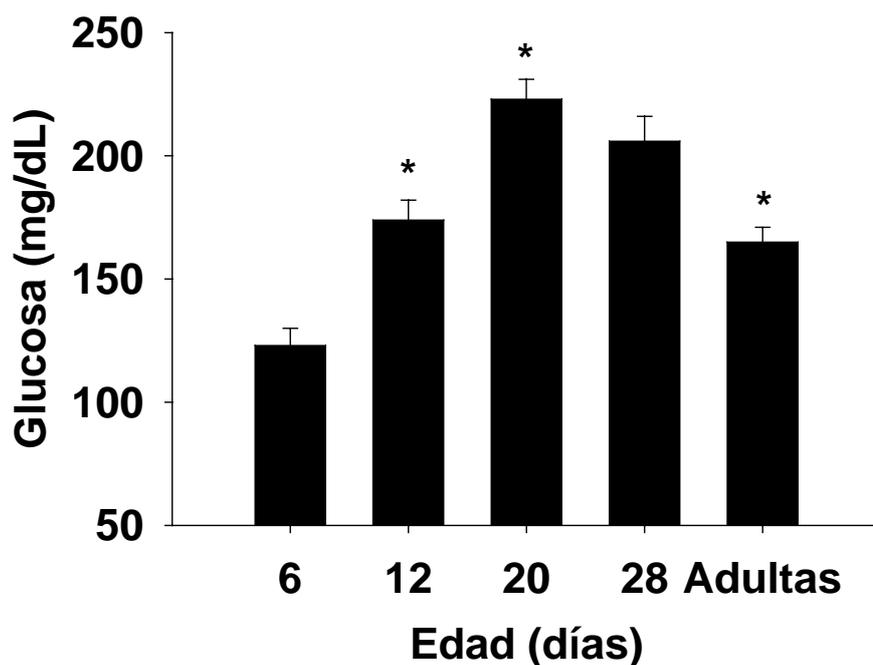


Figura 29. Glucosa plasmática (n=12 animales/edad); símbolos denotan diferencias estadísticamente significativas (*) $p < 0.05$

Al expresar la glucosa por gramo de peso corporal, para compensar por los cambios en el peso durante el crecimiento en este período (tabla 7), se observa que los niveles de glucosa eran similares del d6 al d20 seguido de una reducción de 8 veces en adultos.

Tabla 7. Parámetros corporales y plasmáticos durante el primer mes de vida; la glucosa, insulina, glucagon y cortisol plasmático se expresan por gramo de tejido pancreático.

Edad	Peso corporal (g)	Peso Pancreático (g)	Glucosa (mg/dL/g)	Insulina (pg/mL/g)	Glucagon (pg/mL/g)	Cortisol (pg/mL/g)
6 días	17 ± 0.3	0.04 ± 0.002	5.5 ± 0.2	27 ± 5	97 ± 7	34 ± 7
12 días	25 ± 0.9	0.08 ± 0.003	5.9 ± 0.2	47 ± 6*	68 ± 9*	753 ± 260*
20 días	50 ± 2.3	0.22 ± 0.01	5.1 ± 0.2*	31 ± 4*	21 ± 2†	71 ± 4
28 días	95 ± 2.9	0.48 ± 0.03	2.3 ± 0.2†	12 ± 4*	9 ± 1**	58 ± 5
Adultas	256 ± 12	1.12 ± 0.09	0.7 ± 0.02†	11 ± 2	14 ± 2	17 ± 1†

Datos son promedios ± EEM. **p<0.05, *p<0.01, †p<0.0001 con respecto a la edad previa.

Los niveles de insulina plasmática alcanzaron un pico al d20 con valores 6 veces mayores que los observados al d6 (Fig. 30). Al expresarlos por gramo de peso, los niveles de insulina estuvieron elevados entre el d6 y el d12 y disminuyeron consistentemente del d12 al d28, cuando se alcanzaron los niveles observados en adultos (Tabla 7).

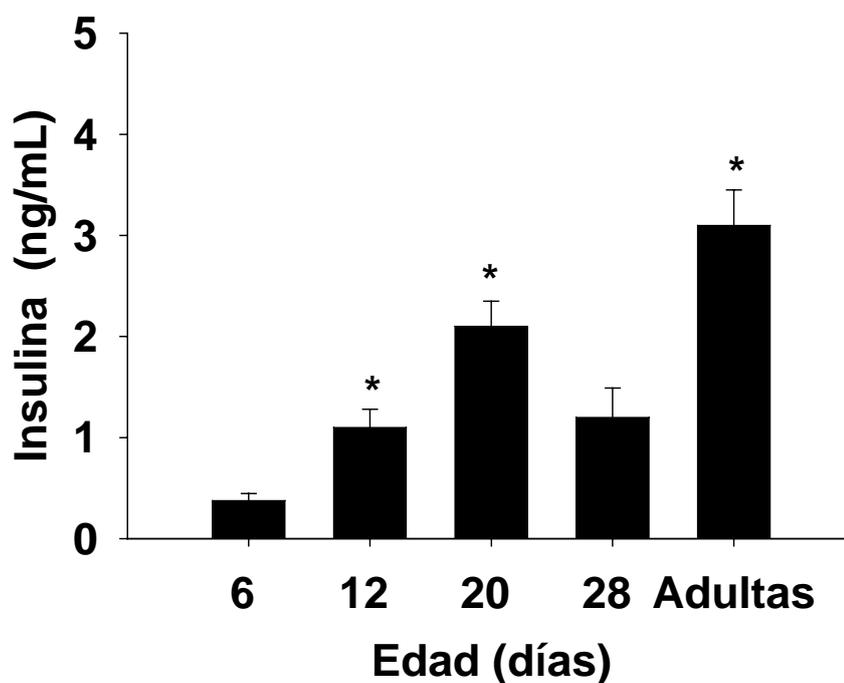


Figura 30. Niveles plasmáticos de insulina a diferentes edades (n = 12) Símbolos denotan diferencias estadísticamente significativas, (*) p<0.05

Los niveles de glucagon plasmático disminuyeron progresivamente del d6 al d28 cuando se alcanzaron valores significativamente menores que al d6 (Fig. 31).

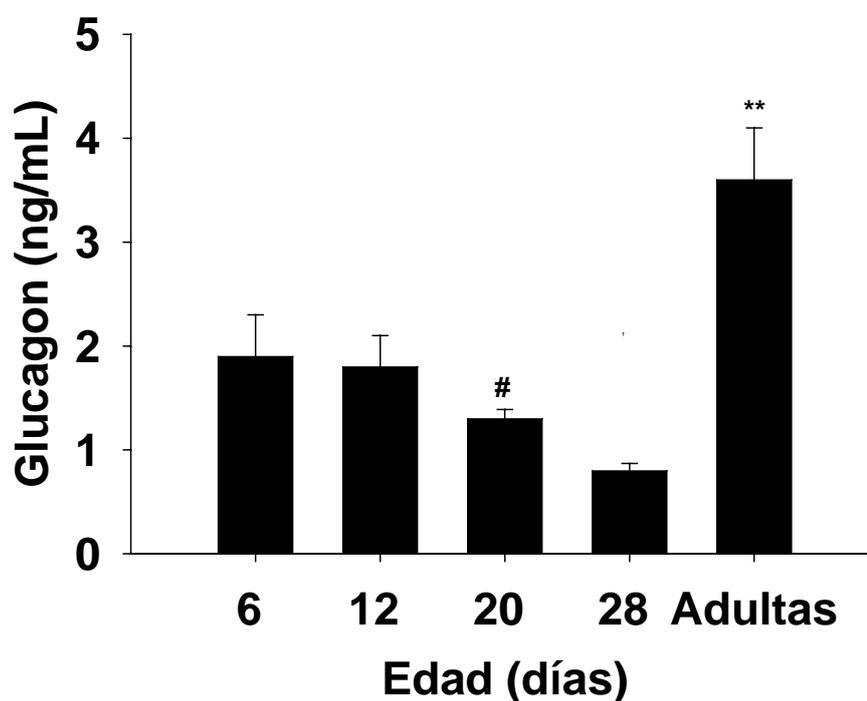


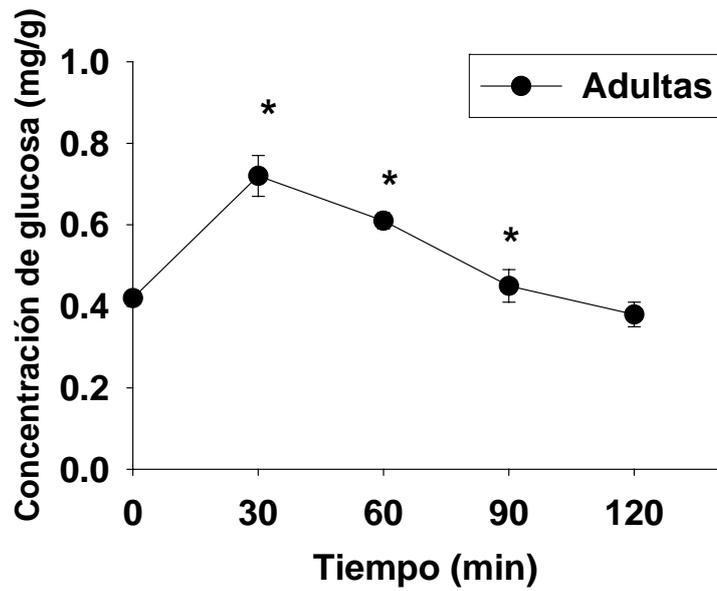
Figura 31. Niveles plasmáticos de glucagon (n=6). Símbolos denotan diferencias estadísticamente significativas, (**) $p < 0.0001$ con respecto a la edad previa, (#) $p < 0.05$ con respecto al d6.

Finalmente, se midieron los niveles de cortisol plasmático para correlacionarlos con el desarrollo pancreático y las concentraciones de glucosa sanguínea. Observamos un pico de cortisol al d12 el cual disminuyó a lo largo del primer mes hasta alcanzar los valores de la edad adulta (Tabla 7).

Curva de tolerancia a la glucosa IV

Se hicieron curvas de tolerancia a la glucosa al d20 y en ratas adultas (Fig. 32 A y B) en las que se observa que en ratas adultas se alcanza un pico de glucosa plasmática a los 30 minutos y se recuperan los niveles basales de glucosa a las 2 horas. Al d20, la curva parte de niveles de glucosa más elevados que en ratas adultas y no muestra diferencias significativas en ningún momento después de la inyección intravenosa de glucosa. Esto sugiere diferencias en el metabolismo de la glucosa al d20 en comparación con ratas adultas.

A.



B.

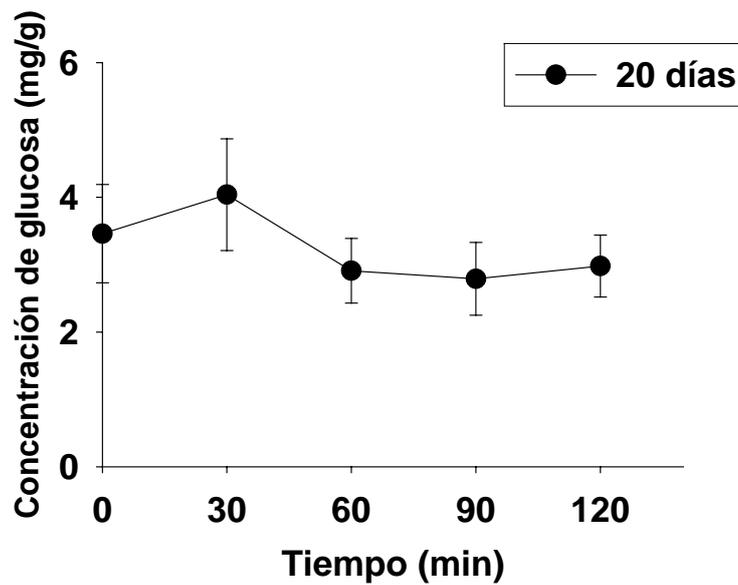


Figura 32. Se realizaron curvas de tolerancia a la glucosa intravenosa a grupos de ratas ($n=3$ por edad) anestesiadas al d20 (A) y adultas (B). Se les inyectó glucosa (2 g/kg) intravenosa por un catéter femoral y se extrajeron muestras de sangre para la determinación de glucosa sanguínea a diferentes tiempos. (*) $p<0.05$ con respecto a la medición anterior.

Sensibilidad periférica a la insulina

Exploramos la sensibilidad periférica a la insulina (Fig. 33). La respuesta a una sola dosis de insulina intravenosa en adultos ocasionó una disminución inmediata de los niveles circulantes de glucosa del 33%. Al d20 sin embargo la respuesta a la insulina estaba retrasada 30 minutos en comparación con la respuesta observada en las adultas y la disminución máxima de los niveles circulantes de glucosa fue de un 10 %. Estos resultados sugieren una disminución en la sensibilidad periférica a la insulina al d20.

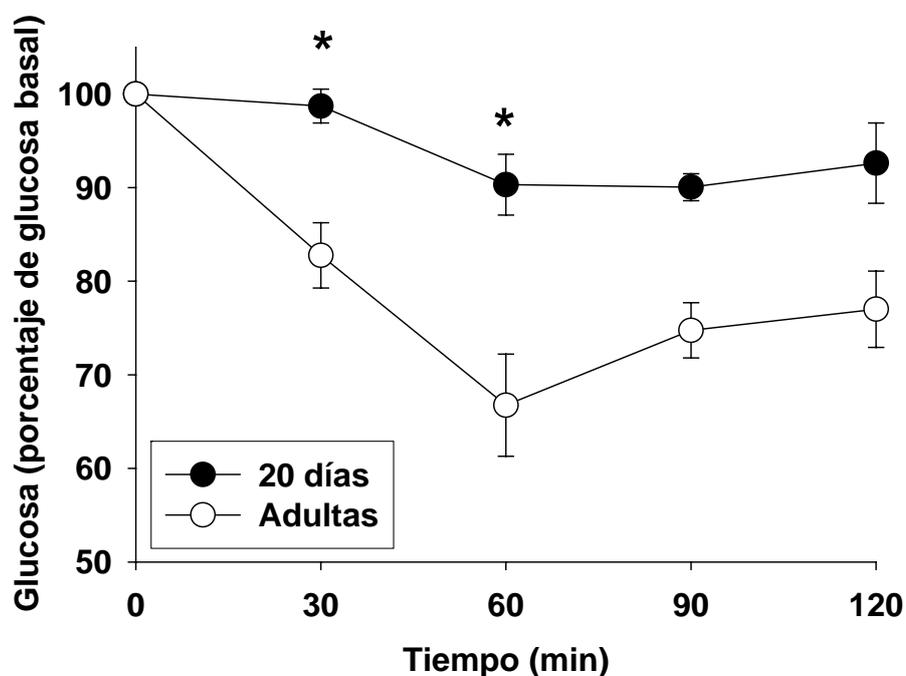


Figura 33. Prueba de tolerancia a la insulina en ratas al d20 y adultas. Se realizaron pruebas de tolerancia a la insulina a grupos de ratas (n=6 por edad) anestesiadas al d20 y adultas. Se les inyectó insulina (0.2 U/kg) de manera intravenosa por un catéter femoral y se extrajeron muestras de sangre para la determinación de glucosa sanguínea a diferentes tiempos. (*) $p < 0.05$ con respecto al adulto.

3. Reorganización estructural del páncreas en desarrollo

Cambios en el porcentaje relativo ocupado por tejido exocrino.

El área pancreática ocupada por tejido exocrino en la cabeza disminuyó durante los primeros 20 días de vida (Fig. 34) Esta disminución fue estadísticamente significativa al d20 y fue seguida por un incremento del 3 % en el d28.

En la cola, el tejido exocrino incrementó consistentemente durante los primeros 20 días de edad y se mantuvo constante hasta la edad adulta.

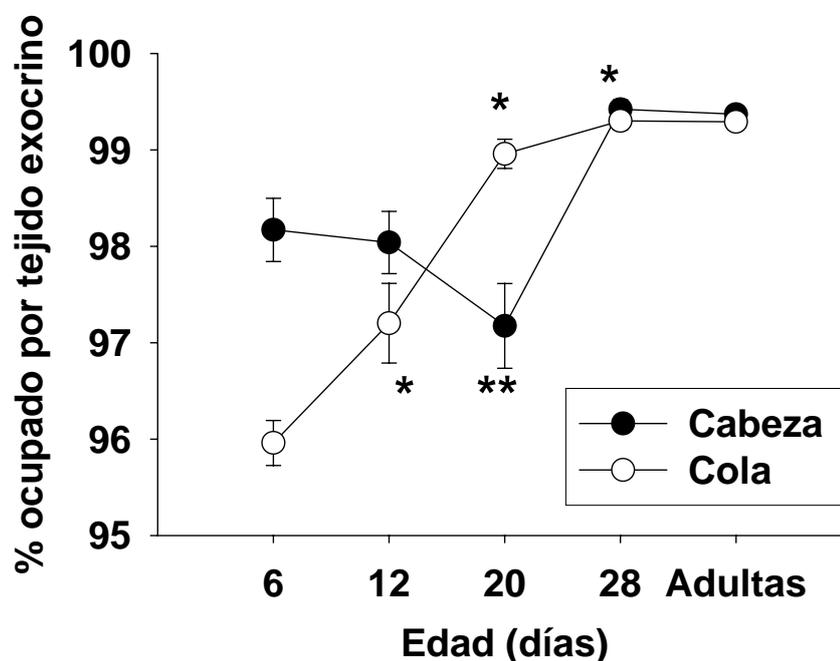


Figura 34. Porcentaje de área pancreática ocupada por tejido exocrino. Resultados son el promedio \pm EEM, n= 8. (*) p < 0.0005 con respecto a la edad previa, (**) p<0.05 con respecto al d6.

Cambios en el porcentaje relativo de células beta.

El área pancreática ocupada por células beta en la cabeza disminuyó con la edad (Fig. 35) Esta disminución fue estadísticamente significativa al d20. La disminución en el porcentaje de células beta entre el d12 y el d20 fue más pronunciada en la cola (64%) que en la cabeza (42%) pancreática. Al d28 el porcentaje relativo de células beta en ambas porciones pancreáticas fue similar al observado en las ratas adultas (d90).

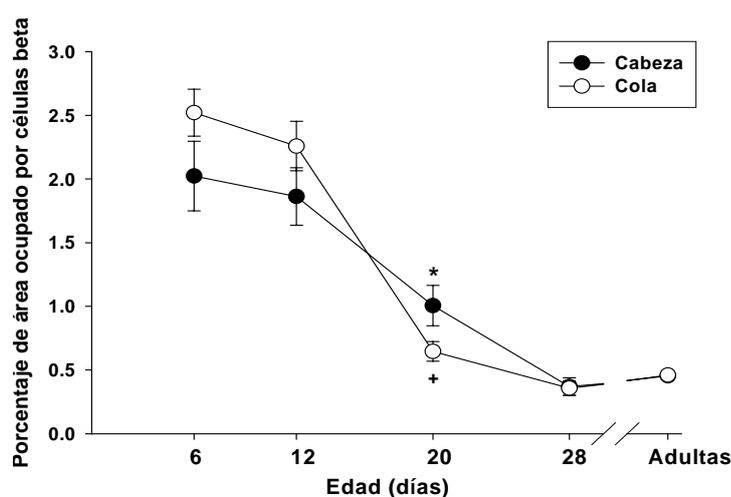


Figura 35. Porcentaje de área pancreática ocupada por células beta. Resultados son el promedio \pm EEM, n= 8. (*) $p < 0.05$, (†) $p < 0.0001$ con respecto a la edad previa.

Cambios en la masa de células beta.

La masa de células beta incrementó del d6 al d12 tanto en la cabeza como en la cola pancreática. En la cabeza, llegó a un máximo al d20 alcanzando valores 4 veces mayores que al d12 (Fig. 36), alcanzando valores mayores al d90. La masa de células beta en la cola se duplicó entre el d6 y el d12 y permaneció estable hasta el d28, sin embargo a partir de esta edad incrementó para alcanzar los valores observados al d90.

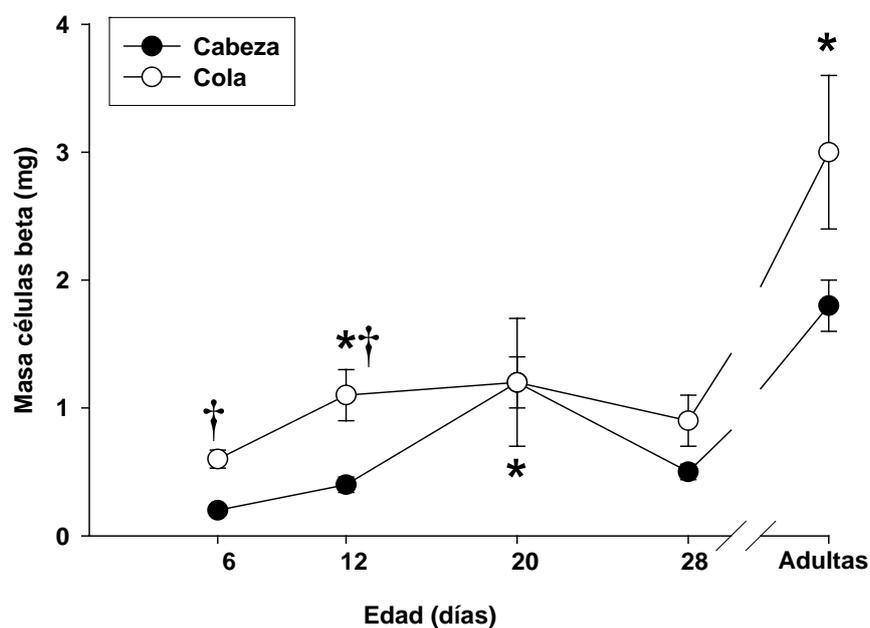


Figura 36. Masa de células beta durante el primer mes de vida en la cabeza y cola pancreática. Resultados son el promedio \pm EEM, $n=8$. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ con respecto a la edad previa.

Cambios en el tamaño de agregados de células beta.

Observamos una distribución bimodal del tamaño de agregados de células beta en todas las edades estudiadas (Fig. 37). En todas las edades, el tamaño predominante fue menor a $10,000 \mu\text{m}^2$. Sin embargo, se observó una pequeña proporción de agregados mayores a $10,000 \mu\text{m}^2$. Una mayor frecuencia de agregados pequeños se observó al d6 en comparación con el d20 y las ratas adultas (Fig. 37 A). El tamaño de agregados de células beta al d20 fue similar al observado en ratas adultas (Fig. 37 B).

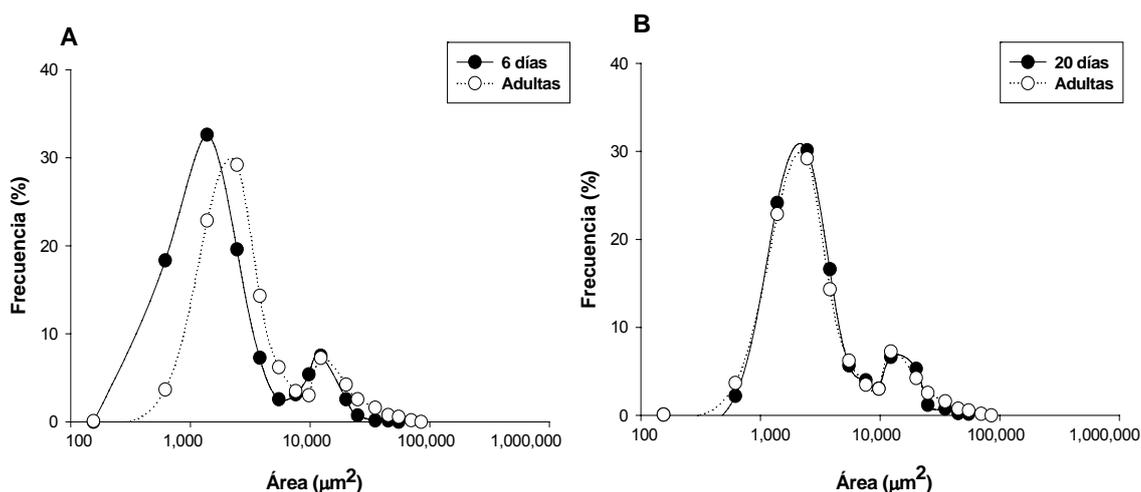


Figura 37. Distribución del tamaño de agregados de células beta a los 6, 20 y 90 días. A) Distribución de frecuencias de agregados de células beta a los 6 y 90 días de edad. **B)** Comparación entre el día 20 y el día 90. Se hizo un conjunto de datos de 8 ratas, $n = 9216$ agregados de células beta.

Cambios en el porcentaje relativo de células alfa.

El área pancreática ocupada por células alfa en la cola mostró una disminución progresiva entre el d6 y el d20, cuando el porcentaje de células alfa fue similar al observado en adultos (Fig. 38). En la cabeza el porcentaje relativo de células alfa fue similar entre el d6 y el d12 pero presentó un incremento de 5 veces entre el d12 y el d20, seguido por una disminución significativa (95 %) entre el d20 y el d28, cuando se alcanzaron valores similares al adulto.

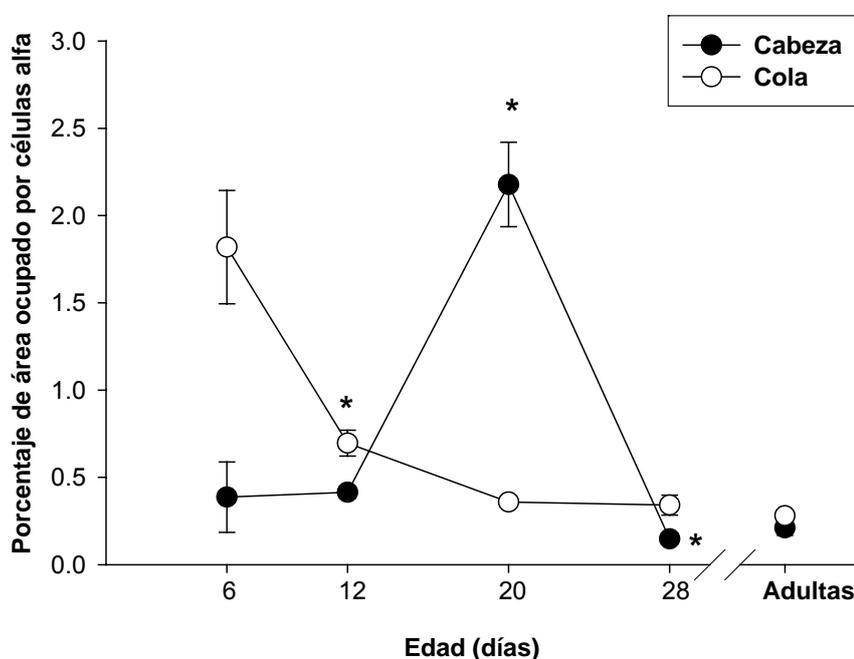


Figura 38. Porcentaje de área pancreática ocupada por células alfa. Promedios \pm EEM, n=4. (*) $p < 0.0001$ con respecto a la edad previa.

Cambios en la masa de células alfa.

Del d6 a la edad adulta se observó una tendencia de la masa de células alfa a incrementar en la cola. En la cabeza, los valores permanecieron constantes entre el d6 y el d12 seguido por un incremento de 32 veces entre el d12 y el d20. Posteriormente, al d28 observamos una disminución significativa hasta alcanzar valores similares a los observados al d12, seguido de un incremento de 3.5 veces hasta alcanzar valores adultos (Fig. 39).

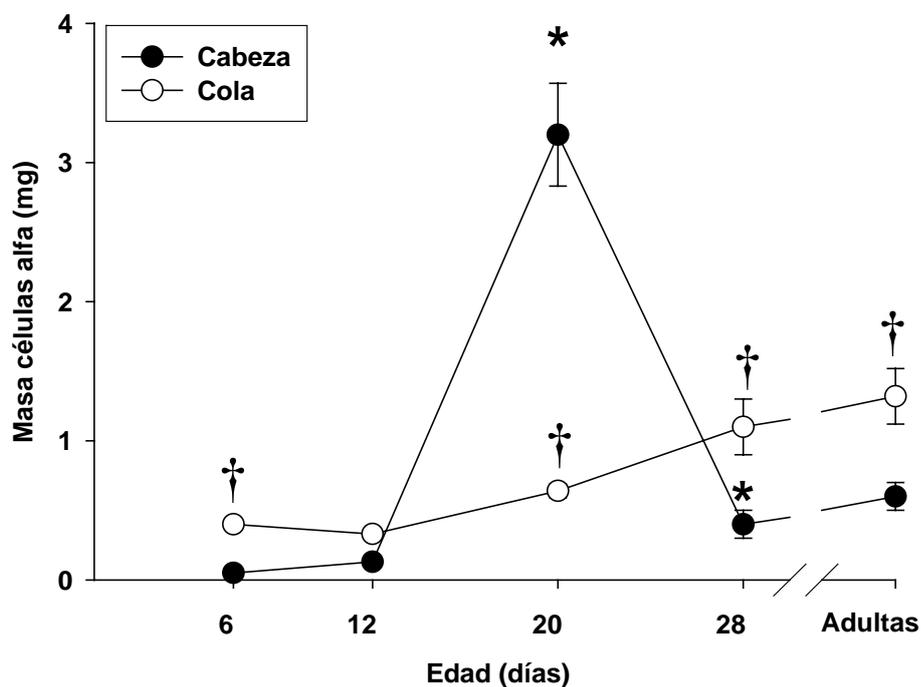


Figura 39. Masa de células alfa en la cabeza y cola pancreática durante el primer mes de vida. Promedios \pm EEM, $n=4$. (*) $p<0.0001$ con respecto a la edad previa. (\dagger) $p<0.05$ respecto a la otra porción pancreática.

Cambios en el tamaño de agregados de células alfa.

Observamos una distribución multimodal del tamaño de agregados de células alfa en las edades estudiadas (Fig. 40). El tamaño predominante de agregados de células alfa fue entre 2 000 y 3 000 μm^2 aunque se observaron agregados entre 8 000 y 18 000 μm^2 en todas las edades. Al d6 se observaron más agregados pequeños que en las adultas (Fig. 40 A), mientras que al d20 la distribución de tamaños fue mayor y similar al de adultas (Fig. 40 B).

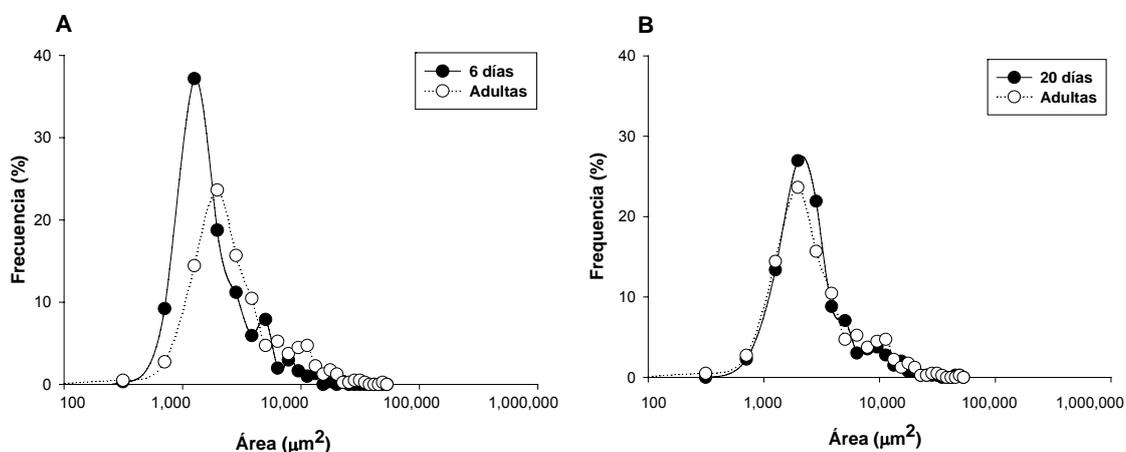


Figura 40. Distribución multimodal del tamaño de agregados de células alfa a los 6, 20 y 90 días. A) Distribución de frecuencias de agregados de células beta a los 6 y 90 días de edad. **B)** Comparación entre el día 20 y el día 90. Datos agregados de 4 ratas. n= 1 739 agregados de células alfa.

Cambios en la conformación de los islotes pancreáticos

Exploramos la repercusión de los cambios observados en las poblaciones de células alfa y beta sobre la estructura de los islotes a los días 6, 20 y adultas. La tabla 8 muestra el porcentaje del islote ocupado por células alfa y beta en las dos porciones pancreáticas a distintas edades.

Tabla 8. Cambios en la conformación del islote y grupos aislados de células alfa y beta durante el primer mes de vida.

Porción pancreática	Edad	Conformación del islote		Grupos celulares aislados	
		Células beta (%)	Células alfa (%)	Células beta (%)	Células alfa (%)
Cabeza	6 días	70 ± 6	30 ± 6	53 ± 6†	33 ± 3
	20 días	64 ± 6†	36 ± 6†	29 ± 4*	51 ± 1*†
	Adultas	89 ± 1*†	11 ± 1*†	53 ± 2†	9 ± 4†
Cola	6 días	63 ± 3	37 ± 3	25 ± 2	40 ± 3
	20 días	50 ± 4*	50 ± 4*	30 ± 5	25 ± 6
	Adultas	63 ± 2*	37 ± 2*	38 ± 4	29 ± 2

Los datos son promedios \pm EE. * $p < 0.01$ con respecto a las otras edades dentro de la misma porción pancreática, † $p < 0.05$ con respecto a la otra porción pancreática a la misma edad.

Entre d6 y d20 el 65 % de los islotes de la cabeza estaba ocupado por células beta, proporción que aumentó a un 89 % en islotes adultos. En la cola el 50 % del área de los islotes al d20 estaba ocupada por células alfa. Sin embargo, en los adultos los islotes de la cabeza tenían 11% de células alfa y en los islotes de la cola la población positiva a glucagon alcanzó un 37%.

La figura 41 se muestra la distribución de células alfa y beta dentro del islote al d6, d20 y adultas donde se puede observar que los islotes adultos de la cabeza y la cola son diferentes ya que los de la cabeza no tienen una proporción muy baja de células alfa mientras que en los de la cola se observó la distribución característica de células alfa alrededor de células beta. Esta conformación cambió durante el primer mes de vida sugiriendo que los cambios en el porcentaje, masa y tamaño de células alfa y beta repercuten en la estructura de los islotes pancreáticos.

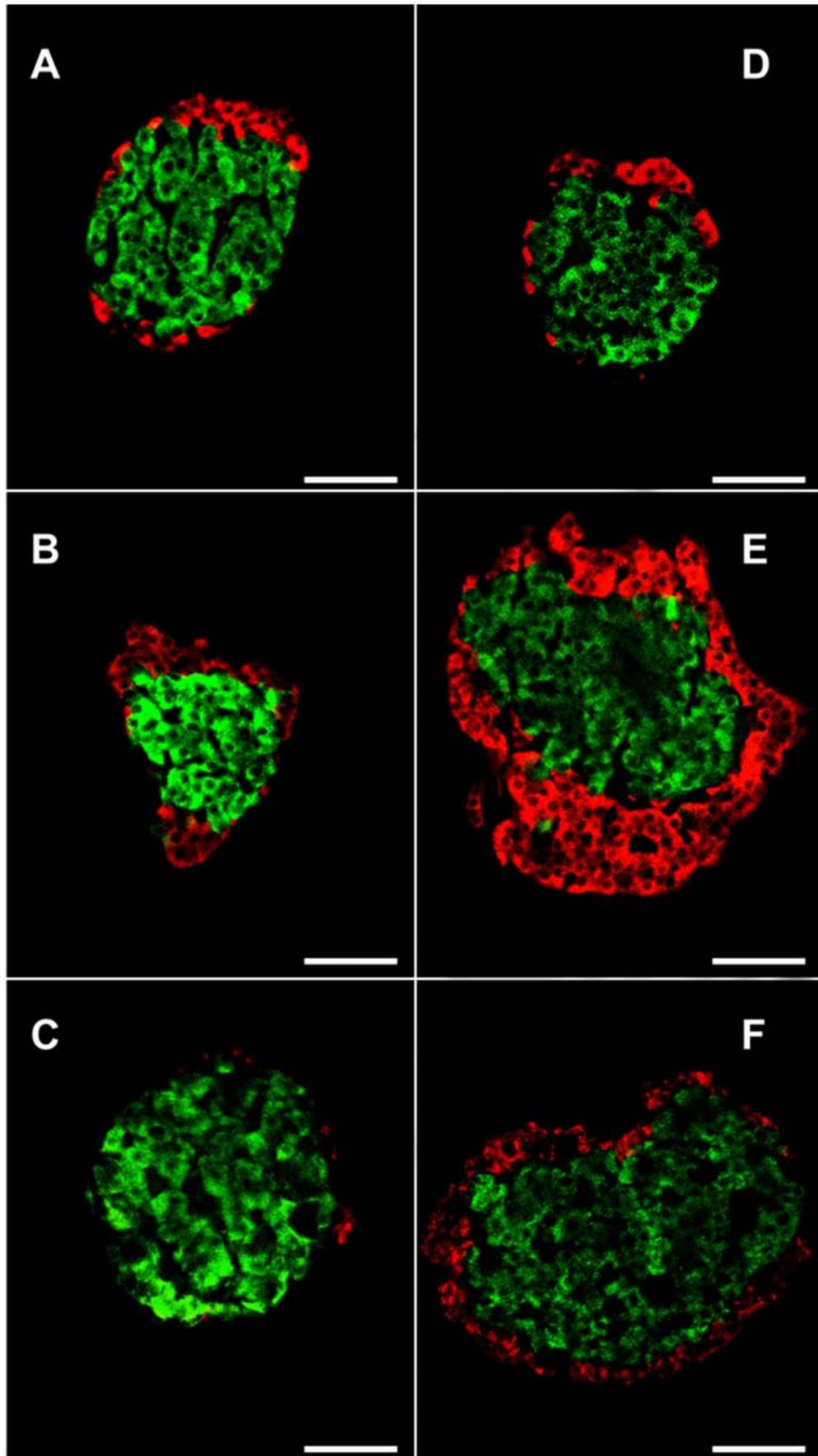


Figura 41 (página anterior) Cambios en la composición de los islotes de la cabeza y cola al d6, d20 y adultas. Fotomicrografías que ilustran la distribución de células alfa (rojo) y beta (verde) en islotes representativos de la cabeza (A-C) y cola (D-F) la d6 (A y D), d20 (B y E) y adultas (C y F). Barra = 50 μ m.

Agrupaciones de células beta o alfa.

Durante el análisis morfométrico del páncreas observamos una proporción importante de agrupaciones celulares formadas exclusivamente por células alfa o beta, independientes de las estructuras clásicas de los islotes. Al cuantificarlas (Tabla 8) se observó que al d20 las agrupaciones de células beta disminuyeron en la cabeza e incrementaron en la cola. Por otro lado, las agrupaciones de células alfa incrementaron de manera importante en la cabeza al d20, lo que coincide con el incremento en la masa de células alfa.

Células positivas a nestina

Se cuantificaron las células positivas a nestina como marcador de neogénesis en cabeza y cola pancreática al d12 y al d20 (figura 42). Observamos un incremento en la inmunopositividad a nestina que se duplicó en la cabeza e incrementó 15 veces en la cola. Esto coincide con un incremento en la masa de células alfa y beta al d20.

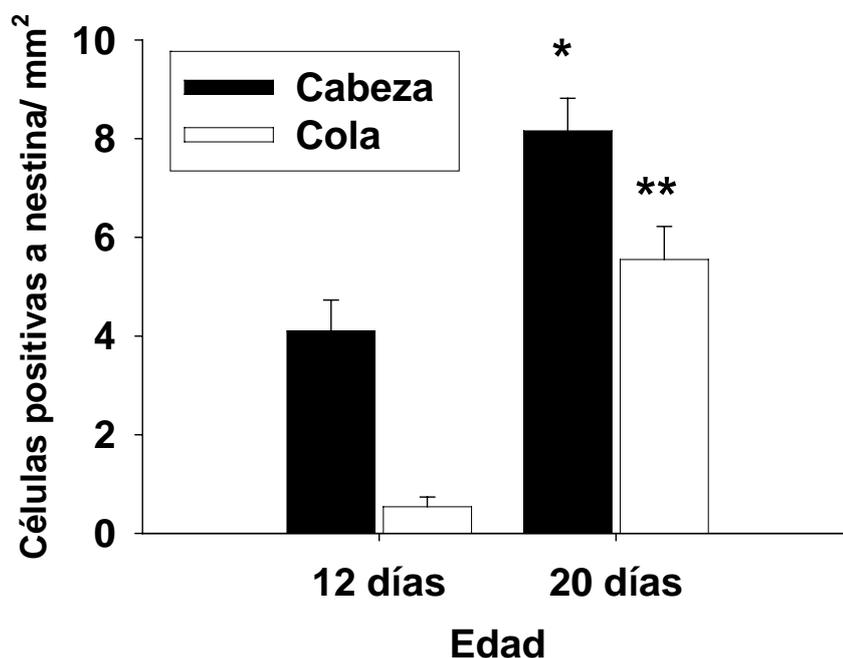


Figura 42. Células positivas a nestina por área de tejido pancreático. Promedios \pm EEM, * $p < 0.01$ y ** $p < 0.0001$ respecto a d12; Cabeza $n = 143$ campos analizados, cola $n = 204$ campos analizados.

4. Características funcionales de las células beta durante el primer mes de vida

Secreción de insulina por células beta aisladas al d20 y d28.

Las células beta aisladas al d20 secretaban la misma cantidad de insulina en 5.6 y 15.6 mM glucosa (Fig. 43). Sin embargo, al d20 las células incrementaron 2.6 veces al ser expuestas a 40 mM KCl y 1.7 veces en presencia de 10 mM leucina. En contraste, las células beta aisladas al d28 incrementaron la secreción de insulina al doble en presencia de 15.6 mM glucosa. En respuesta a KCl y leucina, las células del d28 incrementaron su secreción 5 veces.

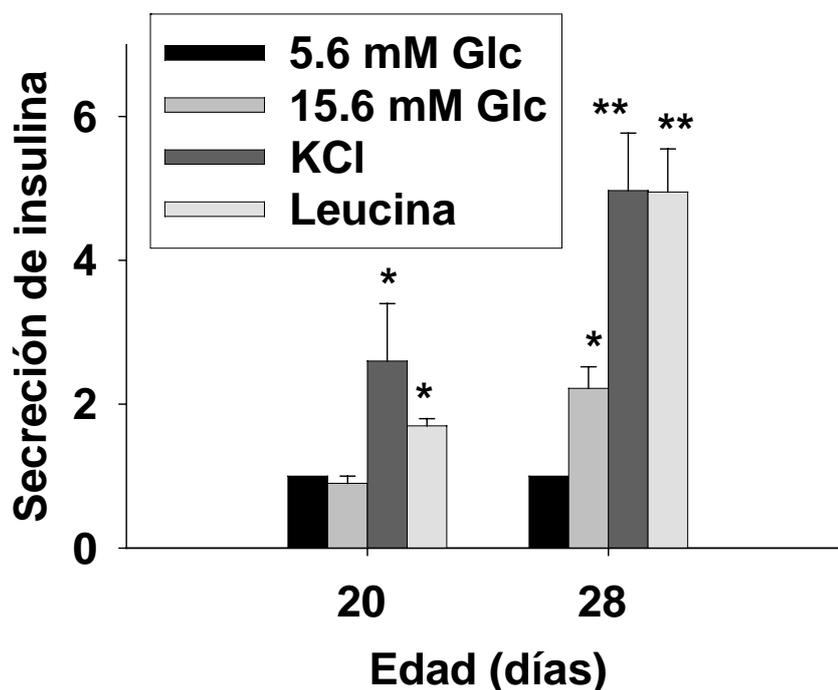


Figura 43. Secreción de insulina de células beta aisladas del d20, d28. Gráfica de barras que representan la liberación de insulina de células beta aisladas al d20 y d28 en respuesta a glucosa, 40 mM KCl y 10 mM leucina. Promedios \pm EE. Símbolos denotan que son estadísticamente significativos, (*) $p < 0.01$ con respecto al control, (**) $p < 0.0005$ con respecto al control,

Al analizar la secreción de insulina por RHPA (Tabla 9 y Fig. 44) se observó que al d20 la secreción basal de insulina en concentraciones basales de glucosa (5.6 mM) está incrementada con respecto a la secreción basal al d28. Se corroboró la incapacidad de las células beta al d20 de incrementar significativamente la secreción de insulina en 15.6 mM de glucosa.

Tabla 9. La secreción de insulina por células beta aisladas en respuesta a diferentes concentraciones de glucosa extracelular durante 1 h.

Edad	Glucosa (mM)	% PCS	Área (μm^2)	Índice de secreción	% SP	% LP
20 días	5.6	31 \pm 2	1919 \pm 120	593 \pm 57	16 \pm 2	15 \pm 1
	15.6	36 \pm 2	2094 \pm 182	768 \pm 91	17 \pm 2	18 \pm 2
28 días	5.6	25 \pm 2*	1402 \pm 125*	358 \pm 55*	17 \pm 2	8 \pm 1†
	15.6	32 \pm 2	1942 \pm 202	618 \pm 71	17 \pm 2	15 \pm 1

Los datos son promedios \pm EE. * $p < 0.05$ con respecto a 15.6 mM glucosa, † $p < 0.005$ con respecto a 15.6 mM glucosa; n= 4 por duplicado en cada edad. % PCS, porcentaje de células secretoras. SP, Células formadoras de placas pequeñas; LP, células formadoras de placas grandes.

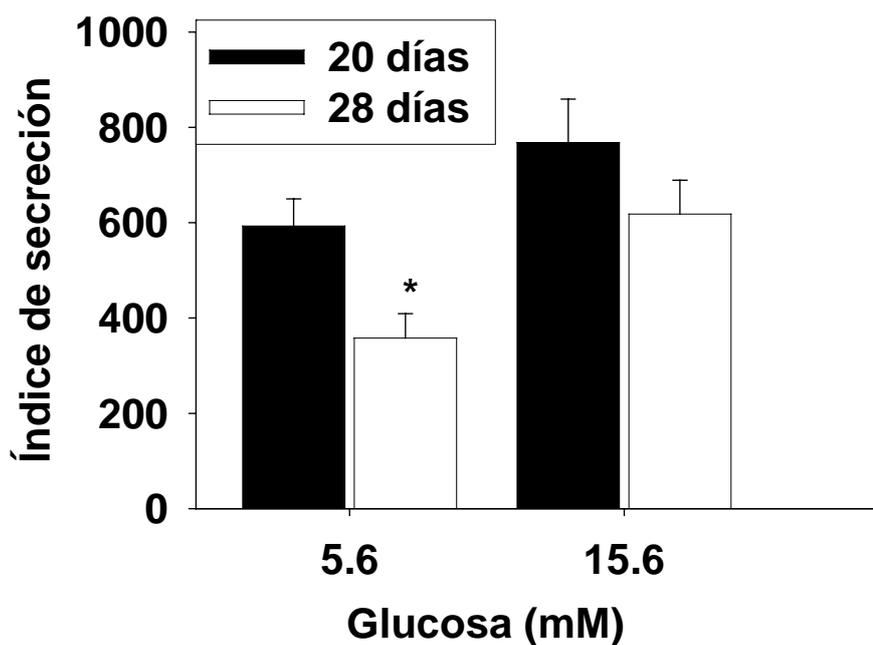


Figura 44. Índice de secreción al d20 y d28 por RHPA. * $p < 0.05$ en relación con 15.6 mM glucosa. $n = 3$ experimentos por duplicado.

Cuantificamos el número de células beta en cada ensayo de RHPA realizando una inmunocitoquímica para insulina en las mismas células en las que se realizó el ensayo hemolítico. Así, calculamos el porcentaje de células beta secretoras que al d20 era del 91 % mientras que al d28 este porcentaje disminuyó a 69% (Figura 45). Este mayor porcentaje de células secretoras puede contribuir la secreción basal elevada que se observa en la figura 44.

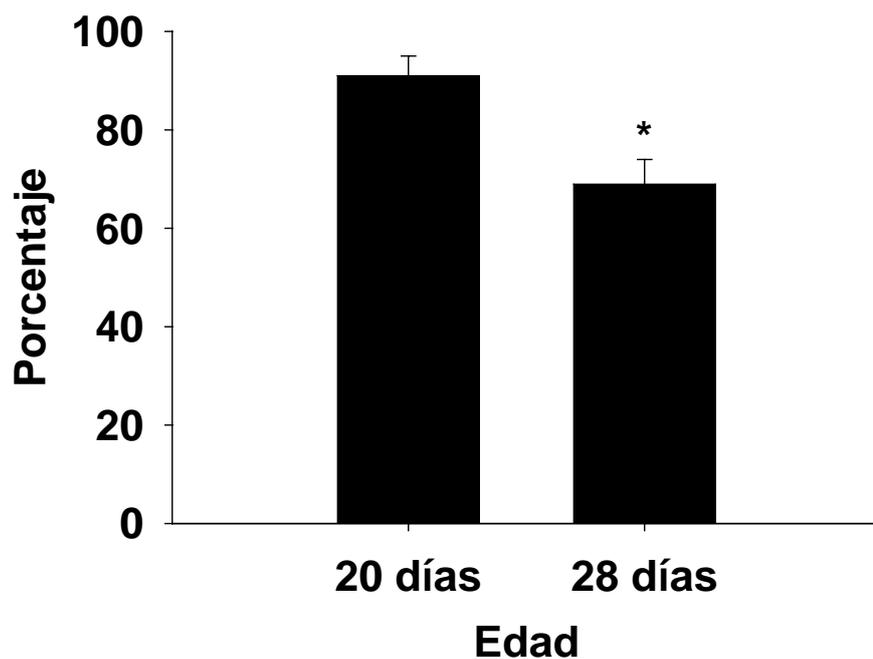


Figura 45. Porcentaje de células beta secretoras de la población total identificadas por inmunocitoquímica posterior al RHPA. n = 3 por duplicado * $p < 0.0001$ respecto al d20.

Subpoblaciones de células beta.

El análisis de las áreas de inmunoplaca en 5.6 mM glucosa al d20 y d28 se muestra en la Fig. 46 donde se observa que la frecuencia de áreas de inmunoplasmas grandes es mayor al d20 que al d28. Esto implica una mayor secreción basal al d20 en comparación al d28.

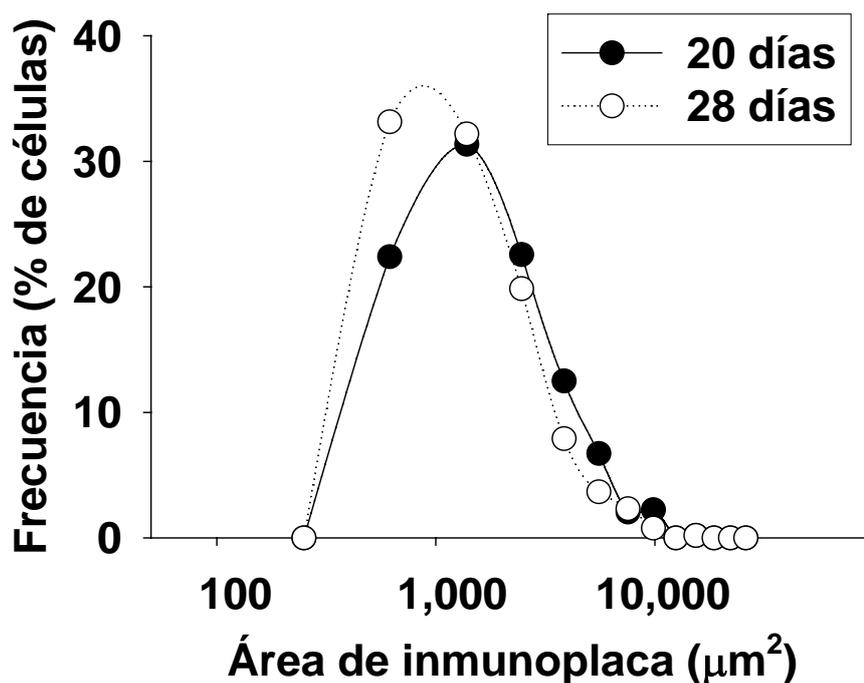


Figura 46. Subpoblaciones de células beta al d20 y d28 en respuesta a concentraciones basales (5.6 mM) de glucosa. n = 3 experimentos por duplicado.

En 15.6 mM glucosa las áreas de inmunoplaaca se distribuyeron en una frecuencia multimodal como se muestra en la Fig. 47. En los adultos, como fue mostrado previamente (Rosenbaum T et al., 2001), se observaron células formadoras de placas pequeñas y grandes (SP y LP). La subpoblación predominante al d20 fue la de células SP estando las LP prácticamente ausentes. Resulta interesante recalcar que es precisamente la población LP la que se recluta en la población adulta en respuesta a concentraciones altas de glucosa (Hiriart M et al., 1991).

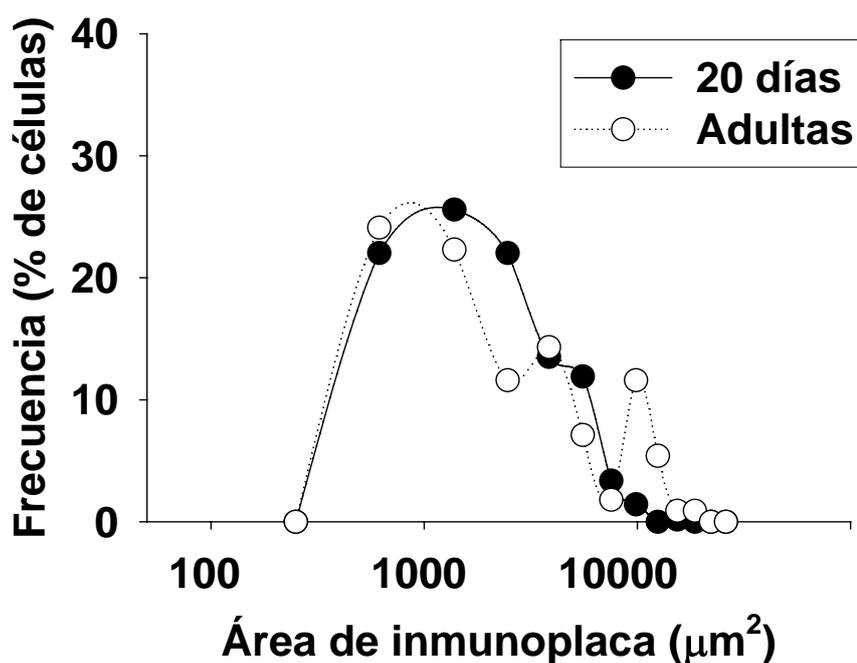


Figura 47. Distribución de frecuencias de las áreas células beta secretoras al d20 y adultas estimuladas con 15.6 mM glucosa. Los datos de los adultos se obtuvieron de experimentos previos. n = 4 experimentos por duplicado.

Localización membranal de GLUT2.

Se cuantificó el porcentaje de GLUT2 localizado en la membrana a diferentes edades. El porcentaje de GLUT2 membranal alcanzó un pico al d20 con un incremento del 36 % con respecto al d6. (Fig. 48). Al d20 la localización de GLUT2 celular fue similar a la observada en las células beta adultas (Figura 49). Cabe resaltar que la cinética seguida por el transportador es similar a la concentración de insulina plasmática observada durante el mismo periodo (Figura 30).

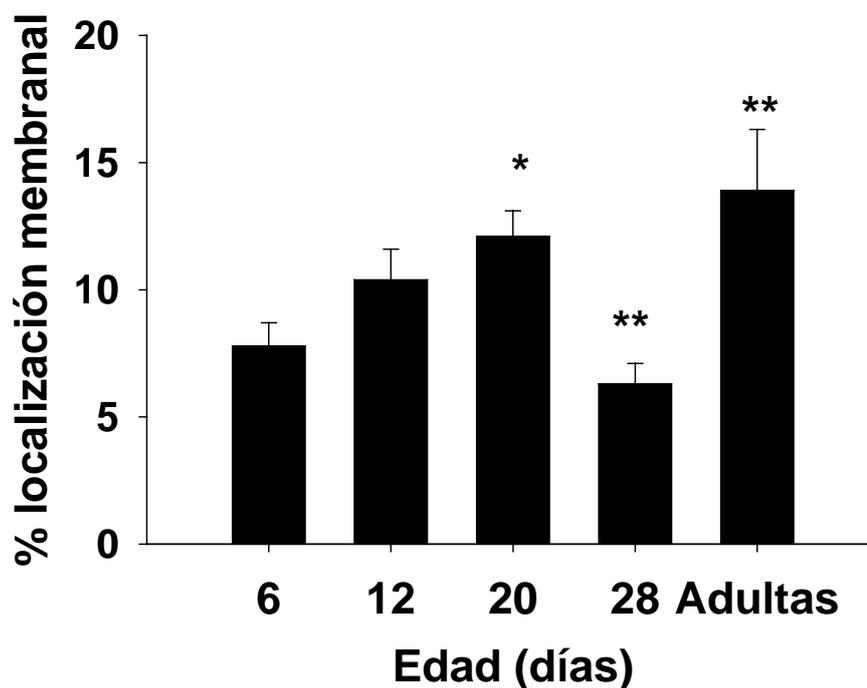
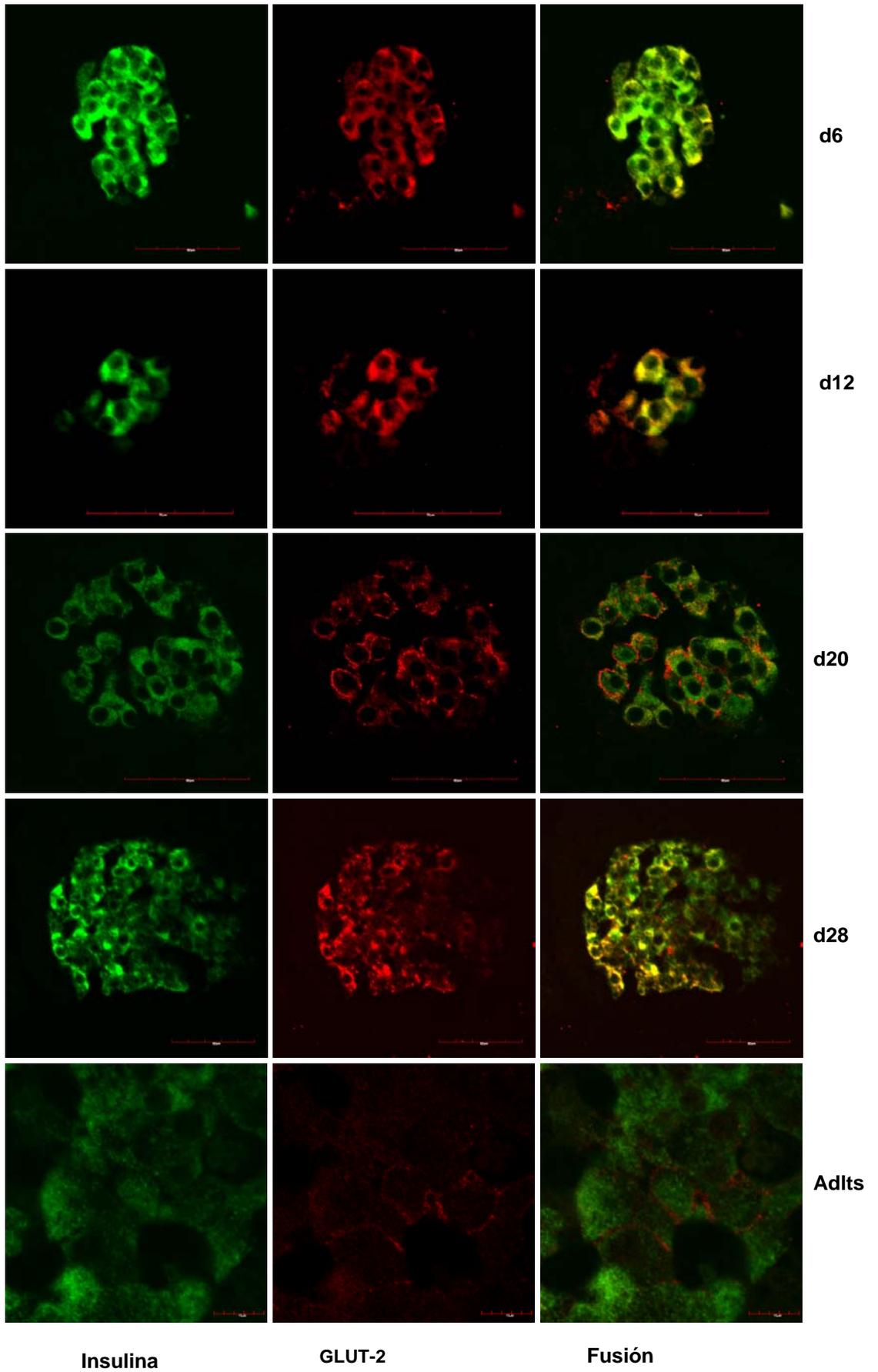


Figura 48. Cuantificación del porcentaje de GLUT2 localizado en la membrana a diferentes edades. $n = 20$ islotes/ edad. * $p < 0.05$ respecto al d6, ** $p < 0.01$ respecto a la edad anterior.

Figura 49. (página siguiente) Localización celular de GLUT2 en islotes de páncreas al d6, d12, d20 y adultas. Fotomicrografías que ilustran la distribución de células beta (verde) y GLUT2 (rojo) en islotes representativos de páncreas a diferentes edades. Barra = $50 \mu\text{m}$ en d6, d12, d20 y d28. Barra = $10 \mu\text{m}$ en adultas.



5. Factor de crecimiento neuronal (NGF) y células beta

Contenido de NGF en células beta.

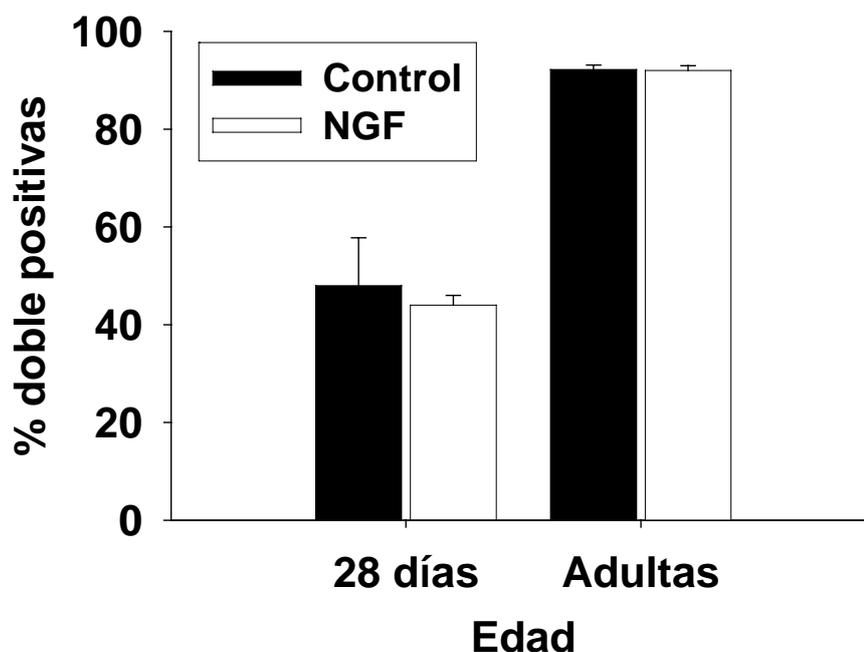


Figura 50. Porcentaje de células inmunopositivas a insulina y NGF tras 48 h de cultivo en condiciones control y NGF. n = 4 experimentos.

Del total de células en el cultivo, cerca del 96% se tiñe para NGF, tanto a los 28 días como en las adultas. De este porcentaje, a los 28 días el 48 % son células beta (fig. 50), en cambio, en el adulto el porcentaje de células inmunopositivas a insulina y NGF es del 92 %.

Para evaluar el efecto del NGF sobre la expresión de insulina en cultivo, se hicieron tinciones de células cultivadas durante 48 h en presencia del factor de crecimiento y no observamos diferencias significativas entre el porcentaje de

células beta entre cultivos en condiciones control y el tratamiento con NGF (Fig. 50).

Efectos del NGF sobre la secreción de insulina.

Al d20 el NGF no incrementó la secreción basal de insulina, sin embargo al d28 la secreción de insulina de células beta expuestas a NGF incrementó tres veces en respuesta al factor de crecimiento (Fig. 51). Sin embargo, al d28 las células beta aún no se comportan como células adultas ya que su secreción en respuesta a glucosa 15.6 mM y a NGF es menos robusta.

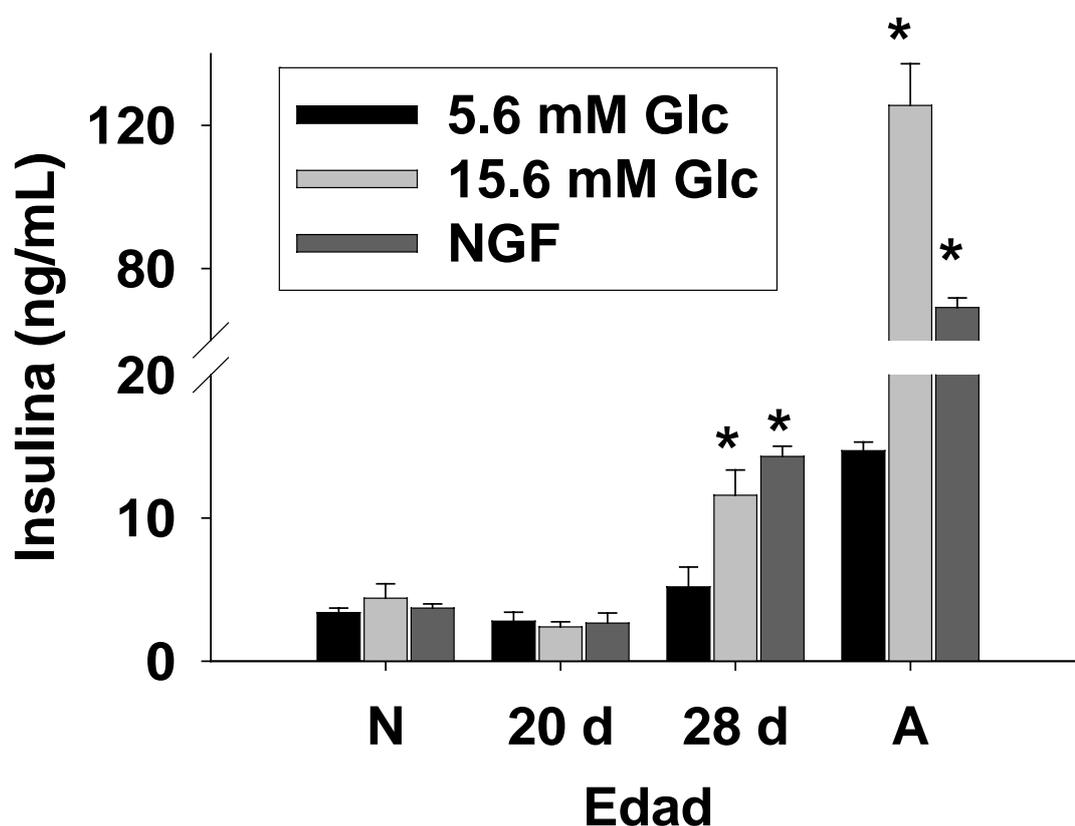


Figura 51. Efecto del NGF sobre la secreción de insulina de células beta aisladas a diferentes edades. * $p < 0.05$ con respecto a 5.6 mM, $n=3$.

Mediante el RHPA estudiamos en detalle los efectos del NGF sobre la secreción de insulina al d28 (Tabla 10) cuando las células ya son capaces de duplicar su secreción de insulina en respuesta a concentraciones altas de glucosa (15.6 mM) y aumentan significativamente su secreción en respuesta a NGF, tanto en 5.6 mM y 15.6 mM de glucosa. Los efectos del NGF son revertidos cuando se utiliza K252a, un antagonista del receptor de alta afinidad del factor de crecimiento, TrkA.

Tabla 10. Efectos del NGF en la secreción de insulina de células beta aisladas.

Tratamiento	Glucosa (mmol/L)	% de células secretoras	Área de inmunoplaaca (μm^2)	Índice de secreción
Control	5.6	47 \pm 1	2534 \pm 269	1214 \pm 160
	15.6	51 \pm 3	4809 \pm 163*	2649 \pm 158*
NGF	5.6	47 \pm 3	5046 \pm 372**	2614 \pm 296**
	15.6	54 \pm 2	6865 \pm 261**	3915 \pm 380**
NGF + K252a	5.6	42 \pm 3	3662 \pm 87 ⁺	1621 \pm 123 ⁺
	15.6	52 \pm 2	4052 \pm 516 ⁺	1985 \pm 259 ⁺

*p<0.001 con respecto a la glucosa basal

**p<0.001 con respecto a condiciones control

⁺ p<0.01 con respecto a NGF

El porcentaje de células secretoras permanece constante en todas las condiciones experimentales (Fig. 52)

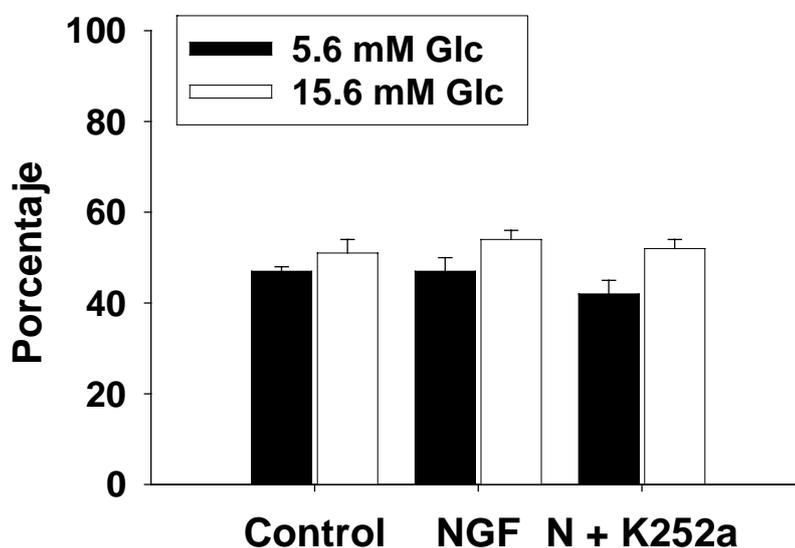


Figura 52. Efecto del NGF sobre el porcentaje de células secretoras, n=3 por duplicado.

El área de inmunoplaca, directamente proporcional a la insulina secretada, incrementó en respuesta a la glucosa y al NGF. El incremento es de un 89 % de 5.6 mM glucosa a 15.6 mM en células control y en un 36 % cuando las células han sido previamente cultivadas con NGF. Así mismo el NGF *per se* incrementa el área de inmunoplaca un 99% en condiciones 5.6 mM glucosa y en un 42 % en 15.6 mM glucosa (fig. 53). Los efectos del NGF sobre el área de inmunoplaca son revertidos en presencia de K252a.

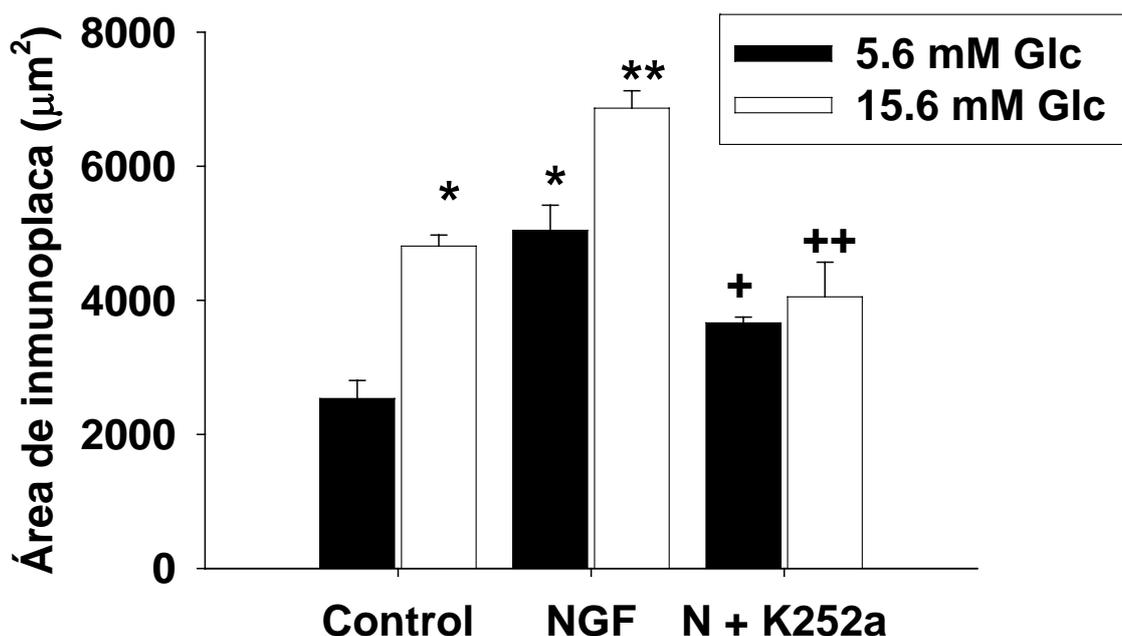


Figura 53. Efecto del NGF sobre el área de inmunoplaaca de células aisladas al d28. * $p < 0.0001$ respecto a control 5.6 mM glucosa, ** $p < 0.0001$ respecto a 15.6 mM glucosa, + $p < 0.0005$ respecto a NGF 5.6 mM glucosa, ++ $p < 0.0001$ respecto a NGF 15.6 mM glucosa.

Al multiplicar los dos parámetros anteriores, porcentaje de células secretoras y área de inmunoplaaca, obtenemos el índice de secreción (IS) que es un parámetro de la función secretora de una población de células beta. El índice de secreción de las células beta en 5.6 mM glucosa se duplica en 15.6 mM glucosa y cuando las células son previamente cultivadas con NGF (fig. 54) indica. Cuando las células beta son estimuladas con glucosa (15.6 mM), la exposición previa a NGF hace que el índice de secreción aumente 47 %. Los efectos del NGF sobre la secreción de insulina en baja y alta glucosa son revertidos por el antagonista del TrkA: K252a.

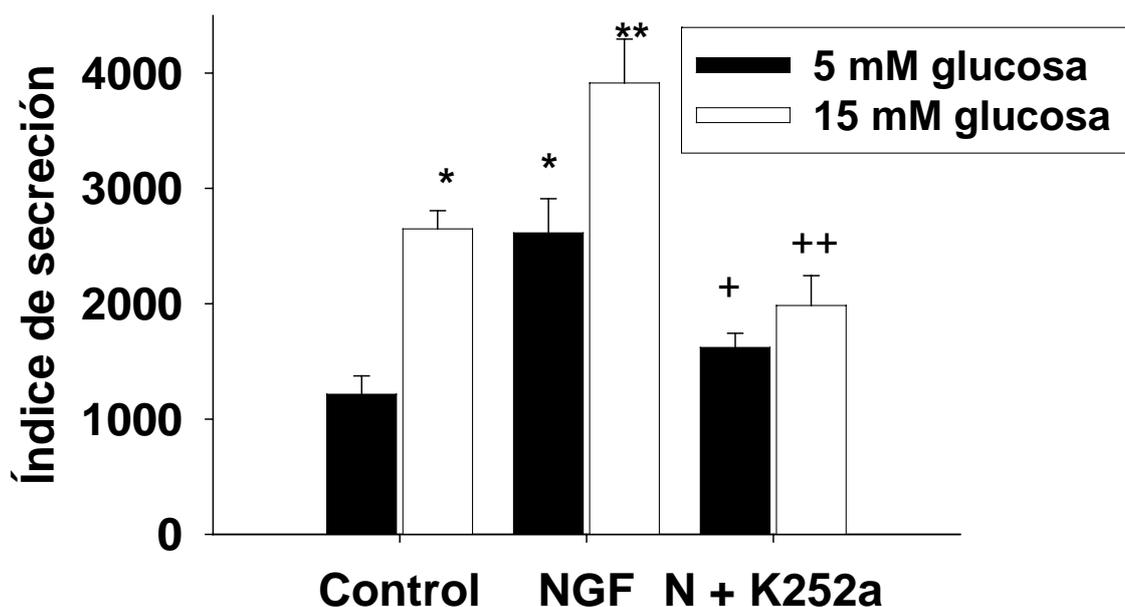
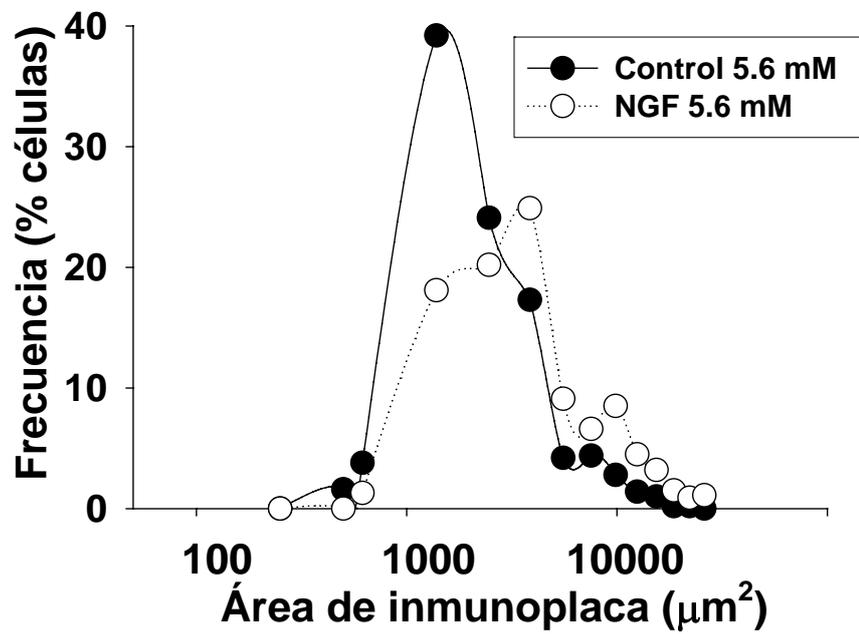


Figura 54 Índice de secreción de células beta de 28 días cultivadas en condiciones control y con NGF. Se estimularon durante una hora con diferentes condiciones. * $p < 0.0001$ respecto a control 5.6 mM glucosa, ** $p < 0.0001$ respecto a 15.6 mM glucosa, + $p < 0.005$ respecto a NGF 5.6 mM glucosa, ++ $p < 0.0001$ respecto a NGF 15.6 mM glucosa.

Efecto del NGF sobre subpoblaciones funcionales al d28.

Se estudió el efecto del NGF sobre las subpoblaciones funcionales al d28 tanto en condiciones basales como estimuladoras de glucosa (Fig. 55). Se observa una distribución bimodal de las subpoblaciones en ambas condiciones y el NGF disminuye la población de SP y aumenta la población de LP. Este efecto sobre las subpoblaciones funcionales explica parcialmente los efectos previamente observados del factor de crecimiento sobre el área de inmunoplaqueta y el índice de secreción.

A.



B.

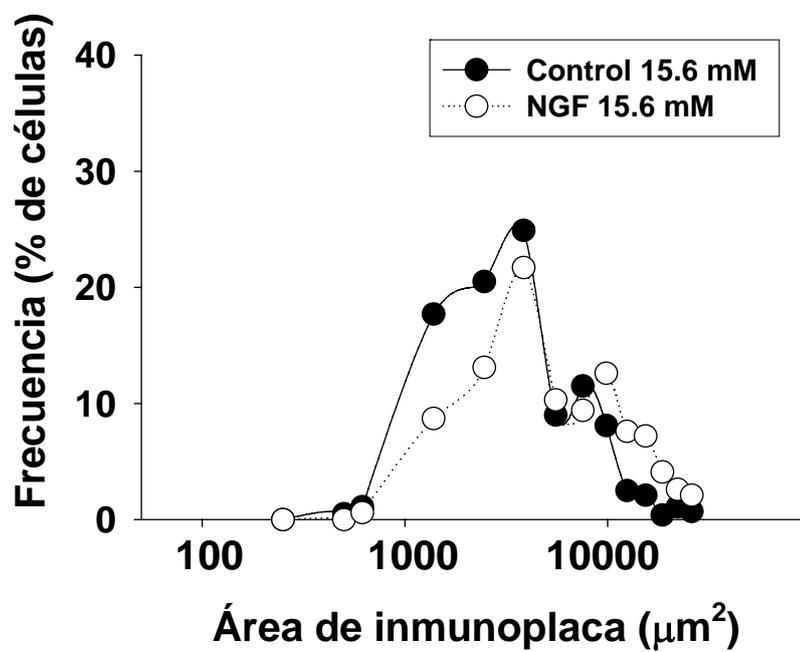


Figura 55. Efecto del NGF en la distribución de frecuencias del área de inmunoplaaca en 5.6 mM glucosa (A) y en 15.6 mM glucosa en células beta al d28. n= 3 experimentos por duplicado.

Efectos del NGF sobre la transcripción génica de las células beta.

Para evaluar los efectos del NGF sobre la cantidad de mRNA de las células beta al d28 se utilizó RT-PCR semicuantitativo utilizando a GAPDH como control interno de expresión.

Se validó el GAPDH evaluando el efecto del NGF sobre su expresión durante diferentes tiempos en cultivo (Figura 56). El NGF no tiene efectos sobre la expresión de GAPDH en ningún tiempo en cultivo.

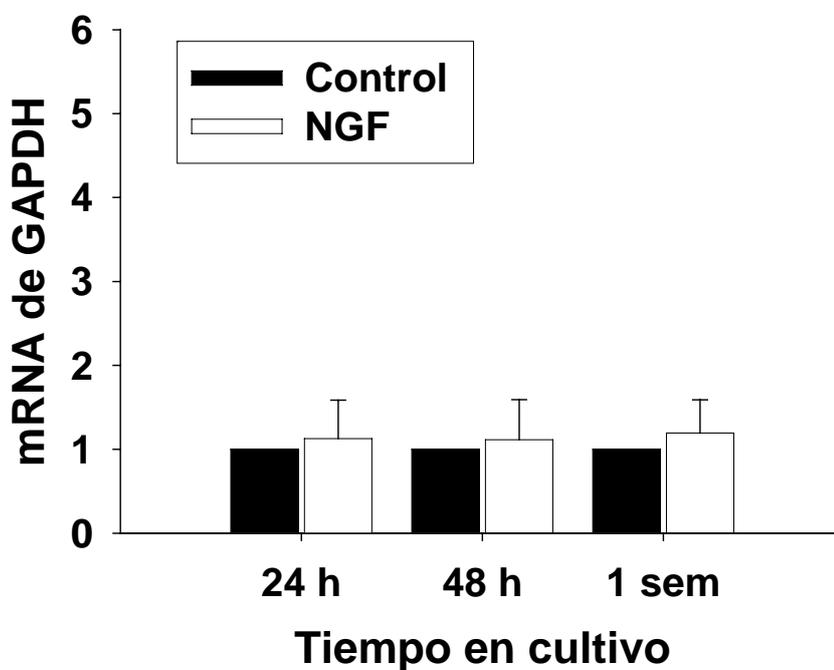


Figura 56. Efectos del NGF sobre la transcripción del gene de GAPDH a diferentes tiempos en cultivo. n = 3.

Así mismo, se evaluó la relación que guardaba la cantidad de mRNA de GAPDH con respecto al mRNA total de las células beta (Figura 57) y observamos que existe una relación directamente proporcional entre ambos parámetros. A partir de esto creemos que GAPDH es un buen control interno de expresión por lo que los experimentos subsecuentes fueron normalizados con respecto a este mensajero.

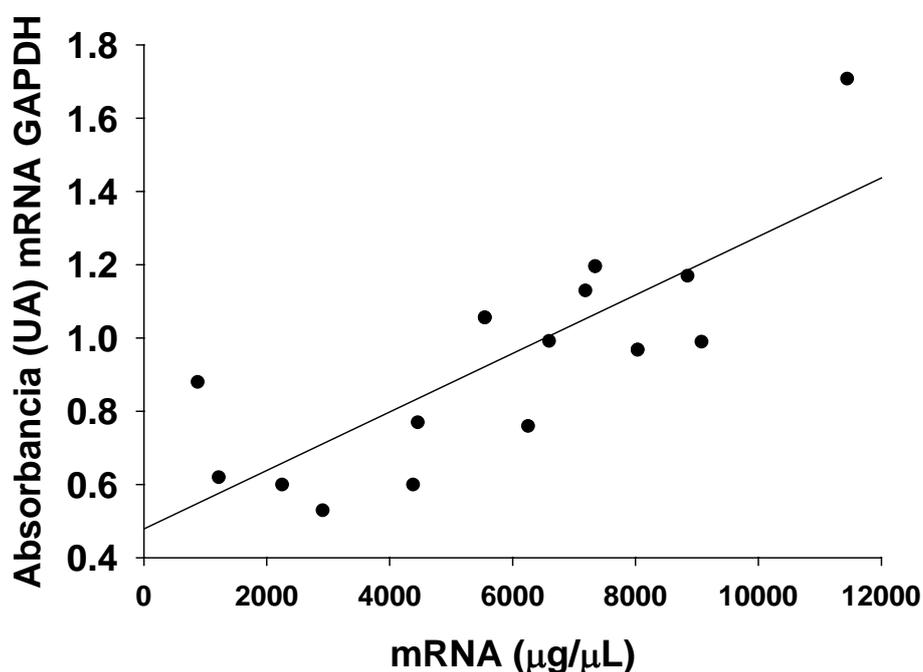


Figura 57. Relación entre mRNA de GAPDH y la concentración total de mRNA en las células beta.

Los resultados del NGF sobre la transcripción del gene de insulina (fig. 58) demuestran que el NGF a las 48 h de cultivo incrementa el mRNA de preproinsulina 3.5 veces cuando se compara con las células en condiciones control.

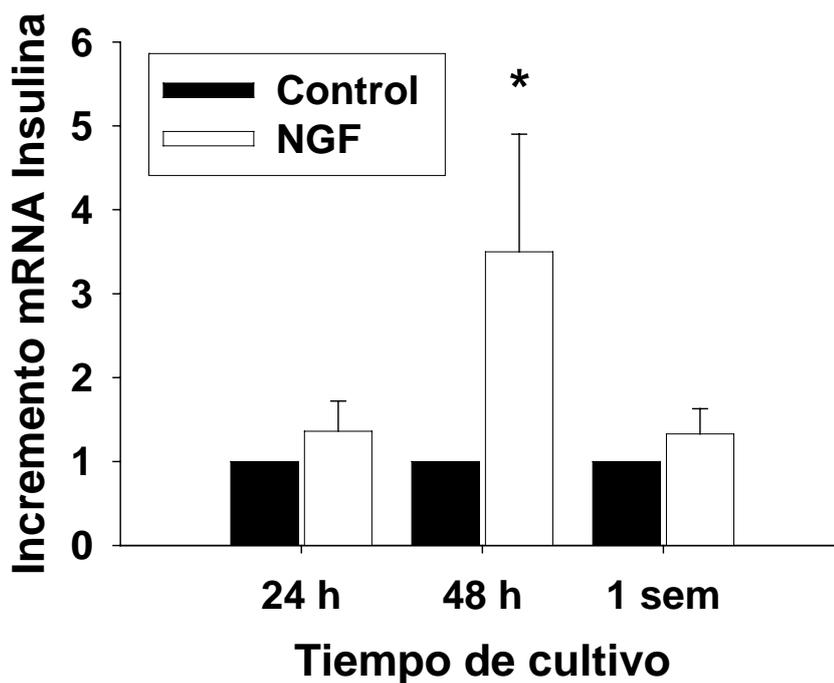


Figura 58. Efecto del NGF en cultivo sobre la transcripción del gen de insulina. N = 3, *p<0.05

Al analizar los efectos del NGF sobre su propia transcripción observamos una disminución del mensajero del factor de crecimiento en presencia del mismo durante diferentes tiempos en cultivo (Fig. 59). A las 24 horas el NGF disminuyó su propio mensajero en un 55 %, a las 48 h disminuyó un 74 % y después de una semana disminuyeron un 70 % los niveles del mRNA del NGF.

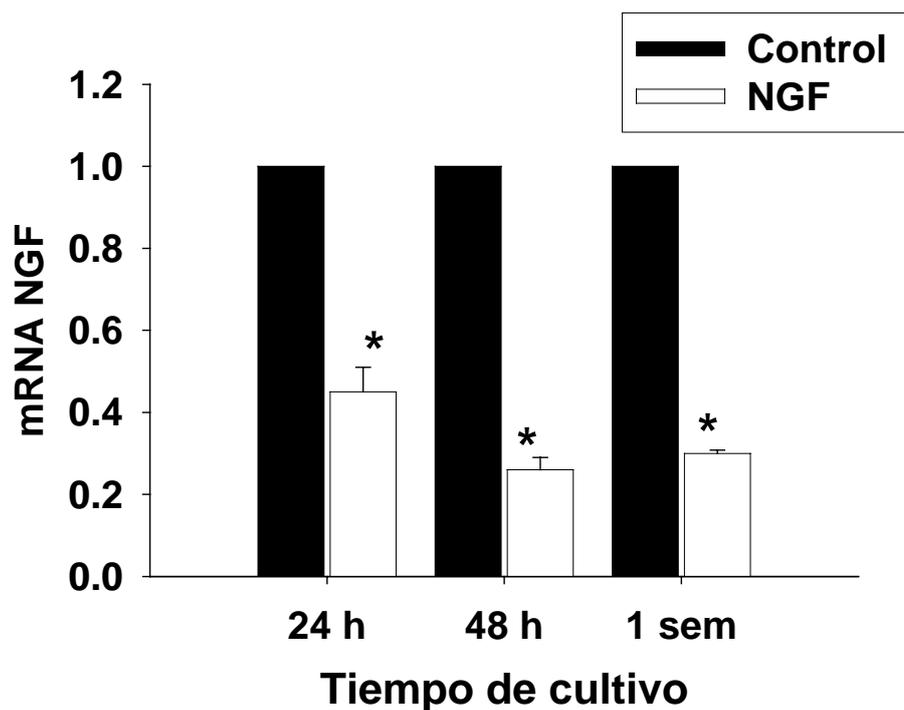


Figura 59. Efecto del NGF sobre los niveles de mRNA de NGF de células beta aisladas al d28 y cultivadas durante diferentes periodos. * $p < 0.0001$, $n = 3$.

En tercer lugar se muestra la presencia del mensajero para el receptor de alta afinidad de NGF, TrkA, en células beta de 28 días (Fig. 60). La presencia de NGF en cultivo incrementa el nivel de mRNA mensajero a diferentes tiempos en cultivo que fue estadísticamente significativo a las 48 h y a 1 semana en cultivo.

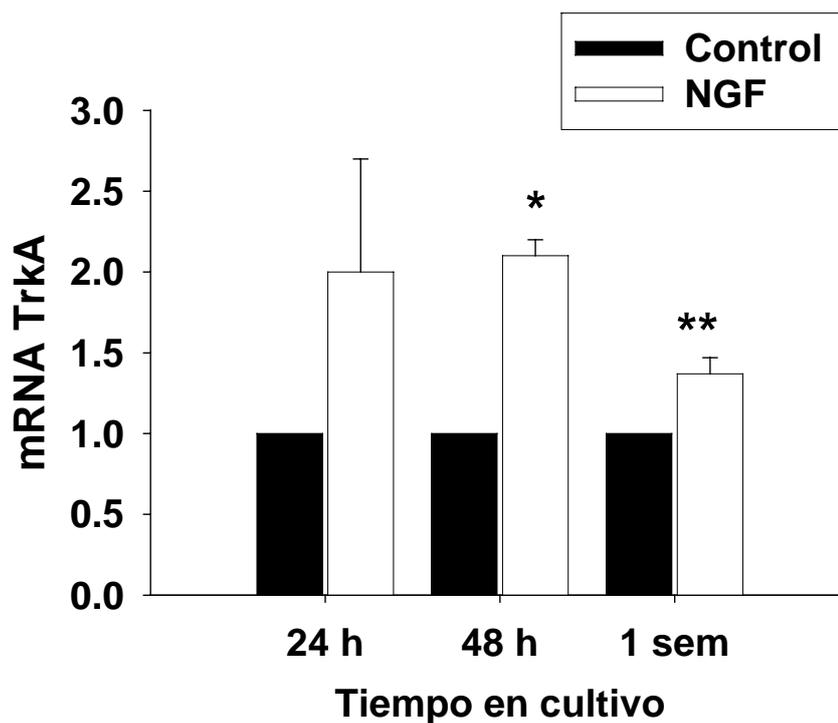


Fig. 60. Efectos del NGF sobre la transcripción del gene de TrkA en células beta aisladas al d28 analizado a diferentes tiempos de cultivo.* $p < 0.001$, ** $p < 0.05$

Al analizar el efecto del NGF sobre los niveles del mRNA del factor de transcripción PDX-1 observamos que no incrementa sus niveles a las 24 y 48 h en cultivo. Sin embargo, las células beta cultivadas con NGF durante una semana incrementan el contenido de mRNA de PDX-1 cuatro veces con respecto a las condiciones control (Figura 61).

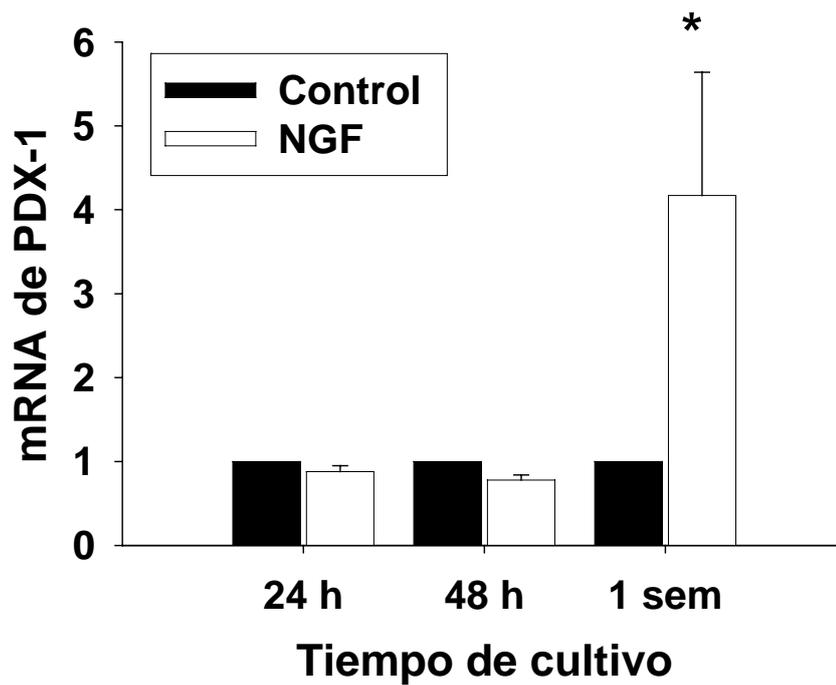


Figura 61. Efectos del NGF sobre la transcripción del gene de PDX-1 a diferentes tiempos de cultivo. n=2, *p<0.05

El NGF no tiene efectos sobre la transcripción del gene de glucagon ni de GAD65 a los tiempos en cultivo estudiados (Fig. 62 y Fig. 63).

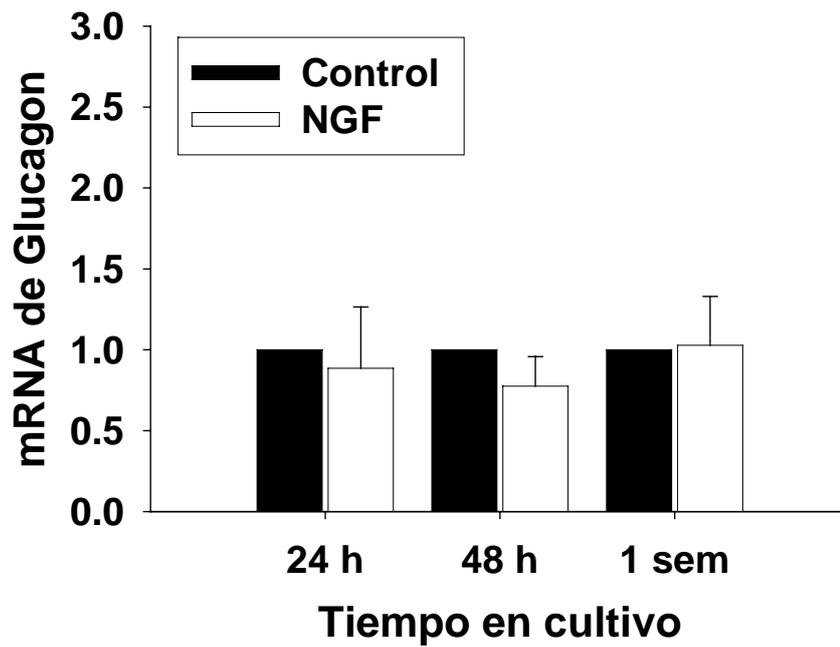


Figura 62. Efectos del NGF sobre la transcripción del gene de glucagon. n=3

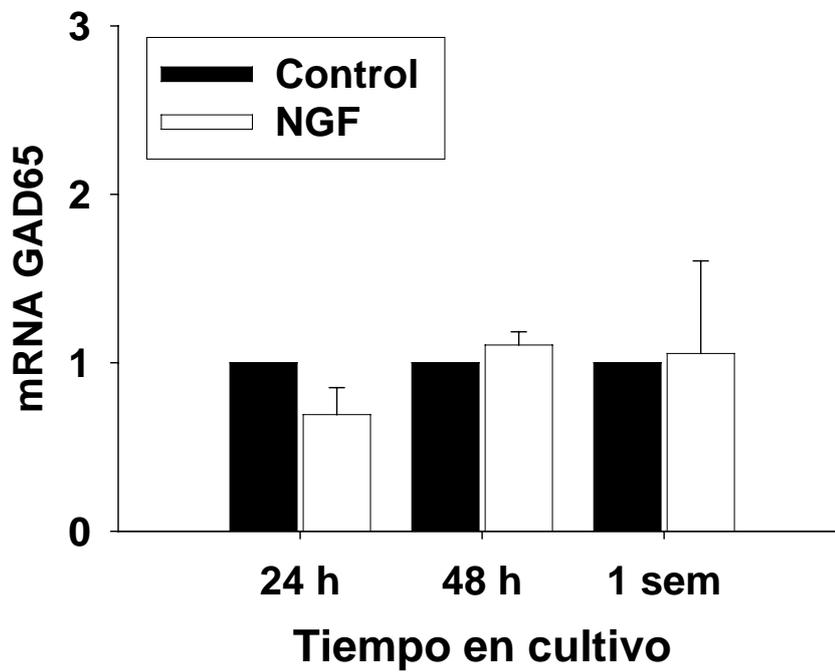


Figura 63. Efectos del NGF sobre la transcripción del gene de GAD65, n=3

V. DISCUSIÓN

Cambios en los niveles de glucosa y hormonas en plasma asociados con la remodelación morfofuncional del páncreas en desarrollo.

Los niveles plasmáticos de glucosa son regulados por varias hormonas como insulina y las contrarreguladoras glucagon y cortisol (Mayor F et al., 1985, Blazquez E et al., 1974, Girard J 1990). Nuestros resultados muestran que en comparación con los adultos, los niveles de glucosa están elevados entre el d6 y el d20. Este periodo de hiperglucemia está asociado con un incremento en la masa de células beta, niveles elevados de insulina plasmática y una falta de respuesta de células beta aisladas a concentraciones elevadas de glucosa. El episodio de hiperglucemia posnatal también se asocia con un incremento en la masa de células alfa y niveles elevados de glucagon y cortisol plasmático. Creemos que el episodio hiperglucémico postnatal puede ser debido a los efectos de las hormonas contrarreguladoras ocasionando una resistencia periférica a la insulina transitoria. Este mismo fenómeno puede explicar los niveles elevados de insulina durante este periodo. Resulta interesante resaltar que durante el pico de glucosa, también aumenta la localización membranal de GLUT2 en concordancia con estudios previos (Ferrer J et al., 1993) así como la insulina plasmática sugiriendo que estos tres procesos pueden estar relacionados entre sí.

Los cambios en el ambiente metabólico y su relación con las células beta no son exclusivos del primer mes de vida. El periodo peri natal se caracteriza por cambios hormonales y metabólicos importantes.

En la rata, las células que contienen insulina pueden ser detectadas al día embrionario 12.5 (Yoshinari M et al., 1982). El contenido pancreático de insulina incrementa durante el periodo perinatal y los niveles plasmáticos de insulina aumentan de manera importante durante el período fetal tardío, caen al nacimiento y se estabilizan manteniendo niveles bajos durante el periodo neonatal (McEvoy RC et al., 1980, Girard JR et al., 1974, Sodoyez-Goffaux F et al., 1979).

Los principales secretagogos de insulina durante este período son aminoácidos como leucina y arginina (Milner RD 1980, Milner RD 1969) y no la glucosa como en células adultas.

Las células beta fetales cultivadas con aminoácidos incrementan su contenido y secreción de insulina (Milner RD 1980) lo que sugiere que éstos pueden actuar como un estímulo fisiológico para la liberación de insulina en el feto. Durante este periodo la homeostasis de la glucosa es regulada principalmente por el metabolismo materno mientras que el metabolismo fetal es predominantemente anabólico. Así, es posible que las vías de acoplamiento para aminoácidos y glucosa sean distintas.

Durante la gestación tardía los niveles plasmáticos de glucocorticoides son elevados e inducen la síntesis de enzimas como la glucógeno sintetasa (Mayor F et al., 1985), necesaria para el metabolismo de glucógeno que representa un almacén de energía. Después del nacimiento, los glucocorticoides plasmáticos disminuyen (Doerr HG et al., 1988), lo que coincide con una disminución en los niveles de insulina y un incremento en las concentraciones de glucagon (Mayor F et al., 1985, Blazquez E et al., 1974, Girard J 1990). La disminución en la proporción insulina/glucagon es causada

por las catecolaminas que incrementan en el momento del nacimiento como consecuencia del corte del cordón umbilical y el estrés producido por el parto (Padbury JF et al., 1981, Arranz L et al., 1990). La disminución en la proporción insulina/glucagon induce cambios metabólicos como la inducción de glucogenolisis, gluconeogénesis y síntesis de cuerpos cetónicos (Mayor F et al., 1985, Girard J 1990).

Durante este periodo los cambios hormonales que se dan alrededor del nacimiento pueden explicar la inducción de los procesos metabólicos necesarios para la adaptación del recién nacido a un nuevo estado nutricional en el cual la glucosa es escasa y la grasa en la leche materna es la principal fuente de energía.

El efecto de todos estos cambios sobre los niveles plasmáticos de glucosa se reflejan como un periodo de hipoglucemia documentado durante las primeras horas postnatales (Mayor F et al., 1985, Shelley HJ et al., 1966, Exton JH 1972) hasta que la glucogenolisis y gluconeogénesis son inducidos y empiezan a restituir los niveles circulantes de glucosa.

El primer mes de vida está caracterizado por un cambio en las demandas metabólicas al ocurrir el destete al d21 en las ratas de laboratorio y al d30 de manera natural (Krinke Georg J 2000). Esto puede ser un factor determinante en los cambios en la estructura y función de los islotes pancreáticos.

Reorganización estructural del páncreas en desarrollo. Estudios previos sugieren que el páncreas en la etapa postnatal sufre una reorganización estructural durante el primer mes de vida (Kassem S et al.,

2000, Scaglia L et al., 1997). En este trabajo, presentamos evidencias de esta reestructuración.

El área pancreática relativa ocupada por células beta y alfa disminuye durante el primer mes de vida. Esto puede deberse a un incremento en el volumen de la porción exocrina del páncreas lo cual conlleva a una disminución en el porcentaje de área ocupada por células endocrinas. Se trata de una observación interesante ya que estudios previos han demostrado que el cortisol promueve la diferenciación y crecimiento del páncreas exocrino (Gesina E et al., 2001) y nosotros describimos niveles elevados de este glucocorticoide al ser comparados con adultas durante la remodelación pancreática a lo largo del primer mes de vida.

También observamos que durante este periodo la masa de células beta y el tamaño de sus agregados incrementaron, sin embargo no había alcanzado la masa adulta al d28. Montanya E et al. (2000) obtuvieron resultados similares, lo que indica que la masa de células beta continúa incrementando después del primer mes de vida. Se ha demostrado que la proliferación celular disminuye después del primer mes de vida (Scaglia L et al., 1997); por lo tanto es posible que el incremento observado en la masa de células beta se deba a neogénesis a partir de células troncales en el páncreas posnatal.

La identificación de células troncales o progenitoras en el páncreas adulto ha despertado el interés en los últimos años, ya que su expansión *in vitro* y manipulación genética tendrían un gran impacto en el tratamiento de la diabetes mellitus (Soria B et al., 2001).

Basados en la caracterización que se ha hecho de las células progenitoras del sistema nervioso (Weissman IL 2000) y médula ósea (Fuchs E

et al., 2000), las características que deben tener las células progenitoras del páncreas son las siguientes: (1) capacidad de autorenovación (Bonner-Weir S et al., 2002); (2) ser una célula indiferenciada y por lo tanto carecer de los marcadores de diferenciación terminal que caracterizan a los diferentes tipos celulares pancreáticos y (3) ser capaz, bajo los estímulos adecuados, de diferenciarse en tejido endocrino (caracterizado por la secreción hormonal de insulina o glucagon), exocrino (productor de enzimas digestivas como amilasa o carboxipeptidasa A) y ductal (que exprese marcadores epiteliales como citoqueratina 19 o CFTR, regulador transmembranal de la fibrosis quística) (Scharfmann R 2003).

Existen evidencias que en el páncreas posnatal existen células troncales multipotenciales, que al diferenciarse dan lugar a las diferentes líneas celulares del páncreas (Rosenberg L 1995). Actualmente, la mayor parte de la evidencia indica que en la vida posnatal el sistema ductal del páncreas es el sitio en el que se localizan las células progenitoras (Rosenberg L 1998, Bonner Weir S 2000c). Esta afirmación se basa en que el desarrollo de los islotes durante la embriogénesis está íntimamente ligada al epitelio ductal (Madsen OD et al., 1996). Por otro lado, se han encontrado células endocrinas dispersas dentro del sistema ductal adulto (Gu D et al., 1993) y se ha descrito la evaginación de islotes a partir de ductos pequeños (Bowens L et al., 1998). *In vitro*, las células ductales son capaces de proliferar y formar estructuras parecidas a islotes que producen insulina (Bonner Weir S 2000a, Ramiya VK et al., 2000).

Recientemente se describieron células ductales que expresan nestina (Zulewski H et al., 2001), un filamento intermedio que se usa como marcador de células progenitoras neurales (Lumelsky N et al., 2001). En cultivo, estas

células positivas a nestina mantienen la capacidad de proliferar y mediante RT-PCR se demostró que son capaces de expresar genes característicos de diferenciación hepática y pancreática (tanto endocrino como exocrino) (Lumelsky N et al., 2001) sugiriendo que podría tratarse de las células progenitoras del páncreas adulto.

Existen evidencias que hacen de la nestina un marcador controversial de células troncales pancreáticas (Edlund H et al., 2002). Al usar la cre-recombinasa dirigida por el promotor de nestina (Cre-nestina) para activar el gen de beta galactosidasa (Rosa26), los estudios de linaje *in vivo*, demostraron que durante el desarrollo embrionario, las células positivas a nestina dan origen a la vasculatura del mesénquima pancreático, mientras que en el periodo posnatal dan lugar a células asociadas con la microcirculación del islote sin dar origen a otros tipos de células pancreáticas, incluyendo las de tejido endocrino (Treutelaar MK et al., 2003).

Por otro lado, se caracterizó la expresión de nestina en el páncreas humano en desarrollo y se aislaron estas células utilizando un plásmido de selección dirigido por promotor. Estos estudios demostraron que *in vivo* la población de células positivas a nestina se localiza específicamente en la vasculatura pancreática fetal y que *in vitro* son incapaces de dar origen a células beta (Humphrey RK et al., 2003).

Finalmente, un protocolo de pulso y seguimiento de células proliferantes con bromodeoxiuridina en un cultivo de células ductales humanas sugiere que aunque las células progenitoras de tejido pancreático endocrino sí se encuentran en el sistema ductal, éstas no son positivas a nestina (Gao R et al., 2003).

Nosotros observamos un incremento en células positivas a nestina tanto en cabeza como en cola del día 12 al d20. De manera interesante este incremento coincide con un incremento en la masa de células alfa y beta durante este periodo lo que apoya observaciones previas que sugieren a la nestina como marcador de células progenitoras dentro del páncreas o como marcador de procesos íntimamente ligados al desarrollo pancreático.

El porcentaje y masa de células alfa incrementaron de manera muy importante al d20 seguido de una disminución igualmente abrupta al d28. Estudios previos han demostrado que dietas con altos contenidos de grasa y proteínas promueven un incremento en la población de células alfa en el páncreas de los roedores (Morley MG et al., 1982, Cerf ME et al., 2005). Por lo tanto, es posible que los cambios observados en la población de células alfa puedan ser parcialmente explicados por cambios en la dieta ya que el d20 coincide con una transición alimenticia de una dieta alta en proteínas y grasas durante la lactancia a una dieta alta en carbohidratos después del destete.

De nuestros resultados se desprende que los cambios estructurales en la masa y porcentaje de células del páncreas endocrino siguen patrones independientes en la cabeza y en la cola. La razón de que esto suceda no es clara, sin embargo puede reflejar su origen embriológico divergente ya que la cabeza proviene de la yema ventral mientras que la cola proviene de la yema dorsal del primordio intestinal (Slack JMW 1995). Este origen embriológico dual conlleva que las relaciones anatómicas durante el desarrollo y antes de la rotación del intestino son diferentes en ambas porciones, la yema dorsal está en contacto con la notocorda mientras que la ventral lo está con el mesodermo esplácnico y por lo tanto los estímulos ambientales a los que son sometidos

también varían. Por lo tanto, es necesario estudiar si el control de los patrones de desarrollo en la cabeza y en la cola es independiente en cada porción.

Modificaciones en la función de células beta en el páncreas en desarrollo.

Estudios previos han demostrado que las células beta fetales y neonatales muestran características de inmadurez funcional como los son una sensibilidad disminuida a la glucosa, secreción escasa de insulina y ausencia de la respuesta bifásica a la glucosa (Hole RL et al., 1988; Hughes 1994, Heinze et al., 1971). Después de este periodo, los islotes parecen tener la capacidad de discriminar entre diferentes concentraciones de glucosa y responder a secretagogos de forma similar a las células adultas (Heinze et al., 1971; Fletcher DJ et al., 1989), pero la secreción de insulina sigue siendo escasa. En contraste, las células beta adultas muestran una secreción robusta y bifásica (Rosenbaum T et al., 2001; Straub SG et al., 2004) y responden consistentemente a diferentes concentraciones de glucosa.

Estos estudios sugieren que las células beta sufren una transición funcional entre el nacimiento y la vida adulta. Nosotros observamos que las células beta al d20 no incrementan su secreción de insulina en respuesta a glucosa 15.6 mM, mientras que al d28 presentan una respuesta normal. Al analizar esta insensibilidad en detalle nos dimos cuenta que al d20 las células beta tienen una secreción basal elevada en comparación con las del d28. Esta secreción basal elevada es resultado de una mayor secreción de células individuales así como un mayor porcentaje de células secretoras a esta edad.

Proponemos que esta secreción elevada explica parcialmente la insensibilidad funcional observada al d20.

Los resultados de la función de células beta sugieren que la transición funcional de esta población ocurre en algún punto entre el d20 y el d28. Por otro lado, el hecho de que las células beta aisladas al d20 incrementen la secreción de insulina en respuesta a KCl y leucina, sugiere que a esta edad tienen una respuesta inadecuada a la glucosa ya que la transcripción del gene de insulina y la maquinaria exocitótica están conservadas.

La leucina es un substrato mitocondrial fisiológico que induce una respuesta insulínica del 50 % cuando se compara con glucosa. Existen varios mecanismos mediante los cuales la leucina puede estimular la liberación de insulina por mecanismos mitocondriales. Uno de ellos consiste en la activación alostérica de la enzima glutamato deshidrogenasa, una enzima de la matriz mitocondrial (Gylfe E 1976). Esta es la razón por la cual glutamina, que es convertida en glutamato por la glutaminasa a pesar de no ser un secretagogo de insulina por sí mismo puede potenciar la secreción de insulina inducida por leucina. Esto promueve la deaminación oxidativa del glutamato que forma iones de amonio, NADPH y alfa-cetoglutarato que puede ser metabolizado en el ciclo de ácidos tricarboxílicos. Otra vía involucra la formación de acetil CoA a partir de leucina mediante la acción de la deshidrogenasa de ácido alfa-cetoisocaproico (Lehninger A 1975) (Figs. 64 y 65).

La liberación de insulina inducida por leucina es completamente inhibida si los islotes se cultivan en concentraciones altas de glucosa (20 mM) durante 1 día, mientras la secreción de insulina inducida por glucosa es inhibida y la

inducida por leucina preservada en un cultivo con baja glucosa (1mM). Concentraciones altas de glucosa inhiben el 90% de la actividad enzimática y aumentan la expresión génica de la subunidad catalítica de la primera enzima de la deshidrogenasa de cetoácidos, un complejo formado por tres enzimas que cataliza el primer paso en el metabolismo de la leucina. Estos estudios sugieren que la liberación de insulina inducida por leucina es regulada por un elemento de respuesta a glucosa negativo en el gene de esta enzima (MacDonald MJ et al., 1990).

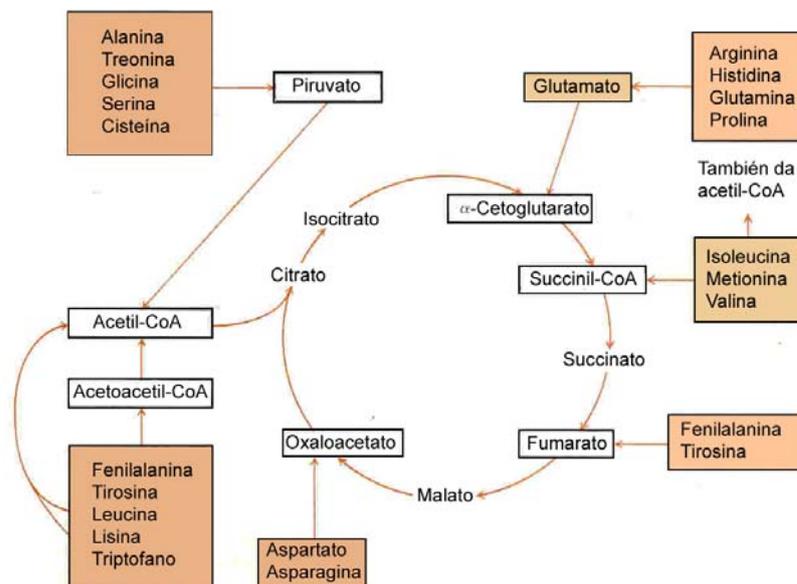


Fig. 64. Metabolismo de aminoácidos gluconeogénicos. *Modificado de Lehninger 1975.*

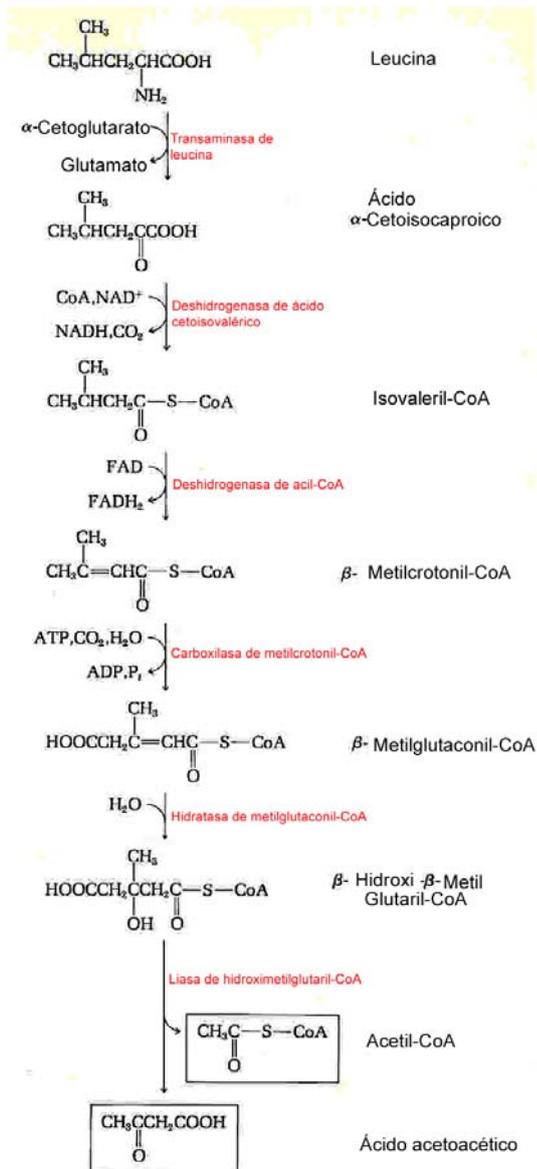


Fig 65. Metabolismo gluconeogénico de la leucina. *Modificado de Lehninger 1975.*

Nuestras observaciones indican que al d28 las células beta incrementan significativamente la secreción de insulina en respuesta a concentraciones altas de glucosa y la respuesta a secretagogos como la leucina y el KCl es más

robusta. Sin embargo, las células beta no alcanzaron una madurez funcional plena al d28, como es revelado por el RHPA ya que el número de células beta formadoras de placas pequeñas incrementó entre el d28 y la edad adulta. Esta observación sugiere el incremento de la masa de células beta observado entre el d28 y la edad adulta es a expensas de células SP mientras que la población de células beta que forman placas medianas- grandes al d28 disminuye con el desarrollo.

El hecho de que al d20 las células beta no sean capaces de distinguir entre diferentes niveles de glucosa y tengan una secreción basal elevada puede reflejar una respuesta adaptativa de las células a los niveles elevados de glucosa documentados entre el d6 y el d20. Esta posibilidad es respaldada por observaciones previas en las que niveles elevados de glucosa ocasionan una disminución en la sensibilidad de las células beta de ratas adultas (Leahy JL et al., 1986, Schmit F et al., 2002). Esta insensibilidad es revertida cuando se reestablece la euglucemia en el adulto (Thorens B et al., 1992) lo cual también es sugerido por nuestros datos al d28.

Los niveles circulantes de glucosa pueden tener un efecto profundo en el proceso de maduración de las células beta como lo demuestran diferentes estudios.

Después de una incubación de 1 h en niveles altos de glucosa, las células beta incrementan la transcripción del gene de insulina (Asfari M et al., 1992) y después de varias horas la actividad de muchos otros genes es alterada lo que da como resultado un fenotipo específico de células beta capaz de responder a diferentes concentraciones de glucosa.

La glucosa *per se* parece ser la responsable de ese fenotipo, por lo menos *in vitro* porque células beta cultivadas en niveles bajos de glucosa (6 mM) disminuyen la respuesta celular a la glucosa, mientras que ésta aumenta si se cultivan en 10 mM glucosa (Ling Z et al., 1996).

Experimentalmente se puede manipular la maduración de la secreción de insulina dependiendo de la concentración extracelular de glucosa. Si las células beta se mantienen en hipoglucemia mantienen características funcionales propias de células fetales. Si en cambio, los niveles extracelulares de glucosa se elevan se observan patrones de secreción de insulina similares a células adultas (Freinkel N et al., 1984).

Los parámetros bioquímicos que cambian durante estos experimentos, y que pueden explicar los cambios funcionales, son la fosforilación oxidativa y el metabolismo de fosfatos y nucleótidos (Freinkel N et al., 1984). Así, concentraciones elevadas de glucosa promueven la maduración del metabolismo y del proceso de acoplamiento entre el estímulo y la secreción (Hellerstrom C et al., 1992).

Generalmente, los efectos agudos de la regulación de glucosa sobre las células beta dependen de modificaciones alostéricas o covalentes de proteínas efectoras o reguladoras como por ejemplo los canales K_{ATP} . Sin embargo los efectos subagudos (horas) y crónicos (días) de la glucosa requieren cambios en los niveles de expresión génica de las proteínas involucradas en la regulación aguda de la función de las células beta (Schmit F et al., 2002). Ejemplos de transcritos que incrementan su expresión en respuesta a la glucosa son las subunidades SUR1 y Kir6.2 de los canales de K_{ATP} (Flamez D et al., 2002), la preproinsulina (Ling Z et al., 1998), la convertasa de

prohormona PC1/3 (Alarcon C et al., 1993), el transportador de glucosa GLUT2 (Ferrer J et al., 1993) y los antígenos de células beta GAD65 (Hao W 1994) y IA-2 (Seissler J et al., 2000).

Estos datos resaltan la importancia de la glucosa en la actividad biosintética de las células beta. La pérdida de sensibilidad de las células beta a cambios extracelulares en la concentración de glucosa se correlacionan con cambios en la clase de proteínas sintetizadas, lo cual a su vez depende en el perfil de RNA mensajero de la célula.

A niveles fisiológicos de glucosa la mayor parte de los transcritos celulares codifican proteínas relacionadas con las funciones especializadas de las células beta como son las enzimas que regulan el metabolismo de glucosa, lípidos y amino ácidos (Flamez D et al., 2002). Esto puede explicar algunas de las diferencias en la expresión de proteínas y su actividad observadas entre células beta fetales y células beta adultas maduras. Es importante tomar en cuenta que las concentraciones de glucosa varían durante el desarrollo así como las proteínas involucradas en la síntesis y secreción de insulina, proteínas de señalización, canales y transportadores.

Las concentraciones bajas de glucosa (3 mM) causan que la mayor parte de los transcritos codifiquen proteínas involucradas en la manutención celular general como reparación, síntesis y degradación de proteínas, transcripción y edición de RNA (Flamez D et al., 2002) y dejen de expresar las que son características de su función.

A nivel transcripcional, el metabolismo de la glucosa puede alterar la expresión de genes directamente a través de la activación o inhibición de proteínas unidas a los complejos de iniciación del promotor génico. Este

proceso se da a través de cinasas y fosfatasa que cambian su función en respuesta a la tasa metabólica de la célula beta (Schmit F et al., 2002). Un ejemplo de cinasas que participan en la expresión génica estimulada por glucosa es el gene de la cinasa de piruvato tipo L que responde a nutrientes en la célula beta (Kennedy HJ et al., 1997). Su transcripción es estimulada por una proteína que se une al elemento de respuesta a carbohidratos (Yamashita H et al., 2001) a través de mecanismos que involucran fosforilaciones mediadas por AMP cíclico (AMPc) (Kawaguchi T et al., 2001).

Otras vías de activación e inactivación dependen del flujo de calcio inducido por glucosa, con el cual se activan cinasas dependientes de calcio y fosfatasa como parte de la vía de señalización del receptor de insulina. Por ejemplo, la elevación de calcio intracelular provoca un incremento en la transcripción del gene de insulina (Lawrence MC et al., 2002). Este incremento es potenciado por el AMPc que puede elevarse en respuesta a la estimulación con incretinas, como GLP1, que activa al factor nuclear de células T activadas (NFAT por sus siglas en inglés). Estudios con el inhibidor de calcineurina FK506 y el quelador de calcio BAPTA sugieren que la respuesta transcripcional de la glucosa requiere calcineurina, una fosfatasa de proteínas dependiente de Ca^{2+} -calmodulina.

La glucosa también incrementa la velocidad de traducción de los transcritos presentes en la célula. En el caso del RNAm de preproinsulina, la secuencia que inhibe su traducción es cortada en respuesta a concentraciones altas de glucosa (Welsh M et al., 1986).

Estas evidencias sugieren a la glucosa como un factor determinante en la maduración funcional de las células beta. Por lo tanto, creemos que el pico

de glucosa que se observa durante el primer mes de vida puede estar correlacionado con la adquisición de la función y maduración de las células beta durante este período.

Así, sugerimos que el ambiente metabólico es importante en la función de las células beta y por lo tanto debe ser tomado en cuenta al analizar los procesos de maduración funcional.

El NGF como factor de maduración funcional durante el primer mes de vida.

El NGF es un factor de maduración funcional en la vida posnatal del páncreas aunque no parece tener efectos sobre la diferenciación de células beta.

Esto es sugerido por nuestros resultados que muestran como el NGF incrementa la secreción basal y estimulada de células beta en cultivo al d28. Este efecto lo tienen a través de un incremento en el área de inmunoplaaca sin alterar los porcentajes de células beta secretoras.

El porcentaje de células secretoras permanezca constante al d28 lo que indica que a esta edad no hay reclutamiento (proceso que implica que células beta inicialmente no secretoras, secreten insulina ante algún estímulo). Esto contrasta con las células beta adultas, ya que en éstas tanto la glucosa como el NGF incrementan el porcentaje de células secretoras (Rosenbaum T et al., 2001). Por otro lado, el porcentaje de células secretoras en condiciones control en 5.6 mM de glucosa ($47\% \pm 2$) indica que la mayor parte de las células beta en cultivo ($51\% \pm 9$ detectadas por inmunocitoquímica) son secretoras; en las

adultas, sin embargo solo el 50% de las células beta detectadas por inmunocitoquímica son secretoras.

La reversión de los efectos del NGF con el antagonista de TrkA, K252a, sugiere que los efectos observados son específicos para el factor de transcripción.

El NGF tiene efectos importantes en la transcripción de diferentes mensajeros.

A las 48 h de cultivo incrementa la transcripción del RNAm de preproinsulina. Este efecto del NGF sobre la transcripción del gene de insulina puede explicar en parte, el aumento en la secreción de insulina observada por RHPA en las células beta. La mayor cantidad de mensajero de preproinsulina aumenta el potencial celular para sintetizar insulina y por lo tanto tener una mayor reserva funcional para responder ante diferentes estímulos como lo son la glucosa y el NGF. Sin embargo para probar esto es necesario realizar una cuantificación de insulina para corroborar que el incremento en la transcripción génica es acompañado de un aumento de la traducción.

El NGF inhibe la transcripción de su gene a todos los tiempos en cultivo ensayados. Esto sugiere un mecanismo de retroalimentación negativa en el cual el producto inhibe su producción, podría indicar una forma de mantener un equilibrio en la cantidad de factor de crecimiento presente en las células.

El NGF incrementa la expresión del gen del mensajero de alta afinidad, TrkA. Esto concuerda con observaciones en células adultas en las que el NGF incrementa el mensajero de TrkA (Rosenbaum T et al., 1998).

El NGF incrementa la transcripción de PDX-1 solo después de una semana en cultivo. Esto sugiere que a las 24 y 48 h de cultivo el NGF no afecta

directamente la transcripción del factor de transcripción. Sin embargo puede incrementar su translocación al núcleo a través de su fosforilación por la activación de la PI3K. Resulta interesante que una semana después los niveles del RNAm de PDX1 incrementen lo que puede ser abordado en líneas posteriores de investigación.

Se detectó la presencia de glucagon y GAD65 en los cultivos de células beta. Esto sugiere la presencia de células alfa en el cultivo y la presencia de la vía sintética de GABA como un marcador de madurez funcional al d28. El NGF no tuvo efectos significativos sobre la transcripción de estos mensajeros.

Los resultados presentados hasta aquí, en conjunto con observaciones previas (Lucas A 1998), apoyan el concepto de que el desarrollo de los órganos está marcado por períodos críticos, caracterizados por una reorganización estructural y funcional intensa durante el primer mes de vida y por cambios en la homeostasis de la glucosa. En el caso del páncreas, el momento de esta remodelación puede incrementar la vulnerabilidad de la glándula a daños ambientales los cuales tendrán consecuencias a largo plazo. En apoyo a esto, se ha demostrado que la ingestión de dietas ricas en carbohidratos durante la lactancia ocasiona hiperinsulinemia y obesidad en ratas adultas (Aalinkeel R et al., 1999, Aalinkeel R et al., 2001, Srinivasan M et al., 2003). Estos cambios metabólicos asociados a dietas ricas en carbohidratos también ocasionaron cambios estructurales caracterizados por cambios en el tamaño, número y composición de islotes pancreáticos (Petrik J et al., 2001) así como un incremento en la secreción de insulina de islotes aislados (Srinivasan M et al., 2000). Nuestros resultados sugieren que este período crítico durante el

desarrollo del páncreas que determina parámetros metabólicos, funcionales y estructurales en la vida adulta, se caracteriza por una remodelación morfofuncional del páncreas endocrino.

Con base al incremento en la secreción de insulina inducido por NGF así como por la regulación del mensajero de la misma molécula, sugerimos al NGF como un factor de maduración funcional durante este período.

Esta remodelación no se ha descrito en humanos, sin embargo varios estudios sugieren que el estado nutricional durante la lactancia es uno de los factores que determinan el desarrollo de la intolerancia a la glucosa en el adulto (Ozanne SE et al., 2002, Ong KK et al., 2004, Yajnik CS 2004). Esto sugiere que, de manera similar a lo que observamos en la rata, en los seres humanos el periodo de lactancia podría ser una ventana crítica en el desarrollo del páncreas. Por lo tanto resulta interesante explorar estos cambios en páncreas humanos como una manera de mejorar la comprensión de la fisiopatología de la *diabetes mellitus* tipo 2.

CONCLUSIONES

1. El primer mes de vida es una ventana crítica en el desarrollo posnatal del páncreas endocrino.

2. Este periodo se caracteriza por cambios metabólicos importantes que pueden repercutir en la maduración funcional y estructural de los islotes pancreáticos. Se detecta un periodo fisiológico de hiperglucemia e hiperinsulinemia. A este evento subyacen un incremento en hormonas contrarreguladoras como el glucagon y el cortisol así como una disminución en la sensibilidad periférica a la insulina.

3. Existe una reestructuración de las poblaciones de células alfa y células beta, dentro y fuera de los islotes, durante el primer mes de vida.

2. Las células beta sufren modificaciones funcionales durante el primer mes de vida caracterizadas por insensibilidad a diferentes concentraciones de glucosa al d20 con una adquisición de función al d28.

4. La proporción de células beta en el páncreas a los 28 días es menor a las adultas y no es modificada por el tratamiento con NGF.

5. Las células beta a los 28 días son capaces de discriminar entre diferentes concentraciones de glucosa extracelular, siendo la secreción de insulina proporcional al estímulo.

6. El cultivo de las células beta a los 28 días con NGF incrementa su respuesta secretora.

7. El incremento observado en el índice de secreción de insulina a los 28 días se debe a un aumento en la cantidad de insulina secretada por células beta individuales, sin que se observe un incremento en la proporción de células beta secretoras.

8. La presencia de NGF exógeno en el medio de cultivo induce un incremento en la transcripción de los genes de insulina y TrkA e inhibe la transcripción de su propio mensajero.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aalinkeel R, Srinivasan M, Kalhan SC, Laychock SG, Patel MS (1999) A dietary intervention (high carbohydrate) during the neonatal period causes islet dysfunction in rats. *Am J Physiol Endocr Metab* 277: E1061-E1069
2. Aalinkeel R, Srinivasan M, Song F, Patel MS (2001) Programming into adulthood of islet adaptations induced by early nutritional intervention in the rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281: E640-E648.
3. Ahlgren U, Jonsson J, Jonsson L, Simu K, Edlund H (1998) Beta cell specific inactivation of the mouse *Ipf1/Pdx1* gene results in loss of the beta-cell phenotype and maturity onset diabetes. *Genes Dev* 12: 1763-1768.
4. Alarcon C, Lincoln B, Rhodes CJ (1993) The biosynthesis of the subtilisin-related proprotein convertase PC3, but not that of the PC2 convertase, is regulated by glucose in parallel to proinsulin biosynthesis in rat pancreatic islets *J Biol Chem* 268:4276-4280
5. Andersen G, Rose CS, Hamid YH (2003) Genetic variation of the GLUT10 glucose transporter (SLC2A10) and relationships to type 2 diabetes and intermediary traits. *Diabetes* 52:2445-2448
6. Angeletti R, Bradshaw R (1971) NGF from mouse submaxillary gland. *Proc Natl Acad Sci USA* 68:2417-2420
7. Arranz L, Ruiz MA, Fernandez E, Medina JM (1990) Metabolic effects of the delay in obliteration of the umbilical cord in the newborn rat *Biol Neonate* 57: 46
8. Asfari M, Janjic D, Meda P, Li G, Halban PA, Wolheim CM (1992) Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin secreting cell lines *Endocrinology* 130:167-178
9. Asphund K (1973) Dynamics of insulin release from the foetal and neonatal rat pancreas *Euro J Clin Invest* 3:338
10. Atwal JK, Maise B, Miller FD, Kaplan DR (2000) The TrkB-SHC site signals neuronal survival and local axon growth via MEK and PI3 kinase. *Neuron* 27:265-277
11. Ayers GJ, Clark J, Burnett (1989) An evaluation of the Abbott TDx serum cortisol assay. *Ann Clin Biochem* 26: 294-295
12. Baldwin AN, Bitler CM, Welcher AA, Shooter EM (1992) 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

13. Ballif BA, Blenis J (2001) Molecular mechanisms mediating mammalian mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK cell survival signals. *Cell Growth Differ* 12:397-408
14. Barde Y, (1989) Trophic factors and neural survival. *Neuron* 2:1525-1534
15. 20. Bax B, Blundell TL, Murray-Rust J, McDonald NQ (1997) Structure of mouse 7S NGF: a complex of nerve growth factor with four binding proteins. *Structure* 5:1275-1285
16. Beattie EC, Howe CL, Wilde A, Brodsky FM, Mobley WC (2000) NGF signals through TrkA to increase clathrin at the plasma membrane and enhance clathrin-mediated membrane trafficking. *J Neurosci* 20:7325-7333
17. Bell GI, Kayano T, Buse JB (1990) Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care* 13:198-208
18. Benzel I, Barde YA, Casademunt E (2001) Strain-specific complementation between NRIF1 and NRIF2, two zinc proteins sharing structural and biochemical properties. *Gene* 281:19-30
19. Bernard EA, Darlison MG, Seeburg P (1987) Molecular biology of the GABAA receptor: the receptor/Channel superfamily. *Trends Neurosci* 10:502-509.
20. Bibel M, Barde YA (2000) Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev* 14:2919-2937
21. Biggs III WH, Meisenhelder J, Hunter T, Cavenee WK, Arden KC (1999) Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:7421-7426
22. Bilderback TR, Gazula VR, Dobrowsky RT (2001) Phosphoinositide 3-kinase regulates crosstalk between Trk A tyrosine kinase and p75(NTR)-dependent sphingolipid signaling pathways. *J Neurochem* 76:1540-1551
23. Bilderback TR, Gazula VR, Lisanti MP, Dobrowsky RT (1999) Caveolin interacts with Trk A and p75(NTR) and regulates neurotrophin signaling pathways. *J Biol Chem* 274:257-263
24. Blazquez E, Sugase M, Blazquez M, Foa PP, (1974) Neonatal changes in the concentration of liver cAMP and of serum glucose, FFA, pancreatic insulin and total glucagon in man and in the rat *J Lab Clin Med* 83: 957

25. Blochl A, Sirrenberg C (1996) Neurotrophins stimulate the release of dopamine from rat mesencephalic neurons via Trk and p75^{NTR} receptors. *J Biol Chem* 271:21100-21107
26. Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, Tatarkiewicz K, Song KH, Sharma A, O'Neil JJ (2000a) In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 7999-8004
27. Bonner-Weir S; (2000b) Life and Death of the Pancreatic Beta Cells; *TEM* 11(9): 375-8
28. Bonner Weir S (2000c) Perspective: postnatal pancreatic beta cell growth. *Endocrinology* 141: 1926-9
29. Bonner-Weir S; (2001) Beta cell turnover: its assessment and implications; *Diabetes* 50, S1: S20-S24
30. Bonner Weir S, Sharma A (2002) Pancreatic stem cells. *J Pathol* 197:519-26
31. Boron WF, Boulpaep EL (2003) The endocrine pancreas in *Medical Physiology*. Ed. Elsevier Saunders. Estados Unidos p. 1075
32. Bowens L, Pipeleers DG (1998) Extra-insular beta cells associated with ductules are frequent in adult human pancreas. *Diabetologia* 41: 629-33
33. Bretherton-Watt D, Gore N, Boam DS (1996) Insulin upstream factor 1 and a novel ubiquitous factor bind to the human islet amyloid polypeptide/amylin gene promoter. *Biochem J* 313:495-502
34. Brice NL, Varadi SJH, Ashcroft, Molnar E (2002) Metabotropic glutamate and GABA_B receptors contribute to the modulation of glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 45:242-252
35. Brinn JE (1991) Rat liver glucose transporter is present in perinatal rat islets. *Diabetes* 40 (suppl 1): 174A
36. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Breenberg ME (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96:857-868
37. Brunicardi FC, Shavelle DM, Andersen DK (1995) Neural regulation of the endocrine pancreas. *Int J Pancreatol* 18:177-195
38. Bryant NJ, Govers R, James DE (2002) Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:267-277

39. Buck CR, Martinez HJ, Black IB, Chao MV (1987) Developmentally regulated expression of the nerve growth factor receptor gene in the periphery and brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:3060-3063
40. Bullock J, Boyle J, Wang M; *Physiology NMS*; 2a Edición (1991); William and Wilkins
41. Bullock J, Boyle J, Wang M; *Physiology NMS*; 4a Edición (2001); William and Wilkins; pp. 317
42. Buteau J, Roduit R, Susini S, Prentki M (1999) Glucagon-like peptide-1 promotes DNA synthesis, activates phosphatidylinositol 3-kinase and increases transcription factor pancreatic and duodenal homeobox gene 1 (PDX1) DNA binding activity in beta (INS-1) cells. *Diabetologia* 42:856-864
43. Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC (1998) Regulation of cell death protease Caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282:1318-1321
44. Carruthers A (1990) Facilitated diffusion of glucose. *Physiol Rev* 70:1135-1176
45. Cartee GD, Douen AG, Ramlal T, Klip A, Holloszi JO (1991) Stimulation of glucose transport in skeletal muscle by hypoxia. *J Appl Physiol* 70:1593-1600
46. Carty MD, Lillquist JS, Peshavaria M, Stein R, Soeller WC (1997) Identification of cis- and trans-active factors regulating human islet amyloid polypeptide gene expression in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 272: 11986-11993
47. Casaccia-Bonnel P, Carter BD, Dobrowsky RT, Chao MV (1996) Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75. *Nature* 383:716-719
48. Casademunt E, Carter BD, Benzel I, Frade JM, Dechant G, Barde YA (1999) the zinc finger protein NRIF interacts with the neurotrophin receptor p75NTR and participates in programmed cell death *EMBO J* 18:6050-6061
49. Cerf ME, Williams K, Nkomo XI, Muller CJ, DuToit DF, Louw J, Wolfe-Coote SA (2005) Islet response in the neonatal rat after exposure to a high-fat diet during pregnancy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288: R1122- R1128
50. Chandler JD, Williams ED, Slavin JL, Best JD, Rogers S (2003) Expression and localization of GLUT1 and GLUT12 in prostate carcinoma. *Cancer* 97:2035-2042

51. Chapman BS, Kuntz ID (1995) Modeled structure of the 75 kDa neurotrophin receptor. *Protein Sci* 4:1696-1707
52. Chessler SD, Simonson WT, Sweet IR, Hammerle LP (2002) Expression of the vesicular inhibitory amino acid transporter in pancreatic islet cells. *Diabetes* 51: 1763-1771
53. Cline GW, Petersen KF, Krssak M, Shen J, Hundal RS, Trajanoski Z, Inzucchi S, Dresner A, Rothman DL, Shulman GI (1999) Impaired glucose transport as a cause of decreased insulin-stimulated muscle glycogen synthesis in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 41:240-6.
54. Conti G, Stoll G, Scarpini E, Baron PL, Bianchi R, Livraghi S, Scarlato G (1997) p75 neurotrophin receptor induction and macrophage infiltration in peripheral nerve during experimental diabetic neuropathy: possible relevance on regeneration. *Exp Neurol* 146:206-211
55. Corbit KC, Foster DA, Rosner MR (1999) Protein kinase Cdelta mediates neurogenic but not mitogenic activation of mitogen-activated protein kinase in neuronal cells. *Mol Cell Biol* 19:4209-4218
56. Corda MG, Guidotti A (1983) Modulation of GABA receptor binding by calcium. *Neurochem* 41: 227-80
57. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL (1994) *Pathologic Basis of Disease*; 5a Edición, Ed. Saunders; p. 897
58. Cotrina ML, Gonzalez-Hoyuela M, Barbas JA, Rodriguez-Tebar A (2000) Programmed cell death in the developing somites is promoted by nerve growth factor via its p75NTR receptor. *Dev Biol* 228:326-336
59. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378:785-789
60. Cunningham ME, Stephens RM, Kaplan DR, Greene LA (1997) Autophosphorylation of activation loop tyrosines regulates signaling by the TRK nerve growth receptor. *J Biol Chem* 272:10957-10967
61. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91:231-241
62. del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, Herrera R, Nunez G (1997) Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 278:687-689

63. Dobrowsky RT, Jenkins GM, Hannun YA (1995) Neurotrophins induce sphingomyelin hydrolisis- modulation by co-expression of p75NTR with Trk receptors. *J Biol Chem* 270:22135-22142
64. Dobrowsky RT, Werner MH, Castellino AM, Chao MV, Hannun YA (1994) Activation of the sphingomyelin cycle through the low affinity neurotrophin receptor. *Science* 265:1596-1598
65. Doege H, Bocianski A, Scheepers A (2001) Characterization of the human glucose transporter GLUT11, a novel sugar transport facilitator specifically expressed in heart and skeletal muscle. *Biochem J* 359:443-449
66. Doerr HG, Sippell WG, Versmold HT, Bidlingmaier F, Knorr D (1988) Plasma mineralocorticoids, glucocorticoids and progestins in premature infants: longitudinal study during the first week of life *Pediatr Res* 23:525
67. Dor Y, Brown J, Martinez OI, Melton DA (2004) Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature*. 429:41-46.
68. Drucker DJ (2005) Biologic actions and therapeutic potential of the proglucagon-derived peptides. *Nat Clin Practice Endocrinol Metab* 1: 22-31
69. Dudek RW, Preinkel N, Lewis NJ, Hellerstrom C, Johnson RC (1980) Morphologic study of cultured pancreatic fetal islets during maturation of the insulin stimulus-secretion mechanism *Diabetes* 29: 15-21
70. Edlund H (2002) Organogenesis: pancreatic organogenesis developmental mechanisms and implications for therapy. *Nat Rev Genet* 3: 524-32
71. Elrick LJ, Docherty K (2001) Phosphorylation dependent intranuclear shuttling of PDX-1 in pancreatic beta cells. *Diabetes* 50:2244-52.
72. Erdo SL, Wolff JR (1990) Gamma aminobutyric acid outside the mammalian brain. *J Neurochem* 54: 363-72.
73. Ernfors P, Hallbook F, Ebendal T, Shooter EM, Radeke MJ, Misko TP, Persson H (1988) Developmental and regional expression of b-nerve growth factor receptor mRNA in the chick and rat. *Neuron* 1:983-996
74. Escandon E, Chao MV (1989) Developmental expression of the chicken nerve growth factor receptor gene during brain morphogenesis. *Brain Res Dev Brain Res* 47:187-196

75. Espinosa MMA, Driscoll SG, Steinke J (1970) *Science* 168:1111-12
76. Etti BS, Masrhak S, Shoshkes M, Cerasi E, Melloul D (2001) A pancreatic beta cell specific enhancer in the human Pdx-1 gene is regulated by HNF-3beta, HNF-1alfa, and SPs transcription factors. *J Biol Chem* 276:17533-17549
77. Exton JH (1972) Gluconeogenesis. *Metabolism* 21:945
78. Feinstein E, Kimchi A, Wallach D, Boldin M Varfolomeev E (1995) The death domain: a module shared by proteins with diverse cellular functions. *Trends Biochem Sci* 20:342-344
79. Ferrer J, Gomis R, Fernandez Alvarez J, Casamitjana R, Vilardell E (1993) Signals derived from glucose metabolism are required for glucose regulation of pancreatic islet GLUT2 mRNA and protein *Diabetes* 42:1273-1280
80. Flamez D, Berger V, Kruhoffer M, Orntoft T, Pipeleers D, Schmit FC (2002) Critical role for cataplerosis via citrate in glucose-regulated insulin release *Diabetes* 51:2018-2024
81. Fletcher DJ, Rowley WH, Pabst SJ, Brinn JE (1989) Age-dependent stimulation of neonatal insulin release and inositol phosphate accumulation by CCK-8 and carbachol. *Diabetes* 38:1337-42
82. Franklin IK, Wollheim CB. (2004) GABA in the endocrine pancreas: its putative role as an islet cell paracrine-signalling molecule. *J Gen Physiol* 123:185-90.
83. Freinkel N, Lewis NJ, Johnson R, Swenne I, Bone A, Hellerstrom C (1984) Differential effects of age versus glycemic stimulation on the maturation of insulin stimulus-secretion coupling during culture of fetal rat islets *Diabetes* 33: 1028
84. Friedman WJ, Greene LA (1999) Neurotrophin signaling via Trks and p75. *Exp Cell Res* 253:131-142
85. Froestl W (2000) Receptors in neurodegenerative diseases. *Pharm Acta Helv* 74:247-251
86. Fuchs E, Segre JA (2000) Stem cells: a new lease on life. *Cell* 100: 143-55
87. Fukumoto H, Kayano T, Buse JB (1989) Cloning and characterization of the major insulin-responsive glucose transporter expressed in human skeletal muscle and onther insulin-responsive tissues. *J Biol Chem* 264:7776-7779

88. Fukumoto H, Seino S, Imura H (1988) Sequence, tissue distribution and chromosomal localization of mRNA encoding a human glucose transporter-like protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 5434-5438
89. Furuta M, Yano H, Zhou A, Rouille Y, Holst JJ, Carroll R, Ravazzola M, Orci L, Furuta H, Steiner DF. (1997) Defective prohormone processing and altered pancreatic islet morphology in mice lacking active SPC2. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:6646-6651
90. Gao R, Ustinov J, Pulkkinen MA, Lundin K, Korsgren O, Otonkoski T (2003) Characterization of endocrine progenitor cells and critical factor for their differentiation in human adult pancreatic cell culture. *Diabetes* 52: 2007-15
91. Gaster M, Handberg A, Beck-Nielsen H, Schroder HD (2000) Glucose transporter expression in human skeletal muscle fibers. *Am J Physiol* 279:E529-E538
92. Gerber JC, Hare TA (1980) GABA in peripheral tissues: presence and actions in endocrine pancreatic function. *Brain Res Bull* 5: 341-46.
93. Gerrish K, Gannon M, Shih D et al. (2000) Pancreatic beta cell-specific transcription of the *pdx-1* gene. The role of conserved upstream control region and their hepatic nuclear factor 3beta sites. *J Biol Chem* 275: 3485-3492
94. Gesina E, Tronche F, Herrera P, Duchene B, Tales W, Czernichow P, Breant B (2001) Dissecting the role of glucocorticoids on pancreas development. *Diabetes* 53: 2322-2329
95. Gilon P, Bertrand G, Loubatieres-Mariani MM, Remacle C, Henquin JC (1991) The influence of gamma aminobutyric acid on hormone release by the mouse and rat endocrine pancreas. *Endocrinology* 129: 2521-2529.
96. Girard J (1990) Metabolic adaptations to change of nutrition at birth. *Biol Neonate* 58:3
97. Girard JR, Kervran A, Soufflet E, Asan R (1974) Factors affecting the secretion of insulin and glucagon by the rat fetus *Diabetes* 23:310-317
98. Glick E, Leshkowitz D, Walker MD (2000) Transcription factor BETA2 acts cooperatively with E2A and PDS1 to activate the insulin gene promoter. *J Biol Chem* 275:2199-2204
99. Gould GW, Homan GD. The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression. *Biochem J* (1993) 295: 329-341

100. Grewal SS, York RD, Stork PJ (1999) Extracellular-signal-regulated kinase signalling in neurons. *Curr Opin Neurobiol* 9:544-553
101. Gromada J, Bokvist K, Ding WG, Barg S, Buschard K, Renstrom E, Rorsman P (1997) Adrenalin stimulates glucagon secretion in pancreatic alfa cells by increasing the calcium current and the number of granules close to the L-type calcium channels. *J Gen Physiol* 110:217-228
102. Gu D, Sarvetnick N (1993) Epithelial cell proliferation and islet neogenesis in IFN gamma transgenic mice. *Development* 118: 33-46
103. Gu XH, Kurose T, Kato S, Masuda K, Tsuda K, Ishida H, Seino Y (1993) Suppressive effect of GABA on insulin secretion from the pancreatic beta cells in the rat. *Life Sci* 52:687-694.
104. Guillam MT, Hummler E, Schaerer E, Yeh JI, Birnbaum MJ, Beermann F, Schmidt A, Deriaz N, Thorens B (1997) Early diabetes and abnormal postnatal pancreatic islet development in mice lacking Glut-2. *Nat Genet* 17:327-30.
105. Guo S, Rena G, Cichy S, He X, Cohen P, Unterman T (1999) Phosphorylation of serine 256 by protein kinase B disrupts transactivation by FKHR and mediates effects of insulin on insulin-like growth factor-binding protein 1 promoter activity through a conserved insulin response sequence. *J Biol Chem* 274:17184-17192
106. Gylfe E (1976) Comparison of the effects of leucines, non-metabolizable leucine analogues and other insulin secretagogues on the activity of glutamate dehydrogenase. *Acta Diabetol Lat* 13:20-4
107. Hao W, Li L, Mehta V, Lernmark A, Palmer JP (1994) Functional state of the beta cell affects expression of both forms of glutamic acid decarboxylase *Pancreas* 9:558-562
108. Heinze E, Steinke J (1971) Glucose metabolism of isolated pancreatic islets: difference between fetal, newborn and adult rats. *Endocrinology* 88:1259-1263
109. Heldin CH (1995) Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* 80:213-223
110. Hellerstrom C, Andersson A, Sandler S (1992) Structural and biochemical maturation of the fetal endocrine pancreas, in: *Perinatal Biochemistry*. Edited by Herrera E, Knopp R CRC Press USA p. 181
111. Hill DR, Bowery NG, Hudson AL (1984) Inhibition of GABAB receptor binding by guanyl nucleotides. *J Neurochem* 42: 652-57

112. Hiriart M, Matteson DR (1988) Na Channel and two types of Ca channels in rat pancreatic beta cells identified with the reverse hemolytic plaque assay. *J Gen Physiol* 91: 617-631
113. Hiriart M, Ramirez-Medeles MC (1991) Functional subpopulations of individual pancreatic beta cells in culture. *Endocrinology* 128: 3193-3198,
114. Hiriart M, VidaltamayoR, Sanchez-Soto MC, Rosenbaum T, Martinez/Merlos T (1996): Neuron-like phenotypic changes in pancreatic beta cells induced by NGF, FGF and dbcAMP; *Endocrine* 4: 19-26
115. Hiriart M (1997a) El páncreas endocrino. En: Libro del Curso Internacional de Actualización en Fisiología. XL Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. México, pp. 305
116. Hiriart M, Martinez MT, Ramirez-Medeles MC (1997b) Physiological behavior of functional subpopulations of single pancreatic beta-cells. *Adv Exp Med Biol* 426:267-74
117. Hole RL, Pian-Smith MCM, Sharp GWG (1988) Development of the biphasic response to glucose in fetal and neonatal rat pancreas *Am J Physiol* 254: E167
118. Howe CL, Valletta JS, Rusnak AS, Mobley WC (2001) NGF signaling from clathrin-coated vesicles: evidence that signaling endosomes serve as a platform for the Ras-MAPK pathway. *Neuron* 32:801-814
119. Huang CS, Zhou J, Feng AK, Lynch CC, Klumperman J (1999) Nerve growth factor signaling in caveolae-like domains at the plasma membrane. *J Biol Chem* 274:36707-36714
120. Huang EJ, Reichardt LF (2001) Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24:677-736
121. Huang EJ, Reichardt LF (2003) Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 72:609-642
122. Hughes SJ (1994) The role of reduced glucose transporter content and glucose metabolism in the immature secretory responses of fetal rat pancreatic islets. *Diabetologia* 37:134-40
123. Humphrey RK, Bucay N, Beattie GM, Lopez A, Messam CA, Cirulli V, Hayek A (2003) Characterization and isolation of promoter-defined nestin-positive cells from the human fetal pancreas. *Diabetes* 52: 2519-25

124. Hunziker E, Stein M (2000) Nestin-expressing cells in the pancreatic islets of Langerhans. *Biochem Biophys Res Commun* 271:116-9
125. Irie S, Hachiya T, Rabidazeh S, Maruyama W, Mukai J, Li Y, Reed JC, Brdesen DE, Sato TA (1999) Functional interaction of Fas-associated phosphatase-1 (FAP-1) with p75NTR and their effect on NF-kappaB activation. *FEBS Lett* 460:191-198
126. Jensen J (2004) Gene regulatory factors in pancreatic development. *Dev Dyn*. 2004 229:176-200
127. Jing S, Tapley P, Barbacid M (1992) Nerve growth factor mediates signal transduction through Trk homodimer receptors. *Neuron* 9:1067-1079
128. Johnson KE (1988) *Human Developmental Anatomy, NMS Series Ed.* Wiley Medical; pp. 214-215
129. Jones PF, Jakubowicz T, Pitossi FJ, Maurer F, Hemmings BA (1991) Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:4171-4175
130. Jonsson J, Carlsson L, Edlund H (1994) Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 371:606-609
131. Joost HG, Wandel S, Sachurmann A (1994) Structure-function relationship of glucose transporters catalyzing facilitated diffusion. *Exp Clin Endocrinol* 102: 434-438.
132. Joost HG, Thorens B (2001) The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitations: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members. *Mol Membr Biol* 18:247-256
133. Kahn BB (1992) Facilitative glucose transporter: regulatory mechanisms and dysregulation in diabetes. *J Clin Invest* 89:1367-1374
134. Kaiser N, Leibowitz G, Nesher R (2003) Glucotoxicity and beta cell failure in type 2 diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab* 16: 5-22
135. Kanaka-Gantenbein C, Tazi A, Czernichow P, Scharfmann R (1995a) In vivo presence of the high affinity nerve growth factor receptor Trk-A in the rat pancreas: differential localization during pancreatic development. *Endocrinology*. 136:761-9
136. Kanaka-Gantenbein C, Dicou E, Czernichow P, Scharfmann R (1995b) Presence of nerve growth factor and its receptors in an in vitro

model of islet cell development: implication in normal islet morphogenesis. *Endocrinology*. 136:3154-62.

137. Kaplan DR, Miller FD (2000) Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 10:381-391

138. Kassem S, Ariel I, Thornton P, Scheimberg I, Glaser B (2000) Beta cell proliferation and apoptosis in the developing normal human pancreas and hyperinsulinism of infancy. *Diabetes* 49: 1325-1333

139. Kaupmann K, Malitschek B, Schuler V, Heid J, Froestl W, Beck P, Mosbacher J, Bischoff S, Kulik A, Shigemoto R (1998) GABAB-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature* 396:683-687.

140. Kawaguchi T, Takenoshita M, Kabashima T, Uyeda K (2001) Glucose and cAMP regulate the L-type pyruvate kinase gene by phosphorylation/dephosphorylation of the carbohydrate response element binding protein *Proc Natl Acad Sci USA* 98:13710-13715

141. Kayano T, Fukumoto H, Eddy RL (1988) Evidence for a family of human glucose transporter-like proteins: sequence and gene localization of a protein expressed in feta skeletal muscle and other tissues. *J Biol Chem* 263:15245-15248

142. Kennedy HJ, Viollet B, Rafiq I, Kahn A, Rutter GA (1997) Upstream stimulatory factor-2 (USF-2) activity is required for glucose stimulation of L-pyruvate kinase promoter activity in single living islet beta cells. *J Biol Chem* 272:20636-20640

143. Khursigara G, Bertin J, Yano H, Moffett H, DiStefano PS, Chao MV (2001) A prosurvival function for the p75 receptor death domain mediated via the Caspase recruitment domain receptor-interacting protein 2. *J Neurosci* 21:5854-5863

144. Khursigara G, Orlinich JR, Chao MV (1999) Association of the p75 neurotrophin receptor with TRAF6. *J Biol Chem* 274:2597-2600

145. Kong H, Boulter J, Weber JL, Lai C, Chao MV (2001) An evolutionarily conserved transmembrane protein that is a novel downstream target of neurotrophin and ephrin receptors. *J Neurosci* 21:176-185

146. Kops GJ, de Ruiter ND, De Vries-Smits AM, Powell DR, Bos JL, Burgering BM (1999) Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Nature* 398:630-634

147. Krajewska M, Krajewski S, Zapata JM, Van Arsdale T, Gascoyne RD, Berern K, McFadden D, Shabaik A, Hugh J, Reynolds A, Clevenger CV, Reed JC (1998) TRAF4 expression in epithelial progenitor cells:

analysis in normal adult, fetal and tumor tissues. *Am J Pathol* 152:1549-1561

148. Krinke Georg J (2000) *The handbook of experimental animals: the laboratory rat*; Ed. Acad. Press; London; p169

149. Krygier S, Djakiew D (2001) The neurotrophin receptor p75NTR is a tumor suppressor in human prostate cancer. *Anticancer Res* 21:3749-3755

150. Ktorza A, Bihoreau MT, Nurhan N, Picon L, Girard (1985) Insulin and glucagon during the perinatal period: secretion and metabolic effects on the liver *Biol Neonate* 48:204-220

151. Large TH, Weskamp G, Helder JC, Radeke MJ, Misko TP, Shooter EM, Reichardt LF (1989) Structure and developmental expression of the nerve growth factor receptor in the chicken central nervous system. *Neuron* 2: 1123-1134

152. Larsson LI (1978); *Endocrine pancreas tumors*; *Hum. Pathol.* 9: 401-416.

153. Lawrence MC, Bhatt HS, Easom RA (2002) NFAT regulates insulin gene promoter pathways induced by glucose and glucagon-like peptide-1 *Diabetes* 51:691-698

154. Leahy JL, Cooper HE, Deal DA, Weir GC (1986) Chronic hyperglycemia is associated with impaired glucose influence on insulin secretion. *J Clin Invest* 77: 908-915

155. Lehninger AL: *Biochemistry*. 2a Edición. Worth Publishers Inc., NY 1975.

156. Leonard J, Peers B, Johnson T, Ferreri K, Lee S, Montminy MR (1993) Characterization of somatostatin trans-activating factor-1, a novel homeobox factor that stimulates somatostatin expression in pancreatic islet cells. *Mol Endocrinol* 7: 1275-1283.

157. Lewin GR, Barde YA (1996) *Physiology of the neurotrophins*. *Annu Rev Neurosci* 19:289-317

158. Ling Z, Hemberg H, Fofiers A, Schmit F, Pipeleers D (1998) Differential expression of rat insulin I and II messenger ribonucleic acid after prolonged exposure of islet beta cells to elevated glucose levels *Endocrinology* 139: 491-495

159. Ling Z, Kiekens R, Mahler T, Schmit FC, Pipeleers-Marichal M, Sener A, Kloppel G, Malaisse WJ, Pipeleers D (1996) Effects of chronically elevated glucose levels on the functional properties of rat pancreatic beta cells *Diabetes* 45: 1774-1782

160. Lorigados-Pedre L, Bergado-Rosado J (2004) El factor de crecimiento nervioso en la neurodegeneración y el tratamiento neurorestaurador. *Rev Neurol* 38:957-71
161. Lu M, Miller C, Habener JF (1996) Functional regions of the homeodomain protein IDX-1 required for transactivation of the rat somatostatin gene. *Endocrinology* 137:2959-2967
162. Lucas A (1998) Programming by early nutrition: an experimental approach. *J Nutr* 128: 401S-406S
163. Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, McKay R (2001) Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science* 292: 1389-93
164. Lund S, Homan GD, Schmitz O, Pederson O (1995) Contraction stimulates translocation of glucose transporter GLUT4 in skeletal muscle through a mechanism distinct from that of insulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:5817-5821
165. Luo L (2000) Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nat Rev Neurosci* 1:173-180
166. MacDonald MJ (1990) Elusive proximal signals of beta-cells for insulin secretion. *Diabetes*. 39:1461-6.
167. Macfarlane WM, McKinnon CM, Felton-Edkins ZA, Cragg H, James RF, Docherty K (1999) Glucose stimulates translocation of the homeodomain transcription factor PDX1 from the cytoplasm to the nucleus in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 274: 1011-1016
168. Macfarlane WM, Smith SB, James RF et al. (1997) The p38/reactivating kinase mitogen-activated protein kinase cascade mediates the activation of the transcription factor insulin upstream factor 1 and insulin gene transcription by high glucose in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 272: 20936-20944.
169. Macheda ML, Kelly DJ, Best JD, Rogers S (2002) Expression during rat fetal development of GLUT12- a member of the class III hexose transporter family. *Anat Embryol* 205:441-452
170. Madsen OD, Jensen J, Blume N, Petersen HV, Lund K, Karlsen C, Andersen FG, Jensen PB, Larsson LI, Serup P (1996) Pancreatic development and maturation of the islet beta cell studies of pluripotent islet cultures. *Eur J Biochem* 242: 435-45
171. Maitland JE, Parry DG, Turtle JR (1980) Perfusion of human fetal pancreas *Diabetes* 29: 57

172. Marshak S, Benshushan E, Shoshkes M, Havin L, Cerasi E, Melloul D (2000) Functional conservation of regulatory elements in the pdx-1 gene: PDX-1 and hepatocyte nuclear factor 3 beta transcription factors mediate beta cell specific expression. *Mol Cell Biol* 20:7583-7590
173. Mayor F, Cuezva JM (1985) Hormonal and metabolic changes in the perinatal period *Biol Neonate* 48:185
174. McEvoy RC, Madson KL (1980) Pancreatic insulin, glucagon and somatostatin positive islet cell populations during the perinatal development of the rat. II Changes in hormone content and concentration *Biol Neonate* 38:255-259
175. McKay S, Purcell A, Carew T (1999) Regulation of synaptic function by neurotrophic factors in vertebrates and invertebrates: implications for development and learning. *Learn Mem* 6:193-215
176. McKinnon, Docherty K (2001) Pancreatic duodenal homeobox-1, PDX-1, a major regulator of beta cell identity and function. *Diabetologia* 44: 1203-1214.
177. McVie-Wylie AJ, Lamson DR, Chen YT (2001) Molecular cloning of a novel member of the GLUT family of transporters, SLC2A10 (GLUT10), localized on chromosome 20q13.1: a candidate gene for NIDDM susceptibility. *Genomics* 72:113-117
178. Meakin SO, MacDonald JI, Gryz EA, Kubu CJ, Verdi JM (1999) The signaling adaptor FRS-2 competes with Shac for binding to the nerve growth factor receptor TrkA: a model for discriminating proliferation and differentiation. *J Biol Chem* 274:9861-9870
179. Medina JM, Vicario C, Juanes MC, Fernandez E (1992) Biochemical adaptations to early extrauterine life, in: *Perinatal Biochemistry*. Edited by Herrera E, Knopp R; CRC Press USA p. 252
180. Miller FD, Kaplan DR (2001) Neurotrophin signalling pathways regulating neuronal apoptosis. *Cell Mol Life Sci* 58:1045-53
181. Milner RD (1969) Stimulation of insulin secretion in vitro by essential amino acids. *Lancet* 1:1075
182. Milner RD (1980) The development of structure and function of the endocrine pancreas, in: *Studies in Perinatal Physiology*. Edited by Widdowson EM. Pitman Medical Limited, p. 16
183. Milner RDG, Ashworth MA, Barson AJ (1971) Insulin release from human fetal pancreas in vitro *Horm Metab Res* 3:353

184. Montanya E, Nacher V, Biarnés M, Soler J (2000) Linear correlation between beta-cell mass and body weight throughout the lifespan in Lewis rats. *Diabetes* 49: 1341-1346
185. Morley MG, Leiter EH, Eisenstein AB, Strack I (1982) Dietary modulation of alpha cell volume and function in strain 129/J mice. *Am J Physiol* 242 (Gastrointest Liver Physiol 5): G354-G359
186. Mueckler M, Caruso C, Baldwin SA (1985) Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science* 229:941-945
187. Offield MF, Jetton TL, Labosky PA et al. (1996) PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development* 122:983-995
188. Ohlsson H, Karlsson K, Edlund T (1993) IPF1, a homeodomain-containing transactivator of the insulin gene. *EMBO J* 12: 4251-4259.
189. Ohneda K, Mirmira RG, Wang J, Johnson JD, German MS (2000) The homeodomain of PDX1 mediates multiple protein-protein interactions in the formation of a transcriptional activation complex on the insulin promoter. *Mol Cell Biol* 20: 900-911
190. Ong KK, Petry CJ, Emmett PM, Kiess W, Hales CN, Ness AR, Dunger DB, the ALSPAC study team: Insulin sensitivity and secretion in normal children related to size at birth, postnatal growth, and plasma insulin-like growth factor-1 levels. *Diabetologia* 47:1064-1070, 2004
191. Oppenheim RW (1991) Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 14:453:501
192. Ozanne SE, Hales CN: Early programming of glucose-insulin metabolism. *TRENDS Endocrinol Metab* 13:368-373, 2002
193. Ozawa S, Sand O (1986) Electrophysiology of excitable endocrine cells. *Physiol Rev* 66:887-952.
194. Padbury JF, Diakomanolis ES, Hobel CJ (1981) Neonatal adaptation: sympathoadrenal response to umbilical cord cutting *Pediatr Res* 15: 1483
195. Pap M, Cooper GM (1998) Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway *J Biol Chem* 273:19929-19932
196. Park JA, Lee JY, Sato TA, Koh JY (2000) Co-induction of p75^{NTR} and p75^{NTR}-associated death executor in neurons after zinc exposure in cortical culture or transient ischemia in the rat. *J Neurosci* 20:9096-9103

197. Patzelt C, Schiltz E (1984) Conversion of proglucagon in pancreatic alpha cells: the major endproducts are glucagon and a single peptide, the major proglucagon fragment, that contains two glucagon-like sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:5007-5011
198. Peers B, Leonard J, Sharma S, Teitelman G, Montminy MR (1994) Insulin expression in pancreatic islet cells relies on cooperative interactions between the helix loop helix factor E47 and the homeobox factor STF-1. *Mol Endocrinol* 8:1798-1806
199. Perez-Villamil B, Schwartz PT, Vallejo M (1999) The pancreatic homeodomain transcription factor IDX1/IPF1 is expressed in neural cells during brain development. *Endocrinology* 140: 3857-3860
200. Perfetti R, Zhou J, Doyle ME, Egan JM (2000) Glucagon-like peptide-1 induces cell proliferation and pancreatic-duodenum homeobox-1 expression and increases endocrine cell mass in the pancreas of old, glucose-intolerant rats. *Endocrinology* 141:4600-4605
201. Petrik J, Srinivasan M, Aalinkeel R, Cookell S, Arany E, Patel MS, Hill DJ (2001) A long-term high carbohydrate diet causes an altered ontogeny of pancreatic islets of Langerhans in the neonatal rat. *Pediatr Res* 49:84-92
202. Pipeleers D, Schuit F, van Schravendijk CFH, van DeWinkel M (1985) Interplay of nutrient and hormones in the regulation of glucagon release. *Endocrinology* 117:817-823
203. Postic C, Shiota M, Magnuson MA (2001) Cell-specific roles of glucokinase in glucose metabolism. *Recent Prog Horm Res* 56:195-217
204. Purves D, Snider WE, Voyvodic JT (1988) Trophic regulation of nerve cell morphology and innervation in the autonomic nervous system. *Nature* 336:123-128
205. Rafiq I, Kennedy HJ, Rutter GA (1998) Glucose-dependent translocation of insulin promoter factor-1 (IPF-1) between the nuclear periphery and the nucleoplasm of single MIN6 beta cells. *J Biol Chem* 273:23241-23247
206. Ramiya VK, Maraist M, Arfors KE, Schatz DA, Peck AB, Cornelius JG (2000) Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells. *Nat Med* 6:278-282
207. Rhoten WB (1980) Insulin secretory dynamics during development of rat pancreas. *Am J Physiol* 239: E57-63
208. Robbins MS, Grouse LH, Sorenson RL, Elde RP (1981) Effect of muscimol on glucose-stimulated somatostatin and insulin release from the isolated, perfused rat pancreas. *Diabetes* 30: 168-71.

209. Rogers S, Docherty SE, Slavin JL, Henderson MA, Best JD (2003) Differential expression of GLUT12 in breast cancer and normal breast tissue. *Cancer Lett* 193: 225-233
210. Rohn JL, Hueber AO, McCarthy NJ, Lyon D, Navarro PBM, Evan GI (1998) The opposing roles of the Akt and c-Myc signalling pathways in survival from CD95-mediated apoptosis. *Oncogene* 17:2811-2818
211. Rorsman P, Hellman B (1988) Voltage-activated currents in guinea-pig pancreatic alpha2-cells: evidence of calcium dependent action potentials. *J Gen Physiol* 91:223-242
212. Rorsman P, Arkhammar P, Bokvist K, Hellerstrom C, Nilsson T, Welsh M, Welsh N, Berggren PO (1989a) Failure of glucose to elicit a normal secretory response in fetal pancreatic beta cells results from glucose insensitivity of the ATP-regulated K⁺ channels *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 4505-4509
213. Rorsman P, Berggren PO, Bokvist K, Ericson H, Mohler H, Ostenson CG, Smith PA (1989b) Glucose-inhibition of glucagon secretion involves activation of GABAA-receptor chloride channels. *Nature* 341: 233-236.
214. Rorsman P, Ashcroft FM, Berggren PO (1991) Regulation of glucagon release from pancreatic alpha cells. *Biochem Pharmacol* 41:1783-1790
215. Rosenbaum T, Vidaltamyo R, Sanchez-Herrera D, Hiriart M (1996) Nerve growth factor increases sodium current in pancreatic beta cells, *J Membr Biol* 153: 53-58
216. Rosenbaum T, Vidaltamayo R, Sanchez-Soto MC, Zentella A, Hiriart M (1998) Pancreatic beta cells synthesize and secrete nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7784-8
217. Rosenbaum T, Sanchez-Soto MC, Hiriart (2001) Nerve Growth Factor increases insulin secretion and barium current in pancreatic beta cells; *Diabetes* 50: 1755-1762
218. Rosenberg L (1995) In vivo cell transformation: neogenesis of beta cells from pancreatic ductal cells. *Cell Transplant* 4: 371-83
219. Rosenberg L (1998) Induction of islet cell neogenesis in the adult pancreas: the partial duct obstruction model. *Microsc Res Tech* 43: 337-46
220. Roux PP, Barker PA (2002) Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Progress in Neurobiology* 67: 203-233

221. Salehi AH, Roux PP, Kubu CJ, Zeindler C, Bhakar A (2000) NRAGE, a novel MAGE protein, interacts with the p75 neurotrophin receptor and facilitates nerve growth factor-dependent apoptosis. *Neuron* 27:279-288
222. Sanchez-Soto MC, Larrieta ME, Vidaltamayo R, Hiriart M (1999) Heterogeneity in glutamic acid decarboxylase expression among single rat pancreatic beta cells. *Diabetologia* 42:1086-92
223. Sato T, Irie S, Kitada S, Reed JC (1995) Fap-1: a protein tyrosine phosphatase that associates with Fas. *Science* 268:411-415
224. Sayo Y, Hosokawa H, Imachi H et al (2000) Transforming growth factor beta induction of insulin gene expression is mediated by pancreatic and duodenal homeobox gene-1 in rat insulinoma cells. *Eur J Biochem* 267:971-978
225. Scaglia L, Cahill C, Finegood DT, Bonner-Weir S (1997) Apoptosis participates in the remodeling of the endocrine pancreas in the neonatal rat. *Endocrinology* 138:1736-1741
226. Scharfmann R (2003) Qu'est ce qu'un cellule souche pancréatique?. *Synthèse* 19: 695
227. Schatteman GC, Gibbs L, Lanahan AA, Claude P, Bothwell M (1988) Expression of NGF receptor in the developing and adult primate central nervous system. *J Neurosci* 8:860-873
228. Schmit F, Flamez D, De Vos A, Pipeleers D (2002) Glucose regulated gene expression maintaining the glucose-responsive state of beta cells *Diabetes* 51 (Suppl.3): S326-S332
229. Schuit FC, Huypens P, Heimberg H, Pipeleers DG (2001) Glucose sensing in pancreatic beta-cells: a model for the study of other glucose-regulated cells in gut, pancreas, and hypothalamus. *Diabetes* 50:1-11
230. Schuit FC, Flamez D, De Vos A, Pipeleers D (2002) Glucose-regulated gene expression maintaining the glucose-responsive state of beta cells *Diabetes* 51 (Suppl 3) : S326-332
231. Schwart PT, Perez-Villamil B, Rivera A, Moratalla R, Vallejo M (2000) Pancreatic homeodomain transcription factor IDX1/IPF1 expressed in developing brain regulates somatostatin gene transcription in embryonic neural cells. *J Bio Chem* 275:19106-19114
232. Segal RA, Greenberg ME (1996) Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Annu Rev Neurosci* 19:463-489

233. Seino S, Iwanaga T, Nagashima K, Miki T (2000) Diverse roles of K(ATP) channels learned from Kir6.2 genetically engineered mice. *Diabetes* 49:311-318
234. Seissler J, Nguyen TB, Aust G, Steinbrenner H, Scherbaum WA (2000) Regulation of the diabetes-associated autoantigen IA-2 in INS-1 pancreatic beta cells *Diabetes* 49:1137-1141
235. Sekine N, Cirulli V, Regazzi B, Brown LJ, Gine E, Marie S (1994) Low lactate dehydrogenase in pancreatic beta cells: potential role in nutrient sensing *J Biol Chem* 269:4895-4902
236. Serup P, Jensen J, Andersen FG et al. (1996) Induction of insulin and islet amyloid polypeptide production in pancreatic islet glucagonoma cells by insulin promoter factor 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 9015-9020
237. Shamovsky IL, Ross GM, Riopelle RJ, Weaver DF (1999) The interaction of neurotrophins with the p75NTR common neurotrophin receptor: a comprehensive molecular modeling study. *Protein Sci* 8:2223-2233
238. Shao Y, Akmentin W, Toledo-Aral JJ, Rosenbaum J, Valdez G (2002) Pincher, a pinocytic chaperone for nerve growth factor/TrkA signaling endosomes. *J Cell Biol* 157:679-691
239. Sharma S, Jhala US, Johnson T, Ferreri K, Leonard J, Montminy M (1997) Hormonal regulation of an islet specific enhancer in the pancreatic homeobox gene STF-1. *Mol Cell Biol* 17:2598-2604
240. Shaw M, Cohen P, Alessi DR (1997) Further evidence that the inhibition of glycogen synthase kinase-3 beta by IGF-1 is mediated by PDK1/PKB-induced phosphorylation of Ser-9 and not by dephosphorilation of Tyr-216. *FEBS Lett* 416:307-311
241. Shelley HJ, Neligan GA (1966) Neonatal hypoglycaemia *Br Med Bull* 22:34
242. Scheepers A, Joost HG, Schurmann A (2004) The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 28:364-71
243. Sheperd PR, Kahn BB (1999) Glucose transporters and insulin action: implications for insulin resistance and deabetes mellitus. *N Engl J Med* 341:248-257
244. Simpson IA, Cushman SW (1986) Hormonal regulation of mammalian glucose transport. *Annu Rev Biochem* 55:1059-1089
245. Slack JMW (1995) Developmental biology of the pancreas. *Development* 121:1569-1580

246. Smith CA, Farrah T, Goodwin RG (1994) The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins. *Cell* 76:959-962
247. Snider WD (1994) Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us. *Cell* 77:627-638
248. Sodoyez-Goffaux F, Sodoyez JC, Devos CJ (1979) Insulin secretion and metabolism during the perinatal period in the rat. Evidence for a placental role in fetal hyperinsulinemia *J Clin Invest* 63:1095-1102
249. Sorenson RL, Garry DG, Brelje TC (1991) Structural and functional considerations of GABA in islets of Langerhans. *Diabetes* 40:1365-1374.
250. Soria B, Skoudy A, Martin F (2001) From stem cells to beta cells: new strategies in cell therapy of diabetes mellitus. *Diabetologia* 44: 407-415
251. Srinivasan M, Aalinkeel R, Song F, Lee B, Laychock SG, Patel MS (2000) Adaptive changes in insulin secretion by islets from neonatal rats raised on a high carbohydrate formula. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279:E1347-E1357
252. Srinivasan M, Laychock SG, Hill DJ, Patel MS (2003) Neonatal nutrition: metabolic programming of pancreatic islets and obesity. *Exp Biol Med* 228: 15-23
253. Stephens RM, Loeb DM, Copeland TD, Pawson T, Greene LA, Kaplan DR (1994) Trk receptors use redundant signal transduction pathways involving SHC and PLCgamma 1 to mediate NGF responses. *Neuron* 12:691-705
254. Stoffers DA, Kieffer TJ, Hussain ME et al. (2000) Insulinotropic glucagon-like peptide 1 agonists stimulate expression of homeodomain protein IDX-1 and increase islet size in mouse pancreas. *Diabetes* 49:741-748
255. Straub SG, Sharp GW (2004) Hypothesis: one rate-limiting step controls the magnitude of both phases of glucose stimulated insulin secretion. *Am J Physiol Cell Physiol* 287: 565-571
256. Tan C, Tuch BE, Tu J, Brown A (2002) Role of NADH shuttles in glucose-induced insulin secretion from fetal beta cells *Diabetes* 51: 2989-2996
257. Thomas-Reetz AC, De Camilli P (1994) A role for synaptic vesicles in non-neuronal cells: clues from pancreatic beta cells and from chromaffin cells. *FASEB J* 8: 209-216.

258. Thomson TM, Rettig WJ, Chesa PG, Green SH, Mena AC, Old LJ (1988) Expression of human nerve growth factor receptor on cells derived from all three germ layer. *Exp Cell Res* 174:533-539
259. Thorens B (2003) A gene knockout approach in mice to identify glucose sensors controlling glucose homeostasis. *Pflugers Arch* 445:482-490
260. Thorens B, Wu YJ, Leahy JL, Weir GC (1992) The loss of GLUT-2 expression by glucose unresponsive beta cells of db/db mice is reversible and is induced by the diabetic environment. *J Clin Invest* 90:77-85
261. Tiedge M, Lenzen S (1993) Differential regulation of glucokinase and GLUT2 glucose transporter gene expression in pancreas and liver from neonatal and 16 day old rats *Bioch Mol Biol Inter* 29:161-166
262. Tresguerres JAF (1993) *Fisiología Humana*; 1a Edición McGraw-Hill- Interamericana; pp. 993- 1003
263. Treutelaar MK, Skidmore JM, Dias-Leme CL, Hara M, Zhang L, Simeone D, Martin DM, Burant CF (2003) Nestin-lineage cells contribute to the microvasculature but not endocrine cells of the islet. *Diabetes* 52: 2503-12
264. Tu J, Tuch BE (1996) Glucose regulates the maximal velocities of glucokinase and glucose utilization in the immature fetal rat pancreatic islet *Diabetes* 45:1068-75
265. Tuch BE, Zheng QL (1993) Chronic hyperglycaemia and the human fetal beta cell *Pancreas* 8:719-725
266. Uldry M, Ibberson M, Horisberger JD, Chatton JY, Riederer BM, Thorens B (2001) Identification of a mammalian H⁺-myo-inositol symporter expressed predominantly in the brain. *EMBO J* 20: 4467-4477
267. Uldry M, Ibberson M, Hosokawa M, Thornes B (2002) GLUT⁹ is a high affinity glucosamine transporter. *FEBS Lett* 524: 199-203
268. Unger RH, Orci L (1975) The essential role of glucagon in the pathogenesis of diabetes mellitus. *Lancet* 1:14-16
269. van Weeren PC, de Bruyn KM, de Vries-Smits AM, van Lint J, Burgering BM (1998) Essential role for protein kinase B (PKB) in insulin-induced glycogen synthase kinase 3 inactivation: characterization of dominant-negative mutant of PKB. *J Biol Chem* 273:13150-13156

270. Vidaltamayo R, Sanchez-Soto MC, Hiriart M (2002) Nerve growth factor increases sodium channel expression in pancreatic beta cells: implications for insulin secretion. *FASEB J* 16:891-892.
271. Vidaltamayo R, Sánchez-Soto MC, Rosenbaum T, Martínez-Merlos T, Hiriart M (1996) Neuron-like phenotypic changes in pancreatic beta cells induced by NGF, FGF, and dbcAMP. *Endocrine* 4:19-26
272. Waeber G, Thompson N, Nicod P, Bonny C (1996) Transcriptional activation of the GLUT2 gene by the IPF-1/ATF-1/IDX-1 homeobox factor. *Mol Endocrinol* 10:1327-1334
273. Wajant H, Henkler F, Scheurich P (2001) The TNF-receptor-associated factor family: scaffold molecules for cytokine receptors, kinases and their regulators. *Cell Signal* 13:389-400
274. Wallberg-Henriksson H, Zierath JR (2001) GLUT4: a key player regulating glucose homeostasis? insights from transgenic and knockout mice. *Mol Membr Biol* 18:205-211
275. Wang C, Kerckhofs K, Van de Castele M, Smolders I, Pipeleers D, Ling Z (2005) Glucose inhibits GABA release by pancreatic beta-cells through an increase in GABA shunt activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006 290:E494-9
276. Wang X, Cahill CM, Pineyro MA, Zhou J, Doyle ME, Egan JM (1999) Gucagon-like peptide-1 regulates the beta cell transcription factor, PDX-1, in insulinoma cells. *Endocrinology* 140:4904-4907
277. Watada H, Kajimoto Y, Umayahara Y et al. (1996) The human glucokinase gene beta-cell-type promoter: an essential role of insulin promoter factor 1/PDX-1 in its activation in HIT-T15 cells. *Diabetes* 45:1478-1488
278. Weinhaus AJ, Poronnik P, Cook DI, Tuch BE (1995) Insulin secretagogues, but not glucose, stimulate an increase in intracellular calcium concentration in the fetal rat beta cell *Diabetes* 44:118-124
279. Weissman IL (2000) Stem cells: units of development, units of regeneration and units of evolution. *Cell* 100: 157-68
280. Welsh M, Scherberg N, Gilmore R, Steiner DF (1986) Translational control of insulin biosynthesis: evidence for regulation of elongation, initiation and signal recognition particle mediated arrest by glucose *Biochem J* 235: 459-467.
281. Wiesmann C, Ultsch MH, Bass SH, de Vos AM (1999) Crystal structure of nerve growth factor in complex with the ligand-binding domain of the TrkA receptor. *Nature* 401: 184-188

282. Williams PL, Warwick, Dyson M, Bannister LH (1989) *Gray's Anatomy*. Ed. Churchill Livingstone, Londres.
283. Wood S, Trayhurn P (2003) Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br J Nutr* 89:3-9
284. Wooten MW, Seibenhener ML, Mamidipudi V, Diaz-Meco MT, Barker PA, Moscat J (2001) The atypical protein kinase C-interacting protein p62 is a scaffold for NF-kappaB activation by nerve growth factor. *J Biol Chem* 276:7709-7712
285. Wu KL, Gannon M, Peshavaria M et al. (1997) Hepatocyte nuclear factor 3beta is involved in pancreatic beta cell specific expression of the PDX1 gene. *Mol. Cell Biol* 17:6002-6013
286. Wu X, Freeze HH (2002) GLUT14, a duplicate of GLUT3, is specifically expressed in testis as alternative splice forms. *Genomics* 80:553-557
287. Xing J, Ginty DD, Greenberg ME (1996) Coupling of the Ras-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science* 273:959-963
288. Yaar M, Zhai S, Pilch PF, Doyle SM, Eisenhauer PB, Fine RE, Glichrest BA (1997) Binding of beta-amyloid to the p75 neurotrophin receptor induces apoptosis: a possible mechanism for Alzheimer's disease. *J Clin Invest* 100:2333-2340
289. Yajnik CS (2004) Early life origins of insulin resistance and type 2 diabetes in India and other Asian countries. *J Nutr* 134:205-210
290. Yamashita H, Takenoshita M, Sakurai M, Bruick RK, Henzel WJ, Shillinglaw W, Arnot D, Uyeda K (2001) A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 9116-9121
291. Yamashita T, Tucker KL, Barde YA (1999) Neurotrophin binding to the p75 receptor modulates Rho activity and axonal outgrowth. *Neuron* 24:585-593
292. Yan H, Chao MV (1991) Disruption of cysteine-rich repeats of the p75 nerve growth factor receptor leads to loss of ligand binding. *J Biol Chem* 266:12099-12104
293. Ye X, Mehlen P, Rabizadeh S, VanArsdale T, Zhang H, Shin H, Wang JJ, Leo E, Zapata J, Hauser CA; Reed JC, Bredesen DE (1999) TRAF family proteins interact with the common neurotrophin receptor and modulate apoptosis induction. *J Biol Chem* 274:30202-30208

294. Yoon JW, Yoon CS, Lim HW, Huang QQ, Kang Y, Pyun KH, Hirasawa K, Sherwin RS, Jun HS (1999) Control of autoimmune diabetes in NOD mice by GAD expression or suppression in beta cells. *Science* 284:1183-1187.
295. Yoshinari M, Daikoku S (1982) Ontogenic appearance of immunoreactive endocrine cells in rat pancreatic islets *Anat Embryol* 165:63
296. Zulewski H, Abraham EJ, Gerlach MJ et al. (2001) Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes* 50: 521-33