

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

**“EL FACTOR DE CRECIMIENTO NEURONAL (NGF) EN
LAS CÉLULAS β PANCREÁTICAS DE RATA EN
DESARROLLO Y SU POSIBLE PARTICIPACIÓN EN LA
INERVACIÓN DEL ISLOTE PANCREÁTICO”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

M EN C. SIRAAM RAMIRO CABRERA VÁSQUEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARCIA HIRIART URDANIVIA

MÉXICO, D. F

NOV 2009



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.

Esta tesis fue dirigida por la
Dra. Marcia Hiriart Urdanivia
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

con la co-tutoría de:

Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Dr. Iván Velasco Velázquez
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

El trabajo fue realizado gracias al patrocinio de:

Posgrado en Ciencias Biomédicas, UNAM

Instituto de Fisiología Celular

Consejo Nacional de la Ciencia y la Tecnología (CONACYT)

Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (DGAPA)

Dirección General de Estudios de Posgrado, UNAM (DGEP)

PROMEP – SEP, Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Marcia Hiriart, por su gran capacidad como científica mexicana y por haberme dirigido exitosamente en este largo, pero hermoso camino hacia la ciencia. Además, por haber confiado en mí, por su gran ayuda en momentos difíciles de mi vida académica y persona, y por las múltiples tardes de compañía en el laboratorio BL102. También por las apreciadas y prósperas colaboraciones futuras.

Al Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina, por sus sabios consejos, su ayuda en mi formación como científico y su amistad.

Al Dr. Iván Velasco Velazquez, por sus acertadas sugerencias, su paciencia en cada uno de mis tutorales y por su apoyo científico.

A mis sinodales: Dra. María Eugenia Mendoza Garrido, del CINVESTAV; Dra. María Luisa Fanjul Peña de Moles, de la Facultad de Ciencias, Dr. Miguel Ángel Morales Mendoza, del Instituto de Investigaciones Biomédicas y al Dr. Guillermo Robles Díaz, de la Facultad de Medicina; estos últimos 3 pertenecientes a la UNAM; por su excelentes críticas y sugerencias para el mejoramiento de la calidad de esta tesis.

A la Dra. Teresa Tusié Luna, por haberme enseñado la puerta de entrada al enriquecedor y fascinante mundo científico. También por los conocimientos en el área de Genética molecular obtenido en su laboratorio.

Al Dr. Antonio Velazquez González, por haber participado y haber sido uno de los principales ejes de mi formación académica. Además, por su apoyo moral y su amistad

A la Dra. Irma Espinosa Poblano, por su gran paciencia y su apoyo en cada una de mis actividades académicas y laborales.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Julio Granados Arriola, por su gran necesidad de que la ciencia sea divertida, ilustrativa y amena. Gracias por haber confiado en mí, tenga la seguridad que no lo defraudaré.

Al Dr. Gregorio Obrador Vera, por darme la oportunidad para poner en práctica mis destrezas académicas y científicas. También por entender mis necesidad de enseñar lo que he aprendido a las generaciones futuras.

A la Dra. Marisol Sandoval Ríos, por haber estado conmigo en momentos muy difíciles de mi vida académica y personal, pero sobre todo por ser mi mejor amiga y por las largas horas de charlas exquisitas y con mucha diversidad.

A la Dra. Araceli Patrón Soberano, Gabriel Orozco Hoyuela y Rodolfo Paredes por su gran apoyo en la Unidad de Microscopía del IFC, UNAM.

A Ana María Escalante, Adrián Aguilera y Francisco Pérez-Eugenio por su ayuda en todo lo relacionado al trabajo de informática y sobre todo por su apoyo en mi examen de Candidatura, realizado por videoconferencia.

A la Dra. Claudia Rivera-Cerecedo y al Dr. Héctor Malagón, ya que sin su ayuda en el aporte de animales, este trabajo no hubiera podido realizarse con la calidad con la que se realizó.

A los técnicos académicos: Diana Millán, Alejandra Álvarez-Tinoco, Dagoberto Tapia y Carmen Sánchez-Soto, por su valiosa colaboración en el desarrollo de cada uno de los experimentos que se llevaron a cabo en este estudio. Además al técnico en laboratorio Félix Sierra y a los histotecnólogos: Federico Jandete y Teresa Cortés Flores por su ayuda en la preparación de los excelentes cortes histológicos.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Lourdes Massieu Trigo y Sara Noguera Solano, por su gran apoyo en todo lo relacionado a los trámites requeridos para mi formación académica, pero sobre todo por su valiosa amistad.

Al M en C. Carlos Manlio Díaz García, por su gran amistad y por sus apoyo y comentarios científicos a esta tesis, pero sobre todo por sus excelentes, amenas y diversas charlas.

A Andrew Almazán, por haber contribuido en la creación de la figura No 2, la cual nos quedo muy linda.

Al personal del servicio de Medicina Transfusional; Enfermeras: Nelly Tirado-Cárdenas, Josefa López Salmorán, Josefina Borjas Mejía, Paula Peñaloza Ramírez, Lidia Méndez Campos. QFB: Vianey Hernández Salinas, Venancio Ortega Velázquez y José Alonso Ramírez Jiménez. Técnicos en laboratorio: Juan Germán Portela Vázquez, Amada Alonso Ramos, Gabriela Cedillo Rivera. Por último a la Lic. en Trabajo Social Paula López Carbajal, a la laboratorista Patricia Mora Pérez, a la secretaria Alejandra Hernández González y a los buenos amigos Jesús Garcés Jiménez y Alejandro Valdés Camarillo. A todos ellos por su gran apoyo laboral y moral, pero sobre todo por ser grandes compañeros y amigos.

A mi querida amiga Selda Gezginci-Oktayoglu, a Álvaro Caso-Chávez y a la Dra. Rocío Aguilar-Chongtay por sus excelentes críticas y su gran apoyo en la discusión y escritura del artículo referido en: BMC Developmental Biology, 2009, 9:34)

A mis compañeros de laboratorio: Víctor Navarro-Tableros, Cristina Aguayo-Mazzucato, Paz Vital, Elena Larrieta, Elvira del Carmen Arellanes Licea, Ricardo Cruz, Carlos Alfonso Larqué Velázquez, Myrian Velasco Torres, Martha Eugenia Ramírez Domínguez, Alondra Alvarado y María Infante.

DEDICATORIA

A **Dafne, Emiliano** y a **Araceli**. Mil gracias por haber permitido ser parte de ustedes. Recuerden que los quiero y respeto muchísimo. Cada uno de los pasos que doy, lo hago pensando en ustedes, para que puedan ver un camino lleno de esperanzas, alegría, confianza y respeto. Mi mayor necesidad es su propio desarrollo intelectual.

A mis padres **Margarita** y a **Abel**. Gracias por haberme dado la vida y lo necesario para llegar a la finalización de este grado académico. Sé que siempre he estado presente en sus actos y pensamientos. Mismos que me han servido de combustible para levantarme cada día y para seguir estudiando y trabajando.

A mis **hermanos**: Néstor, Luis, Margarita, Angelita, Norma, Abel y Yadira, con lo que siempre he contado. Los adoro, admiro y respeto.

A mis **amigos**, los cuales me han ofrecido su cariño sincero y apoyo en cada segundo de mi mundana existencia. Especialmente para la Sra. Araceli Santillán Almáraz.

“La educación empieza con la vida, y no acaba sino con la muerte”
José Martí

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	6
ABSTRACT	8
INTRODUCCIÓN	10
A) Morfología y fisiología del páncreas endocrino	10
A.1) Secreción de insulina por las células β	12
A.1.1) Mecanismos neurales que inducen la secreción de insulina	12
A.1.2) Mecanismos metabólicos que inducen la secreción de insulina	13
B) El factor de crecimiento neuronal (NGF)	17
B.1) Generalidades del NGF	17
B.2) El papel neurotrópico del NGF	18
B.3) El papel angiogénico del NGF	19
B.4) Estructura genética y bioquímica del NGF	21
B.5) Biosíntesis y secreción del NGF	24
B.6) Las neurotrofinas (NTs)	29
B.6.1) Las Nts y su señalización a través de receptores Trks y p75	29
B.6.2) Señales intracelulares inducidas por los receptores Trks	30
B.6.3) Señales intracelulares inducidas por p75	31
B.7) Papel de las NTs en el páncreas	35
B.7.1) El NGF en el desarrollo del páncreas	35
B.7.2) El NGF en la función de la célula β pancreática	36

B.8) El BDNF en la función de células insulares	39
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	42
HIPÓTESIS	42
OBJETIVO GENERAL	42
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
METODOLOGÍA	44
A.1) Reactivos	44
A.2) Animales y obtención de los páncreas	44
A.3) Cultivo de las células insulares de rata	45
A.4) Cortes por congelación del tejido pancreático	46
A.5) Inmunofluorescencia de células aisladas y de cortes de tejido pancreático	47
A.6) Análisis cuantitativo de la inervación simpática del islote	48
A.7) Determinación de los niveles de RNAm de NGF	49
A.8) Análisis semicuantitativo de la inmunofluorescencia para pro NGF	50
A.9) Ensayo de unión a lectina	50
A.10) Estudios de secreción de NGF	51
A.11) Estadística	52

RESULTADOS	54
A.1) La arquitectura de los islotes pancreáticos es modificada progresivamente durante la ontogenia	54
A.2) La innervación simpática de los islotes es sujeta a intensa remodelación durante la ontogenia	54
A.3) Las células α y β sintetizan NGF a través de la ontogenia	55
A.4) Las células insulares secretan NGF desde etapas tempranas del desarrollo	59
A.5) Las células endoteliales de los vasos sanguíneos expresan proNGF durante un periodo delimitado	59
A.6) Los vasos sanguíneos y las fibras simpáticas expresan el receptor TrkA	60
A.7) Análisis de la innervación simpática en los islotes de ratones transgénicos TH-EGFP	62
DISCUSIÓN	66
CONCLUSIONES	72
REFERENCIAS	74

ANEXOS

1) Cabrera-Vásquez S. "El control neurotrófico en el desarrollo y función de dos órganos endocrinos: El ovario y el páncreas". Rev Invest Clin. 2007 May-Jun;59(3):219-28. Revisión en español.

2). Agreda-Vásquez GP, Espinosa-Poblano I, Sánchez-Guerrero SA, Crespo-Solís E, Cabrera-Vásquez S, López-Salmerón J, Barajas J, Peñaloza-Ramírez P, Tirado-Cárdenas N, Velázquez A. Starch and albumin mixture as replacement fluid in therapeutic plasma exchange is safe and effective. J Clin Apher. 2008;23(5):163-7.

3) Cabrera Vásquez S, Víctor Navarro-Tableros, Ma. Carmen-Soto Gutiérrez-Ospina G and Marcia Hiriart. "Remodeling sympathetic innervation in rat pancreatic islets ontogeny". BMC Developmental Biology, 2009, Jun 17; 9:34

Lisa de abreviaciones

NGF, nerve growth factor

F19, Día fetal número 19

P0, Día postnatal 0 ó etapa neonatal

P20, Día posnatal 20

P28, Día posnatal 28

TH, Hidroxilasa de tirosina

GFP, green fluorescent protein

GLUT-2, Glucose transporter-2

VDCC, voltage-dependent calcium channels

NTs, neurotrofinas

BDNF, brain derived neutorphin factor

NT3, neurotrophin 3

NT 4/5, neurotrophin 4/5

VEGF, vascular endothelial growth factor

TrkA, tyrosine kinase A receptor

p75, Low affinity nerve growth factor receptor

RE, reticulo endoplásmico

RESUMEN

Después del nacimiento, los islotes pancreáticos de rata aún no han terminado su desarrollo morfológico y funcional. Es hasta el día posnatal 28 (P28) cuando la morfología de los islotes ya es muy parecida a la de la etapa adulta. Además, para este día, la célula β ya muestra una respuesta secretora de insulina al estímulo con glucosa alta (15.6 mM). Esta respuesta es requerida para la homeostasis de la glucosa del animal.

Algunas estructuras de importancia en la arquitectura y función del islote son los vasos sanguíneos y las fibras del sistema nervioso autónomo. Sin embargo; los eventos ontogénicos que ocurren y los factores tróficos que participan en el desarrollo de la vasculatura e inervación simpática del islote no están bien conocidos aún. Se ha sugerido que el factor de crecimiento neuronal (NGF), participa en la morfogénesis del islote, además de tener un papel como factor neurotrópico y angiogénico en diferentes órganos y / o sistemas.

Los islotes de un ratón transgénico para NGF específicamente en las células β pancreáticas, muestran una hiperinervación con fibras simpáticas. En nuestro laboratorio, hemos demostrado que las células β adultas sintetizan y secretan NGF. Sin embargo, no conocíamos si esta secreción es desde la etapa fetal y si el NGF participa en la morfogénesis y el desarrollo de la inervación simpática y vasculatura del islote.

En este trabajo, analizamos el desarrollo de la vasculatura y la inervación simpática del islote de rata y correlacionamos estos eventos con la secreción de NGF durante la ontogenia. Observamos que los vasos sanguíneos ingresan a los islotes en el periodo fetal, aparentemente seguido de las fibras simpáticas. La mayor cantidad de fibras simpáticas la observamos en el día 20 posnatal (P20) y en la periferia de los islotes. Posteriormente, en la etapa adulta, la inervación en esta área disminuye y se distribuye en el área de células β .

Las células insulares sintetizan y secretan NGF en mayor cantidad en las etapas fetal y neonatal que en la etapa adulta. Estas células insulares, las fibras simpáticas y los vasos sanguíneos; expresan el TrkA durante la todas las etapas estudiadas, lo que sugiere que responden a las señales del NGF. Estas últimas estructuras expresan NGF solo en las etapas tempranas del desarrollo.

Para reforzar nuestros hallazgos, analizamos el desarrollo de la inervación simpática en los islotes de un ratón transgénico TH-GFP, el cual expresa la proteína verde fluorescente (GFP, green fluorescent protein) bajo el control del gen de TH. La inervación en este ratón ingresa al islote en el periodo posnatal, semejante a lo ocurrido en la rata.

Lo anterior sugiere que el NGF puede participar en la guía de los vasos sanguíneos y la inervación simpática hacia el islote durante las etapas tempranas, así como en su desarrollo y mantenimiento en etapas tardías.

ABSTRACT

After birth (early postnatal stage), pancreatic islets have not finished yet its morphological and physiological development. Until, 28 postnatal day (P28) the morphology of islets acquires a similar pattern respect to adulthood. Also, at that time, β cells are capable to enhance its insulin secretion when they exposed to high glucose (15.6 mM glucose). This response is important to a successful glucose homeostasis in animals.

The blood vessels and the fibers of the nervous autonomous system play an essential role in the architecture and function of pancreatic islets. Nevertheless, the ontogenic events and the trophic factors mediating the development of vasculature and sympathetic innervation are not well understood so far. It has been suggested that the nerve growth factor (NGF) participates in islet morphogenesis, and it has a role as neurotrophic and angiogenic factor in different organs and systems.

Islets from a transgenic mouse which overexpressed NGF in β cells, show an hyperinnervation of sympathetic fibers. We have previously shown that adult pancreatic β cells produce and secrete NGF. Nevertheless, we did not know if that secretion begins since the later fetal stage and neither if NGF is involved in morphogenesis and development of islet vasculature and sympathetic innervation.

In this work, we analyzed the development of vasculature and the sympathetic innervation from islet rat and we correlated these events with NGF secretion during the ontogeny. We observed that vasculature is formed first in the fetal period, followed by the innervation of sympathetic fibers and finally, by the islet capsule. The higher number synaptic fibers are observed at 20 postnatal day and in the periphery of islets. Finally, during the adulthood, the innervation in this area are diminished and distributed among β cell area.

Islets cells synthesized and secrete higher amounts NGF in the fetal and early postnatal period. Moreover; at all stages studied, those cells and also the sympathetic fibers and blood vessels express TrkA receptor, which suggest the ability to respond to NGF signals. These last structures were NGF-immunoreactive only at early stages (fetal and early postnatal stages).

To reinforce our findings, we analyzed the development of sympathetic innervations in pancreatic islets from transgenic mice TH-GFP, which expresses the GFP under the control TH gene. The innervations in these mice arrived to the postnatal period, similar to what happened in rats.

In conclusion, these morphological and functional data suggest that NGF could participate in the guide of blood vessels and of sympathetic innervation to the islet during the early stages, and thus, contributing to its development and maintenance in late stages.

INTRODUCCIÓN

A) Morfología y fisiología del páncreas endocrino

El páncreas es una glándula mixta que está conformada por un componente exocrino y uno endocrino. El componente exocrino está compuesto por las células acinares y las células de los conductos pancreáticos, en cambio el endocrino está formado por los islotes pancreáticos.

Los islotes son acúmulos de diferentes tipos de células endocrinas dentro de las que destacan las células α , que secretan glucagon; las β , insulina; las δ , somatostatina y la PP, polipéptido pancreático (Fig. 1). Estas células vierten su secreción al torrente sanguíneo y participan en diversas funciones fisiológicas, como es la homeostasis de la glucosa. En el páncreas adulto, los islotes pancreáticos están separados del tejido exocrino por una cápsula de colágena tipo IV (Fig. 1). Previo a este estudio, se desconocía cómo se desarrolla esta cápsula del islote de la rata.

Los islotes pancreáticos varían considerablemente en tamaño (50 a 500 μm de diámetro) y en el número de células que los componen. Además, las células insulares en los roedores están organizadas espacialmente en el islote, las células β se distribuyen en la parte central del islote y constituyen del 60 a 80 % de la población, mientras que las células α , las δ y las PP se distribuyen en la periferia y forman del 15 a 20 %, del 5 a 10 % y el 2%, respectivamente (Edlund, 2002; Orci y Unger, 1975) (Fig. 1).

El islote pancreático adulto está ampliamente vascularizado y recibe fibras nerviosas del sistema nervioso autónomo (Fig. 1). En general, el páncreas es irrigado por la arteria celíaca en su parte dorsal y por la arteria mesentérica superior en su parte ventral. También recibe ramas de la arteria celíaca a través de la arteria pancreaticoduodenal y esplénica, al igual que pequeñas ramas de la arteria hepática.

El drenaje venoso lo llevan a cabo las venas esplénica y mesentérica. Las arteriolas aferentes se ramifican en el islote en una red de capilares fenestrados. En la rata, estos capilares son drenados por capilares eferentes que corren a través del manto del islote. El flujo sanguíneo de la parte central del islote, se bifurca en los capilares y regresa a la periferia del islote (Bonner-Weir y Orci, 1982). Se ha demostrado que en el páncreas existen 3 tipos de arteriolas: las arteriolas insulares, las arteriolas acinares y las arteriolas de los conductos. Esta red capilar de los islotes y tejido acinar forman un sistema vascular llamado porto-acino-insular (Ohtani y Wang, 1997).

El sistema nervioso autónomo (SNA) del páncreas, se divide en sus componentes parasimpático y simpático que participan en la regulación de la secreción de las diversas hormonas secretadas por las células insulares. La inervación parasimpática del páncreas está a cargo de las ramas preganglionares del nervio vago (Salvioli y cols., 2002). Las fibras vagales hacen sinapsis con las neuronas colinérgicas que se encuentran en el interior del páncreas y que inervan tanto a las células acinares como a los islotes. Estas fibras se originan de neuronas preganglionares de la sustancia gris del

tallo cerebral y los tres segmentos medios de la medula sacra. Abandonan estas estructuras por los nervios craneales III, VII, IX y X y por los nervios raquídeos S2 y S3 y ocasionalmente por S1 y S4.

Por otro lado, la inervación simpática se origina de somas neuronales en el hipotálamo que dan origen a fibras que salen de la medula espinal en las raíces anteriores. Atraviesan los nervios esplácnicos que están compuestos por fibras preganglionares y alcanzan los ganglios, celiaco o paravertebrales. Las fibras posganglionares entran al páncreas acompañando a los vasos. Sin embargo, existen fibras preganglionares que pueden entrar directamente al páncreas (Ahrén B, 2000).

A.1) Secreción de insulina por la célula β pancreática

A.1.1) Mecanismos neurales que inducen la secreción de insulina

El SNA es muy importante en la función del islote y participa en la secreción de insulina secundaria a estímulos de origen neural. Las fibras nerviosas parasimpáticas liberan acetilcolina, neurotransmisor que estimula la secreción de insulina por la célula β pancreática. Mientras que las fibras nerviosas simpáticas secretan noradrenalina, neurotransmisor que la inhibe y a su vez estimula la secreción de glucagon por la célula α (Ahrén R, 2000; Ahrén, 2006).

La acetilcolina, se une a sus receptores muscarínicos (M1 y M3) en las células β . Estos receptores tiene acoplada una proteína $G\alpha_q$, y estimulan la secreción de la insulina al generar diacilglicerol (DG) e inositol trifosfato (IP3) (fig. 2). Además, este mismo estímulo parasimpático incrementa la secreción de otras hormonas como el glucagon, la somatostatina y el PP. La concentración plasmática de esta última hormona, se toma como un indicador indirecto de la actividad parasimpática pancreática. (B. Ahrén 2000).

Por su parte, la NA puede unirse a dos tipos de receptores el α_2 y el β_2 . Dependiendo de la cantidad de receptores que se expresen en su membrana de la célula β , esta amina puede tener un efecto inhibitor o excitador. Si hay mayor cantidad de receptores α_2 , el efecto es la inhibición de la secreción de insulina y si hay más β_2 es la estimulación de la secreción (Ahrén 2000). Ambos receptores pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G. La respuesta de inhibición o estímulo de la secreción obedece a la unión a una proteína G inhibitor (Gi) o excitadora (Ge) de la señal que, a su vez inhibe o estimula a la adenilato ciclasa (AC) (fig 2).

A.1.2) Mecanismos metabólicos que inducen la secreción de insulina

Una de las principales funciones del páncreas endocrino, es la secreción de la insulina por las células β después del incremento en las concentraciones de glucosa sanguínea. Esta secreción se lleva a cabo de la siguiente manera: La glucosa se incorpora a estas células β a través del transportador GLUT-2, es fosforilada por la glucocinasa y convertida en glucosa 6-fosfato.

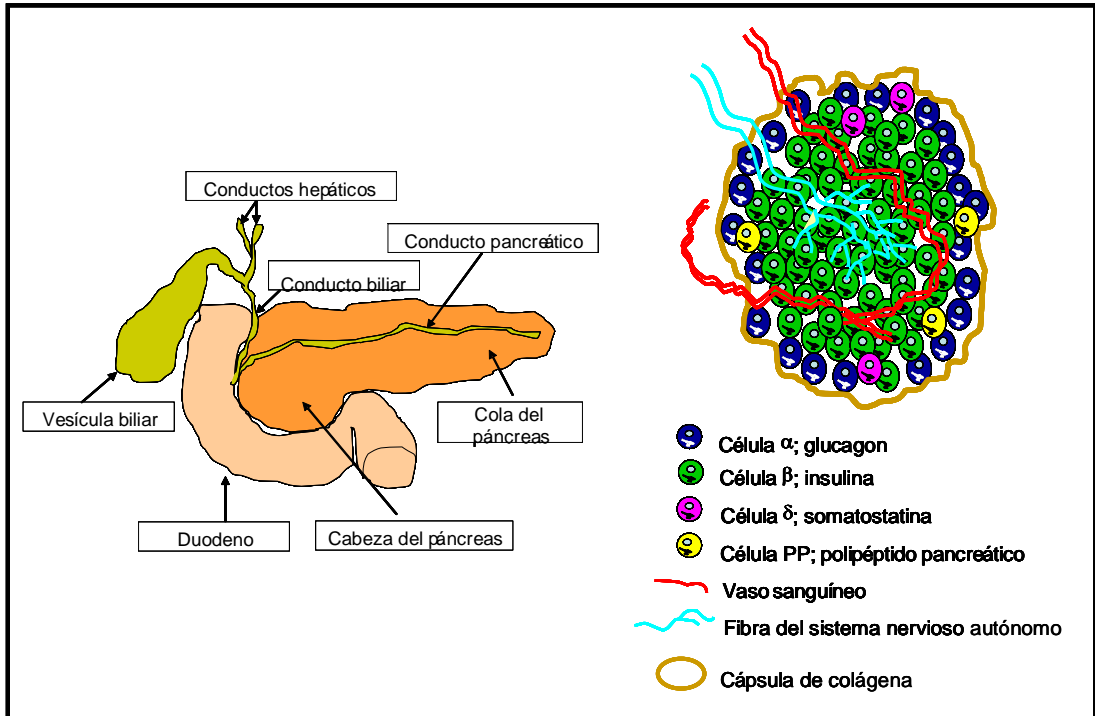


Figura 1. Componentes del páncreas adulto. Histológicamente, el páncreas está constituido por tejido exocrino y endocrino. La porción exocrina incluye a las células de los conductos y a las células acinares. Mientras que la porción endocrina está formada por los islotes pancreáticos, estructuras formadas principalmente por células α productoras de glucagon, β productoras de insulina, δ productoras de somatostatina y PP productoras de polipéptido pancreático. Los islotes son ampliamente irrigados y reciben inervación del sistema nervioso autónomo: fibras simpáticas y parasimpáticas (ver introducción). Además, presentan una cápsula de colágena que los separa del tejido exocrino.

Este último compuesto da inicio a la vía glucolítica. El resultado de esta vía es el incremento en la relación ATP / ADP y el cierre de los canales de K^+ dependientes de ATP (adensin trifosfato) (K_{ATP}), que son los responsables del potencial de membrana de la célula β (-60 mV en condiciones de glucosa basal).

El cierre de los canales K_{ATP} induce que una corriente fundamentalmente de Na^+ ingrese a través de los canales TRP, cuya contribución al potencial de membrana en reposo se encuentra contrarestanda por los canales K_{ATP} en condiciones de glucosa baja. Ambos eventos despolarizan la membrana de la célula β a un nivel que incrementa la probabilidad de apertura de los canales de Ca^{2+} tipo T dependientes de voltaje (alrededor de -40 mV) y los canales de Na^+ . Estos iones ingresan a la célula para reforzar la despolarización celular e inducir la apertura de los canales de Ca^{2+} tipo L y de otros canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VDCC, voltage-dependent calcium channels).

El incremento en la concentración de calcio intracelular dispara la exocitosis de los gránulos de insulina. Por último, los canales de K^+ son necesarios para la repolarización del potencial de acción de la célula β (Hiriart y Aguilar, 2008) (Fig. 2).

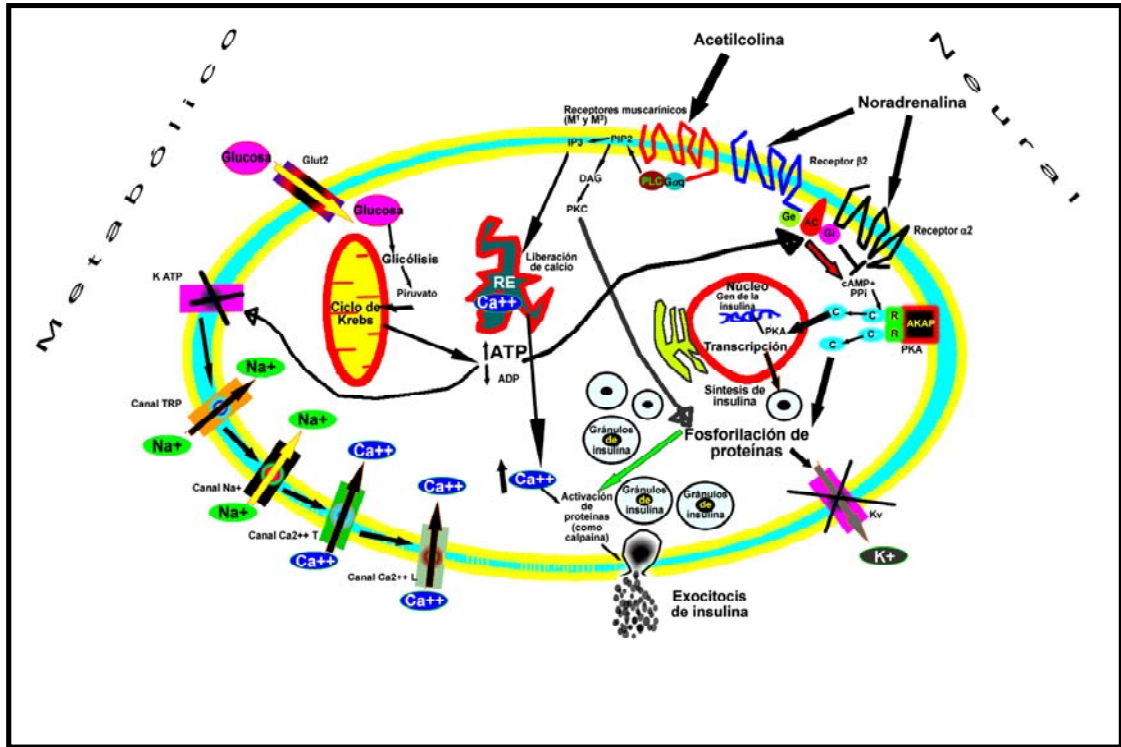


Figura 2. Mecanismos de la secreción de insulina por las células β . La célula β inicia la despolarización de la membrana, una vez la glucosa ha ingresado a esta e incrementa la relación ATP / ADP. Por su parte los neurotransmisores inducen la secreción de la insulina mediante diferentes mecanismos. Todos estos mecanismos, se comentan en el texto. Modificado de Hiriar M y Aguilar-Bryan L: Am J Physiol Endocrinol Metab 2008, 295(6):E1298-1306.

Durante las etapas tempranas del desarrollo de la rata, los mecanismos que regulan la secreción de la insulina estimulada por altas concentraciones de glucosa, así como otras funciones de los islotes y su morfología, son inmaduros. Además, los factores que controlan la morfogénesis, el desarrollo de la función, de la vasculatura y de la inervación simpática; así como el mantenimiento en el islote también han sido poco estudiados.

Se ha descrito que en algunos de estos eventos morfológicos y fisiológicos del islote, participa el factor de crecimiento neuronal (nerve growth factor; NGF). Incluso se ha sugerido que participa en el desarrollo de la inervación simpática del islote. Sin embargo, los datos que lo sugieren son escasos y se han observado en estudios no fisiológicos. Discutiremos los efectos del NGF en otros tejidos y después su participación en el desarrollo y la fisiología del páncreas.

B) EL FACTOR DE CRECIMIENTO NEURONAL (NGF)

B.1) GENERALIDADES DEL NGF

La hipótesis del factor neurotrófico postula que el desarrollo de la inervación es dependiente de factores tróficos producidos por el órgano blanco (Purves y cols., 1988). El NGF es un factor neurotrófico que juega un papel importante en el desarrollo y sobrevivencia de neuronas simpáticas y sensoriales y pertenece a la familia de la neurotrofinas (NTs) (Levi-Montalcini, 1987; Cowan, 2001). En esta familia los que más se han estudiado son cuatro miembros: El NGF, el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la neurotrofina 3 (NT3) y la

neurotrofina 4/5 (NT 4/5) (Bibel y Barde, 2000). Estos cuatro factores son derivados de un gen ancestral común y son similares en secuencia y estructura.

El NGF fue la primera neurotrofina caracterizada; descubierta por Rita Levi-Montalcini, Victor Hamburger y de Elmer Bueker (Aloe, 2004). Quienes describieron que los sarcomas de ratón implantados en embriones de pollo producían una molécula que inducía un aumento notorio de dendritas en sus ganglios simpáticos y sensoriales. Posteriormente, los primeros 2 autores junto con Stanley Cohen, purificaron el NGF en este tipo de sarcomas, en el veneno de víbora y en la glándula maxilar del ratón (Aloe, 2004). Este hallazgo y otros le valieron a Levi-Montalcini el premio Nobel de Medicina en 1986 que compartió con Stanley Cohen.

B.2) El papel neurotrófico del NGF

Las NTs juegan un papel importante en el desarrollo y la función del sistema nervioso (Tucker, 2001). El principal miembro de esta familia, es el NGF; que participa en el desarrollo, la sobrevivencia y la función de las neuronas simpáticas (Levi-Montalcini, 1987; Fariñas, 1999). Ratones tratados con anticuerpos anti-NGF o ratones knockout (KO) para NGF o su receptor TrkA presentan una pérdida dramática de neuronas simpáticas (Levi-Montalcini y Booker, 1960; Crowley y cols., 1994; Smeyne, 1994). Además, el NGF promueve el crecimiento de los axones de las neuronas simpáticas *in vitro* (Cohen y cols., 1954, Glebova y Ginty, 2005) e *in vivo* (Glebova y Ginty, 2004).

A la función del NGF en el crecimiento de los axones de las neuronas, la guía hacia sus órganos blanco y la arborización de las dendritas, la formación, la plasticidad sináptica y el aumento en la sobrevivencia neuronal se le denomina acción neurotrófica. El NGF también ejerce acciones en el desarrollo y la función de órganos no neuronales como el corazón, el sistema inmunológico (Clegg y cols., 1989; Coppola y cols., 2004; Reichardt, 2006), y algunos órganos endocrinos como el ovario (Dissen y cols., 2002), el testículo (Muller y cols., 2006) y el páncreas (Kanaka y cols., 1995a; Rosenbaum y cols., 1998).

Las acciones del NGF cumplen con el postulado de la hipótesis de factor neurotrófico descrita anteriormente, pues ésta hipótesis menciona que los blancos de inervación secretan cantidades limitadas de neurotrofinas que guían su inervación y establecen un balance entre el tamaño del blanco y el número de neuronas que lo inervan (Purves D, 1998) (Fig. 3).

B.3) El papel angiogénico del NGF

Las fibras nerviosas simpáticas son guiadas por factores de crecimiento tales como el NGF (Creedon y Tuttle, 1997) y la artemina, la cual es sintetizada por las células de músculo liso de los vasos sanguíneos (Honma y cols., 2002; Damon y cols., 2007). Además, se ha descrito que los vasos sanguíneos son guiados hacia el órgano que van a irrigar por el factor de crecimiento endotelial (vascular endothelial growth factor; VEGF), un poderoso inductor de angiogénesis (generación de nuevos vasos sanguíneos). Sin embargo; recientemente se ha descrito que el NGF, el cual clásicamente tiene un papel

neurotrófico en el sistema nervioso simpático y sensorial, también tiene un papel angiogénico (Nico y cols., 2008).

Durante el desarrollo embrionario y fetal se ha observado una interdependencia de los sistemas neuronal y vascular (Weinstein, 2005). Clásicamente se ha descrito que el desarrollo de los vasos sanguíneos guía el desarrollo de la inervación autónoma. Por ejemplo; la migración de las fibras simpáticas y sensoriales ocurre a lo largo de vasos ya formados, como es la aorta (Reissmann y cols., 1996). Así mismo, se ha sugerido que el sistema nervioso autónomo participa en el desarrollo del sistema cardiovascular, lo que establece una participación bidireccional entre el desarrollo del sistema nervioso autónomo y el del sistema vascular.

Algunas mutaciones que alteran el desarrollo de neuronas sensoriales o células de Schwann previenen la arteriogénesis. Ratones KO para neurogenina1 / neurogenina 2 (deficientes de neuronas sensoriales) y *phox2b* deficientes de nervios autónomos periféricos, resultan en una desorganización neuronal y desorganización vascular (Mukoyama y cols., 2002).

Se ha demostrado que el NGF induce *in vitro* proliferación de células endoteliales de la microvasculatura de la vena umbilical (Cantarella y cols, 2002), de células endoteliales cerebrales inmortalizadas (Moser y cols., 2004), de la coroides (Steinle y Granger, 2003) y de la microvasculatura de la dermis (Raychaudhuri y cols., 2001). Además; se ha observado que el incremento en los niveles ováricos de NGF después de una denervación del nervio ovárico

superior en ratas prepúberes, eleva los niveles de la biosíntesis de VEGF y la vascularización ovárica (Julio-Pieper y cols., 2006). Esto sugiere que, NGF podría incrementar biosíntesis de VEGF y este inducir la angiogénesis ovárica.

Sin embargo; existen trabajos que demuestran que este efecto angiogénico del NGF es *per se* por la unión de este factor a su receptor TrkA, sin que la biosíntesis del VEGF tenga participación. Se ha observado que el NGF induce la migración de células endoteliales de aorta humana vía la activación de TrkA (Dollé y col., 2005) (Fig. 4). Estos datos establecen una controversia sobre si el efecto angiogénico del NGF se debe a solo uno de estos dos mecanismos o a ambos.

B.4) Estructura bioquímica y genética del NGF

El NGF puede ser aislado en dos distintas formas, el primero es el NGF 7S (coeficiente de sedimentación 7.1 S). Este NGF 7S es un complejo de alto peso molecular y contiene dos copias de cada una de las diferentes cadenas polipeptídicas (subunidades); α , β , y γ (Varon y cols., 1967) . La segunda forma del NGF corresponde a la subunidad β , conocida por su CS como 2.5S (Bocchini y Angeletti, 1969), esta es la forma activa biológicamente. Es un dímero de 26.5 KDa y cada una de las cadenas que la constituyen consta de 118 aminoácidos y contiene 3 puentes disulfuro (Fig. 5).

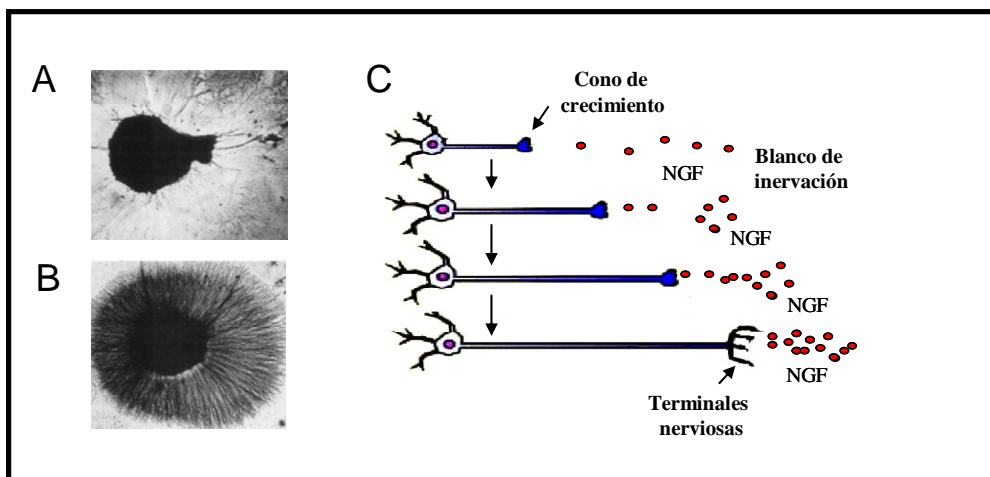


Figura 3. La función neurotrófica del NGF. Experimento de Rita Lev-Montalcini para demostrar el efecto neurotrófico del NGF. A un ganglio sensorial de embrión de pollo de 8 días de edad lo cultivo en condiciones normales (A) y con 10 ng / ml de NGF (B). Este experimento demostró que el NGF es capaz de inducir el crecimiento de los axones de este ganglio, algo que no se observó cuando fue cultivado en condiciones normales. C) Dibujo que demuestra el postulado de la hipótesis del factor neurotrófico, en la cual los blancos de inervación sintetizan y secretan cantidades limitadas del factor neurotrófico (en este caso NGF), el cual guía la inervación hacia él mismo, induciendo crecimiento de axones y dendritas.

Las subunidades α y γ son proteasas de serina del tipo de la kalicreína, pero solo la unidad γ tiene actividad catalítica, ya que la subunidad α carece de una secuencia de aminoácidos necesarios para esta actividad (Ronne y cols., 1984). Ninguna de estas subunidades tiene actividad biológica.

En el ratón, el gen que codifica para la fracción β del NGF tiene una longitud de al menos 45 Kb y contiene 4 exones cortos. Su transcripción resulta en 4 diferentes transcritos de RNAm; los cuales son el resultado de splicing alternativo y de diferentes sitios de inicio de la transcripción, localizados en dos distintos promotores (Selby y cols., 1987) (Fig. 5).

Uno de estos cuatro transcritos, el A (Fig. 4), es el más largo y se expresa en la glándula submaxilar y en la placenta. El transcrito B, no presenta todo el exon 2 y el C tiene un nuevo exon (IA) que reemplaza los dos exones. Por su parte; el D es muy similar al C, carece de un AUG en el marco de lectura del gen, lo que hace que este transcrito sea más corto que el C. Estos tres últimos transcritos son más cortos que el A y se expresan en tejidos diferentes a la glándula submaxilar y a la placenta (Selby y cols., 1987).

Los genes que codifican para la fracción α y γ se localizan en el cromosoma 7, son contiguos y se codifican por genes diferentes. Estos genes están separados por una región intragénica de 5.3 Kb de DNA. En el humano, el gen que codifica para el NGF se localiza en el cromosoma 1 (Francke y cols., 1983) y está organizado en una forma muy similar a la del ratón. A pesar de que, la actividad del NGF fue identificada primero en sarcomas de ratón (Levi-

Montalcini y Hamburger, 1951) y en ciertos venenos de víboras (Cohen, 1959), la mayoría de sus propiedades físicas y químicas, las conocemos por el estudio del NGF obtenido de las glándulas submaxilares del ratón (Cohen, 1960).

B.5) Biosíntesis y secreción del NGF

Todas las NTs son generadas como preproNTs (aproximadamente 240-260 aminoácidos). Estas formas pueden ser procesadas por enzimas intra o extracelulares como la furina, proconvertasas, metaloproteasas de matriz 7 y la plasmina (Lu y cols., 2005) hasta formas maduras que serán secretadas al espacio extracelular (longitud del monómero: 118-129 aminoácidos) (Lessmann y cols., 2003).

La forma preproNT presenta un péptido señal que dirige la síntesis de la proteína naciente al retículo endoplásmico (RE). Este péptido señal es cortado en el RE y las proNTs pueden formar homo o heterodímeros. Después, las NTs transitan hacia el aparato de Golgi probablemente vía moléculas transportadoras no cubiertas por clatrina y finalmente se acumulan en las membranas de la red trans-Golgi (Fig. 6).

En la red trans-Golgi se pueden formar dos diferentes tipos de vesículas secretoras que difieren en sus mecanismos de secreción. Las vesículas secretoras de la vía constitutiva son pequeñas (diámetro 50 a 100 nm) y la liberación de su contenido es independiente del incremento de Ca^{+2} intracelular. En cambio las vesículas de la vía de secreción regulada son

grandes (diámetro de 100 a 300 nm). Estas vesículas pueden o no tener un cuerpo electrodensito. La fusión de estas vesículas con la membrana celular es estrictamente dependiente de Ca^{+2} (Lessmann y cols., 2003).

Se han descrito 3 destinos de las proneurotrofinas: 1) Puede ocurrir un corte intracelular seguido por secreción, 2) una secreción seguida por corte extracelular o 3) una secreción sin corte subsecuente.

El proNGF que se secreta al ambiente extracelular participa como una molécula de señalización celular ya que se une con mayor afinidad al receptor p75 que al TrkA, induciendo señales de apoptosis celular (Lu y cols., 2005). Esta proneurotrofina se ha encontrado incrementada en condiciones patológicas como en la enfermedad de Alzheimer (Peng y cols., 2004; Fahnstock y cols., 2001; Pedraza y cols., 2005), y distrofia de la retina (Srinivasan y cols., 2004).

Recientemente se ha demostrado que el proNGF requiere de endocitosis y proteólisis intracelular para poder inducir la activación del TrkA. Esta proteólisis es ocasionada por una proteasa llamada furina (Boutillier y cols., 2008) (Fig. 6), contrario a lo reportado por Fahnstock y cols. (2004), que indica que el proNGF podría inducir señalización al unirse al TrkA.

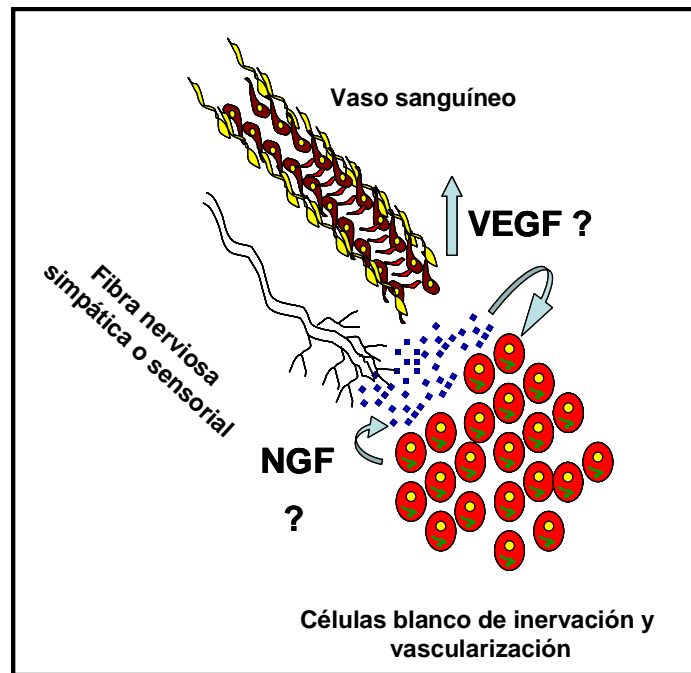


Figura 4. Efecto angiogénico del NGF. Además de su papel neurotrófico, recientemente se le ha demostrado un efecto en la angiogénesis. No se ha establecido si su efecto en la migración y proliferación de las células endoteliales es *per se* por la unión a su receptor TrkA o al incremento en la biosíntesis del VEGF.

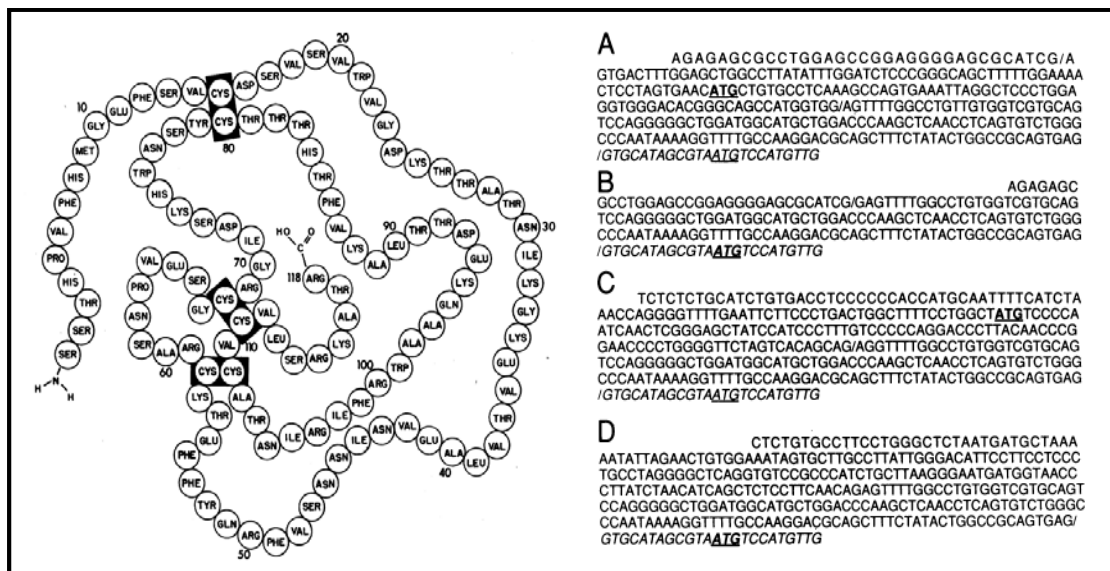


Figura 5. Estructura bioquímica y genética del NGF. A la izquierda, secuencia aminoacídica de la estructura primaria de la subunidad β de NGF obtenida de la glándula submaxilar del ratón. A la derecha, secuencia nucleotídica de las diferentes transcritos del NGF. El primer RNAm (A) corresponde al transcrito largo de NGF; el segundo (B), corresponde al transcrito corto; el siguiente RNAm representa al transcrito C, que corresponde a un precursor nuevo de NGF que contiene un exon IA que reemplaza a los dos primeros exones del transcrito A. El último transcrito (D) es muy parecido al transcrito B, pero diferente a este en su extremo 5' por carecer de un AUG en el marco de lectura. Reproducida de Angeletti y Bradshaw (1971).

Lo anterior se demostró en una línea celular HEK293T que sobreexpresan los receptores p75 y TrkA y en una línea celular de PC12 cultivada a 4° C con la intención de inhibir la endocitosis de proNGF. La activación del receptor TrkA fue disminuida en las células PC12 tratadas con proNGF e incubadas a 4° C, contrario a lo que sucedió con las mismas células en las mismas condiciones pero tratadas con NGF. Esta activación del TrkA fue disminuida cuando las células se trataron con un inhibidor de la furina, el dec-CMNK (Boutillier y cols., 2008).

También, se ha demostrado una liga entre el proteosoma y la biosíntesis y secreción del NGF. La felutamida B, un metabolito de hongos marinos inhibe las actividades hidrolíticas del proteosoma 20S induciendo un incremento en la expresión genética y en la secreción de NGF. La felutamida B se une en forma covalente a los sitios activos del proteosoma 20 y por este mecanismos, incrementa los niveles del mRNA del NGF sin afectar los niveles del mRNA de GAPDH, un gen de expresión constitutiva (Hines y cols, 2008). Dado este efecto, los autores proponen que este tipo de compuestos podrían utilizarse como potenciales drogas terapéuticas para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas o daño neuronal mecánico o químico. Sin embargo, este efecto debe ser mejor estudiado debido a la gran toxicidad celular de la felutamida B.

B.6) Las neurotrofinas (NTs)

B.6.1) Las NTs y su señalización a través de receptores Trks y P75

Las NTs ejercen sus funciones biológicas a través de su unión a dos tipos de receptores transmembranales, uno de alta afinidad, denominado Trks y otro, de baja afinidad denominado p75 (Kalb, 2005; Patapoutian y Reichardt, 2001). Los Trks tienen actividad intracelular de cinasa de tirosina (Chao, 2003). En los mamíferos se han descrito tres genes que expresan los diferentes receptores Trks. El Trk-A, el Trk-B y el Trk-C, que unen respectivamente NGF, BDNF y NT 4/5 y NT3 (Fig. 7) (Chao, 2003).

El receptor p75, es un miembro de la familia del receptor del factor de necrosis tumoral (Yamashita y cols., 2005). Este receptor une al NGF y a las proneurotrofinas. A estas últimas las une con mayor afinidad al NGF (Lu y cols., 2005; Lee y cols., 2001) y puede interactuar con los Trks a través de ciertos dominios de unión (Hempstead, 2002).

La interacción de las NTs con los receptores Trks induce una serie de cascadas de fosforilaciones intracelulares que conducen a la sobrevivencia celular, mientras que la unión de proneurotrofinas a p75 conduce a la apoptosis celular (Lu y cols., 2005). Enseguida discutiremos las señales celulares que inducen ambos receptores para producir estos efectos.

B.6.2) Señales intracelulares inducidas por los receptores Trks

La unión de las NTs a los receptores Trks induce su transfosforilación y el reclutamiento de proteínas adaptadoras que presentan dominios de unión a la porción citoplasmática del receptor. Algunas de estas proteínas adaptadoras contienen un dominio Shc (dominio de homología a la proteína Src). Otras proteínas adaptadoras son la Grb-2, la proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina SOS (Son of Sevenless) y proteínas de la familia de Gab-1/sustrato de receptor de la insulina 1 y 2 (IRS-1 y 2) (Kaplan y Miller, 2000).

El reclutamiento de SOS induce la activación de la proteína G pequeña Ras. Ras activa la vía de señalización de la cinasa de la proteína MAPK / cinasa de la proteína activada por mitógeno (raf/MEK/MAPK) y la de la cinasa de fosfatidilinositol-3 / cinasa de la proteína B (PI-3K/Akt) ambas vías regulan la sobrevivencia celular. La vía raf/MEK/MAPK activa a la cinasa S6 ribosomal (Rsk) y a la proteína de unión a elementos de respuesta de AMPc (CREB), este factor de transcripción induce la expresión de genes antiapoptóticos como el que codifica para Bcl-2.

La transfosforilación de los Trks prolonga la actividad de la MAPK al fosforilar a la proteína transmembranal rica en anquirinas (ARMS) (Fig. 8) (Arevalo y cols., 2006). La vía PI-3K/Akt, es activada por 3 proteínas adaptadoras, Shc, Grb-2 y Gab-1. La PI-3K activa directamente a las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs) y estimula la actividad de cinasa dependiente de fosfoinosítidos 1 y 2 (PDK1 y 2) las cuales a su vez activan a Akt.

Akt activada induce la fosforilación de la proteína Bad promoviendo su asociación con otra llamada 14-3-3, previniendo de esta manera su unión con la proteína antiapoptótica Bcl-2. Además, Akt fosforila e inhibe a Forkhead y a p53, factores transcripcionales que inducen la transcripción de algunos genes como los que codifican para el ligando de Fas y para Bax, respectivamente (Fig. 8) (Kaplan y Miller, 2000). Todos estos eventos, evitan la apoptosis celular.

La fosfolipasa C- γ 1 (PLC- γ 1) se une al dominio citoplasmático del receptor a través de su dominio SH2. Esta enzima hidroliza fosfoinosítidos de membrana y genera inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). El IP3 induce liberación de calcio de los depósitos intracelulares y el incremento del calcio citoplasmático. El DAG estimula la actividad de PKC regulada por calcio. Ambas moléculas pueden participar en el crecimiento de neuritas (Fig. 8) (Kaplan y Miller, 2000).

B.6.3) Señales intracelulares inducidas por p75

La activación de p75 promueve la sobrevivencia en algunos tipos de neuronas y la apoptosis en otros (Mamidipudi y Wooten, 2002). Una vía importante que promueve la sobrevivencia celular de algunas poblaciones neuronales se lleva a cabo por la activación del factor nuclear kappa B (NF- κ B). La activación de p75 por TrkA activa TRAF6, a su vez este participa en la fosforilación del factor inhibidor B (I κ B), resultando en la liberación del factor de transcripción NF- κ B. En esta vía de señalización, p75 colabora con Trk para inducir la sobrevivencia

de neuronas simpáticas (Maggiwar y cols., 1998) y sensoriales (Hamanoue y cols., 1999).

Sin embargo, la unión de las NTs con el receptor p75 también puede inducir apoptosis al activar la hidrólisis de la esfingomielina y la producción de ceramida. La ceramida se une a Raf e induce la formación de complejos Raf-Ras inactivos que inhiben la cascada de señalización de la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK) (Muller y cols., 1998). Además, la ceramida también inhibe a la vía de PI-3K/Akt (Zundel y cols., 2000). La inhibición de ambas vías promueve la apoptosis celular.

Otra forma de inducción de apoptosis por p75 se lleva a cabo por la activación de la vía de la cinasa del amino terminal de jun (JNK)-p53-Bax (Fig. 8). Se ha sugerido que la presencia o ausencia de sortilina, un correceptor de P75 determina si las proneurotrofinas inducen o no a la apoptosis celular (Lu y cols., 2005). Las señales apoptóticas de p75 se inducen sólo si Trk está inactivo. La activación de PI-3K por NGF inhibe la hidrólisis de la esfingomielina dependiente de p75 en células PC-12, lo que sugiere que el Trk-A puede contrarrestar las señales de apoptosis que resultan de la unión de NGF con p75 (Bilderback y cols., 2001).

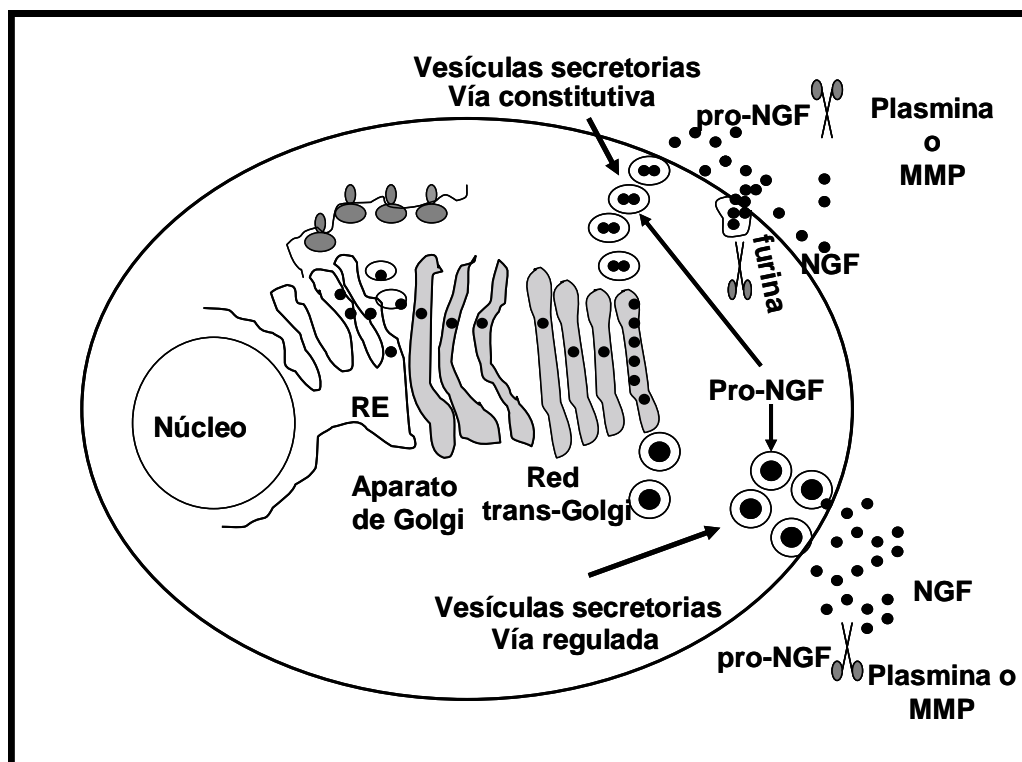


Figura. 6. Ruta de la biosíntesis y la secreción del NGF. El RNA del preproNGF es traducido con la participación de los ribosomas (gris oscuro) y las moléculas de preproNGF formadas, son secuestradas en el RE. Esta forma inmadura del NGF es transportada al aparato de Golgi y subsecuentemente a la red Trans-Golgi mediante un transporte mediado por vesículas. En la red trans-Golgi hay proteínas convertasas como la PC1 que cortan las secuencias de preproNGF y de esta forma el NGF es almacenado en las vesículas secretoras. Posteriormente, estas vesículas son transportadas hacia la membrana celular y a través de la vía constitutiva o regulada se lleva a cabo la secreción del NGF. En algunos casos cuando el proNGF no es cortado en la red trans-Golgi y es secretado, algunas proteínas como la plasmina y metaloproteasas de matriz (MMP) pueden cortar la región pro y separar así el NGF. Recientes hallazgos han demostrado que el proNGF es endocitado y después cortado por una proteasa llamada furina, posteriormente es secretado como NGF. Modificado de Lessmann y cols., 2003.

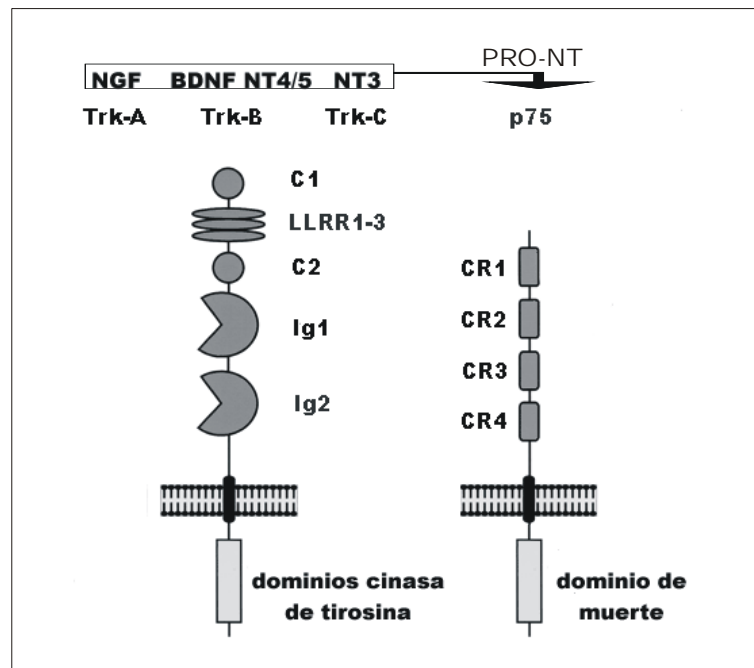


Figura 7. Las dos clases de receptores para las NTs: el Trk y el p75: El receptor Trk, presenta en su porción extracelular motivos ricos en leucinas (LRR1-3), dos grupos de cisteínas (C1 y C2) y dos dominios parecidos a inmunoglobulinas (Ig1 e Ig2). El NGF se une al Trk-A, el BDNF y la NT 4/5 se unen al Trk-B y la NT3 se une al Trk-C. Los Trks unen a sus ligandos con alta afinidad. La unión específica de cada Trk es proporcionada por el dominio 2 parecido a la inmunoglobulina. En su porción intracelular se localizan los dominios de cinasa de tirosinas. El receptor p75 contiene en su dominio extracelular cuatro repetidos de cisteína (CR1, CR2, CR3 y CR4). También, contiene un dominio de muerte celular intracitoplasmático. Este receptor tiene la capacidad de unir a las cuatro NTs: NGF, BDNF, NT4/5 y a NT3 con baja afinidad y a las proneurotrofinas con alta afinidad (modificado de Genes and Development 14:2919-2937, 2000).

B.7) PAPEL DE LAS NTs EN EL PÁNCREAS

B.7.1) El NGF en el desarrollo del páncreas

Se ha descrito que el Trk-A, receptor del NGF se expresa en los islotes de rata fetal y en las células del conducto pancreático durante el desarrollo fetal (Kanaka y cols., 1995b). Esta expresión persiste al nacimiento y en la edad adulta solo se expresa en las células β (Kanaka y cols., 1995b). Además, el NGF participa en el proceso ontogénico del islote, ya que el uso del K252a (un inhibidor del receptor TrkA), retarda significativamente la morfogénesis de los islotes *in vitro* (Kanaka y cols., 1995a).

Por otro lado, existen evidencias de que el NGF incrementa la inervación simpática del páncreas bajo circunstancias no fisiológicas. En un modelo de ratón transgénico que sobreexpresa el NGF específicamente en las células β pancreáticas, se observó hiperinervación de los islotes pancreáticos por fibras del sistema nervioso simpático (Edwards y col., 1989). Además, el tratamiento local con NGF incrementa la inervación simpática en islotes transplantados a ratas diabéticas (Reimer y col., 2003). Estos dos estudios sugieren que el desarrollo de la inervación simpática del islote esta bajo la influencia del NGF.

Sin embargo, ninguno de estos estudios deja claro si las células insulares durante las etapas fetal, posnatal secretan fisiológicamente el NGF, como lo hacen las células β adultas (Rosenbaum y cols., 1998). En caso de hacerlo, nos interesa conocer el papel que tiene el NGF endógeno en el desarrollo de la

inervación simpática y su participación en la morfogénesis. Además, de analizar su función en el desarrollo y la fisiología de la célula β .

B.7.2) El NGF en la función de la célula β pancreática

Resultados de nuestro laboratorio han demostrado que las células β de rata adulta sintetizan y secretan NGF (Rosenbaum y cols., 1998) y que este regula su secreción de insulina (Rosenbaum y col., 2001). Las células β adultas cultivadas por 5 días y tratadas con NGF, secretan más insulina en respuesta a la estimulación con 15.6 mM de glucosa, respecto a las controles no tratadas con la neurotrofina (Vidaltamayo y cols., 2002). Esto se explica, al menos en parte, porque el tratamiento a largo plazo de las células β adultas con NGF, incrementa la densidad de las corrientes de sodio y calcio, a través de los canales Na^+ y Ca^{2+} tipo L (Rosenbaum y cols., 1996; Rosenbaum y cols., 2002) (Fig. 9).

Cuando se cultivan células β con el inhibidor del receptor TrkA, K252a; se observa una disminución del RNAm de insulina así como de su secreción (Navarro y cols, 2004), lo que demuestra que el NGF modula positivamente la biosíntesis y la secreción de insulina. Otros resultados demuestran que el NGF es un importante regulador de la sobrevivencia de las células β aisladas de rata (Navarro y cols, 2004); de la línea celular de células β pancreáticas de ratón $\beta\text{TC6-F7}$ (Pierucci y cols., 2001) y de islotes cultivados y transplantados a ratas hiperglucémicas (Miao y cols., 2005).

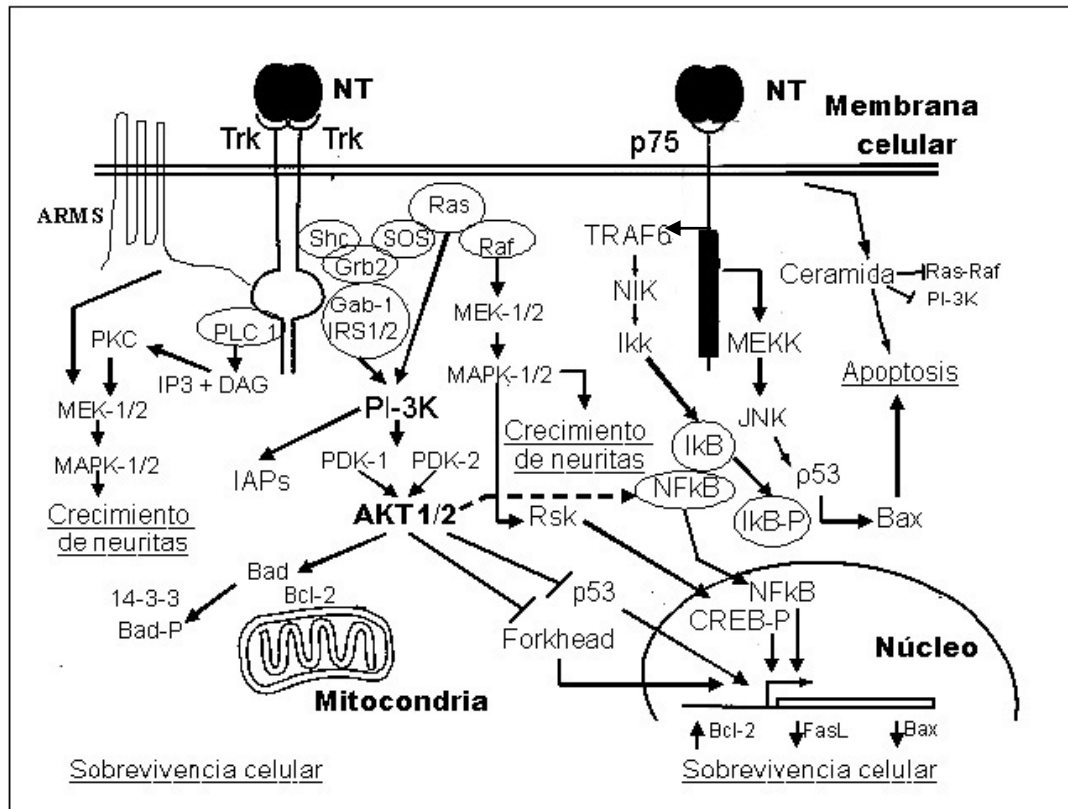


Figura 8. Vías de señalización celular de Trk y de p75. Las vías de PI-3K/Akt y la de raf/MEK/MAPK inducidas por los Trks regulan la supervivencia celular y el crecimiento de neuritas en algunos tipos de neuronas. Mientras que p75 puede regular la supervivencia celular y la apoptosis. La activación de los receptores Trks y p75 pueden converger en la activación de NFκB induciendo un sinergismo para la supervivencia celular (flecha discontinua). NT: Neurotrofina.

Además, ratas tratadas con estreptozotocina (un fármaco que induce destrucción de las células β) presentan un incremento en la expresión del gen del NGF y en su secreción, probablemente por otros tipos de células insulares (Larrieta y cols., 2006). Todos estos datos, sugieren que el NGF induce efectos protectores en la sobrevivencia de las células β tanto *in vitro* como *in vivo*.

Finalmente, el NGF es capaz de modular la plasticidad de la célula β , ya que promueve el crecimiento de procesos celulares parecidos a neuritas en cultivos primarios de células insulares adultas y fetales (Fig. 9), efecto que se potencia con un análogo permeable del AMPc, el dibutilil AMPc (dbcAMP) (Vidaltamayo y cols., 1996).

Es interesante señalar que en los islotes pancreáticos de humano también se expresa el NGF (Vidaltamayo y cols., 2003). Entonces, es probable que las funciones en la biosíntesis de la insulina y en su secreción, también pudieran estar moduladas por el NGF como se ha visto en la rata adulta. Además, se ha observado una correlación entre los niveles bajos de NGF séricos y una disminución en la velocidad de conducción nerviosa motora en pacientes con neuropatía diabética (Faradji y Sotelo, 1990). Esto podría sugerir la existencia de una liga entre un bajo nivel de secreción de NGF por las células β de los pacientes diabéticos y el mal funcionamiento de su sistema nervioso autónomo.

B.8) El BDNF en la función de células insulares

Algunos estudios han sugerido que el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, Brain Derived Neurotrophic factor) participa en la función de las células pancreáticas. Aunque esta NT no es analizada en nuestro estudio mencionaremos su posible papel en la función del islote pancreático.

Estudios de inmunohistoquímica en cortes de páncreas de ratón, pato y lagartija; han demostrado que el BDNF se colocaliza con el glucagon en las células α del islote pancreático (Lucini y cols., 2003). Así mismo, el receptor, Trk-B ha sido observado específicamente en las células α de islotes pancreáticos de ratón (Hanyu y cols., 2003) y de humanos (Shibayama y Koizumi, 1996).

La inyección subcutánea de de BDNF recombinante (20 mg / kg / día durante 8 semanas) a ratones obesos y diabéticos (db/db), reduce significativamente sus niveles de glucosa plasmática (Ono y cols., 1997). Se postula que este efecto se lleva a cabo, al incrementar la concentración de insulina pancreática y disminuir la de glucagon. Los autores sugieren que el BDNF induce una organización de la arquitectura del islote (células β en el centro y α en la periferia), que no se observa en los ratones db/db controles. Además, de incrementar la masa de células β , así como el número de sus gránulos secretores y disminuir la masa de células no β (células α y δ) (Ono y cols., 1997).

Todo esto sugiere que el BDNF previene el mal funcionamiento del páncreas en el ratón db/db al mantener una mejor organización histológica del islote y restaurar los niveles de gránulos secretores en las células β (Yamanaka y cols. 2006). Por último, cultivos de islotes aislados de páncreas de ratones silvestres durante 7 días y tratados con 10 ng / ml de BDNF demostraron una disminución significativa en la secreción de glucagón al compararla con sus controles (Hanyu y cols., 2003). Esto sugiere que el BDNF es uno de los reguladores negativos de la secreción de glucagón, hormona contrarreguladora de las acciones de la insulina (Fig. 9).

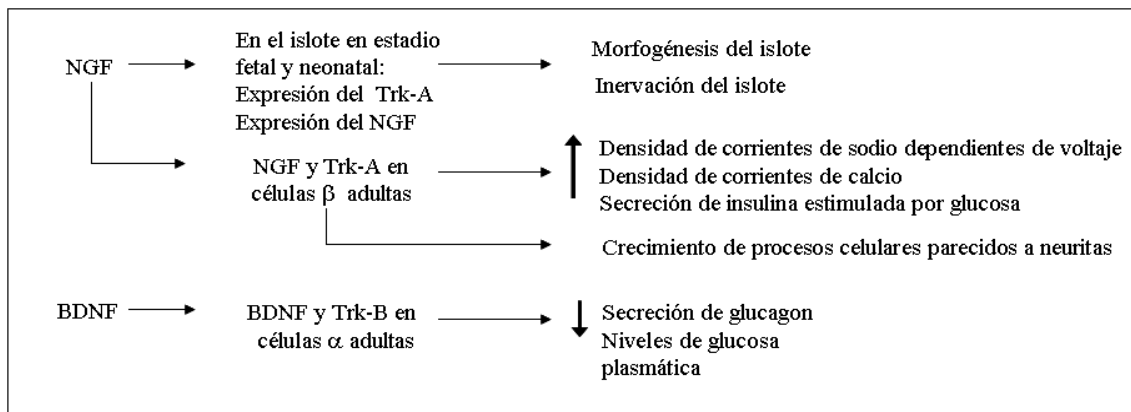


Figura 9. Participación de la NTs en el desarrollo y la función del páncreas. Se sugiere que el NGF contribuye a la morfogénesis del islote. Su papel en la inervación aún no se conoce claramente. A su vez, el NGF participa en la fisiología de la célula β adulta al incrementar la secreción de la insulina estimulada con glucosa e inducir el crecimiento de neuritas. El papel de BDNF en la disminución de la secreción de glucagon y los niveles de glucosa plasmática requiere de mayores estudios.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El desarrollo de la morfogénesis, la inervación simpática y la vasculatura del islote pancreático de la rata no ha sido caracterizado. Tampoco se ha establecido el origen celular del NGF en las etapas tempranas del páncreas, desde que momento del desarrollo se sintetiza y si este factor podría participar en estos tres procesos.

HIPÓTESIS

Si las células insulares del páncreas fetal y posnatal temprano sintetizan y secretan el NGF, entonces este factor neurotrófico podría participar en la morfogénesis, el desarrollo de la inervación simpática y en la vascularización del islote pancreático.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la biosíntesis y la secreción del NGF en el páncreas fetal y posnatal temprano y tardío para conocer su posible participación en la morfogénesis, el desarrollo de la inervación y la vasculatura del islote y caracterizar la estructura morfológica y funcional del islote durante del desarrollo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.- En los islotes de ratas de las etapas fetal (F19) (dos días antes del nacimiento, inicia el desarrollo del islote), posnatal temprana (P1) (nacimiento), posnatal tardía (P20) (destete) y adulta:

a) Determinar la biosíntesis de NGF en las células insulares y en los vasos sanguíneos de los islotes de páncreas de rata

b) Determinar la concentración de NGF secretado por células insulares aisladas en cultivo y bajo condiciones basales y estimuladoras.

2.- Caracterizar la morfología del islote en desarrollo, así como la innervación simpática, y la vasculatura en cortes de páncreas de rata en desarrollo.

3.- Explorar la expresión del receptor TrkA en las fibras nerviosas simpáticas y en los vasos sanguíneos en los cortes de páncreas de las diferentes edades estudiadas.

4.- Comparar el desarrollo de la innervación simpática entre los islotes de rata y los islotes de ratón, para reforzar nuestros hallazgos sobre la ontogenia de la innervación simpática del islote.

METODOLOGÍA

A) Reactivos

Los reactivos utilizados fueron obtenidos de los siguientes proveedores. Colagenasa tipo IV de Worthinton (Freehold, E.U.A); albúmina sérica bovina (BSA), HEPES, poli-L-lisina, tripsina de Sigma (St. Louis, E.U.A); placas de cultivo de Corning (corning, E.U.A); suero bovino fetal de Equitech-Bio (Ingram); solución de sales balanceadas de Hank's, medio de RPMI 1640 y solución de anfotericina B-estreptomicina y penicilina de Life Technologies (Grand Island, E.U.A).

B) Animales y obtención de los páncreas

Los experimentos en animales fueron aprobados por el comité de cuidados de los animales del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Los cuidados de los animales fueron realizados de acuerdo a la guía de uso y cuidados de animales de laboratorio de la academia Nacional de Ciencias (Washington D.C., 1996). Usamos ratas Wistar hembras con un peso de 200 a 250 g. Se mantuvieron en el bioterio con temperatura controlada (22-25°C) y alternancia de luz-obscuridad 12/12; agua y alimento *ad libitum*. Se aparearon con ratas macho de fertilidad comprobada.

El día 1 de la gestación se contó a partir de las 24 horas del apareamiento. Un primer subgrupo de ratas se sacrificó a los 19 días de la gestación (F19) y mediante una laparotomía se obtuvieron sus fetos. A otros dos subgrupos de ratas se les permitió terminar su periodo gestacional, para obtener a las ratas recién nacidas o neonatas y a las ratas de 20 días posnatal (P20). En los

cuatro subgrupos de ratas machos (F19, neonatal, P20 y adultas) se obtuvieron los páncreas por disección. Para el caso de la obtención de los páncreas en las ratas F19 nos ayudamos de un estereoscopio. Los páncreas de ratas adultas macho se utilizaron para compararlas con los 3 estadios mencionados.

Para caracterizar el desarrollo de la inervación en otra especie diferente a la rata y compararlas, utilizamos páncreas de ratón transgénico homocigotos de la cepa Tg-TH-EGFP 1 Gsat / mmnc. Estos ratones expresan el gen de la proteína verde fluorescente (GFP, green fluorescent protein) bajo el control del gen de la hidroxilasa de tirosina (TH). Los ratones fueron donados por los Dres. René Drucker-Colin y Tatiana Fiordeliso, los cuales los adquirieron en el MMRRC (Mutante Mouse Regional Resource Centers). Estos ratones fueron mantenidos bajo condiciones controladas de temperatura, humedad y luz. Además, tuvieron libre acceso a alimentación y agua después del destete.

La presencia del gen de GFP fue establecida con PCR con la cual obtuvimos un fragmento de 475 bp, utilizamos los siguientes “*primers*”: *AGTGCAAGCTGGTGGTCCCGAGTTCTGTC* y *TAGCGGCTGAAGCACTGCA*. Estos “*primers*” son los recomendados por el proveedor. Además, revisamos la presencia de GFP en las glándulas suprarrenales con la ayuda de un microscopio de epifluorescencia.

C) Cultivo de las células insulares de rata

Para demostrar la expresión del gen y la presencia del NGF antes del nacimiento, las ratas fetales fueron obtenidas a través de una operación

cesárea a los 19 días de la gestación (F19). Todas las ratas en este proyecto fueron anestesiadas con pentobarbital (40 mg / kg de peso corporal). Después, los fetos fueron colocados en una solución fría de D-MEM y rápidamente se obtuvieron los páncreas mediante disección. Finalmente, las madres y crías fueron sacrificados por dislocación cervical.

Un protocolo similar fue seguido en las ratas de las diferentes edades. Una vez que los páncreas fueron obtenidos se maceraron mecánicamente, se digirieron con colageneasa tipo IV a 37° C y se sometieron a centrifugación con un gradiente de Ficoll (27, 23, 20 y 11%) del que se recuperó la interfase superior, que contiene los islotes pancreáticos. La disociación de las células de los islotes se llevó a cabo incubando los islotes en baño María y con movimiento en una solución de sales balanceada (Spinner libre de calcio), con 5.6 mM de glucosa, 0.5 de BSA y 0.01% de tripsina (Navarro-Tableros et al., 2004).

Las células aisladas se cultivaron toda la noche en medio de RPMI-1640 (11.6 mmol / L de glucosa) suplementado con suero bovino fetal (SBF, 10%), 200 U / ml de penicilina, 200 µg/ml de estreptomicina y 0.5 µg/ml de anfotericina B a 37°C y 5 % de CO₂ en el aire. Antes de realizar los experimentos de secreción, las células insulares fueron cultivadas toda la noche para permitir que se recuperaran de la disociación.

D) Cortes por congelación del tejido pancreático

Los páncreas de rata y de ratón TH-EGFP obtenidos de las diferentes edades fueron obtenidos y separamos la región de la cabeza de la región del cuerpo-

cola. Esta última región, fue fijada con paraformaldehído al 4% diluido en PBS y se dejó incubando toda la noche a 4° C. Después de tres lavados con PBS, los páncreas fueron secuencialmente transferidos en una gradiente de sacarosa (PBS más 10, 20 y 30% de sacarosa) e incubados 24 h con cada una de las concentraciones.

Posteriormente, los páncreas fueron incluidos en tissue-tek-II y se realizaron cortes de 5 o 10 μm de grosor (cada 200 μm a lo largo del segmento de la cola y la cabeza) con la ayuda de un criostato a -20°C (Leica CM 1900). Los cortes se colocaron en portaobjetos cubiertos con gelatina.

E) Inmunofluorescencias de células aisladas y de cortes de tejido pancreático

Las células insulares disociadas se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS durante 45 minutos a temperatura ambiente y después se lavaron tres veces con PBS. Las células cultivadas y los tejidos fueron incubados con una solución de bloqueo y de permeabilización con 2% de BSA (peso / volúmen) y 0.1% de Tritón (volumen / volumen) por 30 y 60 minutos a temperatura ambiente, respectivamente. Posteriormente se incubaron con anticuerpos policlonales contra varios antígenos pancreáticos, vasculares y neurales y se trabajaron en diferentes condiciones (Tabla 1). Finalmente, se lavaron e incubaron con anticuerpos secundarios acoplados a diferentes fluoróforos (Tabla 1). Esto permitió desarrollar protocolos para únicas, dobles o triples inmunofluorescencias. Finalmente, los cortes se cubrieron con el medio de montaje DAKO.

Las imágenes las obtuvimos en un microscopio confocal mediante la excitación específica para FITC (excitación = 494nm, emisión = 520), CY5 (excitación = 650nm, emisión = 670) y CY3 (excitación = 550nm, emisión = 570). Los siguientes controles negativos fueron hechos: 1) Los anticuerpos primarios contra NGF, insulina y glucagon fueron preabsorbidos con el antígeno correspondiente (1 μ g del péptido / 1 μ g del anticuerpo). 2) Las células disociadas o cortes fueron tratados solo con el anticuerpo secundario omitiendo el uso del anticuerpo primario.

Para determinar el porcentaje de las células positivas a NGF, TrkA, insulina y glucagon; contamos 1400 células en total para cada uno de los marcadores. Para conocer el porcentaje de islotes pancreáticos que muestran la cápsula completa, contamos 100 islotes pancreáticos por cada edad estudiada (F19, P1, P20 y adulta).

F) Análisis cuantitativo de la inervación simpática del islote

Para medir el área de inervación en los islotes en las diferentes edades del desarrollo de la rata (F19, neonatal, P20 y adulta), 15 islotes de 5 cortes realizados cada 100 μ m por animal fueron analizados (n= 8 animales por edad), en total 120 islotes. Para solo cuantificar las fibras TH⁺ de las imágenes obtenidas, cada islote fue delineado y las células TH⁺ fueron eliminadas por el usuario, usando un sistema de computo basado en un análisis de imágenes (Image J, Wayne Rasband; National Institutes of Health, Bethesda, MD). Medimos el área de la inmunoreactividad a insulina, glucagon y fibras TH⁺ en el islote pancreático (área de células β , α y TH⁺). El porcentaje del área total del

islote, del área de células β y α ocupadas por fibras TH^+ fue calculada al dividir el área de fibras TH^+ por el área total del islote y por el área de células β y α . El promedio del área TH^+ = área TH^+ x 100 / área del islote (área de células β , α o ambas).

G) Determinación de lo niveles de RNAm de NGF

Las células aisladas de los islotes de ratas de las diferentes edades (F19, PO, P20 y adulta) fueron lisadas agregándoles 1 ml de reactivo TRIzol por cada 500,000 células (GIBCO/BRL15596-026). Este lisado se guardo a $-70^{\circ}C$ durante una noche. Después de obtener el RNA mensajero (mRNA) de las células insulares de cada una de las edades, realizamos una medición de su concentración mediante espectrofotometría. Para la detección de la expresión genética de NGF, realizamos una reacción de RT-PCR. Utilizamos 200 ng de RNA total y un termociclador de gradiente de temperatura (Eppendorf).

Para cuantificar los niveles de cDNA de NGF utilizamos los niveles de cDNA del gen de de β actina como control interno de expresión. Los oligonucleótidos que utilizamos para la amplificación de los cDNA son: para NGF (sentido) 5'-CTCTGAGCATAATGGGCAGGTAGCT-3', (antisentido) 5'-CGTGTGAAGTCA CCACCCT-3' y para β actina (sentido) 5'-GGGTCAGAAGGATTCCTATG-3', (antisentido) 5'-GGTCTCAAACATGATC TGGG-3' (Larrieta y cols., 2006).

El protocolo que utilizamos para la amplificación fue con una temperatura de alineamiento de $61^{\circ}C$ para NGF y $56^{\circ}C$ para β actina, con 30 y 25 ciclos de amplificación respectivamente. Los productos de la PCR se corrieron en un gel

de agarosa al 2% mediante electroforesis, visualizados mediante una tinción con bromuro de etidio y cuantificados mediante un análisis densitométrico (Scion Image Beta 4.02, Scion Corp., Frederick, MD).

H) Análisis semicuantitativo de la inmunofluorescencia para ProNGF

Obtuvimos imágenes confocales utilizando un Sistema de láser confocal (Fluoview FV1000, Olympus) acoplado a un microscopio de luz invertida Olympus IX81 con un objetivo 40X, de inmersión que utiliza glicerol y algunas imágenes fueron obtenidas utilizando un “zoom” de 2. Todas las inmunofluorescencias se realizaron en series (las cuatro etapas en un mismo momento) y bajo las mismas condiciones y tiempos.

Las imágenes fueron tomadas con los mismos parámetros confocales para obtener una señal fluorescente semi-cuantitativa. La intensidad de la inmunofluorescencia fue tomada con un software Olympus FV10-ASW 1.4. El programa mide la señal fluorescente de las células insulares y el usuario resta la señal de los núcleos, quedándose solo con la señal del citoplasma. Por último, obtuvimos la media de la marca en función del número total de píxeles (400) estudiados en cada uno de los islotes.

I) Ensayo de unión a lectina

Para observar las células endoteliales de los vasos sanguíneos, los cortes fueron incubados por 30 minutos con una isolectina B4 (IB4) obtenida de la *Bandeiraea simplicifolia* conjugada al fluoróforo TRITC (45 µg / ml; sigma) diluida en solución de PBS suplementado con 0.1 mgn / ml de CaCl₂ y MgCl₂

(Meléndez-Herrera et al., 2008). Después de los lavados, se realizaron las contratincciones para insulina y proNGF (ver: Inmunotinción de cortes de tejido pancreático) y por último todos los cortes fueron montados con medio DAKO.

J) Estudios de secreción de NGF

Los cambios ontogénicos de la secreción de insulina y NGF en las células insulares cultivadas (ver cultivo de células insulares), fueron determinados mediante un ensayo de ELISA. Para medir la secreción de NGF y de insulina, 200 000 células insulares aisladas de las diferentes edades, fueron preincubadas durante 1 hora a 37 °C en solución de sales balanceadas Hanks' (HBSS, Sigma) con 5.6 mM de glucosa y con 0.1 % de albúmina sérica bovina (BSA). Esta solución fue remplazada con HBSS fresca que contenía 5.6 mM o 15.6 mM de glucosa o 15.6 mM de glucosa más 20 mM de KCl durante 1 hora a 37 °C.

Al final del periodo de incubación, los sobrenadantes fueron colectados y se les agregó una mezcla de inhibidor de proteasas (Complete Mini protease inhibitor cocktail; Roche Molecular Biochemical, Mannheim, Germany). Estos sobrenadantes fueron colectados y guardados a -70°C hasta la realización del ensayo de ELISA (enzyme linked immunoabsorbent assay) por duplicado.

En el caso de NGF utilizamos un sistema de inmunoensayo (Promega, Madison, WI) y para el caso de insulina utilizamos un kit ultrasensible de determinación de esta hormona (ALPCO, Windham, NH). Las concentraciones de NGF y de insulina fueron obtenidas en picogramos (pg) y nanogramos (ng),

respectivamente. Todos los resultados fueron obtenidos en duplicado y normalizados por la concentración de la proteína total de las 200,000 células determinada en microgramos (μg). La determinación de las proteínas totales fue por el método de Biuret (Bio Rad kit 500-0006).

K) Estadística

Los datos se reportaron como la media \pm desviación estándar (SE), donde n significa el número de células por experimento. La significancia estadística fue obtenida con el análisis de varianza (ANOVA de dos vías) y un análisis de Bonferroni utilizando el programa de Stat view 4.57 (Abacus Concepts, Cary, NC). El valor significativo de p fue de 0.05 o menor ($p = 0.05$ o < 0.05).

Tabla 1. Anticuerpos utilizados

ANTICUERPO	GENERADO EN	PROVEEDOR	CONDICIONES
Anti-insulina	Cobayo	ICN	1:4000, 12 h, 4°C (células) 1:2000, 12 h, 4°C (cortes de tejido)
Anti-glucagon	Ratón	Sigma	1:12000, 12 h, 4°C (células) 1:6000, 12 h, 4°C (cortes de tejido)
Anti-TrkA	Conejo	Abcam	1:100, 12 h, 4°C (células) 1:25, 12 h, 4°C (cortes de tejido)
Anti-glucagon	Cabra	Santa Cruz	1:500, 12 h, 4°C (cortes de tejido)
Anti-NGF	Conejo	US Biological	1:1000, 36 h, 4°C (células)
Anti-TH	Conejo	Chemicon	1:100, 36 h, 4°C (cortes de tejido)
Anti-TH	Ratón	Chemicon	1:20, 36 h, 4°C (cortes de tejido)
Anti-ProNGF	Conejo	Chemicon	1:50, 12 h, 4°C (cortes de tejido)
Anti-vimentina	Ratón	Dako	1:100, 12 h, 4°C (cortes de tejido)
Anti-GFP	Conejo	Santa Cruz	1:200, 12 h, 4°C (cortes de tejido)
Anti-colagéna tipo IV	Ratón	Dako	1:100, 12 h, 4°C (cortes de tejido)
Anticuerpo secundario Cy3	Cabra	Jackson ImmunoResearch	1:50, 2 h, temperatura ambiente
Anticuerpo secundario Cy5	Cabra	Zymed laboratories INC	1:100, 2 h, temperatura ambiente
Anticuerpo secundario FITC	Cabra	Zymed laboratories INC	1:200, 1 h, temperatura ambiente

RESULTADOS

A) La arquitectura de los islotes pancreáticos se modifica progresivamente durante la ontogenia

Los islotes adultos son generalmente redondeados y el 98% de estos están limitados por una cápsula de colágena tipo IV (Fig. 10D, 10H y tabla 2). Observamos a las células α preferentemente localizadas en la periferia y las células β en el centro del islote (Fig. 10D), de acuerdo a lo ya establecido. En P20 esta morfología del islote y la localización de las células α y β es similar a la observada en la etapa adulta (Fig. 10C). Sin embargo, solo cerca del 26 % de los islotes están encapsulados (Fig. 10G y tabla 2).

Los islotes en la etapa neonatal (P1) son pequeños, muy diferentes a los del adulto, no presentan cápsula y están localizados muy cerca uno de otro (Fig. 10B, 10F y tabla 2). Semejantes a los de la etapa P1, los islotes en F19 aún no presentan la morfología del adulto y se observan alargados y sin cápsula, algunas células α y β están diseminadas en el tejido pancreático exocrino (Fig 10A).

B) La inervación simpática de los islotes es sujeta a intensa remodelación durante la ontogenia

Alteraciones en el desarrollo normal de la inervación autónoma (simpáticas y parasimpática) durante la ontogenia, podrían ser críticas para un desarrollo y función normal del islote, así como se ha reportado en el desarrollo del corazón (Hildreth y cols, 2009). Por esto mismo, analizamos la ontogenia de la inervación simpática en los islotes de rata. Las fibras TH⁺ en F19 y P1 se

localizan cerca de la periferia de los islotes (Fig. 10A y 10B); para P20 algunas fibras TH⁺ ya están localizadas dentro de los islotes, principalmente en la periferia (área de células α , Fig. 10C). En los adultos, las fibras TH⁺ se distribuyen dentro del islote, principalmente en el área de células β (Fig. 10D).

Observamos un incremento progresivo del área relativa ocupada por las fibras nerviosas TH⁺ en los islotes entre F19 y P20 (Fig. 10A, 10B y 10C). Sin embargo, entre P20 y la etapa adulta observamos una reducción de este parámetro (Fig. 10C, 10D y 11A). En este escenario, mientras que la periferia del islote sigue este patrón regresivo, la inervación simpática en el centro del islote incrementa de F19 a la etapa adulta (Fig. 11B y 11C).

C) Las células α y β de rata sintetizan NGF a través de la ontogenia

Dada la posibilidad de que el NGF puede participar en la inervación simpática del islote (Edwards y cols, 1989), el primer paso fue evaluar si las células de los islotes en etapas tempranas del desarrollo podrían sintetizar NGF. La expresión del gen de NGF por las células insulares durante el desarrollo, fue explorada por RT-PCR semicuantitativo (ver métodos). Esta expresión es observada en todas las etapas estudiadas. Sin embargo, los niveles mayores de mRNA se observaron en la etapa neonatal (P1) (Fig. 12).

Dobles inmunofluorescencias para proNGF (precursor del NGF) (Lim y col., 2007; y cols., 2005; Lessmann y cols., 2003), glucagon e insulina, respectivamente, mostraron que las células α y β , presentan inmunoreactividad a este marcador en todas las etapas estudiadas (Fig. 13A y B). La intensidad

de la fluorescencia, asociada a esta inmunoreactividad es mayor en F19 y P1 que en las etapas más tardías del desarrollo de la rata (Fig. 14A y B).

A pesar de que las células α y β expresan NGF desde F19, la mayoría de esas células pertenecen a la población de células β que también expresan el receptor TrkA (Tabla 3).

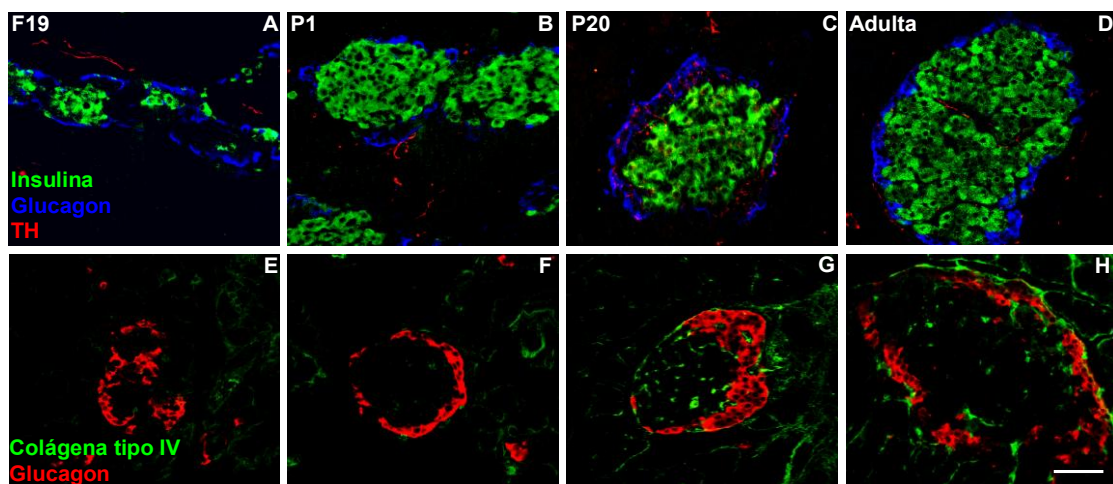


Figura 10. Reorganización morfológica de los islotes pancreáticos desde la etapa prenatal a la adulta. Las fibras simpáticas y la cápsula que cubre a los islotes pancreáticos fueron observadas mediante un microscopio confocal. Las imágenes muestran a las células positivas a insulina (verde), glucagon (azul), hidroxilasa de tirosina (TH; rojo: A, B, C y D) y colágena tipo IV (verde, E, F, G y H) en cortes de páncreas en las diferentes etapas estudiadas. (F19, P1, P20 y adulta). Barra = 50 μ m.

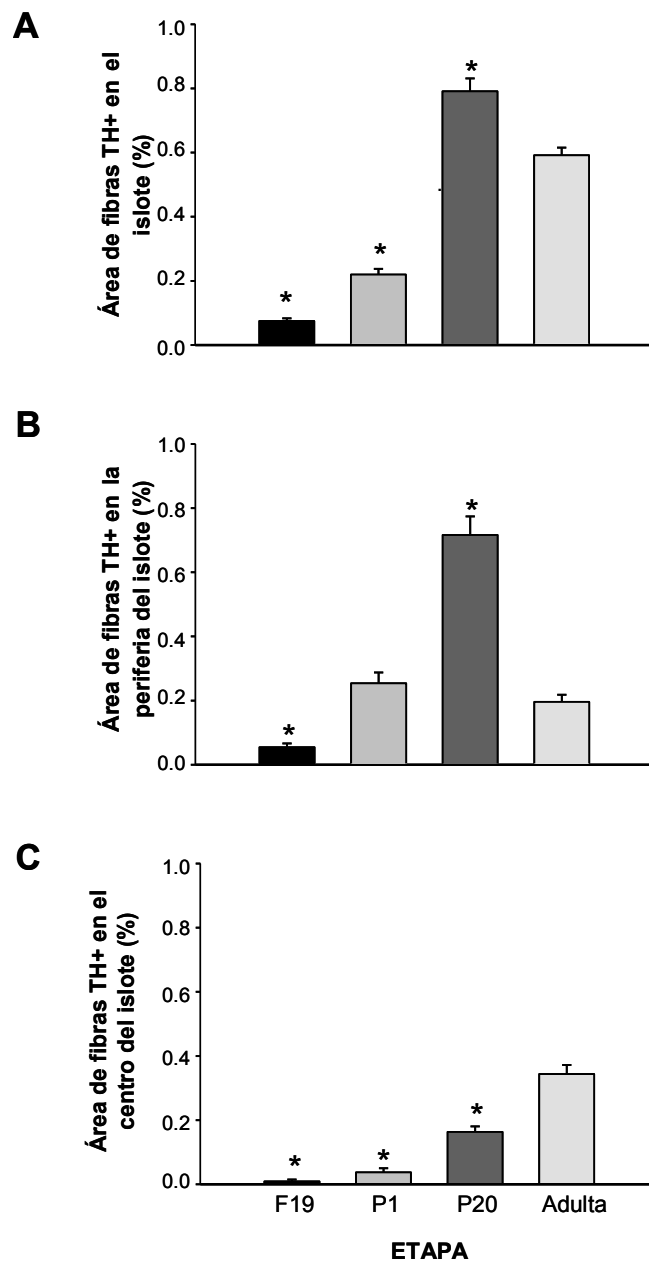


Figura 11. Cuantificación y análisis del área de fibras TH⁺ en los islotes en desarrollo. El área del islote ocupada por fibras TH⁺ incrementa en los islotes a lo largo de las diferentes etapas del desarrollo, alcanzando un pico en P20 y disminuyendo en la etapa adulta (A). La innervación en P20 fue observada principalmente en la periferia (área de células α) (B). Al contrario, la innervación en los islotes adultos es localizada en el centro (área de células β) (C). ANOVA * $p \leq 0.001$ comparado con la etapa adulta.

ETAPAS DEL DESARROLLO	ISLOTES ENCAPSULADOS %
F19	0
P1	0
P20	26
Adulta	98

Tabla 2. Cuantificación de los islotes que presentan cápsula de colágena tipo IV en las diferentes etapas del desarrollo.

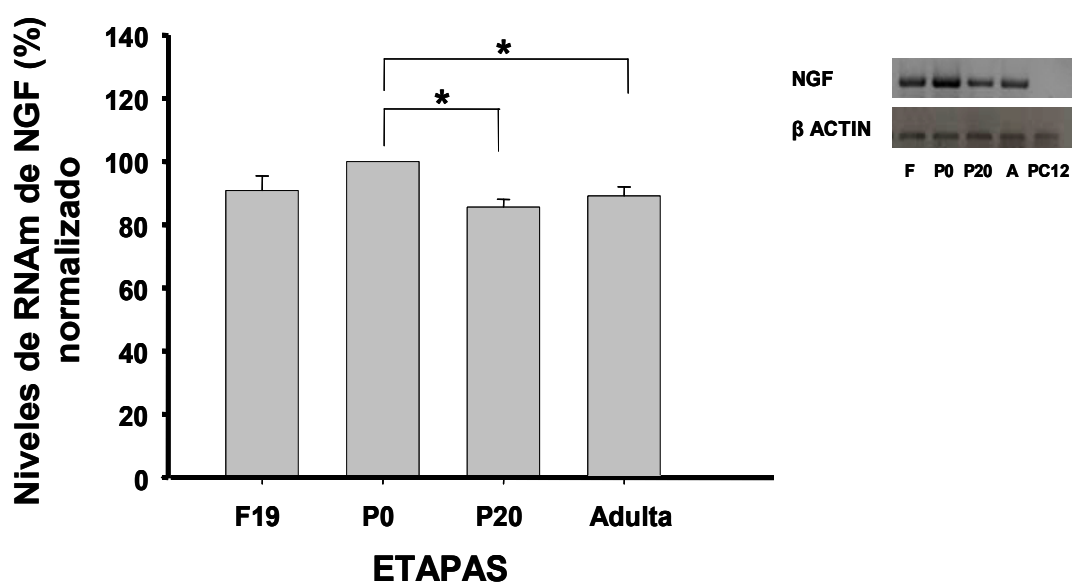


Figura 12. Expresión del gen de NGF en células insulares aisladas durante la ontogenia. Los niveles de mRNA de NGF se analizaron en todas las etapas estudiadas mediante RT-PCR y se normalizaron con los niveles de β -actina. A la derecha se muestra una imagen del gel de agarosa con las bandas correspondientes a la expresión de NGF y β -actina. F, feta; A, adulta; PC12, línea celular de feocromocitoma que no expresa NGF.

* $p < 0.005$, $n = 4$ experimentos diferentes.

D) Las células insulares secretan NGF desde etapas tempranas del desarrollo

La figura 15 muestra que las células insulares aisladas secretan NGF en todas las etapas estudiadas. Sin embargo, esta secreción es mayor en F19 y en P0 con respecto a las otras dos edades.

En estas etapas tempranas del desarrollo, la secreción del NGF podría ser constitutiva o regulada por otras moléculas diferentes a la glucosa, ya que altas concentraciones de esta misma, no afecta la secreción de NGF. Además, observamos que la secreción de NGF y la de insulina, están dissociadas. Este efecto no puede ser atribuido a las condiciones del cultivo o por muerte celular. Esto es demostrado al observar que las células β adultas muestran sensibilidad a la glucosa y una mayor respuesta secretoria a concentraciones altas de glucosa y de KCL. Es interesante el hecho que, bajo esta última condición experimental, las células insulares adultas también incrementan la secreción de NGF (Fig. 15).

E) Las células endoteliales de los vasos sanguíneos expresan proNGF durante un periodo delimitado

Se ha descrito que otras proteínas neurotróficas producidas por células vasculares pueden proveer una guía para que los axones encuentren sus órganos blancos de inervación (Honma et al., 2002). Nos preguntamos si NGF podría ser sintetizado por células de los vasos sanguíneos. Primero, evaluamos el patrón del desarrollo del lecho vascular del islote. La figura 16 muestra que los vasos sanguíneos entran al islote muy temprano en la ontogenia y se

distribuyen de manera homogénea. Además, observamos que los vasos sanguíneos presentan inmunoreactividad a proNGF en F19 y P1, pero no en P20 y en la etapa adulta (Fig. 17).

F) Los vasos sanguíneos y las fibras simpáticas expresan el receptor TrkA

La capacidad de las células vasculares endoteliales (positivas a IB4) y las fibras simpáticas (positivas a TH) para responder a NGF fue analizada mediante la expresión de su receptor de alta afinidad TrkA. La figura 18 muestra que tanto los vasos sanguíneos como las fibras simpáticas son inmunoreactivas a TrkA en todas las etapas estudiadas.

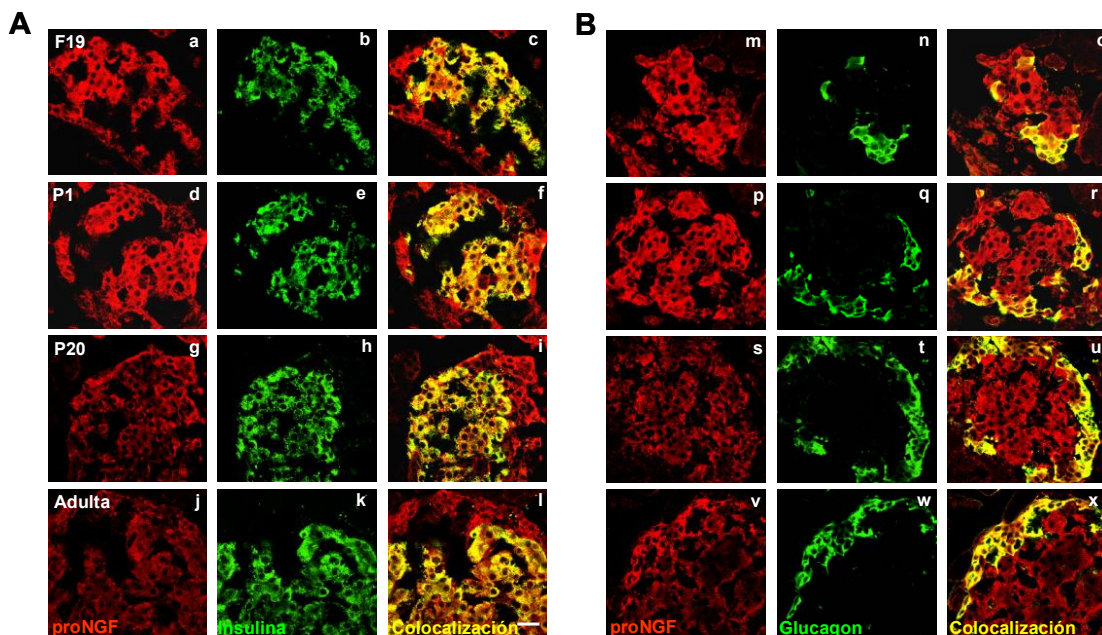


Figura 13. Colocalización de proNGF / insulina y proNGF / glucagon en los islotes de rata en desarrollo, observados en cortes de páncreas de las diferentes etapas. (A) proNGF (a, d, g y j) e insulina (b, e, h y k) y, (B) proNGF (m, p, s y v) y glucagon (n, q, t y w). La coexpresión se muestra en color amarillo. Barra = 50 μ m.

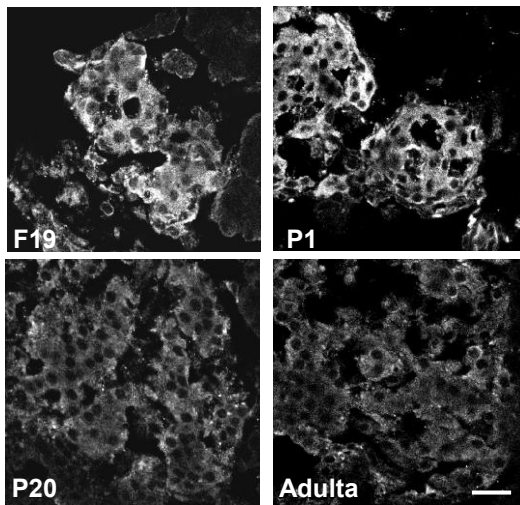
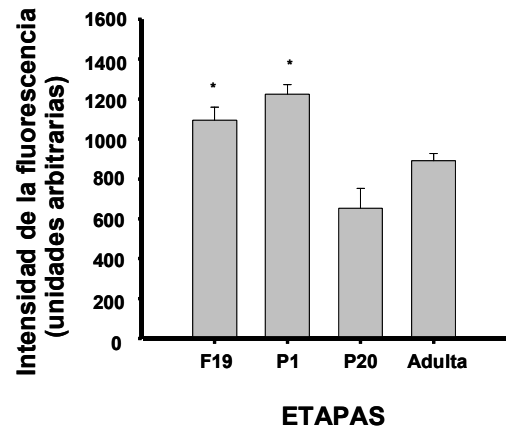
A**B**

Figura 14. Expresión de ProNGF (precursor de NGF) en cortes de páncreas en diferentes etapas del desarrollo de la rata (A). Las barras representan la media de la intensidad de la fluorescencia (unidades arbitrarias) (B). ANOVA * $p = < 0.001$ relativo a la etapa adulta, $n = 8$ animales diferentes por etapa del desarrollo. Barra = 50 μm .

Proteína marcada	Número de células (%)
NGF	87 ± 2.7
TrkA	82 ± 3.9
Insulin	74 ± 2.5
Glucagon	12 ± 1.8

Tabla 3. Cuantificación del número de células positivas a NGF, Trk-A, insulina y glucagon en F19. Los datos son promedio de 3 experimentos independientes. NGF: factor de crecimiento neuronal, TrkA: receptor de alta afinidad para NGF, INS: insulina, GLUC: glucagon.

G) Análisis de la innervación simpática en los islotes de ratones transgénicos TH-EGFP

Para reforzar nuestras observaciones sobre el desarrollo de la innervación simpática del islote en la rata, utilizamos ratones transgénicos TH-EGFP de las etapas P1, P20 y adulta. La figura 19 muestra que en P1 las fibras simpáticas no han llegado al islote aún. En P20 y la etapa adulta, las fibras se localizan dentro del islote cerca del área de células α y β , respectivamente. Este hallazgo es similar a lo observado en la rata. Como ha sido reportado previamente por Teitelman y Lee (1987), los islotes del ratón TH-EGFP presentan abundantes células positivas a TH, las cuales también coexpresan insulina (Fig. 19). En este estudio no analizamos la función de estas células.

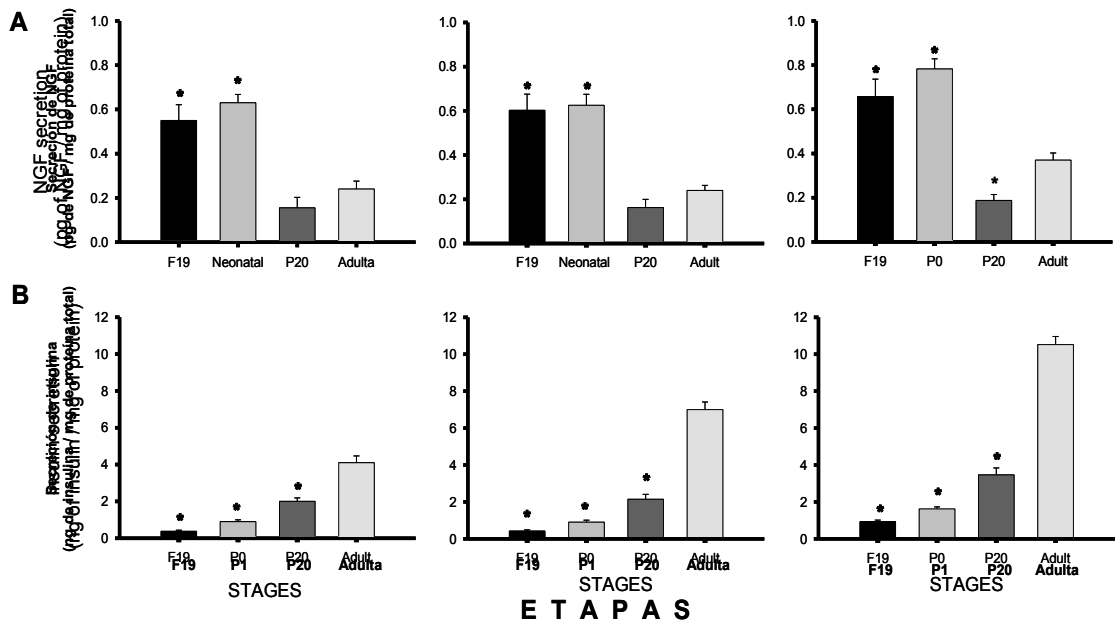


Figura 15. Secreción de NGF y de insulina en las diferentes etapas del desarrollo de la rata. Las gráficas de barra representan la secreción de NGF (A) o insulina (B) de células aisladas en condiciones basales (5.6 mM de glucosa, izquierda) o estimuladoras [15.6 mM de glucosa (en medio) o 15.6 mM de glucosa más 20 mM de KCl (derecha)]. ANOVA * $p < 0.001$ comparado con la etapa adulta. Los datos son obtenidos de 4 experimentos independientes, cada experimento por duplicado.

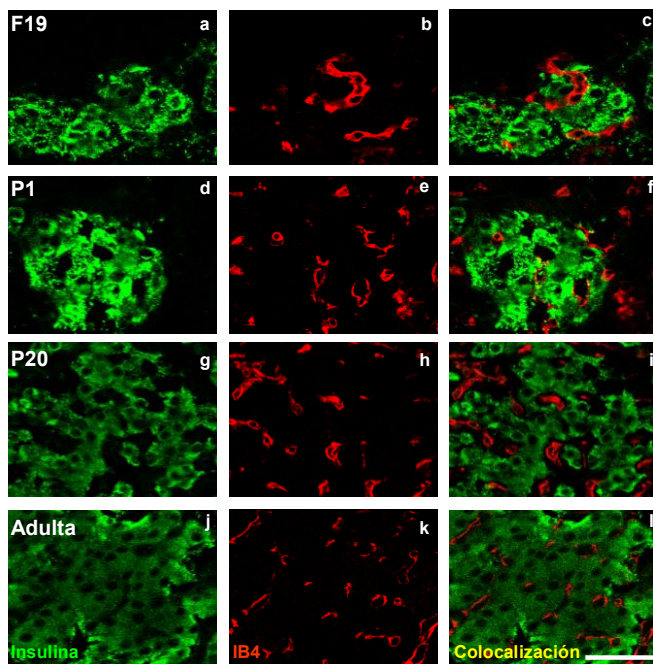


Figura 16. Desarrollo de la vasculatura en los islotes de rata. Las imágenes muestran que los vasos sanguíneos están presentes en los islotes de las ratas desde la etapa fetal (c, f, i y l). Las células endoteliales de los vasos sanguíneos se observan en rojo (b, e, h y k) y las células β en verde (a, d, g y j). IB4: isolectina B. Barra = 50 μ m

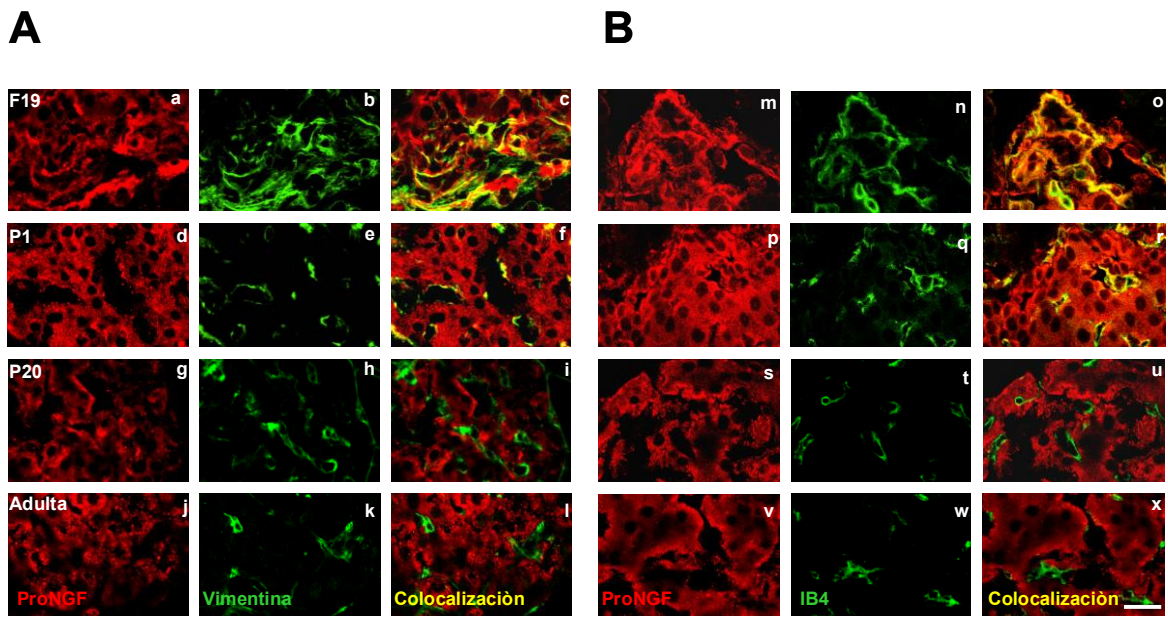


Figura. 17. Expresión de ProNGF en los vasos sanguíneos de los islotes pancreáticos de rata en desarrollo. (A) Colocalización de pro-NGF y vimentina (amarillo; c y f) y (B) de proNGF y de IB4 (amarillo; o y r). Barra = 50 μ m.

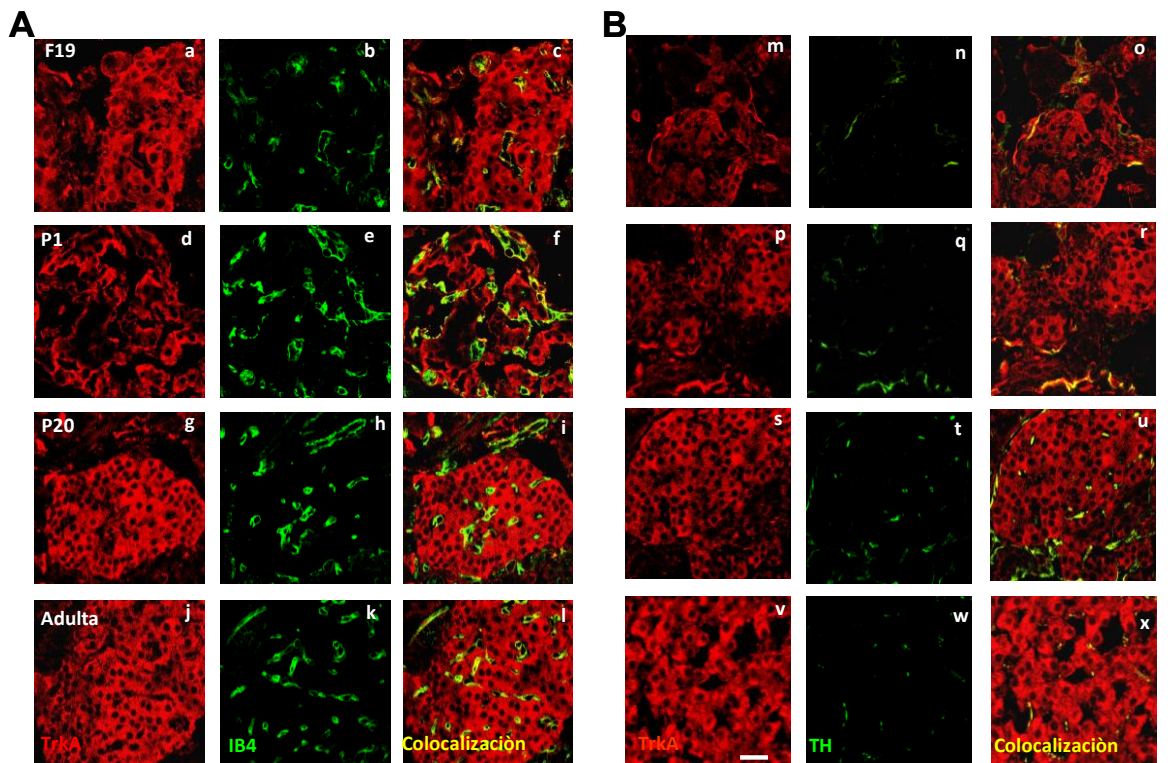


Figura 18. Expresión del receptor TrkA en los vasos sanguíneos y en las fibras simpáticas de los islotes pancreáticos. (A) Colocalización de TrkA e IB4 (amarillo; c, f, i y l) y (B) de TrkA y TH (amarillo; c, f, i y l) en todas las etapas estudiadas (flechas). Barra = 20 μ m

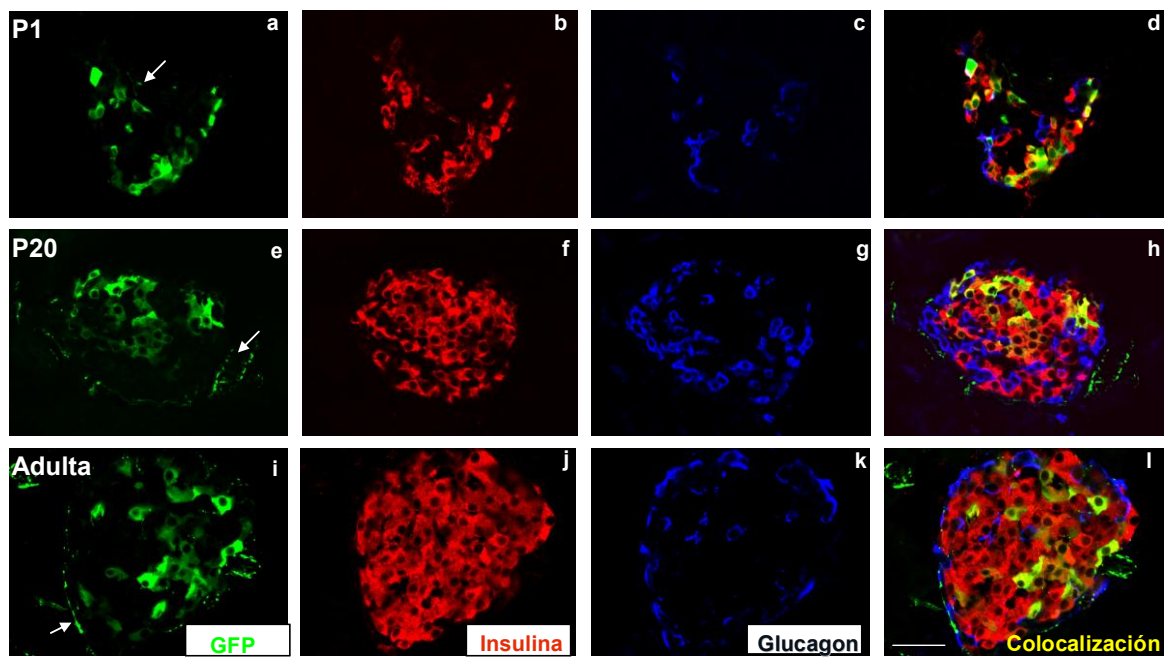


Figura 19. Localización de las fibras simpáticas y células positivas a TH en los islotes de ratón GFP-TH en las diferentes etapas del desarrollo. TH⁺-GFP es localizado en verde (a, e, i; ver métodos); insulina en rojo (b, f y j); glucagon en azul (c, g y k); colocalización en amarillo (d, h y l). En P1, P20 y la etapa adulta las fibras positivas a TH son señaladas con flechas. En todas las etapas estudiadas observamos la presencia de abundantes células doble positivas a TH e insulina. Barra = 20 μ m.

DISCUSIÓN

En este estudio, analizamos el desarrollo de la morfología, cápsula, innervación, vasculatura y función del islote de la rata, en las etapas F19, P1, P20 y adulta. Nuestros resultados muestran el primer análisis completo de la relación entre la innervación, los vasos sanguíneos y la morfología de los islotes pancreáticos durante la ontogenia. Además, analizamos el posible papel del NGF en el desarrollo de estas estructuras. El conocimiento de la ontogenia de un órgano, nos ayudará a comprender mecanismos que establecen un adecuado desarrollo de la función biológica en los individuos adultos.

En la etapa fetal, la homeostasis de la glucosa del feto es dependiente de la madre (King, 2006). Al nacimiento las crías deben de establecer su propio control de esta homeostasis y secretar insulina en respuesta a la leche materna. Otro cambio se da en P20 que en la rata representa el periodo del destete y se presenta un cambio drástico en la alimentación. Estas tres edades representan etapas críticas para el desarrollo pancreático y la maduración de la secreción de insulina inducida por glucosa (Aguayo-Mazzucato y cols., 2006; Navarro-Tableros y cols., 2007) que termina en P28 (Aguayo-Mazzucato y cols., 2006), aunque el páncreas sigue aumentando de tamaño hasta la edad adulta.

Los resultados aquí descritos muestran que la arquitectura de los islotes pancreáticos en la rata se establece progresivamente durante los primeros 20 días de vida posnatal. Los islotes en P20 no son maduros aún, pues 70 % de estos no presentan cápsula de colágena, ni las células β responden a la glucosa como en la etapa adulta. En otros estudios realizados con ratas Zucker delgadas, se ha

mostrado que las fibras reticulares y de colágena aumentan entre la semana 6 y 32 después del nacimiento (Janssen y cols., 2001).

Con estos datos y dado que todos los islotes adultos presentan esta estructura, sugerimos que la presencia de cápsula puede utilizarse como un indicador de madurez. Otros autores también han sugerido que la cápsula podría ser una estructura importante para el desarrollo completo y sobrevivencia de los islotes (Janssen y cols., 2001; Nikolova y cols., 2007; Irving-Rodgers y cols., 2008).

Nuestras observaciones demuestran, que el desarrollo de la inervación simpática de los islotes sufre un proceso de remodelación durante la ontogenia. En términos generales, hay una tendencia de las fibras simpáticas a incrementar en el día P20 y disminuir después de este periodo. Este tipo de resultado no es sorprendente, ya que un proceso de hiperinervación seguido por una eliminación de axones redundantes es mediado a través de un mecanismo denominado competencia neuronal (Deppmann y cols., 2008). Este proceso es comúnmente visto en otros órganos blanco (Silva y cols., 2002). Sin embargo; esta remodelación observada en los islotes, no había sido descrita anteriormente.

Durante las etapas tempranas del desarrollo, las fibras simpáticas se localizan principalmente en la periferia de los islotes, en el compartimento de células α . Mientras que en los islotes maduros, un ajuste de la cantidad de fibras es acompañado por una reducción en este último compartimento y su relocalización en el área de células β . Cambios territoriales en la preferencia de los axones durante la ontogenia, no son raros. Algunos axones en crecimiento utilizan blancos

de inervación transitorios para alcanzar el destino final en la madurez (Silva y cols, 2002).

De esta manera, observamos que la inervación simpática incrementa en el compartimento de las células β cuando estas muestran una madurez funcional (después de P20). Lo cual corrobora otro estudio del laboratorio en el que se observó que en P28 los islotes presentan ya características maduras (Aguayo-Mazzucato y cols., 2006). Al contrario de lo observado en la rata, los islotes pancreáticos adultos de ratones muestran más fibras simpáticas localizadas en la periferia de los islotes (Burriss y Hebrok, 2007).

La comparación entre el desarrollo de la inervación simpática de las ratas y del ratón Tg-TH-GFP refuerza nuestros resultados. La localización de las fibras simpáticas dentro de los islotes del ratón Tg-TH-GFP se observó hasta P20, similar a lo observado en la rata. Aunque, la presencia de abundantes células TH⁺ observadas en los islotes de ratones y descritas anteriormente por Teitelman y cols. (1987) requiere de mayores estudios.

Un aspecto interesante que merece consideración, es la búsqueda de mecanismos por los cuales se remodela la inervación simpática. Se ha observado que cuando se transplantan islotes a la cápsula renal, estos desarrollan inervación simpática (Gardemann y cols., 1994; Myrsten y cols., 1996). Lo que sugiere que algunos factores producidos por las células insulares podrían mediar un efecto neurotrófico en el islote.

En este trabajo, documentamos que las células β sintetizan y secretan NGF a lo largo de la ontogenia pancreática, el cual podría ser un factor trófico para el desarrollo y la sobrevivencia de la inervación simpática y de la vasculatura del islote como ha sido observado en otros órganos (Dissen y cols., 2002; Lara y cols., 1990).

La biosíntesis y secreción de NGF por las células insulares disminuye con la edad. Sin embargo, las células insulares adultas continúan sintetizando y secretando NGF, el cual probablemente ayuda en el mantenimiento de la inervación simpática en los islotes adultos. Un hallazgo importante fue la observación de que las células α y las vasculares también muestran inmunoreactividad para proNGF. Lo que puede ser una fuente alterna de NGF durante el desarrollo pancreático y hasta la adultez.

Para poder demostrar la expresión de NGF en los vasos sanguíneos utilizamos IB4 (marcador de células endoteliales de vasos sanguíneos) (Meléndez y cols., 2008) y vimentina, cuya expresión acompaña a los procesos de angiogénesis (Vasir y cols., 2000). La importancia de que las células vasculares produzcan NGF de manera restringida a la etapa perinatal, resulta de interés. Esto podría implicar que el NGF vascular podría tener efectos auto / paracrinos que participen en la guía de las fibras simpáticas hacia los órganos blanco (islotes) durante las etapas tempranas del desarrollo, como se ha descrito para artemina (Honma, y cols., 2002). Requerimos realizar mayores estudios para poder demostrar esta hipótesis.

En un ratón transgénico que hiperexpresa NGF específicamente en las células β (Edwards y col., 1989) y en un doble knocking para NGF y Bax (Glebova y Ginty, 2004) se ha observado una hiper e hipoinervación de fibras simpáticas en el páncreas, respectivamente. Estos datos, apoyan fuertemente la idea de que los cambios en la disponibilidad de NGF podrían ser una causa de la remodelación de la inervación simpática.

La correlación descrita entre la magnitud del desarrollo de la inervación simpática y la secreción de NGF observada por Wekstein (1965) no la encontramos en el islote. Mientras en P20 observamos una hiperinervación simpática del islote, la secreción de NGF por las células insulares disminuye. Esto, probablemente se deba a un efecto inhibitorio en la secreción de NGF ocasionado por la NA liberada de las fibras simpáticas. Adipositos de una línea celular de ratón (3T3-L1) que fueron cultivados y tratados con NA, mostraron una disminución significativa en la expresión genética y en la secreción de NGF (Peeraully y cols., 2004). Además, tejido adiposo pardo de ratas tratadas con reserpina (un antagonista de la NA) indujo un incremento en los niveles proteicos de NGF (Nisoli y cols., 1996).

Esta regulación negativa de la noradrenalina hacia el NGF podría a su vez, disminuir la biosíntesis del receptor TrkA e inducir apoptosis y remodelación de la inervación simpática por competencia neural, algo que ha sido ampliamente demostrado en ganglios simpáticos de ratones NGF^{-/-}, Bax^{-/-} (Deppmann y cols., 2008).

La presencia de los receptores TrkA en las fibras simpáticas y en los vasos sanguíneos de los islotes observada en todas las edades estudiadas refuerza la acción neurotrófica y angiogénica del NGF propuesta en este trabajo.

Por otro lado, TrkA también se expresa en las células β , dato que ya está ampliamente conocido (Rosenbaum y cols., 1998; Miralles y cols., 1998; Kanaka-Gantenbein y cols., 1995a). Por lo tanto, es probable que el NGF actúe también a través de señales auto / paracrina para promover la maduración de las células β . Esta posibilidad es apoyada por el aumento en la secreción de insulina inducida por glucosa, después de que las células β neonatas son tratadas con NGF (Navarro-Tableros y cols., 2007).

CONCLUSIONES

Los datos morfológicos y funcionales descritos en este trabajo sugieren que el NGF puede jugar un papel clave en la morfogénesis al promover la remodelación y el mantenimiento de la inervación simpática, el desarrollo de su red vascular y la maduración de las células α y β (Fig. 20). Esto es reforzado por la inmunoreactividad de TrkA observada en las células insulares y las fibras simpáticas de los islotes en todas las etapas estudiadas y en los vasos sanguíneos en F19 y P0.

Ciertas evidencias apoyan la relación que existe entre un proceso ontogénico alterado y la presencia de algunas enfermedades que se desarrollan en la etapa adulta. Estos padecimientos son causados por interacciones negativas que ocurren entre el desarrollo del organismo y su medio ambiente durante la vida pre y posnatal. La disminución en la inervación del islote se observa como un evento temprano en la diabetes tipo 1 (Persson-Sjogren y cols., 2005; Saravia y cols., 2003). Además, los ratones knockout para NGF o TrkA resultan en un fenotipo dramático de apoptosis de neuronas simpáticas y muerte de las crías en pocas semanas (Crowley y cols., 1994).

Resulta interesante que la presencia de una mutación autosómica recesiva en el gen de TrkA en humanos, causa un síndrome de insensibilidad congénita al dolor y anhidrosis (CIPA; Chao, y cols., 2006; Indo, y cols., 2002). Además, estos pacientes presentan una alteración en la primera fase de la secreción de insulina inducida por glucosa (Schreiber R, y cols., 2005). Finalmente, una disminución en los niveles séricos de NGF ha sido asociada a la neuropatía periférica en modelos

de animales y humanos con diabetes (Faradji y Sotelo, 1990; Tomlinson y cols., 1997).

Conocer los papeles del NGF en el desarrollo de los islotes, la maduración, la innervación y la función puede conducir a nuevas perspectivas para posibles tratamientos para diabetes mellitus, incluyendo mejoría en las condiciones de los islotes utilizados para transplantes

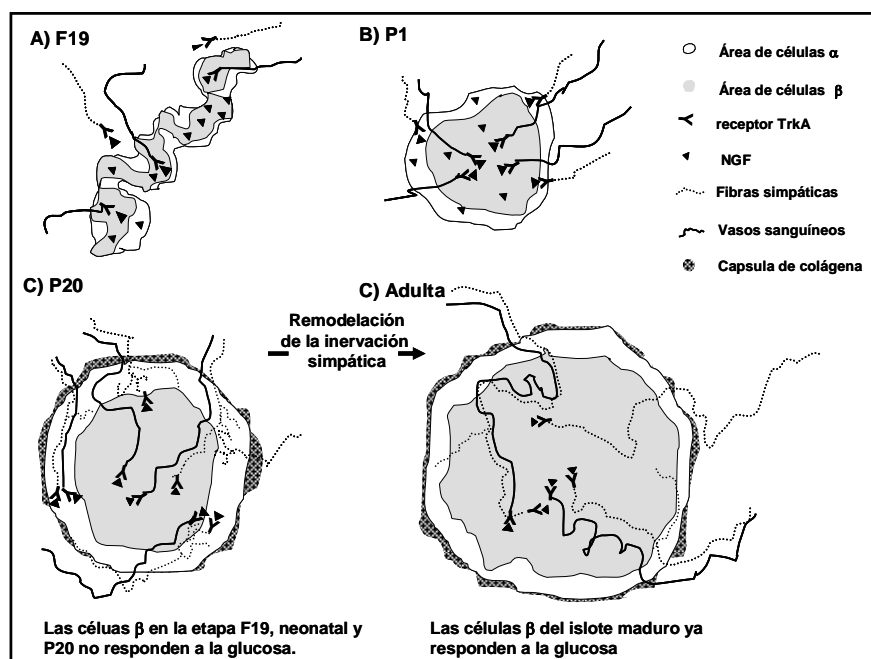


Figura 20. Modelo para explicar el posible papel de NGF en el desarrollo pancreático. En las etapas fetal, posnatal temprana (P1) y posnatal tardía (P20), los islotes son inmaduros en su morfología y función. Durante el desarrollo pancreático, observamos que la red vascular se forma primero, seguida de la innervación simpática, la cápsula de colágena y finalmente la arquitectura del islote maduro. Entre las etapas P20 y adulta se observa un proceso de remodelación de la innervación simpática, probablemente por competencia neural. El NGF podría tener una participación en cada uno de estos cambios morfofuncionales al enviar señales hacia su receptor TrkA, presente en células, fibras simpáticas y vasos sanguíneos de los islotes pancreáticos.

REFERENCIAS

- 1.- Aguayo-Mazzucato C, Sanchez-Soto C, Godinez-Puig V, Gutiérrez-Ospina G, Hiriart M. Restructuring of pancreatic islets and insulin secretion in a postnatal critical window. PLoS ONE 2006, 20;1:e35.
- 2.- Ahrén B. Autonomic regulation of islet hormone secretion. Implications for health and disease. Diabetologia 2000, 43: 393-410.
- 3.- Ahrén B, Wierup N, Sundler F. Neuropeptides and the regulation of islet function. Diabetes 2006, 55 (suppl.2):S98-S107.
- 4.- Aloe L. Rita Levi-Montalcini: the discovery of nerve growth factor and modern neurobiology. Trends Cell Biol 2004, 14(7):395-99.
- 5.- Angeletti RH, Bradshaw RA. Nerve growth factor from mouse submaxillary gland: amino acid sequence. Proc Natl Acad Sci U S A 1971, 68(10):2417-20.
- 6.- Arevalo JC, Pereira DB, Yano H, Teng KK, Chao MV. Identification of a switch in neurotrophin signaling by selective tyrosine phosphorylation. The Journal of biological chemistry 2006, 281 (2):1001-07.
- 7.- Bibel M and Barde YA. Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. Genes and Development 2000, 14:2919-37.

- 8.- Bilderback TR, Gazula VR, Dobrowsky RT. Phosphoinositide 3-kinase regulates crosstalk between Trk A tyrosine kinase and p75(NTR)-dependent sphingolipid signaling pathways. *J Neurochem* 2001, 76(5):1540-51.
- 9.- Bocchini V, Angeletti PU. The nerve growth factor: purification as a 30,000-molecular-weight protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1969, 64(2):787-94.
- 10.- Bonner-Weir and L Orci. New perspectives on the microvasculature of the islets of Langerhans in the rat. *Diabetes* 1982, 31(10):883-89.
- 11.- Boutilier J, Ceni C, Pagdala PC, Forgie A, Neet KE, Barker PA. Proneurotrophins require endocytosis and intracellular proteolysis to induce TrkA activation. *J Biol Chem* 2008, 283(19):12709-716.
- 12.- Burris RE and Hebrok M. Pancreatic Innervation in Mouse Development and β -cell Regeneration. *Neuroscience* 2007, 12 (150):592–602.
- 13.- Cantarella G, Lempereur L, Presta M, Ribatti D, Lombardo G, Lazarovici P, Zappalà G, Pafumi C, Bernardini R. Nerve growth factor-endothelial cell interaction leads to angiogenesis in vitro and in vivo. *FASEB J* 2002, 16(10):1307-309.
- 14.- Chao MV. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signaling pathways. *Nature reviews Neuroscience* 2003, 4:299-309.
- 15.- Chao MV, Rajagopal R, Lee FS. Neurotrophin signalling in health and disease. *Clinical Sci* 2006, 110: 167-173.

16.- Clegg DO, Large TH, Bodary SC, Reichardt LF. Regulation of nerve growth factor mRNA levels in developing rat heart ventricle is not altered by sympathectomy. *Dev Biol* 1989,134(1):30-7.

17.- Cohen S. Purification and metabolic effects of a nerve growth-promoting protein from snake venom. *J Biol Chem* 1959, 234(5):1129-37.

18.- Cohen S. Purification of a nerve-growth promoting protein from the mouse salivary gland and its neuro-cytotoxic antiserum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1960, 46(3):302-11.

19.- Cohen S, Levi-Montalcini R, Hamburger V. A nerve growth-stimulating factor isolated from sarcomas 37 and 180. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1954, 40(10):1014-8.

20.- Coppola V, Barrick CA, Southon EA, Celeste A, Wang K, Chen B, Haddad E, Yin Jian, Nussenzweig A, Subramaniam Arun and Tessarollo Lino. Ablation of TrkA function in the immune system causes B cell abnormalities. *Development* 2004, 131: 5185-95

21- Cowan WM. Viktor Hamburger and Rita Levi-Montalcini: the path to the discovery of nerve growth factor. *Annu Rev Neurosci* 2001, 24: 551-600.

- 22.- Creedon DJ, Tuttle JB. Synergistic increase in nerve growth factor secretion by cultured vascular smooth muscle cells treated with injury-related growth factors. *J Neurosci Res* 1997, 1(47):277-86.
- 23.- Crowley C, Spencer SD, Nishimura MC, Chen KS, Pitts-Meek S, Armanini MP, Ling LH, McMahon SB, Shelton DL, Levinson AD. Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons. *Cell* 1994, 25(76):1001-11
- 24.- Damon DH, Teriele JA, Marko SB. Vascular-derived artemin: a determinant of vascular sympathetic innervation?. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007, 293(1):H266-73.
- 25.- Deppmann CD, Mihalas S, Sharma N, Lonze BE, Niebur E, Ginty DD. A Model for Neuronal Competition During Development. *Science* 2008, 320 (5874): 369-73.
- 26.- Dissen GA, Romero C, Paredes A, Ojeda SR. Neurotrophic control of ovarian development. *Microscopy Reserch and Technique* 2002, 59: 509-15.
- 27.- Dollé JP, Rezvan A, Allen FD, Lazarovici P, Lelkes PI. Nerve growth factor-induced migration of endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2005, 315(3):1220-27.
- 28.- Edlund H. Pancreatic organogenesis--developmental mechanisms and implications for therapy. *Nat Rev Genet* 2002, 3(7):524-32.

29.- Edwards RH, Rutter WJ, Hanahan D. Directed expression of NGF to pancreatic beta cells in transgenic mice leads to selective hyperinnervation of the islet. *Cell* 1989, 58:161-70.

30.- Fahnstock M, Michalski B, Xu B, Coughlin MD. The precursor pro-nerve growth factor is the predominant form of nerve growth factor in brain and is increased in Alzheimer's disease. *Mol Cell Neurosci* 2001, 18(2):210-20

31.- Fahnstock M, Yu G, Michalski B, Mathew S, Colquhoun A, Ross GM, Coughlin MD. The nerve growth factor precursor proNGF exhibits neurotrophic activity but is less active than mature nerve growth factor. *J Neurochem* 2004, 89(3):581-92.

32.- Faradji V, Sotelo J. Low serum levels of nerve growth factor in diabetic neuropathy. *Acta Neurol Scand* 1990, 81(5):402-06.

33.- Fariñas I. Neurotrophin actions during the development of the peripheral nervous system. *Microsc Res Tech* 1999, 45(4-5):233-42.

34.- Francke U, de Martinville B, Coussens L, Ullrich A. The human gene for the beta subunit of nerve growth factor is located on the proximal short arm of chromosome 1. *Science* 1983, 16;222(4629):1248-51.

- 35.- Gardemann A, Jungermann K, Grosse V, Cossel L, Wohlrab F, Hahn HJ, Blech W, Hildebrandt W: Intraportal transplantation of pancreatic islets into livers of diabetic rats. Reinnervation of islets and regulation of insulin secretion by the hepatic sympathetic nerves. *Diabetes* 1994, 43(11):1345-1352.
- 36.- Glebova NO and Ginty DD. Growth and survival signals controlling sympathetic nervous system development. *Annu Rev Neurosci* 2005, 28:191-222.
- 37.- Glebova NO and Ginty DD. Heterogeneous requirement of NGF for sympathetic target innervation in vivo. *J Neurosci* 2004, 24(3):743-51.
- 38.- Hamanoue M, Middleton G, Wyatt S, Jaffray E, Hay RT and Davies AM. p75-mediated NFkB activation enhance the survival response of developing sensory neurons to nerve growth factor. *Mol Cell Neurosci* 1999, 14:28-40.
- 39.- Hanyu O, Yamatani K, Ikarashi T, Soda S, Maruyama S, Kamimura T, Kaneko S, Hirayama S, Suzuki K, Nakagawa O, Nawa H, Aizawa Y. Brain-derived neurotrophic factor modulates glucagon secretion from pancreatic alpha cells: its contribution to glucose metabolism. *Diabetes Obesity and Metabolism* 2003, 5:27-37.
- 40.- Heinze E, Steinke J. Glucose metabolism of isolated pancreatic islets: difference between fetal, newborn and adult rats. *Endocrinology* 1971, 88:1259–63.

- 41.- Hempstead BL. The many faces of p75^{NTR}. *Curr Opin Neurobiol* 2002, 12(3):260-67.
- 42.- Hildreth V, Anderson RH, Henderson DJ. Autonomic innervation of the developing Heart: Origins and function. *Clinical Anatomy* 2009, 22:36-46.
- Hines J, Groll M, Fahnstock M, Crews CM. Proteasome inhibition by fellutamide B induces nerve growth factor synthesis. *Chem Biol* 2008, 15(5):501-12.
- 43.- Hiriart M, Aguilar-Bryan L: Channel regulation of glucose sensing in the pancreatic beta-cell. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008, 295(6):E1298-1306.
- 44.- Honma Y, Araki T, Gianino S, Bruce A, Heuckeroth R, Johnson E, Milbrandt Artemin is a vascular-derived neurotropic factor for developing sympathetic neurons. *Neuron* 2002, 18 (35):267-82.
- 45.- Indo Y. Genetics of congenital insensitivity to pain with anhidrosis (CIPA) or hereditary sensory and autonomic neuropathy type IV. Clinical, biological and molecular aspects of mutations in TRKA (NTRK1) gene encoding the receptor tyrosine kinase for nerve growth factor. *Clin Auton Res* 2002, 12: 20-32.
- 46.- Irving-Rodgers HF, Ziolkowski AF, Parish CR, Sado Y, Ninomiya Y, Simeonovic CJ, Rodgers RJ: Molecular composition of the peri-islet basement membrane in NOD mice: a barrier against destructive insulinitis. *Diabetologia* 2008, 51(9):1680-1688.

- 47.- Janssen SW, Hermus AR, Lange WP, Knijnenburg Q, van der Laak JA, Sweep CG, Martens GJ, Verhofstad AA. Progressive histopathological changes in pancreatic islets of Zucker Diabetic Fatty rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2001, 109:273-82.
- 48.- Julio-Pieper M, Lara HE, Bravo JA, Romero C. Effects of nerve growth factor (NGF) on blood vessels area and expression of the angiogenic factors VEGF and TGF beta in the rat ovary. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2006, 4:57.
- 49.- Kalb R. The protean actions of neurotrophins and their receptors on the life and death of neurons. *Trends Neurosci* 2005, 28(1):5-11.
- 50.- Kanaka-Gantenbein C, Dicou E, Czernichow P and Scharfmann R. Presence of nerve growth factor and its receptors in an *in vitro* model of islet cell development: Implication in normal islet morphogenesis. *Endocrinology* 1995a, 136:3154-62.
- 51.- Kanaka-Gantenbein C, Tazi A, Czernichow P and Scharfmann R. In vivo presence of the high affinity nerve growth factor receptor Trk-A in the rat pancreas: Differential localization during pancreatic development. *Endocrinology* 1995b, 136:761-69.
- 52.- Kaplan DR and Miller FD. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Current Opinion in Neurobiology* 2000, 10:381-91.

- 53.- King JC. Maternal obesity, metabolism, and pregnancy outcomes. *Annu Rev Nutr* 2006, 26:271-291.
- 54.- Lara HE, McDonald JK, Ojeda SR: Involvement of nerve growth factor in female sexual development. *Endocrinology* 1990, 126(1):364-375.
- 55.- Larrieta ME, Vital P, Mendoza-Rodriguez A, Cerbon M, Hiriart M. Nerve growth factor increases in pancreatic β cells after streptozotocin-induced damage in rats. *Exp Biol Med* 2006, 231(4):396-402.
- 56.- Lazarovici P, Marcinkiewicz C, and Lelkes PI. Cross-talk between the cardiovascular and nervous systems: angiogenic effects of nerve growth factor (NGF) and neurotrophic effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) implications in drug development. *Curr Pharm Des* 2006, 2: 2609-22.
- 57.- Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 2001, 294(5548):1945-48.
- 58.- Lessmann V, Gottmann K, Malsangio M. Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Prog Neurobiol* 2003, 69: 341-74.
- 59.- Levi-Montalcini R. The nerve growth factor 35 years later. *Science* 1987, 4(237): 1154-62.

- 60.- Levi-Montalcini R, Hamburger V. Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *J Exp Zool* 1951, 116(2):321-61
- 61.- Levi-Montalcini R, Booker B. Destruction of the sympathetic ganglia in mammals by an antiserum to a nerve-growth protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1960, 46(3):384-91.
- 62.- Lim KC, Tyler CM, Lim ST, Giuliano R, Federoff HJ. Proteolytic processing of proNGF is necessary for mature NGF regulated secretion from neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 2007, 28(361): 599-604.
- 63.- Lu B, Pang PT, Woo NH. The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci* 2005, 6: 603-614.
- 64.- Lucini C, Maruccio L, De Girolamo P, Castaldo L. Brain-derived neurotrophic factor in higher vertebrate pancreas: immunolocalization in glucagon cells. *Anatomy and Embriology* 2003, 4:311-18.
- 65.- Maggiwar SB, Sarmiere PD, Dewhurst S and Freeman RS. Nerve growth factor-dependent activation of NFkB contributes to survival of sympathetic neurons. *J Neurosci* 1998, 18:10356-65.
- 66.- Mamidipudi V, Wooten MW. Dual role for p75 (NTR) signaling in survival and cell death: can intracellular mediators provide an explanation? *J Neurosci Res* 2002, 15;68(4):373-84.

- 67.- Meléndez-Herrera E, Colín-Castelán D, Varela-Echavarría A, Gutiérrez-Ospina G. Semaphorin-3A and its receptor neuropilin-1 are predominantly expressed in endothelial cells along the rostral migratory stream of young and adult mice. *Cell Tissue Res* 2008, 333: 175-184.
- 68.- Miao G, Mace J, Kirby M, Hopper A, Peverini R, Chinnock R, Shapiro J, Hathout E. Beneficial effects of nerve growth factor on islet transplantation. *Transplant Proc* 2005, 37(8):3490-92.
- 69.- Miralles F, Philippe P, Czernichow P, Scharfmann R. Expression of nerve growth factor and its high-affinity receptor Trk-A in the rat pancreas during embryonic and fetal life. *J Endocrinology* 1998, 156: 431–39.
- 70.- Moser KV, Reindl M, Blasig I, Humpel C. Brain capillary endothelial cells proliferate in response to NGF, express NGF receptors and secrete NGF after inflammation. *Brain Res* 2004, 1017(1-2):53-60.
- 71.- Mukoyama YS, Shin D, Britsch S, Taniguchi M, Anderson DJ. Sensory nerves determine the pattern of arterial differentiation and blood vessel branching in the skin. *Cell* 2002, 14;109(6):693-705.
- 72.- Muller D, Davidoff MS, Bargheer O, Paust HJ, Pusch W, Koeva Y, Jezek D, Holstein AF, Middendorff R. The expression of neurotrophins and their receptors in the prenatal and adult human testis: evidence for functions in Leydig cells. *Histochem Cell Biol* 2006, 126(2):199-211.

73.- Muller G, Storz P, Bourtelle S, Doppler H, Pfizenmaier K, Mischak H, Philipp A, Kaiser C, Kolch W. Regulation of Raf-1 kinase by TNF via its second messenger ceramide and crosstalk with mitogenic signalling. *EMBO J* 1998, 17:732-42.

74.- Myrsen U, Keymeulen B, Pipeleers DG, Sundler F: Beta cells are important for islet innervation: evidence from purified rat islet-cell grafts. *Diabetologia* 1996, 39(1):54-59.

75.- Navarro-Tableros V, Fiordeliso T, Hernandez-Cruz A, Hiriart M. Nerve Growth Factor promotes development of glucose-induced insulin secretion in rat neonate pancreatic β cells by modulating calcium channels. *Channels* 2007, 1(6): e1-e9.

76.- Navarro-Tableros V, Fiordeliso T, Hernandez-Cruz A, Hiriart M: Physiological development of insulin secretion, calcium channels, and GLUT2 expression of pancreatic rat beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007, 292(4):E1018-1029.

77.- Navarro-Tableros V, Sanchez-Soto MC, Garcia S, Hiriart M: Autocrine regulation of single pancreatic beta-cell survival. *Diabetes* 2004, 53(8):2018-2023.

78.- Nico B, Mangieri D, Benagiano V, Crivellato E, Ribatti D. Nerve growth factor as an angiogenic factor. *Microvasc Res* 2008, 75(2):135-41.

79.- Nikolova G, Strilic B, Lammert E: The vascular niche and its basement membrane. *Trends Cell Biol* 2007, 17(1):19-25.

- 80.- Nisoli E, Tonello C, Benarese M, Liberini P, Carruba MO. Expression of nerve growth factor in brown adipose tissue: implications for thermogenesis and obesity. *Endocrinology* 1996, 137: 495-503.
- 81.- Ohtani O, Wang QX. Comparative analysis of insulo-acinar portal system in rats, guinea pigs, and dogs. *Microsc Res Tech* 1997, 37(5-6):489-96
- 82.- Ono M, Ichihara J, Nonomura T, Itakura Y, Taiji M, Nakayama C, Noguchi H. Brain derived neurotrophic factor reduces blood glucose level in obese diabetic mice but not in normal mice. *Biochem Biophys Res Commun* 1997, 18:633-37
- 83.- Orci L, Unger RH. Functional subdivision of islets of Langerhans and possible role of D cells. *Lancet* 1975, 20;2(7947):1243-4.
- 84.- Patapoutian A and Reichardt LF. Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Current Opinion in Neurobiology* 2001, 11: 272-80.
- 85.- Peeraully MR, Jenkins JR, Trayhurn P. NGF gene expression and secretion in white adipose tissue: regulation in 3T3-L1 adipocytes by hormones and inflammatory cytokines. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004, 287: E331-339.
- 86.- Pedraza CE, Podlesniy P, Vidal N, Arévalo JC, Lee R, Hempstead B, Ferrer I, Iglesias M, Espinet C. Pro-NGF isolated from the human brain affected by Alzheimer's disease induces neuronal apoptosis mediated by p75NTR. *Am J Pathol* 2005, 166(2):533-43

87.- Peng S, Wu J, Mufson EJ, Fahnstock M. Increased proNGF levels in subjects with mild cognitive impairment and mild Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004, 63(6):641-9.

88.- Persson-Sjogren S, Holmberg D, Forsgren S. Remodeling of the innervation of pancreatic islets accompanies insulinitis preceding onset of diabetes in NOD mouse. *J of Neuroimmunology* 2005, 158:128-137.

89.- Pierucci D, Cicconi S, Bonini P, Ferrelli F, Pastore D, Matteucci C, Marselli L, Marchetti P, Ris F, Halban P, Oberholzer J, Federici M, Cozzolino F, Lauro R, Borboni P, Marlier LN: NGF-withdrawal induces apoptosis in pancreatic beta cells in vitro. *Diabetologia* 2001, 44:1281–1295.

90.- Purves D, Snider WD, Voyvodic JT. Trophic regulation of nerve cell morphology and innervation in the autonomic nervous system. *Nature* 1988, 10; 336:123-28.

91.- Raychaudhuri SK, Raychaudhuri SP, Weltman H, Farber EM. Effect of nerve growth factor on endothelial cell biology: proliferation and adherence molecule expression on human dermal microvascular endothelial cells. *Arch Dermatol Res* 2001, 293(6):291-5.

92.- Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006, 361(1473):1545-64.

- 93.- Reimer MK, Mokshagundam SP, Wyler K, Sundler, Ahrén B and Stagner JI. Local growth factors are beneficial for the autonomic reinnervation of transplanted islet in rats. *Pancreas* 2003, 26(4):392-97.
- 94.- Reissmann E, Ernsberger U, Francis-West PH, Rueger D, Brickell PM, Rohrer H. Involvement of bone morphogenetic protein-4 and bone morphogenetic protein-7 in the differentiation of the adrenergic phenotype in developing sympathetic neurons. *Development* 1996, 122(7):2079-88.
- 95.- Ronne H, Anundi H, Rask L, Peterson PA. 7S Nerve growth factor alpha and gamma subunits are closely related proteins. *Biochemistry* 1984, 23(6):1229-34.
- 96.- Rosenbaum T, Castanares DT, Lopez-Vaides HE, Hiriart M. Nerve growth factor increases L-type calcium current in pancreatic beta cells in culture. *J Membr Biol* 2002, 186(3):177-84
- 97.- Rosenbaum T, Sánchez-Soto MC, Hiriart M. Nerve growth factor increases insulin secretion and barium current in pancreatic β -cells. *Diabetes* 2001, 50:1755-62.
- 98.- Rosenbaum T, Vidaltamayo R, Sánchez-Herrera D, and Hiriart M. Nerve growth factor increases sodium current in pancreatic β cell. *J Membr Biol* 1996, 153:53-58.

99.- Rosenbaum T, Vidaltamayo R, Sanchez-Soto MC, Zentella A and Hiriart M. Pancreatic β cells synthesize and secrete nerve growth factor. Proc Natl Acad Sci USA 1998, 95:7784-88.

100.- Salvioli B, Bovara M, Barbara G, De Ponti F, Stanghellini V, Tonini M, Guerrini S, Cremon C, Degli Esposti M, Koumandou M, Corinaldesi R, Sternini C, De Giorgio R. Neurology and Neuropathology of the Pancreatic Innervation JOP 2002, 3(2):26-33.

101.- Saravia F, Homo-Delarche F. Is innervation an early target in autoimmune diabetes? Trends Immunol 2003, 24: 574-579.

102.- Schreiber R, Levy J, Loewenthal N, Pinsk V, HersHKovitz E. Decreased first phase insulin response in children with congenital insensitivity to pain with anhidrosis. J Pediatr Endocrinol Metab 2005, 18: 873-7.

103.- Selby MJ, Edwards R, Sharp F, Rutter WJ. Mouse nerve growth factor gene: structure and expression. Mol Cell Biol 1987, 7(9):3057-64.

104.- Shibayama E, Koizumi H. Cellular localization of the Trk neurotrophin receptor family in human non-neuronal tissues. Am J Pathol 1996, 148(6):1807-18.

105.- Silva AM, Queiroz DB, Castro Neto EF, Naffah-Mazzacoratti Mda G, Godinho RO, Porto CS, Gutierrez-Ospina G, Avellar MC: Segment-specific decrease of both catecholamine concentration and acetylcholinesterase activity are accompanied by nerve refinement in the rat cauda epididymis during sexual maturation. *J Androl* 2002, 23(3):374-383.

106.- Smeyne RJ, Klein R, Schnapp A, Long LK, Bryant S, Lewin A, Lira SA, Barbacid M. Severe sensory and sympathetic neuropathies in mice carrying a disrupted Trk/NGF receptor gene. *Nature* 1994, 368(6468):246-249.

107.- Srinivasan B, Roque CH, Hempstead BL, Al-Ubaidi MR, Roque RS. Microglia-derived proneurone growth factor promotes photoreceptor cell death via p75 neurotrophin receptor. *J Biol Chem* 2004, 279(40):41839-845.

108.- Steinle JJ, Granger HJ. Nerve growth factor regulates human choroidal, but not retinal, endothelial cell migration and proliferation. *Auton Neurosci* 2003,108(1-2):57-62

109.- Teitelman G, Lee JK. Cell lineage analysis of pancreatic islet development: glucagon and insulin cells arise from catecholaminergic precursors present in the pancreatic duct. *Dev Biol* 1987, 121:454-66.

110.- Tomlinson DR, Fernyhough P, Diemel LT. Role of neurotrophins in diabetic neuropathy and treatment with nerve growth factors. *Diabetes* 1997, (Suppl. 1) 46: S43–S49

- 111.- Tucker KL, Meyer M, Barde YA. Neurotrophins are required for nerve growth during development. *Nat Neurosci* 2001, 4(1):29-37.
- 112.- Vasir B, Reitz P, Xu G, Sharma A, Bonner-Weir S, Weir GC: Effects of diabetes and hypoxia on gene markers of angiogenesis (HGF, cMET, uPA and uPAR, TGF-alpha, TGF-beta, bFGF and Vimentin) in cultured and transplanted rat islets. *Diabetologia* 2000, 43(6):763-772.
- 113.- Vidaltamayo R, Mery CM, Ángeles-Ángeles A, Robles-Díaz G and Hiriart M. Expression of nerve growth factor in human pancreatic β cells. *Growth Factors* 2003, 21(3-4):103-07.
- 114.- Vidaltamayo R, Sánchez-Soto MC, Hiriart M. Nerve growth factor increases sodium channel expression in pancreatic beta cells: implications for insulin secretion. *FASEB J* 2002, 16(8):891-2.
- 115.- Vidaltamayo R, Sanchez-Soto MC, Rosenbaum T, Martínez-Merlos T, Hiriart M. Neuron-like phenotypic changes in pancreatic β -cells induced by NGF, FGF, and dbcAMP. *Endocrine* 1996, 4(1):19-26.
- 116.- Varon S, Nomura J, Shooter EM. The isolation of the mouse nerve growth factor protein in a high molecular weight form. *Biochemistry* 1967, 6(7):2202-09.
- 117.- Weinstein BM. Vessels and nerves: marching to the same tune. *Cell* 2005,11;120(3):299-302.

118.- Wekstein DR.. Heart rate of the preweanling rat and its autonomic control. Am J Physiol. 1965 Jun;208:1259-62.

119.- Yamanaka M, Itakura Y, Inoue T, Tsuchida A, Nakagawa T, Noguchi H, Taiji M. Protective effect of brain-derived neurotrophic factor on pancreatic islets in obese diabetic mice. Metabolism 2006, 55(10):1286-92.

120.- Yamashita T, Fujitani M, Hata K, Mimura F, Yamagishi S. Diverse functions of the p75 neurotrophin receptor. Anat Sci Int 2005, 80(1):37-41.

121.- Zundel W, Swiersz LM, Giaccia A. Caveolin 1-mediated regulation of receptor tyrosine kinase-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity by ceramide. Mol Cell Biol 2000, 20:1507-14.



RINCÓN DEL RESIDENTE

El control neurotrófico en el desarrollo y la función de dos órganos endocrinos: el ovario y el páncreas

Siraam Cabrera-Vásquez*

* Departamento de Biofísica, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México.

Neurotrophic control in the development and function of two endocrine organs: The ovary and the pancreas

ABSTRACT

Neurotrophins (NTs) are important for the survival, differentiation and function of sympathetic and sensorial neurons of central and peripheral nervous system. However, similar functions have been described of NTs in non-neural organs. Nerve Growth factor (NGF) participates in the folliculogenesis and ovulation in the ovary, as well as in the islet morphogenesis and insulin secretion of the pancreatic β cell. The NTs act by binding to two distinct classes of transmembrane receptors: p75 and Trks. Both receptor types lead to activation of intracellular signaling cascades that end with cell survival or apoptosis. In this review different actions of the NTs in the ovarian and the pancreas are described.

Key words. Neurotrophins. Ovary. Pancreas. Innervation.

INTRODUCCIÓN

Las NTs pertenecen a la familia de los factores neurotróficos, de la que destacan cuatro miembros: el factor de crecimiento neuronal (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la neurotrofina 3 (NT3) y la neurotrofina 4/5 (NT 4/5).¹ Los cuatro factores son derivados de un gen ancestral común y son similares en secuencia y estructura. El NGF fue la primera neurotrofina en ser caracterizada. Su descubrimiento se debe al trabajo de Rita

RESUMEN

Las neurotrofinas (NTs) son indispensables para la sobrevivencia, la diferenciación y la función de neuronas simpáticas y sensoriales del sistema nervioso central y periférico. Sin embargo, se han descrito funciones similares de las NTs en órganos no neuronales. El factor de crecimiento neuronal (NGF) participa en la foliculogénesis y la ovulación en el ovario, así como en la morfogénesis del islote y en la secreción de insulina por la célula β pancreática. Las NTs median sus funciones al unirse a dos diferentes tipos de receptores transmembranales: los Trks y el p75. Ambos tipos de receptores inducen la activación de cascadas de señalización que finalizan con sobrevivencia celular o apoptosis. En esta revisión se describen diferentes acciones de las NTs en el ovario y el páncreas.

Palabras clave. Neurotrofinas. Ovario. Páncreas. Inervación.

Levi-Montalcini, Victor Hamburger y Elmer Bueker.² Ellos describieron que los sarcomas de ratón implantados en embriones de pollo producían una molécula que inducía su propia inervación. Posteriormente, los primeros dos autores junto con Stanley Cohen la purificaron en este tipo de sarcomas, en el veneno de víbora y en la glándula maxilar del ratón. A esta molécula le nombraron NGF.²

Las NTs juegan un papel importante en el desarrollo y función del sistema nervioso. Participan en una amplia gama de funciones como el crecimiento

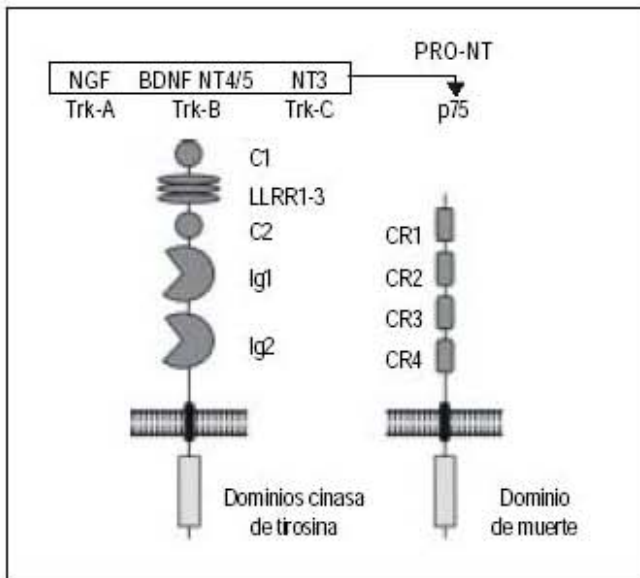


Figura 1. Las dos clases de receptores para las NTs: el Trk y el p75: El receptor Trk, presenta en su porción extracelular motivos ricos en leucinas (LRR1-3), dos grupos de cisteínas (C1 y C2) y dos dominios parecidos a inmunoglobulinas (Ig1 e Ig2). El NGF se une al Trk-A, el BDNF y la NT 4/5 se unen al Trk-B y la NT3 se une al Trk-C. Los Trks se unen a sus ligandos con alta afinidad. La unión específica de cada Trk es proporcionada por el dominio 2 parecido a la inmunoglobulina. En su porción intracelular se localizan los dominios de cinasa de tirosinas. El receptor p75 contiene en su dominio extracelular cuatro repeticiones de cisteína (CR1, CR2, CR3 y CR4). También contiene un dominio de muerte intracitoplasmático. Este receptor tiene la capacidad de unir a las cuatro NTs: NGF, BDNF, NT4/5 y a NT3 con baja afinidad y a las proneurotrofinas (PRO-NT) con alta afinidad (modificado de *Genes and Development* 2000;14: 2919-2937).

de los axones y su guía hacia los órganos blanco, la estructura y la arborización de las dendritas, la formación y la plasticidad sináptica.³ Asimismo, participan en la supervivencia neuronal; además de ejercer otras funciones en órganos no neuronales como el desarrollo del corazón, la función del sistema inmunológico³ y de algunos órganos endocrinos como el ovario,⁴ el testículo⁵ y el páncreas.^{6,7} Las NTs son las formas maduras de las proneurotrofinas, mismas que son procesadas por proteasas extracelulares como la metaloproteínasa de matriz⁷ y la plasmina.⁸

Ejercen sus funciones biológicas a través de su unión a dos tipos de receptores transmembranales, unos de alta afinidad denominados Trks y otro tipo de baja afinidad, que es compartido por todas las NTs, denominado p75.^{9,10} Los Trks son receptores con actividad intracelular de cinasa de tirosinas.¹¹ En los mamíferos se han descrito tres genes que expresan los diferentes receptores Trks. El Trk-A, el

Trk-B y el Trk-C, que unen respectivamente NGF, BDNF y NT 4/5 (Figura 1).¹¹ El receptor p75 es un miembro de la familia del receptor del factor de necrosis tumoral,¹² al cual se unen las NTs con menor afinidad que a los Trks. Puede interactuar con los Trks a través de ciertos dominios de unión¹³ y se une con mayor afinidad a las proneurotrofinas.^{8,14}

La interacción de las NTs con los receptores Trks induce una serie de cascadas de fosforilaciones intracelulares que conducen a la supervivencia celular, mientras que la unión de proneurotrofinas a p75 conduce a la apoptosis celular.⁸

Señales intracelulares inducidas por los receptores Trks

La unión de las NTs a los receptores Trks induce su transfosforilación y el reclutamiento de proteínas adaptadoras que presentan dominios de unión a la porción citoplasmática del receptor. Algunas de estas proteínas adaptadoras contienen un dominio Shc (dominio de homología a la proteína Src). Otras proteínas adaptadoras son la Grb-2, la proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina SOS (Son of Sevenless) y proteínas de la familia de Gab-1/sustrato de receptor de la insulina 1 y 2 (IRS-1 y 2).¹⁵ El reclutamiento de SOS induce la activación de la proteína G pequeña Ras. Ras activa la vía de señalización de la cinasa de la proteína MAPK / cinasa de la proteína activada por mitógeno (raf/MEK/MAPK) y la de la cinasa de fosfatidilinositol-3 / cinasa de la proteína B (PI-3K/Akt). Ambas vías regulan la supervivencia celular.

La vía raf/MEK/MAPK activa a la cinasa S6 ribosomal (Rsk) y a la proteína de unión a elementos de respuesta de AMPc (CREB), este factor de transcripción induce la expresión de genes antiapoptóticos como el que codifica para Bcl-2. La transfosforilación de los Trks prolonga la actividad de la MAPK al fosforilar a la proteína transmembranal rica en anquirinas (ARMS) (Figura 2).¹⁶

La vía PI-3K/Akt es activada por tres proteínas adaptadoras: Shc, Grb-2 y Gab-1. La PI-3K activa directamente a las proteínas inhibitoras de la apoptosis (IAPs) y estimula la actividad de cinasa dependiente de fosfoinosítidos 1 y 2 (PDK1 y 2), las cuales a su vez activan a Akt.

Akt activada induce la fosforilación de la proteína Bad promoviendo su asociación con otra llamada 14-3-3, previniendo de esta manera su unión con la proteína antiapoptótica Bcl-2. Además, Akt fosforila e inhibe a Forkhead y a p53, factores transcripcionales que inducen la transcripción de algunos genes

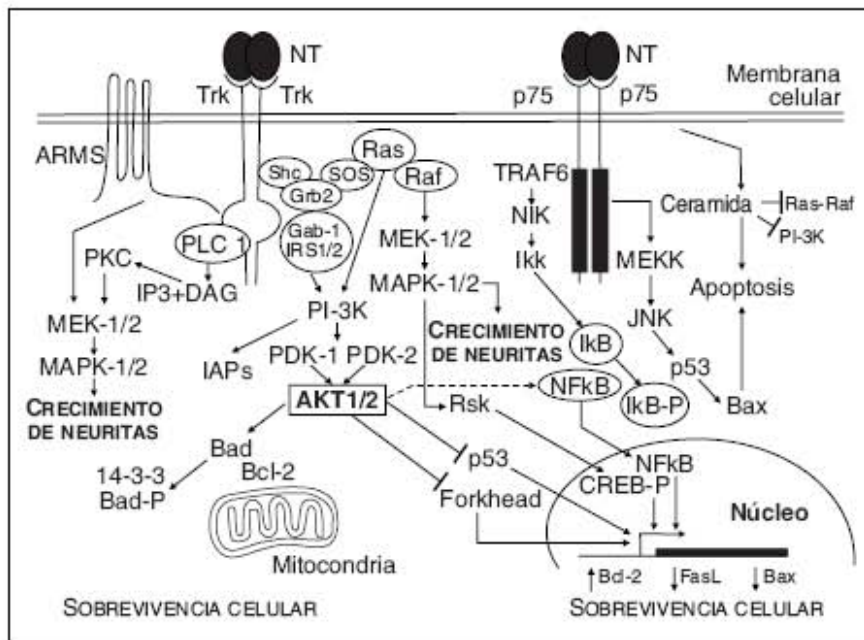


Figura 2. Vías de señalización celular de Trk y de p75. Las vías de PI-3K/Akt y la de raf/MEK/MAPK inducidas por los Trks regulan la supervivencia celular y el crecimiento de neuritas en algunos tipos de neuronas. Mientras que p75 puede regular la supervivencia celular y la apoptosis. La activación de los receptores Trks y p75 pueden converger en la activación de NFkB induciendo un sinergismo para la supervivencia celular (flecha discontinua). NT: Neurotrofina.

como los que codifican para el ligando de Fas y para Bax, respectivamente (Figura 2).¹⁵ Todos estos eventos evitan la apoptosis celular.

La fosfolipasa C- γ 1 (PLC- γ 1) se une al dominio citoplasmático del receptor a través de su dominio SH2. Esta enzima hidroliza fosfoinosítidos de membrana y genera inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). El IP3 induce liberación de calcio de los depósitos intracelulares y el incremento del calcio citoplasmático. El DAG estimula la actividad de PKC reguladas por calcio. Ambas moléculas pueden participar en el crecimiento de neuritas (Figura 2).¹⁵

Señales intracelulares inducidas por p75

La activación de p75 promueve la supervivencia en algunos tipos de neuronas y la apoptosis en otros.¹⁷ Una vía importante que promueve la supervivencia celular de algunas poblaciones neuronales se lleva a cabo por la activación del factor nuclear kappa B (NF- κ B). La activación de p75 induce la fosforilación del factor inhibidor B (I κ B), resultando en la liberación del factor de transcripción NF- κ B. En esta vía de señalización, p75 colabora con Trk para inducir la supervivencia de neuronas simpáticas¹⁸ y sensoriales (Figura 2).¹⁹

Sin embargo, la unión de las NTs con el receptor p75 también puede inducir apoptosis al activar la hidrólisis de la esfingomielina y la producción de ceramida. La ceramida se une a Raf e induce la formación de complejos Raf-Ras inactivos que inhi-

ben la cascada de señalización de la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK).²⁰ Además, la ceramida también inhibe a la vía de PI-3K/Akt.²¹ La inhibición de ambas vías promueve la apoptosis celular. Otra forma de inducción de apoptosis por p75 se lleva a cabo por la activación de la vía de la cinasa del amino terminal de jun (JNK)-p53-Bax (Figura 2). Se ha sugerido que la presencia o ausencia de sortilina, un correceptor de p75, determina si las proneurotrofinas inducen o no a la apoptosis celular.⁸ Las señales apoptóticas de p75 se inducen sólo si Trk está inactivo. La activación de PI-3K por NGF inhibe la hidrólisis de la esfingomielina dependiente de p75 en células PC-12, lo que sugiere que el Trk-A puede contrarrestar las señales de apoptosis que resultan de la unión de NGF con p75.²²

Como hemos mencionado, las NTs también participan en el desarrollo y la función del ovario⁴ y del páncreas.^{6,7} El propósito de esta revisión es describir los mecanismos celulares inducidos por las NTs para llevar a cabo ambas acciones.

EL CONTROL NEUROTRÓFICO EN EL DESARROLLO DEL OVARIO

Estudios en ratas y ratones han demostrado que los genes que codifican para las cuatro NTs: NGF, BDNF, NT3 y NT4/5, y sus receptores TrkA, TrkB, TrkC y p75, se expresan en el ovario de rata en el estadio fetal y posnatal antes del inicio de la foliculogénesis.^{23,24} Además se demostró, mediante la técni-

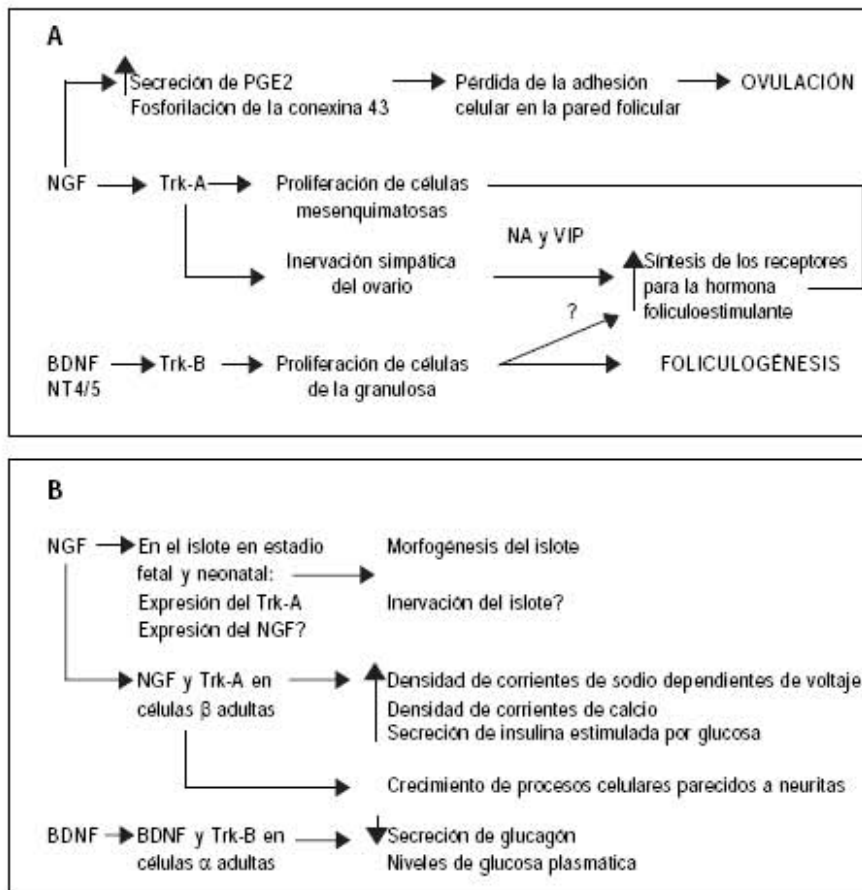


Figura 3. El control neurotrófico en el desarrollo y la función del ovario y del páncreas. **A.** En el ovario el NGF induce la proliferación de células mesenquimatosas y el desarrollo de su inervación simpática, además de participar en la ovulación. Mientras que el BDNF y la NT4/5 inducen la proliferación de las células de la granulosa. El NGF participa en la foliculogénesis incrementando la síntesis de los receptores para la hormona foliculoestimulante, aunque esto no está muy claro para el BDNF y la NT4/5. **B.** En el páncreas, se sugiere que el NGF contribuye a la morfogénesis del islote. Su papel en la inervación aun no se conoce claramente. A su vez, el NGF participa en la fisiología de la célula β adulta al incrementar la secreción de la insulina estimulada con glucosa e inducir el crecimiento de neuritas. El papel de BDNF en la disminución de la secreción de glucagón y los niveles de glucosa plasmática requiere mayores estudios. NA: Noradrenalina. VIP: Péptido intestinal vasoactivo.

ca de reacción de la cadena de la polimerasa acoplada a la transcriptasa reversa (RT-PCR), que también se expresan en ovarios de fetos humanos de 13 y 21 semanas de gestación.²⁵

El NGF en el desarrollo del ovario

Mediante ensayos de protección de RNAsa se ha demostrado que los RNAm para el NGF y su receptor Trk-A se expresan en el ovario de la rata durante el desarrollo fetal tardío. Los niveles de ambos, disminuyen entre las 24 y 48 horas posnatal, durante la foliculogénesis. Posteriormente, se mantienen en bajos niveles hasta la pubertad.²³ Además, mediante hibridación *in situ* e inmunofluorescencia se ha detectado el RNAm y la proteína del receptor Trk-A en las células de la granulosa y en los ovocitos en la etapa posnatal.²⁶

El NGF participa en el desarrollo del ovario por dos mecanismos funcionalmente relacionados: a) la maduración de las células ováricas y b) la inducción de su inervación. Se ha propuesto también que el NGF participa en la proliferación de las células me-

senquimatosas del ovario durante la etapa fetal.²⁷ Los ratones neonatales "knock-out" (KO) o deficientes de NGF (KO-NGF) presentan una disminución de cerca de la mitad en la proliferación de estas células, con respecto a los ratones silvestres.²⁶

El NGF es necesario para la foliculogénesis temprana. Los ratones KO-NGF de una semana de edad posnatal presentan una disminución en el número de folículos primarios y secundarios comparados con ovarios de ratones silvestres.²⁶ Esta disminución no es causada por deficiencia de gonadotropinas, ya que los ratones KO-NGF presentan niveles séricos de la hormona foliculoestimulante (FSH) y luteinizante (LH) similares a los ratones silvestres.²⁶

Por otro lado, se ha demostrado que al neutralizar durante los primeros tres días de vida posnatal el efecto del NGF con un anticuerpo anti-NGF en ratas, el ovario sufre una pérdida completa de la inervación simpática, lo cual se observa en la etapa prepuberal.⁴ La inervación simpática del ovario participa en la foliculogénesis temprana al inducir la síntesis de receptores para gonadotropinas en los folículos en desarrollo, lo que aumenta su sensibili-

dad a estas hormonas.²⁷ Se ha sugerido que este efecto es mediado por un aumento de la concentración de AMPc por neurotransmisores como la noradrenalina (NA) y el péptido intestinal vasoactivo (VIP), presentes en los ovarios antes de la foliculogénesis.

Resultados alternos *in vitro*, demostraron que la exposición de ovarios de ratas neonatas a agonistas beta-adrenérgicos o VIP incrementan los niveles de RNAm y de la proteína para el receptor de la FSH (FSHr).²⁸ Además, los ovarios de ratones KO-NGF en el estadio posnatal, presentan una disminución en los niveles de RNAm de FSHr con respecto a los ratones silvestres.²⁹ Estos resultados, demuestran la participación del NGF en la foliculogénesis temprana y en la innervación simpática del ovario (Figura 3a).

Por último, el tratamiento con NGF a células de la granulosa de humano en cultivo, induce un incremento en la secreción de estradiol (E2), en los niveles del RNAm del FSHr y en su biosíntesis. Además de una inhibición de la secreción de progesterona.³⁰ Estos resultados sugieren que el NGF podría prevenir la luteinización temprana en los ovarios preovulatorios.

El BDNF y la NT 4/5 en el desarrollo del ovario

El BDNF y la NT 4/5 también participan en la foliculogénesis.³¹ Mediante técnicas de inmunohistoquímica se detectó al receptor Trk-B en la membrana de los ovocitos de folículos primarios y secundarios de ratones de siete días posnatal. Sus ligandos, el BDNF y la NT4/5, se observaron predominantemente en las células de la granulosa.³² Los ratones KO-Trk-B y dobles KO-BDNF y KO-NT4/5 presentan una reducción significativa en el número de folículos secundarios con respecto a los ratones silvestres. Esta reducción es secundaria a una disminución en la proliferación y no en la apoptosis de las células de la granulosa.³² En células mesenquimatosas de ratones KO-NGF neonatos se observan estos mismos cambios, lo que sugiere que la proliferación celular representa un mecanismo general usado por las NTs para regular la foliculogénesis.

Los ratones KO-Trk-B, también presentan una disminución significativa en los niveles de RNAm de los FSHr, degeneración de los oocitos y pérdida de la organización folicular en el estadio posnatal.³² Los ratones KO-Trk-C no presentan defectos en la foliculogénesis.²⁴

EL CONTROL NEUROTROFICO EN LA FUNCIÓN DEL OVARIO

El NGF participa en la ovulación.⁴ La maduración del folículo es inducida por diferentes estímulos hormonales como la LH, que induce la ruptura de la pared folicular. Además, participan una serie de moléculas como las interleucinas,³³ las prostaglandinas y la desintegrina y metaloproteinasas con motivos de trombospondina-1 (ADAMTS-1).³⁴ En la etapa preovulatoria existe un incremento en los niveles del RNAm del NGF y de su receptor Trk-A, posterior a un aumento en los niveles de LH.³⁵

La secreción de LH estimula la síntesis de la interleucina 1b (IL-1 β) en el ovario.³⁶ Por su parte, la IL-1 β , incrementa la expresión de los genes de NGF y Trk-A en las células ováricas. Este aumento es inhibido por un antagonista natural de los receptores para IL-1 β , el IL-1ra.³⁵ IL-1 β incrementa la secreción de prostaglandina E2 (PGE2) de células ováricas aisladas en cultivo. Este efecto se atenúa cuando las células se tratan con anticuerpos anti-NGF o con un inhibidor de la actividad cinasa de tirosinas de Trk-A como es el K252a. Además, la administración de anticuerpos anti-NGF o de K252a a ratas, bloquea la ovulación inducida por gonadotropina sérica de yegua preñada (PMSG).³⁵ Estos datos también sugieren que el NGF participa en la ovulación.

Utilizando células de la teca de folículos preovulatorios de bovino y transfectadas con el gen del Trk-A,³⁷ se observó que el NGF induce la fosforilación en serinas de la conexina 43 en estas células. La conexina 43 es la principal proteína constituyente de las uniones comunicantes en los folículos preovulatorios. La fosforilación de la conexina 43 por NGF induce una ruptura de la comunicación entre las células de la teca. Lo anterior se observó al reducirse la habilidad de estas células para transferir marcadores fluorescentes entre ellas por las uniones comunicantes.³⁸ Estos resultados sugieren que la activación de los receptores Trk-A por el NGF induce pérdida de la adhesión celular que ocurre en la pared folicular antes de la ovulación (Figura 3A).

EL CONTROL NEUROTROFICO EN EL DESARROLLO DEL PÁNCREAS

El páncreas es una glándula mixta, es decir, está constituida por una porción exocrina y una endocrina. La porción exocrina incluye a las células de los conductos y a las células acinares. Mientras que la porción endocrina está formada por los islotes pan-

creáticos, que son agregados formados por cuatro tipos celulares distintos, que incluyen:

- Células β productoras de insulina.
- Células α productoras de glucagón.
- Células δ productoras de somatostatina.
- Células PP productoras de polipéptido pancreático.

El NGF en el desarrollo del páncreas

No se conoce mucho sobre el papel del NGF en el desarrollo del páncreas. Se sabe que el Trk- A, receptor del NGF, se expresa en los islotes de rata fetal y en las células del conducto pancreático durante el desarrollo fetal.³⁹ Esta expresión persiste al nacimiento y en la edad adulta sólo se expresa en las células β .³⁹ El NGF participa en la morfogénesis del islote, ya que el uso del K252a retarda significativamente la morfogénesis de islotes *in vitro*.⁶ Sin embargo, se desconoce si las células del islote fetal sintetizan y secretan el NGF o si este factor proviene de algún otro tejido.

Por otro lado, existen evidencias de que el NGF incrementa la inervación simpática del páncreas bajo circunstancias no fisiológicas. En un modelo de ratón transgénico de NGF específico de las células β pancreáticas, se observó desde la etapa fetal de la rata una hiperinervación simpática de los islotes pancreáticos.⁴⁰ Además, el tratamiento local con NGF incrementa la inervación simpática en islotes transplantados a ratas diabéticas.⁴¹ Estos datos sugieren que el NGF podría tener una participación en la ontogenia del páncreas y en el desarrollo de su inervación simpática (Figura 3B).

EL CONTROL NEUROTRÓFICO EN LA FUNCIÓN DEL PÁNCREAS

El NGF en la función de la célula β pancreática

Resultados de nuestro laboratorio han demostrado que las células β de rata adulta sintetizan y secretan NGF, en respuesta al aumento en la concentración de glucosa extracelular.⁷ Además, el NGF también se expresa en las células β de islotes de humano adulto.⁴² Las células β adultas cultivadas por cinco días y tratadas con NGF, secretan más insulina en respuesta a la estimulación con 20.6 mM de glucosa que con 5.6 mM.⁴³ Esto se explica, al menos en parte, porque el tratamiento a largo plazo de las células β adultas con NGF, incrementa la densidad de las corrientes de sodio y calcio tipo L sensibles al voltaje^{44,45} y

las corrientes de calcio (Ca^{2+}) a través de los canales de Ca^{2+} .⁴⁶

Cuando se cultivan células β con K252a hay una disminución del RNAm de insulina, así como de su secreción,⁴⁷ lo que demuestra que el NGF modula positivamente su biosíntesis y su secreción. Otros resultados de nuestro laboratorio y de otros autores demuestran que el NGF es un importante regulador de la sobrevivencia de las células β aisladas,⁴⁷ así como de islotes *in vitro*.⁴⁸ Además, ratas tratadas con estreptozotocina (un fármaco que puede inducir apoptosis de las células β) presentan un incremento en la expresión del gen del NGF y en su secreción por las células β .⁴⁹ Esto sugiere que el NGF induce efectos protectores en la sobrevivencia de las células β tanto *in vitro* como *in vivo*.

Por último, nuestro grupo también ha demostrado que el NGF es capaz de modular la plasticidad de la célula β , ya que promueve el crecimiento de procesos celulares parecidos a neuritas en cultivos primarios de células insulares adultas y fetales, efecto que se potencia con un análogo permeable del AMPc, el dibutilil AMPc (dbcAMP).⁴³

El BDNF en la función de células insulares

Estudios de inmunohistoquímica en cortes de páncreas de ratón, pato y lagartija, han demostrado que el BDNF se colocaliza con el glucagón en las células α del islote pancreático.⁵⁰ Asimismo, el receptor Trk-B ha sido observado específicamente en las células α de islotes pancreáticos de ratón⁵¹ y de humanos.⁵²

La inyección subcutánea de BDNF a ratones obesos y diabéticos (db/db) reduce los niveles de glucosa plasmática.⁵³ Se postula que este efecto se lleva a cabo, al incrementar la concentración de insulina pancreática y disminuir la de glucagón. Además, en estos mismos ratones inyectados, el BDNF induce una organización de la arquitectura del islote (células β en el centro y α en la periferia), misma que no se observa en los ratones db/db controles. También, incrementa la masa de células β , así como el número de sus gránulos secretorios y disminuye la masa de células no β (células α y δ). Todo esto sugiere que el BDNF previene el mal funcionamiento del páncreas en el ratón db/db al mantener una mejor organización histológica del islote y restaurar los niveles de gránulos secretorios en las células β .⁵⁴

Por último, cultivos de islotes aislados de páncreas de ratones silvestres durante siete días y tratados con 10 ng/mL de BDNF demostraron una disminución significativa en la secreción de glucosa.

gón al compararla con sus controles.⁵¹ Esto sugiere que el BDNF es uno de los reguladores negativos de la secreción de glucagón, hormona contrarreguladora de las acciones de la insulina (Figura 3B).

CONCLUSIONES

La maduración del ovario requiere la participación del NGF, el BDNF y la NT 4/5. Estas NTs parecen tener funciones complementarias en la folículoogénesis al regular la proliferación y la diferenciación de las células que constituyen el folículo ovárico, las cuales incluyen a las células mesenquimatosas, a las células de la granulosa y al ovocito. Observaciones tanto en ovarios de roedores como ovarios humanos, así lo sugieren. En los folículos preovulatorios humanos se ha observado mediante inmunohistoquímica la presencia de las NTs NGF, BDNF, NT3 y NT4; además de sus receptores Trk-A, Trk-B y Trk-C en las células de la granulosa y óvulos de estos folículos.⁵⁵

Asimismo, es clara la participación del NGF en la ovulación al inducir la pérdida de la adhesión celular en la pared del folículo ovárico.³⁸ Por otro lado, estudios recientes *in vitro* e *in vivo* en cultivos, han demostrado que el NGF incrementa la biosíntesis del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) promoviendo así la angiogénesis en los ovarios.⁵⁶

Las evidencias descritas anteriormente establecen con claridad la participación de las NTs en el desarrollo y la función del ovario. Estas acciones son ejercidas por la unión de la NTs a sus receptores, los Trk y el p75. La activación de estos receptores induce una serie de señales intracelulares de supervivencia y desarrollo de las células que los expresan, además de señales de apoptosis celular.

En el páncreas adulto, la participación de las NTs en su función también es clara. Sin embargo, su participación en su desarrollo y función durante etapas tempranas aún requiere de muchos estudios. Kanaka y cols. observaron que islotes en etapa embrionaria cultivados y tratados con K252a (inhibidor del receptor TrkA), retardan significativamente su morfogénesis, lo que demuestra la participación del NGF en este proceso.⁶

Dos estudios sugieren que el desarrollo de la inervación simpática del islote está bajo la influencia del NGF. En un estudio los autores utilizaron un transgénico para el NGF específico de las células β ⁴⁰ y en otro, los islotes transplantados a ratas diabéticas contienen un disco de liberación prolongada de NGF.⁴¹ En ambos estudios se observó hiperinervación simpática, pero ninguno deja claro si las células insulares duran-

te las etapas fetal, posnatal ya secretan fisiológicamente el NGF, como lo hace las células β adultas.⁷ Esto no permite esclarecer si la fuente endógena del NGF es la que interviene en la hiperinervación. En nuestro laboratorio estamos muy interesados en estudiar si en condiciones fisiológicas las células insulares desde las etapas fetal y posnatal sintetizan y secretan NGF. En caso de hacerlo, estudiaremos el papel del NGF en el desarrollo de inervación simpática del islote y si esta inervación participa en su morfogénesis.

Es interesante saber que en los islotes pancreáticos de humano también se expresa el NGF.⁴² Esto sugiere que las funciones en la biosíntesis de la insulina y en su secreción, también estarían moduladas por el NGF como se ha visto en la rata. En los últimos años ha incrementado el interés por estudiar a las NTs en el humano, ya que su deficiencia o incremento tisular esta relacionada a algunas enfermedades.

Se han observado elevados niveles de NGF y BDNF séricos en fluido alveolar en pacientes con asma bronquial.^{57,58} Los niveles incrementados de NGF en este fluido pueden estimular la producción de neuropéptidos como la sustancia P o la neurocinina A y B, que inducen la activación de linfocitos, eosinófilos, basófilos y macrófagos, potenciando la respuesta inflamatoria. A este fenómeno se le denomina inflamación neural.⁵⁷ También, en pacientes con rinitis alérgica se ha observado una fuerte asociación entre la inflamación eosinofílica y los niveles de NGF, no así con los de NT-3.⁵⁹

Los niveles séricos de NGF están elevados en niños con lupus eritematoso sistémico y se correlacionan con la actividad de la enfermedad.⁶⁰ Estos resultados sugieren que el NGF juega un papel en la patogénesis de la enfermedad y puede ser de valor pronóstico para evaluar el curso de la enfermedad. Por otro lado, se ha observado una correlación entre los niveles bajos de NGF séricos y una disminución en la velocidad de conducción nerviosa motora en pacientes con neuropatía diabética.⁶¹ Otros estudios han relacionado un polimorfismo en donde hay un cambio de un aminoácido valina por un metionina (Val66Met) en el gen que codifica para BDNF con depresión geriátrica,⁶² desorden bipolar⁶³ y esquizofrenia.⁶⁴

Existen muchas evidencias de que las NTs participan en el desarrollo, mantenimiento y supervivencia de neuronas del sistema nervioso autónomo, células de la glía y oligodendrocitos. Un decremento en su concentración podría inducir muerte neuronal y participar en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, Huntington y esclerosis lateral amiotrófica. Algunos modelos ani-

males de este tipo de padecimientos han demostrado un mejoramiento de los síntomas cuando son tratados con NTs, lo que sugiere que podrían ser candidatos de uso como tratamiento en humanos con estas patologías.

Sin embargo, el uso de la NTs en la práctica clínica es muy limitado dada toda la serie de señales inducidas por estos factores. Resultados de un estudio clínico en fase I en pacientes con Alzheimer tratados con NGF, no son muy alentadores. A estos pacientes les implantaron fibroblastos autólogos modificados genéticamente para expresar NGF humano en la región de los núcleos basales. Sólo dos de seis pacientes tratados con NGF mejoraron parcialmente algunos aspectos de sus funciones cognitivas.⁶⁵

Asimismo, una desregulación de las señales celulares inducidas por las NTs puede contribuir al desarrollo de algunos tipos de cánceres. Mientras que la sobreexpresión de NGF, NT3, p75 y TrkC en ciertos melanomas y de NGF y TrkA en cáncer de mama induce el crecimiento del tumor; la sobreexpresión de NGF y de p75 en el cáncer de próstata lo inhibe. Por lo tanto, el uso de las NTs en la terapia de ciertos cánceres puede ser benéfico o perjudicial dependiendo del tipo histológico del tumor.⁶⁶

En esta revisión he descrito algunos mecanismos celulares y moleculares que demuestran un papel importante de las NTs en el desarrollo y la función del ovario y del páncreas. Además, los datos descritos muestran la importancia de realizar mayores estudios de la participación de las NTs en la fisiología y la fisiopatología de órganos del sistema neuroendocrino; así como de sus posibles, aunque por el momento limitados usos terapéuticos en enfermedades neurodegenerativas y cánceres.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Marcia Hiriart, por su apoyo académico y en la revisión y comentarios de este artículo. Al Dr. Gabriel Gutiérrez O., por su apoyo académico. A la UABJO, a PROMEP, a la DGEP y a CONACYT, por su apoyo económico (beca de Doctorado No. 185762, 2005-2008). Al IFC de la UNAM. A mis compañeros de laboratorio, Cristina Aguayo M, Víctor Navarro T, Carmen Sánchez S, Félix Sierra R. Al servicio de Medicina Transfusional del INCMNSZ. A Araceli, a Dafne, a Emiliano y a Manuel por su cariño.

REFERENCIAS

1. Bibel M, Barde YA. Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes and Development* 2000; 14: 2919-37. Review.

2. Aloe L, Levi MR. The discovery of nerve growth factor and modern neurobiology. *Trends Cell Biol* 2004; 14(7): 395-9.
3. Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006; 361(1473): 1545-64. Review.
4. Dissen GA, Romero C, Paredes A, Ojeda SR. Neurotrophic control of ovarian development. *Microscopy Research and Technique* 2002; 59: 509-15. Review.
5. Muller D, Davidoff MS, Bargheer O, Paust HJ, Pusch W, Koeva Y, et al. The expression of neurotrophins and their receptors in the prenatal and adult human testis: evidence for functions in Leydig cells. *Histochem Cell Biol* 2006; 126(2): 199-211.
6. Kanaka GC, Dicou E, Czernichow P, Scharfmann R. Presence of nerve growth factor and its receptors in an *in vitro* model of islet cell development: Implication in normal islet morphogenesis. *Endocrinology* 1995; 136(7): 3154-62.
7. Rosenbaum T, Vidaltamayo R, Sánchez SMC, Zentella A, Hiriart M. Pancreatic β cells synthesize and secrete nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 7784-88.
8. Lu Bai, Pang PT, Woo NH. The yin and yang of neurotrophin action. *Nature Reviews Neuroscience* 2005; 6: 603-14.
9. Kalb R. The protean actions of neurotrophins and their receptors on the life and death of neurons. *Trends Neurosci* 2005; 28(1): 5-11. Review.
10. Patapoutian A, Reichardt LF. Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Current Opinion in Neurobiology* 2001; 11: 272-80. Review.
11. Chao MV. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signaling pathways. *Nature reviews Neuroscience* 2003; 4: 299-309.
12. Yamashita T, Fujitani M, Hata K, Mimura F, Yamagishi S. Diverse functions of the p75 neurotrophin receptor. *Anat Sci Int* 2005; 80(1): 37-41. Review.
13. Hempstead BL. The many faces of p75NTR. *Curr Opin Neurobiol* 2002; 12(3): 260-7. Review.
14. Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 2001; 294(5548): 1945-8.
15. Kaplan DR, Miller FD. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Current Opinion in Neurobiology* 2000; 10: 381-91. Review.
16. Arevalo JC, Pereira DB, Yano H, Teng KK, Chao MV. Identification of a switch in neurotrophin signaling by selective tyrosine phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 2006; 281(2): 1001-07.
17. Mamidipudi V, Wooten MW. Dual role for p75 (NTR) signaling in survival and cell death: can intracellular mediators provide an explanation? *J Neurosci Res* 2002; 15; 68(4): 373-84. Review.
18. Maggiwar SB, Sarmiere PD, Dewhurst S, Freeman RS. Nerve growth factor-dependent activation of NF κ B contributes to survival of sympathetic neurons. *J Neurosci* 1998; 18: 10356-65.
19. Hamanoue M, Middleton G, Wyatt S, Jaffray E, Hay RT, Davies AM. p75-mediated NF κ B activation enhance the survival response of developing sensory neurons to nerve growth factor. *Mol Cell Neurosci* 1999; 14: 28-40.
20. Muller G, Storz P, Bourtel S, Doppler H, Pfizenmaier K, Mischak H, et al. Regulation of Raf-1 kinase by TNF via its second messenger ceramide and crosstalk with mitogenic signalling. *EMBO J* 1998; 17: 732-42.
21. Zundel W, Swiersz LM, Giaccia A. Caveolin 1-mediated regulation of receptor tyrosine kinase-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity by ceramide. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 1507-14.
22. Bilderback TR, Gazula VR, Dobrowsky RT. Phosphoinositide 3-kinase regulates crosstalk between Trk A tyrosine kinase and

- p75 (NTR)-dependent sphingolipid signaling pathways. *J Neurochem* 2001; 76(5): 1540-51.
23. Dissen GA, Newman Hirshfield A, Malamed S, Ojeda SR. Expression of neurotrophins and their receptors in the mammalian ovary is developmentally regulated: changes at the time of folliculogenesis. *Endocrinology* 1995; 136: 4681-92.
 24. Spears N, Molinek MD, Robinson LL, Fulton N, Cameron H, Shimoda K, et al. The role of neurotrophin receptors in female germ-cell survival in mouse and human. *Development* 2003; 130: 5481-91.
 25. Anderson RA, Robinson LL, Brooks J, Spears N. Neurotrophins and their receptors are expressed in the human fetal ovary. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2002; 87(2): 890-7.
 26. Dissen GA, Romero C, Newman HA, Ojeda SR. Nerve growth factor is required for early follicular development in the mammalian ovary. *Endocrinology* 2001; 142: 2078-86.
 27. Hirshfield AN. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Citol* 1991; 124: 43-101. Review.
 28. Mayerhofer A, Dissen GA, Costa ME, Ojeda SR. A role for neurotransmitters in early follicular development: Induction of functional follicle-stimulating hormone receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology* 1997; 138: 3320-9.
 29. Romero C, Paredes A, Dissen GA, Ojeda SR. Nerve growth factor induces the expression of functional FSH receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology* 2002; 143: 1485-94.
 30. Salas C, Pieper MJ, Valladares M, Pommer R, Vega M, Mastroianni C, et al. Nerve growth factor-dependent activation of *trkA* receptors in the human ovary results in synthesis of follicle-stimulating hormone receptors and estrogen secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(6): 2396-403.
 31. Ojeda SR, Romero C, Tapia V, Dissen GA. Neurotrophic and cell-cell dependent control of early follicular development. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 163(1-2): 67-71.
 32. Paredes A, Romero C, Dissen GA, DeChiara TM, Reichardt L, Cornea A, et al. *TrkB* receptors are required for follicular growth and oocyte survival in the mammalian ovary. *Developmental Biology* 2004; 267: 430-49.
 33. Brannstrom M, Enskog A. Leukocyte networks and ovulation. *J Reprod Immunol* 2002; 57(1-2): 47-60. Review.
 34. Richards JS. Ovulation: new factors that prepare the oocyte for fertilization. *Mol Cell Endocrinol* 2005; 234(1-2): 75-9. Review.
 35. Dissen GA, Hill DF, Costa ME, Dees WL, Lara HE, Ojeda SR. A role for *TrkA* nerve growth factor receptor in mammalian ovulation. *Endocrinology* 1996; 137: 198-209.
 36. Hurwitz A, Ricciarelli E, Botero L, Rohan RM, Hernandez ER, Adashi EY. Endocrine -and autocrine- mediated regulation of rat ovarian (teca-interstitial) interleukin-1 β gene expression: Gonadotropin-dependent preovulatory acquisition. *Endocrinology* 1991; 129: 3427-9.
 37. Dissen GA, Parrott JA, Skinner MK, Hill DF, Costa ME, Ojeda SR. Direct effects of nerve growth factor on thecal cells from antral ovarian follicles. *Endocrinology* 2000; 141: 4736-50.
 38. Mayerhofer A, Dissen GA, Parrott JA, Hill DF, Mayerhofer D, Garfield RE, et al. Involvement of nerve growth factor in the ovulatory cascade: *TrkA* receptor activation inhibits gap junctional communication between thecal cells. *Endocrinology* 1996; 137(12): 5662-70.
 39. Kanaka GC, Tazi A, Czernichow P, Scharfmann R. In vivo presence of the high affinity nerve growth factor receptor *TrkA* in the rat pancreas: Differential localization during pancreatic development. *Endocrinology* 1995; 136(2): 761-9.
 40. Edwards RH, Rutter WJ, Hanahan D. Directed expression of NGF to pancreatic beta cells in transgenic mice leads to selective hyperinnervation of the islet. *Cell* 1989; 58(1): 161-70.
 41. Reimer MK, Mokshagundam SP, Wyler K, Sundler, Ahren B, Stagner JJ. Local growth factors are beneficial for the autonomic reinnervation of transplanted islet in rats. *Pancreas* 2003; 26(4): 392-7.
 42. Vidaltamayo R, Mery CM, Angeles AA, Robles DG, Hiriart M. Expression of nerve growth factor in human pancreatic β cells. *Growth Factors* 2003; 21(3-4): 103-7.
 43. Vidaltamayo R, Sánchez SMV, Rosenbaum T, Martínez MT, Hiriart M. Neuron-like phenotypic changes in pancreatic β -cells induced by NGF, FGF, and dbcAMP. *Endocrine* 1996; 4(1): 19-26.
 44. Rosenbaum T, Vidaltamayo R, Sánchez HD, Hiriart M. Nerve growth factor increases sodium current in pancreatic β cell. *J Membr Biol* 1996; 153: 53-8.
 45. Rosenbaum T, Castanares DT, López VHE, Hiriart M. Nerve growth factor increases L-type calcium current in pancreatic beta cells in culture. *J Membr Biol* 2002; 186(3): 177-84.
 46. Rosenbaum T, Sánchez SMC, Hiriart M. Nerve growth factor increases insulin secretion and barium current in pancreatic β -cells. *Diabetes* 2001; 50: 1755-62.
 47. Navarro TV, Sánchez SMC, Garcia S, Hiriart M. Autocrine regulation of single pancreatic beta-cell survival. *Diabetes* 2004; 53(8): 2018-23.
 48. Miao G, Mace J, Kirby M, Hopper A, Peverini R, Chinnock R, et al. Beneficial effects of nerve growth factor on islet transplantation. *Transplant Proc* 2005; 37(8): 3490-2.
 49. Larrieta ME, Vital P, Mendoza RA, Cerbon M, Hiriart M. Nerve growth factor increases in pancreatic β cells after streptozotocin-induced damage in rats. *Exp Biol Med* 2006; 231(4): 396-402.
 50. Lucini C, Maruccio L, De Girolamo P, Castaldo L. Brain-derived neurotrophic factor in higher vertebrate pancreas: immunolocalization in glucagon cells. *Anatomy and Embryology* 2003; 4: 311-8.
 51. Hanyu O, Yamatani K, Ikarashi T, Soda S, Maruyama S, Kamimura T, et al. Brain-derived neurotrophic factor modulates glucagon secretion from pancreatic alpha cells: its contribution to glucose metabolism. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 2003; 5: 27-37.
 52. Shibayama E, Koizumi H. Cellular localization of the *Trk* neurotrophin receptor family in human non-neuronal tissues. *Am J Pathol* 1996; 148(6): 1807-18.
 53. Ono M, Ichihara J, Nonomura T, Itakura Y, Taiji M, Nakayama C, Noguchi H. Brain derived neurotrophic factor reduces blood glucose level in obese diabetic mice but not in normal mice. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 18: 633-7.
 54. Yamanaka M, Itakura Y, Inoue T, Tsuchida A, Nakagawa T, Noguchi H, Taiji M. Protective effect of brain-derived neurotrophic factor on pancreatic islets in obese diabetic mice. *Metabolism* 2006; 55(10):1286-92.
 55. Seifer DB, Feng Bo, Shelden RM. Immunocytochemical evidence for the presence and location of the neurotrophin-*Trk* receptor family in adult human preovulatory ovarian follicles. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2006; 194: 1129-36.
 56. Pieper MJ, Lara HE, Bravo JA, Romero C. Effects of nerve growth factor (NGF) on blood vessels area and expression of the angiogenic factors VEGF and TGF β in the rat ovary. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2006; 4(57). Published on line.
 57. Nockher WA, Renz H. Neurotrophins in allergic diseases: from neuronal growth factors to intercellular signaling molecules. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117(3): 583-9. Review.

58. Rochlitz S, Nassenstein C, Braun A. The contribution of neurotrophins to the pathogenesis of allergic asthma. *Biochem Soc Trans* 2006; 34: 594-9. Review.
59. Kobayashi H, Gleich GJ, Butterfield JH, Kita H. Human eosinophils produce neurotrophins and secrete nerve growth factor on immunologic stimuli. *Blood* 2002; 99(6): 2214-20.
60. Aalto K, Korhonen L, Lahdenne P, Pelkonen P, Lindholm D. Nerve growth factor in serum of children with systemic lupus erythematosus is correlated with disease activity. *Cytokine* 2002; 20(3): 136-9.
61. Faradji V, Sotelo J. Low serum levels of nerve growth factor in diabetic neuropathy. *Acta Neurol Scand* 1990; 81(5): 402-6.
62. Hwang JP, Tsai SJ, Hong CJ, Yang CH, Lim JF, Yang YM. The Val66Met polymorphism of the brain-derived neurotrophic-factor gene is associated with geriatric depression. *Neurobiol Aging* 2006; 27(12): 1834-7.
63. Sklar P, Gabriel SB, McInnis MG, Bennett P, Lim YM, Tsan G, et al. Family-based association study of 76 candidate genes in bipolar disorder: BDNF is a potential risk locus. Brain-derived neurotrophic factor. *Mol Psychiatry* 2002; 7(6): 579-93.
64. Neves PM, Cheung JK, Pasdar A, Zhang F, Breen G, Yates P, et al. BDNF gene is a risk factor for schizophrenia in a Scottish population. *Mol Psychiatry* 2005; 10(2): 208-12.
65. Tuszynski MH, Thal L, Pay M, Salmon DP, U HS, Bakay R, et al. A phase 1 clinical trial of nerve growth factor gene therapy for Alzheimer disease. *Nat Med* 2005; 11(5): 551-5.
66. Kruttgen A, Schneider I, Weis J. The dark side of the NGF family: neurotrophins in neoplasias. *Brain Pathol* 2006; 16(4): 304-10.

Reimpresos:

M. en C. Siraam Cabrera-Vásquez
 Departamento de Biofísica,
 Instituto de Fisiología Celular, UNAM.
 AP 70-253,
 04510, México, D.F.,
 Tel.: 5622-56-65
 Fax: 5622-5607
 Correo electrónico: scabrera@ifc.unam.mx

*Recibido el 5 de octubre de 2006.
 Aceptado el 22 de marzo de 2007.*

Starch and Albumin Mixture as Replacement Fluid in Therapeutic Plasma Exchange Is Safe and Effective

Gladys P. Agreda-Vázquez,^{1*} Irma Espinosa-Poblano,² Sergio A. Sánchez-Guerrero,¹ Erick Crespo-Solís,¹ Siram Cabrera-Vásquez,² Josefa López-Salmonán,² Josefina Barajas,² Paula Peñaloza-Ramírez,² Nelly Tirado-Cárdenas,² and Antonio Velázquez²

¹Department of Hematology-Oncology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México, D.F, México

²Transfusion Medicine Service, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México, D.F, México

Therapeutic plasma exchange (TPE) is an effective treatment in Myasthenia gravis (MG) and Guillain-Barré syndrome (GBS) and 5% human albumin is the replacement fluid of choice; however, it is expensive. More recently, it has been suggested that starch is a safe and cheaper choice to human albumin. *Objective:* To evaluate our 5-year experience using 3% hydroxyethyl starch (HES) and 5% human albumin mixture, as replacement fluid in TPE for these diseases. *Materials and methods:* Retrospective study carried out from January 2001 through September 2006. We included those patients with MG and GBS undergoing TPE. We analyzed clinical outcome (CO) and adverse events (AE) and our results were compared with a previous study which included similar patients undergoing TPE using just 5% human albumin. *Results:* Thirty-one procedures were carried out in 26 patients, a total of 147 TPE sessions. In the group of MG we had 57% complete responses (CR) and 86% overall response (OR) while in the group of GBS we had 40% CR and 60% OR. When we analyzed our CO with the previous study no statistical differences were found. Mean processed plasma volume (PPV) was 4.2 in MG and 5.5 in GBS. Twenty patients had AE, being hypotension and catheter dysfunction the most frequent ones, while tachycardia, hypertension and paresthesias were statistically more frequent in the HES/albumin group. *Conclusions:* TPE with a mixture of 3% HES and 5% human albumin is as effective and safe as 5% human albumin alone for patients with these diseases. *J. Clin. Apheresis* 23:163–167, 2008. ©2008 Wiley-Liss, Inc.

Key words: therapeutic plasma exchange; hydroxyethyl starch; albumin; Guillain-Barré syndrome; Myasthenia gravis

INTRODUCTION

Therapeutic plasma exchange (TPE) has been commonly used to treat patients in a wide range of diseases but it is especially useful in Myasthenia gravis (MG) and Guillain-Barré syndrome (GBS). The American Society for Apheresis (ASFA) and the American Association of Blood Banks (AABB) consider both MG and GBS as Category I indication for this procedure [1–4].

MG is the most common disorder of neuromuscular transmission. Described as an autoimmune disorder; these patients have been shown to have autoantibody that binds to acetylcholine receptors on the postsynaptic membrane. These autoantibodies, which are usually polyclonal, may increase receptor turnover, block binding of the neurotransmitter acetylcholine to the receptor, or may produce complement-mediated lysis of the receptor structure [5,6]. Its annual incidence is 1 per 100,000 persons [4]. Currently, the five treatment modalities include acetylcholine esterase inhibitors, thymectomy, immunosuppressive agents, plasma exchange, and IV immunoglobulin. TPE with or without

the concurrent administration of immunosuppressive therapy, has resulted in low levels of circulating antibody and clinical improvement, therefore TPE is considered a standard therapy in this disease [4–7].

On the other hand, GBS is considered the most frequently clinical paralytic disorder [5]. Its annual incidence approaches 1–2 cases per 100,000 persons [4]. In ~60% of cases, GBS follows closely an infection, most frequently caused by the microbiologic agent *Campylobacter jejuni* [8]. An autoimmune pathogenesis is strongly suggested in response of this infective agent and activated T cells and B cells in the circulation

*Correspondence to: Gladys P. Agreda-Vázquez, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán-Hematology and Oncology, Vasco de Quiroga 15 Delegación Tlalpán México 14000, Mexico. E-mail: patyr2mi@hotmail.com

Received 26 May 2008; Accepted 2 September 2008

Published online 25 September 2008 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).
DOI: 10.1002/jca.20175

have been demonstrated [7]. Supportive care is the mainstay of treatment; whereas corticosteroids may impede recovery when given as monotherapy and may abrogate the beneficial effect of TPE when the two are combined in the treatment of GBS. TPE with or without concurrent IV immunoglobulin therapy has been shown to be effective in accelerating motor recovery, and decreasing time on the ventilator [5,7,9].

Currently, human albumin, or a combination of saline and human albumin, is commonly used, and widely accepted as a replacement fluid for routine in TPE [10,11]. However, recent clinical experience has demonstrated that the use of colloidal starch as a partial replacement solution is well tolerated, drug interaction is minimal, the potential for disease transmission is absent and it is cost-effective when compared with human albumin [12]. Several groups of investigators have used hydroxyethyl starch (HES) as partial or full alternative to albumin during TPE. HES is a polysaccharide colloid biochemically similar to glycogen, which likely explains the lack of immunogenicity and lack of severe adverse reactions, traditionally, it has been used as a volume expander and its safety has been well established [11,12]. Changes in hemoglobin, platelet count, coagulation parameters, plasma fibrinogen, and immunoglobulins are similar to those reported with human albumin and only a few side effects have been reported, mainly concerned to coagulopathy [13]. Contraindications for using starches in TPE are as follows: congestive heart failure, renal or liver failure, coagulopathy, hyperviscosity, allergic reactions to starches, pregnancy, breast feeding, and childhood [11]. Excessive HES exposure in patients with impaired renal function can result in acquired lysosomal storage disease, hence HES should be avoided in chronic plasmapheresis procedures [14,15].

Here, we report our experience in TPE using 3% HES and 5% human albumin mixture in MG and GBS, assessing both clinical outcome (CO) and adverse events (AE) and comparing our current results with those previously published by our group in a cohort of patients with MG and GBS treated with TPE using just 5% human albumin as replacement fluid [16].

MATERIALS AND METHODS

This is a retrospective study carried out from January 2001 through September 2006. We reviewed the records of all patients diagnosed with MG and GBS undergoing TPE with 3% HES (VoluvenTM 6%, Fresenius kabi, México) and 5% human albumin (OctalbinTM 25%, Octapharma, México) mixture. We excluded those patients with serum creatinine >1.5 mg/dL. For each patient several parameters were recorded, including age, sex, diagnosis, number of TPE sessions per patient, processed plasma volume (PPV) in each

TPE session, type of replacement solution as well as CO and AE observed.

We defined procedure as a set of sessions carried out on a single patient, session as a single apheresis procedure and PPV as the total plasma volume processed through the entire series of procedures. Replacement solutions were initially 5% human albumin followed by 3% HES. We employed the following formula: $C_1V_1 = C_2V_2$ to calculate the required HES and albumin, from its original concentration, to get the final concentration according to the desired plasma volume to be processed in each patient. C_1 = Initial concentration. C_2 = Final concentration. V_1 = Initial volume. V_2 = Final volume.

We calculated the PPV for each TPE as follows: in patients with MG 60 mL/kg of body weight daily for 3 consecutive days. After this course of sessions, response was assessed, and the need for further treatment was evaluated. In the group of patients with GBS 200–250 mL/kg of body weight in six sessions on alternate days followed by the evaluation of the response and the need for further treatment [9,16]. We assessed response according to the following criteria: In the MG group complete response was considered when withdrawal of mechanical ventilation was possible, when the vital capacity improved >50% compared to the basal value or when the ability to walk without assistance was accomplished; partial response, when the vital capacity improved >25% but <50% compared to the basal value and muscle strength was 3–4/5. In the GBS group, complete response was considered if the patient was able to walk and withdrawal of mechanical ventilation was possible, partial response when the muscle strength was 3–4/5 or if the patient was withdrawn from mechanical ventilation. In both, MG and GBS, no response was considered when neither one of the aforementioned criteria was achieved.

Furthermore, we defined hypertension when systolic blood pressure (SBP) was ≥ 140 mmHg or diastolic blood pressure (DBP) ≥ 90 mmHg; hypotension when SBP was ≤ 90 mmHg or DBP ≤ 50 mmHg; catheter dysfunction whenever a decreased blood flow was observed; tachycardia as a heart rate >100 beats per minute; and paresthesias as the sensation of tingling, pricking, or numbness expressed by the patient.

All TPE procedures were performed with the Hemonetics MCSTM (Braintree, MA). We analyzed response rates and adverse events, and our results were compared with a previously published study which included similar patients undergoing TPE using just 5% human albumin [16].

STATISTICAL ANALYSIS

To compare our results with the previously published report [16], Fisher's exact and Student-*T* tests

TABLE I. Patients' Characteristics

Diagnosis	No. of patients	Sex M/F	Mean age (Range) years	No. of procedures ^a	No. of sessions ^a	Mean PPV ^b (Range)
MG	15	8/7	40.47 (19–73)	20	86	4.26 (1.5–6.6)
GBS	11	7/4	42.36 (21–70)	11	61	5.58 (3.1–7.9)
Total	26	15/11	41.17 (19–73)	31	147	4.74 (1.5–7.9)

^aTotal number of procedures and sessions.

^bProcessed plasma volumen per patient.

TABLE II. Patients' Clinical Outcomes

Study group	Diagnosis	No. of patients	No. of complete responses (%)	No. of partial responses (%)	Failures (%)	Not assessed	PPV (range)
Current	MG	15	8 (57)	4 (29)	2 (14)	1	4.26 (1.5–6.6)
Lazo et al. [16]	MG	28	19 (68)	6 (21)	3 (11)	0	3.1 (1.6–6.5)
<i>P</i> -Value			0.516	0.707	1.000		0.008
Current	GBS	11	4 (40)	2 (20)	4 (40)	1	5.58 (3.1–7.9)
Lazo et al. [16]	GBS	16	7 (54)	2 (15)	4 (31)	3	3.9 (0.8–5.4)
<i>P</i> -Value			0.680	1.000	0.685		0.005

were used. A value of $P = < 0.05$ was considered statistically significant. Patients with unavailable clinical data were not included for analysis.

RESULTS

From January 2001 through September 2006, twenty six patients were included (15 males and 11 females), and their mean age was 41.1 years (range 19–73 years). Fifteen patients complained of MG and 11 of GBS.

Procedures and Sessions

Thirty-one procedures and 147 sessions of plasma exchange were performed in the total group of 26 patients, an average of 4.7 plasma exchange sessions (range of 2–8) and 4.7 PPV (range 1.5–7.9) per patient.

The replacement fluid mixture included an average proportion of 46.8% (range 26–100%) of 3% HES, and 5% human albumin for the complementary proportion. Characteristics of all patients are summarized in Table I

Myasthenia Gravis

This group included 15 patients, 8 males, and 7 females, mean age was 40.4 years, (range 19–73 years); 20 procedures were performed, equivalent to 86 sessions of plasma exchange with an average of 4.3 plasma exchange sessions (range 2–6) per patient, and an average of 4.2 PPV (range 1.5–6.6). The replacement solution proportion was 44.9% HES and 55.1%

human albumin. Eight (57%) patients achieved complete responses (CR), 4 (29%) PR and 2 (14%) did not respond. One patient was not evaluated due to the lack of complete clinical data.

When we compared these results with our previously published study we found no statistical differences in response rates (CR $P = 0.516$, PR $P = 0.707$, failures $P = 1.000$). It is noteworthy that the PPV in the MG group of patients in the this study was 4.2 compared to 3.1 which was statistically significant in our previous study ($P = 0.008$).

Guillain-Barré Syndrome

We included 11 patients, 7 males, and 4 females, 11 procedures were performed, equivalent to 61 sessions with an average of 5.5 plasma exchange sessions (range 3–8) per patient, and a mean of 5.5 PPV (range 3.1–7.9). The replacement solution proportion was 50.3% HES and 49.7% human albumin. Four (40%) patients achieved CR, 2 (20%) PR and 4 (40%) did not respond. One patient was not evaluated due to lack of complete clinical data.

When we compared these results with our previously published study we found no statistical differences in terms of response rates. (CR $P = 0.680$, PR $P = 1.000$ and failures $P = 0.685$). The PPV in GBS was 5.5 in this study versus 3.9 in our previous one ($P = 0.005$). All these results are summarized in Table II.

TABLE III. TPE Adverse Reactions

	Current study	Lazo et al. [16]	P-Value
Hypotension	10/26	10/44	0.181
Catheter dysfunction	10/26	10/44	0.181
Tachycardia	4/26	0/44	0.016
Hypertension	4/26	0/44	0.016
Paresthesias	3/26	0/44	0.047
Hypoglycemia	0/26	3/44	0.289
Other	0/26	3/44	0.289

Adverse Events

A total of 31 AE were documented in 21 patients, and 10 of them presented with more than one complication. Hypotension, catheter dysfunction, tachycardia, hypertension, and paresthesias were the AE presented in our patients, as shown in Table III. None of those patients with AE required discontinuation of TPE sessions.

Among the 86 sessions of TPE performed in the MG group there were 18 AE; being hypotension (7 cases) the most frequent one. Whereas among 61 sessions of TPE performed in the GBS group, we found 13 AE being catheter dysfunction the most frequent one (6 cases).

When we compared these AE, just tachycardia, hypertension, and paresthesias were statistically more frequent in this study ($P = 0.016$, $P = 0.016$, and $P = 0.047$, respectively) as shown in Table III.

Laboratory

The following parameters were analyzed for both groups of patients (MG and GBS) in the this study; hemoglobin, WBC and platelet counts, serum calcium, albumin, PT and PTT within 24 h before the TPE procedure as well as 24 h after the last procedure in 90% of our patients. In these patients, hemoglobin, platelets, serum calcium, and albumin concentrations demonstrated statistically significant changes ($P = <0.05$) as shown in Table IV.

Relapses

In this study, four patients in the MG group relapsed within the next 4 months after the completion of TPE. However, all of them responded to a new course of TPE with the HES/albumin mixture, two achieving PR and the other two achieving CR. In contrast, we did not see any relapse among the GB group of patients.

DISCUSSION

Therapeutic plasma exchange in MG and GBS is a treatment Category I indication according to both AABB and ASFA criteria [1–4].

TABLE IV. Laboratory Parameters in Current Study

	Pre - TPE Mean (SD)	Post - TPE Mean (SD)	P Value
Hemoglobin	12.7 (± 2.46)	11.4 (± 1.82)	0.001
Leukocytes	10.15 (± 3.84)	11.59 (± 3.93)	0.187
Platelets	243.916 (± 95.98)	173.958 (± 66.98)	0.001
Calcium ^a	8.77 (± 1.139)	7.95 (± 0.988)	0.000
Albumin	3 (± 1.147)	2.38 (± 0.733)	0.031
PT	12.95 (± 3.433)	14.4 (± 3.13)	0.131
PTT	29.13 (± 3.257)	31.5 (± 7.12)	0.513

^aSerum calcium.

TPE in MG is especially useful in myasthenic crisis, perioperatively for thymectomy, or as an adjunct to other therapies to maintain optimal clinical status [4]. There are several published protocols, such as 25–45 mL of plasma per kg of body weight every other day for 5–6 exchanges in an attempt to decrease the serum antibody titer by 85%. Mild exacerbations in patients otherwise on chronic stable medication regimens can be managed with shorter courses of 2–3 TPE of 1–1.5 plasma volumes as needed. Some patients may be managed with highly individualized treatment regimens consisting of 1–4 exchanges of 1–1.5 plasma volumes per month until a satisfactory and stable response is obtained [5].

Whereas in GBS, the Guillain-Barré Syndrome Study Group trial demonstrated that plasmapheresis significantly benefited patients acutely ill with this disease, in terms of outcome at predetermined times as well as the time to achieve predetermined degrees of clinical improvement [9]. The French Cooperative Group randomized the patients according to the severity of their GBS in mild, moderate or severe groups. These patients underwent 0 versus 2 TPE (mild); 2 versus 4 TPE (moderate); 4 versus 6 TPE (severe). Each procedure exchanged 1.5 plasma volumes. The median time from onset to recovery in the mild group was better in TPE compared to the control arm. In the moderate Group 4 TPE were better than 2, while in the severe Group 6 TPE were not more beneficial than 4. It has been suggested that TPE should be instituted within 14 days of the onset of neuropathic symptoms [5]. A typical course of treatment for severely affected patients will consist of a total exchange of 250 mL of plasma per kg of body weight over 10–14 days. This typically is divided into 5–6 procedure [4,9].

The replacement fluid should be 5% human serum albumin or similar colloidal solution in both diseases [5].

Currently, it is possibility to use HES as a partial or full alternative to albumin during plasma exchange. The maximum daily dose of 6% HES recommended is 1,500 mL and for 3% HES is 3,000 mL [11]. Furthermore, the chronic use of HES may result in increased deposits of starch in the reticulo-endothelial system [14,15].

In this article, we analyzed our experience with TPE using 3% HES and 5% human albumin mixture during a 5-year period and compared it with our previous experience with TPE using 5% human albumin alone as replacement fluid and we could see that in MG we had 86% overall response rate (57% of CR and 29% PR) whereas in the GBS group we had a 60% overall response rate (40% of CR and 20% PR), similar to our previously reported results [16].

Regarding complications, just tachycardia (4 cases), hypertension (4 cases) and paresthesias (3 cases) demonstrated statistical differences. However, these AE were mild and none of our TPE sessions had to be discontinued. The treatment in those patients complaining of tachycardia and hypertension was to diminish the blood flow and in those with paresthesias it was the IV calcium infusion if a slower blood flow was not enough to eliminate these symptoms.

In terms of laboratory parameters, the hemoglobin, and platelet count as well as the serum calcium and albumin concentrations decreased when we compared pre-TPE and post-TPE values but we did not have either to transfuse RBC, platelets or to infuse albumin to correct these imbalances.

When we assessed the PPV, we found out that patients treated with our current TPE protocols had higher volumes when compared with those patients included in our previous publication. This is explained by an amendment done to our TPE protocol since year 2001, when the PPV was increased to 60 mL/kg of body weight instead of 30 mL/kg [16], at least in the MG group of patients.

We believe that a cost-benefit assessment in our patients is guaranteed even though it has been suggested by others that starch is a cheaper choice to human albumin [10–12]. Grossly, at our institution the cost of 6% HES is \$197.00 MXN pesos (19.70 USD) per 500 mL bag, while human albumin is \$590.00 MXN pesos (59.00 USD) per 50 mL bottle. Just as an example, the cost by session in an adult weighing 70 kg with human albumin alone should be \$4,720.00 MXN pesos (472 USD) whereas with 3% HES would cost \$2,557.00 MXN pesos (256 USD), 46% cheaper.

We conclude that TPE with a mixture of 3% HES and 5% human albumin is as effective and safe as 5% human albumin alone for patients with MG and GBS.

REFERENCES

1. McLeod BC. Introduction to the third special issue. Clinical applications of therapeutic apheresis. *J Clin Apheresis* 2000; 15:1–5.
2. Frیده JL, Kay CE. Donor screening and blood collection. In: Rudmann SV, editor. *Blood banking and transfusion medicine*, 2nd ed. Philadelphia: Elsevier Saunders. 2005. pp 226–227.
3. Rudmann SV, Nicol KK. Transfusion issues. In: Rudmann SV, editor. *Blood Banking and Transfusion Medicine*, 2nd ed. Philadelphia: Elsevier Saunders. 2005. pp 458–461.
4. Szczepiorkowski ZM, Bandarenko N, Kim HC, Linenberger ML, Marques MB, Sarode R, Schwartz J, Shaz BH, Weinstein R, Wirk A, Winters JL. Guidelines on the use of therapeutic apheresis in clinical practice-evidence-based approach from the Apheresis Applications Committee of the American Society for Apheresis. *J Clin Apheresis* 2007;22:106–175.
5. Weinstein R. Therapeutic apheresis in neurological disorders. *J Clin Apheresis* 2000;15:74–128.
6. Drachman DB. Myasthenia Gravis. *N Engl J Med* 1994;330: 1979–1810.
7. Lehmann HC, Hartung HP, Hetzel GR, Stüve O, Kieseier BC. Plasma exchange in neuroimmunological disorders, Part 2. Treatment of neuromuscular disorders. *Arch Neurol* 2006;63: 1066–1071.
8. Hughes RA, Comblath DR. Guillain Barré Syndrome. *Lancet* 2005;366:1653–1666.
9. Guillain-Barré Syndrome Study Group. Plasmapheresis and acute Guillain-Barré syndrome. *Neurology* 1985;35:1096–1104.
10. Rock G, Sutton DMC, Freedman J, Nair RC, and the Members of the Canadian Apheresis Group. Pentastarch instead of albumin as replacement fluid for therapeutic plasma exchange. *J Clin Apheresis* 1997;12:165–169.
11. Brecher ME, Owen HG, Bandarenko N. Alternatives to albumin: starch replacement for plasma exchange. *J Clin Apheresis* 1997;12:146–153.
12. Owen HG, Brecher ME. Partial colloid starch replacement for therapeutic plasma exchange. *J Clin Apheresis* 1997;12: 87–92.
13. Goss GA, Weinstein R. Pentastarch as partial replacement fluid for therapeutic plasma exchange: effect on plasma proteins, adverse events during treatment, and serum ionized calcium. *J Clin Apheresis* 1999;14:114–121.
14. Auwerda JJ, Wilson PJ, Sonneveld P. Foamy macrophage syndrome due to hydroxyethyl starch replacement: a severe side effect in plasmapheresis. *Ann Intern Med* 2002;137:1013–1014.
15. Auwerda JJ, Leebeek FW, Paul Wilson JH, van Diggelen OP, Lam KH, Sonneveld P. Acquired lysosomal storage caused by frequent plasmapheresis procedures with hydroxyethyl starch. *Transfusion* 2006;46:1705–1711.
16. Lazo-Langner A, Espinosa-Poblano I, Tirado-Cárdenas N, Ramírez-Arvizu P, López-Salmorán J, Peñaloza-Ramírez P, Sánchez-Guerrero S. Therapeutic plasma exchange in Mexico: experience from a single institution. *Am J Hematol* 2002; 70:16–21.

Research article

Open Access

Remodelling sympathetic innervation in rat pancreatic islets ontogeny

Siraam Cabrera-Vásquez¹, Víctor Navarro-Tableros¹, Carmen Sánchez-Soto¹, Gabriel Gutiérrez-Ospina² and Marcia Hiriart*¹

Address: ¹Biophysics Department, Instituto de Fisiología Celular – Neuroscience, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico DF, 04510, México and ²Cell Biology and Physiology Department, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico DF, 04510, México

Email: Siraam Cabrera-Vásquez - scabrera@ifc.unam.mx; Víctor Navarro-Tableros - vnavarro@ifc.unam.mx; Carmen Sánchez-Soto - csanchez@ifc.unam.mx; Gabriel Gutiérrez-Ospina - gabo@correo.biomedicas.unam.mx; Marcia Hiriart* - mhiriart@ifc.unam.mx

* Corresponding author

Published: 17 June 2009

Received: 9 March 2009

BMC Developmental Biology 2009, **9**:34 doi:10.1186/1471-213X-9-34

Accepted: 17 June 2009

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-213X/9/34>

© 2009 Cabrera-Vásquez et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: Pancreatic islets are not fully developed at birth and it is not clear how they are vascularised and innervated. Nerve Growth Factor (NGF) is required to guide sympathetic neurons that innervate peripheral organs and also in cardiovascular system and ovary angiogenesis. Pancreatic beta cells of a transgenic mouse that over-expressed NGF in attracts sympathetic hyperinnervation towards them. Moreover, we have previously demonstrated that adult beta cells synthesize and secrete NGF; however, we do not know how is NGF secreted during development, nor if it might be trophic for sympathetic innervation and survival in the pancreas.

We analyzed sympathetic innervation and vasculature development in rat pancreatic islets at different developmental stages; foetal (F19), early postnatal (P1), weaning period (P20) and adults. We temporarily correlated these events to NGF secretion by islet cells.

Results: Sympathetic fibres reached pancreatic islets in the early postnatal period, apparently following blood vessels. The maximal number of sympathetic fibres (TH immunopositive) in the periphery of the islets was observed at P20, and then fibres entered the islets and reached the core where beta cells are mainly located. The number of fibres decreased from that stage to adulthood. At all stages studied, islet cells secreted NGF and also expressed the high affinity receptor TrkA. Foetal and neonatal isolated islet cells secreted more NGF than adults. TrkA receptors were expressed at all stages in pancreatic sympathetic fibres and blood vessels. These last structures were NGF-immunoreactive only at early stages (foetal and P0).

Conclusion: The results suggest that NGF signalling play an important role in the guidance of blood vessels and sympathetic fibres toward the islets during foetal and neonatal stages and could also preserve innervation at later stages of life.

Background

Adult pancreatic β cells secrete insulin in response to an increase in extracellular glucose. At birth, this response is not fully developed as neonate β -cells are insensitive to glucose and synthesize and secrete less insulin than adults [1]. Pancreatic islets are innervated by autonomic fibres. In particular, sympathetic neural cell bodies are located in the superior mesenteric and celiac ganglia and are components of the splanchnic nerve and parasympathetic innervation comes from the vagus nerve [2].

Sympathetic innervation plays important roles in the physiology and physiopathology of the endocrine pancreas; nor- and epinephrine inhibit insulin secretion, while stimulate glucagon secretion [3]. Moreover, sympathetic innervation of pancreatic islets is altered in animal models with insulin resistance and type 2 diabetes [4]. However, factors that control sympathetic innervation of pancreatic islets are not clear. The neurotrophin nerve growth factor (NGF) is especially interesting because is synthesized by the peripheral targets of NGF-dependent sympathetic neurons and NGF concentrations are proportional to their innervation density [5]. For example, NGF participates in the innervation of spleen, peripheral lymph nodes and ovaries [6-8] and has also trophic effects on their vascularization [9].

Adult pancreatic beta cells produce and secrete NGF and express NGF high- (TrkA) and low-affinity (p75) receptors during lifespan and NGF is important for a normal islet morphogenesis during prenatal life [10,11] and have trophic effects on β cells survival, maturation and insulin secretion [1,12-14]. These effects are controlled by auto-crine or paracrine mechanisms [15].

Sympathetic nerves in the pancreas are closely related to blood vessels [16], and nervous fibres are also in part guided by endothelium-derived signals [17]. Trophic interactions among nerve cells, blood vessels and islet cells are fundamental to assure an adequate pancreatic ontogeny and a mature assemblage and function.

NGF could be an important regulator molecule on innervation and vascularisation of the islets. The following observations indicate that this could be the case, 1) NGF overexpression in pancreatic β cells causes islet sympathetic hyper-innervation [18]. 2) When islet grafts to diabetic rats are pre-treated with NGF, sympathetic innervation is increased after transplantation [19]. 3) Pancreatic sympathetic innervation is reduced in NGF/Bax double knockout (KO) mice [20]. Finally, NGF *in vitro* induces development of glucose-induced insulin secretion in neonate rat β cells [14] and promotes neuron-like phenotypic changes in foetal and adult β cells [21]. The aim of this study was to investigate the morphophysiological relationships between innervation, vascularization and islet morphogenesis and function during ontogeny of rat pancreas, in particular of islets from foetal (F19), early (P1) and late postnatal (P20) stages of development, compared to adults. We also analyzed biosynthesis and secretion of NGF and insulin by β cells at these stages.

Results

The structure of pancreatic islets during ontogeny

As expected, in mature adult islets glucagon producing β cells form a ring-like structure, surrounding insulin-producing β cells that fill most of the centre (Fig. 1D and 1H). At this stage, we observed that 98% of islets were delimited by a collagen capsule (Fig. 1H and additional file 1).

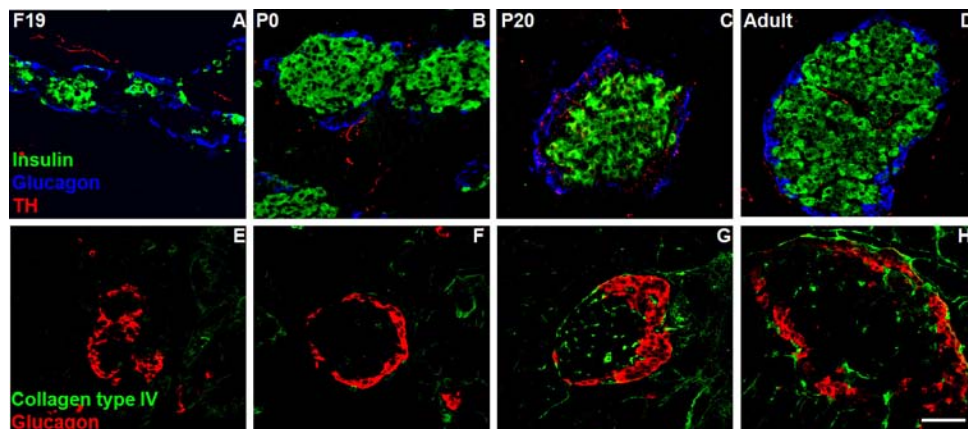


Figure 1
Morphological reorganization of pancreatic islets from prenatal life to adulthood. We localised sympathetic nerve fibres and collagen capsules surrounding the islets by confocal microscopy in longitudinal sections of pancreases. Immunostaining for insulin (green), glucagon (blue), tyrosine hydroxylase (TH; red) and collagen type IV (2nd line, green) at different developmental stages (F19, P1, P20 and adult). Scale bar = 50 μ m.

In contrast, F19 islets were not formed yet; we only observed large groups of endocrine cells without a capsule and isolated α and β cells were scattered through the exocrine pancreas (Fig. 1A and 1E and additional file 1). Neonatal islets were small, rounded, did not yet presented capsule and were located in close proximity to each other (Fig. 1B and 1F and additional file 1). At P20 most of the endocrine cells had a similar distribution to adults; however, only nearly 26% of the islets were encapsulated (Fig. 1C and 1G and additional file 1).

Remodelling sympathetic innervation of islets and NGF

To identify the sympathetic fibres we used a tyrosine-hydroxylase (TH) immunofluorescence. A progressive increase in the relative area occupied by TH positive innervation in the islets was observed between F19 to P20 (Fig. 1 upper panels and Fig 2A). Interestingly, this parameter decreased between P20 and adulthood in the periphery of the islets (Fig. 1 upper panels and Fig. 2B), while increased in the central area (Fig. 1, upper panels and Fig. 2C).

Sympathetic remodelling in this process is probably modulated by NGF produced by islet cells. We analyzed NGF production *in situ* with an antibody raised against the NGF precursor protein pro-NGF [22-24] in α and β cells. Pro-NGF immunoreactivity was observed in both cell types at all stages studied (Fig. 3A and 3B). However, the fluorescence intensity was higher at F19 and P1 than at later ontogenetic stages (additional file 2A and 2B) and when this was studied in isolated islet cells, we confirmed that most of them were β cells (insulin positive) and also labelled positive for TrkA receptors (additional file 3). At all stages studied mRNA for NGF is expressed by islet cells (data not shown).

NGF is released by foetal and neonatal islet cells

We analyzed NGF secretion by ELISA (see Methods). At all studied stages, islet cells secreted NGF (Figure 4A). In accordance to the pro-NGF immunofluorescence observed; NGF secretion was higher at F19 and P1 than at older ages.

NGF secretion may be constitutive or regulated by other way than glucose stimulated insulin secretion, because clearly from figure 4B, both types of secretions are dissociated. This effect can not be attributed to cultured conditions or reduced cell viability, because P20 and adult cultured β cells increased insulin secretion when exposed to high glucose and KCl. Under the last experimental condition, adult β cells also increased NGF release.

Pro-NGF and TrkA receptors are expressed for a delimited period in vascular cells

Vascular cells may also provide guidance cues to axons in their way to reach their targets [17]. Figure 5 shows that blood vessels that enter the islets early in pancreatic

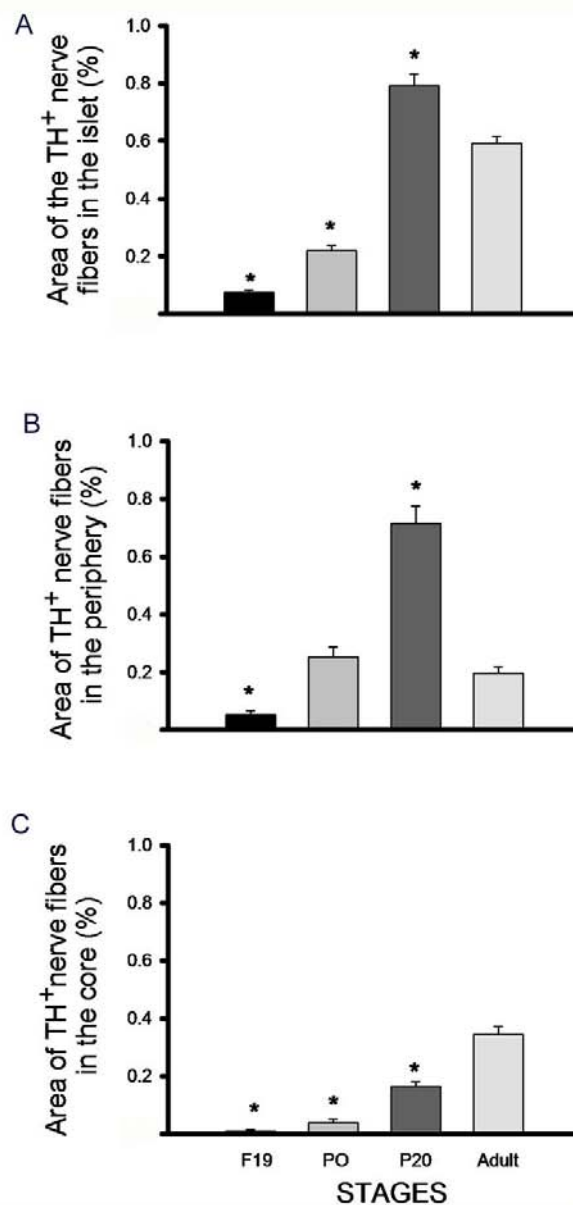


Figure 2
Quantification and analysis of TH⁺ fibres in development of islets. Bar graphs represent A) Percentage of total area occupied by TH⁺ fibres. B) Percentage of peripheral area occupied by TH⁺ fibres. C) Percentage of the core area occupied by TH⁺ fibres. ANOVA *p < 0.001 compared to adulthood.

ontogeny (F19 and P1) labelled positive to pro-NGF, but not at P20 and thereafter (Fig. 6A and 6B). Blood vessels and sympathetic fibres can respond to NGF, because clear and consistently at all stages both vascular cells and TH positive fibres display immunoreactivity for TrkA receptors (Fig. 7A and 7B).

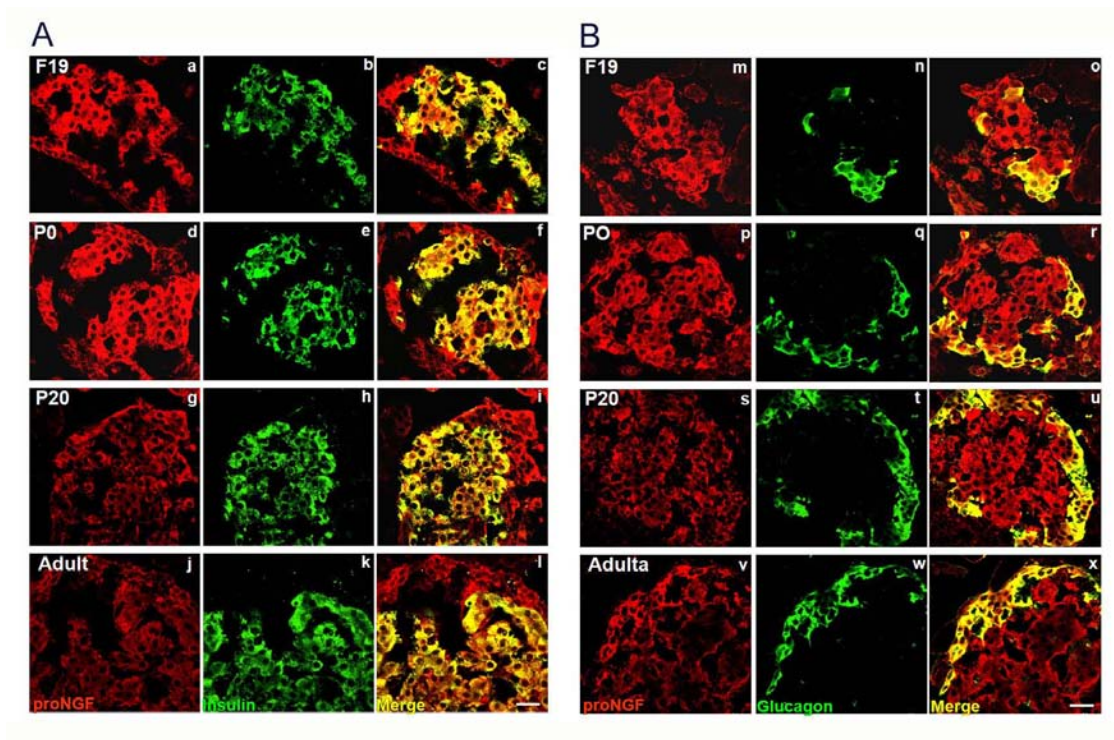


Figure 3
Colocalization of pro-NGF and insulin or glucagon. (A) Insulin and pro-NGF, (B) glucagon and pro-NGF at different developmental stages. Scale bar = 20 μ m.

Discussion

We analyzed innervation and function development of pancreatic islets. To our knowledge this is the first analysis of the relationship between innervation, blood vessels and rat pancreatic islets morphology at critical developmental stages. We also examined a possible role of NGF in this process.

Glucose homeostasis in foetal stages depends on the mother [25]. At birth, mammals abruptly need to achieve glucose control on their own, so β cells start secreting insulin. Nearly at P20 pups are weaned and they build up an omnivorous diet. These two stages are critical windows for pancreatic development and maturation of glucose induced insulin secretion [1,26]. We propose that a capsule or basal membrane surrounding the islets may be taken as one of the maturity markers, because almost all mature islets in adult animals are surrounded by one. It has been suggested that a membrane surrounding the islets could be an important niche for their complete development and survival [27-29]. We observed that a nearly-mature configuration of the pancreatic islets is progressively established during the first 20 days of postnatal life in the rat. However, at this stage nearly 30% of islets presented a continuous capsule surrounding them, indi-

cating that they will continue maturing until adulthood [26].

We observed that pancreatic islets in early development receive an extensive innervation by sympathetic fibres. This innervation is refined later in development. Interestingly, when islets are transplanted to the kidney capsule or intraportally, they develop sympathetic innervation after transplantation [30,31]. Moreover, when purified β cells are transplanted to the kidney capsule, grafts are progressively innervated mainly by tyrosine hydroxylase-containing nerve fibres. These observations led to suggest that some factors produced by β cells mediate islet neurotrophism [31].

We have previously shown that adult pancreatic β cells produce and secrete NGF [15]. In this work we observed that this is the case also along ontogeny, which indicates that NGF may be trophic for sympathetic innervation and survival in islets, as it has been observed for other organs [6-8]. NGF secretion in adult cells could also be important for sympathetic fibres maintenance throughout life.

Vascular cells also displayed pro-NGF immunoreactivity, however this is only observed in a critical window around

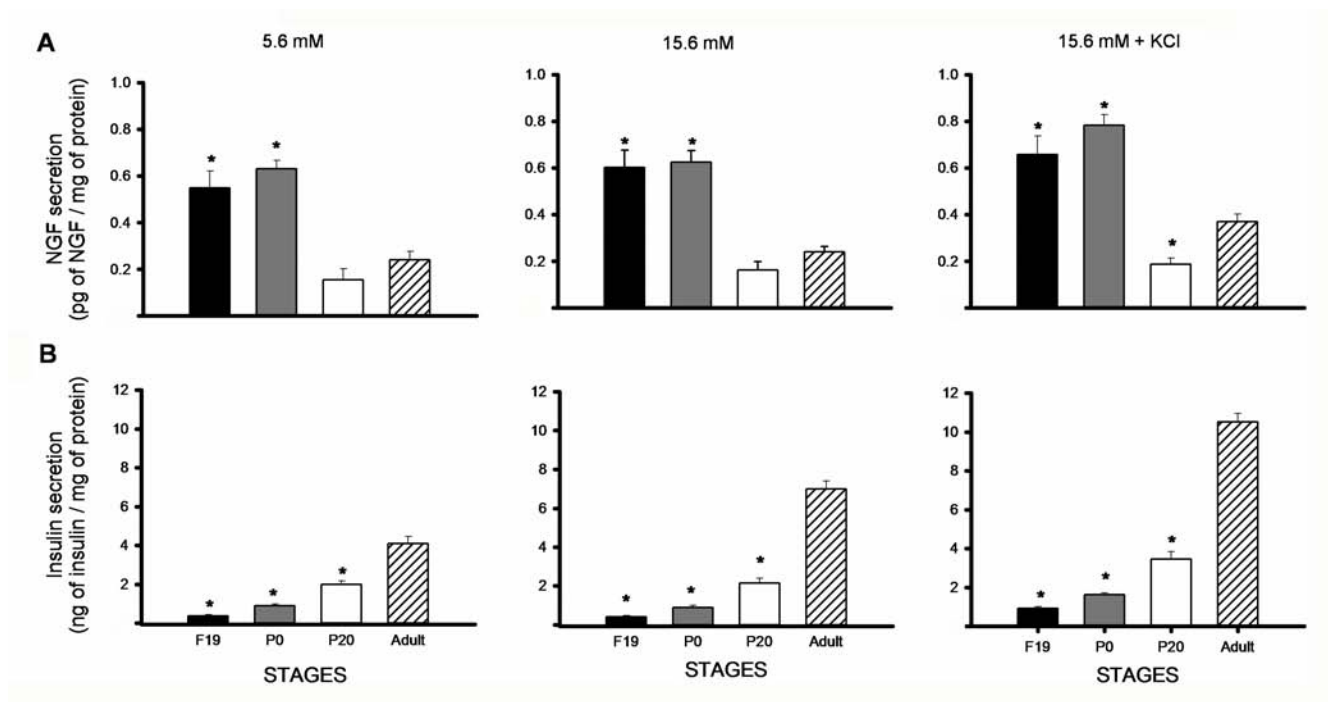


Figure 4
NGF and insulin secretion at different stages of development. Bar graphs represent NGF (A) or insulin (B) secretion by isolated insular cells under basal or stimulated conditions at different developmental stages. Line 1) Basal 5.6 mM glucose; 2) Stimulated 15.6 mM glucose and 3) Glucose 15.6 mM plus 20 mM KCl. ANOVA * $p < 0.001$ compared to adult cells. Data obtained from 4 independent experiments, each by duplicate.

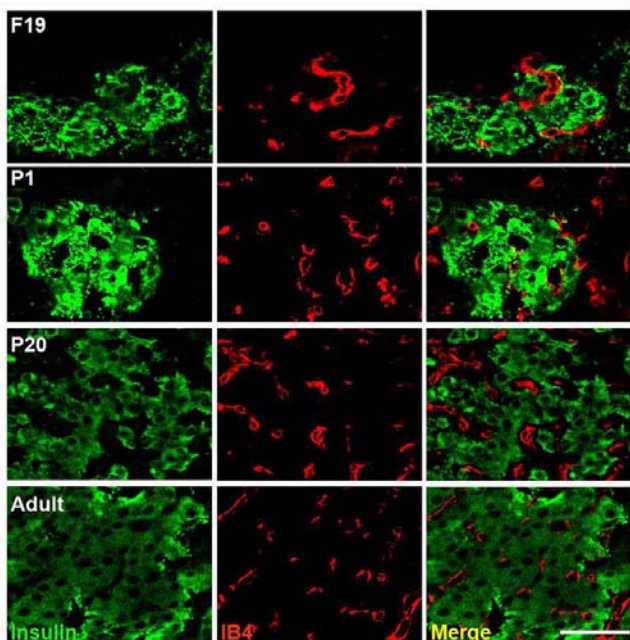


Figure 5
Blood vessel localization in rat islets during development. Insulin (green); Iso-lectin IB4 (red); merge (yellow). Scale bar = 50 μ m.

birth. This could also be important for nerve guidance into the islets. There is no perfect marker for blood vessels. We used isolectin IB4 and vimentin. Vimentin expression alone cannot be considered as specific endothelium marker; but it seems to accompany the process of angiogenesis in islets [32]. We also observed that both markers were expressed in blood vessels of developing and mature islets.

NGF produced by β , α and vascular cells might be acting by auto/paracrine mechanisms because all the studied cells within the islets express TrkA receptors. During development NGF may attract sympathetic fibres as they search for their targets as described for artemin [17,33] and/or promote sympathetic fibre outgrowth within the islet. The presence of TrkA receptors in β cells is not new [10,15,34]. It is likely that NGF acting through autocrine/paracrine mechanisms promotes β cell maturation. In support of this possibility, it has been shown that glucose-induced insulin secretion is increased by NGF after calcium channel translocation to the membrane of the neonate rat β cells [35]. The presence of TrkA receptors in vascular cells, on the other hand, might be important for islet blood vessel development because NGF also promotes angiogenesis [9,36] and migration of endothelial cell [37].

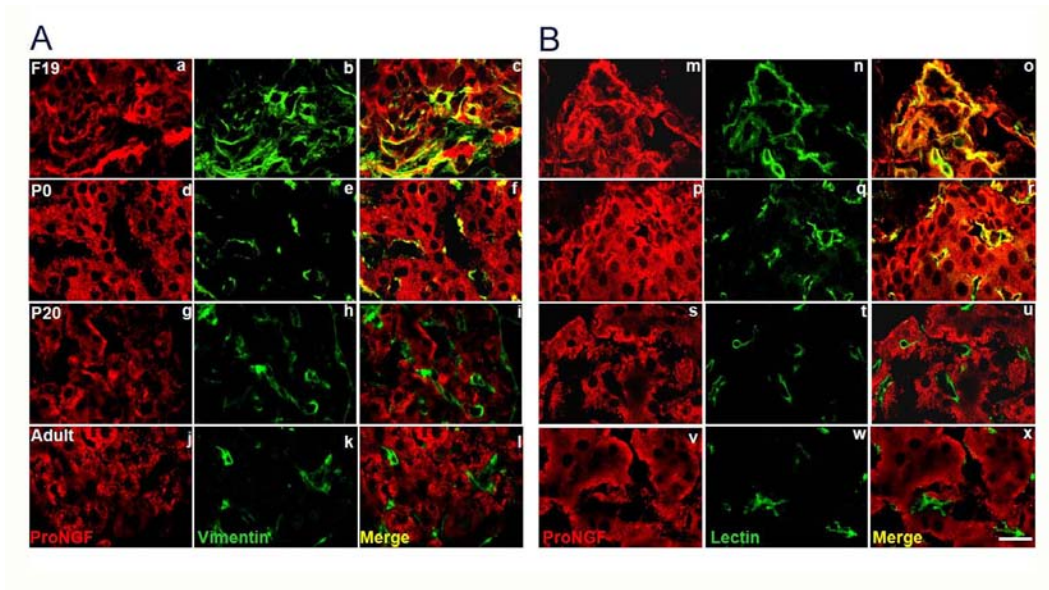


Figure 6
Pro-NGF expression in vascular cells of pancreatic islets. (A) Colocalization of pro-NGF and vimentin (c and f), (B) pro-NGF and lectin IB4 in different ontogenetic stages (o and r). Scale bar = 20 μm.

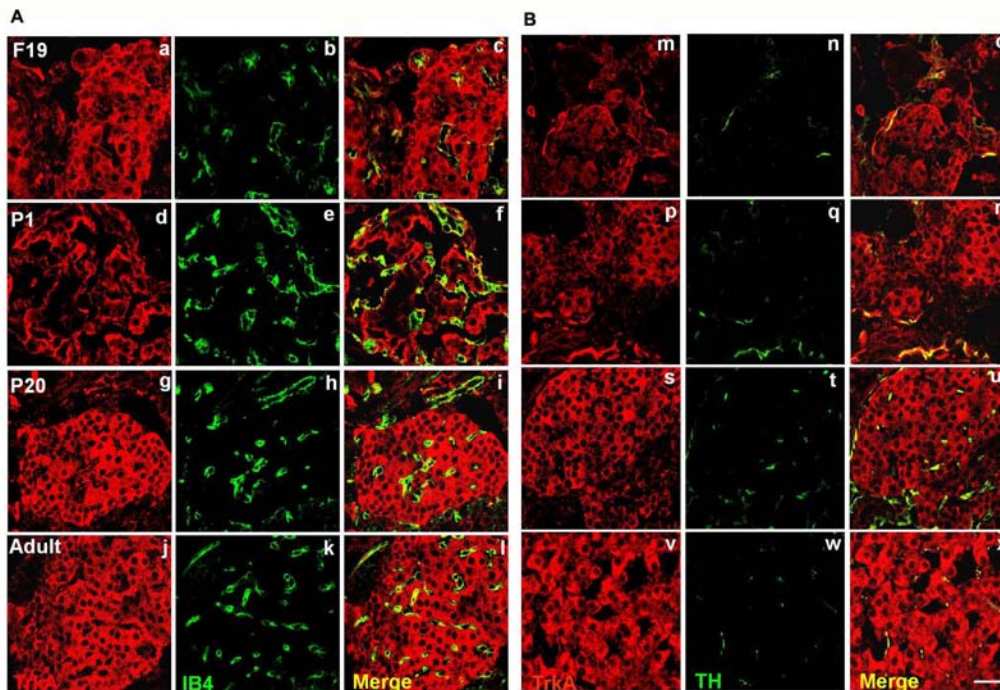


Figure 7
Expression of TrkA in vascular cells and sympathetic fibres of pancreatic islets. (A) Colocalization of TrkA and vimentin; (B) TrkA and TH at different ontogenetic stages. Colocalization of markers in blood vessels (c, f, i and l) or sympathetic fibres (o, r, u and x). Scale bar = 20 μm.

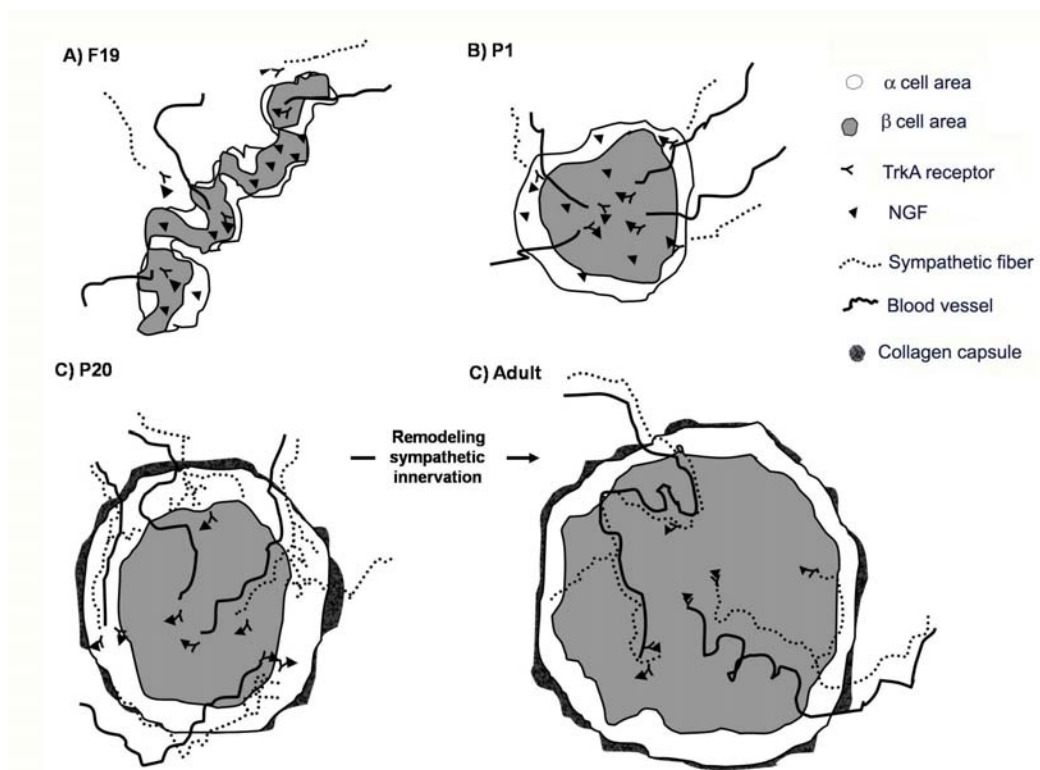


Figure 8

Model to explain the possible role of NGF in pancreatic development. Our results show that at foetal, early postnatal and P20 stages, the islets are immature in morphology and function. We observed that vasculature is formed first, followed by the innervation of sympathetic fibres and finally, by the capsule, finally conforming the architecture of the mature islet. Between P20 and adult stages a process of remodelling of the sympathetic innervation of the islet, probably by neural competition is observed. NGF could have a role in each the morphofunctional changes that can be received by insular cells, sympathetic fibres and blood vessels due to the presence to TrkA.

These results show that sympathetic innervation is subjected to a strong ontogenetic remodelling during pancreatic development. In general terms, there is a trend of innervation to increase from the perinatal period to P20. After this time, the amount of innervation within the islet decreases. Early hyper-innervation followed by a late elimination of redundant axons mediated through competitive interactions is commonly seen in peripheral targets [38,39]. However, it is to our knowledge the first description in pancreatic islets.

At earlier stages, sympathetic fibres are located mainly to the periphery of the islets or α cell compartment and as islets mature, an adjustment in the amount of fibres is accompanied by their relocation near the β cell area. Changes of preferred territories of axons to innervate during different ontogenetic stages are common. Transitory targets are used by growing axons while waiting for their definitive target to reach the maturity needed to receive

innervation. This might happen in the pancreas since the innervation enters later to the β cell compartment, when these cells display more mature functional features [26]; in P28 through adulthood. Adult mice also show more sympathetic fibres located in the periphery of their islets [16].

An interesting issue that deserves consideration relates to the mechanism by which the sympathetic innervation is remodelled. Previous observations that show that NGF overexpression in transgenic mice [18] and knocking out NGF and BAX [20] led to hyper-innervation and hypo-innervation, respectively, strongly suggest that changes in NGF availability might underlie sympathetic nerve remodelling. Accordingly, our results show that insular cells synthesize and release higher amounts of NGF at F19 and P1 than at P20 and after. Interestingly, this pattern of NGF secretion closely paralleled the phases of hyper- and hypo-innervation described in this work.

Further support for this type of inference is the fact that TrkA-immunoreactivity was observed in islet sympathetic fibres at all ages. We may speculate that the decrease in NGF release in mature beta cells, might be the result of the negative feedback of norepinephrine, secreted by mature sympathetic fibres [40,41].

Conclusion

In conclusion, these morphological and functional data suggest that NGF plays a pivotal role in pancreatic islet morphogenesis, remodelling and maintenance of sympathetic innervation and development of the vasculature and maturation of α and β cells in the islets, as modelled in Fig 8.

There is increasing evidence supporting the causal connection between many adult diseases and an altered ontogeny caused by persistent interactions between the developing organism and its environment early during pre- or postnatal life. A decrease in islet innervation has been shown to be an early target in type 1 diabetes [42,43]. Moreover, both homozygous knockout mice for NGF and TrkA resulted in dramatic phenotypes showing poor viability, not surviving beyond few weeks [44].

Interestingly in humans, an autosomal recessive mutation in TrkA gene causes a syndrome of congenital insensitivity to pain with anhidrosis (CIPA; [45], reviewed in [46]). Patients with this mutation show an impaired first-phase of glucose induced-insulin secretion [47]. Finally, a decrease in serum NGF level has been associated with peripheral neuropathy in animal models and humans with diabetes [48,49].

Knowing the roles of NGF in pancreatic islet development, maturation, innervation and function may lead us to new perspectives for understanding and treatment of diabetes mellitus, including better conditions of islets for transplantation.

Methods

Animal care

The experiments were carried out in foetal (F19 day), neonate (1 postnatal day; P1), juvenile (P20) and adult Wistar rats. All postnatal rats were male, and born and raised in temperature and light controlled rooms located in our animal facility. Rats were weaned at P21 and allowed free access to food and water after weaning. Animal protocols were designed following the guidelines provided by the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Academy of Sciences, Washington D.C., 1996) and approved by the Animal Care Committee at the Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México.

Culture of single insular cells

Rat foetuses were obtained through a caesarean incision at the age 19 days of gestation. In all the experiments, animals were deeply anaesthetised with sodium pentobarbital (40 mg/kg of body weight). After this procedure, foetuses were removed and placed in culture dishes filled with cold D-MEM and rapidly, pancreas was dissected and animals were killed by cervical dislocation.

A similar protocol was followed in rats of different post-natal ages. Once pancreatic islets were obtained by collagenase digestion (collagenase type IV from Worthington; Freehold, NJ), insular cells were desegregated and cultured as described previously [13]. To improve dissociation, the suspension was passed through syringes with needles of decreasing diameter. Dissociated cells were cultured in 24-well culture dishes filled with RPMI 1640 (11.6 mmol/l glucose) supplemented with 10% foetal calf serum, 200/ml penicillin G, 200 μ g/ml streptomycin, and 0.5 μ g/ml amphotericin B, at 37°C and 5% CO₂ in air. Islet cells were allowed to recover by culturing them overnight before conducting further experiments. Reagents were obtained from the following: Bovine serum albumin (BSA), HEPES, poly-L-lysine, trypsin, from Sigma (St. Louis, MO); tissue culture dishes from Corning (Corning, NY); foetal bovine serum (FCS) from Equitech-BIO (Ingram, TX); Hanks' balanced salt solution (HBSS), RPMI 1640 salts, and penicillin-streptomycin-amphotericin B solution from Life Technologies (Grand Island, NY).

Immunofluorescence techniques

Fresh body-tail segments of rat pancreas were rapidly placed in a buffered solution of paraformaldehyde (4%) overnight at 4°C, washed in phosphate buffer-saline (PBS; pH7.4, 0.1 M), and sequentially transferred to graded (10, 20 and 30%) solutions of sucrose in PBS for 24 h in each concentration. Tissue samples were then included in Tissue-Tek-II, cut longitudinally (5 or 10 μ m) in a cryostat (Leica CM 1900) and mounted on to gelatin-coated slides. One tissue section was taken every 200 μ m along each pancreas segment.

Tissue sections and cultured cells were first incubated with a blocking solution, with 2% bovine serum albumin (wt/vol) and 0.1% Triton X-100 (vol/vol) in PBS-t during 30 min at room temperature. Cell and tissue samples were then incubated with the primary polyclonal antibodies raised against various neural, vascular and pancreatic antigens and worked at different conditions (additional file 4); then washed and incubated with the corresponding secondary antibodies conjugated to various fluorophores (additional file 4). This allowed us to develop protocols for single, double or triple immunofluorescence labelling. After a final washing step with PBS, slides were cover-

slipped with anti-fading agent (DAKO). Negative controls were designed as follows: pre-adsorption with the corresponding antigen (1 µg peptide/µg antibody) for the antibodies raised against NGF, insulin or glucagon. For the rest of the antibodies, we omitted primary or secondary antibodies.

To determine the percentage of cells positive to NGF, TrkA, insulin and glucagon, at least 1400 culture cells were counted per marker. Percentage of pancreatic islets that display complete capsules were obtained at different developmental stages, 100 islets were counted per stage.

Endothelial lectin-binding

Endothelial labelling was also achieved by incubating the tissue sections with TRITC-conjugated *Bandeiraea simplicifolia* I isolectin B4 (IB4; 45 µg/ml; Sigma), diluted in PBS supplemented with 0.1 mg/ml CaCl₂ and MgCl₂ [22]. After an extensive wash, all of the slides were coverslipped with anti-fading mounting medium.

To further characterise blood vessels we used vimentin that is an intermediate filament protein (IF). Vimentin is expressed in cells of mesenchymal origin, like are endothelial, fibroblasts and smooth muscle cells, all types present in blood vessels [23,24]. We used a monoclonal mouse Anti-Vimentin, Clone VIM 3B4, DAKO (see table S1) according to the manufacturer's instructions.

Quantitative analysis of the sympathetic innervation

We measured islet innervation area at different stages, in 5 sections, taken each 100 µm in the pancreas, per animal (n = 8 animals per data). In each section, 15 different islets were measured. Each islet was delineated and TH+ cells were removed from images using a computer based imaging analysis system (Image J 1.36, Wayne Rasband; National Institutes of Health, Bethesda, MD). The percentage of total pancreatic area and α and β areas occupied by TH+ fibres were estimated. The total pancreatic area was calculated by dividing TH+ fibres area by total pancreatic islet area, and α and β cell areas. The rate area TH+ = area TH+ × 100/islet area (α cell area + β cell area).

Confocal microscopy

Confocal images were obtained using a Fluoview FV1000 laser confocal system (Olympus) attached/interfaced to an Olympus IX81 inverted light microscope with a 40× glycerol-immersion objective and some images were obtained with zoom 2. We used an Olympus Fluoview FV1000 confocal microscope to observe the sections for Cy5 (excitation 647 nm/DF32, emission 680 nm/DF32), CY3 (excitation 550 nm/DF32, emission 570 nm/DF32) and FITC (excitation 488 nm/DF32, emission 522 nm/DF32).

For the semiquantitative immunoreactive pro-NGF analysis, all images were taken with the exact same confocal settings to obtain semi-quantitative fluorescent signal and the histograms. Semi-quantification of image intensities was done with Olympus FV10-ASW 1.4 software. Fluorescence measurements were performed automatically by the computer program over the selected areas of interest. The program measures the fluorescence signal of the cytoplasm of the insular cells and obtaining the mean fluorescence in function of the total number of pixels studied in the islets.

Insulin and NGF secretion assays. After obtaining the cells, 200 000 islet cells per well were incubated in Hanks' balanced salt solution HBSS (5.6 mM glucose, 0.1% BSA) for 1 hour at 37°C. Then, cells were clustered in three experimental groups and incubated, in fresh 5.6 mM glucose-HBSS, 15.6 mM glucose-HBSS or 15.6 mM glucose, 20 mM KCl in HBSS, for 1 hour at 37°C. At the end a protease inhibitors was added to each sample (Complete Mini protease inhibitor cocktail; Roche Molecular Biochemical, Mannheim, Germany). NGF and insulin concentrations were then measured by ELISA; EmaxImmunoassay System (Promega, Madison, WI) for NGF and Mercodia ultrasensitive rat insulin ELISA (ALPCO, Windham, NH) for insulin. NGF and insulin levels are reported in pg and ng respectively. All the results were obtained by duplicate and normalised per µg of total protein as estimated by using Bradford assays as recommended by the supplier (Bio-Rad kit 500-0002).

Statistical analysis

All of the data are reported as means ± SEM; n denotes the number of cells/or experiments. Because the data distribution fitted a normal curve, we used a one-way ANOVA followed by a Bonferroni's test for multiple comparisons to carry out the statistical analyses (Stat view 4.57; Abacus Concepts, Cary, NC). The p value was set at 0.05.

Abbreviations

NGF: nerve growth factor; F19: foetal day 19; P0: postnatal day 0 or neonatal; P20: postnatal day 20

Authors' contributions

SCV carried out experiments, participated in design of the experiments, draft and final version of the manuscript. VNT carried out experiments of mRNA NGF RT-PCR, cultures and discussion of the manuscript. CSS carried out cultures and insulin secretion analysis, also discussed the manuscript. GGO participated in the design of experiments and quantification of innervation and in discussion and draft version. MH conceived the study, designed experiments, coordination of participants, writing the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Additional material

Additional file 1

Pancreatic islets that display complete capsules at different developmental stages.

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-213X-9-34-S1.pdf>]

Additional file 2

*Ontogeny Pro-NGF expression. (A) Pro-NGF expression in the pancreas at different developmental stages. (B) Bars represent mean fluorescence intensity (arbitrary units). ANOVA * $p < 0.001$ relative to adulthood, $n = 8$ different animals per developmental stage. Scale bar = 20 μ m.*

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-213X-9-34-S2.pdf>]

Additional file 3

Percentage of cells immunoreactive to NGF, TrkA, insulin and glucagon at F19.

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-213X-9-34-S3.pdf>]

Additional file 4

Antibodies used in the experiments.

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-213X-9-34-S4.pdf>]

Acknowledgements

We are very grateful to Selda Gezginci-Oktayoglu, Alvaro Caso-Chávez and Dr. Rocío Aguilar-Chongtay for the discussion and revision of the manuscript; Diana Millán, Felix Sierra, Federico Jandete, Alejandra Alvarez-Tinoco, and Dagoberto Tapia, for technical assistance; Dr. Claudia Rivera-Cerecedo and Dr. Hector Malagón for providing animal management and care; Dr. Araceli Patrón Soberano, Gabriel Orozco Hoyuela and Rodolfo Paredes from the Unit of Microscopy, and to Ana Ma. Escalante, Adrián Aguilera and Francisco Perez-Eugenio from the Computing Unit, all Units are in the Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

This work was supported by DGAPA 229407 (Universidad Autónoma de México), Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México SDI.PTID.05.6 and CONACYT FI-60065 to MH.

This study was performed in partial fulfilment of the requirements for the PhD degree in Biomedical Sciences (Universidad Nacional Autónoma de México) of Siraam Cabrera-Vásquez that received fellowships from Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca, PROMEP, and CONACYT (185762).

References

1. Navarro-Tableros V, Fiordeliso T, Hernandez-Cruz A, Hiriart M: **Physiological development of insulin secretion, calcium channels, and GLUT2 expression of pancreatic rat beta-cells.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007, **292(4)**:E1018-1029.
2. Salvioli B, Bovara M, Barbara G, De Ponti F, Stanghellini V, Tonini M, Guerrini S, Cremon C, Degli Esposti M, Koumandou M, et al.: **Neurology and neuropathology of the pancreatic innervation.** *Jop* 2002, **3(2)**:26-33.
3. Ahren B: **Autonomic regulation of islet hormone secretion – implications for health and disease.** *Diabetologia* 2000, **43(4)**:393-410.
4. Ahren B: **Glucagon secretion in relation to insulin sensitivity in healthy subjects.** *Diabetologia* 2006, **49(1)**:117-122.
5. Bjerre B, Björklund A, Mobley WW, Rosengren E: **Short- and long-term effects of nerve growth factor on the sympathetic nervous system in the adult mouse.** *Brain Research* 1975, **94(2)**:263-277.
6. Carlson SL, Albers KM, Beiting DJ, Parish M, Conner JM, Davis BM: **NGF modulates sympathetic innervation of lymphoid tissues.** *J Neurosci* 1995, **15(9)**:5892-5899.
7. Dissen GA, Romero C, Paredes A, Ojeda SR: **Neurotrophic control of ovarian development.** *Microsc Res Tech* 2002, **59(6)**:509-515.
8. Lara HE, McDonald JK, Ojeda SR: **Involvement of nerve growth factor in female sexual development.** *Endocrinology* 1990, **126(1)**:364-375.
9. Lazarovici P, Marcinkiewicz C, Lelkes PI: **Cross talk between the cardiovascular and nervous systems: neurotrophic effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiogenic effects of nerve growth factor (NGF)-implications in drug development.** *Curr Pharm Des* 2006, **12(21)**:2609-2622.
10. Kanaka-Gantenbein C, Dicou E, Czernichow P, Scharfmann R: **Presence of nerve growth factor and its receptors in an in vitro model of islet cell development: Implication in normal islet morphogenesis.** *Endocrinology* 1995, **136(7)**:3154-3162.
11. Kanaka-Gantenbein C, Tazi A, Czernichow P, Scharfmann R: **In vivo presence of the high affinity nerve growth factor receptor Trk-A in the rat pancreas: differential localization during pancreatic development.** *Endocrinology* 1995, **136(2)**:761-769.
12. Hiriart M, Aguilar-Bryan L: **Channel regulation of glucose sensing in the pancreatic beta-cell.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008, **295(6)**:E1298-1306.
13. Navarro-Tableros V, Sanchez-Soto MC, Garcia S, Hiriart M: **Autocrine regulation of single pancreatic beta-cell survival.** *Diabetes* 2004, **53(8)**:2018-2023.
14. Rosenbaum T, Sanchez-Soto MC, Hiriart M: **Nerve growth factor increases insulin secretion and barium current in pancreatic beta-cells.** *Diabetes* 2001, **50(8)**:1755-1762.
15. Rosenbaum T, Vidaltamayo R, Sanchez-Soto MC, Zentella A, Hiriart M: **Pancreatic beta cells synthesize and secrete nerve growth factor.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, **95(13)**:7784-7788.
16. Burris RE, Hebrok M: **Pancreatic innervation in mouse development and beta-cell regeneration.** *Neuroscience* 2007, **150(3)**:592-602.
17. Honma Y, Araki T, Gianino S, Bruce A, Heuckeroth R, Johnson E, Milbrandt J: **Artemin is a vascular-derived neurotrophic factor for developing sympathetic neurons.** *Neuron* 2002, **35(2)**:267-282.
18. Edwards RH, Rutter WJ, Hanahan D: **Directed expression of NGF to pancreatic [beta] cells in transgenic mice leads to selective hyperinnervation of the islets.** *Cell* 1989, **58(1)**:161-170.
19. Reimer MK, Mokshagundam SP, Wlyer K, Sundler F, Ahren B, Stagner JI: **Local growth factors are beneficial for the autonomic reinnervation of transplanted islets in rats.** *Pancreas* 2003, **26(4)**:392-397.
20. Glebova NO, Ginty DD: **Heterogeneous requirement of NGF for sympathetic target innervation in vivo.** *J Neurosci* 2004, **24(3)**:743-751.
21. Vidaltamayo R, Sánchez-Soto MC, Rosenbaum T, Martínez-Merlos T, Hiriart M: **Neuron-like phenotypic changes in pancreatic B-cells induced by NGF, FGF and dbcAMP.** *Endocrine* 1996, **4**:19-26.
22. Lessmann V, Gottmann K, Malcangio M: **Neurotrophin secretion: current facts and future prospects.** *Prog Neurobiol* 2003, **69(5)**:341-374.
23. Lu B, Pang PT, Woo NH: **The yin and yang of neurotrophin action.** *Nat Rev Neurosci* 2005, **6(8)**:603-614.
24. Lim KC, Tyler CM, Lim ST, Giuliano R, Federoff HJ: **Proteolytic processing of proNGF is necessary for mature NGF regulated secretion from neurons.** *Biochem Biophys Res Commun* 2007, **361(3)**:599-604.
25. King JC: **Maternal obesity, metabolism, and pregnancy outcomes.** *Annu Rev Nutr* 2006, **26**:271-291.

26. Aguayo-Mazzucato C, Sanchez-Soto C, Godinez-Puig V, Gutierrez-Ospina G, Hiriart M: **Restructuring of pancreatic islets and insulin secretion in a postnatal critical window.** *PLoS ONE* 2006, **1**:e35.
27. Janssen SW, Hermus AR, Lange WP, Knijnenburg Q, Laak JA van der, Sweep CG, Martens GJ, Verhofstad AA: **Progressive histopathological changes in pancreatic islets of Zucker Diabetic Fatty rats.** *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2001, **109(5)**:273-282.
28. Nikolova G, Strilic B, Lammert E: **The vascular niche and its basement membrane.** *Trends Cell Biol* 2007, **17(1)**:19-25.
29. Irving-Rodgers HF, Ziolkowski AF, Parish CR, Sado Y, Ninomiya Y, Simeonovic CJ, Rodgers RJ: **Molecular composition of the perislet basement membrane in NOD mice: a barrier against destructive insulinitis.** *Diabetologia* 2008, **51(9)**:1680-1688.
30. Gardemann A, Jungermann K, Grosse V, Cossel L, Wohlrab F, Hahn HJ, Blech W, Hildebrandt W: **Intraportal transplantation of pancreatic islets into livers of diabetic rats. Reinnervation of islets and regulation of insulin secretion by the hepatic sympathetic nerves.** *Diabetes* 1994, **43(11)**:1345-1352.
31. Myrsten U, Keymeulen B, Pipeleers DG, Sundler F: **Beta cells are important for islet innervation: evidence from purified rat islet-cell grafts.** *Diabetologia* 1996, **39(1)**:54-59.
32. Vasir B, Reitz P, Xu G, Sharma A, Bonner-Weir S, Weir GC: **Effects of diabetes and hypoxia on gene markers of angiogenesis (HGF, cMET, uPA and uPAR, TGF-alpha, TGF-beta, bFGF and Vimentin) in cultured and transplanted rat islets.** *Diabetologia* 2000, **43(6)**:763-772.
33. Damon DH, Teriele JA, Marko SB: **Vascular-derived artemin: a determinant of vascular sympathetic innervation?** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007, **293(1)**:H266-273.
34. Miralles F, Philippe P, Czernichow P, Scharfmann R: **Expression of nerve growth factor and its high-affinity receptor Trk-A in the rat pancreas during embryonic and fetal life.** *J Endocrinol* 1998, **156(3)**:431-439.
35. Navarro-Tableros V, Fiordeliso T, Hernandez-Cruz A, Hiriart M: **Nerve growth factor promotes development of glucose-induced insulin secretion in rat neonate pancreatic beta cells by modulating calcium channels.** *Channels (Austin)* 2007, **1(6)**:408-416.
36. Julio-Pieper M, Lara HE, Bravo JA, Romero C: **Effects of nerve growth factor (NGF) on blood vessels area and expression of the angiogenic factors VEGF and TGFbeta1 in the rat ovary.** *Reprod Biol Endocrinol* 2006, **4**:57.
37. Dolle JP, Rezvan A, Allen FD, Lazarovici P, Lelkes PI: **Nerve growth factor-induced migration of endothelial cells.** *J Pharmacol Exp Ther* 2005, **315(3)**:1220-1227.
38. Deppmann CD, Mihalas S, Sharma N, Lonze BE, Niebur E, Ginty DD: **A model for neuronal competition during development.** *Science* 2008, **320(5874)**:369-373.
39. Silva AM, Queiroz DB, Castro Neto EF, Naffah-Mazzacoratti Mda G, Godinho RO, Porto CS, Gutierrez-Ospina G, Avellar MC: **Segment-specific decrease of both catecholamine concentration and acetylcholinesterase activity are accompanied by nerve refinement in the rat cauda epididymis during sexual maturation.** *J Androl* 2002, **23(3)**:374-383.
40. Nisoli E, Tonello C, Benarese M, Liberini P, Carruba MO: **Expression of nerve growth factor in brown adipose tissue: implications for thermogenesis and obesity.** *Endocrinology* 1996, **137(2)**:495-503.
41. Peeraully MR, Jenkins JR, Trayhurn P: **NGF gene expression and secretion in white adipose tissue: regulation in 3T3-L1 adipocytes by hormones and inflammatory cytokines.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004, **287(2)**:E331-339.
42. Persson-Sjogren S, Holmberg D, Forsgren S: **Remodeling of the innervation of pancreatic islets accompanies insulinitis preceding onset of diabetes in the NOD mouse.** *J Neuroimmunol* 2005, **158(1-2)**:128-137.
43. Saravia F, Homo-Delarche F: **Is innervation an early target in autoimmune diabetes?** *Trends Immunol* 2003, **24(11)**:574-579.
44. Crowley C, Spencer SD, Nishimura MC, Chen KS, Pitts-Meek S, Armanini MP, Ling LH, McMahon SB, Shelton DL, Levinson AD, et al.: **Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons.** *Cell* 1994, **76(6)**:1001-1011.
45. Indo Y: **Genetics of congenital insensitivity to pain with anhidrosis (CIPA) or hereditary sensory and autonomic neuropathy type IV. Clinical, biological and molecular aspects of mutations in TRKA(NTRK1) gene encoding the receptor tyrosine kinase for nerve growth factor.** *Clin Auton Res* 2002, **12(Suppl 1)**:20-32.
46. Chao MV, Rajagopal R, Lee FS: **Neurotrophin signalling in health and disease.** *Clin Sci (Lond)* 2006, **110(2)**:167-173.
47. Schreiber R, Levy J, Loewenthal N, Pinsky V, Hershkovitz E: **Decreased first phase insulin response in children with congenital insensitivity to pain with anhidrosis.** *J Pediatr Endocrinol Metab* 2005, **18(9)**:873-877.
48. Faradji V, Sotelo J: **Low serum levels of nerve growth factor in diabetic neuropathy.** *Acta Neurol Scand* 1990, **81(5)**:402-406.
49. Tomlinson MJ, White A, Barratt CL, Bolton AE, Cooke ID: **The removal of morphologically abnormal sperm forms by phagocytes: a positive role for seminal leukocytes?** *Hum Reprod* 1992, **7(4)**:517-522.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

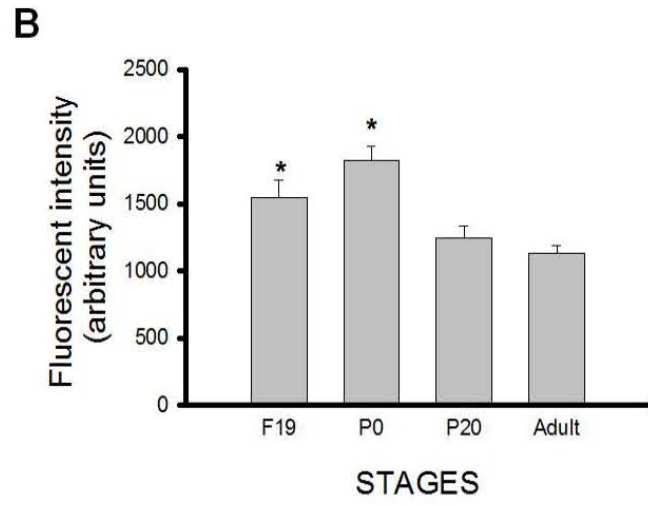
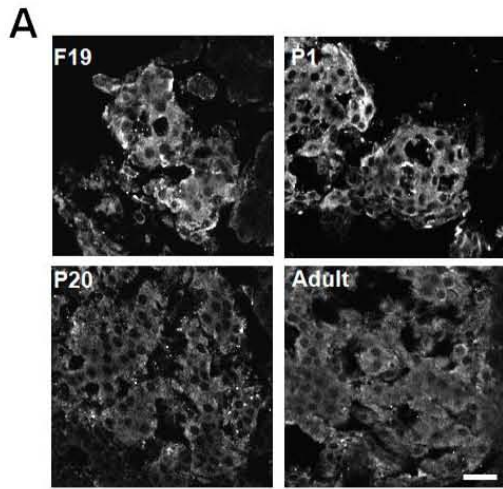
Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp



ANTIBODY	SOURCE	CONDITIONS
1. Guinea pig anti-insulin	ICN, Aurora, OH	1:4000, 12 h, 4 °C (cells) 1:2000, 12 h, 4 °C (Tissue sections)
2. Mouse anti-glucagon	Sigma	1:12000, 12 h, 4 °C (cells) 1:6000, 12 h, 4 °C (Tissue sections)
3. Rabbit anti-TrkA	Abcam	1:100, 12 h, 4 °C (cells) 1:25, 12 h, 4 °C (Tissue sections)
4. Goat anti-glucagon	Santa Cruz	1:500, 12 h, 4 °C (Tissue sections)
5. Rabbit anti-NGF	US Biological	1:1000, 36 h, 4 °C (cells)
6. Rabbit anti-tyrosine hydroxylase	Chemicon	1:100, 36 h, 4 °C (Tissue sections)
7. Mouse anti-tyrosine hydroxylase	Chemicon	1:20, 36 h, 4 °C (Tissue sections)
8. Rabbit anti-ProNGF	Chemicon	1:50, 12 h, 4 °C (Tissue sections)
9. Mouse anti-vimentin	Dako	1:100, 12 h, 4 °C (Tissue sections)
10. Rabbit anti-GFP	Santa Cruz	1:200, 12 h, 4 °C (Tissue sections)
11. Mouse Anti-collagen type IV	Dako	1:100, 12 h, 4 °C (Tissue sections)
12. Cyanine 3 (Cy3)-conjugated F(ab') ₂ fragment of goat anti-guinea pig IgG	Jackson ImmunoResearch	1:50, 2 h, room temperature
13. Cyanine 5 (Cy5)-conjugated F(ab') ₂ fragment of goat anti-rabbit IgG	Zymed laboratories	1:100, 2 h, room temperature
14. Fluorescein isothiocyanate-conjugated (FITC)-conjugated anti-mouse IgG	Zymed laboratories	1:200, 1 h, room temperature



STAGES	ENCAPSULATED ISLETS %
F19	0
P1	0
P20	26
Adult	98