

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**EL FACTOR DE CRECIMIENTO NEURONAL EN LA  
REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DE INSULINA  
EN CÉLULAS  $\beta$  DE RATA ADULTA EN CULTIVO**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**LICENCIADA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA**

**P R E S E N T A**

**ELVIRA DEL CARMEN ARELLANES LICEA**

**TUTORA: DRA. MARCIA HIRIART URDANIVIA**

**MÉXICO, D.F.**

**OCTUBRE 2006**



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.

La realización de esta investigación fue llevada a cabo gracias a los donativos de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico IN211800 (Beca de Licenciatura) y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología D 39822-Q (Beca de Licenciatura).

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Marcia Hiriart Urdanivia, por el aprendizaje en su laboratorio, por la convivencia, por su paciencia, confianza y guía.

A los Sinodales un profundo agradecimiento por su espera, orientación y valiosos comentarios.

A las Dras. María Eugenia Gosebatt Bonaparte y Cristina Fernández Mejía por el aprendizaje que me dejó la estancia en sus laboratorios y muy buenos recuerdos.

A los Investigadores que contribuyeron a mi formación académica durante la licenciatura, por haberme transmitido sus conocimientos.

A la Dra. Tatiana Fiordeliso Coll por su ayuda enorme durante la realización de las IF y por todos sus consejos.

Al Sr. Pedro Hernández Trujillo, sin quien no hubiera podido realizar y por su ayuda desinteresada durante los cultivos primarios.

Al personal del Bioterio del IFC, en especial a la Dra. Claudia Rivera por su eficiencia y disposición para el uso de los animales de laboratorio.

Al personal de la Biblioteca del IFC por sus atenciones, gran eficiencia y amabilidad.

Al personal de la UBM del IFC por su profesionalismo y accesibilidad para llevar a cabo la realización de parte de los experimentos.

A Alfonso Salgado por su ayuda y consejos durante el proceso de RT-PCR.

Al laboratorio del Dr. Alejandro Zentella por su amabilidad y uso del espectrofotómetro.

Muy especialmente a mis amigos por compartir esos excelentes momentos, por sus consejos, apoyo, por todo: Karina, Amado, Haydeé, Yajaira, Cristina, Hefziba y por esas inolvidables palabras.

Especialmente a todos mis compañeros del laboratorio por su ayuda, enseñanzas, discusiones académicas, aprendizaje y compañerismo, con mucho cariño.

Y bueno a la UNAM por haber sido un sueño e idealización alcanzable y en alguna parte satisfactoria.

## DEDICATORIAS

A mis padres: Lourdes Licea y Jesús Arellanes por su apoyo durante toda mi vida en las buenas y en las malas decisiones, sin quienes no hubiera podido lograr nada a quienes agradezco enormemente todo lo que hacen por mí. Aunque por un tiempo me privé de ellos espero que algún día sea retribuyente.

A mis hermanas: Libertad, Tania y Brenda, por todo, por ser parte esencial de mi vida, por su cariño, por todos los momentos que hemos pasado juntas, hubiera preferido haberlas disfrutado más pero afortunadamente tenemos todo el tiempo para hacerlo.

A la cosita más bella del universo y llena de vida: Sebastián, eres adorablemente especial.

A mis tíos Rosalía Contreras y Tomás Licea y a mis primos Sofía y David por su cariño, apoyo y por haber compartido parte de sus vidas conmigo.

A mis abuelitas Elvira Meixueiro† y Carmen Hernández por ser en parte la inspiración en la investigación científica aunque pudo haber sido de una mejor manera...

Ricardo, no existen palabras para expresar mi enorme agradecimiento y cariño por estar conmigo, por ser como eres, por todo, porque has sido tanto para mí, gracias por ayudarme y formar parte de mí.

## ABREVIATURAS

<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehído - 3 - fosfato deshidrogenasa
<b>GLP-1</b>	Péptido similar a glucagon - 1
<b>HBSS</b>	Solución salina balanceada de Hanks
<b>HNF</b>	Factor nuclear hepático
<b>IRS</b>	Sustrato del receptor de insulina
<b>MAPK</b>	Proteína cinasa activada por mitógenos
<b>MODY</b>	Diabetes tipo 2 de aparición temprana
<b>NGF</b>	Factor de crecimiento neuronal
<b>NLS</b>	Señal de localización nuclear
<b>PBS</b>	Buffer salino de fosfatos
<b>PDX-1</b>	<i>Pancreatic duodenal homeobox-1</i>
<b>PEF</b>	Penicilina - estreptomina - fungizona
<b>PI3-K</b>	Fosfoinosítido 3 - cinasa
<b>RE</b>	Retículo endoplásmico
<b>RTK</b>	Receptor con actividad de cinasa de tirosina
<b>RT-PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcripción reversa
<b>SBF</b>	Suero bovino fetal
<b>SRP</b>	Partícula de reconocimiento de la señal
<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>TFs</b>	Factores de transcripción

## ÍNDICE

	<b>Páginas</b>
<b>I. RESUMEN</b>	1
<b>II. INTRODUCCIÓN</b>	3
2.1 Estructura del Páncreas y del Islote Pancreático	3
2.2 Biosíntesis de Insulina	4
2.2.1 El Gen de Insulina	5
2.2.2 Traducción y Procesamiento de Insulina	7
2.3 Regulación de la Transcripción del Gen Insulina	9
2.3.1 Principales Factores de Transcripción que Regulan la Transcripción del Gen de Insulina	9
2.3.2 Regulación de la Transcripción del Gen de Insulina por Glucosa	13
2.3.2.1 Mecanismos de Regulación de la Transcripción del Gen de Insulina por Glucosa que Dependen de la Actividad de PDX-1	16
2.4 Secreción de Insulina: Acoplamiento entre el Estímulo con Glucosa y la Secreción de Insulina	17
2.4.1 Transporte y Metabolismo de la Glucosa	17
2.4.2 Canales Iónicos que Participan en la Actividad Eléctrica de la Célula $\beta$ Implicados en la Secreción de Insulina	18
2.5 El Factor de Crecimiento Neuronal	20
2.5.1 El Factor de Crecimiento Neuronal en las Células $\beta$ Pancreáticas	23
<b>III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	26
<b>IV. HIPÓTESIS</b>	26
<b>V. OBJETIVOS</b>	27
5.1 General	27
5.2 Particulares	27
<b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	28
6.1 Cultivo de Células $\beta$ Pancreáticas	28
6.2 RT-PCR	29

6.3	ELISA para Insulina	31
6.3.1	ELISA para Insulina en Incubaciones con Anticuerpos Neutralizantes	32
6.4	Inmunofluorescencia	33
6.4.1	Cuantificación de la Inmunoreactividad	34
6.5	Análisis Estadístico	35
<b>VII.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>36</b>
7.1	Secreción de Insulina a Tres Horas de Incubación	36
7.1.1	Expresión de Insulina	38
7.1.2	Expresión de PDX-1	38
7.2	Secreción de Insulina en Presencia de Anticuerpos Neutralizantes	41
7.3	Secreción de Insulina a Seis Horas de Incubación	43
7.3.1	Expresión de Insulina	43
7.3.2	Expresión de PDX-1	45
7.4	Inmunofluorescencia de PDX-1	46
<b>VIII.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>60</b>
<b>IX.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>67</b>
<b>X.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>69</b>
<b>XI.</b>	<b>REFERENCIAS</b>	<b>70</b>

## I. RESUMEN

Las células  $\beta$  pancreáticas producen y secretan insulina, que ejerce un papel fundamental en la regulación del metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. La expresión del gen de insulina es específica de las células  $\beta$  y está dada por la interacción de diferentes factores de transcripción con la región promotora del gen. Uno de los más importantes para la transactivación del gen de insulina es PDX-1, que es indispensable para la formación del páncreas y cuya actividad es regulada por diversos estímulos, entre los que sobresalen la glucosa y la insulina.

Es posible que exista una regulación autocrina de la síntesis y la secreción de insulina, ya que las células  $\beta$  producen y secretan insulina y el factor de crecimiento neuronal (NGF) y presentan autorreceptores a ambas moléculas. El NGF tiene diversos efectos sobre las células  $\beta$  y ha sido implicado en la ontogenia del islote pancreático; la modulación de la plasticidad de las células  $\beta$  en cultivo; la potenciación de la secreción de insulina en respuesta a la glucosa y otras acciones relacionadas con la modulación de canales iónicos y a la sobrevivencia celular.

En este trabajo, demostramos que en células  $\beta$  aisladas de rata adulta, el NGF de forma autocrina, mantiene el nivel de RNAm de insulina de manera dependiente de glucosa y que es crítico para mantener la secreción de insulina estimulada por glucosa cuando las células son cultivadas en una baja densidad celular. De forma exógena, el NGF aumenta la secreción de insulina y regula la localización subcelular de PDX-1 aumentando su expresión en el citoplasma así como en el núcleo.

Concluimos que el NGF regula, a corto plazo, la biosíntesis de insulina a nivel transcripcional así como, posiblemente la modulación de la actividad de PDX-1, lo que podría explicar en parte, el efecto positivo del NGF sobre la secreción de insulina en células  $\beta$  pancreáticas.

## II. INTRODUCCIÓN

### 2.1 Estructura del Páncreas y del Islote Pancreático

El páncreas de los mamíferos es una glándula con función mixta exocrina y endocrina (**Figura 2.1**), que controla la absorción de nutrientes y muchas funciones homeostáticas, como el metabolismo de la glucosa (**1, 2**).

El páncreas exocrino está formado por células acinares que secretan enzimas digestivas y por el sistema epitelial ductal que secreta electrolitos y bicarbonato, que transporta la secreción acinar al intestino delgado. La porción exocrina comprende del 95 al 99% del páncreas total (**1, 3**).

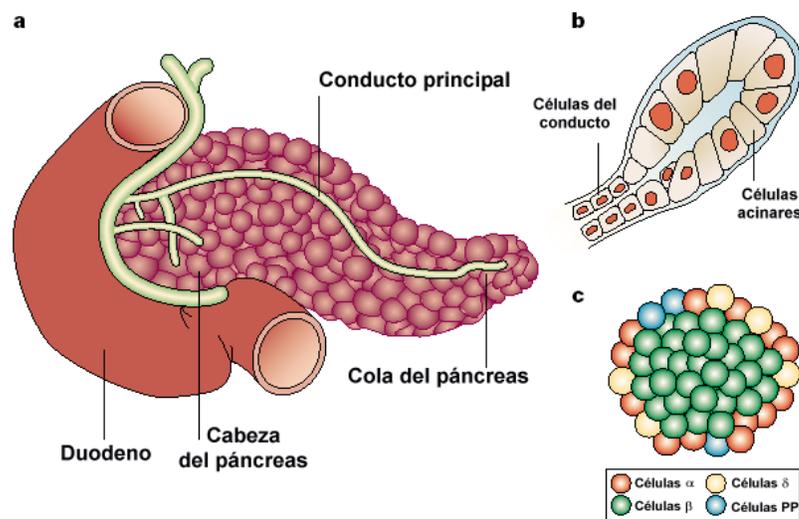
El páncreas endocrino comprende del 1 al 2 % del páncreas total (**2, 4**), está formado por los islotes de Langerhans ó islotes pancreáticos, que se encuentran distribuidos entre el tejido exocrino. Están constituidos por cuatro tipos celulares:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y PP, que secretan hormonas peptídicas al torrente sanguíneo (**1, 3, 4**). Los islotes están altamente vascularizados e inervados y están rodeados por una membrana basal que los encapsula (**4**).

Las células  $\alpha$  secretan glucagon, constituyen del 15 al 20 % del islote pancreático y se encuentran principalmente en la periferia del islote. El glucagon es secretado en condiciones de hipoglucemia y promueve la glucogenólisis y la gluconeogénesis hepática. Por otro lado, dentro del islote esta hormona, de manera paracrina, estimula la secreción de insulina (**1, 4**).

Las células  $\delta$  secretan somatostatina, representan del 5 al 10 % del islote pancreático. Esta hormona ejerce efectos inhibitorios en la secreción pancreática exocrina y endocrina (**1**).

Las células PP secretan polipéptido pancreático, constituyen menos del 2 % del islote pancreático y al igual que la somatostatina tiene efectos inhibitorios en la secreción pancreática exocrina y endocrina (1).

Las células  $\beta$  secretan insulina, son el tipo celular más abundante dentro del islote, comprendiendo del 70 al 80 % de éste y en roedores se encuentran en el centro del islote, rodeadas de los otros tipos celulares (1, 4, 5). La insulina es secretada principalmente en respuesta a la glucosa, así como por otros nutrientes, hormonas y por estimulación nerviosa. La insulina tiene un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis de glucosa, y en la regulación del metabolismo de lípidos y proteínas (5, 6)



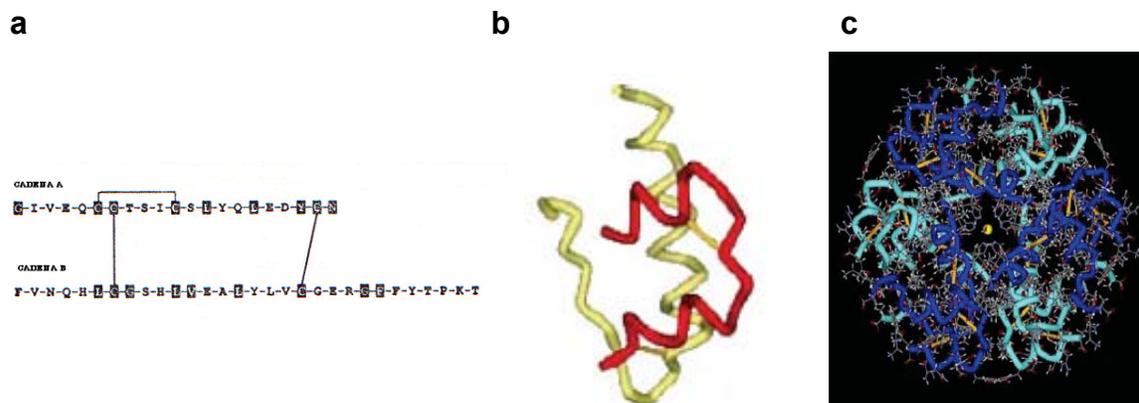
**Figura 2.1. Estructura del páncreas exocrino y endocrino.** Se muestra en (a) el páncreas maduro, en (b) la porción exocrina y en (c) el islote pancreático. **Modificado de la referencia 1.**

## 2.2 La Biosíntesis de Insulina

El producto inicial de la transcripción del gen de insulina es la preproinsulina, la cual contiene una secuencia de 24 aa en el extremo N-terminal denominada péptido señal, que es hidrolizado al entrar al retículo endoplásmico rugoso. La proinsulina resultante también es hidrolizada para dar la insulina madura y un péptido conector llamado péptido C (7).

La insulina tiene un peso molecular de ~ 6000 Da, y su estructura está altamente conservada en los vertebrados. Está formada por dos cadenas polipeptídicas, la cadena A tiene 21 aa y la cadena B tiene 30 aa, unidas por dos puentes disulfuro intercadena (A7 - B7 y A20 - B19) y uno intracadena (A6 - A11). El precursor proinsulina contiene el péptido C de 31 aa entre las cadenas B y A (8, 9).

La forma circulante y biológicamente activa de la insulina es monomérica, aunque en la presencia de iones de zinc y pH ácido, la insulina forma cristales compuestos de insulina dimerizada que se asocia en hexámeros (Figura 2.2) (9, 10).



**Figura 2.2. Estructura de la insulina.** (a) Estructura primaria, (b) estructura secundaria, (c) el hexámero de insulina humana. **Modificado de las referencias 10 y 18.**

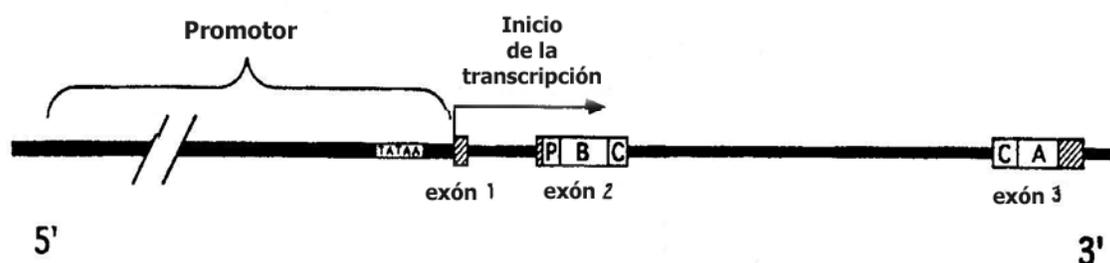
### 2.2.1 El Gen de Insulina

La estructura del gen de insulina se encuentra altamente conservada entre las especies; la región codificante contiene tres exones y dos intrones (Figura 2.3). El primer exón contiene las secuencias 5' no traducidas (UTR), implicadas en el inicio de la transcripción; el segundo exón contiene las secuencias que codifican el péptido señal, la cadena B y una fracción del péptido C; y el tercer exón codifica

el resto del péptido C, la cadena A, y la región 3' UTR. El gen humano de insulina se encuentra en el extremo del brazo corto del cromosoma 11 (11p15.5) (8, 11).

En las especies de rata y en ratón, a diferencia de otros organismos, existen dos tipos de insulina, los tipos I y II, que son el producto de dos genes no alélicos siendo el resultado de una duplicación génica mediada por RNA. Los dos tipos de insulina en la rata, difieren una de la otra por dos aa en la cadena B y por dos aa en el péptido C. El gen de la preproinsulina II contiene tres exones y dos intrones, en tanto que la I tiene solo un intrón. En la rata ambos genes se encuentran en el cromosoma 1 (12, 13).

La región 5' no transcrita del gen de insulina, aproximadamente 4 kb río arriba (upstream) del sitio de inicio de la transcripción, constituye la región promotora, que son secuencias requeridas para el inicio apropiado de la transcripción del gen de insulina. El promotor de insulina juega un papel regulador, dirigiendo el sitio correcto de inicio de la transcripción, limita la transcripción de insulina a las células  $\beta$ , además restringe la expresión de un gen ligado a estas células y regula la proporción de transcripción en respuesta a reguladores fisiológicos. Los estudios del promotor de insulina se han enfocado a un pequeño fragmento de aproximadamente 400 pb del promotor proximal (14, 15).



**Figura 2.3. Representación esquemática del gen de insulina.** Se representa la región promotora, la caja TATA, los exones (en las cajas se marca las regiones que codifican las diferentes porciones de la preproinsulina) e intrones. **Modificado de la referencia 14.**

### 2.2.2 Traducción y Procesamiento de Insulina

La insulina es sintetizada como precursor de una cadena, que comprende: el péptido señal (secuencia señal) en el N-terminal, la cadena B, una secuencia Arg-Arg, el péptido C, otra secuencia Lys-Arg y la cadena A (9).

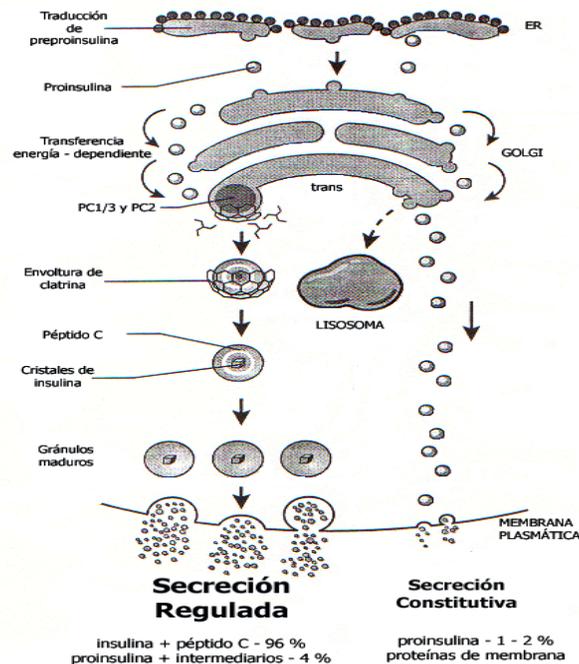
La traducción del RNAm de la preproinsulina empieza en el citosol con la unión de ribosomas libres a la molécula. La transferencia al lumen del retículo endoplásmico rugoso (RE) se da co-traduccionalmente. A la secuencia señal de la preproinsulina naciente se une la partícula de reconocimiento de la señal (SRP) que permite la unión del complejo al receptor del SRP en la membrana del RE. Cuando la SRP y su receptor se disocian de la cadena naciente, la secuencia señal se une a un canal (translocón) que se abre para permitir la entrada de la cadena, que es elongada hasta que la traducción termina y la secuencia señal es cortada por una peptidasa de la señal y degradada en el lumen; al final de esta transferencia la preproinsulina es ya proinsulina (9, 16).

La preproinsulina es plegada en su configuración más estable termodinámicamente y se forman los tres puentes disulfuro. El proceso es catalizado por las proteínas llamadas BiP y PDI del RE. BiP evita la agregación de proteínas y la proteína disulfuro isomerasa (PDI) es la enzima que cataliza la formación de los enlaces disulfuro (9, 16).

La proinsulina viaja a través de vesículas del RE al complejo de Golgi. Los gránulos secretorios son formados en el trans Golgi y son secretados hacia la vía de secreción regulada, estos gránulos contienen otros productos de la célula  $\beta$  (Figura 2.4) (9, 16, 18).

La conversión de proinsulina a insulina madura se da en las vesículas de secreción recién formadas. Es catalizada por tres enzimas: las prohormona convertasas PC1/3, PC2 y carboxipeptidasa H ó E (CPH). PC1 corta la proinsulina

en la secuencia Arg-Arg y PC2 en la secuencia Lys-Arg, ambas endoproteasas son dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  y tienen un pH de actividad óptima de 5.5, ambiente que se encuentra en el gránulo secretor de la célula  $\beta$ . Los aa básicos expuestos en las uniones de las cadenas B-C y C-A son removidos por la exoproteasa CPH (9, 17, 18).



**Figura 2.4. Biosíntesis de insulina.** Organización subcelular de la traducción y procesamiento de insulina. Modificado de la referencia 18.

En estudios de islotes aislados de rata, se observó que la síntesis de insulina a nivel traduccional aumenta de inmediato en respuesta a la alta glucosa (7, 18, 19). El mecanismo de acción de la glucosa puede estar a nivel del inicio de la traducción, así como por la modulación de la actividad de la SRP (20). En células  $\beta$  aisladas de rata, se demostró que existe un reclutamiento de las células a la biosíntesis de insulina, dependiendo de la concentración de glucosa (21).

También se han identificado elementos reguladores implicados en la inducción específica de la traducción de insulina en las regiones 5' y 3' UTR del RNAm por la glucosa (17).

## 2.3 Regulación de la Transcripción del Gen de Insulina

El gen de insulina en los mamíferos adultos es expresado exclusivamente en las células  $\beta$  (22). El RNAm de insulina es detectado al día embrionario 8.5 en la especie ratón (23) y en humanos se encuentran células que expresan insulina en la octava semana de desarrollo embrionario (22).

La regulación de la transcripción del gen de insulina depende de la interacción de elementos que actúan en *cis* (secuencias de DNA del gen), con factores proteicos que actúan en *trans* (24). Las secuencias del promotor funcionan como sitios de reconocimiento para factores de transcripción (TFs), que son proteínas de unión al DNA secuencia específicas y cuya expresión puede ser restringida a las células  $\beta$  ó pueden tener una distribución ubicua en otros tipos celulares (14, 22).

El promotor de insulina tiene la secuencia conservada TATAA conocida como caja TATA, que ubica el sitio de inicio de la transcripción por la RNA polimerasa II y la expresión específica en la célula  $\beta$  depende de la interacción de TFs (24).

### 2.3.1 Principales Factores de Transcripción que Regulan la Transcripción del Gen de Insulina

Los genes de insulina comparten ciertos elementos críticos del promotor, por lo que son regulados por TFs similares (14, 22). Los principales elementos en *cis* y factores en *trans* que regulan la expresión del gen de insulina son:

**Elemento E:** Tienen la secuencia consenso CANNTG, se unen factores de transcripción de la familia de hélice-asa-hélice con un dominio básico (bHLH) y son potentes activadores transcripcionales (14, 22, 24). Estos TFs forman un

complejo heteromérico entre los miembros de la familia, que contiene proteínas ubicuas, con funciones redundantes [codificadas por E2A (E12, E47 y E2/5) ó HEB] y específicas del islote (BETA2/NeuroD1), importantes en el desarrollo del islote pancreático (25 - 27).

**Elemento C2:** Contiene la secuencia CAGG que se une a los TFs de la familia Pax. Estos contienen un dominio *paired* y un homeodominio, que son las proteínas PAX6, que actúa como transactivador y PAX4, como represor transcripcional, y juegan un papel importante en el desarrollo pancreático (22, 27, 28).

**Elemento G1:** Secuencia rica en purinas, con la caja G/GAGA, se une el factor con un dominio de dedos de zinc, Pur-1/MAZ (14, 22).

**Elemento de respuesta a cAMP:** Se une el TF CREB, miembro de la familia de cierre de leucina con una región básica (bZIP) (22).

**Región del elemento Z:** Ha sido caracterizada sólo en el gen de insulina en humanos, se une el complejo Zal, aunque los factores reguladores no han sido aislados (27).

**Elemento C1/RIPE3b:** En este elemento se unen dos complejos llamados RIPE3b1 y 2, siendo el primero específico de células  $\beta$  e inducido en respuesta a glucosa, y corresponde al TF MafA con dominio de cierre de leucina y uno básico; activa fuertemente el promotor de insulina y es importante durante el desarrollo de las células  $\beta$  (22, 29, 30).

**Elemento A:** A1-A4, contienen la secuencia núcleo TAAT y los TFs que se unen a este elemento tienen la región de unión al DNA llamada homeodominio, que es una unidad estructural con el motivo de hélice-vuelta-hélice que se encuentra altamente conservada (14, 27).

El principal activador del elemento A es la proteína PDX-1 (pancreatic duodenal homeobox-1), descrito previamente como IPF-1, STF-1, IDX-1, GSF e IUF-1 (22, 27, 31 - 35). Su expresión en el páncreas de ratón adulto se restringe a las células  $\beta$  (~ 91 %) y a un pequeño subgrupo de células  $\delta$  (~ 15 %) y de células  $\alpha$  (~ 3 %) (36). En secciones de páncreas de rata adulta se ha observado que todas las células  $\beta$  expresan PDX-1 (37). Además, este TF es indispensable para la formación del páncreas en ratones y en humanos, y participa en la diferenciación de la célula  $\beta$  (38 - 40). En el humano, una mutación heterocigota de PDX-1 está asociada a la forma de diabetes tipo 2 conocida como MODY4 (41, 42).

PDX-1 es un regulador clave de la función de la célula  $\beta$ , ya que además de ser el principal transactivador del gen de insulina, regula también la expresión de proteínas reguladoras que le confieren sensibilidad a la glucosa a esta célula como son GLUT2 y probablemente la glucocinasa (22, 27, 43, 44 ). PDX-1 mantiene el fenotipo de células  $\beta$  adultas, así como la población de éstas (44, 45).

PDX-1 es una proteína de 283 aa y tiene una estructura modular, con el homeodominio en la parte central y la señal de localización nuclear (NLS), flanqueada por dos regiones ricas en prolina, en el N-terminal se encuentra el dominio de transactivación (32, 35, 46, 47).

El gen de pdx-1 contiene dos exones y un intrón, el gen humano se encuentra en el cromosoma 13q12.1 (48) y en la rata en el cromosoma 12 (47). Los elementos esenciales para la expresión específica en la célula  $\beta$  de PDX-1, en la rata se encuentran dentro de las -6.5 kb del promotor (49) y -4.5 kb en el ratón (47).

En ratones y en humanos, existen tres secuencias cortas altamente homólogas, en la región promotora del gen de pdx-1, y se ha demostrado que la

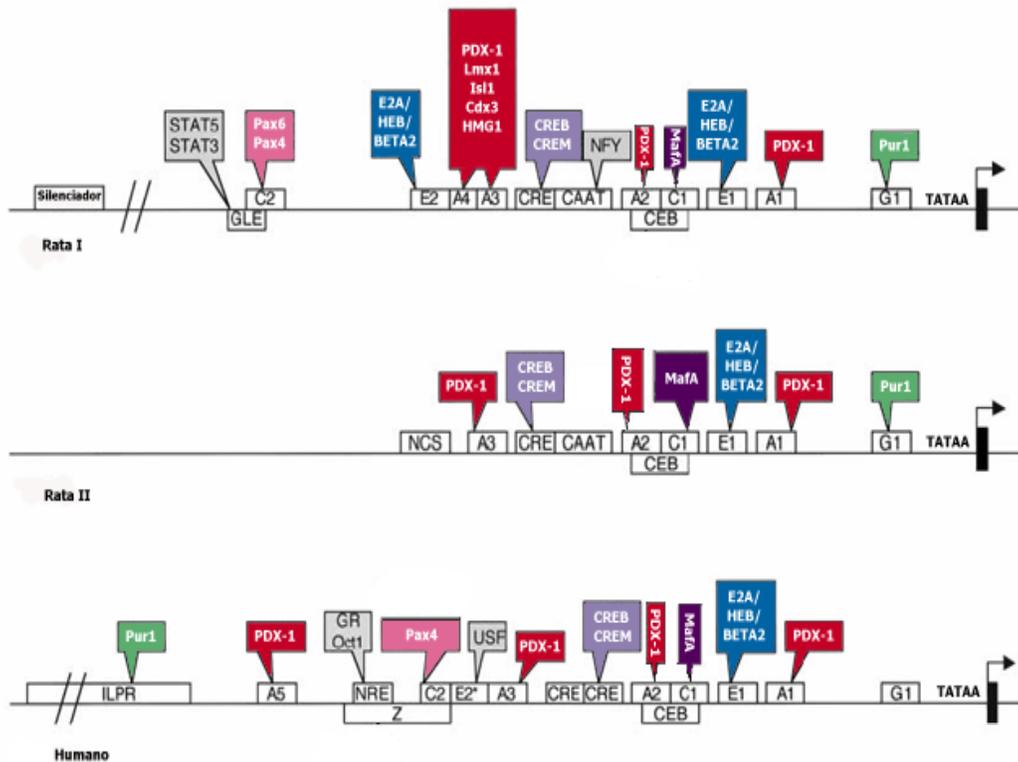
regulación de la expresión está conferida por el factor de transcripción HNF-3 $\beta$  (llamado también FoxA2), HNF1 $\alpha$  y de forma autorregulatoria por la propia proteína PDX-1 (**50 - 52**). Recientemente se encontró que entre estas dos especies y en la rata existe un área (denominada IV) homóloga en la región promotora que es regulada por HNF-3 $\beta$ , Nkx2.2 y PDX-1 (**53**). Otros factores de transcripción que regulan la transcripción del gen son: BETA2 y USF (**49, 54**). Su mecanismo de acción y regulación por glucosa, será expuesto en la siguiente sección.

Otros TFs homeodominios que se unen al elemento A son: Lmx-1, Cdx-3, Isl-1, HMGI(Y) y HNF-1 $\alpha$ , que también participan en el desarrollo pancreático (**22, 27, 43**).

Existen otros TFs cuyos sitios de unión al promotor de insulina no han sido completamente identificados, tampoco es claro si la modulación de la transcripción se da de forma indirecta, pero participan en la diferenciación de las células  $\beta$  y en la expresión de insulina, como son: Nkx2.2, Nkx6.1 y neurogenina3 (**27, 55 - 58**).

Dentro de los TFs que regulan negativamente la expresión del gen de insulina se encuentra: el elemento NRE, los factores de transcripción E47, BETA 3 y c-Jun (**22**).

Es importante destacar la actividad sinérgica que existe sobre el promotor de insulina entre algunos de los TFs arriba discutidos (PDX-1, E2A, BETA2/NeuroD1 y MafA) que lleva a la transcripción específica en la célula  $\beta$  (**46, 59 - 61**), y que el estado de la cromatina en la región promotora del gen de insulina también influye en el nivel de transcripción (**62**). Finalmente en la **Figura 2.5** se muestra la organización de la región promotora de los genes de insulina de rata I y II y de humano.



**Figura 2.5: Factores de transcripción que regulan la expresión del gen de insulina.** Están marcados los factores de transcripción y sus sitios de unión al promotor descritos en el texto. Modificado de la referencia 22.

### 2.3.2 Regulación de la Transcripción del Gen de Insulina por Glucosa

La glucosa es el principal regulador fisiológico de las funciones de la célula  $\beta$ . La regulación de la expresión del gen de insulina por glucosa ha sido ampliamente estudiada, actualmente existen discrepancias en cuanto al curso temporal de la estimulación de la transcripción en respuesta a concentraciones estimuladoras de glucosa ( $> 11$  mM), así como debido a diferencias en los modelos celulares estudiados; a continuación describiré como se da esta regulación por glucosa.

Los primeros estudios en islotes de rata aislados, demostraron que la glucosa alta (17 mM) estimula la transcripción del RNAm de preinsulina I

(mRNAs) a 24 h de incubación (63), el mismo grupo demostró que la glucosa alta estabiliza y aumenta la vida media del mRNAs siendo de ~ 76 h (64).

En la línea celular de hámster HIT-T15, se demostró que la glucosa regula positivamente la transcripción del mRNAs después de 4 h de incubación, de forma dependiente de la dosis (65), lo que ocurre también en islotes humanos aislados, después de 12 h de estimulación (66). Posteriormente, por medio de transfecciones con el gen reportero de CAT bajo la región promotora del gen de insulina I de rata en islotes fetales, después de 48 h de cultivo se describió una modulación positiva en respuesta a glucosa de la actividad de CAT (67).

En la línea celular de ratón  $\beta$ TC3, la glucosa alta incrementó transitoriamente la transcripción del gen de insulina a los 30 minutos de estimulación y después de 60 y 120 minutos de incubación con el estímulo, el nivel decayó (68). En islotes aislados y en células HIT-T15, se demostró que la exposición a glucosa alta por sólo 15 minutos, dio como resultado una elevación transitoria de la transcripción del gen de insulina, los autores proponen un cambio altamente dinámico de la biosíntesis de insulina y que la vida media del RNAm de insulina es corta (69).

El mismo grupo demostró que la insulina secretada en respuesta a la glucosa, es la señal que produce el aumento de la transcripción y que esta hormona en ausencia de glucosa, puede también aumentar la transcripción y que la señalización intracelular vía insulina implica la activación de IRS-1 y -2, PI3-K, p70 s6k y CaMK (70). Así mismo, el incremento en la biosíntesis de insulina a nivel traduccional es en parte, debido al incremento de la transcripción de insulina en respuesta a glucosa (71). Estos autores describen que es específicamente la señalización de la isoforma A del receptor de insulina (IRA) en células  $\beta$ , lo que activa la transcripción del gen de insulina (72); y han propuesto un importante

mecanismo de regulación autocrina y a corto plazo sobre la regulación de la transcripción de insulina (73).

En marcado contraste con los grupos anteriores, otros estudios en células de ratón MIN6 cotransfectadas con PDX-1 y genes reporteros bajo el promotor de insulina de humano, demostraron que es únicamente la glucosa quien potencia la actividad del promotor de insulina y no así la insulina secretada ni la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (74).

Al ser incubados islotes de rata durante 1 h en glucosa alta (17 mM), el mRNA<sub>Ins</sub> no fue modificado, lo que de acuerdo a los autores no resultó sorprendente, ya que el RNA<sub>m</sub> de insulina es muy abundante en las células  $\beta$  (~ 30 % de los RNA<sub>m</sub>), el nivel incrementó sólo después de 48 h de cultivo en condiciones de glucosa baja y estimulados las últimas 24 h (75).

En islotes recién aislados de rata, el mRNA<sub>Ins</sub> I aumentó en respuesta a glucosa alta después de 6 h y 24 h de incubación (76). Posteriormente el mismo grupo demostró que a pesar de que los islotes se recuperaran del proceso de aislamiento, la exposición a tiempos cortos con glucosa alta ( 1 y 3 h) no modificó la proporción del mRNA<sub>Ins</sub> entre alta y baja glucosa, lo que sí ocurrió después de 6 h de incubación y hasta 24 h; por otro lado, la insulina exógena en bajas concentraciones de glucosa, no modificó la transcripción de insulina a 6 y 24 h y concluyeron que el incremento temprano de la biosíntesis de insulina en respuesta glucosa es regulado a nivel traduccional (77).

Finalmente, otros procesos transcripcionales regulados positivamente por la glucosa incluyen: el *splicing* del preRNA de insulina (78), la estabilización del RNA<sub>m</sub> de insulina inducido por glucosa (75) y modificaciones en la cromatina de la región promotora del gen de insulina que se correlaciona con el aumento del nivel transcripcional de este gen en respuesta a glucosa alta (30 mM) (79).

### 2.3.2.1 Mecanismos de Regulación de la Transcripción del Gen de Insulina por Glucosa que Dependen de la Actividad de PDX-1

Se ha mostrado que la unión de PDX-1 a la región promotora del gen de insulina es estimulada por el metabolismo de la glucosa. Se ha observado *in vitro* que empieza a los 15 minutos de exposición a la alta glucosa (20 mM), y que la fosforilación del factor de transcripción es importante para la transactivación del mismo. La cual es acompañada por un cambio en el peso molecular de la proteína de 31 a 46 kDa (**80 - 82**); entre las vías de señalización implicadas en esta modulación están las de SAPK2 (p38 MAPK) y la PI3-K (**81**).

En células MIN6 que sobreexpresan PDX-1 funcional, se evidenció por medio de microscopía confocal, que cuando las células son expuestas a concentraciones altas de glucosa por más de 24 h, la proteína cambia su localización subcelular entre la periferia nuclear y el nucleoplasma. En baja glucosa, PDX-1 se encontraba en la periferia nuclear en la mayoría de las células y en alta glucosa la localización cambiaba al nucleoplasma. Por lo anterior, se propuso que esta translocación podría ser un mecanismo importante para la activación del promotor de insulina (**83**).

Posteriormente, el mismo grupo evidenció que PDX-1 endógeno es translocado en respuesta a glucosa de citosol a núcleo, y que no se asocia a la periferia nuclear, y que esta translocación depende de la actividad de la PI3-K pero no de la de SAPK2 (**84**).

Por estudios de Western blot de extractos celulares totales de islotes humanos, se corroboró que la glucosa alta produce un cambio en el peso molecular de PDX-1. Así mismo, en fraccionamientos subcelulares de citoplasma y núcleo, en glucosa baja la forma de 31 kDa se encontró en el citoplasma y en glucosa alta la forma de 46 kDa se encontró en el núcleo (**85**).

Se ha explorado también el papel autorregulador de la insulina sobre la actividad de PDX-1. Se demostró que la hormona estimula la unión de PDX-1 al DNA, lo que depende de la activación de PI3-K y SAPK2 (86). La mutación de la caja A3/4, del promotor de insulina de rata I, abolió la estimulación por glucosa e insulina a corto plazo de la transcripción de insulina (70).

La introducción de PDX-1 en una línea celular humana NES2Y (NesPDX-1), que carece de PDX-1 endógeno restaura la inducción por glucosa de la transcripción del gen de insulina (87).

En un estudio cualitativo en células NesPDX-1, por inmucitoquímica se encontró que en baja glucosa PDX-1 se encontraba en la periferia nuclear y con poca tinción en el citoplasma, en tanto que en alta glucosa, PDX-1 se encontraba en el nucleoplasma. Esta translocación se completó a los 15 minutos de incubación y se activó desde 10 mM de glucosa. La insulina, en ausencia de glucosa, también estimuló el movimiento de PDX-1. Esta translocación es reversible y es inhibida cuando se bloquea la desfosforilación, nuevamente se corroboró la participación de PI3-K y SAPK2 (88).

## **2.4 Secreción de Insulina: Acoplamiento entre el Estímulo con Glucosa y la Secreción de Insulina**

La secreción de insulina es regulada principalmente por la concentración de glucosa sanguínea, y además es modulada por las acciones de diversas hormonas, neurotransmisores y otros nutrientes (89 - 91).

### **2.4.1 Transporte y Metabolismo de la Glucosa**

La glucosa entra a la célula  $\beta$  por difusión facilitada, por medio del transportador de glucosa tipo GLUT2, el cual tiene una Km alta para la glucosa (42 mM) (92).

En el interior de la célula la glucosa es catabolizada. Su principal ruta es la glucólisis. El primer paso es la fosforilación a glucosa-6-fosfato por la enzima glucocinasa (hexocinasa tipo 4), que se ha propuesto como el sensor de la concentración de glucosa en la célula  $\beta$  (89, 93, 94). La ruta glucolítica continúa hasta la formación de piruvato que es convertido en acetil-coenzima A en la mitocondria, en donde es oxidado en el ciclo de Krebs ó ciclo de los ácidos tricarboxílicos. La última fase es la transferencia de electrones a la cadena respiratoria, la cual está acoplada a la síntesis de ATP, proceso conocido como fosforilación oxidativa. El ATP es exportado al citosol y el incremento en la relación de ATP/ADP en la célula  $\beta$  inicia la actividad eléctrica (89, 95, 96), que se describe a continuación.

#### **2.4.2 Canales Iónicos que Participan en la Actividad Eléctrica de la Célula $\beta$ Implicados en la Secreción de Insulina**

La célula  $\beta$  es eléctricamente excitable y en condiciones normoglucémicas, alrededor de 5 mM, se encuentra en reposo con un potencial cercano a los -70 mV. Cuando la concentración de glucosa extracelular aumenta por arriba de 7.5 mM, el ATP generado por el catabolismo de la glucosa se une a los canales de potasio sensibles a ATP ( $K_{ATP}$ ) en la membrana plasmática. Esto conduce a su cierre, reduciendo la permeabilidad al  $K^+$  (89, 97). Después del cierre del  $K_{ATP}$  se observa una despolarización lenta de la membrana, que se debe probablemente al flujo de corriente a través de los canales catiónicos no selectivos (98, 99).

Esta despolarización lenta alcanza un potencial al cual incrementa la probabilidad de apertura de canales sensibles a voltaje de  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  tipo T (99 - 101). El influjo de  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  a través de estos canales produce una despolarización rápida, hasta alcanzar el voltaje al cual incrementa la probabilidad de apertura de canales de  $Ca^{2+}$  tipo L (99, 102). En esta fase, denominada de meseta, se superponen trenes de potenciales de acción dependientes de la entrada de  $Ca^{2+}$  que son separados por periodos eléctricamente silentes

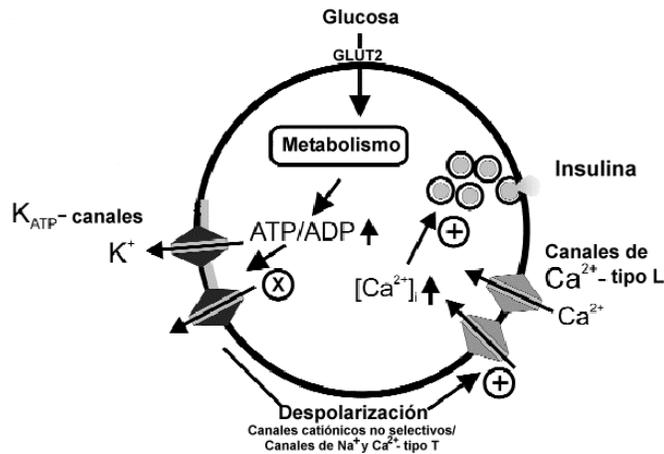
(repolarización), estos periodos de la actividad eléctrica coinciden con la liberación pulsátil de insulina (**103, 104**).

El incremento en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  por los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L es esencial en la exocitosis de los gránulos que contienen insulina (**89, 99, 102**); existen muchas proteínas implicadas en el proceso de exocitosis, que incluyen las proteínas SNARE sinaptobrevina/ VAMP, SNAP-25, syntaxina,  $\alpha$ -SNAP y las proteínas sensoras de  $\text{Ca}^{2+}$  sinaptotagmina I y II (**103**).

La secreción de insulina tiene un patrón bifásico, pocos minutos después de la elevación de la concentración de glucosa, se observa una estimulación transitoria de la secreción, llamada primera fase que dura ~ 10 minutos y alcanza un pico máximo de secreción que declina rápidamente, la segunda fase consiste de una secreción sostenida en un nivel menor que la anterior (**103**).

Se ha demostrado que la secreción de insulina que depende de glucosa es heterogénea. En las células  $\beta$  aisladas de rata existen subpoblaciones que difieren en la magnitud de secreción de insulina así como en el umbral de respuesta a la glucosa (**105**).

En la **Figura 2.6** se muestra un esquema del acoplamiento entre el estímulo con glucosa y la secreción de insulina.



**Figura 2.6. Secreción de Insulina.** Se muestran algunos de los canales iónicos que participan en el acoplamiento entre el estímulo con glucosa y la secreción de insulina en las células  $\beta$  pancreáticas. **Modificado de la referencia 103.**

## 2.5 El Factor de Crecimiento Neuronal

El factor de crecimiento neuronal (NGF) es un factor neurotrófico que pertenece a la familia de las neurotrofinas. Estas representan una familia de proteínas que están estructural y funcionalmente relacionadas, en mamíferos además del NGF existen otras neurotrofinas llamadas: factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), neurotrofina – 3 (NT-3) y neurotrofina – 4/5 (NT-4/5) (**106, 107**).

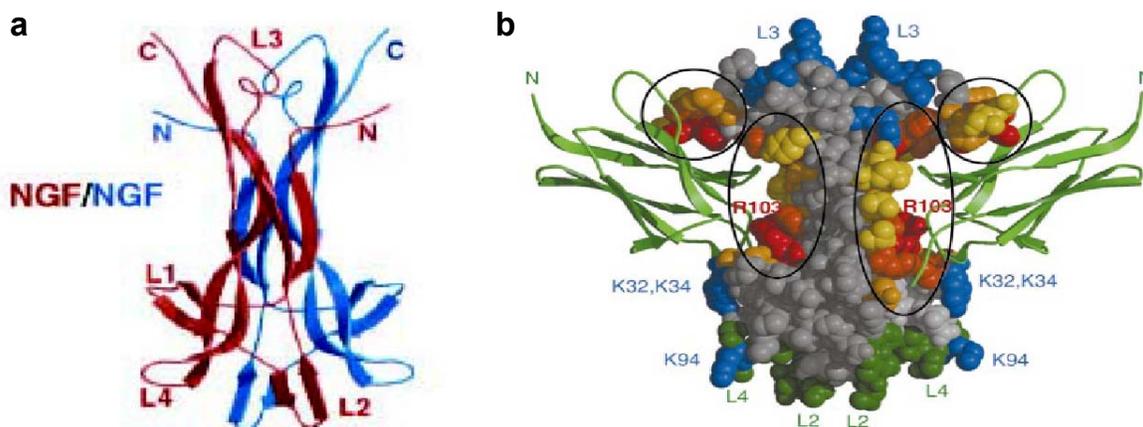
El NGF regula diferentes funciones en ciertas poblaciones neuronales, en el sistema nervioso central y periférico, como son: el desarrollo embrionario, el control de la sobrevivencia, diferenciación, regulación del crecimiento, manutención del fenotipo neuronal y apoptosis (**107, 108**).

El NGF es una proteína homodimérica de 118 aa por monómero, con un peso molecular de 26.5 kD, conocido como NGF- $\beta$  o NGF 2.5 S; la interfase de la formación del dímero es de naturaleza hidrofóbica, con una alta constante de asociación y es muy estable (**109**).

El NGF se encuentra en grandes cantidades en la glándula submaxilar del ratón macho, y forma un complejo de alto peso molecular conocido como NGF 7 S. Está formado por el dímero NGF- $\beta$  y por dos moléculas denominadas  $\alpha$  (proteasa de Ser inactiva) y  $\gamma$  (proteasa de Ser activa). En este complejo ( $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ ), el NGF carece de actividad biológica, ya que los sitios de unión a sus receptores están bloqueados por las cadenas  $\alpha$  y  $\gamma$  (**110**).

La señalización inducida por el NGF, es mediada por dos clases diferentes de receptores membranales, la primera pertenece a la familia de receptores con actividad de cinasa de tirosina (RTKs), llamado TrkA que se une al NGF con alta afinidad y alto grado de especificidad; el segundo tipo es el receptor a neurotrofinas p75 (p75<sup>NTR</sup>), el cual pertenece a la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR) y se une a todas las neurotrofinas con similar afinidad (**107, 111**).

Los residuos de aa 2 - 13 en la región N-terminal del NGF son muy importantes para la unión a TrkA (**111, 112**). El dominio principal por medio del cual TrkA se une al NGF es el dominio 5 (TrkA-d5). En el complejo NGF/TrkAd-5, la región central del dímero de NGF se une a dos moléculas del TrkA-d5. La interfase de ésta interacción se subdivide en dos segmentos 1) de especificidad y 2) conservado, que es homólogo entre las otras neurotrofinas y receptores Trks. Existe un tercer segmento de interacción que es la región que une TrkA-d5 a la porción transmembranal (**111, 112**). La afinidad del NGF a su receptor TrkA es muy alta, con una  $K_d$  de 0.1 a 1.0 nM (**113**). En la **Figura 2.7** se muestran la estructura del NGF y la interacción con su receptor TrkA.



**Figura 2.7: Estructura del NGF y de la interacción con TrkA.** (a) NGF dimérico en diagrama de cintas, cada monómero está representado en rojo y azul, (b) Interacción entre el NGF y TrkA; TrkA-d5 (verde en diagrama de cintas) y el NGF (en forma de llenado de espacio), los círculos representan el segmento de especificidad y los óvalos el conservado. **Modificado de las referencias 111 y 112.**

La unión del NGF a TrkA, induce su dimerización y activa su función catalítica. Existen 10 residuos de Tyr conservadas en el dominio citoplásmico del receptor, tres de las cuales están presentes en el asa autorreguladora del dominio de cinasa, que es una estructura necesaria para la regulación de la función catalítica (114). La fosforilación de los otros residuos promueve la señalización creando sitios de anclaje para proteínas adaptadoras, que acoplan estos receptores a cascadas de señalización intracelular, incluyendo la vía Ras/MAPK, PI3-K/PKB, PLC- $\gamma$  y PKC- $\delta$  principalmente, cuyas funciones enzimáticas son esenciales para las actividades biológicas inducidas por el NGF (114, 115).

Otras proteínas están implicadas también como efectores cascada abajo de la señalización NGF/TrkA como son: SNT (blanco del factor neurotrófico asociado a Suc1), Rap 1, rAPS, SH2-B y Cdc42/Rac/Rho (114, 115).

El receptor p75<sup>NTR</sup>, es una glicoproteína transmembranal que se une al dímero del NGF como monómero (116). Es probable que la señalización mediada

por p75<sup>NTR</sup> juegue un papel fisiológico después de estrés o daño (117) y tiene una importante función regulando la sobrevivencia celular para el correcto apareamiento de neuronas con sus células blanco (118). Se han descrito tres vías principales de señalización de este receptor: vía JNK (Cinasa de c-jun), NFκB (Factor Nuclear κB) y la vía esfingomielinasa - ceramida (119 - 121).

La función biológica del NGF no se limita a células neuronales, sino que también tiene efectos importantes en diferentes tejidos donde es expresado: es un regulador de la sobrevivencia de linfocitos B de memoria (122); en células cebadas, el NGF desencadena la liberación de gránulos que contienen histamina y serotonina (123); en adipocitos podría ser ligado a la respuesta inflamatoria (124), entre otros tipos celulares. En el sistema endocrino, particularmente en las células β, el NGF es un importante regulador, cuyas funciones serán descritas a continuación.

### **2.5.1 El Factor de Crecimiento Neuronal en las Células β Pancreáticas**

En los primeros estudios realizados en relación al papel del NGF en las células β, se demostró la expresión funcional de los receptores a NGF TrkA y p75<sup>NTR</sup> en islotes fetales de rata, así como en diversas líneas celulares β (125). Este grupo de investigación después evidenció una importante función de TrkA en un modelo *in vitro* de desarrollo del islote pancreático en ratas. Así mismo, que el NGF secretado por células no endocrinas adyacentes podría tener una acción paracrina sobre los islotes (126, 127).

Posteriormente se encontró que en la rata adulta, las células β sintetizan y secretan NGF biológicamente activo, que es secretado en respuesta a cambios en la concentración de glucosa y a agentes despolarizantes y también expresan TrkA (128). Las células β humanas también expresan NGF y TrkA (129, 130).

El NGF produce cambios en la morfología celular de las células  $\beta$  aisladas de ratas fetales y adultas, cultivadas por 2 semanas. En condiciones control las células  $\beta$  son en general redondas y cuando son cultivadas con NGF extienden procesos similares a neuritas (**131**).

El NGF también induce cambios en la fisiología de las células  $\beta$  adultas. Al analizar la secreción de insulina en respuesta a glucosa en células cultivadas con NGF de 5 a 7 días, se observó que el grupo control perdió la capacidad de discriminar entre distintas concentraciones de glucosa, propiedad que conservaron las células tratadas con NGF (**131**). Sin embargo, cuando se cultivan células  $\beta$  a una mayor densidad por el mismo tiempo, se observa que las células control si discriminan entre las concentraciones de glucosa. Además las células tratadas con NGF secretan casi el doble que sus controles en baja y alta glucosa (**101**). En parte, estos resultados sugieren que las células sembradas con una densidad mayor tienen efectos paracrinós y autocrinós que las preservan en mejores condiciones.

En exposiciones cortas de 1 hora a NGF de células  $\beta$  aisladas, este factor incrementó la secreción de insulina en respuesta a la glucosa (**132**). Lo que también se demostró en células INS-1, en las cuales el NGF potencia la secreción de insulina sólo en la presencia de glucosa (**133**).

El NGF modula la actividad eléctrica en células  $\beta$  de rata adulta cultivadas. Cuando las células fueron expuestas a este factor de 5 a 7 días, la densidad de la corriente de  $\text{Na}^+$  aumentó (**134**). Posteriormente se demostró que el NGF aumenta la expresión del canal de sodio  $\text{NaV1.3}$  y que este incremento podría explicar, en parte, el aumento en la secreción de insulina en las células cultivadas con NGF (**101**).

El cultivo por el mismo tiempo de células  $\beta$  con NGF, también aumentó la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L (**135**). Además, una exposición corta a NGF, de 5 minutos, aumentó la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$ ; lo que sugiere que el NGF tiene dos tipos de efectos sobre los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , a largo plazo posiblemente aumente la cantidad de canales disponibles en la membrana plasmática y a corto plazo modula la actividad de estos canales por modificaciones postraduccionales como la fosforilación del canal (**132**).

Otros efectos del NGF están relacionados a la regulación de la sobrevivencia celular, ya que el NGF mantiene la sobrevivencia de células  $\beta$  en cultivos primarios de manera autocrina (**136**), así como en la línea celular  $\beta$ -TC6-F7 (**130**). El tratamiento con NGF incrementa la sobrevivencia de islotes transplantados así como su re-inervación (**137**). Finalmente, por análisis morfométrico se mostró que el NGF aumenta el contenido de insulina en los gránulos de secreción en células  $\beta$  cultivadas por 10 días (**138**).

### **III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El NGF tiene diversos efectos sobre la fisiología de las células  $\beta$  pancreáticas, sin embargo no se conoce en su totalidad la vía de señalización del NGF en estas células. En este trabajo exploraremos si el NGF, a corto plazo, regula de manera autocrina la transcripción del gen de insulina, vía la activación de TrkA y si el blanco potencial es PDX-1. Lo cual podría estar implicado en el efecto positivo del NGF en la secreción de insulina.

## IV. HIPÓTESIS

El NGF regula la transcripción del gen de insulina y la actividad de PDX-1 lo que subyace al efecto positivo del NGF sobre la secreción de insulina en células  $\beta$  pancreáticas aisladas.

## V. OBJETIVOS

### 5.1 General

Determinar los efectos *in vitro* del factor de crecimiento neuronal en células  $\beta$  pancreáticas aisladas de rata adulta, sobre la regulación de la transcripción del gen de insulina y su mecanismo(s) de acción.

### 5.2 Particulares

1.- Analizar en células  $\beta$  pancreáticas aisladas estimuladas a tiempos cortos de incubación y con dos concentraciones de glucosa 5.6 y 15.6 mM, bajo diferentes condiciones experimentales: células control, tratadas con NGF 2.5 S y K252a y/o anticuerpo anti-NGF, por RT-PCR el efecto de los tratamientos en la expresión génica de insulina, PDX-1, y GAPDH.

2.- Analizar paralelamente la secreción de insulina por ELISA.

3.- Caracterizar si el NFG promueve la translocación de PDX-1 del citoplasma al núcleo por el método de inmunofluorescencia, en los tratamientos arriba referidos.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Los reactivos se obtuvieron de las siguientes fuentes:

Colagenasa tipo IV de Worthington Biochemical Corp. (Freehold, NJ, USA); Anestésico (Pentobarbital sódico) de Pfizer (Pfizer de México); suero bovino fetal (SBF) de Equitech-Bio (Ingram, TX, USA); K252a de Alomone Labs (Jerusalem, Israel); cajas de cultivo de Corning Inc. (Corning, NY, USA); agarosa (ultra pura grado DNA) de Bio-Rad (Hercules, CA, USA); NGF 2.5 S, Ficoll tipo 400-DL, D-(+)-glucosa, solución salina balanceada de Hanks (HBSS) con glucosa, HEPES, bicarbonato de sodio, solución de tripsina-EDTA, albúmina sérica bovina (BSA), poli-L-lisina, bromuro de etidio, solución de azul tripano (0.4 %), dietilpirocarbonato (DEPC), EDTA, trizma base y tritón X-100 de Sigma (St. Louis MO, USA); gentamicina, L-glutamina, solución de penicilina – estreptomycin - anfotericina B como Fungizona, medio RPMI-1640 con glucosa y reactivo TRI<sub>ZOL</sub> de Life Technologies (Grand Island, NY, USA); solución de Spinner, medio RPMI-1640 y HBSS sin glucosa de Microlab (México, D. F., México); paraformaldehído y ácido bórico de J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA); anticuerpos neutralizantes: Anti-NGF (de ratón levantado en conejo) de Sigma y Anti-Insulina (de porcino obtenido en cobayo) de Fitzgerald Industries internacional, Inc. (Concord, MA, USA).

### 6.1 Cultivo de Células $\beta$ Pancreáticas

Se realizaron cultivos primarios de células  $\beta$  pancreáticas con la técnica descrita previamente (**101**, **105**). Todas las soluciones y medios de cultivo utilizados para la incubación de las células tuvieron un pH de 7.35 a 7.4 y una osmolaridad de ~ 290 mOsm/kg.

Los páncreas fueron obtenidos de ratas Wistar macho de 250 a 280 g de peso, que fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (90 mg/kg). Los páncreas fueron insuflados con HBSS con 10  $\mu$ g/ml de gentamicina y 0.1 % de BSA, se disecaron y limpiaron de tejido graso y linfático y se cortaron en pedazos pequeños. Posteriormente fueron digeridos en colagenasa tipo IV (4 mg/páncreas), para separar los islotes del tejido acinar. Los islotes fueron aislados por medio de un gradiente de Ficoll y lavados con HBSS.

Para la obtención de las células  $\beta$  pancreáticas aisladas, los islotes fueron disgregados en solución dispersante de Spinner, sin Ca<sup>2+</sup>, con 0.5 % de BSA, 0.5 % de tripsina, 150 U/ml de penicilina, 150  $\mu$ g/ml de estreptomycin, 0.375  $\mu$ g/ml de

fungizona y 15 mM de glucosa, durante 10 minutos, a 37 °C en agitación constante. Posteriormente, las células se dispersaron con ayuda de una pipeta Pasteur siliconizada.

Las células aisladas, con una viabilidad de al menos 96 %, se sembraron y cultivaron en cajas de cultivo previamente cubiertas con poli-L-lisina (0.5 mg/ml), en medio de cultivo RPMI-1640 que contiene 11.1 mM de glucosa, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 0.25 µg/ml de fungizona, 2 mM de glutamina y 1 % de SBF, a 37 °C con una mezcla de 5 % de CO<sub>2</sub> en aire. Antes de iniciar los experimentos, las células aisladas se dejaron recuperar por ~ 18 horas después del aislamiento.

## **6.2 RT-PCR**

Se cultivaron de 400 - 500 x 10<sup>3</sup> células β por condición en cajas de cultivo de 35 mm x 10 mm. Después de la recuperación post-aislamiento, las células fueron lavadas 2 veces e incubadas en 2 ml de medios respectivos en 5.6 ó 15.6 mM de glucosa, en las siguientes condiciones: 1) En HBSS suplementada con 0.1 % de BSA y PEF, por 3 horas y 2) en medio RPMI-1640 suplementado con 1 % de SBF, 2 mM de glutamina y PEF, por 6 horas, ambos a 37 °C con una mezcla de 5 % de CO<sub>2</sub> en aire. Las condiciones experimentales fueron: células control, tratadas con NGF 2.5 S (50 ng/ml) y K252a (20 nM).

El RNA total se extrajo después de las respectivas incubaciones, se utilizó 1 ml del reactivo TRI<sub>ZOL</sub> por cada 0.5 x 10<sup>6</sup> células para lisar las células directamente en las cajas de cultivo, la extracción se llevó a cabo de acuerdo a las especificaciones del boletín técnico con ligeras modificaciones. La concentración y calidad del RNA total extraído fue evaluada por medio de espectrofotometría a una longitud de onda de 260 y 280 nm.

Los niveles de RNAm de insulina (I y II) (**60**), PDX-1 (**57**) y GAPDH (**128**), como control interno de expresión, se midieron con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcripción reversa (RT-PCR) de acuerdo al protocolo recomendado por el proveedor RNA PCR Core Kit de Applied Biosystems por Roche Molecular Systems Inc. (Branchburg, NJ, USA). La síntesis del cDNA se llevo a cabo con Oligo-dT como primer, usando 100 ng de RNA total por condición experimental.

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

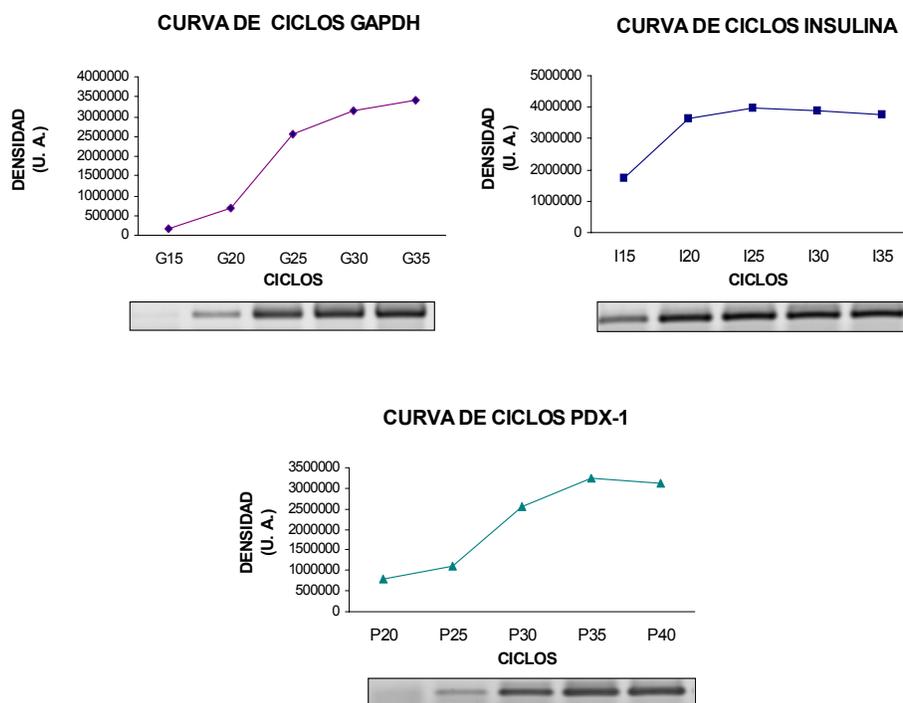
Para insulina se usó la secuencia 5'-AAGAGCCATCAGCAAGC-3' para el oligonucleótido sentido y la secuencia 5'-GAGCAGATGCTGGTGCAGC-3' para el oligonucleótido antisentido; para PDX-1 se usó la secuencia 5'-CTCGCTGGGAACGCTGGAACA-3' para el oligonucleótido sentido y la secuencia 5'-GCTTTGGTGGATTCATCCACGG-3' para el oligonucleótido antisentido; para GAPDH se usó la secuencia 5'-GCCCCATGTTTGTGAT-3' para el oligonucleótido sentido y la secuencia 5'-GCCCCAGCATCAAAGGT-3' para el oligonucleótido antisentido.

Se hicieron curvas de ciclos y de temperaturas para determinar los parámetros de RT-PCR óptimos y evitar llegar a la saturación de la amplificación (**Figura 6.1**):

	Temperatura de alineamiento	Ciclos	Tamaño del fragmento
<b>GADPH</b>	56 °C	20	514 pb
<b>Insulina</b>	56 °C	15	329 - 334 pb
<b>PDX-1</b>	56 °C	28	224 pb

Los productos de la RT-PCR (8 µl) se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5 % en una solución de TBE 0.5 X (TBE 0.5 X: 45 mM de tris base, 45 mM de ácido bórico, 1 mM de EDTA). Posteriormente, los geles fueron

teñidos con una solución de bromuro de etidio (0.5  $\mu\text{g/ml}$ ) de 3 a 4 minutos; seguido por el análisis semi-cuantitativo de la expresión génica por densitometría (densidad de la banda corregida por el blanco), con el equipo Typhoon 8600, y con el programa ImageQuant 5.1 de Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, Alemania).



**Figura 6.1.** Se muestra el análisis por densitometría de los productos de RT-PCR de GAPDH, insulina y PDX-1 en diferentes ciclos de amplificación a 56 °C, en células  $\beta$  recién aisladas, en unidades arbitrarias (U. A.).

### 6.3 ELISA para Insulina

La secreción de insulina fue medida paralelamente a la RT-PCR para los diferentes genes, de las condiciones experimentales anteriormente mencionadas.

El sobrenadante de las diferentes incubaciones de las células fue centrifugado por 5 minutos a 1000 g, y una alícuota libre de células se almacenó a - 70 °C para la subsecuente medición de la secreción de insulina por *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA).

Se utilizó un kit para ELISA de insulina de rata, Ultra-Sensitive Rat Insulin ELISA de ALPCO Diagnostics (Wingham, NH, USA). La insulina en el sobrenadante se midió de acuerdo al protocolo proporcionado por el proveedor, diluyendo las muestras, de acuerdo a los diferentes tiempos de incubación. La insulina secretada en ng/ml de medio, se normalizó al contenido de RNA total en mg/ml.

### **6.3.1 ELISA para Insulina en Incubaciones con Anticuerpos Neutralizantes**

Para evaluar si la modulación por NGF de la secreción de insulina es dependiente de la densidad celular y/o la presencia de insulina en el medio, se llevaron a cabo experimentos usando anticuerpos neutralizantes del NGF y de la insulina secretados por las células  $\beta$ .

Las células fueron sembradas y cultivadas en cajas de cultivo de 12 pozos previamente cubiertas con poli-L-lisina ( $100 \times 10^3$  células  $\beta$  aisladas). Después de la recuperación del aislamiento se preincubaron con 1 ml de HBSS suplementada con 0.1 % de BSA y PEF con 5.6 mM de glucosa por 60 minutos, posteriormente se lavaron 1 vez con el medio respectivo y se incubaron en 1 ml de HBSS suplementada, con 5.6 ó 15.6 mM de glucosa, por 3 horas en condiciones control o tratamientos (todos en 15.6 mM de glucosa) con anticuerpo anti NGF (1:500), anticuerpo anti insulina (1:1000) ó la combinación de ambos anticuerpos.

La insulina secretada se midió por ELISA como fue descrito previamente y se normalizó al contenido de proteína total, medido con el kit de *Protein Assay* de Bio-Rad. Los anticuerpos neutralizantes solos ó en combinación no interfirieron en el ensayo de ELISA (no mostrado).

## 6.4 Inmunofluorescencia

Las células fueron sembradas y cultivadas en cubreobjetos de vidrio cubiertos con poli-L-lisina ( $\sim 50 \times 10^3$  células  $\beta$  aisladas) en cajas de 24 pozos. Después de la recuperación después del aislamiento se preincubaron con HBSS suplementada con 0.1 % de BSA y PEF con 5.6 mM de glucosa por 90 minutos, posteriormente se lavaron 1 vez con el medio respectivo y se incubaron en 1 ml de HBSS suplementada, con 5.6 ó 15.6 mM de glucosa, por 15 minutos, 1 hora ó 6 horas en condiciones control ó tratamiento con NGF 2.5 S (50 ng/ml).

Las inmunofluorescencias y la cuantificación de la inmunorreactividad se realizaron con las técnicas descritas previamente (139). Las células fueron lavadas dos veces con PBS 0.01 M y se fijaron con paraformaldehído al 4 % en PBS por 30 minutos a temperatura ambiente (TA), se lavaron nuevamente con PBS y se incubaron con una solución de bloqueo con 2 % de BSA y 0.1 % de Triton X-100 por 30 minutos a TA. Las células  $\beta$  aisladas adheridas a los cubreobjetos fueron incubadas en cámara húmeda toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario anti-PDX-1 en la solución anterior (dilución 1:50, anticuerpo policlonal obtenido en cabra, de Santa Cruz Biotechnology, Inc.; Santa Cruz, CA, USA). Al día siguiente los cubreobjetos fueron lavados e incubados por 2 horas a TA con el anticuerpo secundario anti-cabra conjugado a *cyanine 2* (Cy2) en la solución anterior (dilución 1:100 de Jakson Immuno Research Laboratories, Inc.; West Baltimore Pike, USA). Finalmente las muestras se lavaron con PBS, y fueron montadas con medio conteniendo 15 mM de  $\text{NaN}_3$  (de DAKO; Carpinteria, CA, USA).

Los controles negativos fueron hechos incubando las muestras con el anticuerpo primario preincubado con el péptido de bloqueo (40  $\mu\text{g/ml}$ ) o sólo el anticuerpo secundario. Como se esperaba, estas muestras no mostraron fluorescencia.

En experimentos apareados, se llevó a cabo una inmunotinción para insulina con un anticuerpo primario anti insulina en PBS por 2 horas a TA (dilución 1:10000, anticuerpo policlonal obtenido en cobayo, ICN Biomedicals, Inc.; Aurora, Ohio, USA) y revelado con anticuerpo secundario anti-cobayo acoplado a *fluorescein isothiocyanate* (FITC) en la misma solución (de Jakson Immuno Research Laboratories, Inc), para establecer el porcentaje de células  $\beta$  pancreáticas en el cultivo.

#### **6.4.1 Cuantificación de la Inmunoreactividad**

La inmunorreactividad de PDX-1 e insulina, se analizó con microscopía de epifluorescencia, usando un microscopio invertido Nikon Diaphot, equipado con una lámpara de mercurio 100 W y filtro apropiado para FITC (excitación 492 nm, emisión 520 nm, Nikon; Japón). Las muestras fueron examinadas con alta magnificación usando un objetivo de inmersión de aceite (63 X, NA 1.3, Leitz Wetzlar, Alemania).

Las imágenes digitales fueron adquiridas con una cámara digital CCD enfriada (SenSys 0401E, Roper Scientific; Tucson AZ, USA). La iluminación se limitó con un obturador electrónico Uniblitz (Vincent Associates; Rochester NY, USA). Se encontró que las exposiciones de 60 a 200 ms fueron las apropiadas para el rango de las intensidades de fluorescencia en las muestras. Las imágenes fueron adquiridas con el programa Image-Pro Plus 2.0 (Media Cybernetics; Silver Spring MD, USA) y almacenadas en el formato de imagen TIFF (8 ó 12 bits de resolución).

El análisis de las imágenes fue hecho con el programa Image J (Wayne Rasband; National Institutes of Health, USA). Las áreas de interés fueron obtenidas por el contorno de la región citoplásmica (no-nuclear) y nuclear de cada célula aislada ó de células en pequeños acúmulos, por campo. La intensidad de la fluorescencia promedio se midió de cada área de interés, así como un área libre

de células del cubreobjeto de cada imagen. Las intensidades de fluorescencia corregidas por el fondo (fluorescencia específica) se colectaron de células  $\beta$  pancreáticas aisladas comprendidas en 120 campos en promedio, provenientes de dos cultivos independientes con 4 animales por cultivo. Los resultados fueron graficados en Origin 6.0 (Microcal; Northampton, MA, USA).

## 6.5 Análisis Estadístico

El análisis estadístico fue hecho con StatView 4.57 (Abacus Concepts; Berkeley CA, USA). Una prueba estadística no-paramétrica (Kolmogorov-Smirnov) fue usada para comparar los datos entre grupos, ya que la distribución de la intensidad de la fluorescencia en cultivos de células  $\beta$  pancreáticas sigue una distribución de Poisson. Las diferencias significativas obtenidas con la prueba Kolmogorov-Smirnov se reportan en el intervalo de confianza de 99 %. Una prueba estadística paramétrica (ANOVA factorial) se usó también para comparar los datos entre grupos, las diferencias significativas obtenidas con esta prueba se reportan con el mismo intervalo de confianza. Los resultados se reportan de acuerdo a los análisis por la prueba no paramétrica. Las conclusiones principales de estos experimentos, no se alteraron al realizar una prueba estadística u otra.

El análisis estadístico de los datos (secciones **6.2** y **6.3**) fue evaluado por ANOVA factorial, seguido por Fisher's PLSD y fue hecho con el programa arriba mencionado. Las comparaciones fueron hechas entre tratamientos contra controles en la misma concentración de glucosa y entre controles en diferentes concentraciones de glucosa.

Un símbolo denota una  $p < 0.05$  y doble símbolo denota una  $p < 0.01$ .

## VII. RESULTADOS

### 7.1 Secreción de Insulina a Tres Horas de Incubación

Se ha observado actividad del NGF exógeno sobre las células  $\beta$  aisladas desde los 5 minutos de exposición, ya que modula la actividad de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L. Así mismo, la secreción de insulina en respuesta a distintas concentraciones de glucosa aumenta con la exposición a NGF exógeno durante una hora. Por otro lado, la secreción de insulina en 15.6 mM glucosa aumenta de forma autocrina por la acción del NGF endógeno (**132**).

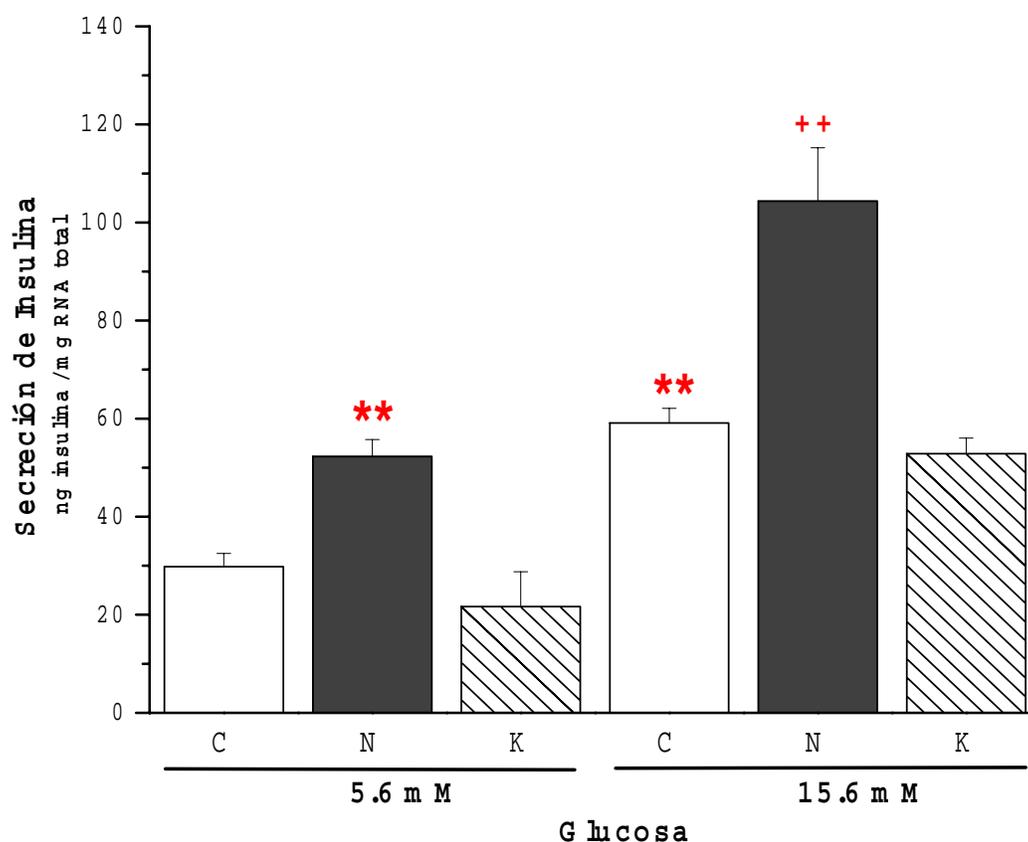
Se conoce también que, la modulación del nivel de RNAm de insulina, en ciertos estudios, ocurre después de exposiciones cortas a glucosa (**69, 70**).

Para investigar la función del NGF de forma autocrina y del NGF exógeno sobre la modulación de la biosíntesis de insulina a nivel transcripcional a tiempos breves de incubación, las células fueron incubadas en condiciones basales de glucosa 5.6 mM y estimuladas con 15.6 mM, en ausencia ó presencia de NGF (50 ng/ml) por 3 y 6 horas. Para investigar el papel del NGF secretado por las células  $\beta$  se utilizó un inhibidor de TrkA, el K252a (20 nM) que bloquea la fosforilación del receptor de alta afinidad para NGF (**132, 140, 141**). Previamente se ha demostrado que el tratamiento con K252a ó un anticuerpo neutralizante anti NGF en células  $\beta$  aisladas bloquea la señalización autocrina del NGF, en concentraciones estimulantes de glucosa, de células  $\beta$  aisladas y cultivadas (**136**).

Se midieron paralelamente la secreción de insulina en respuesta a los diferentes tratamientos y el nivel del RNAm (*steady-state*) de insulina y de PDX-1 en ~ 500,000 células  $\beta$  aisladas. La **Figura 7.1**, muestra la secreción de insulina en respuesta a los diferentes tratamientos experimentales después de 3 horas de incubación. Como se esperaba las células  $\beta$  aisladas discriminan entre las

diferentes concentraciones de glucosa, la secreción en 15.6 mM de glucosa aumentó casi 2 veces con respecto a 5.6 mM de glucosa.

El tratamiento con NGF potenció la secreción de insulina en cerca de 75 % en ambas concentraciones de glucosa. Sin embargo, la exposición a K252a (20 nM) no modificó significativamente la secreción de insulina en ninguna concentración de glucosa, tampoco el incubar las células con un anticuerpo neutralizante del NGF secretado (no mostrado).



**Figura 7.1. Efecto del NGF y K252a sobre la secreción de insulina.** La secreción de insulina de  $\sim 500 \times 10^3$  células  $\beta$  aisladas se midió por ELISA después de 3 horas de incubación en 5.6 ó 15.6 mM de glucosa. C, células control; N, células expuestas a NGF; K, células expuestas a K252a (20 nM). Las barras representan el promedio  $\pm$  SEM de la insulina secretada normalizada al contenido de RNA total, provenientes de 3 (K) ó 4 experimentos independientes. Los símbolos denotan una diferencia significativa con respecto al control en 5.6 mM glucosa (\*\*) y con respecto al control en 15.6 mM glucosa (++);  $p < 0.01$ .

### 7.1.1 Expresión de Insulina

La **Figura 7.2**, muestra los niveles de RNAm de insulina (I y II) en respuesta a los diferentes tratamientos experimentales después de 3 horas de incubación. Bajo estas condiciones experimentales, la glucosa no modificó significativamente la cantidad del RNAm de insulina en las células  $\beta$  aisladas.

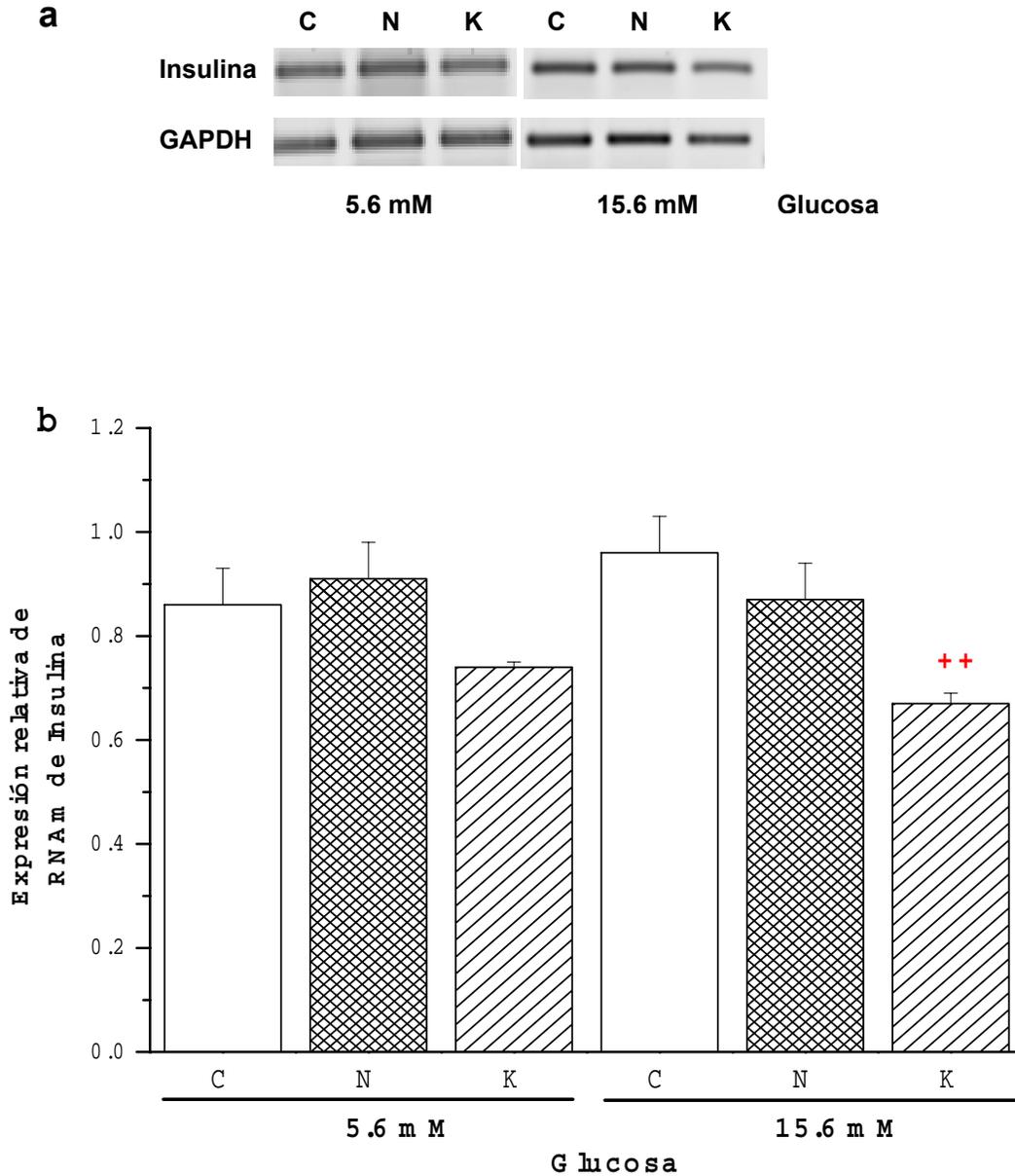
A pesar de que el tratamiento con NGF potenció la secreción de insulina, no modificó significativamente la cantidad del RNAm de insulina en las células  $\beta$  aisladas en ninguna de las concentraciones de glucosa.

En tanto, la exposición a K252a (20 nM) disminuyó la cantidad del RNAm de insulina en ambas concentraciones de glucosa. En 15.6 mM de glucosa la disminución fue del 30 %, lo cual fue estadísticamente significativo con respecto al control.

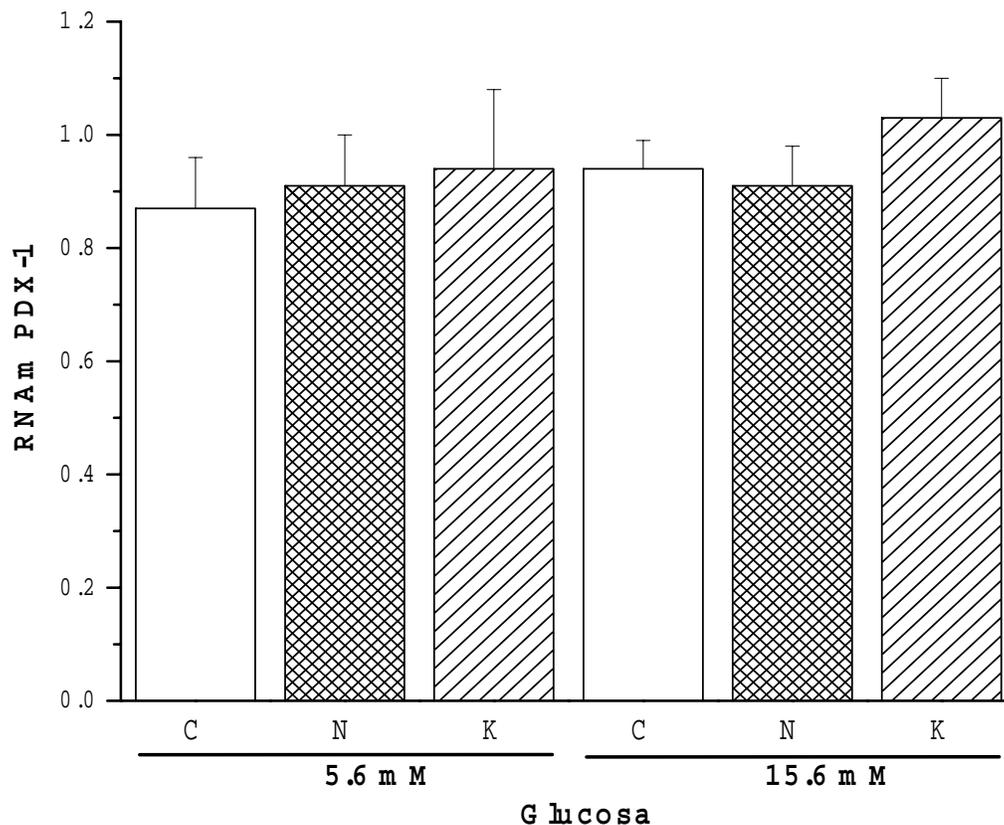
### 7.1.2 Expresión de PDX-1

Dado que el factor de transcripción PDX-1 es un regulador clave de la función de la célula  $\beta$ , ya que es el principal transactivador del gen de insulina (**22, 27, 44**), se analizó también la expresión de PDX-1 en respuesta a NGF.

La **Figura 7.3**, muestra los niveles de RNAm de PDX-1 en respuesta a los diferentes tratamientos después de 3 horas de incubación. Bajo estas condiciones experimentales, la glucosa no modificó significativamente la cantidad del RNAm de PDX-1 en las células  $\beta$  aisladas.



**Figura 7.2. Efecto del NGF y K252a sobre la expresión del gen de insulina.** Los niveles de RNAm de insulina de  $\sim 500 \times 10^3$  células  $\beta$  aisladas se midieron por RT-PCR después de 3 horas de incubación en 5.6 ó 15.6 mM de glucosa. C, células control; N, células expuestas a NGF; K, células expuestas a K252a (20 nM). (a) Fragmento representativo de un experimento de los productos de la reacción de RT-PCR. (b) Las barras representan el promedio  $\pm$  SEM de los niveles de RNAm de insulina normalizados a la expresión del gen constitutivo GAPDH, provenientes de 3 (K) ó 4 experimentos independientes. Los símbolos denotan la diferencia con respecto al control en 15.6 mM glucosa (++);  $p < 0.01$ .



**Figura 7.3. Efecto del NGF y K252a sobre la expresión del gen de PDX-1.** Los niveles de RNAm de PDX-1 de  $\sim 500 \times 10^3$  células  $\beta$  aisladas se midieron por RT-PCR después de 3 horas de incubación en 5.6 ó 15.6 mM de glucosa. C, células control; N, células expuestas a NGF; K, células expuestas a K252a (20 nM). Las barras representan el promedio  $\pm$  SEM de los niveles de RNAm de PDX-1 normalizados a la expresión del gen constitutivo GAPDH, provenientes de 3 (K) ó 4 experimentos independientes.

A pesar de que el tratamiento con NGF potenció la secreción de insulina, ni la exposición a NGF ó a K252a (20 nM) modificaron significativamente la cantidad del RNAm de PDX-1 en las células  $\beta$  aisladas, en ninguna de las concentraciones de glucosa.

## 7.2 Secreción de Insulina en Presencia de Anticuerpos Neutralizantes

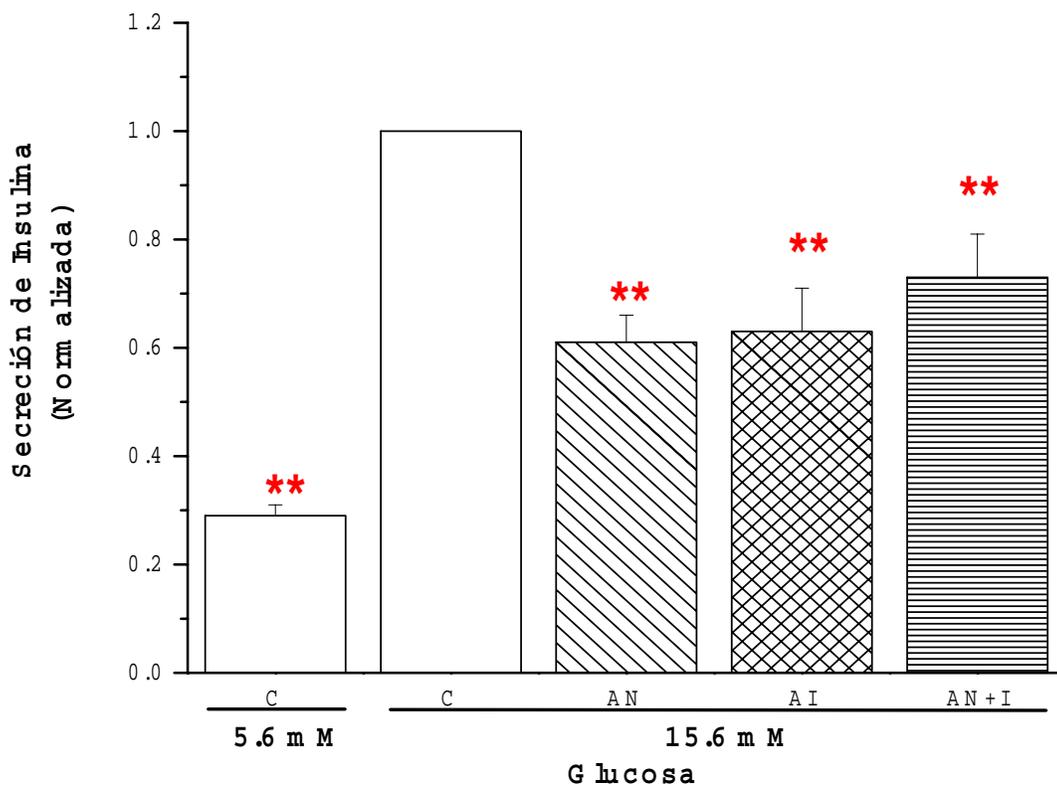
En el laboratorio se ha mostrado que el NGF participa de forma autocrina en la secreción de insulina en concentraciones estimuladoras de glucosa. Es decir, la inhibición de la señalización de NGF por medio de un anticuerpo neutralizante del NGF ó por el inhibidor K252a disminuye la secreción en respuesta a concentraciones de glucosa de 15.6 mM, medido por el ensayo hemolítico inverso (RHPA) (132). En este ensayo, la insulina secretada por las células se encuentra neutralizada mediante un anticuerpo.

Dado que en las presentes condiciones experimentales el uso del inhibidor K252a (**Figura 7.1**) ó un anticuerpo neutralizante del NGF (no mostrado), no modificaron la secreción de insulina en ninguna concentración de glucosa exploramos si era a causa de la alta densidad celular utilizada. Ya que la insulina secretada al medio, que permanece en el sobrenadante, podría participar también en la modulación de su propia secreción.

La **Figura 7.4**, muestra la secreción de insulina de  $100 \times 10^3$  células  $\beta$  aisladas en respuesta a los diferentes tratamientos experimentales después de 3 horas de incubación. Las células discriminan entre las diferentes concentraciones de glucosa y la secreción de insulina en 15.6 mM de glucosa aumentó 3.3 veces con respecto a 5.6 mM de glucosa.

El efecto de la neutralización del NGF y de la insulina secretada por las células  $\beta$  aisladas fue evaluado sólo en 15.6 mM de glucosa. El tratamiento con un anticuerpo neutralizante anti-NGF causó una disminución del 39 % en la insulina secretada con respecto al control en 15.6 mM de glucosa. El anticuerpo neutralizante de la insulina también provocó una disminución similar en la secreción. La combinación de los dos anticuerpos fue equivalente a la de cada anticuerpo por separado, ya que el porcentaje de disminución de la secreción de

insulina de los anticuerpos solos ó en combinación no fue estadísticamente diferente.



**Figura 7.4. Efecto de anticuerpos neutralizantes del NGF y la insulina sobre la secreción de insulina.** La secreción de insulina de  $100 \times 10^3$  células  $\beta$  aisladas se midió por ELISA después de 3 horas de incubación en 5.6 ó 15.6 mM de glucosa. C, células control; AN, células expuestas al anticuerpo anti-NGF (1:500); AI, células expuestas al anticuerpo anti-insulina (1:1000); AN+I, células expuestas a ambos anticuerpos neutralizantes. Las barras representan el promedio  $\pm$  SEM de la insulina secretada normalizada al contenido de proteína total. Los datos se expresan en relación al control en 15.6 mM de glucosa (equivalente a 1), provenientes de 3 (AI) ó 4 experimentos independientes. Los símbolos denotan una diferencia significativa con respecto al control en 15.6 mM glucosa (\*\*);  $p < 0.01$ .

### 7.3 Secreción de Insulina a Seis Horas de Incubación

El siguiente tiempo experimental utilizado fue de 6 horas. Aproximadamente 500,000 células  $\beta$  aisladas fueron incubadas en medio de cultivo RPMI-1640 para evitar variables relacionados a la falta de nutrientes, que tendrían en la HBSS.

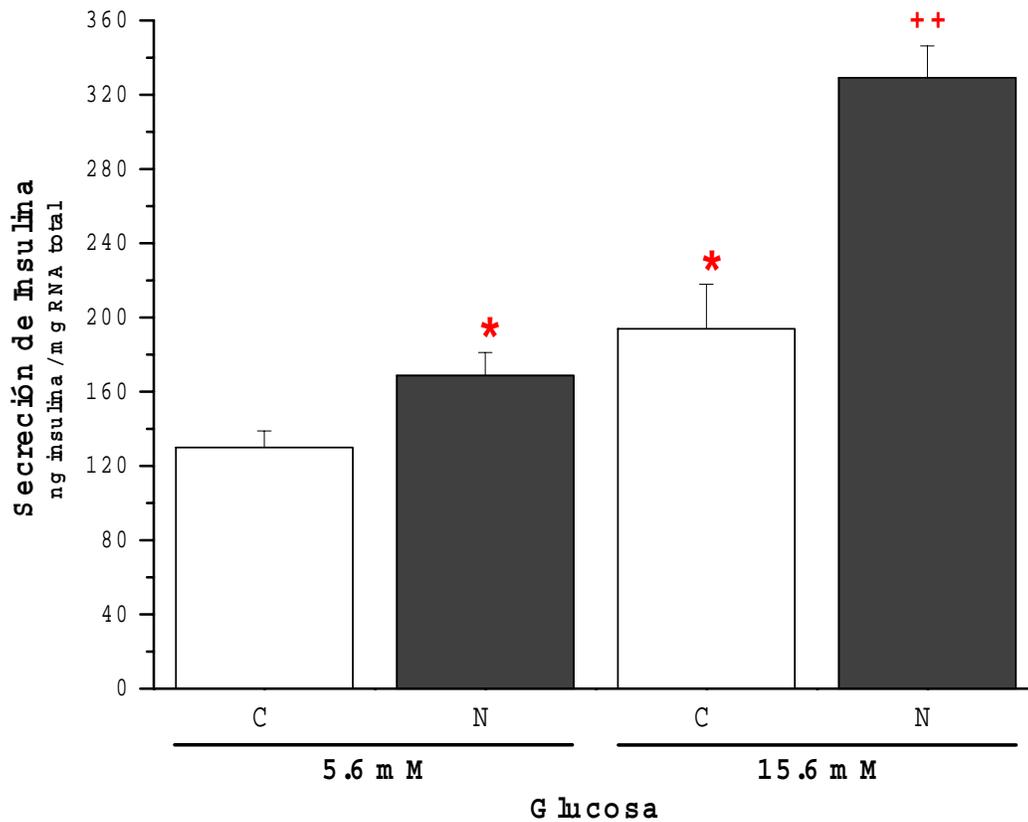
La **Figura 7.5** muestra la secreción de insulina en respuesta a los diferentes tratamientos experimentales después de 6 horas de incubación. Como se esperaba, las células  $\beta$  aisladas discriminan entre las diferentes concentraciones de glucosa, la secreción en 15.6 mM de glucosa aumentó 1.5 veces con respecto a 5.6 mM de glucosa.

El tratamiento con NGF potenció la secreción de insulina un 30 % y un 70 % en 5.6 y 15.6 mM de glucosa, respectivamente. A este tiempo experimental no fue explorada la función del NGF endógeno, ya que en el laboratorio se ha demostrado que la inhibición de la señalización del NGF en tiempos largos de incubación afecta negativamente la viabilidad celular (**136**).

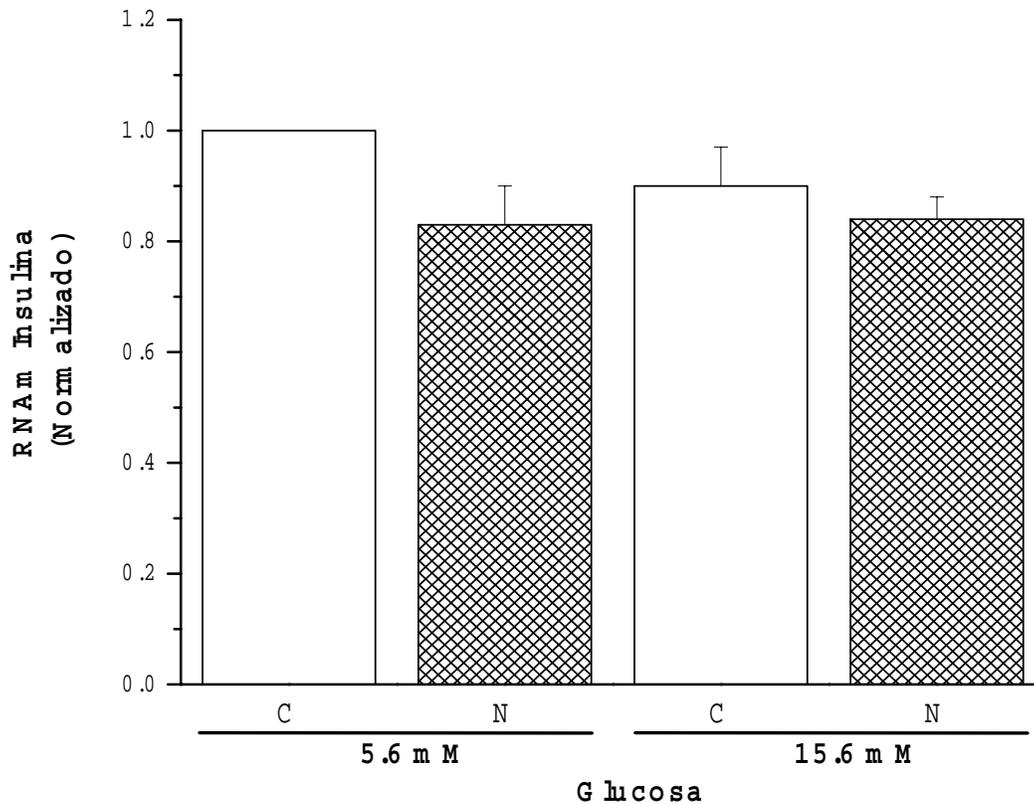
#### 7.3.1 Expresión de Insulina

La **Figura 7.6** muestra los niveles de RNAm de insulina (I y II) en respuesta a los diferentes tratamientos experimentales después de 6 horas de incubación. Bajo estas condiciones experimentales, la glucosa no modificó significativamente la cantidad del RNAm de insulina en las células  $\beta$  aisladas.

De igual forma, a pesar de que el tratamiento con NGF potenció la secreción de insulina, no modificó significativamente la cantidad del RNAm de insulina en las células  $\beta$  aisladas en ninguna de las concentraciones de glucosa.



**Figura 7.5. Efecto del NGF sobre la secreción de insulina.** La secreción de insulina de  $\sim 500 \times 10^3$  células  $\beta$  aisladas se midió por ELISA después de 6 horas de incubación en 5.6 ó 15.6 mM de glucosa. C, células control; N, células expuestas a NGF. Las barras representan el promedio  $\pm$  SEM de la insulina secretada normalizada al contenido de RNA total, provenientes de 4 experimentos independientes. Los símbolos denotan una diferencia significativa con respecto al control en 5.6 mM glucosa (\*);  $p < 0.05$  y con respecto al control en 15.6 mM glucosa (\*\*);  $p < 0.01$ .



**Figura 7.6. Efecto del NGF sobre la expresión del gen de insulina.** Los niveles de RNAm de insulina de  $\sim 500 \times 10^3$  células  $\beta$  aisladas se midieron por RT-PCR después de 6 horas de incubación en 5.6 ó 15.6 mM de glucosa. C, células control; N, células expuestas a NGF. Las barras representan el promedio  $\pm$  SEM de los niveles de RNAm de insulina normalizados a la expresión del gen constitutivo GAPDH. Los datos se expresan en relación al control en 5.6 mM de glucosa (equivalente a 1), provenientes de 4 experimentos independientes.

### 7.3.2 Expresión de PDX-1

La **Figura 7.7** muestra los niveles de RNAm de PDX-1 en respuesta a los diferentes tratamientos después de 6 horas de incubación. Bajo estas condiciones experimentales, la glucosa 15.6 mM modificó significativamente la cantidad del RNAm de PDX-1 en las células  $\beta$  aisladas, aumentó la cantidad del RNAm de PDX-1 en casi un 20 %, comparado con el control en 5.6 mM de glucosa.

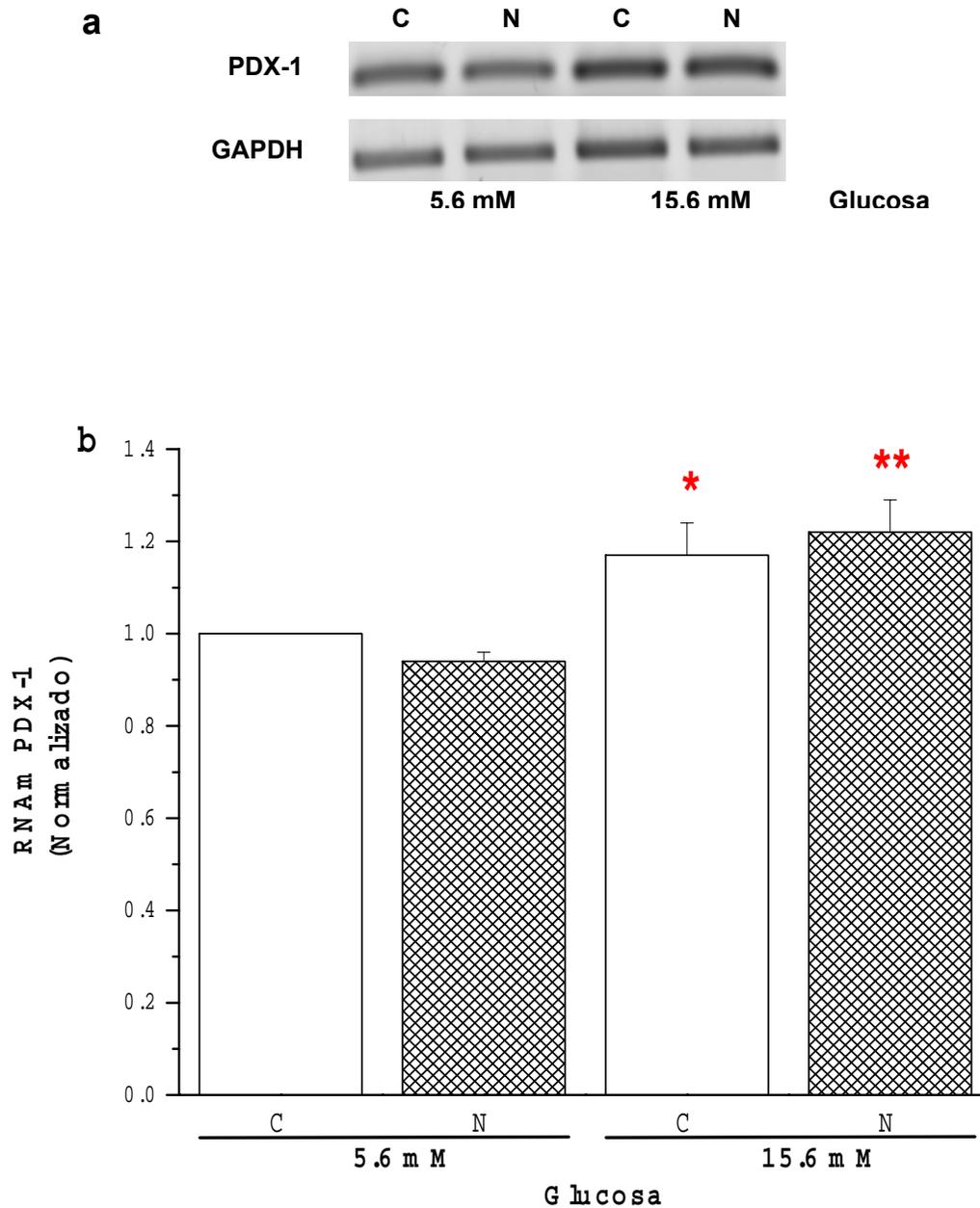
El tratamiento con NGF no modificó significativamente la cantidad del RNAm de PDX-1 en las células  $\beta$  aisladas en comparación con su respectivo control en ninguna concentración de glucosa. Sin embargo el nivel del RNAm de PDX-1 en el tratamiento con NGF en 15.6 mM de glucosa aumentó 22 % con respecto al control en 5.6 mM de glucosa, por lo que el efecto observado podría deberse sólo a la glucosa alta.

#### **7.4 Inmunofluorescencia de PDX-1**

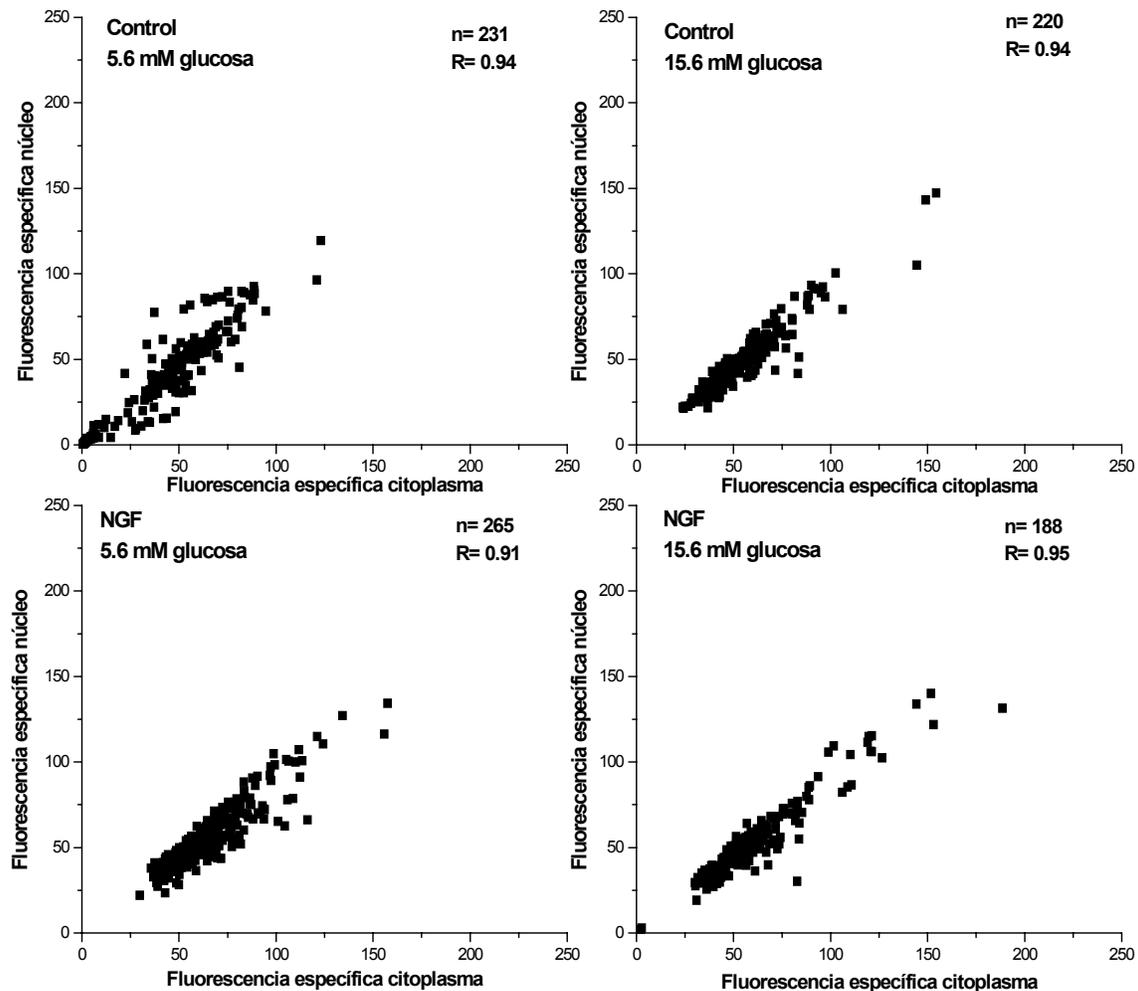
Para llevar cabo la caracterización de la posible modulación por NGF de la localización subcelular de PDX-1 en células  $\beta$  aisladas, hicimos un estudio de fluorescencia cuantitativa para detectar la proteína PDX-1 en el citoplasma y en el núcleo, de acuerdo a la metodología reportada (**139**) y como fue descrito en la sección 6.4. Las condiciones experimentales son: células control y células tratadas con NGF (50 ng/ml) en 5.6 y 15.6 mM de glucosa, incubadas por 15 minutos, 1 y 6 horas.

El porcentaje de células  $\beta$  en el cultivo fue de ~ 92 %. Las células con una fluorescencia específica de PDX-1 < 20.92 para el núcleo y < 23.10 para el citoplasma, se consideraron como células negativas para esta proteína.

La **Figura 7.8** muestra la relación entre la fluorescencia específica de PDX-1 en el núcleo contra la fluorescencia específica de PDX-1 en el citoplasma en células  $\beta$  aisladas en respuesta a los tratamientos experimentales incubadas por 15 minutos. Como puede apreciarse, existe una relación directa entre la expresión de PDX-1 en el núcleo y en el citoplasma en las células en todos los tratamientos experimentales, que también fue vista en los tres tiempos de estimulación.



**Figura 7.7. Efecto del NGF sobre la expresión del gen de PDX-1.** Los niveles de RNAm de PDX-1 de  $\sim 500 \times 10^3$  células  $\beta$  aisladas se midieron por RT-PCR después de 6 horas de incubación en 5.6 ó 15.6 mM de glucosa. C, células control; N, células expuestas a NGF. **(a)** Fragmento representativo de un experimento de los productos de la reacción de RT-PCR. **(b)** Las barras representan el promedio  $\pm$  SEM de los niveles de RNAm de PDX-1 normalizados a la expresión del gen constitutivo GAPDH. Los datos se expresan en relación al control en 5.6 mM de glucosa (equivalente a 1), provenientes de 4 experimentos independientes. Los símbolos denotan una diferencia significativa con respecto al control en 5.6 mM glucosa (\*)  $p < 0.05$  y (\*\*)  $p < 0.01$ .



**Figura 7.8. Expresión específica de PDX-1 en el núcleo contra citoplasma.** La expresión de PDX-1 en  $50 \times 10^3$  células  $\beta$  aisladas se midió por fluorescencia cuantitativa después de 15 minutos de incubación en 5.6 ó 15.6 mM de glucosa. Las gráficas superiores corresponden a las células control y las inferiores a las células expuestas a NGF. n, número de células aisladas analizadas; R, coeficiente de correlación. Los datos son representativos de células provenientes de un cultivo.

En la **Tabla I** se muestran los datos de la expresión de PDX-1 en núcleo y en citoplasma en respuesta a los tratamientos, después de 15 minutos de incubación.

**Tabla I: Expresión específica de PDX-1 a 15 minutos de incubación**

Condición experimental	Expresión específica en el núcleo (Promedio)	SEM $\pm$	Expresión específica en el citoplasma (Promedio)	SEM $\pm$
C 5.6 mM (231)	38.30	1.72	41.49	1.71
NGF 5.6 mM (265)	56.75 #	1.10	65.91 #	1.21
C 15.6 mM (220)	48.57 #	1.27	54.59 #	1.31
NGF 15.6 mM (188)	53.50	1.65	60.71	1.88

La expresión de PDX-1 en  $50 \times 10^3$  células  $\beta$  aisladas se midió por fluorescencia cuantitativa después de 15 minutos de incubación en 5.6 ó 15.6 mM de glucosa. C, células control; N, células expuestas a NGF. El número de células aisladas analizadas está entre paréntesis. Los datos son representativos de células provenientes de un cultivo. Los símbolos denotan una diferencia significativa con respecto al control en 5.6 mM glucosa (#);  $p < 0.0001$ .

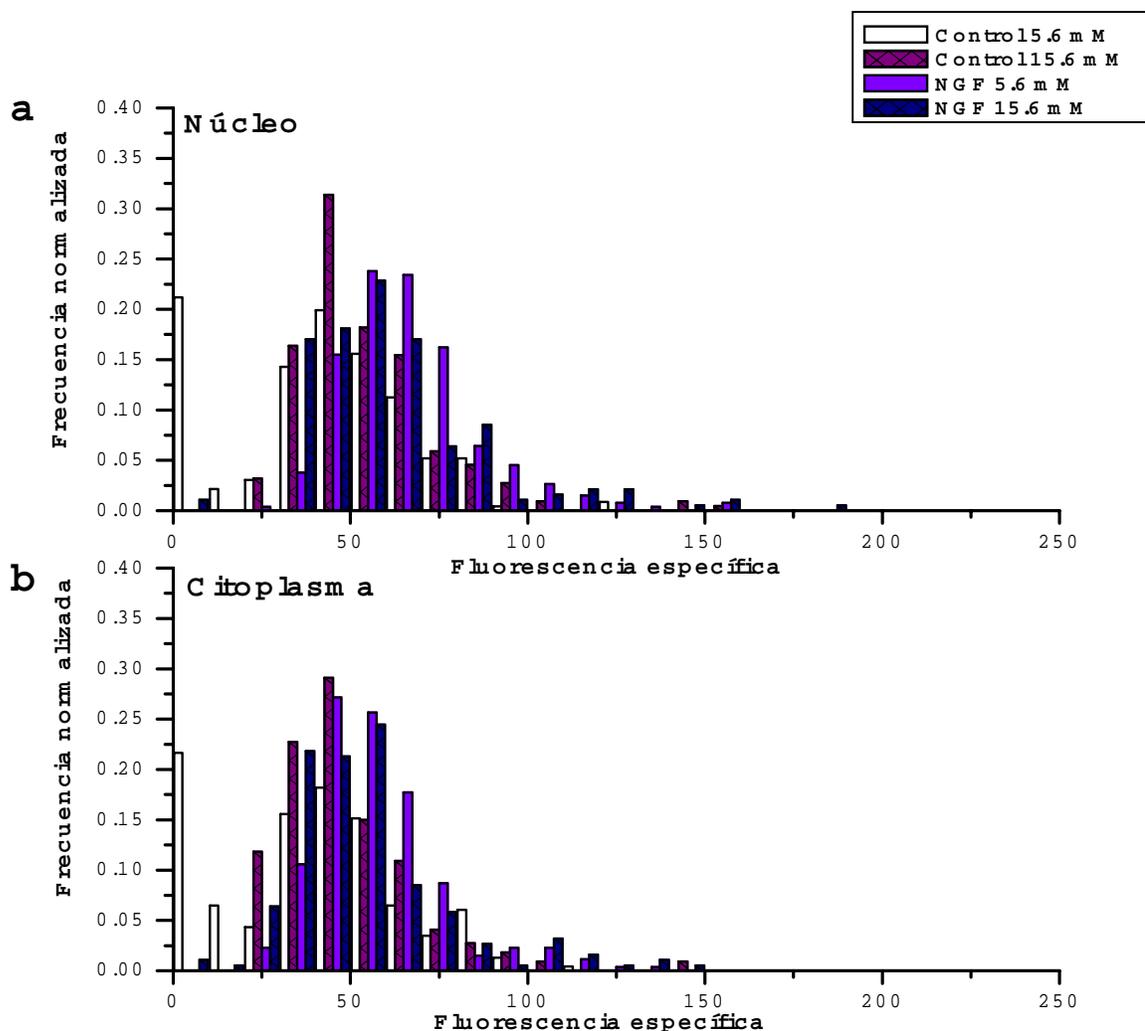
La **Figura 7.9** muestra un histograma de la distribución de frecuencias de la fluorescencia específica de PDX-1 en el núcleo (a) y en el citoplasma (b) de células  $\beta$  aisladas en respuesta a los tratamientos experimentales incubadas por 15 minutos. La expresión de PDX-1 por células  $\beta$  aisladas en ambos compartimentos celulares, no es homogénea entre los tratamientos.

El tratamiento con 15.6 mM de glucosa aumenta la proporción de células con mayor expresión de PDX-1 en el núcleo así como en el citoplasma con respecto a las células incubadas con baja glucosa ( $p < 0.0001$ ).

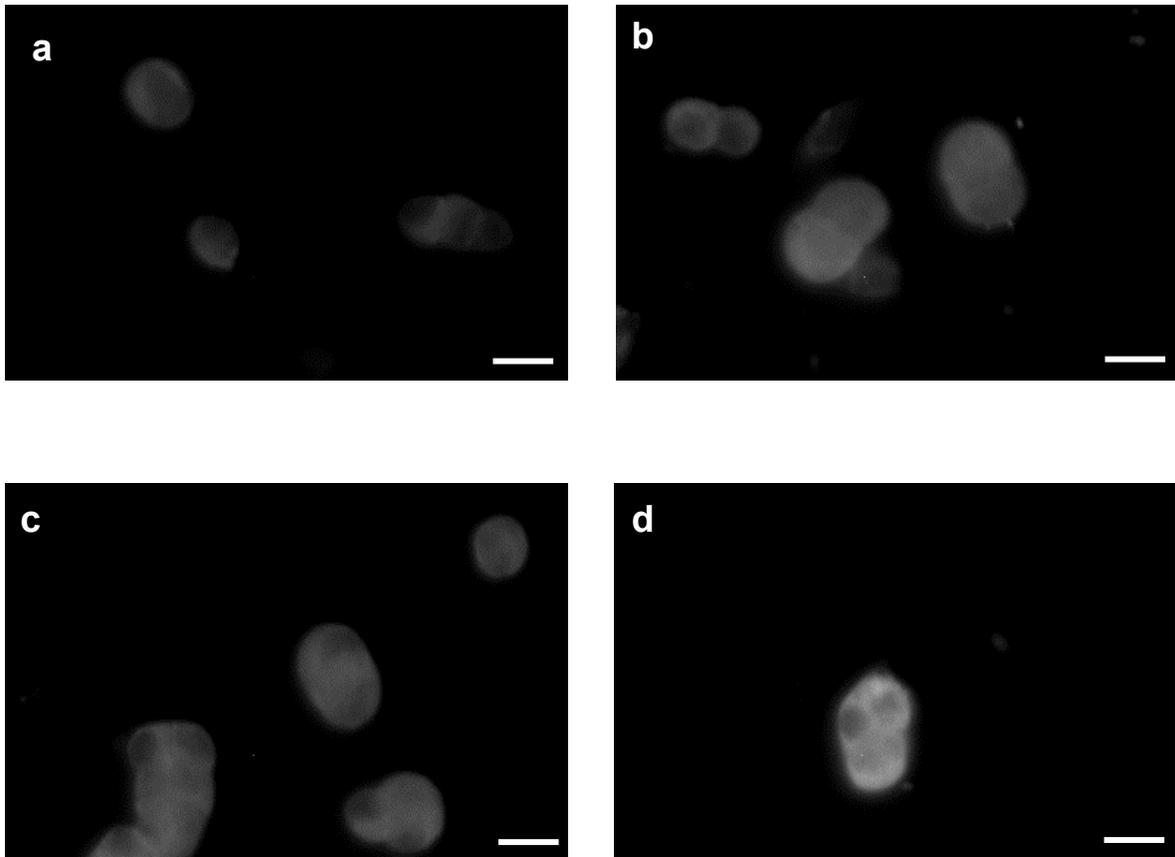
El tratamiento con NGF en 5.6 mM de glucosa aumenta la proporción de células con una mayor expresión de PDX-1 en el núcleo así como en el citoplasma con respecto a las células incubadas sin NGF en 5.6 mM de glucosa ( $p < 0.0001$ ).

A pesar de que el tratamiento con NGF en 15.6 mM de glucosa, tiende a aumentar la proporción de células con una alta expresión de PDX-1 en el núcleo así como en el citoplasma con respecto a las células control, el análisis estadístico no reveló diferencias.

La **Figura 7.10** muestra la inmunofluorescencia para la detección de PDX-1 en células  $\beta$  aisladas en cada uno de los tratamientos experimentales a 15 minutos de incubación, en donde puede apreciarse el aumento en la expresión de PDX-1 en 15.6 mM de glucosa y en respuesta al NGF.

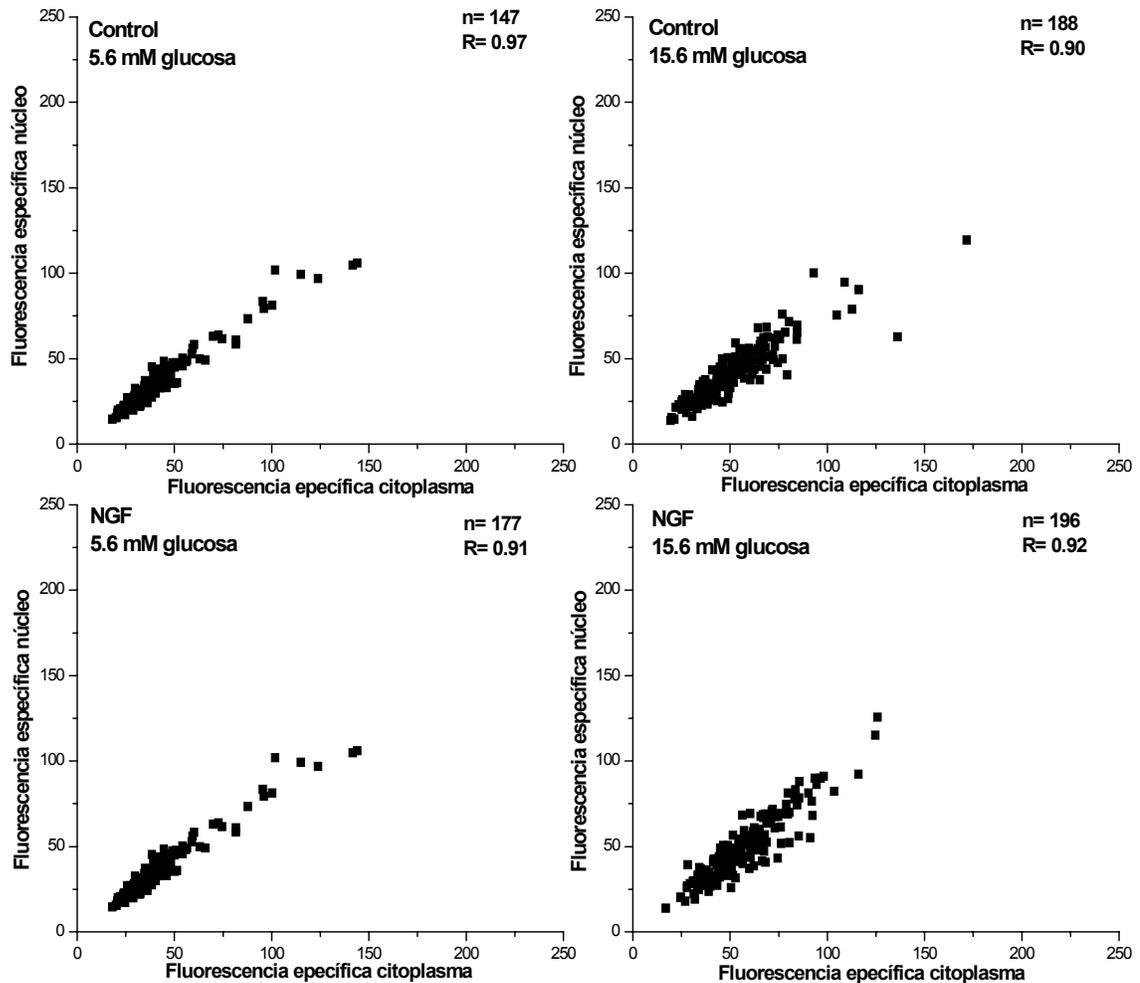


**Figura 7.9. Histograma de la distribución de frecuencias de la fluorescencia específica de PDX-1.** La expresión de PDX-1 en células  $\beta$  aisladas se midió por fluorescencia cuantitativa después de 15 minutos de incubación en 5.6 ó 15.6 mM de glucosa. (a) Expresión de PDX-1 en el núcleo y (b) en el citoplasma.



**Figura 7.10. Expresión de PDX-1 en células  $\beta$  aisladas.** La expresión de PDX-1 se midió por microscopía de fluorescencia en células incubadas por 15 minutos en 5.6 (a, c) ó 15.6 mM (b, d) de glucosa. (a) y (b) Células control; (c) y (d) células tratadas con NGF. Barra = 10  $\mu$ m.

La **Figura 7.11** muestra la relación entre la fluorescencia específica de PDX-1 en el núcleo contra la fluorescencia específica de PDX-1 en el citoplasma en células  $\beta$  aisladas en respuesta a los tratamientos experimentales incubadas por 1 hora.



**Figura 7.11. Expresión específica de PDX-1 en el núcleo contra el citoplasma.** La expresión de PDX-1 en  $50 \times 10^3$  células  $\beta$  aisladas se midió por fluorescencia cuantitativa después de 1 hora de incubación en 5.6 ó 15.6 mM de glucosa. Las gráficas superiores corresponden a las células control y las inferiores a las células expuestas a NGF. n, número de células aisladas analizadas; R, coeficiente de correlación. Los datos son representativos de células provenientes de un cultivo.

En la **Tabla II**, se muestran los datos de la expresión de PDX-1 en núcleo y en citoplasma en respuesta a los tratamientos, después de 1 hora de incubación.

**Tabla II: Expresión específica de PDX-1 a 1 hora de incubación**

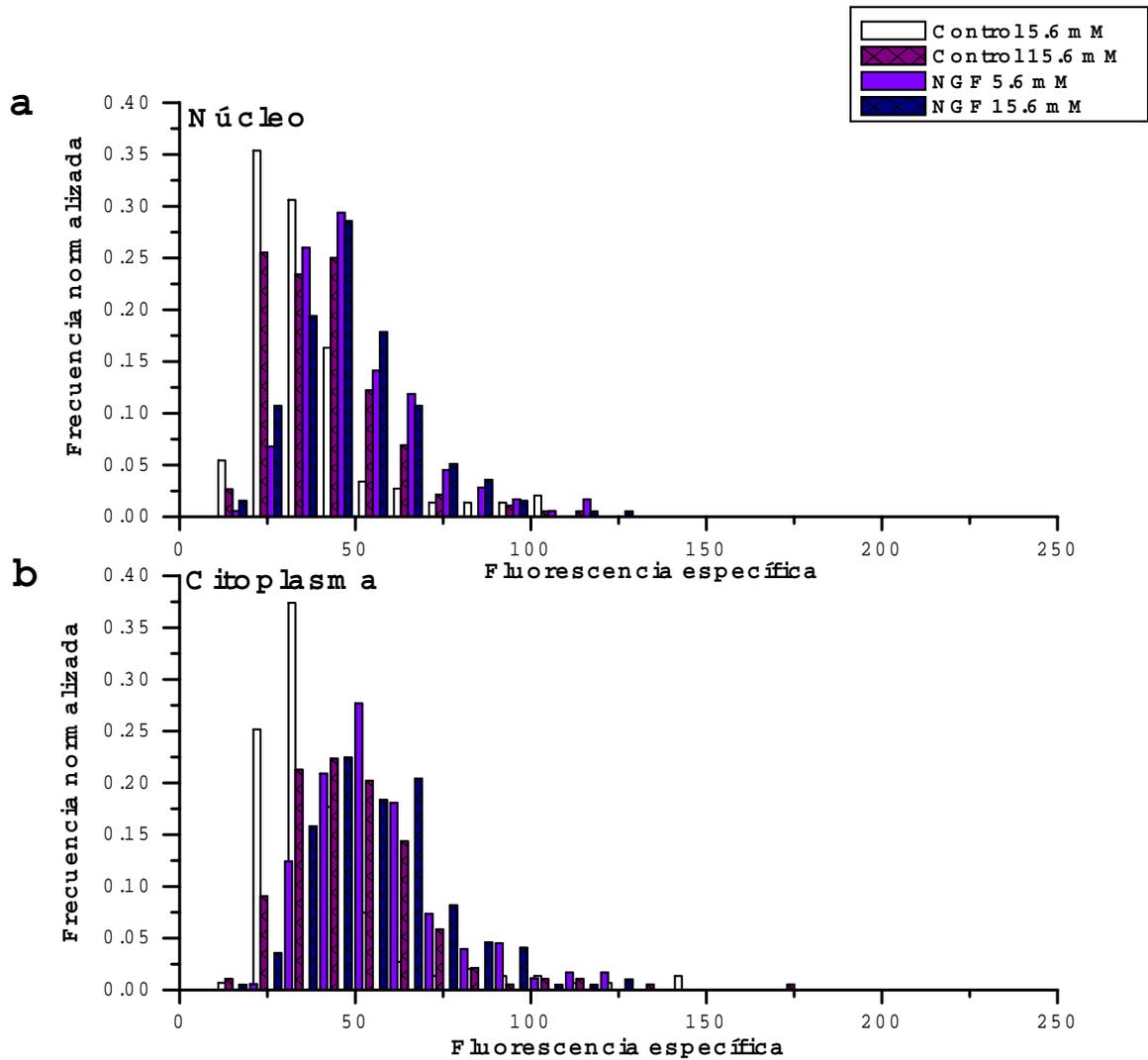
Condición experimental	Expresión específica en el núcleo (Promedio)	SEM $\pm$	Expresión específica en el citoplasma (Promedio)	SEM $\pm$
C 5.6 mM (147)	36.79	1.47	42.33	1.81
NGF 5.6 mM (188)	49.37	1.38	59.23	1.45
C 15.6 mM (177)	40.99	1.20	50.75	1.52
NGF 15.6 mM (196)	48.90	1.28	56.14	1.34

La expresión de PDX-1 en  $50 \times 10^3$  células  $\beta$  aisladas se midió por fluorescencia cuantitativa después de 1 hora de incubación en 5.6 ó 15.6 mM de glucosa. C, células control; N, células expuestas a NGF. El número de células aisladas analizadas está entre paréntesis. Los datos son representativos de células provenientes de un cultivo.

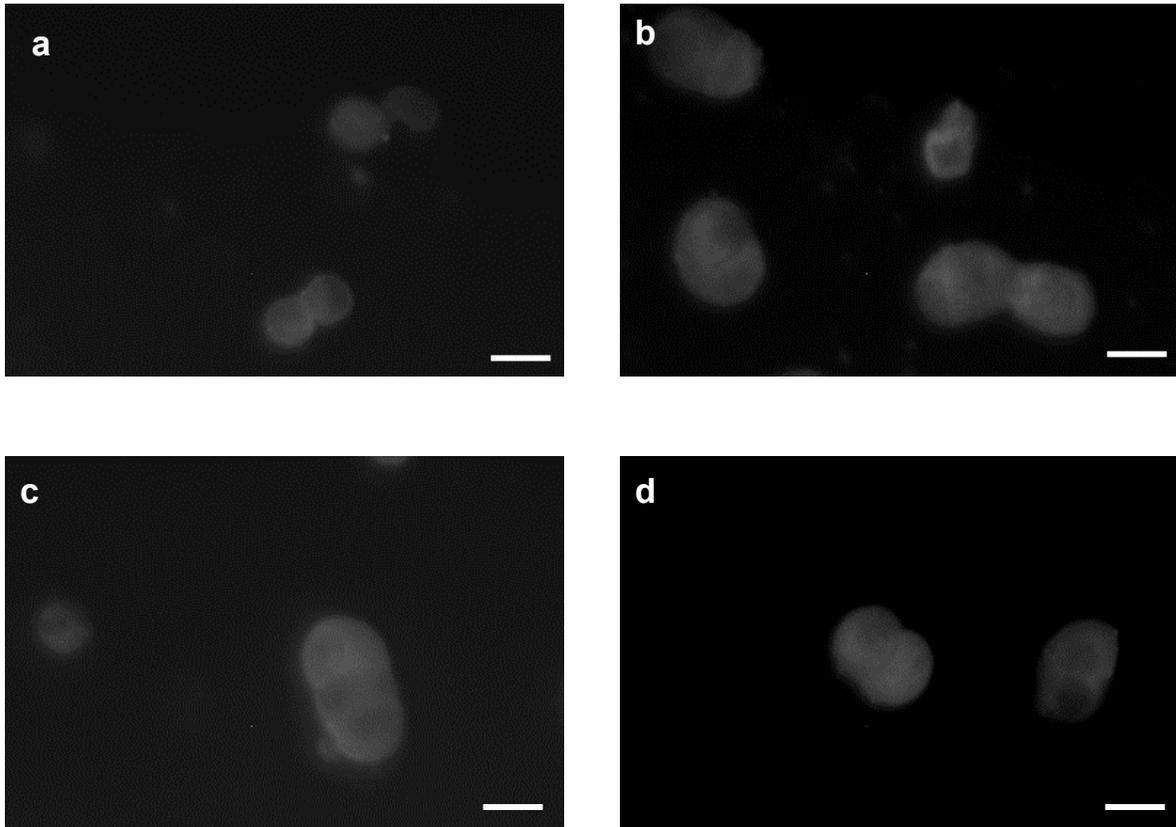
La **Figura 7.12** muestra un histograma de la distribución de frecuencias de la fluorescencia específica de PDX-1 en el núcleo (**a**) y en el citoplasma (**b**) de células  $\beta$  aisladas en respuesta a los tratamientos experimentales incubadas por 1 hora. La expresión de PDX-1 en ambos compartimentos celulares, no es homogénea entre los tratamientos.

El tratamiento con 15.6 mM de glucosa, no cambia la proporción expresión de PDX-1 en ninguno de los compartimentos celulares, con respecto a las células incubadas con 5.6 mM de glucosa. Los tratamientos con NGF en 5.6 y 15.6 mM de glucosa, si bien tienden a aumentar la proporción de células con una alta expresión de PDX-1 en el núcleo así como en el citoplasma con respecto a las células incubadas sólo en 5.6 ó 15.6 mM de glucosa, estos cambios no fueron diferentes estadísticamente.

La **Figura 7.13** muestra la inmunofluorescencia para la detección de PDX-1 en células  $\beta$  aisladas en cada uno de los tratamientos experimentales a 1 hora de incubación, en donde puede apreciarse que la expresión de PDX-1 no es alterada por los tratamientos experimentales.

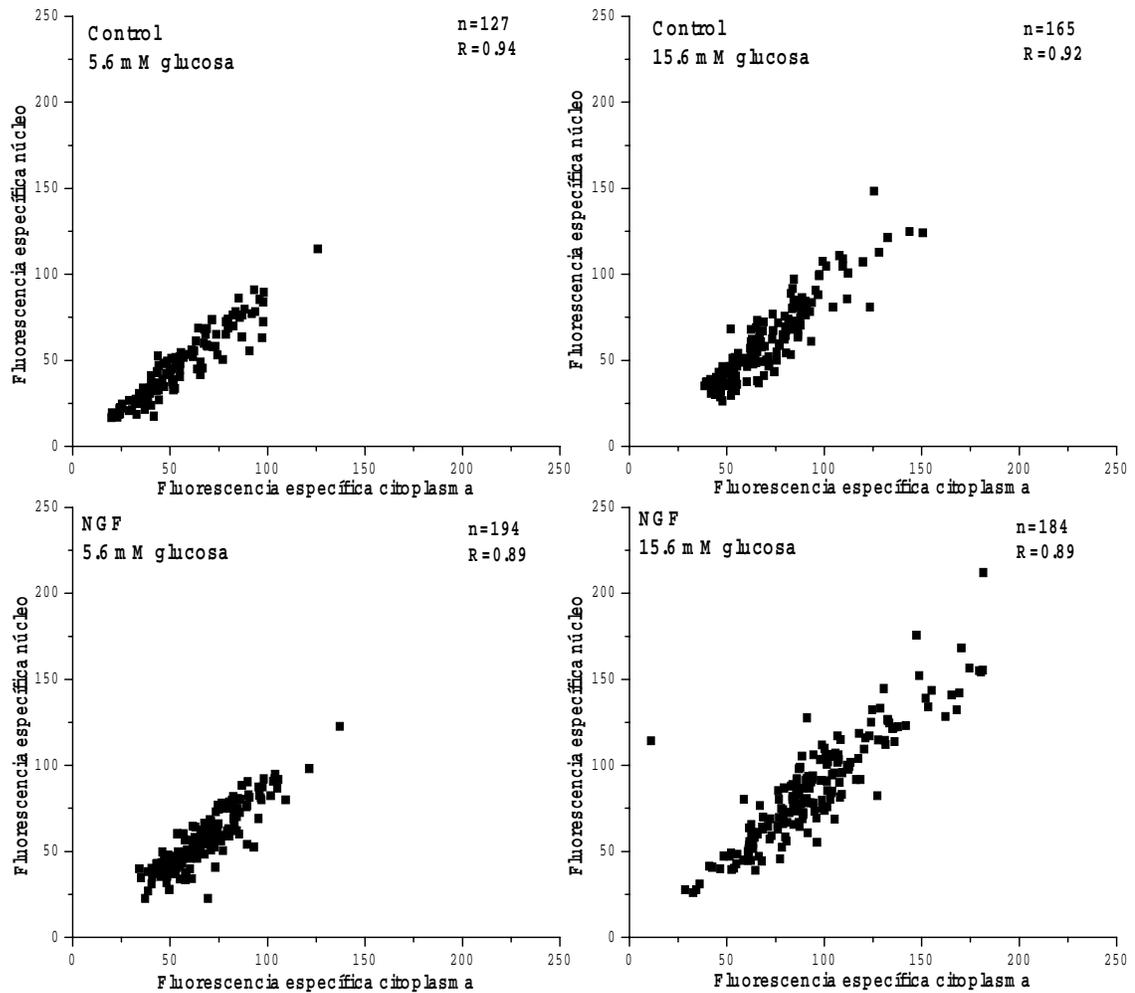


**Figura 7.12. Histograma de la distribución de frecuencias de la fluorescencia específica de PDX-1.** La expresión de PDX-1 en células  $\beta$  aisladas se midió por fluorescencia cuantitativa después de 1 hora de incubación en 5.6 ó 15.6 mM de glucosa. (a) Expresión de PDX-1 en el núcleo y (b) en el citoplasma.



**Figura 7.13. Expresión de PDX-1 en células  $\beta$  aisladas.** La expresión de PDX-1 se midió por microscopía de fluorescencia en células incubadas por 1 hora en 5.6 (**a**, **c**) ó 15.6 mM (**b**, **d**) de glucosa. (**a**) y (**b**) Células control; (**c**) y (**d**) células tratadas con NGF. Barra = 10  $\mu$ m.

La **Figura 7.14** muestra la relación entre la fluorescencia específica de PDX-1 en el núcleo contra la fluorescencia específica de PDX-1 en el citoplasma, en células  $\beta$  aisladas en respuesta a los tratamientos experimentales incubadas por 6 horas.



**Figura 7.14. Expresión específica de PDX-1 en el núcleo contra el citoplasma.** La expresión de PDX-1 en  $50 \times 10^3$  células  $\beta$  aisladas se midió por fluorescencia cuantitativa después de 6 horas de incubación en 5.6 ó 15.6 mM de glucosa. Las gráficas superiores corresponden a las células control y las inferiores a las células expuestas a NGF. n, número de células aisladas analizadas; R, coeficiente de correlación. Los datos son representativos de células provenientes de un cultivo.

En la **Tabla III**, se muestran los datos de la expresión de PDX-1 en el núcleo y en el citoplasma en respuesta a los tratamientos, después de 6 horas de incubación. Este tiempo más largo se incluyó para detectar posibles cambios en la localización de PDX-1 cuando sí es modificada su expresión y para conocer la dependencia del tiempo en los posibles cambios en la translocación.

**Tabla III: Expresión específica de PDX-1 a 6 horas de incubación**

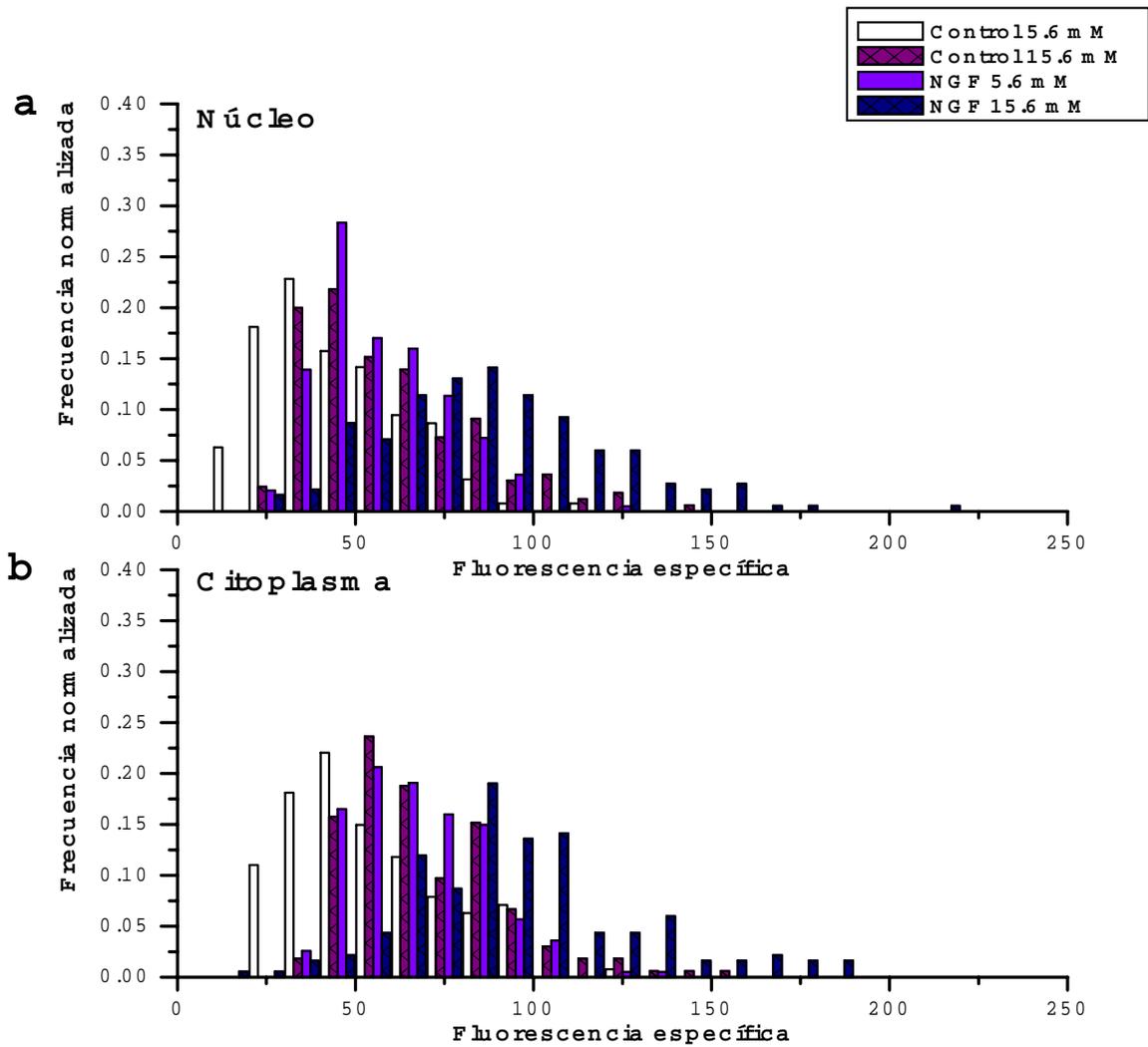
Condición experimental	Expresión específica en el núcleo (Promedio)	SEM $\pm$	Expresión específica en el citoplasma (Promedio)	SEM $\pm$
C 5.6 mM (127)	45.31	1.77	53.74	1.91
NGF 5.6 mM (194)	56.72 #	1.23	67.21 #	1.23
C 15.6 mM (165)	59.15 #	1.82	69.31	1.73
NGF 15.6 mM (184)	86.88 +	2.33	95.03 +	2.35

La expresión de PDX-1 en  $50 \times 10^3$  células  $\beta$  aisladas se midió por fluorescencia cuantitativa después de 6 horas de incubación en 5.6 ó 15.6 mM de glucosa. C, células control; N, células expuestas a NGF. El número de células aisladas analizadas está entre paréntesis. Los datos son representativos de células provenientes de un cultivo. Los símbolos denotan una diferencia significativa con respecto al control en 5.6 mM de glucosa (#) y con respecto al control en 15.6 mM de glucosa (+);  $p < 0.0001$ .

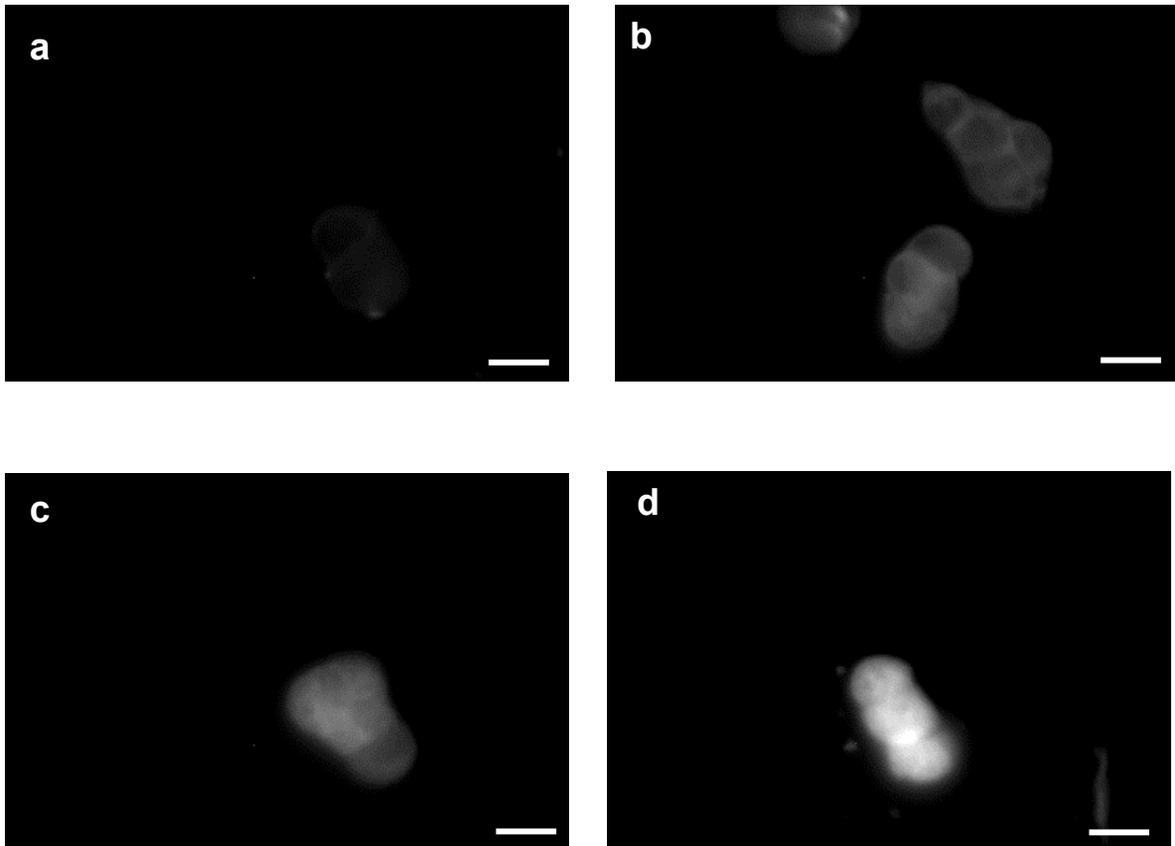
La **Figura 7.15** muestra un histograma de la distribución de frecuencias de la fluorescencia específica de PDX-1 en el núcleo (a) y en el citoplasma (b) de células  $\beta$  aisladas en respuesta a los tratamientos experimentales incubadas por 6 horas. La expresión de PDX-1 en ambos compartimentos celulares, no es homogénea entre los tratamientos.

El tratamiento con 15.6 mM de glucosa aumenta la proporción de células con mayor expresión de PDX-1 en el núcleo así como en el citoplasma (aunque en este último con una pequeña diferencia), con respecto a las células incubadas con 5.6 mM de glucosa ( $p < 0.0001$ ). El tratamiento con NGF en 5.6 mM de glucosa incrementa la proporción de células con una mayor expresión de PDX-1 en el núcleo así como en el citoplasma con respecto a las células incubadas sólo en 5.6 mM glucosa ( $p < 0.0001$ ). Finalmente, el tratamiento con NGF en 15.6 mM de glucosa, aumenta marcadamente la expresión de PDX-1 en el núcleo así como en el citoplasma con respecto a las células incubadas sólo en glucosa ( $p < 0.0001$ ).

La **Figura 7.16**, muestra la inmunofluorescencia para la detección de PDX-1 en células  $\beta$  aisladas en cada uno de los tratamientos experimentales a 6 horas de incubación, en donde puede apreciarse el aumento en la expresión de PDX-1 en glucosa alta y en respuesta al NGF.



**Figura 7.15. Histograma de la distribución de frecuencias de la fluorescencia específica de PDX-1.** La expresión de PDX-1 en células  $\beta$  aisladas se midió por fluorescencia cuantitativa después de 6 horas de incubación en 5.6 ó 15.6 mM de glucosa. (a) Expresión de PDX-1 en el núcleo y (b) en el citoplasma.



**Figura 7.16: Expresión de PDX-1 en células  $\beta$  aisladas.** La expresión de PDX-1 se midió por microscopía de fluorescencia en células incubadas por 6 horas en 5.6 (**a**, **c**) ó 15.6 mM (**b**, **d**) de glucosa. (**a**) y (**b**) Células control; (**c**) y (**d**) células tratadas con NGF. Barra = 10  $\mu$ m.

## VIII. DISCUSIÓN

El papel del NGF sobre la fisiología de las células  $\beta$  pancreáticas, particularmente sobre la potenciación de la secreción de insulina, ha sido explicado en parte por la modulación de la actividad eléctrica de las células  $\beta$  cultivadas por días (**101**, **132**, **134**, **135**); sin embargo a tiempos cortos de exposición al factor (de minutos a horas) el efecto del NGF sobre la biosíntesis a nivel transcripcional de la insulina y de PDX-1 no ha sido estudiado.

Para entender cómo el NGF potencia la secreción de insulina a corto plazo, exploramos su efecto sobre la biosíntesis de insulina y de PDX-1 a nivel transcripcional y la posible modulación de la localización subcelular de PDX-1 en células  $\beta$  aisladas de ratas adultas. Por RT-PCR detectamos el RNAm de insulina y de PDX-1 a 3 y 6 h de incubación y analizamos por medio de inmunofluorescencia cuantitativa la localización subcelular de PDX-1.

En este trabajo demostramos que el NGF exógeno en condiciones basales así como estimuladoras de glucosa, potencia la secreción de insulina a 3 y 6 horas de incubación, como ya ha sido evidenciado por medio de RHPA a 1 hora de exposición al factor (**132**). Sin embargo, a estos dos tiempos experimentales, el nivel de RNAm de insulina no cambia en respuesta a la estimulación con NGF exógeno ni a la concentración de glucosa de 15.6 mM.

Otros estudios *in vitro* han descrito una regulación positiva por la glucosa a corto plazo sobre la transcripción del gen de insulina, de forma transitoria. Por un lado en células  $\beta$ TC3 expuestas 30 minutos (**68**) y en islotes aislados de rata y células HIT-T15 expuestas 15 minutos (**69**, **73**). En estas últimas, los niveles de RNAm fueron medidos 60 ó 90 minutos después del estímulo.

No obstante, otros grupos han demostrado que en islotes de rata, 1 hora de exposición a la glucosa alta (17 mM) no modifica el RNAm de insulina (75). En el mismo modelo, tampoco se modificó la proporción del RNAm de insulina durante la exposición a glucosa alta por 1 y 3 h, lo que ocurrió después de 6 h de incubación (77). Sin embargo, en estos últimos experimentos el RNAm de insulina disminuye en la concentración de glucosa 3.3 mM considerada como hipoglucémica ya que, se ha demostrado que la hipoglucemia disminuye el contenido del RNAm de insulina (142, 143), por lo que esto afecta la proporción entre alta y baja glucosa (17 vs 3.3 mM).

Bajo nuestro protocolo experimental en células  $\beta$  aisladas, no observamos cambios en el nivel del RNAm de insulina en respuesta al NGF exógeno, ni a la concentración de glucosa de 15.6 mM. Esto podría deberse a que: a) efectivamente exista una onda rápida y transitoria de estimulación, b) la modulación del nivel del RNAm sea después de periodos de tiempo más largos (> 6 horas o días), c) la regulación por el NGF ó la glucosa sea a nivel traduccional (7, 18, 138). Sin embargo, hay que recordar que los niveles del RNAm de insulina finalmente reflejan un balance entre la transcripción y la degradación del RNAm.

Otra posibilidad es que el NGF endógeno, secretado por las células  $\beta$  pueda participar de forma autocrina en el mantenimiento de los niveles de RNAm de insulina, como ha sido mostrado de manera autocrina por la propia insulina (70).

Para probar esto último, utilizamos K252a para inhibir el receptor TrkA, a 3 h de incubación. La secreción de insulina no fue modificada por el tratamiento en ninguna concentración de glucosa, pero el RNAm de insulina disminuyó en ambas concentraciones de glucosa aunque el efecto sólo es significativo en 15.6 mM de glucosa.

Dado que se ha mostrado que el NGF endógeno participa en la secreción de insulina inducida por glucosa, por medio de RHPA en donde se neutraliza la insulina secretada (**132**), y nuestros experimentos fueron hechos a una alta densidad celular, disminuimos la densidad de  $\sim 500 \times 10^3$  a  $100 \times 10^3$  células. Encontramos que al inhibir el NGF ó la insulina secretados por las células  $\beta$ , la secreción de insulina estimulada por glucosa disminuye. Estos resultados sugieren que las células  $\beta$  aisladas cuando están cultivadas a una baja densidad celular, son más sensibles a la falta de NGF en la secreción de insulina estimulada por glucosa.

Considerando el efecto de la insulina sobre la regulación de su propia secreción, previamente se ha demostrado que existe una retroalimentación positiva en células  $\beta$  aisladas de ratón, en las cuales la insulina estimula de forma autocrina su secreción (**144**). Así como en islotes de ratón, la insulina secretada constitutivamente es necesaria para la secreción de insulina estimulada por glucosa (**145**).

Al bloquear paralelamente el NGF e insulina secretados, encontramos que, el efecto sobre la secreción de insulina fue el mismo que al inhibir cada uno por separado. Lo que sugiere que ambas proteínas convergen en la misma vía para mantener la secreción estimulada por glucosa, ya que ambas tienen RTKs (**114**, **146**), y se ha evidenciado que TrkA activado recluta a los IRS-1 y 2 (**147**). Los IRS son proteínas adaptadoras que participan en la vía de señalización inducida por insulina y además son expresados por las células  $\beta$  (**70**, **146**). Así mismo, otro miembro de la familia de las neurotrofinas, el BDNF también recluta a IRS-1 y 2 en neuronas corticales (**148**).

La modulación del nivel de RNAm de PDX-1 no se modificó después de 3 h de exposición a los diferentes tratamientos, aunque a las 6 h de incubación

incrementó el RNAm de este factor de transcripción en respuesta sólo a la concentración de glucosa de 15.6 mM.

Si bien entre los TFs que regulan la expresión del gen de PDX-1 se encuentran: HNF-3 $\beta$  y 1 $\alpha$ , Nkx2.2, BETA2, USF y el propio PDX-1 (**49 - 54**), las señales extracelulares que regulan la expresión de PDX-1 no están completamente elucidadas.

En células MIN6 se ha identificado que el promotor del gen de PDX-1 es regulado positivamente por ciertos estímulos como son: la glucosa, la insulina y por GLP-1 (**149**). Se ha demostrado que el GLP-1 en células INS-1, después de 3 h de incubación, incrementa el RNAm de PDX-1, independientemente de la concentración de glucosa, sin embargo, la glucosa *per se* no modifica significativamente la expresión (**150**).

Finalmente, investigamos por medio de inmunofluorescencia cuantitativa, si el NGF podría participar en la modulación de la localización subcelular de PDX-1, ya que se ha demostrado que este factor presenta una translocación entre el citoplasma y el núcleo (**84, 85, 88**), inducida por glucosa ó por insulina.

De manera inesperada encontramos que, la expresión de PDX-1 en el citoplasma y en el núcleo tiene una correlación positiva en los tres tiempos experimentales utilizados (15 minutos, 1 y 6 horas) y bajo todos los tratamientos.

La concentración de glucosa de 15.6 mM incrementó la expresión de PDX-1 en el núcleo y en el citoplasma después de 15 minutos y 6 h de exposición con respecto a la concentración de glucosa de 5.6 mM. El NGF en 5.6 mM de glucosa aumentó la expresión de PDX-1 en el núcleo y en el citoplasma a 15 minutos y 6 h de exposición, con respecto a la baja glucosa. El NGF en alta glucosa aumentó de forma marcada la expresión de PDX-1 en el núcleo y en el citoplasma a 6 h de exposición, con respecto a la alta glucosa.

En tanto que a 1 h no hubo diferencias significativas entre todos los tratamientos, lo que podría ser explicado como parte de la estabilización del sistema al retornar a condiciones basales.

Es poco probable que los cambios de expresión de PDX-1 en respuesta a la glucosa ó al NGF sean el resultado de un aumento en la biosíntesis de PDX-1 debido al medio de incubación (HBSS). Lo que sugiere que el reconocimiento del anticuerpo policlonal anti PDX-1 sea modulado por las modificaciones postraduccionales de PDX-1, ya que se ha evidenciado que la glucosa ó la insulina inducen la fosforilación del factor (**80 – 82, 88**), la adición de un grupo N-acetilglucosamina ligado a O (O-GlcNAc) (**151**) y la adición covalente de SUMO-1 (*small ubiquitin-related modifier 1*) a PDX-1 (**152**).

Otra característica de la expresión de PDX-1 en células  $\beta$  aisladas fue la heterogeneidad en la expresión de esta proteína por célula. La glucosa alta y el NGF aumentaron el número de células con mayor expresión de PDX-1.

La heterogeneidad funcional de las células  $\beta$  aisladas ha sido descrita previamente e incluye: la biosíntesis de insulina dependiente de glucosa (**21**), la secreción de insulina, en donde se reportó la existencia de subpoblaciones cuya secreción es modulada por la glucosa (**105**) y en preparaciones de células  $\beta$  purificadas (**153**) que también se reportó la existencia de diferencias intercelulares en la actividad secretora.

Se ha demostrado que el NGF también modula el comportamiento de las subpoblaciones funcionales de células  $\beta$  (**132**), esto es, aumenta la proporción de células que secretan la mayor proporción de insulina en concentraciones de glucosa estimuladora y no estimuladora.

La asociación entre la modulación del NGF sobre la localización subcelular de PDX-1 y la posible participación en la secreción de insulina potenciada por el NGF, podría deberse a que existen evidencias de que PDX-1 además de ser un factor clave en la regulación de la expresión del gen de insulina, también tiene un papel en la secreción de insulina, como se explica a continuación.

Las mutaciones en PDX-1 ó una disminución en su expresión, causan una desregulación en la función de las células  $\beta$  y el desarrollo de diabetes tipo 2 en humanos y en modelos en ratones (**41, 42, 44, 154, 155**).

En humanos con una mutación en un alelo de PDX-1, la secreción de insulina está afectada (**156**), lo que sucede también en un modelo de ratón con inactivación específica de células  $\beta$  de PDX-1(**44**). En ratones heterocigotos con un alelo inactivado de PDX-1, cuyo contenido de insulina pancreática es normal, presentan una secreción de insulina estimulada por glucosa reducida, así como a KCl, lo que sugiere que la secreción de insulina independiente de glucosa, es también dependiente de PDX-1 (**157**).

Recientemente se encontró que PDX-1 regula positivamente la transcripción del gen de sinaptotagmina 1, que es una proteína sensora  $Ca^{2+}$  y que ejerce un papel central en la exocitosis de insulina, por lo que PDX-1 puede contribuir a la secreción de esta hormona por medio de la regulación de la expresión de sinaptotagmina 1 (**158**). Por medio de análisis de la expresión génica por microarreglos en islotes de rata, se encontró que PDX-1 juega un papel esencial en la regulación del metabolismo mitocondrial, ya que la desregulación lleva a una disminución en la generación de ATP que está ligado a una secreción de insulina inducida por glucosa disminuida (**159**).

Así mismo, en células INS-1, en las cuales se suprimió la expresión de PDX-1, disminuyó el procesamiento de la proinsulina y la secreción de insulina **(160)**.

En conclusión, el presente trabajo indica que a corto plazo el NGF mantiene la expresión del RNAm de insulina y regula la localización subcelular de PDX-1, lo que en conjunto podría contribuir a la potenciación de la secreción de insulina estimulada por glucosa.

La insulina y el NGF secretados en respuesta a la glucosa, tienen un importante papel de retroalimentación autocrino en la fisiología de las células  $\beta$  pancreáticas **(128, 136, 161 - 163)**. Por lo que, una desregulación en la función de alguno ó ambos factores en las células  $\beta$  podría contribuir negativamente al desarrollo de la diabetes tipo 2.

## IX. CONCLUSIONES

De lo expuesto en el presente trabajo, se pueden obtener las siguientes conclusiones:

El NGF exógeno potencia la secreción de insulina de células  $\beta$  aisladas de rata adulta en condiciones basales y estimuladas con glucosa después de 3 y 6 h de exposición. A estos tiempos experimentales, el tratamiento con NGF no modifica significativamente la cantidad del RNAm de insulina en ninguna de las concentraciones de glucosa. En tanto que la cantidad del RNAm de PDX-1 aumenta en células control en concentración de glucosa de 15.6 mM, comparado con el control en baja glucosa a 6 h de exposición. Aunque el tratamiento con NGF no modifica este RNAm, el efecto de la concentración de glucosa se mantiene.

Al bloquear la señalización autocrina del NGF con el K252a, la secreción de insulina después de 3 h de incubación, no se modifica significativamente en ninguna concentración de glucosa. Sin embargo, la cantidad del RNAm de insulina disminuye en 15.6mM de glucosa. Al analizar la secreción de insulina en células  $\beta$  aisladas cultivadas a una densidad menor, el tratamiento con un anticuerpo neutralizante del NGF disminuye la insulina secretada con respecto a las células control en alta glucosa.

A 15 minutos y 6 h de incubación, la expresión de PDX-1 en el núcleo así como en el citoplasma tienen una relación directa bajo todos los estímulos. El tratamiento con 15.6 mM de glucosa aumenta la proporción de células con mayor expresión de PDX-1 con respecto a las células incubadas con 5.6 mM de glucosa. El tratamiento con NGF en 5.6 mM de glucosa aumenta la proporción de células con una mayor expresión de PDX-1 con respecto a las células incubadas sólo con glucosa. El tratamiento con NGF en 15.6 mM glucosa, aumenta marcadamente la expresión de PDX-1 con respecto a las células incubadas sólo con glucosa, después de 6 h de estimulación.

Finalmente, la modulación de la localización subcelular de PDX-1 por el NGF probablemente preceda a la biosíntesis de insulina a nivel transcripcional, aunque también pudiera estar relacionado a la potenciación de la secreción de insulina dependiente de glucosa inducida por el NGF.

## **X. PERSPECTIVAS**

Identificar por medio de estudios de expresión del genoma por microarreglos, los genes cuya expresión pueda ser modulada por el NGF en células  $\beta$  aisladas.

Determinar el mecanismo de transducción de señales del NGF en la regulación del nivel de RNAm de insulina así como en el aumento de la expresión de PDX-1 en el núcleo y citoplasma de células  $\beta$  aisladas.

Analizar si el aumento de la expresión de PDX-1 en el núcleo y citoplasma por el NGF implica la síntesis de novo de la proteína ó si esta es necesaria para el aumento en su expresión en células  $\beta$  aisladas.

Evaluar si efectivamente el aumento de la expresión de PDX-1 en el núcleo y citoplasma inducido por NGF participa y de qué manera en la secreción de insulina dependiente de glucosa potenciada por el NGF en células  $\beta$  aisladas.

## XI. REFERENCIAS

- (1) Edlund, H. (2002) Pancreatic organogenesis - developmental mechanisms and implications for therapy. *Nature Rev. Genet.* 3: 524-532.
- (2) Peters, J. *et al.* (2000) Ontogeny, differentiation and growth of the endocrine pancreas. *Virchows Arch.* 436: 527-538.
- (3) Kim, S. K. & Hebrok, M. (2001) Intercellular signals regulating pancreas development and function. *Genes & Dev.* 15: 111-127.
- (4) Pipeleers, D. *et al.* (1992) Morphology of the pancreatic  $\beta$ -cell. In *Insulin, Molecular Biology to Pathology.* (Ashcroft, F. M., & Ashcroft, S. J. H. eds.) p. 3-31, *Oxford University Press.*
- (5) Kulkarni, R. N. (2004) The islet  $\beta$ -cell. *Int. J. Biochem. & Cell Biol.* 36: 365-367.
- (6) Saltiel, A. R. (1996) Diverse signaling pathways in the cellular actions of insulin. *Am. J. Physiol.* 270: E375-E385.
- (7) Campbell, I. L. *et al.* (1982) Insulin biosynthesis and its regulation. *Clin. Sci.* 62: 449-455.
- (8) Steiner, D. F. *et al.* (1985) Structure and evolution of the insulin gene. *Ann. Rev. Genet.* 19: 463-484.
- (9) Bailyes, E. M. *et al.* (1992) Insulin synthesis. In *Insulin, Molecular Biology to Pathology.* (Ashcroft, F. M., & Ashcroft, S. J. H. eds.) p. 64-92, *Oxford University Press.*
- (10) De Meyts, P. (2004) Insulin and its receptor: structure, function and evolution. *BioEssays.* 26: 1351-1362.
- (11) Clark, A. R. & Docherty, K. (1992) The insulin gene. In *Insulin, Molecular Biology to Pathology.* (Ashcroft, F. M., & Ashcroft, S. J. H. eds.) p. 35-63, *Oxford University Press.*
- (12) Lomedico, P. *et al.* (1979) The structure and evolution of the two nonallelic rat preproinsulin genes. *Cell.* 18: 545-558.
- (13) Soares, M. B. *et al.* (1985) RNA-mediated gene duplication: the rat preproinsulin I gene is a functional retroposon. *Mol. Cell. Biol.* 5: 2090-2103.
- (14) German, M. *et al.* (1995) The insulin gene promoter. *Diabetes.* 44: 1002-1004.
- (15) Ohneda, K. *et al.* (2000) Regulation of insulin gene transcription. *Cell & Dev. Biol.* 11: 227-233.
- (16) Lodish, H. *et al.* (2000). *Molecular Cell Biology.* p. 691-726. 4a. ed., *W. H. Freeman and Company.*
- (17) Goodge, K. A. & Hutton, J. C. (2000) Translational regulation of proinsulin biosynthesis and proinsulin conversion in the pancreatic  $\beta$  cell. *Cell & Dev. Biol.* 11: 235-243.
- (18) Steiner, D. F. *et al.* (2001) Biosynthesis of insulin. In "Handbook of Physiology, Section 7, The Endocrine System, Vol. II, The Endocrine Pancreas and Regulation of metabolism". (Jefferson, L. S. and Cherrington, A. D. eds.), pp. 49-78, *Oxford University Press.*
- (19) Permutt, M. A. & Kipnis, D. M. (1972) Insulin biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 247: 1194-1199.
- (20) Welsh, M. *et al.* (1986) Translational control of insulin biosynthesis. *Biochem. J.* 235: 459-467.
- (21) Schuit, F. C. *et al.* (1988) Glucose stimulates proinsulin biosynthesis by a dose - dependent recruitment of pancreatic beta cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 3865-

- 3869.
- (22) Melloul, D. *et al.* (2002) Regulation of insulin gene transcription. *Diabetologia*. 45: 309-326.
  - (23) Gittes, G. K. & Rutter, W. J. (1992) Onset of cell-specific gene expression in the developing mouse pancreas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89: 1128-1132.
  - (24) Docherty, K. & Clark, A. R. (1994) Nutrient regulation of insulin gene expression. *FASEB J*. 8: 20-27.
  - (25) Sharma, A. *et al.* (1997) Analysis of the role of E2A - encoded proteins in insulin gene transcription. *Mol. Endocrinol.* 11: 1608-1617.
  - (26) Naya, F. J. *et al.* (1997) Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/NeuroD – deficient mice. *Genes & Dev.* 11: 2323 - 2334.
  - (27) Stein, R. (2001) Insulin gene transcription: factors involved in cell type-specific and glucose-regulated expression in islet cells are also essential during pancreatic development. In "Handbook of Physiology, Section 7, The Endocrine System, Vol. II, The Endocrine Pancreas and Regulation of metabolism". (Jefferson, L. S. and Cherrington, A. D. eds.), pp. 25-47, *Oxford University Press*.
  - (28) Sosa-Pineda, B. *et al.* (1997) The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing  $\beta$  cells in the mammalian pancreas. *Nature*. 386: 399-402.
  - (29) Olbrot, M. *et al.* (2002) Identification of  $\beta$ -cell-specific insulin gene transcription factor RIPE3b1 as mammalian MafA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101: 2930-2933.
  - (30) Matsuoka, T. *et al.* (2004) The MafA transcription factor appears to be responsible for tissue-specific expression of insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 3865-3869.
  - (31) Clark, A. R. *et al.* (1993) Human insulin gene enhancer-binding proteins in pancreatic  $\alpha$  and  $\beta$  cell lines. *FEBS Letters*. 329: 139-143.
  - (32) Ohlsson, H. *et al.* (1993) IPF1, a homeodomain-containing transactivator of the insulin gene. *EMBO J*. 12: 4251-4259.
  - (33) Mashak, S. *et al.* (1996) Purification of the  $\beta$ -cell glucose-sensitive factor that transactivates the insulin gene differentially in normal and transformed islet cells. *Biochemistry*. 93: 15057-15062.
  - (34) Guz, Y. *et al.* (1995) Expression of murine STF-1, a putative insulin gene transcription factor, in  $\beta$  cells of pancreas, duodenal epithelium and pancreatic exocrine and endocrine progenitors during ontogeny. *Development*. 121: 11-18.
  - (35) Lu, M. *et al.* (1996) Functional regions of the homeodomain protein IDX-1 required for transactivation of the rat somatostatin gene. *Endocrinology*. 137: 2959-2967.
  - (36) Peshavaria, M. *et al.* (1994) XIHbox 8, an endoderm-specific *Xenopus* homeodomain protein, is closely related to a mammalian insulin gene transcription factor. *Mol. Endocrinol.* 8: 806-816.
  - (37) Serup, P. *et al.* (1995) The homeodomain protein IPF-1/STF-1 is expressed in a subset of islet cells and promotes rat insulin 1 gene expression dependent on an intact E1 helix-loop-helix factor binding site. *Biochem. J*. 310: 997-1003.
  - (38) Jonsson, J. *et al.* (1994) Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature*. 371: 606-609.
  - (39) Stoffers, D. A. *et al.* (1997) Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence. *Nature Genet.* 15: 106-110.

- (40) Wang, H. *et al.* (2001) Pdx1 level defines pancreatic gene expression pattern and cell lineage differentiation. *J. Biol. Chem.* 276: 25279-25286.
- (41) Stoffers, D. A. *et al.* (1997) Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1. *Nature Genet.* 17: 138-139.
- (42) Macfarlane, W. M. *et al.* (1999) Missense mutations in the insulin promoter factor-1 gene predispose to type 2 diabetes. *J. Clin. Invest.* 104: R33-R39.
- (43) Melloul, D. (2004) Transcription factors in islet development and physiology. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1014: 28-37.
- (44) Ahlgren, U. *et al.* (1998)  $\beta$ -cell-specific inactivation of the mouse *Ipf1/Pdx1* gene results in loss of the  $\beta$ -cell phenotype and maturity onset diabetes. *Genes & Dev.* 12: 1763-1768.
- (45) Johnson, J. D. *et al.* (2003) Increased islet apoptosis in *Pdx1*<sup>+/-</sup> mice. *J. Clin. Invest.* 111: 1147-1160.
- (46) Peshavaria, M. *et al.* (1997) Functional characterization of the transactivation properties of the PDX-1 homeodomain protein. *Mol. Cell. Biol.* 17: 3987-3996.
- (47) McKinnon, C. M. & Docherty, K. (2001) Pancreatic duodenal homeobox-1, PDX-1, a major regulator of beta cell identity and function. *Diabetologia.* 44: 1203-1214.
- (48) Stoffel, M. *et al.* (1995) Localization of human homeodomain transcription factor insulin promoter factor 1 (IPF1) to chromosome band 13q12.1. *Genomics.* 28: 125-126.
- (49) Sharma, S. *et al.* (1996) Pancreatic islet expression of the homeobox factor STF-1 relies on an E-box motif that binds USF. *J. Biol. Chem.* 271: 2294-2299.
- (50) Marshak, S. *et al.* (2000) Functional conservation of regulatory elements in the *pdx-1* gene: PDX-1 and hepatocyte nuclear factor 3 $\beta$  transcription factors mediate  $\beta$ -cell-specific expression. *Mol. Cell. Biol.* 20: 7583-7590.
- (51) Gerrish, K. *et al.* (2001) The role of hepatic nuclear factor 1 $\alpha$  and PDX-1 in transcriptional regulation of the *pdx-1* gene. *J. Biol. Chem.* 276: 47775-47784.
- (52) Lee, C. S. *et al.* (2002) *Foxa2* controls *Pdx-1* gene expression in pancreatic  $\beta$ -cells in vivo. *Diabetes.* 51: 2546-2551.
- (53) Gerrish, K. *et al.* (2004) Conserved transcriptional regulatory domains of the *pdx-1*. *Mol. Endocrinol.* 18: 533-548.
- (54) Melloul, D. *et al.* (2002) Regulation of *pdx-1* gene expression. *Diabetes.* 51: S320-S325.
- (55) Sussel, L. *et al.* (1998) Mice lacking the homeodomain transcription factor *Nkx2.2* have diabetes due to arrested differentiation of pancreatic  $\beta$ -cells. *Development.* 125: 2213-2221.
- (56) Schwitzgebel, V. M. *et al.* (2000) Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas. *Development.* 127: 3533-3542.
- (57) Jensen, J. *et al.* (1996) mRNA profiling of rat islet tumors reveal *Nkx6.1* as a  $\beta$ -cell-specific homeodomain transcription factor. *J. Biol. Chem.* 271: 18749-18758.
- (58) Cissell, M. A. *et al.* (2003) Transcription factor occupancy of the insulin gene in vivo. *J. Biol. Chem.* 278: 751-756.
- (59) Odagiri, H. *et al.* (1996) Function of the human insulin promoter in primary cultured islet cells. *J. Biol. Chem.* 271: 1909-1915.
- (60) Glick, E. *et al.* (2000) Transcription factor BETA2 acts cooperatively with E2A and PDX1 to activate the insulin gene promoter. *J. Biol. Chem.* 275: 2199-2204.

- (61) Zhao, L. *et al.* (2005) The islet  $\beta$  cell-enriched MafA activator is a key regulator of insulin gene transcription. *J. Biol. Chem.* 280: 11887-11894.
- (62) Chakrabarti, S. K. *et al.* (2003) Covalent histone modifications underlie the developmental regulation of insulin gene transcription in pancreatic  $\beta$  cells. *J. Biol. Chem.* 278: 23617-23623.
- (63) Nielsen, D. A. *et al.* (1985) Control of insulin gene expression in pancreatic  $\beta$  cells and in an insulin-producing cell line, RIN-5F cells. *J. Biol. Chem.* 260: 13585-13589.
- (64) Welsh, M. *et al.* (1985) Control of insulin gene expression in pancreatic  $\beta$  cells and in an insulin-producing cell line, RIN-5F cells. *J. Biol. Chem.* 260: 13590-13594.
- (65) Hammonds, P. *et al.* (1987) Glucose regulates proinsulin messenger RNA levels in a clonal cell line of simian virus 40-transformed B cells. *FEBS Letters.* 213: 149-154.
- (66) Hammonds, P. *et al.* (1987) Regulation and specificity of glucose-stimulated insulin gene expression in human islets of Langerhans. *FEBS Letters.* 223: 131-137.
- (67) German, M. S. *et al.* (1990) Regulation of insulin gene expression by glucose and calcium in transfected primary islet cultures. *J. Biol. Chem.* 265: 22063-22066.
- (68) Efrat, S. *et al.* (1991) Glucose induces insulin gene transcription in a murine pancreatic  $\beta$ -cell line. *J. Biol. Chem.* 266: 11141-11143.
- (69) Leibiger, B. *et al.* (1998) Short-term regulation of insulin gene transcription by glucose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 9307-9312.
- (70) Leibiger, I. B. *et al.* (1998) Exocytosis of insulin promotes insulin gene transcription via the insulin receptor/PI-3 kinase/p70 s6 kinase and CaM kinase pathways. *Mol. Cell.* 1: 933-938.
- (71) Leibiger, B. *et al.* (2000) Glucose-stimulated insulin biosynthesis depends on insulin-stimulated insulin gene transcription. *J. Biol. Chem.* 275: 30153-30156.
- (72) Leibiger, B. *et al.* (2001) Selective insulin signaling through A and B insulin receptors regulates transcription of insulin and glucokinase genes in pancreatic  $\beta$  cells. *Mol. Cell.* 7: 559-570.
- (73) Leibiger, B. *et al.* (2002) Short-term regulation of insulin gene transcription. *Biochem. Soc. Trans.* 30: 312-317.
- (74) Kennedy, H. J. *et al.* (1999) Glucose enhances insulin promoter activity in MIN6  $\beta$ -cells independently of changes in intracellular  $Ca^{2+}$  concentration and insulin secretion. *Biochem. J.* 342: 275-280.
- (75) Tillmar, L. *et al.* (2002) Control of insulin mRNA stability in rat pancreatic islets. *J. Biol. Chem.* 277: 1099-1106.
- (76) Leibowitz, G. *et al.* (2002) Glucose-regulated proinsulin gene expression is required for adequate insulin production during chronic glucose exposure. *Endocrinology.* 143: 3214-3220.
- (77) Leibowitz, G. *et al.* (2003) Insulin does not mediate glucose stimulation of proinsulin biosynthesis. *Diabetes.* 52: 998-1003.
- (78) Wang, J. *et al.* (1997) Regulation of insulin preRNA splicing by glucose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 4360-4365.
- (79) Mosley, A. L. & Özcan, S. (2003) Glucose regulates insulin gene transcription by hyperacetylation of histone H4. *J. Biol. Chem.* 278: 19660-19666.
- (80) Macfarlane, W. M. *et al.* (1994) Glucose modulates the binding activity of the  $\beta$ -cell transcription factor IIIF1 in a phosphorylation dependent manner. *Biochem. J.* 302: 625

- transcription factor IUF1 in a phosphorylation-dependent manner. *Biochem. J.* 303: 625-631.
- (81) Macfarlane, W. M. *et al.* (1997) The p38/reactivating kinase mitogen-activated protein kinase cascade mediates the activation of the transcription factor insulin upstream factor 1 and insulin gene transcription by high glucose in pancreatic  $\beta$ -cells. *J. Biol. Chem.* 272: 20936-20944.
  - (82) Petersen, H. V. *et al.* (1998) Glucose stimulates the activation domain potential of the PDX-1 homeodomain transcription factor. *FEBS Letters.* 431: 362-366.
  - (83) Rafiq, I. *et al.* (1998) Glucose-dependent translocation of insulin promoter factor-1 (IPF-1) between the nuclear periphery and the nucleoplasm of single MIN6  $\beta$ -cells. *J. Biol. Chem.* 273: 23241-23247.
  - (84) Rafiq, I. *et al.* (2000) Glucose-stimulated preproinsulin gene expression and nuclear translocation of pancreatic duodenum homeobox-1 require activation of phosphatidylinositol 3-kinase but not p38 MAPK/SAPK2. *J. Biol. Chem.* 275: 15977-15984.
  - (85) Macfarlane, W. M. *et al.* (1999) Glucose stimulates translocation of the homeodomain transcription factor PDX-1 from the cytoplasm to the nucleus in pancreatic  $\beta$ -cells. *J. Biol. Chem.* 274: 1011-1016.
  - (86) Wu, H. *et al.* (1999) Insulin stimulates pancreatic-duodenal homeobox factor-1 (PDX-1) DNA-binding activity and insulin promoter activity in pancreatic  $\beta$  cells. *Biochem. J.* 344: 813-818.
  - (87) Macfarlane, W. M. *et al.* (2000) Glucose modulation of insulin mRNA levels is dependent on transcription factor PDX-1 and occurs independently of changes in intracellular  $Ca^{2+}$ . *Diabetes.* 49: 418-423.
  - (88) Elrick, L. J. & Docherty, K. (2001) Phosphorylation - dependent nucleocytoplasmic shuttling of pancreatic duodenal homeobox-1. *Diabetes.* 50: 2244-2252.
  - (89) Ashcroft, F. M. & Ashcroft, S. J. H. (1992) Mechanism of insulin secretion. In *Insulin, Molecular Biology to Pathology.* (Ashcroft, F. M., & Ashcroft, S. J. H. eds.) p. 95-150, *Oxford University Press.*
  - (90) Hinke, S. A. *et al.* (2004) Plasticity of the  $\beta$  cell insulin secretory competence: preparing the pancreatic  $\beta$  cell for the next meal. *J. Physiol.* 558: 369-380.
  - (91) Ahrén, B. (2000) Autonomic regulation of islet hormone secretion - implications for health and disease. *Diabetologia.* 43: 393-412.
  - (92) Shepherd, P. R. & Kahn, B. B. (1999) Glucose transporters and insulin action. *N. Engl. J. Med.* 341: 248-257.
  - (93) German, M. S. (1993) Glucose sensing in pancreatic islet beta cells: the key role of glucokinase and the glycolytic intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 1781-1785.
  - (94) Matschinsky, F. M. (1996) A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes.* 45: 223-241.
  - (95) Maechler, P. & Wollheim, C. B. (2001) Mitochondrial function in normal and diabetic  $\beta$ -cells. *Nature.* 414: 807-812.
  - (96) Nelson, D. L. & Cox, M. M. (2000) Glycolysis and the catabolism of hexoses. In *Lehninger Principles of Biochemistry* (Nelson, D. L. y Cox, M. M. eds.) p. 527-566, *Worth Publishers,* 3a. Ed.
  - (97) Ashcroft, F. M. *et al.* (1984) Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic  $\beta$ -cells. *Nature* 312: 446-448.

- (98) Cruz-Cruz, R. *et al.* (2005) A thapsigargin-sensitive cationic current leads to membrane depolarization, calcium entry and insulin secretion in rat pancreatic beta cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 289: E439-E445.
- (99) Mears, D. (2004) Regulation of insulin secretion in islets of Langerhans by  $Ca^{2+}$  channels. *J. Membr. Biol.* 200: 57-66.
- (100) Hiriart, M. & Matteson, D. R. (1988)  $Na^+$  channels and two types of  $Ca^{2+}$  channels in rat pancreatic  $\beta$  cells identified with the reverse hemolytic plaque assay. *J. Gen. Physiol.* 91:617-639.
- (101) Vidaltamayo, R. *et al.* (2002) Nerve growth factor increases sodium channel expression in pancreatic  $\beta$  cells: implications for insulin secretion. *FASEB J.* 16: 891-892.
- (102) Rosario, L. M. *et al.* (1993) Bursting electrical activity in pancreatic beta-cells: evidence that the channel underlying the burst is sensitive to  $Ca^{2+}$  influx through L-type  $Ca^{2+}$  channels. *Pflugers. Arch.* 424: 439-447.
- (103) Rorsman, P. *et al.* (2000) The cell physiology of biphasic insulin secretion. *News Physiol. Sci.* 15: 72-77.
- (104) Pørksen, N. (2002) The in vivo regulation of pulsatile insulin secretion. *Diabetologia.* 45: 3-20.
- (105) Hiriart, M. & Ramirez-Medeles, C. (1991) Functional subpopulations of individual pancreatic B-cells in culture. *Endocrinology.* 128: 3193-3198.
- (106) Levi-Montalcini, R. (1987) The Nerve Growth Factor 35 years later. *Science.* 237: 1154-1162.
- (107) Chao, M. V. (2003) Neurotrophin and their receptors: a convergence point for many signaling pathways. *Nature Rev. Neurosci.* 4: 299-309.
- (108) Snider, W. D. (1994) Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us. *Cell.* 77: 627-638.
- (109) McDonald, N. Q. *et al.* (1991) New protein fold revealed by a 2.3-Å resolution crystal structure of nerve growth factor. *Nature.* 354: 411-414.
- (110) Bax, B. *Et al.* (1997) Structure of mouse 7S NGF: a complex of nerve growth factor with four binding proteins. *Structure.* 5: 1275-1285.
- (111) Wiesmann, C. & de Vos, A. M. (2001) Nerve growth factor: structure and function. *Cell. Mol. Life Sci.* 58: 748-759.
- (112) Wiesmann, C. *et al.* (1999) Crystal structure of nerve growth factor in complex with the ligand-binding domain of the TrkA receptor. *Nature.* 401: 184-188.
- (113) Holden, P. H. *et al.* (1997) Immunoglobulin-like domains define the nerve growth factor binding site of the TrkA receptor. *Nature Biotechnol.* 15: 668-672.
- (114) Patapoutian, A. & Reichardt, L. F. (2001) Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11: 272-280.
- (115) Klesse, L. J. & Parada, L. F. (1999) Trks: signal transduction and intracellular pathways. *Microsc. Res. Tech.* 45: 210-216.
- (116) He, X. (2004) Structure of nerve growth factor complexed with the shared neurotrophin receptor p75. *Science.* 304: 870-875.
- (117) Lee, F. S. *et al.* (2001) The uniqueness of being a neurotrophin receptor. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11: 281-286.
- (118) Majdan, M. & Miller, F. D. (1999) Neuronal life and death decisions: functional antagonism between the Trk and p75 neurotrophin receptors. *Int. J. Devl. Neurosci.* 17: 153-161.
- (119) Chao, M. *et al.* (1998) Neurotrophin receptors: mediators of life and death. *Brain Res. Reviews.* 26: 295-301.

- (120) Casaccia-Bonnenfil, P. *et al.* (1999) p75 neurotrophin receptor as a modulator of survival and death decisions. *Microsc. Res. Tech.* 45: 217-224.
- (121) Mamidipudi, V. & Wooten M. V. (2002) Dual role for p75<sup>NTR</sup> signaling in survival and cell death: can intracellular mediators provide an explanation? *J. Neurosci. Res.* 68: 373-384.
- (122) Torcia, M. *et al.* (1996) Nerve growth factor is an autocrine survival factor for memory B lymphocytes. *Cell.* 85: 345-356.
- (123) Frade, J. M. & Barde Y.-A. (1998) Nerve growth factor: two receptors, multiple functions. *BioEssays.* 20: 137-145.
- (124) Peeraully, M. R. *et al.* (2004) NGF gene expression and secretion in white adipose tissue: regulation in 3T3-L1 adipocytes by hormones and inflammatory cytokines. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 287: E331-E339.
- (125) Scharfmann, R. *et al.* (1993) Expression of functional nerve growth factor receptors in pancreatic  $\beta$  cell lines and fetal rat islets in primary culture. *Diabetes.* 42: 1829-1836.
- (126) Kanaka-Gantenbein, C. *et al.* (1995) Presence of nerve growth factor and its receptors in an *in vitro* model of islet cell development: implication in normal islet morphogenesis. *Endocrinology.* 136: 3154-3162.
- (127) Miralles, F. *et al.* (1998) Expression of nerve growth factor and its high-affinity receptor Trk-A in the rat pancreas during embryonic and fetal life. *J. Endocrinol.* 156: 431-439.
- (128) Rosenbaum, T. *et al.* (1998) Pancreatic  $\beta$  cells synthesize and secrete nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 7784-7788.
- (129) Vidaltamayo, R. *et al.* (2003) Expression of nerve growth in human pancreatic  $\beta$  cells. *Growth Factors.* 21: 103-107.
- (130) Pierucci, D. *et al.* (2001) NGF-withdrawal induces apoptosis in pancreatic beta cells in vitro. *Diabetologia.* 44: 1281-1295.
- (131) Vidaltamayo, R. *et al.* (1996) Neuron-like phenotypic changes in pancreatic  $\beta$ -cells induced by NGF, FGF, and dbcAMP. *Endocrine.* 4: 19-26.
- (132) Rosenbaum, T. *et al.* (2001) Nerve growth factor increases insulin secretion and barium current in pancreatic  $\beta$ -cells. *Diabetes.* 50: 1755-1762.
- (133) Frödin, M. *et al.* (1995) Glucose, other secretagogues, and nerve growth factor stimulate mitogen-activated protein kinase in the insulin-secreting  $\beta$ -cell line, INS-1. *J. Biol. Chem.* 270: 7882-7889.
- (134) Rosenbaum, T. *et al.* (1996) Nerve growth factor increases sodium current in pancreatic  $\beta$  cells. *J. Membr. Biol.* 153: 53-58.
- (135) Rosenbaum, T. *et al.* (2002) Nerve growth factor increases L-type calcium current in pancreatic  $\beta$  cells in culture. *J. Membr. Biol.* 186: 1-8.
- (136) Navarro-Tableros, V. *et al.* (2004) Autocrine regulation of single pancreatic  $\beta$ -cell survival. *Diabetes.* 53: 2018-2023.
- (137) Reimer, M. K. *et al.* (2003) Local growth factors are beneficial for the autonomic reinnervation of transplanted islets in rats. *Pancreas.* 26: 392-397.
- (138) González del Pliego, M. *et al.* (2001) Ultrastructural changes in pancreatic beta cells treated with NGF and dbcAMP. *Cell. Tissue. Res.* 305: 365-378.
- (139) Fiordeliso, T. & Hernández-Cruz, A. (2002) Oestrogen regulates neurofilament expression in a subset of anterior pituitary cells of the adult female rat. *J. Neuroendocrinol.* 14: 411-424.

- (140) Tapley, P. *et al.* (1992) K252a is a selective inhibitor of the tyrosine protein kinase activity of the *trk* family of oncogenes and neurotrophin receptors. *Oncogene*. 7: 371-381.
- (141) Ohmichi, M. *et al.* (1992) Inhibition of the cellular actions of nerve growth factor by staurosporine and K252A results from the attenuation of the activity of the *trk* tyrosine kinase. *Biochemistry*. 31: 4034-4039.
- (142) Giddings, S. J. *et al.* (1993) Hypoglycemia but not hyperglycemia induces rapid changes in pancreatic  $\beta$ -cell gene transcription. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 265: E259-E266.
- (143) Philippe, J. *et al.* (1994) Insulin gene transcription is decreased rapidly by lowering glucose concentrations in rat islet cells. *Diabetes*. 43: 523-528.
- (144) Aspinwall, C. A. *et al.* (1999) Insulin-stimulated insulin secretion in single pancreatic beta cells. *J. Biol. Chem.* 274: 6360-6365.
- (145) Srivastava, S. & Goren, H. J. (2003) Insulin constitutively secreted by  $\beta$ -cells is necessary for glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes*. 52: 2049-2056.
- (146) Saltiel, A. R. & Kahn, R. (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 414: 799-806.
- (147) Miranda, C. *et al.* (2001) IRS-1 and IRS-2 are recruited by TrkA receptor and oncogenic TRK-T1. *J. Cell. Physiol.* 186: 35-46.
- (148) Yamada, M. *et al.* (1997) Insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2 are tyrosine-phosphorylated and associated with phosphatidylinositol 3-kinase in response to brain-derived neurotrophic factor in cultured cerebral cortical neurons. *J. Biol. Chem.* 272: 30334-30339.
- (149) Campbell, S. C. & Macfarlane, W. M. (2002) Regulation of the *pdx-1* gene promoter in pancreatic  $\beta$ -cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 299: 277-284.
- (150) Buteau, J. *et al.* (1999) Glucagon-like peptide-1 promotes DNA synthesis, activates phosphatidylinositol 3-kinase and increases transcription factor pancreatic and duodenal homeobox gene 1 (PDX-1) DNA binding activity in beta (INS-1)-cells. *Diabetologia*. 42: 856-864.
- (151) Gao, Y. *et al.* (2003) The transcription factor PDX-1 is post-translationally modified by O-linked N-acetylglucosamine and this modification is correlated with its DNA binding activity and insulin secretion in min6  $\beta$ -cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 415: 155-163.
- (152) Kishi, A. *et al.* (2003) Sumoylation of Pdx-1 is associated with its nuclear localization and insulin gene activation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 284: E830-E840.
- (153) Van Schravendijk, C. F. H. *et al.* (1992) Pancreatic  $\beta$  cell heterogeneity in glucose-induced insulin secretion. *J. Biol. Chem.* 267: 21344-21348.
- (154) Brissova, M. *et al.* (2005) Reduced PDX-1 expression impairs islet response to insulin resistance and worsens glucose homeostasis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 288: E707-E714.
- (155) Kulkarni, R. N. *et al.* (2004) PDX-1 haploinsufficiency limits the compensatory islet hyperplasia that occurs in response to insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 114: 828-836.
- (156) Clocquet, A. R. *et al.* (2000) Impaired insulin secretion and increased insulin sensitivity in familial maturity-onset diabetes of the young 4 (insulin promoter factor 1 gene). *Diabetes*. 49: 1856-1864.
- (157) Brissova, M. *et al.* (2002) Reduction in pancreatic transcription factor PDX-1 impairs glucose-stimulated insulin secretion. *J. Biol. Chem.* 277: 11225-11232.
- (158) Nakajima-Nagata, N. *et al.* (2004) Pdx-1 enables insulin secretion by regulating *svantopterin 1* gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 318: 631-635.

- synaptotagmin 1 gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 318: 631-635.
- (159) Gauthier, B. R. *et al.* (2004) Oligonucleotide microarray analysis reveals PDX-1 as an essential regulator of mitochondrial metabolism in rat islets. *J. Biol. Chem.* 379: 31121-31130.
- (160) Wang, H. *et al.* (2005) Suppression of Pdx-1 perturbs proinsulin processing, insulin secretion and GLP-1 signalling in INS-1 cells. *Diabetologia.* 48: 720-731.
- (161) Kulkarni, R. N. *et al.* (1999) Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic  $\beta$  cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. *Cell.* 96: 329-339.
- (162) Leibiger, I. B. *et al.* (2002) Insulin feedback action on pancreatic  $\beta$ -cell function. *FEBS Letters.* 532: 1-6.
- (163) Larrieta, M. E. *et al.* (2006) Nerve growth factor increases in pancreatic  $\beta$  cells after streptozotocin-induced damage in rats. *Exp. Biol. Med.* 231: 396-402.