



Universidad Nacional Autónoma de México

**Instituto de Fisiología Celular
Departamento de Biofísica**

**Efectos tróficos del factor de crecimiento
neuronal en la maduración de la actividad
eléctrica de la célula beta pancreática**

T E S I S

Que presenta:

Victor Manuel Navarro Tableros

Para obtener el grado de Doctor en Ciencias

Directora de tesis: Dra. Marcia Hiriart Urdanivia

Ciudad Universitaria, México D. F.
2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Esta tesis fue realizada en el departamento de Biofísica del Instituto de Fisiología Celular, UNAM; bajo la dirección de la Dra. Marcia Hiriart Urdanivia. Fue apoyada por los donativos de CONACYT D38822-Q, DGAPA 203903 y de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México SDI.PTID.05.6 y por una beca de Doctorado de CONACYT.

Algunos de los resultados se encuentran publicados en:

Victor Navarro-Tableros, Tatiana Fiordeliso, Arturo Hernández-Cruz and Marcia Hiriart. Physiological development of insulin secretion, calcium channels and GLUT2 expression of pancreatic rat β -cells. (2007). *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 292: E1018-E1029.

Otros resultados se encuentran en preparación para ser publicados:

Navarro-Tableros V., Fiordeliso T., Hernández-Cruz A., and Hiriart M.
Nerve Growth Factor promotes maturation of rat beta cells.

Los resultados de algunos experimentos realizados en paralelo se encuentran publicados en:

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

Agradecimientos

A la Dra. Marcia Hiriart Urdanivia por su confianza y por enseñarme a ser crítico.

A la Dra. Leticia Verdugo y al Dr. Arturo Hernández por su apoyo, crítica y sugerencias valiosos para la realización de este trabajo.

A la Dra. Tatiana Fiordelisio y Mariana por su apoyo técnico y amistad.

A Carmen Sánchez por su apoyo técnico.

A los departamentos de biología molecular, histología, computo, microscopia y biblioteca por su valiosa ayuda.

A la Dra. Claudia Rivera y el Dr. Héctor Malagón del Bioterio por facilitarme los animales necesarios para el trabajo experimental.

A Sara, Angélica, Zenaida y a todo el personal administrativo por su apoyo.

A Félix Sierra por su ayuda técnica y por tener siempre el material necesario para el trabajo experimental.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo atorgado.

Con todo cariño, respeto y gratitud:

A mi madre Celia quien me ha enseñado a luchar por lo que deseo y no darme por vencido; por apoyar y alentarme a lograr una más de mis metas en la vida.

A mi padre Victor Navarro[†], esperando que donde quiera que se encuentre esté orgulloso.

A mis hermanos Guadalupe, Sabrina, Miguel, Irving y Belem quienes me incitan a seguir adelante.

A mi abuela Concepción que me contagia su fortaleza y sus ganas de vivir cada vez más y mejor.

A José Luis e Ignacio Tableros quienes fungieron como padres.

A mi Amiga Cristina por su apoyo incondicional dentro y fuera del trabajo.

A mis compañeros y amigos de laboratorio que hicieron más divertido todo el tiempo durante las horas de trabajo.

A LAPG por estar a mi lado pese a todo y tolerar mis malos momentos.

A mis amigos: Antonio, Jesús, Lluely, Yeni y Darío por estar siempre conmigo en los buenos, pero sobre todo en los momentos difíciles.

INDICE

Resumen	1
Abstract	3
I. Introducción	5
El páncreas y su estructura	6
Biosíntesis de insulina	7
Acoplamiento entre el estímulo y la secreción de insulina	10
Patrón bifásico de la secreción de insulina	13
Secreción de insulina en respuesta a la glucosa en etapas tempranas del desarrollo	15
Canales de calcio sensibles a voltaje	17
Nomenclatura de los canales de calcio sensibles a voltaje	20
Expresión heterogénea de VGCC en las células β pancreáticas y su participación en la secreción de insulina en respuesta a la glucosa	21
Canales de calcio tipo L	21
Canales de calcio tipo N	23
Canales de calcio tipo P/Q y R	24
Canales de calcio tipo T	24
Modulación de los canales de calcio en las células β	25
Factor de Crecimiento Neuronal	27
Vía de señalización del NGF	30
Señalización mediada por TrkA	30

Señalización mediada por p75	34
Canales de calcio y diabetes mellitus	35
II. Planteamiento de problema	37
III. Hipótesis	39
IV. Objetivos	40
Objetivos generales	40
Objetivos particulares	40
V. Metodología	42
Materiales	42
Cultivo de célula β pancreáticas	43
Secreción de insulina	43
Doble inmunotinción de insulina y subunidades $\alpha 1$ de los canales de calcio sensibles a voltaje (VGCC) y GLUT2 en células aisladas y cortes de tejido	44
Imágenes y cuantificación de fluorescencia	46
Microscopia confocal de cortes por congelación del tejido pancreático	48
Aislamiento de RNA citoplasmático y detección por transcriptasa reversa (RT-PCR) de los transcritos de RNAm de las subunidades de los VGCC	49
Registros electrofisiológicos	50
Análisis estadístico	52
VI. Resultados	53
A. Caracterización funcional de las células β neonatales	53

Secreción de insulina en células β neonatales y adultas	53
Expresión del RNAm de insulina y NGF en células β neonatales y adultas	54
Acumulación de insulina en células β neonatales y adultas	56
Corrientes de Ba^{2+} en células neonatales y adultas	57
Los islotes pancreáticos de ratas neonatales y adultas expresan diferentes canales de calcio sensibles a voltaje	60
Expresión de los RNAm que codifican a subunidades $\alpha 1$ de los VGCC en células β neonatales y adultas	64
La inmunoreactividad para las subunidades $\alpha 1$ de los VGCC muestra una distribución subcelular	65
Expresión de los RNAm que codifica para las subunidades $\beta 2$ y $\beta 3$ de los VGCC en células β neonatales y adultas	68
Expresión de GLUT2 en células β neonatales y adultas	70
B. Efectos tróficos del NGF en la maduración funcional de las células β neonatales	73
El NGF incrementa la secreción de insulina y promueve la sensibilidad a la glucosa	73
El NGF aumenta la síntesis de insulina y de NGF en las células neonatales	75
El NGF modula la acumulación de insulina en las células β en cultivo	78
El NGF aumenta la IBa^{2+} en células β neonatales	80

El incremento en la IBa^{2+} modulado por NGF, está dado por un aumento en el número de canales funcionales en la membrana plasmática	83
Caracterización de la corriente insensible al tratamiento con Ab-N en células neonatales cultivadas por 48 horas	85
Las células β neonatales expresan canales de calcio tipo L, N y T funcionales	86
Participación de los VGCC en la secreción de insulina estimulada por glucosa	88
El NGF modula diferencialmente la expresión del RNAm de las subunidades $\beta 2$ y $\beta 3$ en las células neonatales	89
El NGF promueve la expresión de GLUT2 preferentemente en la membrana citoplasmática	90
VII. Discusión	93
VIII. Conclusiones	107
IX. Perspectivas	109
X. Referencias	111

Resumen

Las células beta pancreáticas de rata fetal tienen la capacidad de responder a cambios en la concentración de glucosa, pero a diferencia de la célula beta adulta, carecen de la primera fase y la magnitud de la secreción es menor. Es solo algunos días después del nacimiento que las células alcanzan una madurez funcional, adquiriendo una adecuada respuesta a la glucosa y haciéndose evidente la segunda fase de la secreción. Sin embargo, no se conoce con exactitud el mecanismo o los factores implicados en esta maduración funcional.

En este trabajo se caracterizaron algunos componentes del acoplamiento entre el estímulo de glucosa y la secreción de insulina, así como la participación del NGF en la maduración funcional de las células beta en cultivo, en dos etapas del desarrollo de la rata.

Las células neonatales secretan menos insulina que las adultas y no responden a la glucosa. Esta deficiencia está dada en parte por que las células neonatales sintetizan menos hormona y la expresión de transportadores de tipo GLUT2 y de canales de calcio es menor.

En las células neonatales, las corrientes de calcio son menores y está relacionado a un menor número de copias de RNAm de las subunidades alfa 1 de los canales de calcio y una menor expresión de éstos en la membrana citoplasmática.

El NGF endógeno tiene efectos autocrinos importantes: mantiene la síntesis de insulina y NGF, y la expresión de canales de calcio en la membrana citoplasmática, mientras que el NGF exógeno tiene efectos tróficos que ayudan a la maduración funcional de las células neonatales en cultivo, promoviendo la respuesta a la glucosa, incrementando su secreción de insulina y las corrientes de

calcio. Estos efectos son resultado de un incremento en la expresión de RNAm de insulina y de transportadores GLUT2 y canales de calcio tipo LD en la membrana citoplasmática.

En conclusión, al nacimiento las células beta pancreáticas son inmaduras funcionalmente y el NGF es un factor trófico que promueve la maduración de la secreción de insulina en respuesta a la glucosa.

Abstract

Pancreatic beta cells from fetal rat have the capacity to respond to changes in glucosa concentration, but in contrast to adult cells, fetals lack of the first phase of insulin secretion and the omound of hormon secreted is fewer. It is only some days after birth that the cells reach a functional maturation, acquiring and adequate response to glucose and making evident the second phase of the secretion. However there is not known exactly the mechanism or the factors involved in that functional maturation of the beta cells.

In this work we characterized some componentes of the glucose stimulus and insulin secretion coupling, as well as the NGF participation in the functional maturation of beta cells in culture in en two stages of the rat development.

Neonatal cells secrete less amount of insulin than adults and do not respond to glucosa. This deficiency is due in part because neonaltal cells synthesize less hormone and becace the expression of GLUT2 transporters and calcium channels is fewer.

In neonatal cells, the calcium currents are smaller, that is related to a less level of copies of mRNA of the calcium channels alpha 1 subunits and a fewer expression of this channels in the cytoplasmic membrane.

The endogenous NGF has important autocrine effects on neonatal cells: maintains the synthesis of insulin and NGF, and the expression of calcium channels in the cytoplasmic membrane, whereas the exogenous NGF has trophic effects that help to the functional maturation of neonatal cells *in vitro*, promoting the glucose response, increasing their insulin. In contrast, the exogenous NGF has trophic effects that help to functional maturation of the neonatal cells in culture, promoting the glucose response, increasing their insulin secretion and the calcium currents. These effects are due by an increase in the expression of insulin mRNA and GLUT2 transporters and LD calcium channels in the cytoplasmic membrane. In conclusión, at birth the pancreatic beta cells are functionaly immature and the NGF is an important trophic factor that promotes the maturation of the insulin secretion in response to glucose.

I. Introducción

Durante el desarrollo intrauterino, la transferencia de glucosa y otros nutrientes necesarios para el crecimiento y desarrollo del feto, depende completamente del metabolismo de la madre y el nacimiento representa una etapa de transición hacia la independencia de la etapa posnatal.

En la etapa fetal, el organismo crece, sus órganos y sistemas maduran y se preparan para los cambios que conllevan el nacimiento y su adaptación a la vida posnatal. En la etapa tardía del desarrollo intrauterino, las demandas energéticas para el crecimiento son altas y la madre ajusta su metabolismo para proveer el combustible necesario para este proceso. De esta manera, el ambiente metabólico de la madre determina el fetal y las situaciones que alteren este ajuste, repercutirán invariablemente en el desarrollo y la maduración funcional del feto. Algunas evidencias demuestran que la obesidad materna, por ejemplo, incrementa el riesgo de complicaciones metabólicas que alteran el crecimiento fetal y su riesgo a desarrollar enfermedades en la vida posnatal (revisado por King, 2006).

Después del nacimiento, el individuo se independiza de la madre y se establece una alimentación enteral, en la cual la leche materna provee los nutrientes necesarios para el crecimiento y desarrollo neonatal. Los nutrientes son entonces absorbidos en el intestino por lo que el organismo necesita controlar la homeostasis de la glucosa en respuesta a los alimentos para que sus productos metabólicos sean almacenados y utilizados por los órganos y sistemas para realizar sus funciones.

El páncreas y su estructura

En los mamíferos, la glucosa representa la principal fuente para la producción de energía y su metabolismo es regulado por diferentes mecanismos, entre los que son primordiales las hormonas pancreáticas.

El páncreas es una glándula mixta compuesta por una parte exocrina y otra endocrina. La parte exocrina está formada por el tejido acinar y por el sistema de conductos pancreáticos que secretan y transportan, respectivamente, enzimas y bicarbonato, necesarios para el metabolismo inicial y la absorción de los nutrientes en el tracto gastrointestinal. La parte endocrina, que es la parte central de este trabajo, es crucial para el control de la glucemia; está formada por los islotes pancreáticos que se encuentran dispersos entre el tejido acinar. Los islotes ocupan del 1 al 2 % aproximadamente de la masa total del páncreas y están formadas por diferentes tipos celulares: células β (80 %), α (15 %), δ (3 a 5 %) y de polipéptido pancreático (PP), que secretan insulina, glucagon, somatostatina y polipéptido pancreático, respectivamente, al torrente sanguíneo (figura 1.1).

Las células β pancreáticas sintetizan y secretan, principalmente insulina, una hormona metabólica esencial para la vida; en su ausencia, los mamíferos recién nacidos, entre ellos los humanos, en pocas horas desarrollan diabetes y una cetoacidosis severa que puede llevar a la muerte.

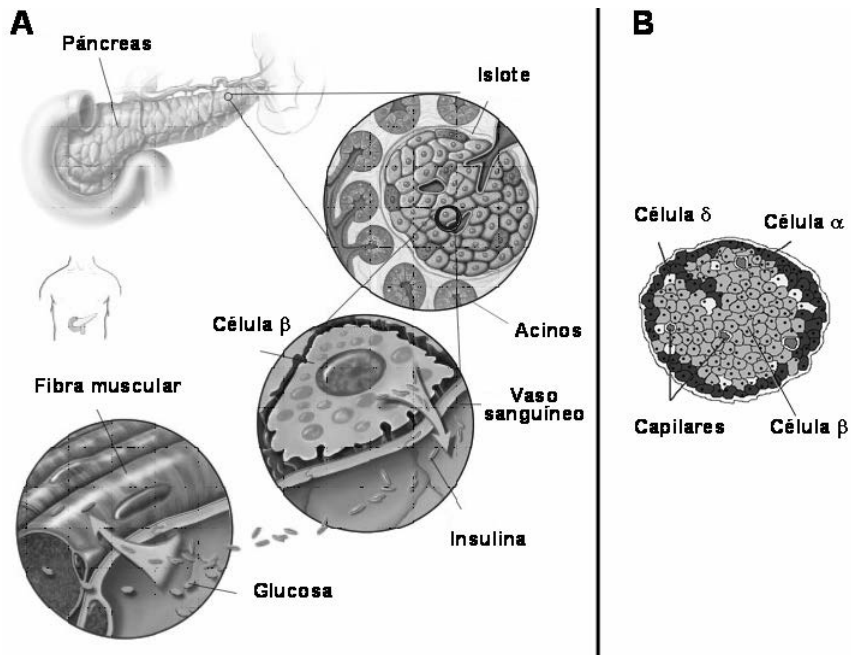


Figura 1.1. Estructura del páncreas endocrino. El páncreas se localiza en el abdomen, adyacente al duodeno, está formado por células acinares y un sistema de conductos (parte exocrina) y los islotes pancreáticos que son las unidades funcionales del páncreas endocrino. Las células β sintetizan y secretan insulina que es vertida a los vasos sanguíneos adyacentes en respuesta a cambios en la glucosa. La insulina facilita la recaptura de glucosa dentro de las células y tejidos como el músculo esquelético (A). B) Islole típico de rata que muestra la localización de las células β al centro, las α en la periferia y las δ dispersas en el islole (modificado de stemcells.nih.gov/info/scireport/chapter7.asp).

Biosíntesis de insulina

La insulina se sintetiza como una prohormona, que es el producto directo de la traducción del RNAm de insulina. Esta molécula contiene las cadenas A y B de la insulina, el péptido señal y el péptido C (figura 1.2).

Una vez que la preinsulina se forma, ésta se transloca a través de la membrana del retículo endoplásmico rugoso (RER) hacia su compartimiento interno o cisterna, con ayuda del péptido señal. Inmediatamente después de la translocación de la cadena peptídica, la proinsulina se separa de la secuencia del péptido señal por acción de una peptidasa, dando origen a la proinsulina. En el lumen del RER, la proinsulina se pliega y rápidamente se forman los enlaces

embargo, otras moléculas regulan también su secreción, como algunos aminoácidos cuyo metabolismo lleva a la producción de ATP, hormonas como el glucagon, el péptido parecido a glucagon 1 y 2 (GLP1 y GLP2) y la acetilcolina. Estas moléculas tienen la capacidad de potenciar, pero no de iniciar la secreción de insulina. Otras hormonas como la epinefrina, norepinefrina y somatostatina, regulan negativamente la secreción hormonal.

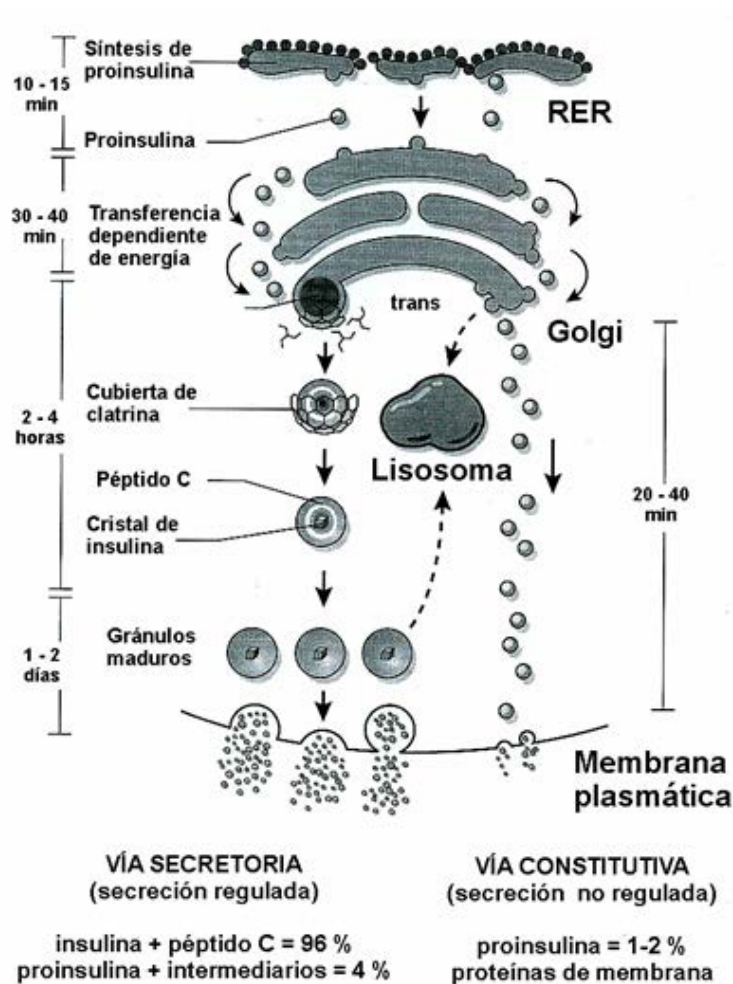


Figura 1.3. Biosíntesis de insulina. Las flechas indican la dirección del movimiento de la proinsulina a través de los compartimientos celulares. Las flechas discontinuas hacia abajo indican la vía de receptor de manosa-6-P para los lisosomas, mientras que las flechas discontinuas hacia arriba indican la vía de degradación del gránulo (autofagia). Las escalas de tiempo indican el tiempo de estancia intracompartamental. RER, retículo endoplásmico rugoso (modificado de Jefferson et al., 2001).

Por otro lado, fármacos como las sulfonilureas, medicamentos que son ampliamente utilizados en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 (DM2), se unen al receptor de sulfonilureas tipo 1 (SUR-1) de los canales de potasio sensibles a ATP (KATP) y modulan su actividad, aumentando la despolarización de la membrana, de una manera independiente de glucosa y estimulando así la secreción de insulina.

Acoplamiento entre el estímulo de glucosa y la secreción de insulina

La secreción por las células β depende de la glucosa extracelular, secretando más insulina cuando se eleva la concentración de glucosa. La insulina es críticamente importante entre otras cosas, para promover la entrada de glucosa a células como adipocitos y el músculo; así como el almacenamiento de glucosa y la prevención del rompimiento del glucógeno, principalmente en el hígado y en los músculos. Cuando la glucosa sanguínea disminuye, las células β dejan de secretar insulina, manteniendo así una homeostasis de la glucosa en la sangre (Kahn, 2000). Las alteraciones en este proceso pueden llevar a hipoglucemia o hiperglucemia y finalmente a diabetes.

Las células β pancreáticas son eléctricamente excitables y las señales eléctricas juegan un papel central en la regulación de la secreción hormonal, lo cual propicia la entrada de calcio (Mears, 2004; Barbosa et al., 1998; Dean y Matthews, 1968). Cuando la concentración extracelular de glucosa aumenta de una concentración basal (5 mM) a una concentración estimuladora (mayor a 7 mM), la célula se despolariza y se inicia una actividad eléctrica rítmica, que comienza con una despolarización lenta desde un potencial de reposo (-70 mV) hasta un voltaje en el

cual se produce una franca actividad eléctrica (revisado por Rorsman et al., 1994 y por Ashcroft et al., 1994). Esta consta de oscilaciones en el potencial de membrana, caracterizadas por una despolarización lenta seguida de una despolarización rápida, la cual alcanza un nivel de meseta en el que se superponen ráfagas de potenciales de acción dependientes de calcio; y que son separadas por períodos eléctricamente silentes (repolarización; figura 6.3) (Bertram y Sherman, 2000; Cook et al., 1991; Dean y Matthews, 1968).

El primer paso para el acoplamiento entre el estímulo de glucosa y la actividad eléctrica es el transporte del azúcar al espacio intracelular. Las células β de rata expresan transportadores de glucosa tipo 2 (GLUT2), que propicia un transporte máximo de glucosa entre 5 a 10 mM. Una vez dentro de la célula, la glucosa es fosforilada por una hexocinasa (glucocinasa), produciéndose glucosa 6 fosfato. Este paso ha sido considerado importante para detectar los cambios en la glucosa y el paso limitante para su metabolismo, mediante la cual se ajusta la cantidad de insulina secretada de acuerdo al nivel extracelular de glucosa (revisado por Matschinsky, 2002).

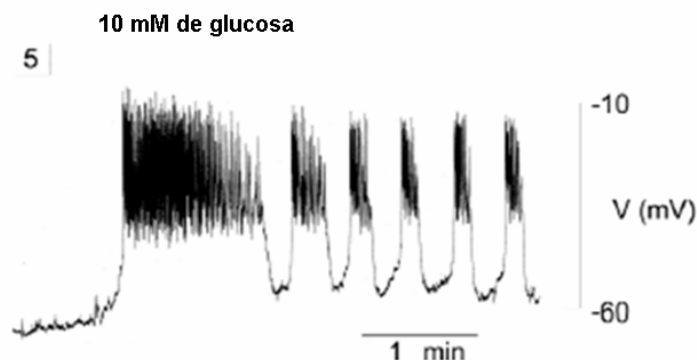


Figura 1.3. Actividad eléctrica modulada por glucosa, de una célula β en un islote intacto (tomado de Rorsman et al., 2000).

En ausencia de glucosa, la relación ATP/ADP en la célula β es baja y los canales KATP están abiertos. El constante flujo de iones potasio (K^+) a través de estos canales mantiene el potencial de membrana cercano a los -70 mV (potencial de reposo). Cuando aumenta la concentración extracelular de glucosa, se incrementa su transporte al citoplasma por los transportadores GLUT2. La subsiguiente degradación metabólica de la glucosa, aumenta la concentración de ATP que lleva a un incremento en la relación ATP/ADP, lo cual cierra los canales KATP. Este cierre, aunado al influjo de iones a través de canales catiónicos no selectivos, despolariza la membrana. Entonces, la despolarización de la membrana alcanza un voltaje al cual aumenta la probabilidad de apertura de los canales de sodio y calcio tipo T dependientes de voltaje. El aumento en el influjo de sodio y calcio, a través de estos canales, incrementa la despolarización de la membrana hasta alcanzar el voltaje en el cual aumenta la probabilidad de apertura de canales de calcio tipo L (figura 1.4).

En las células β pancreáticas, los canales de calcio sensibles a voltaje son la vía más importante para la entrada de calcio extracelular que controla la secreción de insulina. Clásicamente se ha establecido que en las células β de roedores así como en otras especies y líneas de células β , los del tipo L son los principales canales que contribuyen al influjo de calcio al interior de la célula (Mears, 2004; Davalli et al., 1996; Pressel y Mislner, 1991). El influjo de iones por estos canales, aumenta considerablemente la $[Ca^{2+}]_i$ que lleva a la exocitosis de los gránulos que contienen insulina (Revisado por MacDonald et al., 2005 y por Rorsman et al., 1994). No obstante, no es clara la participación de otro tipo de canales de calcio en este proceso.

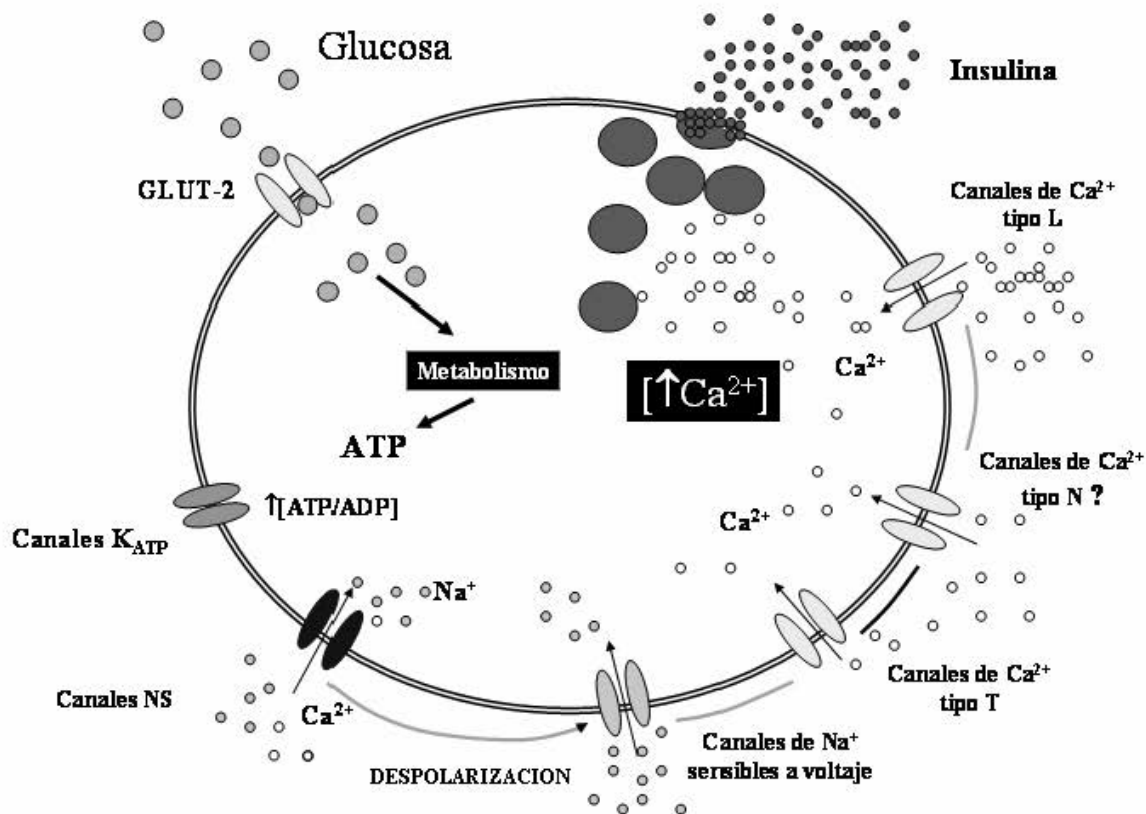


Figura 1.4. Acoplamiento entre el estímulo de glucosa y la secreción de insulina. El metabolismo de la glucosa y la subsiguiente producción de ATP, que cierra los canales K_{ATP} produciendo la despolarización de la membrana. La despolarización (flechas y líneas al margen exterior de la membrana celular) aumenta la probabilidad de apertura de los canales sensibles a voltaje. El influjo de iones calcio incrementa la concentración del calcio intracelular que produce la exocitosis de los gránulos que contienen insulina.

Patrón bifásico de la secreción de insulina

La exposición de las células β pancreáticas a la glucosa, resulta en un patrón bifásico de secreción de insulina, donde la respuesta inicial o primera fase, se caracteriza por un rápido incremento en la secreción, que ocurre inmediatamente después del aumento en la concentración de glucosa en los primeros 10 minutos y seguido por una declinación también rápida. Si la elevación en el nivel de glucosa continúa, se produce una segunda fase de secreción más lenta y gradual que

puede mantenerse por varias horas (figura 1.5) (revisado por Caumo y Luzi, 2004; Rorsman et al., 2000).

Se ha sugerido que la primera fase de la secreción, resulta de la liberación de insulina de los gránulos maduros que se encuentran anclados a la proximidad de la membrana plasmática, mientras que la siguiente fase deriva de los gránulos almacenados, así como de la participación de la insulina recién sintetizada (Daniel et al., 1999).

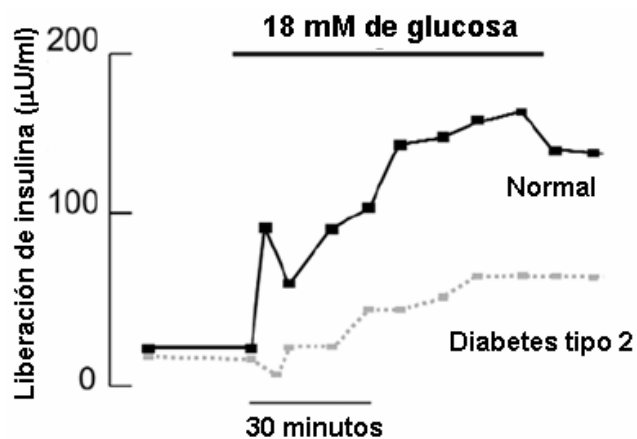


Figura 1.5. Secreción bifásica de insulina en respuesta a la glucosa y su alteración en la diabetes tipo 2. La secreción de insulina aumenta cuando la concentración de glucosa se eleva a 18 mM en individuos sanos y es seguida por una fase de secreción de insulina más lenta y sostenida. En comparación, en los individuos diabéticos, la primera fase está ausente y existe una atenuación de la segunda fase de la secreción (modificado de Rorsman et al., 2000).

Una de las principales razones por la que se ha puesto especial énfasis en el estudio de la fisiología de la secreción de insulina en respuesta a la glucosa, es su relación con alteraciones en la producción, secreción y acción de la insulina que muestran los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (Porte, 1991). Estos pacientes presentan además un patrón de secreción anormal, con una pérdida selectiva de la primera fase y atenuación de la segunda (figura 1.5), que ha sido considerada como una característica temprana en la aparición de la diabetes

(Rorsman et al., 2000). Varios grupos de trabajo han puesto un interés especial en el estudio del patrón de secreción hormonal en la célula β durante la ontogenia celular, sin embargo faltan por aclarar muchos de los mecanismos o factores implicados en este proceso.

Secreción de insulina en respuesta a la glucosa en etapas tempranas del desarrollo

Durante el nacimiento, el suplemento continuo de nutrientes por la placenta cesa, siendo remplazado por un aporte de alimento vía enteral, en forma de leche aportada por la madre. Es entonces que, a través del intestino se establece un suplemento intermitente de nutrientes. Durante este cambio de la nutrición parenteral a enteral, la nutrición y la glucemia sanguínea comienzan a ser reguladas por las glándulas endocrinas (revisado por King, 2006).

Se ha establecido que en el páncreas fetal, las células β no tienen la capacidad de discriminar los cambios en la glucosa extracelular y su secreción es mínima comparada con las células adultas. Sin embargo, también ha sido demostrado que las células fetales tienen la capacidad de responder a otros secretagogos que sugiere que la respuesta a la glucosa se establece en periodos posteriores del desarrollo. La madurez funcional caracterizada por una robusta secreción de insulina en respuesta a la glucosa, se alcanza sólo después del nacimiento. Por lo que se ha sugerido que una de las principales características en esta inmadurez es la insensibilidad a la glucosa, sin embargo no se conoce el origen de este defecto (Bergsten et al., 1998; Hole et al., 1988).

Es sólo varios días después del nacimiento que las células β son capaces de responder a la glucosa, estableciendo su papel glucorregulador, característico de las células adultas (Mendonça et al., 1998). En el caso de las células β maduras, éstas son capaces de responder a la glucosa a través de sus productos catabólicos que depende del grado de glucólisis, proceso en el cual la enzima glucocinasa juega un papel crítico (German, 1993; Matschinsky, 1990). En las células β embrionarias de rata y ratón, la vía biosintética de la insulina ya se encuentra establecida (Meneghel-Rozzo et al., 2004.; Bergsten et al., 1998). Sin embargo, parece ser que los pasos finales que llevan a la exocitosis hormonal, se vuelven funcionales solamente después del nacimiento (Bliss y Sharp, 1994).

Por lo anterior, se ha propuesto que durante la etapa fetal, las células β expresan transportadores GLUT2, pero que éstos se encontrarían preferentemente en compartimientos citoplasmáticos, resultando en una insensibilidad al aumento en la glucosa extracelular (Hughes, 1994; Tiedge y Lenzen, 1993), sin embargo esto no ha sido comprobado. En contraste, otros grupos de trabajo han sugerido que la deficiencia en la respuesta a la glucosa puede ser resultado de una falta de maduración del acoplamiento entre el metabolismo de la glucosa y la actividad eléctrica celular, implicando particularmente a los canales KATP y a los canales de calcio sensibles a voltaje (VGCC, por sus siglas en inglés), pero esto tampoco es claro (Meneghel-Rozzo et al., 2004).

En el presente trabajo, se analizan ambas posibilidades, considerando que durante el desarrollo, tanto la expresión de los transportadores GLUT2 como de los VGCC podrían ser procesos dinámicos, los cuales cambian durante el desarrollo normal, hasta alcanzar las características de una célula madura.

Canales de calcio sensibles a voltaje

Los canales de calcio sensibles a voltaje son unidades multiproteicas localizadas en la membrana citoplasmática cuya actividad aumenta cuando la membrana se despolariza. En respuesta a la despolarización de la membrana, la conformación de los canales pasa de un estado cerrado a un estado abierto y el influjo de calcio a través de estos canales aumenta la $[Ca^{2+}]_i$. El calcio sirve como un segundo mensajero que acopla o traduce las señales eléctricas en respuestas celulares. En general, el aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ controla una diversidad de eventos intracelulares incluyendo exocitosis, endocitosis, contracción muscular, transmisión sináptica y el metabolismo celular; participa en la fertilización y controla la proliferación, la diferenciación y el desarrollo celular mediante la regulación de la fosforilación de proteínas, la expresión genética y el ciclo celular y bajo ciertas circunstancias puede causar muerte celular mediante la activación del programa apoptótico o la producción de necrosis (revisado por Catterall, 2000 y por Berridge, et al., 2000).

Los VGCC están compuestos por cuatro a cinco subunidades proteicas ($\alpha 1$, $\alpha 2$, β , δ y γ). El modelo general indica que en estos canales, la subunidad principal ($\alpha 1$) es una proteína transmembranal, asociada con el dímero $\alpha 2\delta$ a través de enlaces disulfuro y que además está unida a una subunidad β intracelular y en algunos casos a una subunidad transmembranal γ (figura 1.6) (revisado por Catterall, 2000).

Las características electrofisiológicas y farmacológicas del canal están dadas por la subunidad $\alpha 1$, para las cuales se han identificado al menos diez genes diferentes que la codifican (Catterall et al., 2003). Está formada por cuatro

repeticiones homólogas o dominios transmembranales (I al IV), cada uno integrado por seis segmentos (S1 a S6), contiene el poro y una región de cargas positivas situado en S4 que le confiere la sensibilidad a cambios de voltaje, conocida como sensor de voltaje (Figura 1.6).

Las subunidades $\alpha 2\delta$, β y γ no forman directamente el poro, por lo que son llamadas subunidades auxiliares. Sin embargo, juegan un importante papel en la regulación de la translocación de los canales a la membrana, en las propiedades de compuerta y en su dependencia de voltaje (revisado por Arikath y Campbell, 2003; Catterall, 2000).

La subunidad β es una proteína citosólica que se asocia con la subunidad $\alpha 1$, entre sus principales funciones están: mantener el tránsito de la subunidad $\alpha 1$ a la membrana citoplasmática y la regulación de las propiedades biofísicas del canal por contener sitios de fosforilación (Viard et al., 2004).

Hasta la fecha, se han identificado cuatro diferentes subtipos de subunidad β (Vance et al., 1998) y los diferentes subtipos pueden tener distintos efectos sobre los canales de calcio; por ejemplo, la coexpresión de la subunidad $\alpha 1$ con la subunidad $\beta 2$ produce un retardo en la inactivación, mientras que la coexpresión con la subunidad $\beta 3$ la acelera de manera significativa (Hullin et al., 1992).

En los islotes pancreáticos de rata, se han identificado los RNA mensajero (RNAm) para la subunidades $\beta 2$ y $\beta 3$ (Iwashima et al., 2001) Sin embargo, se conoce poco sobre los mecanismos que regulan la interacción de estas subunidades con la subunidad $\alpha 1$ en las células β . Sólo algunos estudios previos han demostrado que la expresión de la subunidad $\beta 3$ inhibe la secreción de

insulina, aunque este efecto se ha atribuido a la inhibición de la liberación de calcio de depósitos intracelulares, más que a una inhibición directa de los VGCC de la membrana (Berggren et al., 2004).

Debido a que las subunidades β son importantes para la expresión en la membrana y la función de los canales de calcio, resulta interesante explorar a de estas subunidades y su posible relación con la expresión de las subunidades α_1 en la membrana durante el desarrollo.

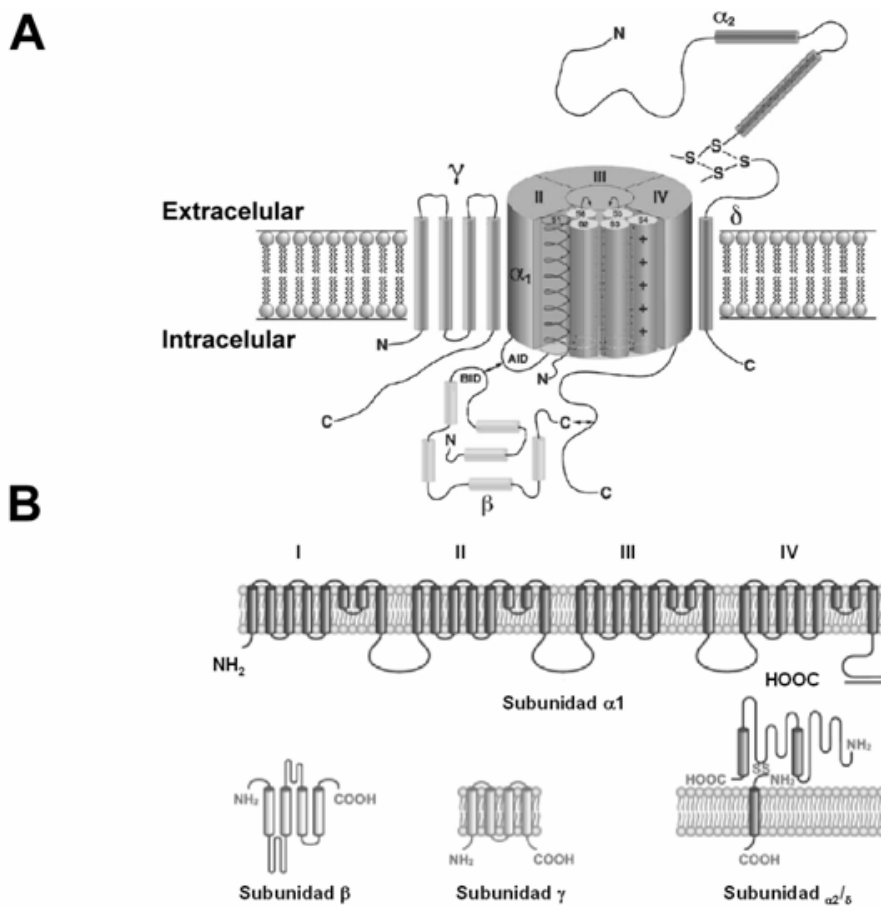


Figura 1.6. Estructura general de un canal de calcio sensible a voltaje. En la figura se muestra la subunidad α_1 con el sensor de voltaje y las diferentes subunidades auxiliares que lo integran (A) (Randall y Benham, 1999) y B) la topología sugerida para las subunidades del VGCC (Yang y Berggren, 2005).

Las subunidades $\alpha 2$ y δ son codificadas como un dímero por un mismo gene, al igual que para la subunidad β , se han identificado cuatro subtipos del dímero $\alpha 2\delta$ ($\alpha 2\delta 1$ a $\alpha 2\delta 4$) pero a diferencia de la primera, que puede tener efectos antagónicos; los diferentes subtipos de $\alpha 2\delta$ tienen efectos similares ya que básicamente todas incrementan la amplitud de la corriente y modulan la activación e inactivación del canal.

Originalmente, la subunidad γ fue descrita sólo en el músculo esquelético sin embargo hoy se conoce que diferentes subtipos, son expresados en una amplia variedad de tejidos ($\gamma 1$ a $\gamma 8$) y que ninguno de estos subtipos están relacionados con el tráfico de los canales. Sin embargo, se sabe que su expresión inhibe la actividad del canal, modulando negativamente la cinética de activación (Hullin et al., 1992).

Nomenclatura de los canales de calcio sensibles a voltaje

La nomenclatura Ca_v para los VGCC, conocida como estructural; fue propuesta en el año 2000 y describe a las proteínas y los RNAm de los VGCC, clasificándolos en tres familias: $Ca_v 1$, $Ca_v 2$ y $Ca_v 3$ (Ertel., 2000). Hasta la fecha se han identificado seis tipos de corrientes Ca_v codificados por la subunidad $\alpha 1$: $Ca_v 1.1$ (tipo LS, $Ca_v 1.2$ (tipo LC), $Ca_v 1.3$ (tipo LD), $Ca_v 1.4$ (tipo LE); $Ca_v 2$, codificados por la subunidad $\alpha 2$: $Ca_v 2.1$ (tipo P y Q), $Ca_v 2.2$ (tipo N), $Ca_v 2.3$ (tipo R), y $Ca_v 3$ codificados por la subunidad $\alpha 3$: $Ca_v 3.1$ (tipo TG), $Ca_v 3.2$ (tipo TH), $Ca_v 3.3$ (tipo TI).

En base a sus propiedades electrofisiológicas, los canales de calcio tipo L, N, P, Q y R se clasifican como canales de calcio activados a alto voltaje (HVA) y al tipo T como canales activados a bajo voltaje (LVA, Catterall et al., 2003). La tabla 1 resume la clasificación de los VGCC, sus propiedades biofísicas y farmacológicas así como sus principales funciones.

Tabla 1. Clasificación de las subunidades $\alpha 1$ de los canales de calcio.

Tipo de canal	Clasificación alfabética del tipo de subunidad $\alpha 1$	Clasificación numérica de la subunidad $\alpha 1$	Perfil de inactivación	Farmacología	Subtipo de subunidad β	Efecto sobre la inactivación de la subunidad $\alpha 1$
P	$\alpha 1A$	Cav2.1	Muy lento	ω -Agatoxina IVA	$\beta 1b$ $\beta 2a$ $\beta 3$ $\beta 4$	Aumenta rapidez Enlentecimiento substancial Aumenta rapidez Enlentecimiento moderado
Q	$\alpha 1A$	Cav2.1	Moderado	ω -Agatoxina IVA		
N	$\alpha 1B$	Cav2.2	Rápido	ω -Conotoxina G-VIA		
L	$\alpha 1C$ $\alpha 1D$ $\alpha 1F$ $\alpha 1S$	Cav1.2 Cav1.3 Cav1.4 Cav1.1	Lento	Dihidropiridinas		
R	$\alpha 1E$	Cav2.3	Rápido	SNX-482		
T	$\alpha 1G$ $\alpha 1H$ $\alpha 1I$	Cav3.1 Cav3.2 Cav3.3	Muy rápido	Pimozida*		

Modificado de Catterall et al 2003. *Santi et al., 2002.

Expresión heterogénea de VGCC en células β pancreáticas y su participación en la secreción de insulina en respuesta a la glucosa

Las células β de diferentes especies expresan diversos subtipos de subunidades $\alpha 1$ responsables de generar canales de calcio tipo L, P/Q, R y T (Mears, 2004).

Canales de calcio tipo L

Los canales de calcio tipo L que expresan las células β pancreáticas y líneas celulares secretoras de insulina, tienen las mismas características biofísicas que los canales neuronales: con poca o ninguna inactivación y alta sensibilidad a las dihidropiridinas (DHP; Smith et al., 1989). El modelo general aceptado, establece

que en las células β pancreáticas, el influjo de calcio está dado principalmente por canales de calcio tipo L que corresponde a las subunidades $\alpha 1D$ o Cav 1.3 (Schulla, et al., 2003; Satin, 2000; Davalli et al., 1996; Ohta et al., 1993).

Sin embargo, es importante mencionar que la expresión de la subunidad $\alpha 1$ que origina corrientes de calcio tipo L difiere entre las diferentes especies (Liu et al., 2003; Barg et al., 2001; Horvath et al., 1998; Seino, 1995) y aunque la mayoría de los autores están de acuerdo en que en las células β de rata y líneas celulares relacionadas el mayor contribuidor de los canales de calcio es la subunidad $\alpha 1D$ (Yang y Berggren, 2006; Taylor et al., 2005; Sher et al., 2003; Rosenbaum et al., 2001; Namkung et al., 2001; Barnett et al., 1995; Bokvist et al., 1995; Ramanadham et al., 1994; Seino et al., 1992), otros describen que la expresión de la subunidad $\alpha 1C$ es más importante, especialmente en los ratones (Schulla et al., 2003; Namkung et al., 2001; Iwashima et al., 1993; Seino et al., 1992).

Debido a que ambos canales (LC y LD) tienen entre sí, características biofísicas y farmacológicas similares, ha sido difícil el análisis de la participación individual de estos subtipos de canales en la corriente total de calcio y en la secreción de insulina.

Algunos datos demuestran que los canales de calcio formados por la subunidad $\alpha 1D$ (LD) están preferentemente ligados a la secreción de insulina estimulada por glucosa (Liu et al., 2003), los cuales son apoyados por los hallazgos encontrados en ratones en los que se ha eliminado la subunidad $\alpha 1D$ ($\alpha 1D^{-/-}$), que desarrollan un estado hipoinsulinémico e hiperglucemia (Namkung et al., 2001). En contraste, otros grupos sugieren que la subunidad $\alpha 1C$ está asociada a la primera fase de la

secreción, ya que los ratones con deleciones de esta subunidad carecen de la secreción rápida (Schulla et al., 2003; Barg et al., 2001; Wisser et al., 1999; Safayhi et al., 1997), sin embargo la expresión e importancia en la secreción de insulina de células de rata es aún materia de debate.

Canales de calcio tipo N

La expresión de canales de calcio tipo N en las células β pancreáticas permanece siendo controvertido. Varios grupos de trabajo han establecido que las células β pancreáticas expresan canales de calcio tipo N, pero su expresión varía ampliamente entre especies; desde los ratones en los que representa una parte importante de la corriente de calcio (revisado por Sher et al., 2003) o células caninas en las que este componente está prácticamente ausente (Pressel y Mislner, 1991), en lo que se refiera al páncreas humano, se ha establecido que las células β no expresan este tipo de canales de calcio (Davalli, et al., 1996).

Ha sido demostrado que las líneas celulares INS-1 y RINm5F secretoras de insulina procedentes de rata, expresan canales tipo N y que éstos son importantes para la secreción de insulina estimulada por glucosa, no obstante hay que recordar que estas células proceden de líneas tumorales y su fisiología puede diferir de las células normales. En el caso de las células de rata, existen datos controversiales con respecto a su expresión (Horvath et al., 1998; Sher et al., 1992; Ramanadham y Turk, 1994) y no se ha llegado a un acuerdo a su importancia en la secreción hormonal. Por otra parte, no existen estudios detallados sobre la expresión de los canales de calcio durante el desarrollo normal

de la rata, por lo que resultó interesante en este proyecto, abordar estos estudios y analizar su importancia en la secreción de las células β de rata.

Canales de calcio P/Q y R

La expresión de canales de calcio tipo P/Q se ha descrito ampliamente en líneas celulares secretoras de insulina, como las células RINm5F, INS-1 (Magnelli et al., 1996; Horvath et al., 1998) así como en células β de rata (Ligon et al., 1998.) y humano (Sher et al., 2003). Por otro lado, mientras que la participación de los canales de calcio tipo R ha sido ampliamente estudiada en la línea celular INS-1 y se conoce que dichos canales están implicados en la secreción de insulina en respuesta a la glucosa; participando particularmente en la segunda fase de la secreción. Se sugiere que disfunciones en estos canales, pueden estar relacionados con alteraciones en las células β y el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 (DM2, Pereverzev et al., 2002.; Vajna et al., 2001; Grabsch et al., 1999; Vajna et al., 1998). Sin embargo, es importante mencionar, que otros grupos de trabajo han descartado completamente la expresión de estos canales en las células β pancreáticas de rata (Pereverzev et al., 2002).

Canales de calcio tipo T

Los islotes de páncreas de humano y las células β pancreáticas de rata expresan canales de calcio tipo T (Barnett et al., 1996; Ashcroft et al., 1990; Hiriart y Matteson, 1988) que corresponden a la subunidad $\alpha 1G$ (Sher et al., 2003; Zhuang et al., 2000; Seino, 1995). En el caso de las células de rata, los canales se activan

e inactivan a potenciales de membrana bajos y despliegan cinéticas de inactivación rápida y desactivación lenta.

Se ha sugerido que los canales de calcio tipo T modulan la actividad eléctrica de la membrana y mantienen la secreción de insulina (Bhattacharjee et al., 1997), aunque también ayudan a mantener la concentración basal del calcio intracelular y en algunos casos participa en la destrucción de células β inducida por citocinas (Wang et al., 1999). Por su importancia en la generación de la actividad eléctrica celular, consideramos a estos canales como candidatos importantes, para estudiar su expresión y la relación con la maduración funcional de las células β pancreáticas.

Modulación de los canales de calcio en las células β

La despolarización de la membrana determina la apertura, la actividad y densidad de los VGCC en las células β pancreáticas y se regulan por una diversidad de mecanismos; como la concentración intracelular de calcio $[Ca^{2+}]_i$, la fosforilación de proteínas, la translocación de los canales y la interacción con otras proteínas. De esta manera, la regulación a la baja o el alta de la función o expresión de los VGCC se vería reflejada en alteraciones en la exocitosis hormonal.

En relación a la regulación de los VGCC, las cinasas de proteínas son factores clave en el control de los niveles del calcio intracelular. La eficiente fosforilación de los canales se acompaña de la formación de complejos de cinasa y canal. Por ejemplo, en cerebro, músculo esquelético, músculo liso y corazón la cinasa de proteínas A (PKA) se encuentra anclada a la membrana cerca de los canales de calcio tipo L y esta interacción es necesaria por ejemplo, para la regulación de la

fuerza contráctil dependiente de actividad del músculo esquelético y para la modulación β adrenérgica del corazón (revisado por Yang y Berggren, 2005).

Los VGCC en las células β pancreáticas se modulan por diferentes cinasas: la cinasa dependiente de AMPc (PKA) que incrementa la secreción de insulina (Yang and Berggren, 2005), la cinasa C que tiene un papel tónico en el mantenimiento de la función de los VGCC y el acoplamiento entre el estímulo y la secreción (Arkhammar et al., 1994); la cinasa dependiente de GMPc (PKG) que incrementa el influjo de Ca^{2+} a través de canales tipo L y la cinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina tipo II (CaM cinasa II) que es responsable de la inactivación dependiente de calcio de los canales L (revisado por Yang and Berggren 2005).

La señalización de las cinasas de tirosina juega un importante papel en la regulación de la proliferación, supervivencia y diferenciación de las células β (Navarro-Tableros et al., 2004; Welsh et al., 2000) y se ha mostrado que la estimulación de los receptores de insulina contribuye, al menos parcialmente, al incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por el influjo de iones a través de estos canales, mecanismo que no es enteramente claro, sin embargo no se descarta la posibilidad de que estas cinasas modulen a los Ca_v a través de fosforilaciones (revisado por Yang y Berggren 2005).

En el caso de otros receptores con actividad de cinasa de tirosina, como el receptor de alta afinidad (TrkA) para el factor de crecimiento neuronal (NGF; el cual es nuestro modelo fisiológico); su activación puede tener efectos a corto y largo plazo, incrementando la corriente total de calcio por canales sensibles a voltaje (Rosenbaum et al., 2001).

De acuerdo con lo anterior, los canales iónicos y particularmente los VGCC, no operan como unidades aisladas, sino que están asociados con otras moléculas que son importantes para su tránsito a la membrana (Altier et al., 2002), el direccionamiento hacia sitios específicos y su asociación con moléculas, para formar complejos especializados de transducción de señales (revisado por Yang y Berggren 2005), por ello resultó interesante estudiar la función del NGF como un factor trófico importante que puede modular la expresión y función los VGCC, no sólo en la etapa adulta, sino que probablemente también, durante el desarrollo normal de la rata.

El factor de crecimiento neuronal en la célula β pancreática

El factor de crecimiento neuronal (NGF) pertenece a la familia de las neurotrofinas que incluyen al factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), la neurotrofina 3 (NT-3) y la neurotrofina 4/5 (NT-4/5). Cada neurotrofina interactúa con un miembro de la familia de receptores con actividad de cinasa de tirosina (Trk); el NGF se une a TrkA; BDNF y NT-4/5 a TrkB y NT-3 a TrkC, los cuales activan vías de señalización importantes (revisado en Patapoutian y Reichardt, 2001).

El NGF es una proteína originada de un precursor, que consta de un gran complejo multimolecular definido como NGF 7S, el cual consiste de tres diferentes especies moleculares: la subunidad α , cuya función es desconocida, la subunidad γ que posee una actividad de proteasa, y la subunidad β que es la forma biológicamente activa del NGF (figura 1.7).

La subunidad β , derivada del complejo 7S, se aísla como un dímero, su forma madura tiene una secuencia de 118 aminoácidos y que contienen tres puentes disulfuro intercadena (figura 1.8). La actividad biológica del NGF es regulada a través de dos receptores: un receptor de baja afinidad conocido como receptor para NGF p75 y un receptor de alta afinidad conocido como gp140trkA o TrkA el cual es un miembro de la familia Trk de los receptores con actividad de cinasa de tirosina (figura 1.9).

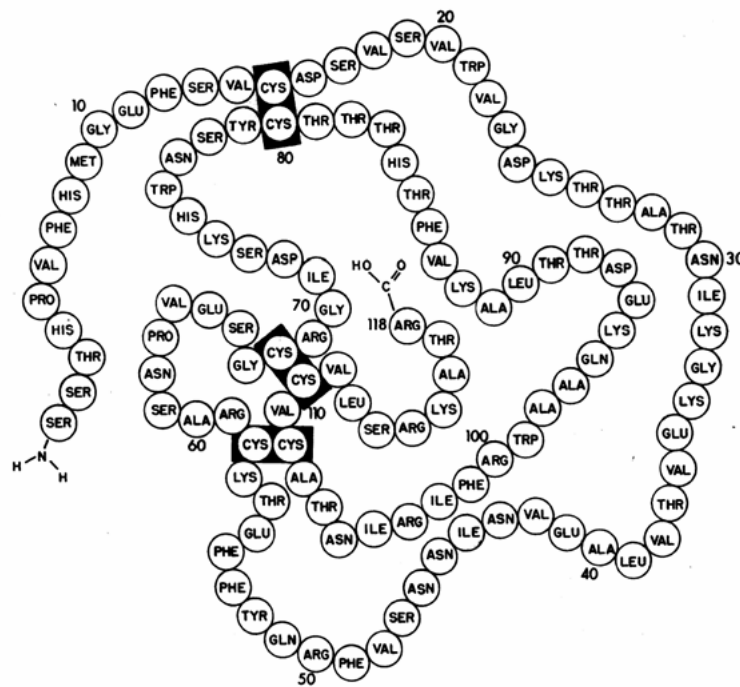


Figura 1.7. Secuencia de aminoácidos de la subunidad 2.5S del NGF. Los aminoácidos encerrados en recuadro negro indican el sitio de los enlaces disulfuro (modificado de Angeletti et al., 1971).

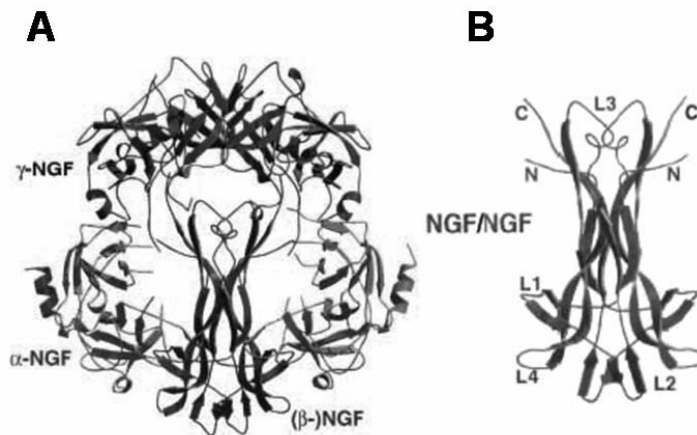


Figura 1.8. Estructura de la molécula de NGF. A) Complejo 7S mostrando las subunidades α , β y γ . **B)** Dímero de subunidades β de NGF (2S), mostrando las terminales carboxilo (C) y amino (N) terminales, así como las asas importantes para la unión con los receptores TrkA (L2 y L4) y p75 (L1, L3 y L4) (Wiesmann y de Vos, 2001).

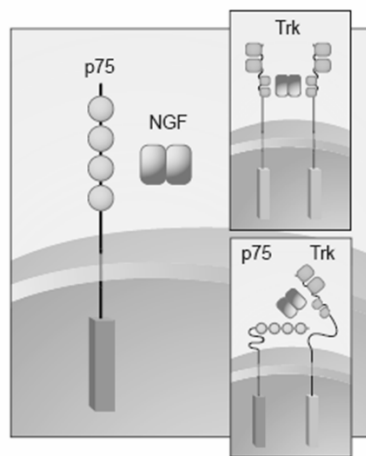


Figura 1.9. Modelo de interacción de los receptores de NGF. El dímero de NGF se une a una forma monomérica de p75, a un dímero de TrkA o a un heterodímero de p75-TrkA (Zampieri y Chao, 2004).

El NGF fue identificado originalmente como un factor exclusivamente neurotrófico, importante factor trófico en el desarrollo normal del sistema nervioso, que modula el desarrollo, diferenciación y sobrevivencia celular así como la expresión de proteínas como canales iónicos en algunos tipos de neuronas. Actualmente se conoce que el NGF se expresa y tiene importantes efectos en otros tejidos: participa en la respuesta inflamatoria aguda; en el desarrollo de los ovarios, se

expresa y secreta por el corazón y la adenohipófisis (Sofroniew, M. V., et al., 2001; Levi-Moltalcini et al., 1996; Dissen et al., 2000; Furukawa et al., 1984; Missale et al., 1996).

Vía de señalización del NGF

Señalización mediada por TrkA

La dimerización del receptor TrkA, mediada por el ligando (NGF) es seguida por la transfosforilación de residuos de tirosina que se unen a los dominios de homología Scr2 (SH2) de las proteínas adaptadoras. Esto lleva a la activación de las cinasas de fosfatidilinositol 3 fosfato (PI3K), fosfolipasa C- γ (PLC- γ) y a las proteínas adaptadoras Ras (Shc, Grb2 y SOS) que inician el proceso de transducción de señales, operando independientemente o en conjunto, para generar los diferentes efectos de la respuesta neurotrófica (figura 1.10).

En esta vía, la estimulación de PI3K y la producción de fosfoinosítidos D-3 fosforilados están implicadas en la mitogénesis mediada por factor de crecimiento, en la prevención de la apoptosis y en cambios celulares como el crecimiento de neuritas en células de feocromocitoma de rata (PC12).

En la vía de la PLC- γ , ésta cataliza la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP₂) a diacilglicerol (DAG) y trifosfato de inositol (IP3). El DAG activa la proteína cinasa C (PKC) y el IP3 promueven la liberación transitoria de calcio (Ca²⁺) del retículo endoplásmico.

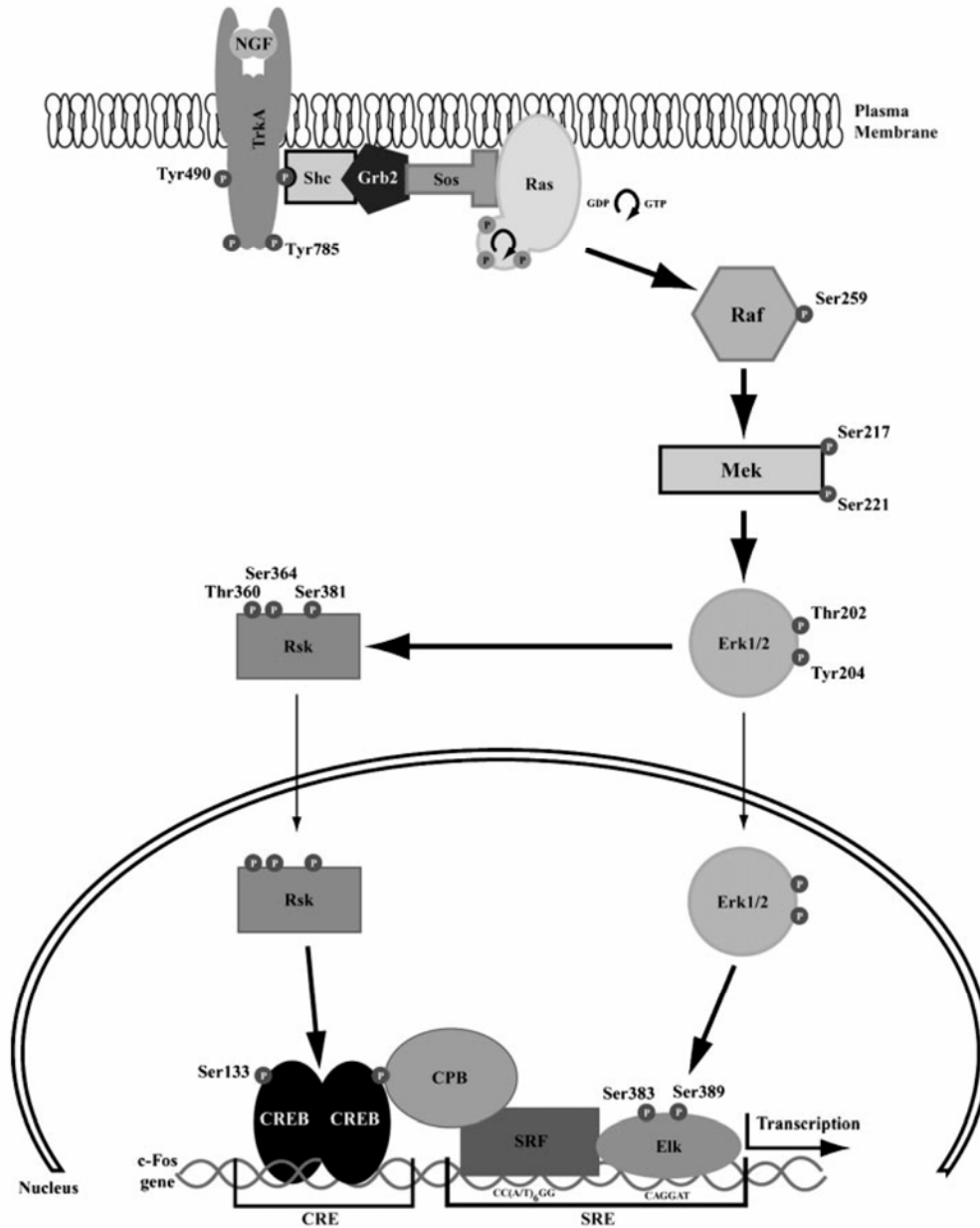


Figura 1.10. Esquema de la cascada de señalización de la activación de TrkA. Después de su fosforilación, se recluta Shc al receptor vía la interacción con un dominio SH2 o fosfotirosina y Shc es unido por el complejo Grb2-Sos. El reclutamiento de Sos a la membrana próxima a Ras, donde funciona como intercambiador de GTP, activando a Ras. El Ras activado recluta y activa a Raf, la cual es una cinasa de serinas y treoninas, que fosforila a la cinasa MEK. Esta fosforilación inicia la actividad de la cinasa que lleva a la activación de la cinasa MAP Erk1/2, que entonces participa en al menos dos cascadas. Erk1/2 se puede translocar al núcleo, donde fosforila el factor de transcripción Elk-1 o bien fosforila a la cinasa Rsk. La fosforilación de Elk-1 le permite interactuar con el factor de transcripción accesorio SRF, después de lo cual se une al elemento de respuesta sérica (SRE) dentro de la región promotora *c-fos* y contribuye al inicio de la transcripción. La fosforilación de Rsk produce su translocación al núcleo y la consecuente fosforilación de CREB. El CREB fosforilado se une a la proteína coactivadora transcripcional CPB, la cual une también el complejo SRF-Elk, creando un complejo de factores de transcripción extendido que lleva a la transcripción de *c-fos* (tomado de Sofroniew, 2001).

Ras (p21^{ras}) es una proteína G monomérica de bajo peso molecular que inicia la cascada de eventos que llevan a la activación de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK). Los substratos para MAPK incluyen a factores de transcripción nuclear, a la fosfolipasa A₂ y algunas cinasas como la cinasa II ribosomal S6. Las vías de Ras, MAPK y su producto corriente abajo, al igual que PI3K y PLC- γ son importantes en la sobrevivencia neuronal mediada por factores de crecimiento.

El NGF tiene efectos sobre la diferenciación celular como en el caso de las células PC12, que implican el término de la división celular, el inicio del crecimiento de neuritas y el incremento en la expresión de canales de sodio y calcio. Se plantea que la expresión de un fenotipo neuronal eléctricamente excitable, como en el caso de las neuronas simpáticas, requiere del NGF para mantener las propiedades normales de los canales de Ca²⁺ (revisado por Sofroniew et al., 2001), por lo que en este trabajo se analiza el papel del NGF en la expresión de los canales de calcio durante el desarrollo de la célula β pancreática.

En la rata adulta, las células β pancreáticas expresan el receptor de alta afinidad para NGF (TrkA) y sintetizan NGF biológicamente activo, el cual es secretado en respuesta a cambios en la concentración extracelular de glucosa (Rosenbaum et al., 1998). Entre los efectos del NGF sobre la fisiología de las células β adultas, están el inducir cambios morfológicos y funcionales. El NGF aumenta la densidad de canales de sodio en la membrana y modula la actividad eléctrica celular (Vidaltamayo et al., 2002). Así mismo, aumenta la corriente de calcio y la secreción de insulina en respuesta a la glucosa (Rosenbaum et al., 2001); mantiene la sobrevivencia celular (Navarro-Tableros et al., 2004) y promueve la

extensión de procesos citoplasmáticos parecidos a neuritas (Rosenbaum et al., 1996).

Durante el desarrollo del páncreas, la expresión de los receptores TrkA tiene un patrón cambiante. En etapas tempranas, el receptor se expresa en las células localizadas en los conductos pancreáticos, pero conforme avanza el desarrollo el TrkA comienza a localizarse en el tejido endócrino; hasta que finalmente, en la etapa adulta, los receptores se localizan exclusivamente en los islotes pancreáticos (Kanaka-Gantenbein et al., 1995a). Ha sido demostrado que la señalización por TrKA es necesaria para el desarrollo normal del islote, de tal manera que si esta vía se bloquea, se produce una disminución en el número y tamaño de los islotes así como en la cantidad de células β que los integran (Kanaka-Gantenbein et al., 1995a).

Se ha demostrado que la señalización por cinasas de tirosina regula la liberación de insulina sin afectar el metabolismo de la glucosa (Persaud et al., 1999) y que en la célula β adulta, la exposición a NGF produce un incremento en las corrientes de calcio (Rosenbaum et al., 1998, 2001). Sin embargo, a pesar de conocer la importancia del NGF en el desarrollo morfológico del páncreas endócrino, no se ha estudiado su papel en el desarrollo funcional, por lo que resulta interesante analizar el efecto de este factor en la maduración de la secreción de insulina en respuesta a la glucosa durante la ontogenia del páncreas.

Señalización mediada por p75

El receptor p75 es un miembro de la familia de receptores de muerte del factor de necrosis tumoral y debido a razones prácticas en el desarrollo de este trabajo, sólo se mencionaran sus características generales.

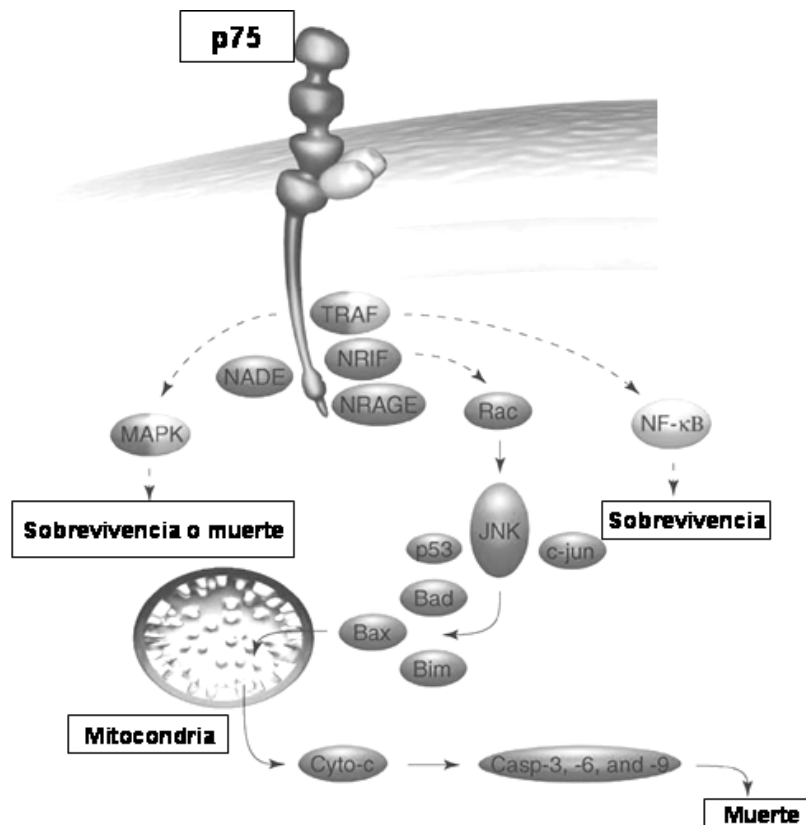


Figura 1.11. Vía de señalización del receptor p75 en la supervivencia y muerte celular. La vía implica la activación de las proteínas acopladoras de la vía de JNK, que regula la activación de Bad y la subsiguiente salida del citocromo c (Cyto-c) de la mitocondria. Posteriormente, el Cyto-c activa la vía de las caspasas (Casp-3,-6 y -9). (Modificado de Nykjaer et al., 2005).

Este receptor actúa como un transductor de señales de apoptosis y fue identificado como un facilitador cooperativo de la función de los receptores TrkA. Sin embargo, ha sido demostrado que el receptor p75 tiene funciones diferentes cuando no se encuentra en interacción con TrkA, induciendo la muerte celular por apoptosis, por lo que es un importante modulador de la estructura tisular durante

el desarrollo y la remodelación estructural, y está implicado en diferentes condiciones patológicas que implican la pérdida celular (figura 1.11, Schor et al., 2005; Yamashita et al., 2005).

Canales de calcio y diabetes mellitus

Las células β de rata expresan dos tipos de canales de calcio tipo L: LC y LD, formados por las subunidades $\alpha 1C$ y $\alpha 1D$ (respectivamente) y la expresión de los genes que codifican estas subunidades, pueden afectarse por el nivel de glucosa sanguínea, produciendo una reducción de la respuesta secretora de las células (Iwashima et al., 1993).

Una de las características de la diabetes mellitus no insulino dependiente (NIDDM) o tipo 2 (DM2), es la alteración de la secreción de insulina. En células β , tanto en la diabetes establecida como en los estados prediabéticos de modelos animales con NIDDM, se presentan alteraciones en la expresión y función de los canales de calcio sensibles a voltaje (Roe et al., 1996; Giroix et al., 1983) caracterizada por una reducción del nivel del RNAm que codifica a las subunidades $\alpha 1$ que forman VGCC de los cuales, los tipo L son los más afectados (Kato et al., 1996) y relacionada a una pérdida de la corriente total de calcio y a la disminución o abatimiento de la respuesta secretora en respuesta a la glucosa (Roe et al., 1996). Esto sugiere que la glucosa puede ser un estímulo importante en el desarrollo funcional de las células β , funcionando como un factor regulador de la expresión de los canales.

El nacimiento en los mamíferos, puede ser un estímulo capaz de producir ajustes en la fisiología celular, tales que permitan al organismo adaptarse a las nuevas condiciones metabólicas, secundario a la estimulación por los cambios en la alimentación.

Por lo anterior, es importante analizar la maduración funcional y estructural de las células β pancreáticas al nacimiento, así como los mecanismos y factores que contribuyen a este proceso. Este conocimiento nos permitirá entender mejor las alteraciones que pueden llevar a un desajuste celular y sistémico, que se vea reflejado en una condición tan particular como en el caso de los pacientes diabéticos.

II. Planteamiento del problema.

Las células β pancreáticas de rata fetal carecen de la capacidad de responder a cambios en la concentración extracelular de glucosa y carecen de la primera fase de la secreción de insulina (Hole et al., 1988). Ha sido demostrado que es sólo algunos días después del nacimiento, que las células alcanzan una madurez funcional, adquiriendo una adecuada respuesta a la glucosa y haciéndose evidente la segunda fase de la secreción (Mendonça et al., 1998) sin embargo, no se conoce el mecanismo o los factores implicados en el desarrollo de la maduración funcional de la célula β después del nacimiento.

Los canales de calcio sensibles a voltaje, juegan un papel importante en el acoplamiento entre la elevación de glucosa y la secreción de insulina de las células adultas. Sin embargo, en la etapa fetal los bloqueadores de canales de calcio producen solo un pequeño efecto inhibitorio sobre la secreción de insulina estimulada por glucosa, a diferencia de las células adultas, en las cuales el bloqueo de los canales de calcio lleva a una marcada disminución en la secreción hormonal (Hole et al., 1988). Esto sugiere que en la etapa fetal la secreción de insulina no depende de la entrada de calcio extracelular pero que en algún momento, después del nacimiento, se establece una secreción de insulina estimulada por glucosa que depende de la entrada de calcio.

Lo anterior puede ser resultado por diferentes mecanismos los cuales podrían incluir: A) que la secreción de insulina no dependa de la concentración extracelular de calcio y por tanto del influjo de estos iones por VGCC o B) que la secreción sí dependa del influjo de calcio, pero que exista alguna alteración en la expresión o función de los VGCC en algunas etapas del desarrollo.

Ha sido establecido que es solo tres días después del nacimiento, que la secreción de insulina presenta un perfil de secreción similar al de las células adultas, pero con una secreción disminuida. Esto sugiere que el nacimiento es un estado crítico para las células β pancreáticas, donde se adquiere una completa maduración funcional.

Es claro que tanto el calcio intracelular como el extracelular son utilizados para la generación de una completa respuesta bifásica y que la segunda fase de la secreción depende fuertemente de la movilización de calcio a través de VGCC por lo que es interesante analizar la expresión y función de éstos en las células de ratas recién nacidas. El tráfico de los canales de calcio es regulado por las subunidades β accesorias, por lo que resulta interesante también, analizar la expresión de estas subunidades y su relación con alteraciones en la expresión de los canales de calcio y la secreción de insulina en respuesta a la glucosa.

El Factor de Crecimiento Neuronal (NGF) participa en el la morfología normal del páncreas endócrino durante el desarrollo fetal, sin embargo no se ha estudiado su participación en la maduración funcional de la célula β . En las células adultas, el NGF tiene efectos tróficos sobre la fisiología de la célula adulta, incrementando la secreción de insulina en respuesta a la glucosa; aumentando las corrientes de sodio y calcio y modulando la actividad eléctrica, sin embargo se desconoce si este factor modula estos componentes en otros estadios de la ontogenia y si participa en el desarrollo de la maduración funcional de la secreción de insulina en respuesta a la glucosa.

Se ha sugerido que en las células β pancreáticas de pacientes diabéticos, podría existir alguna alteración en la actividad eléctrica, descartando la implicación de los

canales KATP, pero considerando a los canales de calcio como posibles candidatos (Kjems et al., 2003). Esta hipótesis es apoyada por el hecho de que los islotes de pacientes con tolerancia a la glucosa alterada, presentan alteraciones en la $[Ca^{2+}]_i$ (Kindmark et al 1994).

Un aumento en el conocimiento del desarrollo normal de las células β , así como del mecanismo y los factores que regulan la maduración de la secreción de insulina en respuesta a la glucosa, nos ayudarán a comprender mejor como algunos desajustes en este proceso pueden originar la aparición de diabetes mellitus.

III. Hipótesis

Comparado con las células adultas, las células neonatales secretan una menor cantidad de insulina y no responden adecuadamente a la glucosa. Esta inmadurez funcional podría estar relacionada con alteraciones en el acoplamiento entre el estímulo de glucosa y la secreción de insulina. Por otra parte, sí la célula β secreta NGF y expresa receptores TrkA durante el desarrollo y su señalización produce efectos tróficos que regulan la morfogénesis del islote, entonces es probable que el NGF participe también en la maduración funcional de la secreción de insulina en respuesta a la glucosa durante el desarrollo posnatal de la rata.

IV. Objetivos

Objetivos generales

Caracterizar algunos componentes del acoplamiento entre el estímulo de glucosa y la secreción de insulina, en las células β pancreáticas en dos etapas del desarrollo de la rata: neonatal y adulta.

Analizar el efecto del NGF sobre este mecanismo en células β en cultivo.

Objetivos específicos

1. Caracterizar en células β neonatales y comparar con las adultas lo siguiente:

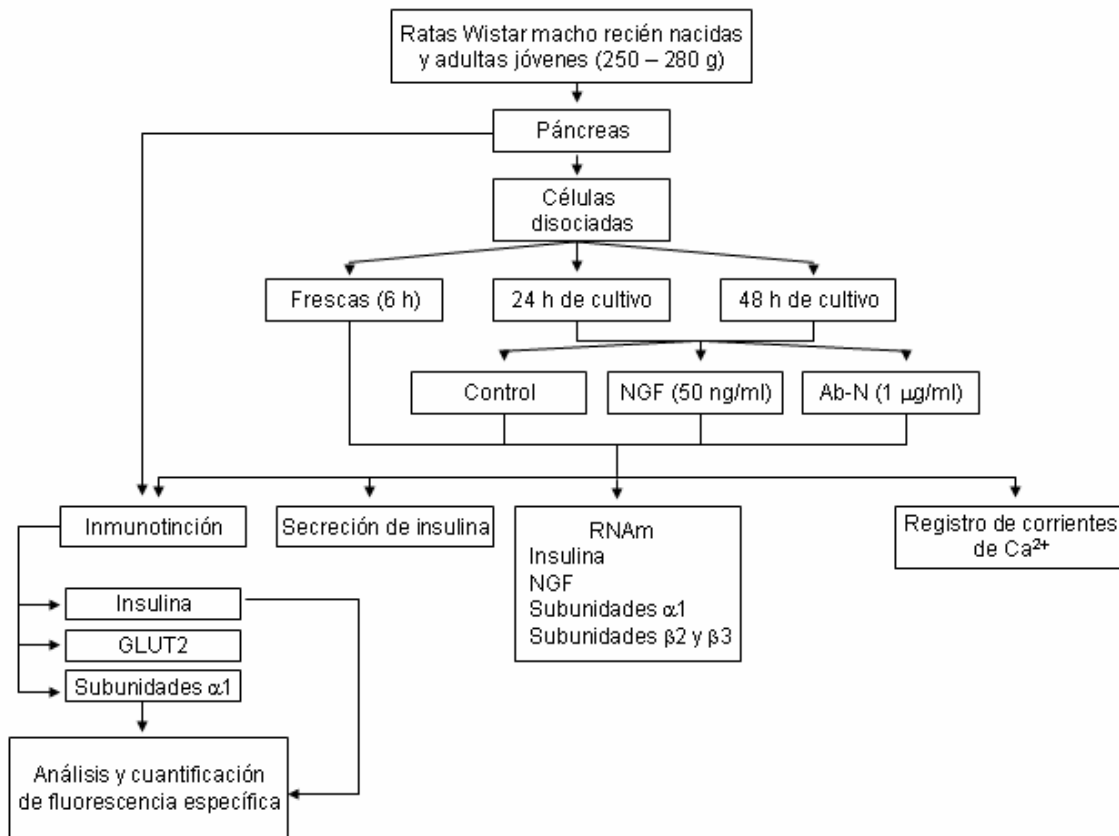
- a) Expresión del RNAm de insulina
- b) Contenido de insulina.
- c) Secreción de insulina en respuesta a la glucosa.
- d) Corriente total de calcio.
- e) Expresión de diferentes subunidades $\alpha 1$ que forman canales de calcio
- f) Participación individual en la generación de la corriente macroscópica, de los diferentes tipos de canales de calcio sensible a voltaje expresado por las células β .
- g) Participación individual de los diferentes tipos de canales de calcio en la secreción de insulina estimulada por glucosa.
- h) Expresión de las subunidades $\beta 2$ y $\beta 3$ de los canales de calcio.

2. Analizar el efecto del NGF endógeno y exógeno sobre:

- a) Secreción de insulina en respuesta a la glucosa.
- b) Contenido de insulina intracelular.
- c) Expresión de transportadores GLUT2 en la membrana celular.
- d) Corriente total de calcio.
- e) RNAm de las subunidades $\alpha 1$ de los diferentes canales de calcio expresados por las células β pancreáticas.
- f) Expresión de las subunidades $\alpha 1$ en el citoplasma y la membrana celular.
- g) RNAm de las subunidades $\beta 2$ y $\beta 3$

V. Metodología

Para alcanzar los objetivos se utilizaron diferentes técnicas que se resumen en la figura 5.1. Cada técnica se describe detalladamente en los apartados siguientes.



Materiales

Los reactivos fueron obtenidos de las siguientes fuentes: colagenasa tipo IV de Worthington (Freehold, NJ); albúmina sérica bovina (BSA), HEPES, poli-L-lisina, tripsina y todas las sales para los registros electrofisiológicos de Sigma (St. Louis, MO); cajas Petri de cultivo (Corning); suero bovino fetal de Equitech-BIO (Ingram, TX); solución de sales balanceada Hanks y RPMI-1640 (SIGMA), solución de penicilina-estreptomicina-amfotericina B de Life Technologies (Grand Island, NY) y tetrodotoxina de Calbiochem (La Jolla, CA).

Cultivo de células β pancreáticas

Los páncreas fueron obtenidos de ratas Wistar macho de un día de vida posnatal o de adultas jóvenes (250-280 g). Los islotes pancreáticos fueron aislados y separados del tejido acinar por una digestión con colagenasa y por centrifugación en un gradiente de Ficoll. Los islotes limpios fueron separados manualmente y la disociación de las células se realizó mediante la incubación de los islotes en un baño con agitación constante por 10 minutos a 37°C en solución Spinner libre de calcio, con 15 mmol/l de glucosa, 0.5 % de albúmina bovina (BSA) y 0.01 % de tripsina, seguida de agitación mecánica. Las células fueron cultivadas en medio RPMI-1640 (11.6 mmol/l de glucosa) con 1 % de suero de cabra fetal, 200 unidades/ml de penicilina G, 200 μ g/ml de estreptomicina y 0.5 μ g/ml de amfotericina B. Las células insulares fueron utilizadas después de 6 horas para los experimentos de células frescas o cultivadas por 24 ó 48 horas en condiciones control, con NGF (50 ng/ml) o con un anticuerpo neutralizante para NGF (Ab-N, 1 μ g/ml) para los demás experimentos.

Secreción de insulina

Para analizar la secreción en respuesta a la glucosa y la participación del NGF en este proceso; células β frescas o cultivadas por 48 horas en las diferentes condiciones (control, NGF o Ab-N) se incubaron por 30 minutos en solución salina Hank's (HBSS) con 5.6 mM de glucosa. Finalmente, las células fueron incubadas por 60 minutos en HBSS 5.6 o 15.6 mM de glucosa. El medio de cultivo

recuperado se mantuvo a -20°C hasta ser utilizado y la insulina secretada fue cuantificada por el método de ELISA.

El ensayo de ELISA es un inmunoensayo enzimático de dos sitios de fase sólida. Brevemente, se basa en una técnica de sandwich directa, en la cual dos anticuerpos monoclonales se dirigen contra los determinantes antigénicos por separado sobre una molécula de insulina. Durante la incubación, la insulina en la muestra reacciona con anticuerpo contra insulina conjugado con peroxidasa y el anticuerpo contra insulina que se encuentra previamente unido a la pared del pozo. El conjugado unido se detecta por una reacción con 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina. Finalmente, la reacción se detiene agregando un ácido, que produce una reacción colorimétrica, que es analizada en un espectrofotómetro.

Los experimentos se realizaron de acuerdo a las instrucciones del manual del proveedor, usando los sobrenadantes de 5×10^5 células en todos los casos.

Doble inmunotinción de insulina y subunidades $\alpha 1$ de los canales de calcio sensibles a voltaje (VGCC) y GLUT2 en células aisladas y cortes de tejido

Las células aisladas frescas o cultivadas, fueron fijadas en paraformaldehído (PFH) al 4 % en PBS, por 45 minutos a temperatura ambiente, lavadas y permeabilizadas con una solución de bloqueo que contenía 2 % albúmina sérica bovina (BSA, w/v) y 0.1 % de tritón X (v/v) por 30 minutos a temperatura ambiente. Para los cortes de páncreas se utilizó una solución de permeabilización con 1 % de tritón. Las muestras se incubaron en una cámara húmeda durante una noche a 4°C con el anticuerpo primario policlonal IgG levantado en conejo contra las

subunidades $\alpha 1B$, $\alpha 1C$, $\alpha 1D$ y $\alpha 1G$ de rata (Alomone Labs; Jerusalén, Israel) a una dilución 1:100 para células cultivadas y 1:10 para los cortes de tejido; anticuerpo policlonal levantado en conejo contra el transportador de glucosa tipo 2 (GLUT2) de rata (Chemicon International; CA, USA) a una dilución de 1:1200 para cultivos celulares y 1:600 para los cortes de tejido. Al siguiente día, las muestras se lavaron e incubaron por 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario IgG Fragmento F(ab')₂ conjugado a Cyanine 5 (CY5), levantado en cabra contra IgG de conejo (Jackson ImmunoResearch; Pennsylvania, USA). Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo primario levantado en cobayo contra insulina de rata (ICN) por 2 horas a una dilución de 1:10000 para cultivos celulares y 1:5000 para cortes de tejido, seguido de una incubación con el anticuerpo secundario conjugado a FITC levantado en cabra contra cobayo (Jackson ImmunoResearch), dilución 1:100 para cultivos celulares y 1:50 para cortes de tejidos. Las muestras se montaron en un medio que contiene 15 mM de NaN₃ (DAKO).

Se realizaron los siguientes controles negativos: 1) los anticuerpos primarios (anti-VGCC o insulina) se preabsorbieron con su antígeno correspondiente (1 μ g del péptido por 1 μ g de anticuerpo); 2) los cultivos celulares fueron tratados con el anticuerpo primario sólo ó 3) con el anticuerpo secundario solamente. Como se esperaba, las muestras mostraron, en el primer caso solamente un fondo (background) para la fluorescencia de Cy5 o FITC sin ninguna fluorescencia en los otros casos. Los controles negativos de los anticuerpos secundarios se llevaron a cabo con una incubación de las muestras, primero con el anticuerpo primario anti-

VGCC, seguido de la incubación con el anticuerpo secundario Cy5 de cabra contra conejo (dilución 1:50) y finalmente con el anticuerpo secundario diferente (por ejemplo anticuerpo FITC contra cobayo). Como se esperaba, este procedimiento mostró una buena tinción de Cy5 pero no mostró señal de FITC.

Imágenes y cuantificación de fluorescencia

Para las imágenes de inmunoreactividad específica, las inmunotinciones fueron visualizadas con microscopia de epifluorescencia, usando un microscopio invertido (Nikon Diaphot) equipado con una lámpara de mercurio de 100 W y filtros apropiados para Cy5 (excitación 647 nm, emisión 680 nm; Omega optical; Brattleboro VT, USA) y FITC (excitación 488 nm, emisión 522 nm; Omega optical). Las imágenes de fluorescencia de cada campo se obtuvieron de manera separada. Las muestras se examinaron con un alto aumento usando un objetivo de inmersión en aceite para fluorescencia (63X, 1.3 NA, Leitz Wetzlar, Germany). Las imágenes digitales fueron adquiridas con una cámara CCD digital enfriada (SenSys 0401E, Roper Scientific; Tucson AZ, USA) y la iluminación fue limitada con un shutter electrónico Uniblitz (Vincent Associates; Rochester NY, USA). Las exposiciones se cambiaron para un rango de intensidades de fluorescencia de cada muestra. Las imágenes fueron adquiridas con el programa Image-Pro Express 2.0 (Media Cybernetics; Silver Spring MD, USA) y almacenadas como imágenes en formato TIFF (8 o 12 bits de resolución).

El análisis de imágenes fue realizado con los programas Image J 1.36 (Wayne Rasband; National Institutes of Health, USA) y MetaMorph (Universal Imaging; 6.1). Para cada célula en el campo, se definió el área citoplasmática (no nuclear) y

el promedio de la intensidad de fluorescencia se cuantificó en el área de interés, así como de 3 a 8 áreas libres de células del mismo cubreobjetos (fluorescencia de fondo). La intensidad de fluorescencia corregida con el fondo (fluorescencia específica) se cuantificó en todas las células pancreáticas identificadas en 200 campos de dos cultivos independientes. Los datos de estos dos cultivos (20 animales por cultivo por condición experimental) fueron graficados.

Realizamos un análisis de la expresión de la proteína de canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática en relación al citoplasma como fue descrito previamente en Viard et al., 2004, con algunas modificaciones. Brevemente, se dibujó una línea sobre la imagen de cada célula en el campo, evitando el núcleo (MetaMorph; Universal Imaging), obteniéndose el perfil de intensidad de fluorescencia (cuantificada sobre la distancia total de la línea) (ver Figura 6.9). Los perfiles similares se dibujaron en 25 células de cada condición experimental. A partir de cada perfil de intensidad, se cuantificó el promedio de fluorescencia de 5 píxeles contiguos en la periferia de las células de ambas terminales (señal de la membrana plasmática) también como de 5 píxeles contiguos localizados a la mitad de la región citoplasmática (señal citoplasmática). Las señales de la membrana, correspondientes a cada terminal se promediaron y dividieron por el promedio de la señal citoplasmática obteniendo la relación membrana/citoplasma (M/C). El promedio de la relación M/C de todas las células se tomó como el patrón de tinción representativo para cada condición. Los resultados numéricos se graficaron con el programa Origin 3.8 (Microcal; Northampton, USA) y la composición de las imágenes se realizó con los programas Image J y Microsoft PowerPoint.

Microscopía confocal de cortes por congelación del tejido pancreático

Cortes por congelación de tejido pancreático

El tejido pancreático fue obtenido y fijado con PFH 4 % en PBS por 12 horas a 4°C. Después de lavar con PBS, los páncreas se sometieron a un gradiente de sacarosa al 10 %, 20 % y 30 % por 24 horas cada uno y finalmente se realizaron cortes de 10 µm de espesor por congelación con un criostato (Leica CM 1900).

Un día posterior a la tinción (ver apartadom correspondiente), se tomaron las imágenes de todos los cortes de cada experimento, con un microscopio confocal de barrido láser (Bio-Rad MRC 1024, Hércules, CA, USA), ensamblado a un microscopio invertido (Nikon, Diaphot 300), equipado con un objetivo de inmersión en aceite para fluorescencia 40X (Nikon Corporation). Los parámetros de excitación y emisión fueron los siguientes: para la tinción con FITC: excitación 488 nm; emisión 522 nm/DF32. Para Cy5: excitación 647 nm; emisión 680 nm/DF32. Los parámetros permanecieron fijos a través de toda la sesión. Las imágenes obtenidas a 488 y 647 nm de excitación se colectaron de manera separada o en conjunto. El análisis y procesamiento posteriores de las imágenes se realizó con el programa desarrollado por Todd Clark Breile (Confocal Assistant 4.02). Para cada condición experimental, se analizaron al menos 10 islotes de 4 páncreas diferentes.

Aislamiento del RNA citoplasmático y detección por transcriptasa reversa (RT)-PCR de los transcritos de RNAm de las subunidades de los VGCC

El RNA citoplasmático fue extraído de células frescas o cultivadas por 48 horas en condiciones control o en presencia de NGF (50 ng/ml) o de un antisuero contra NGF (1 μ M) usando TRIzol (GIBCO/BRL). Las células fueron lisadas directamente en las cajas de cultivo, 1 ml de TRIzol por 1×10^6 células. El RNA citoplasmático se transcribió de manera reversa siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante (Perking-Elmer catalogue no. N808-0143).

La reacción de RT-PCR se realizó con 200 ng del RNA total para la detección del RNAm de las subunidades $\alpha 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$ de los VGCC, insulina o NGF, usando como gen interno a la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) para propósitos cuantitativos.

Todas las secuencias de inicio (primers) se sintetizaron y se usaron como iniciadores de la amplificación del templado de DNA. Los primers usados para la amplificación fueron los siguientes: $\alpha 1B$ 5'AAAGCACAGAGCTTCTACTG3' sentido y 5'GTGGTTGGAGTCTCATCTTG 3' antisentido; $\alpha 1C$ 5'AATCTCTTC-TTGCCATTGC3' sentido y 5'CTGGAGGTC-ATCCATGTTGA 3' antisentido; $\alpha 1D$ 5'GCTGAAAGTCTGAACACTGC3' sentido y 5'AGCAGGAACCTCAGGCTCGT3' antisentido; $\alpha 1G$ 5'GAAGATGCGAGTGGACAG3' sentido y 5'CTGTGGCGATGGTCACTG3' antisentido; subunidad $\beta 2$ 5'AAGACCACAATGAGTGCAGC3' sentido y 5'ATAATGAGAGGTCAGGTATC3' antisentido; subunidad $\beta 3$ 5'CCATCCCTGGACTTCAG3' sentido y 5'CTAACGCC-AATCTAACTCC3' antisentido; insulina 5'AAGAGCCATCAGCAAGC 3' sentido y 5'GAGCAGATG-

CTGGTGCAGC3' antisentido; NGF 5'GGCATGCTGGACCCAAGCTC3' sentido y 5'GCGCTTGCTCCGGTGAGTCC3' antisentido; GAPDH 5'GCCCCCATGTTT-GTGAT3' sentido y 5'GCCCCAGCATCAAAGGT3' antisentido. Se realizaron treinta y cinco ciclos de amplificación con una temperatura de alineación de 60°C para α 1B, α 1C, α 1D, β 2 y β 3; 67°C para α 1G y 56°C para insulina y GAPDH con 16 y 20 ciclos, respectivamente, y 61°C con 30 ciclos para NGF.

Los productos de reacción fueron secuenciados y mostraron el 100 % de identidad con las secuencias reportadas para los genes de las subunidades α 1B, α 1C, α 1D, α 1G, β 2 y β 3, insulina, NGF y GAPDH genes (datos no mostrados). El material amplificado se corrió por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 % y se visualizó por una tinción con bromuro de etidio. Las bandas de PCR se analizaron con ayuda del analizador de densitometría (Typhoon).

Registros electrofisiológicos

La corriente total de calcio fue analizada en células frescas o cultivadas por 24 y 48 horas. Para analizar las corrientes de macroscópicas de calcio (Ca^{2+}) sensibles a voltaje, utilizamos la técnica de fijación de voltaje en micro áreas de membrana en la configuración de célula completa (Hamill et al., 1981), usando Ba^{2+} como acarreador de carga; se empleó un amplificador de señal Axopatch 200B (Axon Instruments, Foster City, CA), como previamente ha sido descrito (Cruz-Cruz, et al., 2005) a temperatura ambiente (20 a 22°C). Brevemente, se utilizaron tubos capilares KIMAX-51 (Kimble Glass, Vineland NJ) para los electrodos, los cuales tuvieron una resistencia en la punta de 1.5-3 M Ω . Las puntas de electrodos se

recubrieron con Sylgard (Dow Corning, Midland, MI). La solución externa consistió de (mmol/l): 125 NaCl, 5 KCl, 2 MgCL₂, 10 BaCl₂, 10 HEPES y 10 de glucosa. La solución interna contenía (mmol/l): 120 CsAsp, 10 CsCl, 5 CsF, 2.5 Cs-BAPTA, 10 HEPES y 10 CL-tetrametilamonio y 2.5 de ATP. Las corrientes de Na⁺ se bloquearon con la adición de 100 nmol/l de tetrodotoxina (TTX) a la solución externa.

Los transitorios capacitivos de la pipeta fueron cancelados antes de romper la membrana y la capacitancia celular total se determinó por la integración digital de los transitorios capacitivos con pulsos de +10 mV, a partir de un potencial de mantenimiento de -80 mV. Los transitorios capacitivos de la célula, fueron cancelados y las resistencias en serie compensadas, usando el circuito interno de fijación de voltaje. Los transitorios capacitivos lineares así como las corrientes de fuga se sustrajeron por un procedimiento en línea de P/2.

El protocolo de pulsos para el análisis de las corrientes de bario (IBa²⁺), consistieron de pulsos de prueba despolarizantes de 15 ms de duración, desde -60 a +50 mV con incrementos de 10 mV, a partir de un potencial de mantenimiento de -80 mV. Las curvas de activación de la IBa²⁺ fueron obtenidas por la conversión de los valores de la corriente al pico a conductancias (G).

$$G IBa^{2+} = IBa^{2+} / (Vm - ErBa^{2+})$$

Donde IBa²⁺ es el valor de la corriente al pico, Vm es el potencial de pulso comando y ErBa²⁺ es el potencial de inversión aparente, obtenido por la extrapolación de las relación I-V, las cuales en la mayoría de los casos fue ~ +56 mV.

Los valores de G fueron normalizados y ajustados a una relación de Boltzmann:

$$G/G_{max} = \{1 + \exp [-(V - V_{1/2})/k]\}^{-1}$$

Donde G es la conductancia al pico de IBa^{2+} , G_{max} es la conductancia máxima de IBa^{2+} , $V_{1/2}$ es el punto medio de la curva de activación, y k es el factor de activación.

Análisis estadístico

Todos los datos se informan como promedio \pm el error estándar de la media (EEM); donde n denota el número de células o experimentos. La significancia estadística específica fue obtenida con los análisis de varianza de una vía (ANOVA) y Bonferroni. La distribución de la intensidad de fluorescencia en las células en cultivo sigue una distribución de Poisson más que una distribución normal, por lo cual se utilizó una prueba estadística no paramétrica (Kolmogorov-Smirnov) para comparar los datos entre grupos (Fiordeliso y Hernández-Cruz, 2002). Las diferencias significativas obtenidas de la prueba de Kolmogorov-Smirnov se reportan como el 95% del intervalo de confianza (Stat view 4.57; Abacus Concepts, Cary, NC).

VI. Resultados

A. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LAS CÉLULAS β NEONATALES

Secreción de insulina en células β neonatales y adultas

La secreción de insulina de células β neonatales y adultas en cultivo fue examinada por ELISA, en una concentración de glucosa basal (5.6 mM) y otra estimuladora (15.6 mM). Como se ilustra en la figura 6.1, en 5.6 mM de glucosa, las células β neonatales secretan 92 % menos insulina que las células adultas y no responden a cambios en la concentración extracelular de glucosa, debido a que no hubo cambios en la insulina secretada cuando las células fueron incubadas con una concentración estimuladora de glucosa (15.6 mM).

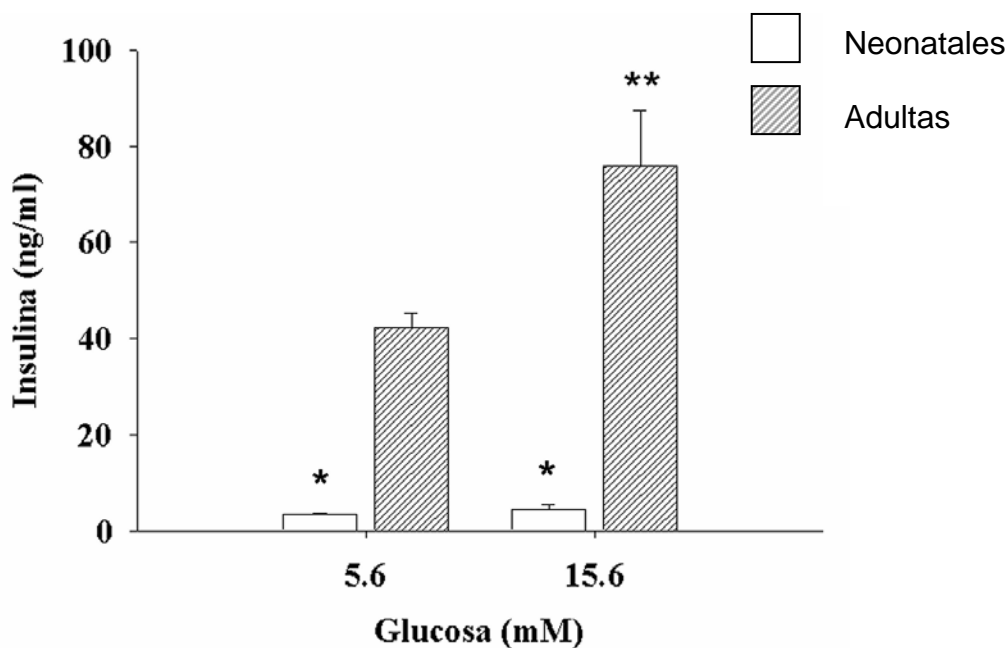


Figura 6.1. Secreción de insulina en respuesta a la glucosa en células neonatales y adultas. Las células neonatales secretan menos insulina en concentraciones basales de glucosa (5.6 mM) y carecen de la capacidad de secretar insulina en respuesta a condiciones estimuladoras de glucosa (15.6 mM). Los datos son expresados como el promedio \pm el error estándar de la media (EEM) de cuatro experimentos independientes. * $P < 0.001$ con respecto a las células adultas y ** $P < 0.01$ con respecto a 5.6 mM.

Como puede apreciarse en la figura 6.1, en una concentración basal de glucosa, las células adultas secretan 12 veces más insulina que su contraparte neonatal. Sin embargo, en contraste con estas últimas y como era de esperarse, las células adultas responden al incremento de glucosa, aumentando su secreción en un 79%. De esta manera, nuestras observaciones demuestran que comparado con las células adultas, las neonatales secretan menos insulina y carecen de la capacidad de advertir cambios en la concentración extracelular de glucosa.

Expresión del RNAm de insulina y NGF en células β neonatales y adultas

Los resultados anteriores muestran una inmadurez funcional de las células β neonatales caracterizada por una deficiente secreción de insulina y una incapacidad para responder a cambios en la concentración de glucosa. Esta deficiente secreción, podría estar relacionada a una baja síntesis de la hormona, por lo que decidimos analizar la expresión del RNAm de insulina de las células neonatales y compararla con su expresión en células adultas. En la figura 6.2 se muestra el análisis de la densitometría de los productos de PCR de insulina, en la cual se aprecia claramente que las células neonatales expresan un 40 % menos RNAm que las células adultas. Estos resultados indican que la inmadurez funcional de las células neonatales para secretar insulina está dada, al menos en parte por una menor síntesis hormonal.

Previamente, hemos demostrado que las células β de rata adulta sintetizan y secretan NGF biológicamente activo y expresan su receptor de alta afinidad TrkA (Rosenbaum et al., 1998). El TrkA se expresa desde etapas tempranas del desarrollo de la rata (Kanaka-Gaentenbein et al., 1995a) y la activación de la

señalización a través de este receptor, es necesaria para el desarrollo normal de las células β (Kanaka-Gaentenbein et al., 1995b).

Sin embargo, no se conoce con certeza si el NGF es sintetizado en etapas tempranas del desarrollo. Por lo anterior, analizamos la expresión del RNAm de NGF en células neonatales para conocer si en esta etapa del desarrollo, las células β tienen la capacidad de sintetizar esta proteína. En la figura 6.2 se muestra que las células neonatas expresan RNAm de NGF, sin embargo, de manera similar a lo que ocurre con el RNAm de insulina, en la etapa neonatal, las células expresan 20 % menos RNAm que las células adultas.

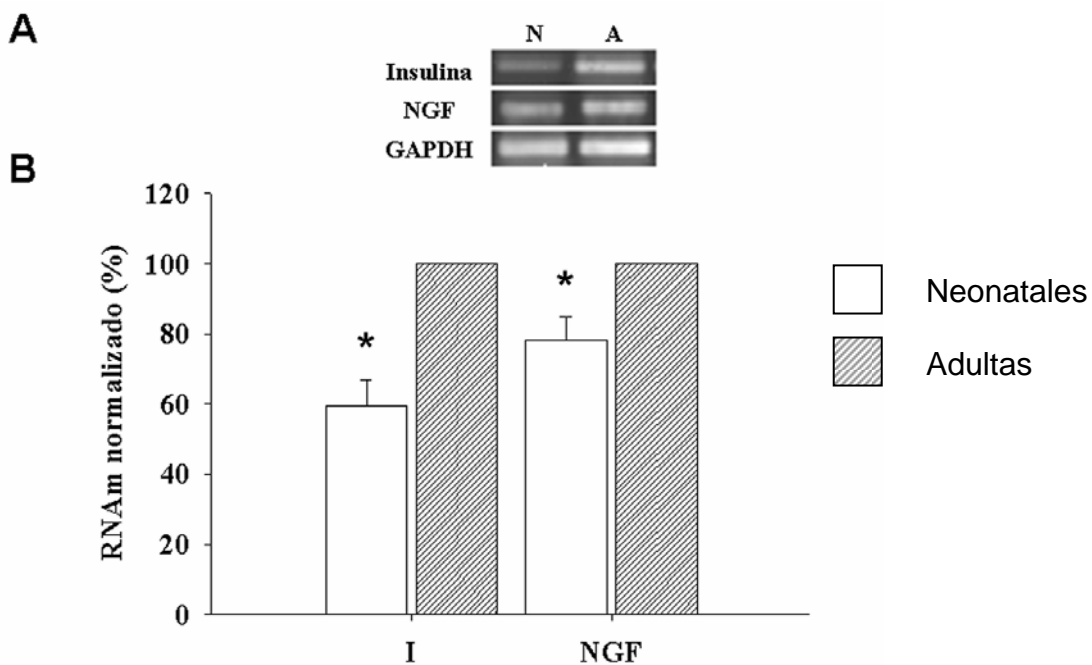


Figura 6.2. Expresión de los RNAm de insulina y NGF en células β de rata. **A)** Muestra los productos de PCR de los mensajeros de insulina, NGF y gliceraldehido fosfato deshidrogenasa (control interno, GAPDH). **B)** Muestra los niveles de expresión de ambos mensajeros. Comparado con las células adultas, las neonatales expresan 40 % y 20 % menos mensajero de insulina y NGF, respectivamente. Los datos son expresados como el promedio \pm EEM de cuatro experimentos independientes. * $P < 0.001$ con respecto a las células adultas.

Acumulación de insulina en células β neonatales y adultas

Considerando que la deficiencia en la síntesis de insulina en la etapa neonatal, pueda relacionarse con una deficiencia en la cantidad de insulina almacenada, decidimos explorar el contenido de esta hormona, por medio de un análisis cuantitativo de inmunoreactividad en imágenes digitales de células insulares en cultivo (figura 6.3A y ver métodos). El análisis cuantitativo de inmunoreactividad de las células neonatales, revela dos poblaciones celulares: células con una inmunoreactividad moderada (entre 5 y 50 unidades de fluorescencia específica (UF)) y células con una mayor inmunoreactividad (> 50 UF). El porcentaje de células en estos dos grupos fue de 64.7 y 35.3 en las células neonatales y 99.2 y 0.8 en las células adultas, respectivamente (figura 6.3B).

Contrario a lo que esperábamos, observamos que la inmunoreactividad para insulina es más fuerte en las células neonatales, en comparación con las células adultas (medianas $X_1 = 26.9$ y $X_2 = 13.6$ UF) y asumiendo una relación lineal entre la inmunoreactividad y el contenido de insulina, estos datos sugieren que las células neonatales acumulan cerca de dos veces más insulina que las células adultas.

Estos resultados demuestran que a pesar de la reducida cantidad de RNAm de insulina, la inadecuada secreción hormonal de las células β de rata neonatal lleva a una acumulación de insulina (ver figura 6.3). Esta síntesis hormonal disminuida contribuye a la menor secreción de las células neonatales, sin embargo la diferencia en la secreción hormonal de más de 10 veces entre las células adultas y neonatales y no puede ser adjudicada solamente a la diferencia del 40 % del contenido del RNAm de insulina. Es probable que la inmadurez de otro u otros de

los componentes del acoplamiento entre el estímulo de glucosa y la secreción de insulina contribuya a esta deficiencia.

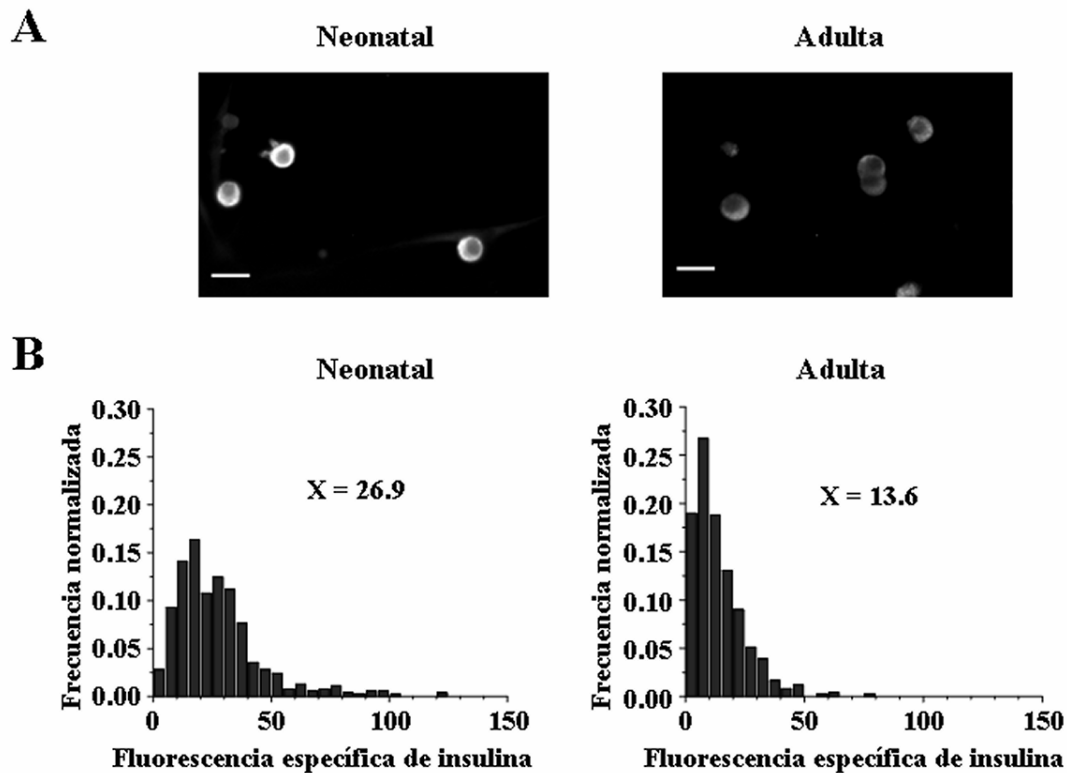


Figura 6.3. Contenido de insulina en células β de rata. A) Micrográficas representativas de células positivas para insulina de rata neonatal y adulta. **B)** Histogramas de expresión individual de fluorescencia específica de insulina. Las células neonatales tienen una mayor expresión de inmunoreacción que las adultas. Al menos 500 células fueron utilizadas para la cuantificación de la fluorescencia para cada edad y expresadas como unidades de fluorescencia (UF). X representa la mediana del histograma de fluorescencia específica de insulina.

Corrientes de Ba^{2+} registradas en células β neonatales y adultas

Un deficiente influjo de calcio (Ca^{2+}) a través de los VGCC podría ser otra causa que explique la deficiencia en la secreción en respuesta a la glucosa y con la incongruencia con la acumulación de insulina en las células β neonatales. Para evaluar esta posibilidad, se registraron las corrientes a través de los canales de Ca^{2+} de células β individuales, bajo la técnica de fijación de voltaje en su

configuración de célula completa, utilizando bario (Ba^{2+}) como acarreador de carga (ver métodos). En la figura 6.4A y B se muestran los registros de corrientes representativas, obtenidas de células neonatales y adultas, respectivamente.

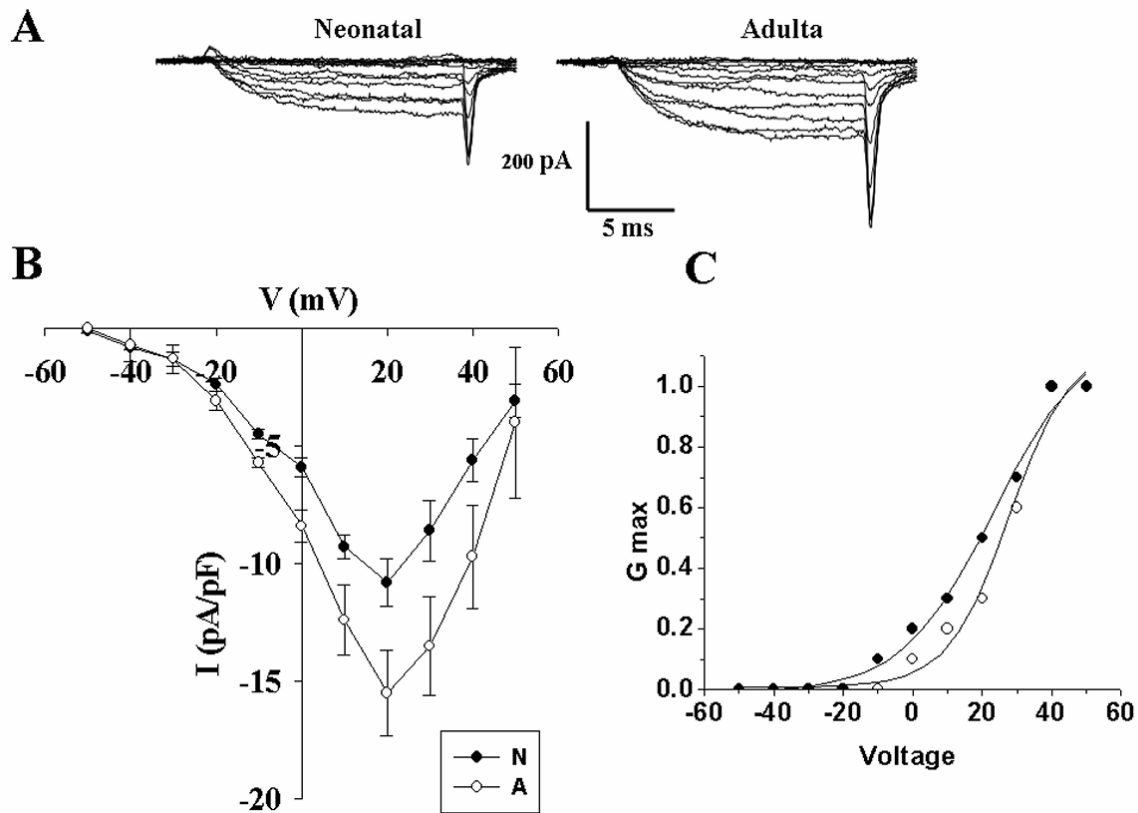


Figura 6.4. Densidad de corriente de Ba^{2+} en células β pancreáticas. A) Corrientes de Ba^{2+} representativas de células neonatales (N) y adultas (A). **B)** Densidad de corriente de Ba^{2+} ($I_{Ba^{2+}}$ pA/pF). La relación corriente y voltaje (IV) de células β pancreáticas muestra que las células neonatales (\bullet , $n = 12$) tienen menos $I_{Ba^{2+}}$ que las células adultas (\circ , $n = 10$). No se observaron diferencias en la dependencia de voltaje entre ambas edades **(C)**. Los datos son expresados como la media de la densidad de corriente \pm EEM, n indica el número de células registradas.

En la figura 6.4C se presenta la relación corriente y voltaje (I/V) de los promedios obtenidos de 12 células neonatales y 10 adultas. En ambos casos la I/V muestra dos principales componentes de la corriente de Ba^{2+} : un componente activado a bajo voltaje (LVA por sus siglas en inglés) con un umbral de activación de

alrededor de -40 mV y otro componente activado a alto voltaje (HVA por sus siglas en inglés), con un umbral de activación de alrededor de -20 mV. Estos dos componentes corresponden, respectivamente, a VGCC tipo T y L de las células adultas (Hiriart y Matteson, 1988; Barnett, et al., 1995).

La principal diferencia entre las células β neonatales y adultas, es que la densidad de la corriente de bario (IBa^{2+}) máxima al pico, es aproximadamente 30 % más pequeña en las neonatales (10.8 ± 1.0 pA/pF) comparado con las células adultas (15.5 ± 1.8 pA/pF) sin mostrar diferencias significativas en los parámetros de Boltzmann en la dependencia de voltaje para la activación (figura 6.4D y tabla 1).

Tabla 1. Parámetros de Boltzmann para la dependencia de voltaje de células β neonatales y adultas.

Parametro	Neonatas	Adultas
$Va_{1/2}$ (mV)	1.14 ± 0.08	1.08 ± 0.04
Ka	15.8 ± 2.8	16.6 ± 1.3

Estos resultados, sugieren que además de una menor síntesis de insulina, la deficiente secreción de las células neonatales está relacionada también, con una menor densidad de corriente de calcio comparado con las células adultas, lo cual explicaría el relativamente alto contenido de insulina acumulado en las células en esta etapa del desarrollo.

Los islotes pancreáticos de ratas neonatales y adultas expresan diferentes canales de calcio sensibles a voltaje

Ha sido demostrado previamente que las células β de rata adulta, expresan canales de calcio sensibles a voltaje, sin embargo no está claro qué tipo de canales expresan durante las diferentes etapas del desarrollo. Para evaluar el tipo de canales de calcio expresados en los islotes de ratas neonatales y adultas, se realizaron tinciones inmunohistoquímicas, utilizando anticuerpos primarios que reconocen a las subunidades $\alpha 1B$, $\alpha 1C$, $\alpha 1D$ y $\alpha 1G$ que forman canales de calcio tipo N, LC, LD y T, respectivamente; en cortes de tejido pancreático, paralelamente a una inmunotinción para insulina, con el fin de correlacionar la localización de ambas proteínas (ver métodos).

Como se muestra en las figuras 6.5 y 6.6, en las imágenes confocales del tejido pancreático, los islotes fueron fácilmente distinguibles del tejido acinar. En general, y dependiendo del estadio del desarrollo, la fluorescencia específica para insulina es abundante en la parte de los islotes (columna izquierda, figuras 6.5 y 6.6) con poca inmunoreactividad en la periferia de los mismos (tinción inespecífica o fondo). Es importante señalar que existen diferencias considerables en la expresión de insulina entre las células insulares, particularmente en los islotes pancreáticos de rata adulta, mientras que esta heterogeneidad es menos marcada en los islotes de ratas neonatales.

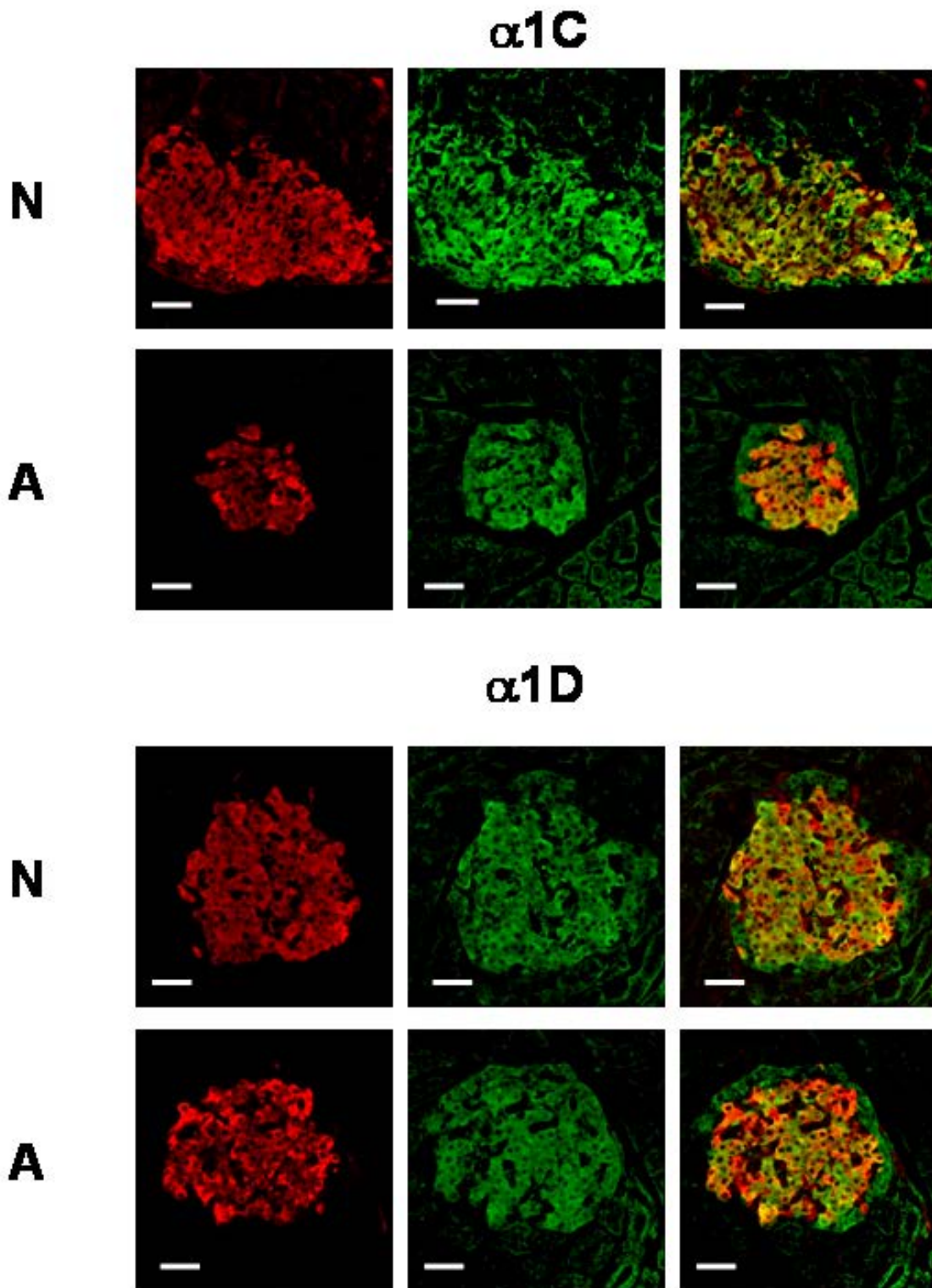


Figura 6.5. Coexpresión de insulina y $\alpha 1C$ (arriba) y $\alpha 1D$ (abajo) en islotes pancreáticos de rata. Micrografías confocales representativas de páncreas de rata neonatal (N) y adulta (A), mostrando insulina (rojo), canales de calcio (verde) y translapamiento (amarillo). Las barras representan 50 μm .

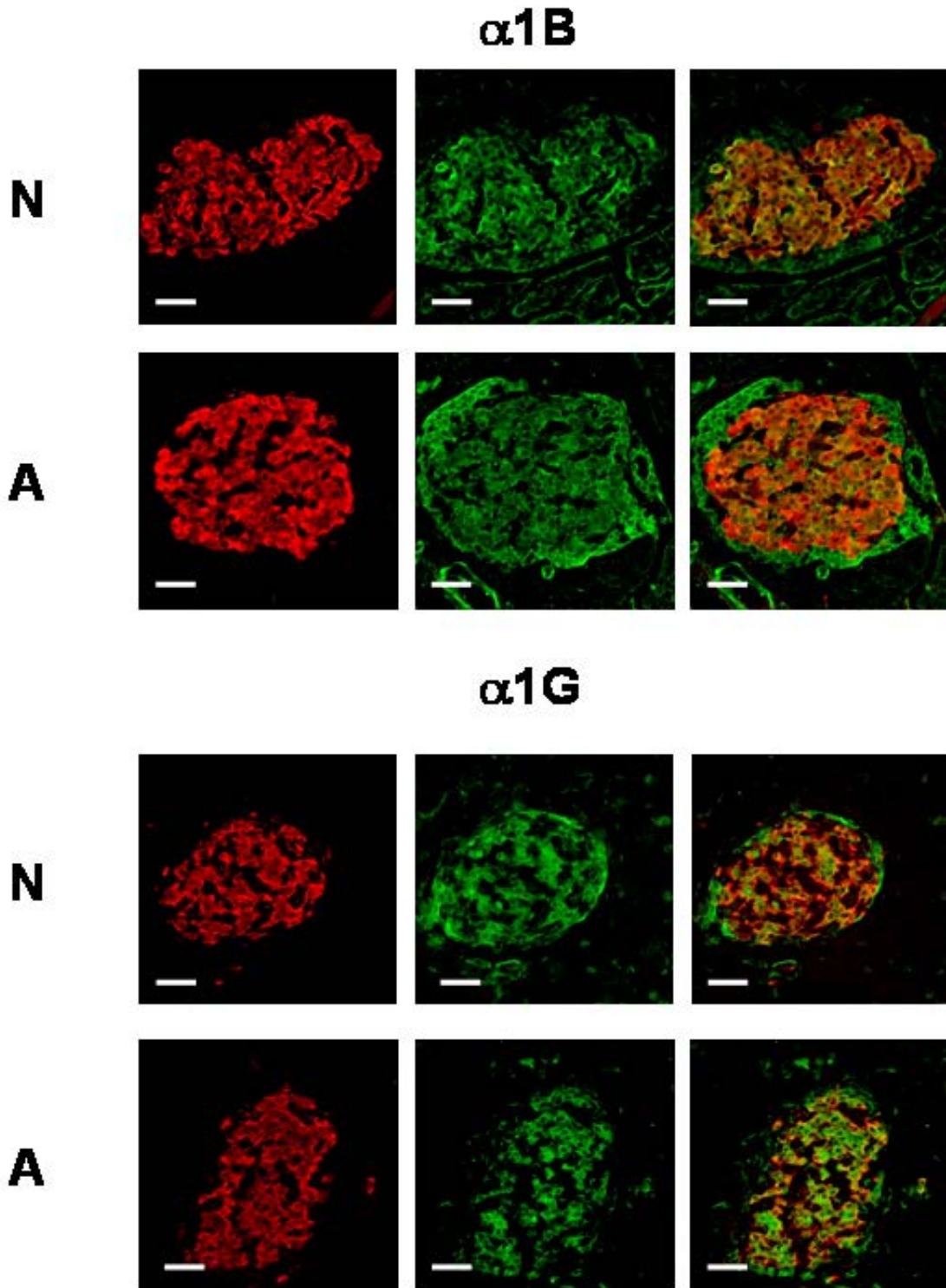


Figura 6.6. Coexpresión de insulina y $\alpha 1B$ (arriba) y $\alpha 1G$ (abajo) en islotes pancreáticos de rata. Micrografías confocales representativas de páncreas de rata neonatal (N) y adulta (A), mostrando insulina (rojo), canales de calcio (verde) y translapamiento (amarillo). Las barras representan 50 μm .

En general, tanto las células de los islotes neonatales como adultos, son inmunoreactivas a los cuatro tipos de subunidades $\alpha 1$ que fueron examinadas, pero, en contraste con la tinción de insulina, la inmunoreactividad específica para los canales de calcio aparece más ampliamente distribuida en todo el islote (columna intermedia figuras 6.5 y 6.6).

Cuando se compararon las imágenes confocales de insulina y de las subunidades $\alpha 1$, el área de células inmunoreactivas para las subunidades, parece mayor que el área de inmunoreactividad para insulina (preferentemente localizado al centro del islote, columna derecha figuras 6.5 y 6.6), que indica que existen células que expresan canales de calcio, que no son células β . Por su localización en la periferia del islote, podemos inferir que la mayoría pueden ser células α ; sin descartar la posibilidad de otro tipo de células insulares, como las células δ o PP. Así mismo, puede apreciarse, que existe una heterogeneidad en la inmunoreactividad para las diferentes subunidades que forman canales de calcio, la cual se observa tanto entre los islotes pancreáticos, como entre las células en ambas etapas del desarrollo.

Estos resultados demuestran que los islotes pancreáticos de rata en ambas edades expresan los canales de calcio tipo N, LC, LD y T y que éstos se expresan no solamente en las células positivas a insulina (β), sino también en otras células insulares.

Expresión de los RNAm que codifican a subunidades $\alpha 1$ de los VGCC en células β neonatales y adultas

Es posible que la menor ICa^{2+} registrada en las células β de rata neonatal pudiera resultar de una reducida síntesis de los RNAm que codifican para las correspondientes subunidades $\alpha 1$ que forman canales de calcio. Para evaluar esta hipótesis, se analizó por RT-PCR, la expresión del nivel de RNAm de las células β que codifica para las subunidades $\alpha 1B$, $\alpha 1C$; $\alpha 1D$ y $\alpha 1G$ que forman VGCC tipo N, L y T, respectivamente.

En la figura 6.7 se muestra que las células neonatales expresan el RNAm para los cuatro tipos de subunidades $\alpha 1$, sin embargo, la expresión del RNAm de $\alpha 1B$ es considerablemente más abundante que las otras subunidades, siendo 4.7, 2.1 y 1.2 veces más abundante que los RNAm de $\alpha 1C$, $\alpha 1D$ y $\alpha 1G$, respectivamente. Así mismo, cuando fue comparada su expresión con la de las células adultas, se encontró que las células neonatales expresan aproximadamente 70%, 60% y 53% menos RNAm que codifica para las subunidades $\alpha 1C$, $\alpha 1D$ y $\alpha 1G$, respectivamente pero el RNAm de $\alpha 1B$ fue más abundante en las células neonatales. En contraste, a pesar de que existe una tendencia a una mayor expresión de RNAm de $\alpha 1B$ en las células adultas, no hubo diferencias significativas cuando se realizó el análisis estadístico.

Estos resultados demuestran que las células neonatales y adultas expresan al menos cuatro tipos de canales de calcio; sugiriendo que la ICa^{2+} registrada es producida por los canales de calcio tipo N, LC, LD y T en ambas etapas del desarrollo.

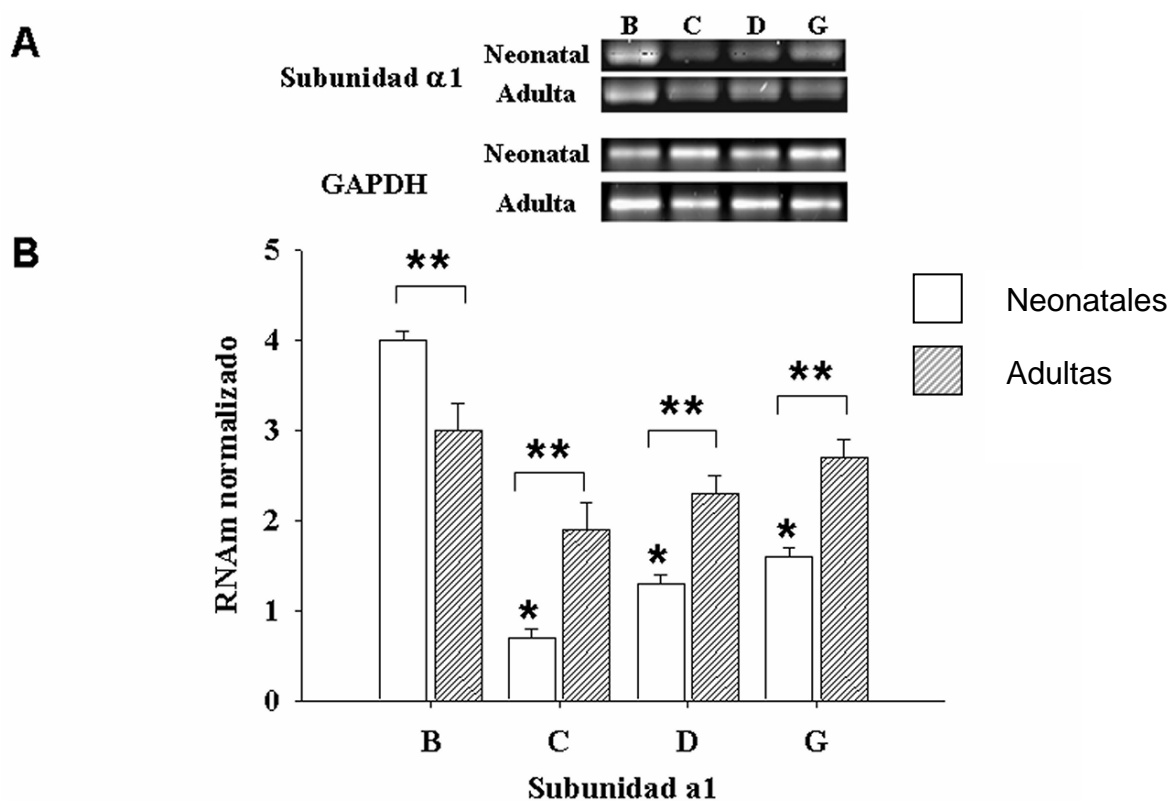


Figura 6.7. Diferencias de la expresión de los RNAm de los canales de calcio sensibles a voltaje. A) Productos de PCR para las subunidades $\alpha 1B$, $\alpha 1C$, $\alpha 1D$ y $\alpha 1G$ y GAPDH de células neonatales (N) y adultas (A). **B)** Niveles de expresión de los RNAm en células neonatales (barras negras) y adultas (barras grises). El nivel de expresión del RNAm esta normalizado con respecto al nivel de expresión del RNAm de GAPDH. Los datos son expresados como el promedio \pm EEM de tres experimentos independientes. * $P < 0.001$ respecto a la subunidad $\alpha 1B$ en las células neonatas, ** $P < 0.001$.

La inmunoreactividad para las subunidades $\alpha 1$ de los VGCC muestra una distribución subcelular

A pesar del hecho de que las células neonatales presentan corrientes de Ca^{2+} más pequeñas y menos copias de RNAm de las subunidades $\alpha 1C$, $\alpha 1D$ and $\alpha 1G$ que las células adultas, la comparación de la inmunoreactividad muestra diferencias inconsistentes para la expresión de las subunidades $\alpha 1$ entre los islotes neonatales y adultos. Así mismo, el promedio de la inmunoreactividad total en las

células insulares en cultivo, no mostró diferencias significativas en la expresión de las subunidades.

Para evaluar la posibilidad de que la incongruencia entre los resultados del análisis de las corrientes de Ca^{2+} y de la inmunoreactividad, estuviera dado por una diferencia en la distribución de los canales en compartimientos celulares (ver métodos), analizamos la inmunoreactividad para las subunidades $\alpha 1$ en células aisladas en cultivo (figura 6.8).

La figura 6.9A y B muestran ejemplos de las micrografías digitales de fluorescencia, obtenidas de las células cultivadas, inmunoteñidas para la subunidades $\alpha 1\text{B}$, $\alpha 1\text{C}$, $\alpha 1\text{D}$ y $\alpha 1\text{G}$, en las cuales se muestra claramente una distribución diferencial entre los dos compartimientos, la cual es más intensa en la periferia celular (membrana) que en el citoplasma. Es probable que este patrón de fluorescencia anular refleje la distribución predominante de las subunidades $\alpha 1$ en la membrana plasmática, la cual es menos clara en la inmunoreactividad celular en los islotes intactos (figura 6.5 y 6.6).

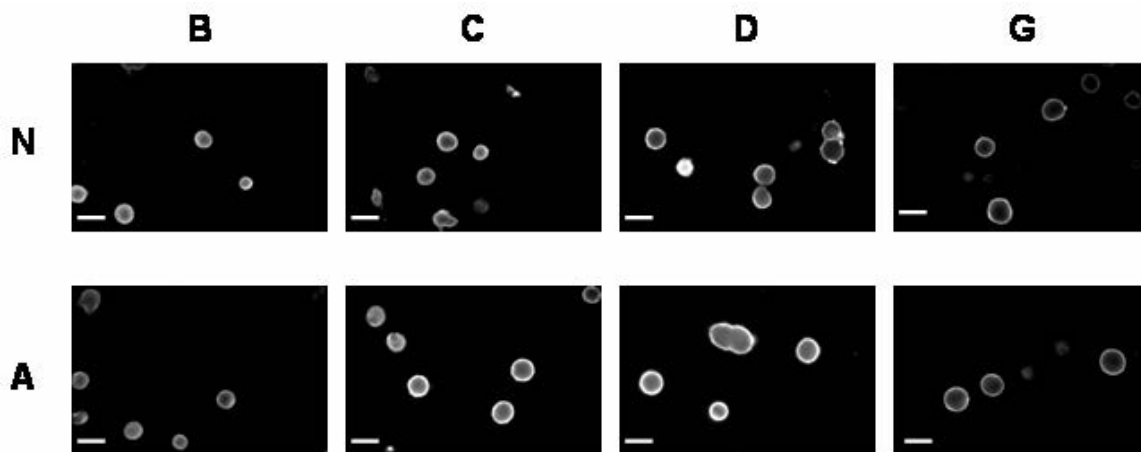


Figura 6.8. Expresión diferencial de canales de calcio. Expresión de las subunidades $\alpha 1\text{B}$, $\alpha 1\text{C}$, $\alpha 1\text{D}$ y $\alpha 1\text{G}$ que forman canales de calcio sensibles a voltaje en células β pancreáticas neonatas (N) y adultas (A). Las barras de calibración son $50 \mu\text{m}$.

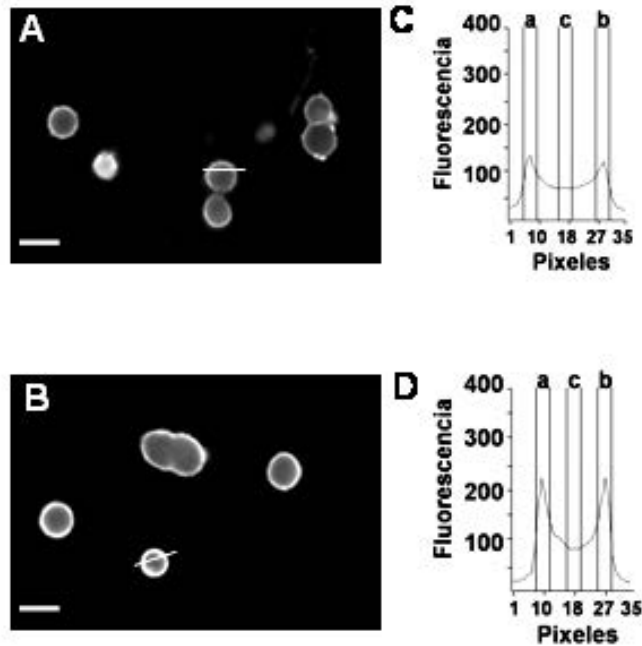


Figura 6.9. Micrografías representativas de la localización subcelular de la subunidad $\alpha 1D$ en células individuales aisladas de ratas neonatales (A) y adultas (B). La expresión de los canales en la membrana celular, difiere entre las células neonatales y adultas (C y D), los píxeles indicados en el eje de las ordenadas indica la distancia tomada en la posición indicada por la barra sobre las células. Las barras representan 36 píxeles ($10 \mu m$).

Para analizar cuantitativamente este patrón de inmunoreactividad, se cuantificó la fluorescencia en la membrana (M) y el citoplasma (C) por separado en 25 células por cada condición (ver métodos), para obtener la relación de esta expresión entre ambos compartimientos (M/C). La tabla 2 muestra que en las células neonatales, las subunidades $\alpha 1B$, $\alpha 1C$ y $\alpha 1D$ se expresan casi igual en los compartimientos de la membrana y el citoplasma, mientras que $\alpha 1G$ se expresa preferentemente en la membrana plasmática, en comparación con la expresión en las células adultas en las que los cuatro tipos de canales se sitúan preferentemente en la membrana. Estos hallazgos apoyan, que las corrientes de Ca^{2+} registradas en las células adultas son mayores que en las células neonatales debido a que las subunidades $\alpha 1$ correspondientes a los VGCC, tienden a una mayor localización

en la membrana plasmática y con una menor tendencia a localizarse en el citoplasma.

Tabla 2. Relación M/C de la expresión de subunidades $\alpha 1$ de los canales de calcio en células β de rata. * P = 0.001

Subunidad $\alpha 1$	M/C	
	Neonatas	Adultas
B	1.47 \pm 0.04	1.55 \pm 0.05
C	1.58 \pm 0.07*	2.58 \pm 0.14
D	1.55 \pm 0.07*	2.74 \pm 0.15
G	2.43 \pm 0.09*	2.88 \pm 0.19

Expresión de los RNAm que codifican para las subunidades auxiliares $\beta 2$ y $\beta 3$ de los VGCC en células β neonatales y adultas

Previamente ha sido demostrado que la expresión de las subunidades auxiliares β , es crucial para la regulación de la expresión y función de los VGCC (Nishimura et al., 1993). Por lo cual, decidimos explorar la expresión del nivel de los RNAm que codifican para las subunidades auxiliares $\beta 2$ y $\beta 3$ de los VGCC en células neonatales y fue comparado con la expresión de las células adultas.

En la figura 6.10 se muestra la expresión del RNAm para ambas subunidades, donde se aprecia que comparado con las células adultas, la expresión del RNAm de la subunidad $\beta 2$ es 40 % menos abundante en las células neonatales (figura 6.10B). Mientras que la expresión del RNAm de la subunidad $\beta 3$ es similar en las células de ambas edades del desarrollo (figura 6.10C). Nuestros resultados

sugieren que las células de rata neonatal tienen una baja expresión del RNAm de $\beta 2$, comparado con las células adultas.

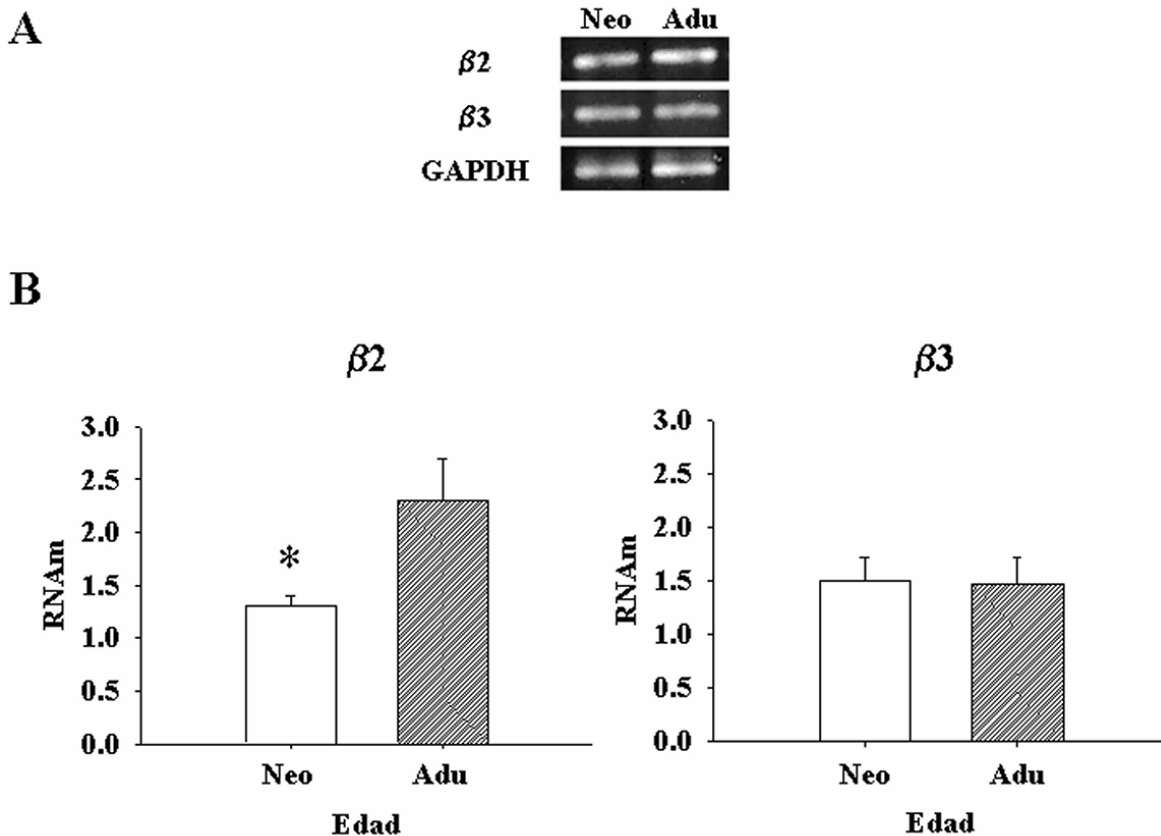


Figura 6.10. Expresión de las subunidades $\beta 2$ y $\beta 3$ en células β pancreáticas. A) Productos de PCR de células neonatales (Neo) y adultas (Adu). **B)** Niveles de expresión de los RNAm de $\beta 2$ y $\beta 3$. Los datos son expresados como la media \pm EEM de cuatro experimentos independientes.
* $P < 0.05$ con respecto a las adultas.

Es posible que debido a su importante papel en la translocación de los canales de calcio hacia la membrana celular, una síntesis disminuida de esta subunidad accesoria, pudiera disminuir el tráfico de los canales de calcio. Nosotros sugerimos que en las células neonatales, la menor densidad en la corriente de calcio en esta etapa del desarrollo, se debe a una deficiente expresión de canales funcionales en la membrana plasmática, defecto que estaría dado por dos condiciones: 1) por una menor síntesis de canales de calcio secundaria a la

síntesis disminuida de los RNAm que codifican para las subunidades $\alpha 1$ y 2) por un defecto en su translocación a la membrana; probablemente relacionado a una menor cantidad de subunidades $\beta 2$, necesarias para este proceso.

Expresión de GLUT2 en células β neonatales y adultas

Hasta ahora, nuestros resultados demuestran que la deficiente secreción hormonal de las células neonatales, se debe a la inmadurez de varios mecanismos funcionales, entre los que se encuentran: 1) menor síntesis de insulina y 2) menor densidad de corriente de calcio; relacionada a una baja síntesis de canales y una menor translocación de éstos a la membrana. Sin embargo, es importante recordar que además, las células neonatales no responden a cambios en la concentración extracelular de glucosa (ver figura 6.2). Lo que sugiere, la existencia de al menos un componente más, implicado en el desacoplamiento entre el estímulo de glucosa y la secreción de insulina en esta etapa del desarrollo.

Debido a que el primer punto en este proceso, es la entrada de glucosa a la célula a través de los transportadores GLUT2; para su posterior metabolismo y subsiguiente generación de ATP, que permite el acoplamiento con la actividad eléctrica celular, decidimos evaluar la expresión de GLUT2 por medio de tinciones inmunohistoquímicas.

La figura 6.11A y B muestra imágenes representativas de cortes de tejido pancreático de rata neonatal y adulta donde se muestra que los islotes neonatales expresan GLUT2, pero con una menor inmunoreactividad que los islotes adultos.

Además, se puede apreciar que en las células insulares, la expresión del transportador se sitúa preferentemente en la membrana citoplasmática, mientras que en los neonatales, la expresión parece ser igual en la membrana y en el citoplasma.

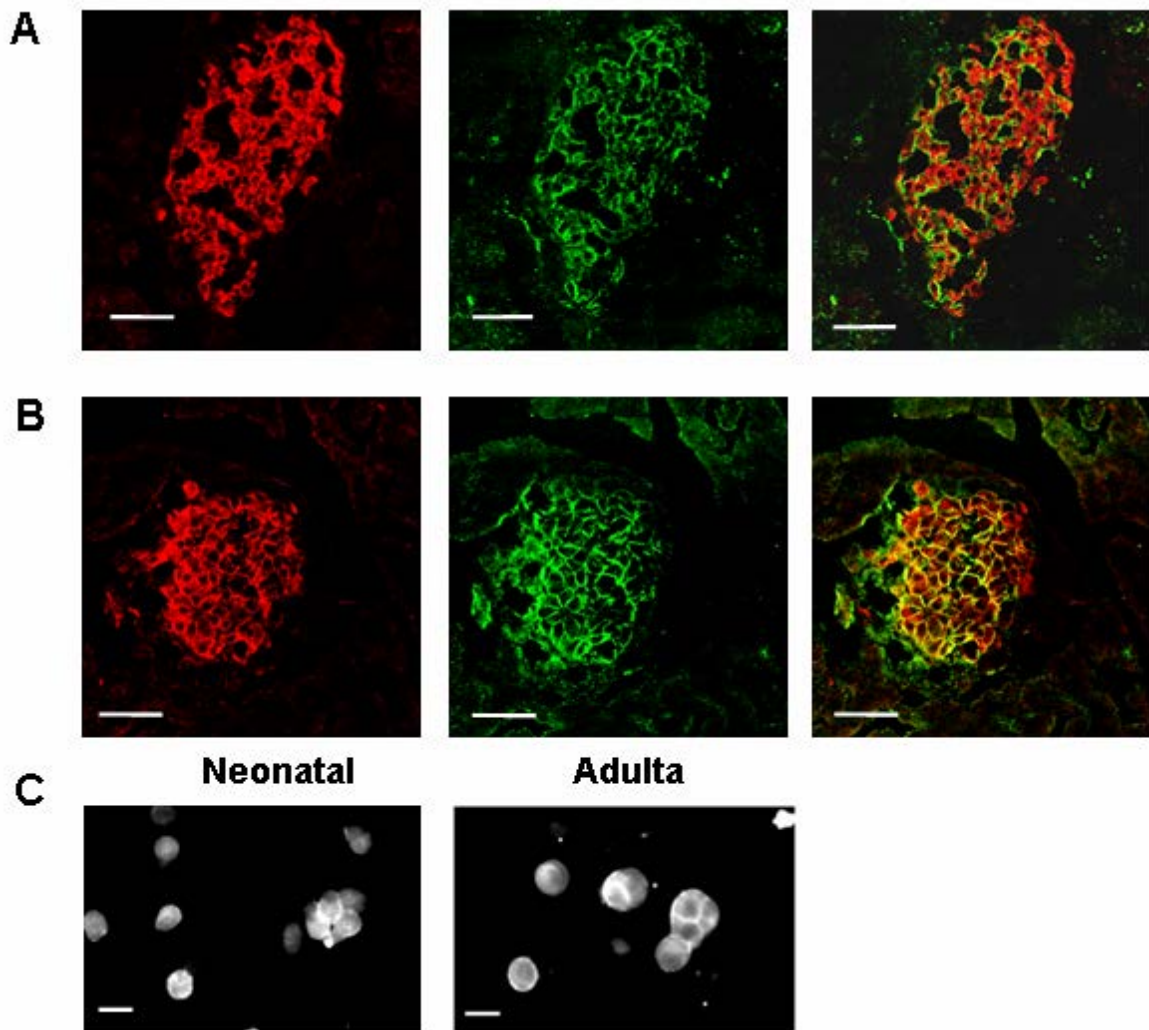


Figura 6.11. Expresión de los transportadores GLUT2 en islotes pancreáticos de rata neonatal (A) y adulta (B). Micrografías confocales de islotes neonatales y adultos mostrando insulina (rojo), GLUT2 (verde) y translapamiento (amarillo); las barras son 50 μm . C) Mostrando la expresión de GLUT2 en células β aisladas de rata neonatal y adulta; las barras son 10 μm .

Paralelamente se analizó la inmunoreactividad para GLUT2 en células insulares aisladas. La figura 6.11C muestra un patrón de expresión similar a las figuras 6.11A y B, pero se aprecia de manera más clara que las células neonatales expresan el transportador, pero no existe una diferencia apreciable entre su expresión en la membrana y el citoplasma. Mientras que en las células adultas, existe una expresión mayor en la periferia celular, que corresponde al área de la membrana. Estos resultados apoyan la idea de que una de las razones por la cual las células β neonatales son insensibles a la glucosa extracelular, es debido a una menor densidad de transportadores GLUT2 en la membrana citoplasmática, con un subsiguiente transporte de glucosa transmembranal reducido.

B. EFECTOS TROFICOS DEL NGF EN LA MADURACIÓN FUNCIONAL DE LAS CÉLULAS β NEONATALES

El NGF incrementa la secreción de insulina y promueve la sensibilidad a la glucosa

Previamente hemos demostrado, que las células β de rata adulta expresan el receptor de alta afinidad para el NGF (TrkA), sintetizan y secretan NGF biológicamente activo (Rosenbaum et al., 1998), el cual aumenta la secreción de insulina en respuesta a la glucosa, por un mecanismo que implica el aumento de corrientes de calcio sensibles a voltaje (Rosenbaum et al., 2000). Así mismo, se ha demostrado que el TrkA se expresa desde etapas tempranas del desarrollo pancreático y que su señalización es necesaria para el desarrollo normal de los islotes y de las células β (Kanaka-Gaentenbein et al., 1995). De esta manera, decidimos analizar si el NGF podría ser un factor trófico en la maduración funcional de las células β en la etapa neonatal. Para esto, exploramos la participación del NGF en la secreción de insulina basal y estimulada por alta glucosa.

Las células neonatales y adultas fueron cultivadas por 48 horas en condiciones control o en presencia de NGF (50 ng/ml) o con antisuero contra NGF (Ab-N, 1 μ g/ml) y estimuladas con 5.6 o 15.6 mM de glucosa. El NGF promueve la capacidad de secretar insulina en respuesta al cambio en la concentración extracelular de glucosa (figura 6.12), ya que en las células cultivadas en presencia del factor y estimuladas con 15.6 mM de glucosa, la secreción de insulina aumentó

3.4 veces con respecto a las células control, mientras que la secreción basal no fue afectada (5.6 mM de glucosa).

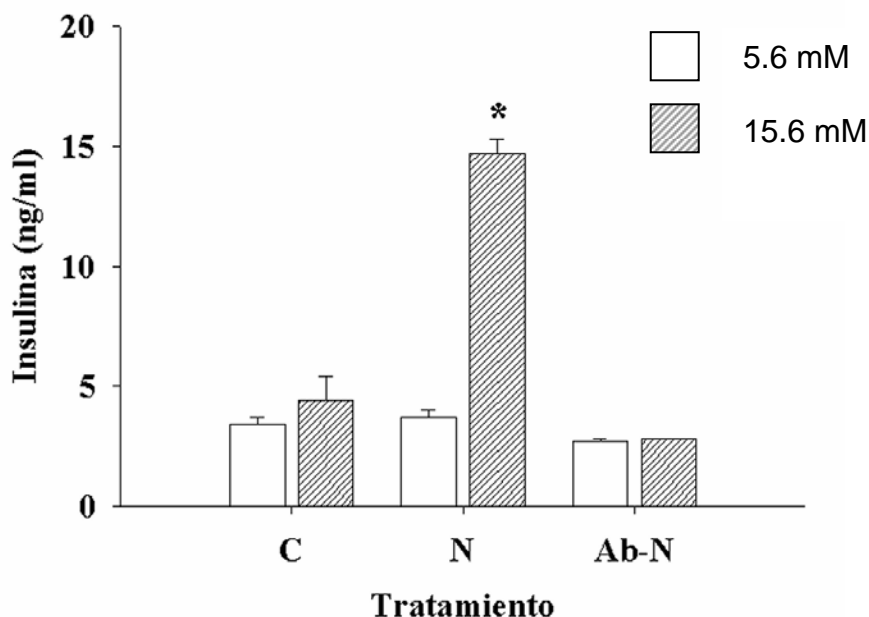


Figura 6.12. Efectos del NGF en la secreción de insulina estimulada por glucosa en células β neonatales. Comparado con los controles (C), el NGF (N) incrementa la secreción de insulina estimulada por 15.6 mM de glucosa sin afectar la secreción basal en 5.6 mM glucosa. En contraste, el anticuerpo contra NGF (Ab-N) no afectó la secreción en ninguna de las concentraciones de glucosa. Los datos son expresados como el promedio de tres experimentos independientes \pm EEM. * $P < 0.001$ con respecto a las células control.

Paralelamente, exploramos los efectos autocrinos del NGF en la secreción estimulada por glucosa, neutralizando el NGF secretado por las mismas células, con ayuda de un anticuerpo específico. Como se muestra en la figura 6.12, en presencia del anticuerpo, existe una tendencia al descenso de la secreción, tanto en una condición basal de glucosa como en la estimuladora, sin embargo no hubo diferencias significativas cuando fueron comparados con la secreción de las células control. A pesar de que el NGF incrementó de manera importante la secreción de insulina en respuesta a 15.6 mM de glucosa, la cantidad de hormona secretada en ambas concentraciones de glucosa sigue siendo mucho menor,

representando sólo el 8 % de la secreción de las células adultas, cultivadas en las mismas condiciones (figura 6.13).

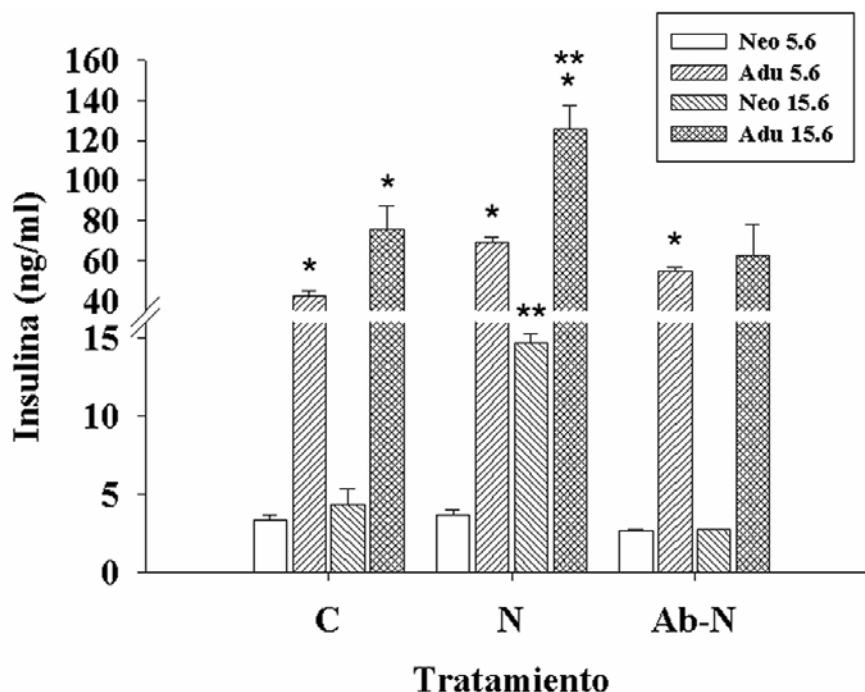


Figura 6.13. Comparación de la secreción de insulina en células β de rata. En comparación con las células adultas (adu), las neonatales (Neo) secretan menos insulina en ambas concentraciones de glucosa, a pesar del aumento estimulado por el NGF (N) en células cultivadas. El anticuerpo contra NGF (Ab-N) disminuyó la secreción basal sólo en las células adultas cuando fue comparada con los controles. Los datos son expresados como el promedio de tres experimentos independientes \pm EEM. * $P < 0.001$ con respecto a las neonatales ** $P < 0.001$ respecto a 5.6 mM glucosa.

El NGF aumenta la síntesis de insulina y de NGF en las células neonatales

Debido a que el NGF es un factor trófico importante que modula la síntesis de insulina en las células β de rata adulta, decidimos explorar el nivel de expresión del RNAm de insulina y su modulación por NGF en las células neonatales. Para lo anterior, las células disociadas fueron cultivadas por 48 horas en condiciones control, con NGF o Ab-N y se analizaron los niveles de RNAm de insulina. La figura 6.14 muestra que comparado con las células control, el NGF aumenta la

expresión del RNAm de alrededor de 39 %, mientras que el Ab-N lo disminuye en un 48 %. Estos datos sugieren que el NGF endógeno es importante para mantener la síntesis de insulina, mientras que el NGF exógeno promueve el incremento en la síntesis hormonal. En contraste, en las células adultas el NGF aumenta el nivel de RNAm de insulina en un 23 % con respecto a las células control, sin embargo el tratamiento con Ab-N no mostró diferencias significativas cuando fueron comparados con los controles.

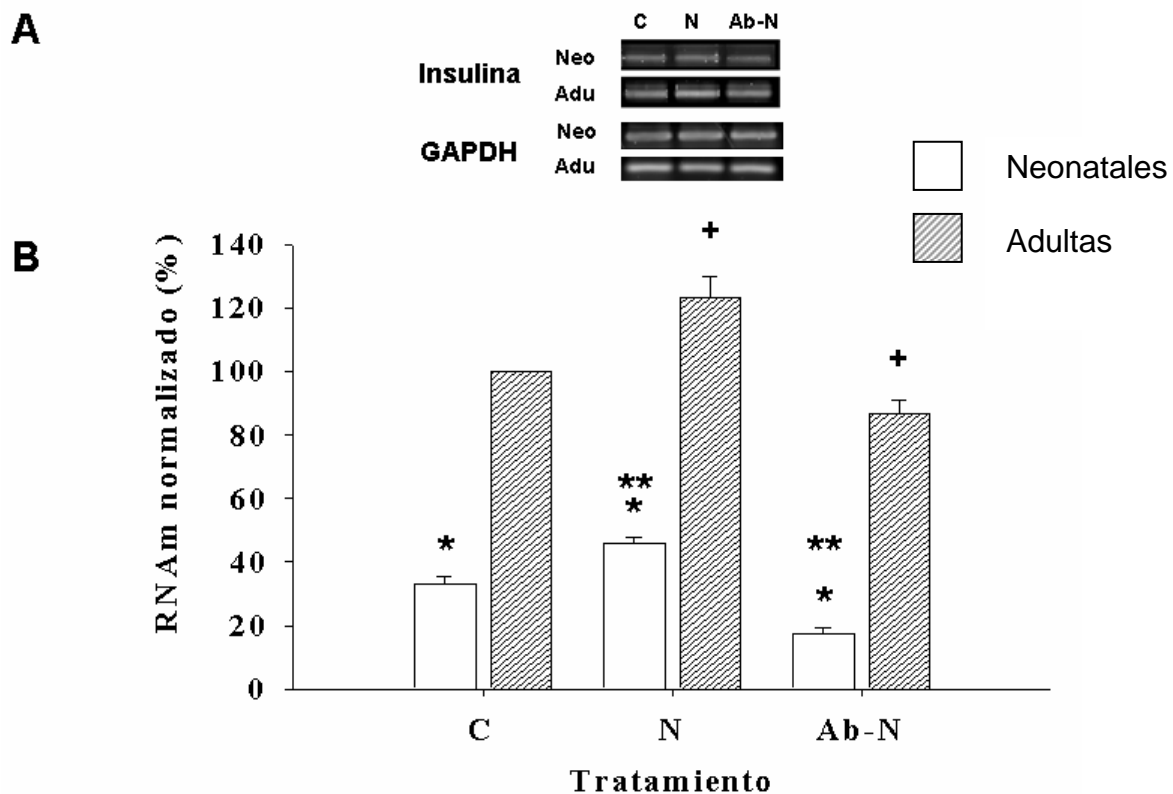


Figura 6.14. Efectos del NGF sobre la expresión del RNAm de insulina en células neonatales (Neo) y adultas (Adu) cultivadas por 48 h. A) Productos de PCR de insulina y GAPDH de células cultivadas en condiciones control (C) o con NGF (N) o con un anticuerpo contra NGF (Ab-N). **B)** Niveles de expresión del RNAm de insulina de células neonatales y adultas. Los datos son expresados como el promedio de tres experimentos independientes \pm EEM. * $P < 0.001$ con respecto a las adultas, **, + $P <$ con respecto a sus controles.

Paralelamente, exploramos la expresión del RNAm de NGF y su modulación por NGF en las células cultivadas en las mismas condiciones que se mencionaron

arriba. La figura 6.15 muestra que comparado con las células control, el NGF incrementa su propio RNAm en un 53 %, sin embargo el tratamiento con Ab-N no afectó su expresión. En contraste con las células neonatales, en las adultas, el tratamiento con Ab-N disminuyó la expresión del RNAm de NGF en un 15 %, mientras que el NGF exógeno no modificó su expresión, sugiriendo una saturación del efecto del NGF por el factor endógeno.

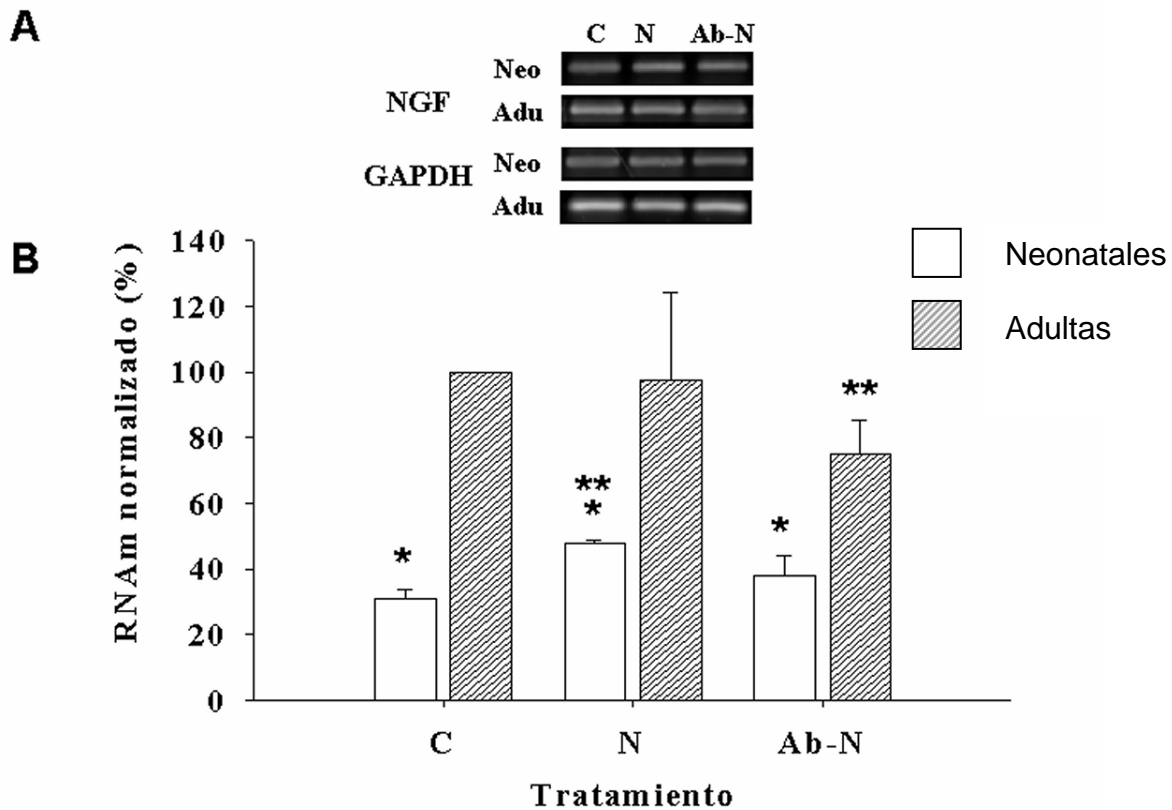


Figura 6.15. Efectos del NGF sobre la expresión del RNAm de NGF en células neonatas (Neo) y adultas (Adu) cultivadas por 48 h. A) Productos de PCR de NGF y GAPDH de células cultivadas en condiciones control (C) o con NGF (N) o con un anticuerpo contra NGF (Ab-N). **B)** Niveles de expresión del RNAm de insulina de células neonatales y adultas. Los datos son expresados como el promedio de tres experimentos independientes \pm EEM. * $P < 0.001$ con respecto a las adultas, **, + $P <$ con respecto a sus controles.

El NGF modula la acumulación de insulina en las células β en cultivo

Nuestras observaciones indican que el NGF exógeno promueve la sensibilidad a la glucosa, aumentando la secreción de insulina, y el nivel de RNAm de esta hormona (figuras 6.12 y 6.14). Así mismo, como se mostró previamente, en las células frescas, comparado con las células adultas, las neonatales tienen una mayor inmunoreactividad de insulina en el citoplasma (figura 6.3). Considerando que en las células neonatales, el tratamiento con NGF incrementa la secreción en respuesta a alta glucosa y la síntesis de insulina, decidimos analizar los cambios en la inmunoreactividad para insulina, modulados por NGF, en células β disociadas en cultivo.

La figura 6.16 muestra que de acuerdo a su inmunoreactividad, existen dos principales poblaciones: a) células que tienen poca insulina y b) células con un alto contenido de esta hormona, representadas por dos modas (X_1 y X_2 , respectivamente).

En todas las condiciones, existen dos poblaciones que difieren en su inmunoreactividad, en el caso de las células control, se observan dos diferentes distribuciones: células que expresan poca insulina ($X_1 = 12$) y células que expresan más insulina ($X_2 = 85$), mientras que en presencia de NGF, se siguen observando las dos poblaciones pero existe una redistribución de las mismas, ya que comparado con las células control, en las células tratadas con el factor, existe un descenso en la segunda población; disminuyendo principalmente a las células que expresan más de 100 UF; y aumentando la población que expresa alrededor de 50 UF. Si comparamos las poblaciones de las células tratadas con NGF con las poblaciones de las células control, podemos apreciar que la inmunoreactividad

disminuyó en un 44.7 % el valor promedio en la segunda población ($X_2 = 47$ UF contra 85 UF de los controles) y una disminución del 41 % en la primera ($X_1 = 7$ UF contra 12 UF de los controles). Así mismo, el tratamiento con Ab-N también causó una redistribución de las poblaciones, disminuyendo en un 47 % la inmunofluorescencia de insulina en la segunda población ($X_2 = 45$ UF contra 85 UF de los controles) y de un 58 % en la primera ($X_1 = 5$ contra 12 de los controles). Estos datos demuestran que ambos tratamientos producen un desplazamiento a la izquierda de las poblaciones, incrementando el número de células que tienen una baja inmunoreactividad y prácticamente desapareciendo las células con una inmunoreactividad alta (más de 100 UF).

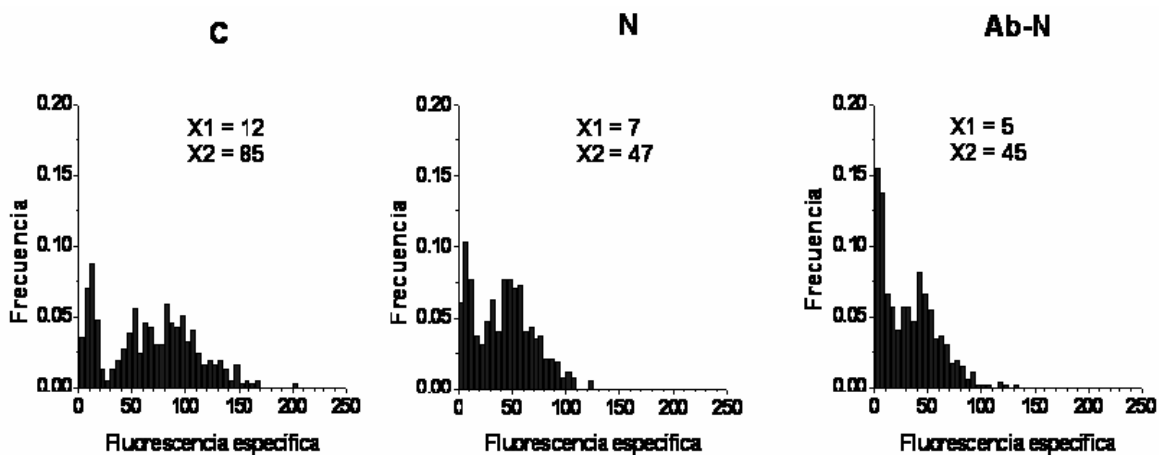


Figura 6.16. Efectos del NGF sobre el contenido de insulina en células neonatales cultivadas por 48 h. Con respecto al nivel de inmunoreactividad para insulina, los histogramas muestran que en todas las condiciones, existen dos poblaciones: una con menor (X_1) y otra con mayor expresión (X_2). Con respecto a los controles (C), tanto el NGF (N) como el anticuerpo contra NGF (Ab-N) disminuyen el contenido de insulina, pero conservando ambas poblaciones. X_1 y X_2 denotan las medianas. Al menos 500 células fueron analizadas en cada condición.

Nuestros datos sugieren que en las células neonatales, donde existe una deficiente secreción y a pesar que exista una menor síntesis hormonal, la insulina se acumula en el citoplasma, mientras que en las células adultas, debido a su alta

secreción, es baja la acumulación de la hormona. En tal caso, en las células cultivadas en presencia de NGF, debido a que el factor incrementa la secreción hormonal, la acumulación disminuye, mientras que en las células tratadas con Ab-N, el aumento en la inmunoreacción de insulina sería resultado de la disminución en la síntesis hormonal secundaria a la supresión del NGF endógeno (figura 6.14).

El NGF aumenta la IBA²⁺ en células β neonatales

Resultados previos de nuestro laboratorio han demostrado que el NGF incrementa la IBA²⁺ en células adultas en cultivo (Rosenbaum et al., 2002), por lo que decidimos analizar los efectos del NGF sobre las corrientes macroscópicas de calcio en células neonatales y adultas, para saber si el NGF es un factor trófico que module las corrientes de Ba²⁺ desde la etapa neonatal. Para determinar los efectos del NGF sobre la densidad de IBA²⁺ en las células β , se cultivaron células neonatales y adultas durante 24 y 48 horas con NGF para conocer el tiempo mínimo que necesitan las células neonatales para responder al factor; paralelamente se cultivaron células en presencia de un anticuerpo contra NGF (Ab-N) para analizar sus efecto autocrinos.

La figura 6.17 muestra la relación I/V de las células neonatales que fueron cultivadas por 24 h, donde se observa que a este tiempo de cultivo, el NGF aún no produce modificaciones en la densidad de la corriente de Ba²⁺.

Después de 48 horas en cultivo, en células neonatales la IBA²⁺ sigue siendo aproximadamente 28 % menor que en las células adultas. Sin embargo, a este tiempo de cultivo, podemos observar que en las células cultivadas en presencia de NGF, incrementa la IBA²⁺ (figura 6.18). El NGF exógeno incrementó la IBA²⁺ de las

células neonatales en un 90 %, comparado con los controles, mientras que el tratamiento con Ab-N, la disminuyó en un 46 % (figura 6.18B), sin alterar la dependencia de voltaje para la activación (figura 6.18E).

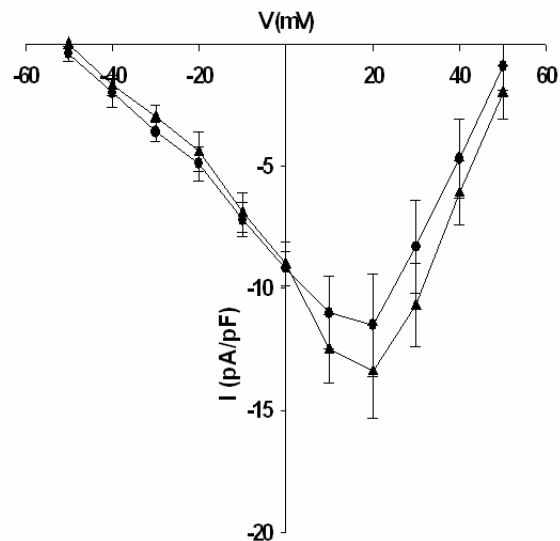


Figura 6.17. Efectos del NGF sobre la corriente de Ba^{2+} en células β de rata neonatal cultivadas por 24 h. Con respecto a los controles (\bullet , $n = 9$), el NGF (\blacktriangle , $n = 17$) no tiene efectos sobre la IBa^{2+} . Los datos son expresados como la media de la densidad de corriente \pm EEM, n indica el número de células registradas.

Es importante notar que después de 48 horas de tratamiento con Ab-N, se aprecia una corriente persistente de IBa^{2+} , la cual se activada alrededor de -20 mV y que alcanza un pico de corriente alrededor de +20 mV (figura 6.18D). Esto sugiere la presencia de una corriente HVA remanente, que es insensible al tratamiento con Ab-N.

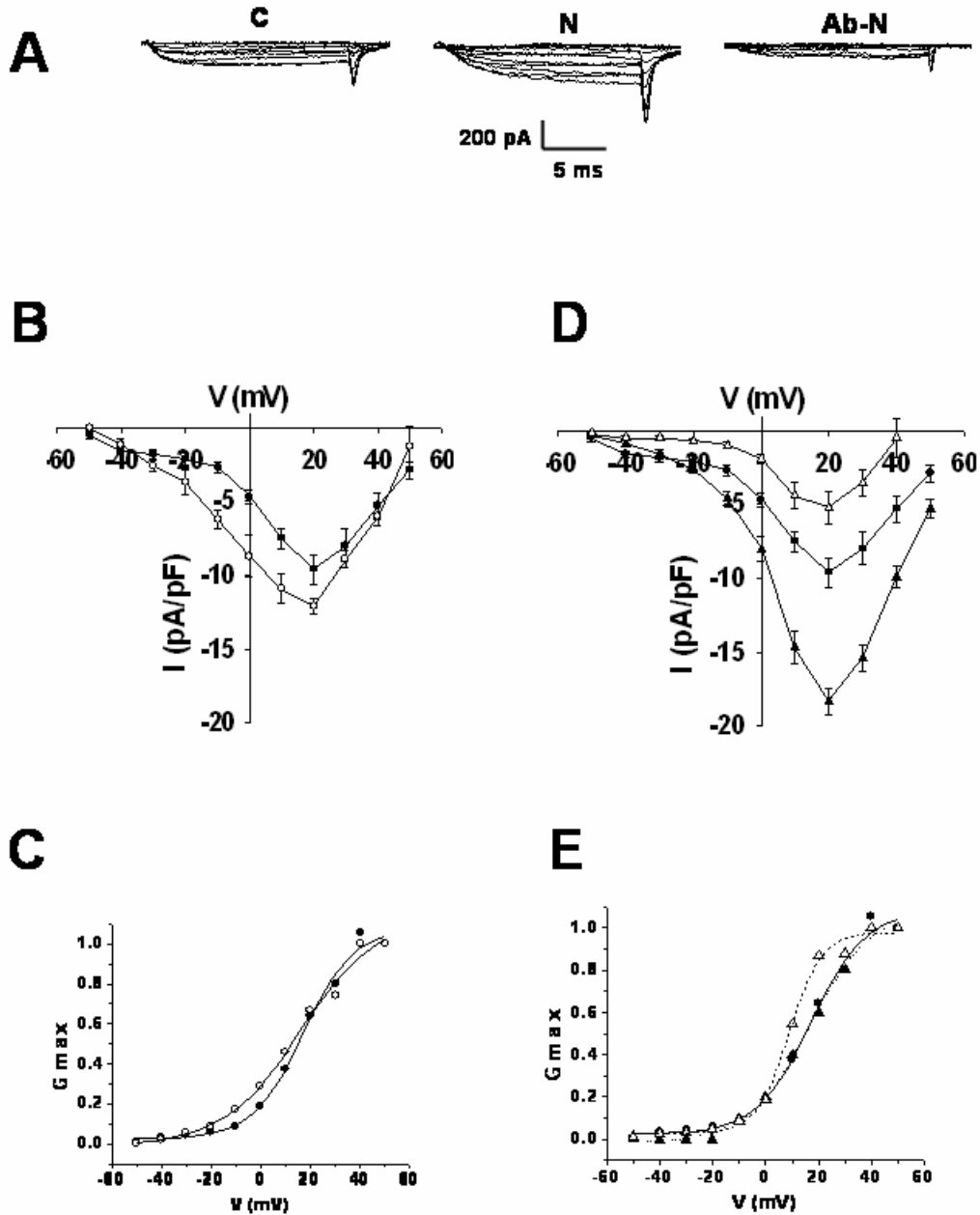


Figura 6.18. Efectos del NGF sobre la corriente de Ba^{2+} en células β pancreáticas cultivadas por 48 h. A) Corrientes de Ba^{2+} representativas de células neonatales cultivadas en condiciones control (C), con NGF (N) o con anticuerpo contra NGF (Ab-N). **B)** $I_{Ba^{2+}}$ (pA/pF) de células neonatales (\bullet , $n = 12$) o adultas (\circ , $n = 10$) en condiciones control. **D)** Efectos del NGF sobre la $I_{Ba^{2+}}$. Con respecto a los controles (\circ , $n = 7$), el NGF incrementa la $I_{Ba^{2+}}$ (\blacktriangle , $n = 27$), mientras que la supresión del NGF disminuye la $I_{Ba^{2+}}$ (\triangle , $n = 13$) de la supresión del NGF endógeno sobre la densidad de corriente $I_{Ba^{2+}}$ de células β de ratas neonatales. No se apreciaron diferencias en la dependencia de en el voltaje de las $I_{Ba^{2+}}$ entre ambas edades (**C**) o entre tratamientos (**E**). Los datos son expresados como la media de la densidad de corriente \pm EEM, n indica el número de células registradas.

Con respecto a las células adultas, no se apreciaron efectos del NGF sobre la IBa^{2+} , a las 48 h de cultivo (figura 6.19). Estos resultados sugieren que las neonatales responden más tempranamente al factor que las células adultas, que necesitan al menos cuatro días para incrementar la densidad de corriente de calcio.

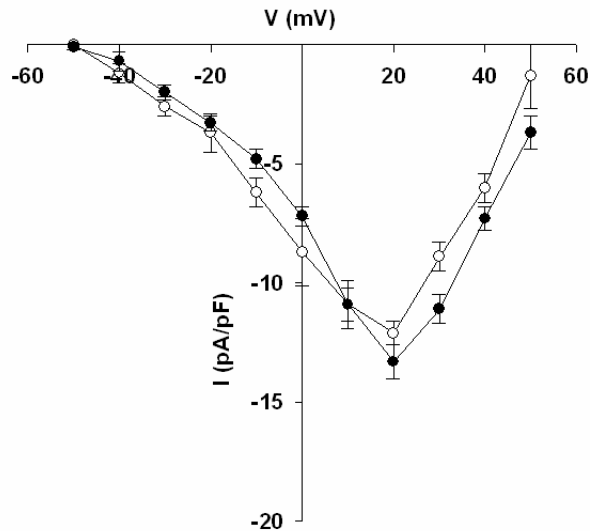


Figura 6.19. IBa^{2+} de células β de rata adulta cultivadas por 48 h. No se observaron diferencias significativas en la IBa^{2+} de las células cultivadas con NGF (●, n = 6) con respecto a las células control (○, n = 22). Los datos son expresados como media de la densidad de corriente \pm EEM.

El incremento en corriente de Ba^{2+} modulado por NGF, está dado por un aumento en el número de canales funcionales en la membrana plasmática

El incremento en la densidad de corriente en las células neonatales cultivadas con NGF podría explicarse por dos mecanismos: un aumento en la síntesis de canales de calcio o bien un aumento en el número de canales funcionales en la membrana citoplasmática. Para discernir entre las dos posibilidades, decidimos analizar la expresión de los RNAm que codifican diferentes subunidades $\alpha 1$ de los canales de

calcio. Sin embargo, los niveles de expresión de los RNAm de las subunidades que forman canales de calcio, no se modifican cuando las células son cultivadas en presencia del factor, ni tampoco cuando se ha suprimido el factor endógeno con ayuda del anticuerpo contra NGF (Figura 6.20).

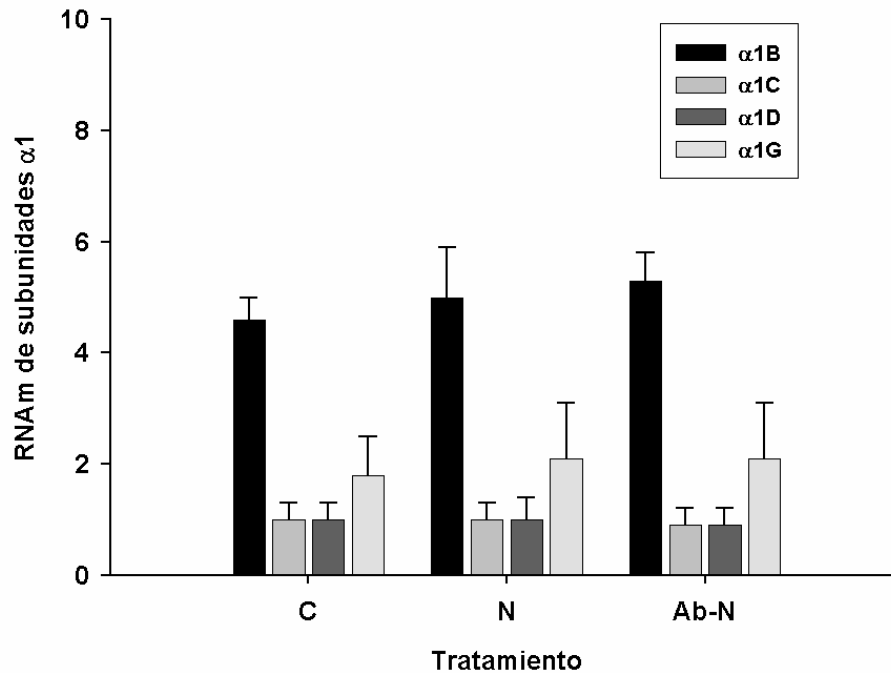


Figura 6.20. Efectos del NGF en los niveles de RNAm de las subunidades $\alpha 1$ de los canales de calcio en células neonatales. Las células fueron cultivadas por 48 h en condiciones control (C), con NGF (N) o con un anticuerpo contra NGF (Ab-N). Ninguno de los tratamientos afectaron los niveles de RNAm de las subunidades $\alpha 1B$, C, D y G, que forman canales de calcio tipo N, L y T, respectivamente.

Para explorar la posibilidad que el efecto del NGF sobre las corrientes de calcio esté dado por un incremento de la translocación de canales a la membrana, se analizó la expresión de las subunidades $\alpha 1$ en la membrana y el citoplasma por separado y se obtuvo la relación M/C como previamente fue explicado (figura 6.9 y ver materiales y métodos). La tabla 3 muestra que con respecto a las células

control, el tratamiento con NGF incrementa la relación M/C en la expresión de $\alpha 1D$ (canales tipo L), sin afectar la expresión de otro tipo de canales. En contraste, el tratamiento con Ab-N disminuye la expresión en la membrana de las subunidades $\alpha 1 D$ y G (canales tipo LD y T), y muy ligeramente de la subunidad $\alpha 1B$ (canales N), pero sin afectar la expresión de $\alpha 1C$ (canales tipo LC), indicando que el NGF mantiene y promueve la translocación de canales funcionales a la membrana plasmática.

Tabla 3. Efecto del NGF sobre la expresión de las subunidades $\alpha 1$ de los canales de calcio en células neonatas cultivadas por 48 h.

Subunidad $\alpha 1$ Tratamiento	M/C			
	B	C	D	G
Control	1.07 \pm 0.01	1.49 \pm 0.05	1.16 \pm 0.04	1.79 \pm 0.06
NGF	1.05 \pm 0.01	1.36 \pm 0.03	2.20 \pm 0.05*	1.74 \pm 0.09
Ab-N	0.86 \pm 0.05*	1.43 \pm 0.06	0.60 \pm 0.01*	0.71 \pm 0.02*

*P < 0.001 con respecto a las células control.

Caracterización de la corriente insensible al tratamiento con Ab-N en células neonatales cultivadas por 48 horas

La figura 6.18D muestra una corriente remanente que es insensible al tratamiento con Ab-N y debido a que la relación I/V indica que este componente podía estar dado por la participación de canales HVA, decidimos analizar la naturaleza de esta corriente. Para alcanzar este fin, se registraron las corrientes de IBa^{2+} de células neonatales cultivadas por 48 horas en presencia de Ab-N (control) y posteriormente se aplicó alguno de los siguientes bloqueadores de canales: nifedipina para los tipo L (5 μ M) o ω -Conotoxina para los tipo N (ω -CTX, 100 nM) y

posteriormente se registraron una vez más, las corrientes de IBa^{2+} . La figura 6.21 muestra que la nifedipina disminuyó en un 47 % la corriente remanente, mientras que la ω -CTX no afectó la densidad de la IBa^{2+} (datos no mostrados) y quedando un remanente de corriente insensible a ambos bloqueadores. Esto datos demuestran que la corriente insensible a Ab-N es generada por canales de calcio tipo L.

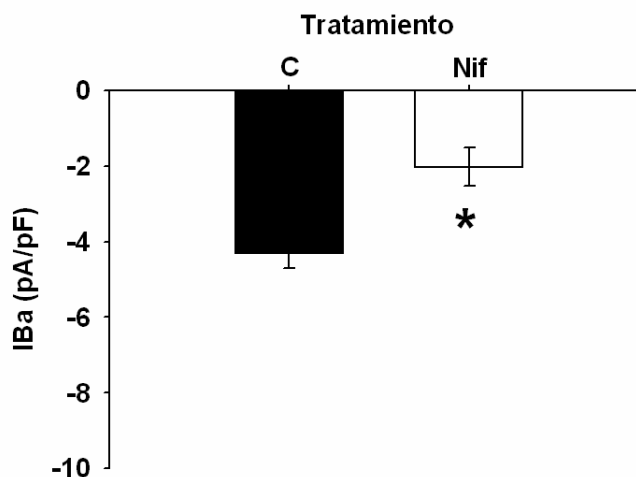


Figura 6.21. Caracterización de la corriente de Ba^{2+} insensible a Ab-N en células neonatales cultivadas por 48 h. La nifedipina (Nif) disminuye la IBa^{2+} (pA/pF) en las células cultivadas con Ab-N (C) por 48 h. Los datos son expresados como promedio de cuatro células \pm EEM. * $P < 0.05$.

Las células β neonatales expresan canales de calcio tipo L, N y T funcionales

Una vez demostrado que las células de rata neonatal expresan los RNAm y las proteínas de canales de calcio tipo L, N y T (figuras 6.6 a 6.7), decidimos analizar la funcionalidad y participación de estos componentes, en la corriente total de calcio, en células neonatales en cultivo. Para lo anterior, se registró la IBa^{2+} de las células neonatales cultivadas por 48 h en presencia de NGF (controles), posteriormente se aplicó nifedipina, ω -CTX o pimozida (para bloquear los canales

tipo L, N o T, respectivamente) y la IBa^{2+} fue registrada nuevamente para analizar la participación de cada componente.

La figura 6.22 muestra que tanto la nifedipina como la ω -CTX disminuyen aproximadamente un 45 % la corriente total de IBa^{2+} , mientras que la pimozida no afectó la corriente HVA, pero abatió el componente de la corriente activada a bajo voltaje (LVA) o corriente de calcio tipo T, que demuestra que los canales L, N y T contribuyen a la corriente total de calcio en las células neonatales cultivadas con NGF.

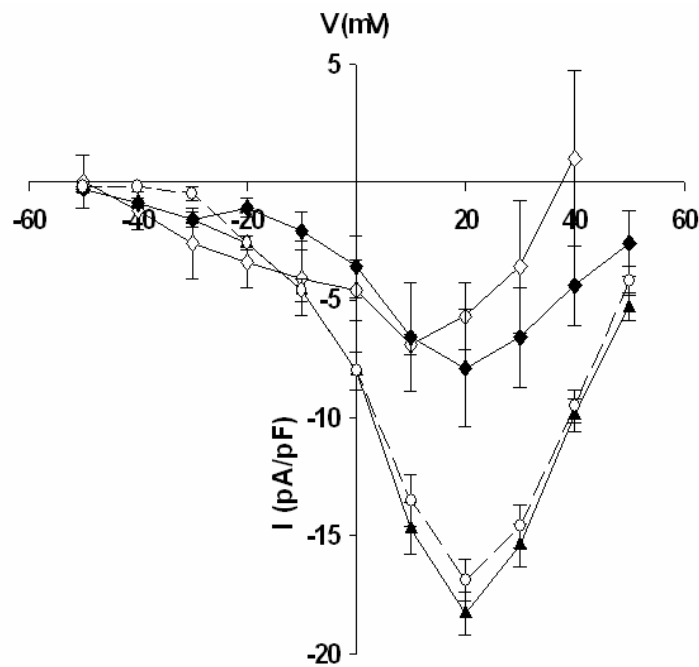


Figura 6.22. Efecto de los bloqueadores de canales de calcio sobre la IBa^{2+} de células neonatales cultivadas con NGF por 48 h. La nifedipina (◆, n = 12) y ω -ctx (◇, n = 9) disminuyen la corriente HVA con respecto a las células control (▲, n = 27), mientras que la pimozida (○ y líneas discontinuas, n = 6) abate el componente LVA. Los datos son expresados como el promedio de la $IBa^{2+} \pm$ EEM, n denota el número de células registradas.

Participación de los VGCC en la secreción de insulina estimulada por glucosa

En los resultados anteriores, se demostró que las células neonatales cultivadas con NGF, expresan canales de calcio tipo L, N y T que participan en la generación de la corriente total de calcio. Así que decidimos analizar el papel de los diferentes canales de calcio expresados en estas células, en la secreción de insulina estimulada por glucosa. Para lo anterior, células neonatales disociadas fueron cultivadas por 48 h con NGF, una vez cumplido el tiempo de cultivo, las células fueron estimuladas con 15.6 mM de glucosa (control) en ausencia o presencia de alguno de los bloqueadores específicos de canales de calcio (nifedipina, ω -CTX o pimozida).

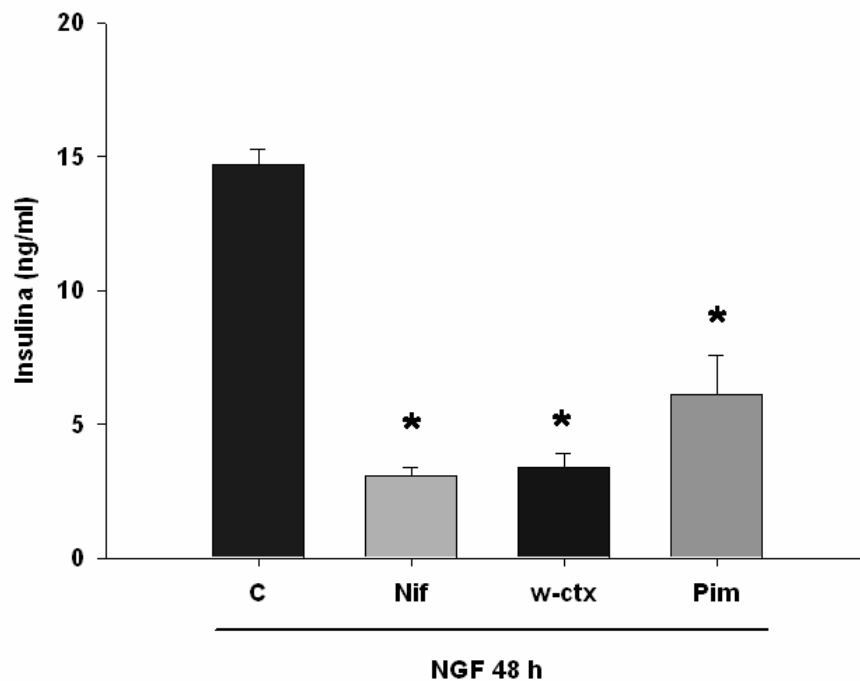


Figura 6.23. Efecto de los bloqueadores de canales de calcio sobre la secreción de insulina estimulada por glucosa en células neonatas cultivadas con NGF por 48 h. Con respecto a las células control (C), la nifedipina (Nif), ω -Conotoxina (w-ctx) y pimozida (Pim) disminuyen la secreción de insulina estimulada por 15.6 mM de glucosa. Los datos son expresados como el promedio de tres experimentos independientes \pm EEM. * P < 0.001 con respecto a los controles.

La figura 6.23 muestra los efectos de los bloqueadores de calcio en la secreción de insulina de células neonatales. Comparado con las células control, tanto la nifedipina como la ω -CTX descendieron la secreción en un 78%, mientras que la pimozida la disminuyó en un 58 %. Demostrando que las células neonatales cultivadas en presencia de NGF expresan canales de calcio tipo L, N y T funcionales, importantes para la secreción hormonal estimulada por glucosa.

El NGF modula diferencialmente la expresión del RNAm de las subunidades $\beta 2$ y $\beta 3$ en las células neonatales

Algunos reportes han demostrado que el tráfico de los canales de calcio es modulado por la coexpresión de las subunidades β y $\alpha 1$ (Nishimura et al., 1993) y nuestras observaciones muestran que las células neonatales expresan RNAm de las subunidades $\beta 2$ y $\beta 3$ pero que comparado con las adultas, las células neonatales expresan 45 % menos RNAm de la subunidad auxiliar $\beta 2$.

Es posible que el NGF mantenga y promueva la translocación de los canales a la membrana citoplasmática, al menos en parte, modulando la síntesis de estas subunidades, por lo que exploramos los niveles de expresión de los RNAm de $\beta 2$ y $\beta 3$ en células neonatales y su modulación por NGF.

La figura 6.24 muestra que el NGF modula diferencialmente la expresión de ambas subunidades β , ya que mientras que la presencia del factor aumenta la expresión del RNAm de $\beta 2$ en un 20 %, disminuye en un 10 % los niveles del RNAm de $\beta 3$. En contraste, el tratamiento con Ab-N incrementa la expresión del RNAm de $\beta 3$ en un 18 % sin afectar la expresión del RNAm de $\beta 2$.

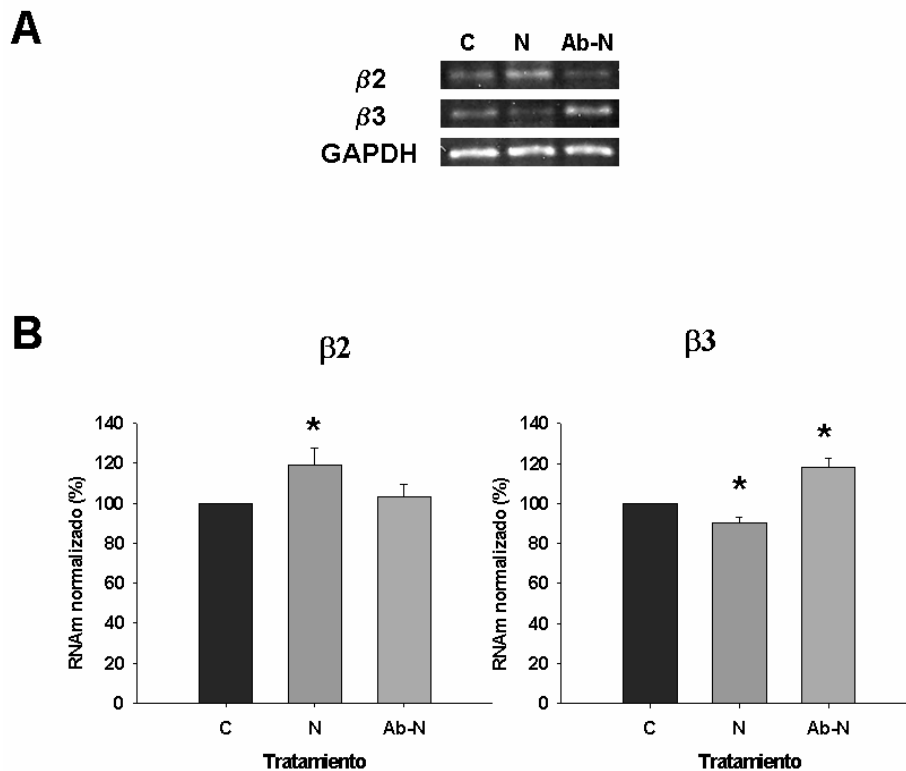


Figura 6.24. Efectos del NGF sobre la expresión de los RNAm de las subunidades $\beta 2$ y $\beta 3$ de los canales de calcio en células neonatales cultivadas por 48 h. A) Productos de PCR de las subunidades $\beta 2$, $\beta 3$ y GAPDH de células cultivadas en condiciones control (C) o con NGF (N) o con un anticuerpo contra NGF (Ab-N). B) Muestra los niveles de expresión del RNAm de $\beta 2$ y $\beta 3$ en las diferentes condiciones de cultivo. Los datos son expresados como el promedio de tres experimentos independientes \pm EEM. * $P < 0.005$ con respecto sus controles.

El NGF promueve preferentemente la expresión de GLUT2 en la membrana citoplasmática

El transporte de glucosa dentro de las células, es el primer punto en el acoplamiento entre el estímulo de glucosa y la secreción de insulina. Proceso mediado por los transportadores GLUT2. Sin embargo, las células neonatales no tienen la capacidad de responder a cambios en la concentración extracelular de glucosa, como lo demuestran nuestros datos (ver figura 6.1). Así mismo, el NGF promueve la sensibilidad a la glucosa, aumentando la secreción de insulina

después de una estimulación con alta glucosa. Considerando que esta respuesta está relacionada con cambios en la expresión de GLUT2, decidimos explorar y comparar la expresión de los transportadores GLUT2 en células neonatales y adultas y su modulación por NGF.

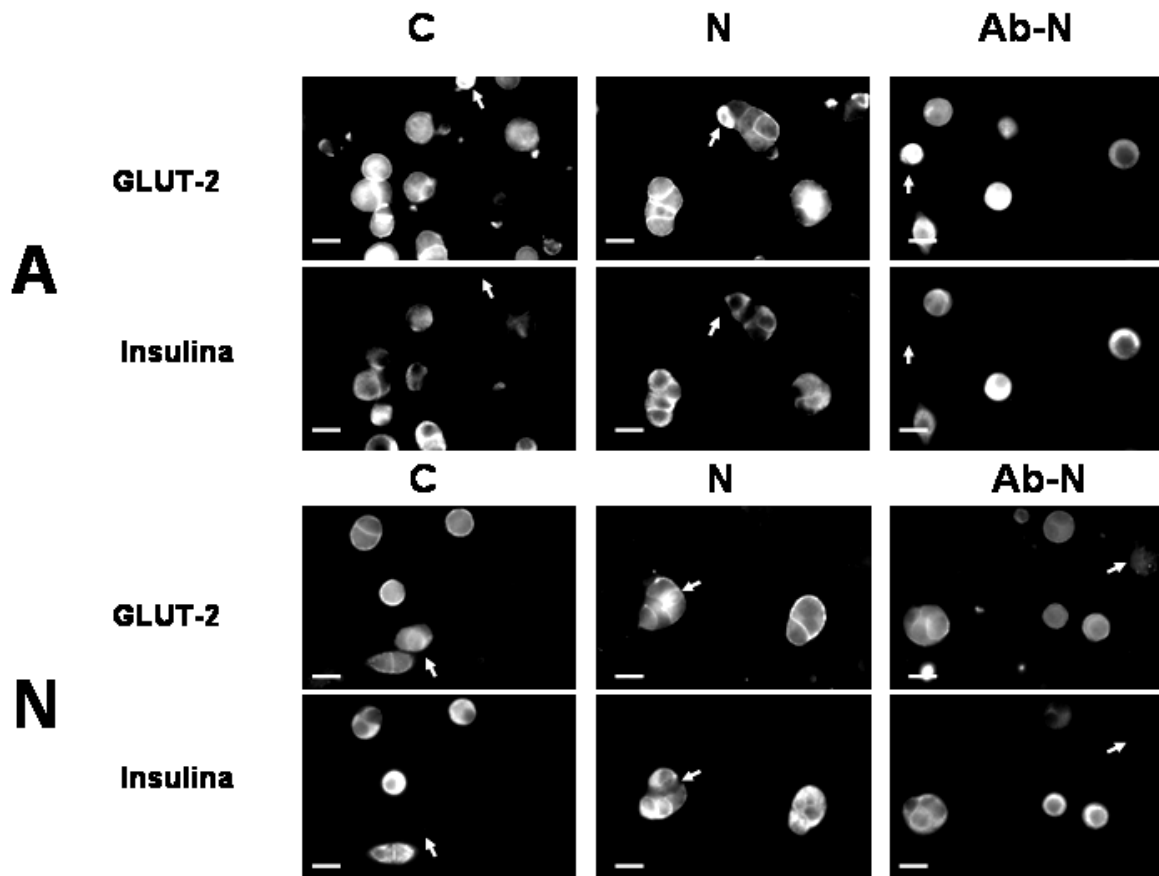


Figura 6.25. Efectos del NGF sobre la expresión de los transportadores GLUT2 en la membrana de células β pancreáticas cultivadas por 48 h. Micrografías representativas que muestran la expresión de GLUT-2 y de insulina en células adultas (A) y neonatales (B). En los controles, las células neonatas expresan los transportadores GLUT-2 preferentemente en el citoplasma, mientras que en las adultas los transportadores se expresan principalmente en la membrana. Con respecto a los controles, en ambas edades, el NGF aumenta la expresión de GLUT-2 en la membrana, mientras que el Ab-N disminuye su expresión en este compartimiento con un incremento paralelo de su expresión en el citoplasma. Las barras son 10 μ M.

En la figura 6.25 se muestra que las células neonatales tienen menos inmunoreactividad para GLUT2 que las células adultas y que esta expresión está preferentemente situada en el citoplasma, mientras que en las células adultas, la

expresión del GLUT2 esta localizada en su mayoría en la membrana citoplasmática. Cuando las células fueron cultivadas en presencia de NGF, observamos que la inmunoreactividad para GLUT2 claramente aumentó en la membrana, tanto en las células neonatales como en las adultas. En contraste, el tratamiento con Ab-N disminuyó la expresión del transportador en la membrana con un paralelo aumento en el compartimiento citoplasmático. Estos datos sugieren que el NGF promueve el desarrollo de la sensibilidad a la glucosa, al menos en parte, aumentando el número de transportadores GLUT2 funcionales en la membrana plasmática, mientras que la supresión del factor endógeno, bloquea este proceso.

Así mismo, se puede apreciar que en las células de ambas edades y en todos los tratamientos, existen células que son inmunoreactivas a GLUT2 y negativas para insulina. Esto sugiere que en los islotes pancreáticos de ambas edades del desarrollo, existen células que expresan el transportador GLUT2 diferentes a las células β (figura 6.25, flechas). Es importante notar que estas células expresan una alta inmunoreactividad a GLUT2 incluso superior a las células β pancreáticas y que con respecto a su localización en el islote (periferia), podrían tratarse de células α (figura 6.11A y B), sin embargo son necesarios otros estudios para comprobarlo.

VII. Discusión

Durante la etapa fetal los mamíferos dependen del metabolismo materno de la glucosa, por una nutrición a través de la placenta. En estadios tempranos del período gestacional, las células β pancreáticas no tienen la capacidad de sentir cambios en la concentración extracelular de glucosa. En este estadio del desarrollo, la secreción de insulina es escasa y monofásica, similar al patrón que se observa en la diabetes tipo 2 (Del Guerra et al., 2005; Weyer et al., 2001, 1999). Hacia el final del embarazo la glucosa comienza a estimular la secreción de insulina, sin embargo en comparación con las células adultas, la secreción de las células fetales sigue siendo monofásica y no es sensible a los bloqueadores de canales de Ca^{2+} (Hole et al., 1988; Kevran y Random, 1980).

Después del nacimiento, los cambios en la alimentación y el metabolismo nutricional conllevan a una rápida adaptación del organismo a la nueva situación. Es sólo varios días después del nacimiento que el patrón bifásico de la secreción de insulina se desarrolla, aunque a esta edad la cantidad de insulina secretada es mucho menor que la de las células adultas (Mendonça et al., 1998).

Nuestros resultados indican que al nacimiento, las células β son aún funcionalmente inmaduras, debido a que secretan una menor cantidad de insulina y a su insensibilidad a los cambios en la concentración extracelular de glucosa. La secreción basal disminuida está dada al menos en parte, por que la corriente de calcio y síntesis de insulina son menores en esta etapa del desarrollo, mientras que la incapacidad de sentir cambios en la concentración extracelular de glucosa, se debe al menos en parte, por una menor expresión de transportadores GLUT2 en la membrana (figura 7.1).

En los mamíferos, el nacimiento es un estado crítico del proceso del desarrollo y representa un estado de transición metabólica, ya que mientras en la etapa fetal, el organismo depende completamente del metabolismo materno, después del nacimiento, éste se independiza y por lo tanto, necesita adaptarse a su independencia, promoviendo que las células β adquieran la capacidad de ajustar la secreción de insulina en función de la concentración de la glucosa en la sangre, manteniendo así la euglucemia.

Algunos estudios han demostrado que la maduración funcional de la célula β , es un proceso activo que incluye cambios en el patrón de secreción (Hole et al., 1988; Bliss y Sharp, 1994) y que esto podría estar dado al menos en parte, por alteraciones en cualquier punto del acoplamiento entre el estímulo de glucosa y la secreción de insulina (Mendonça et al., 1998; Boschero et al., 1990; Rorsman et al., 1989), sin embargo, no son claros los mecanismos o factores implicados en este proceso.

Hasta donde sabemos, este es el primer trabajo que demuestra que las células β son funcionalmente inmaduras al nacimiento, con alteraciones en la secreción de insulina regulada, resultado de al menos tres principales mecanismos: 1) una incapacidad para detectar cambios en la concentración de glucosa, 2) una menor corriente de calcio y 3) una menor síntesis de insulina.

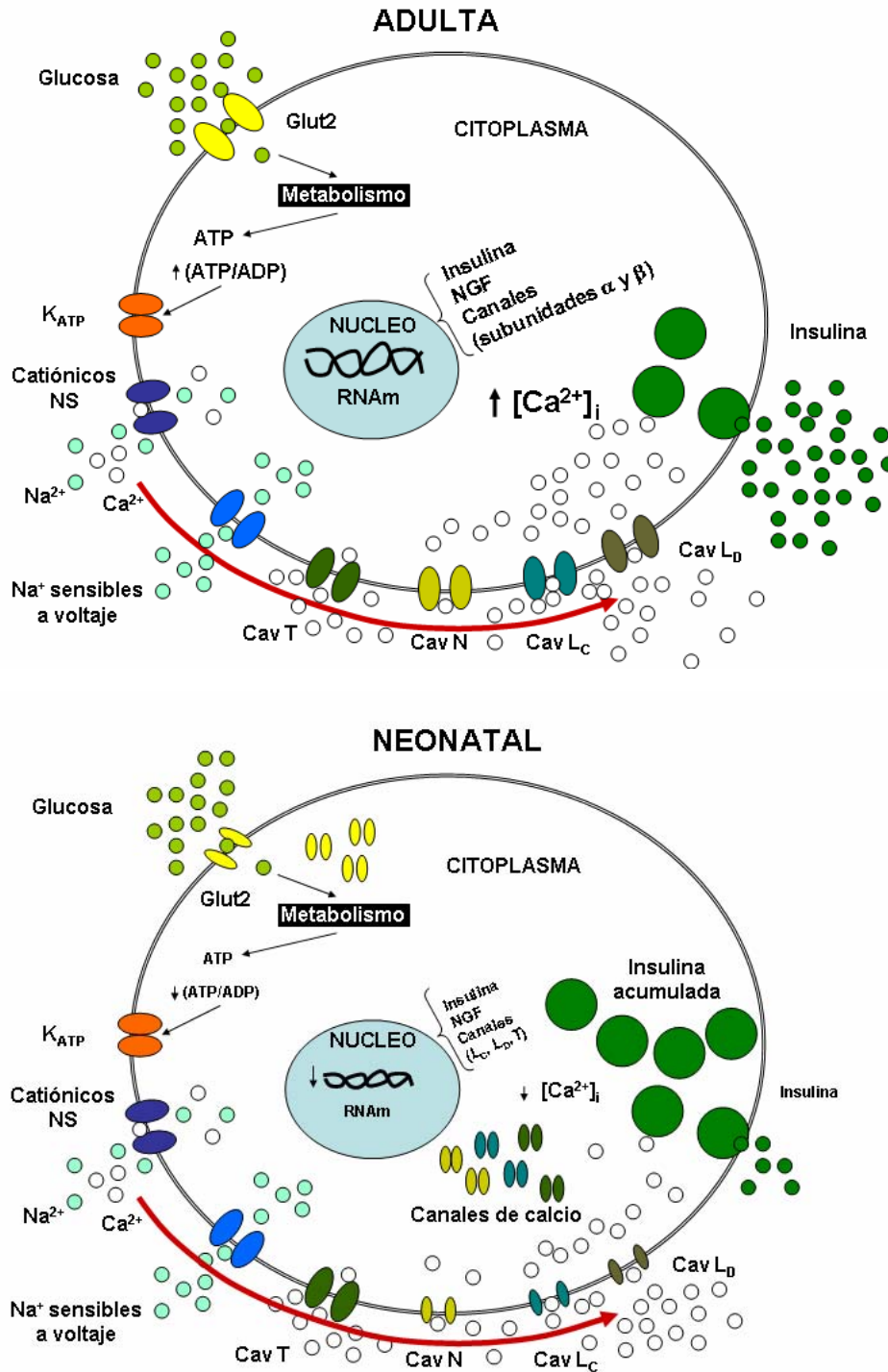


Figura 7.1. Acoplamiento entre el estímulo y la secreción de insulina en dos etapas del desarrollo. En comparación con la célula adulta, las neonatales secretan una menor cantidad de insulina en respuesta a la glucosa. Esta deficiente secreción está dada, al menos en parte por la menor síntesis de insulina y expresión de canales de calcio sensibles a voltaje en la membrana plasmática. La incapacidad para responder a cambios en la glucosa está relacionada a una menor expresión de transportadores GLUT2 en la membrana. La despolarización de la membrana está representada por la línea roja.

La respuesta inadecuada a la glucosa está relacionada con una menor expresión de transportadores GLUT2 en la membrana, que sugiere que en las células neonatales, son incapaces de detectar cambios en la concentración extracelular de glucosa y son incapaces de mantener la homeostasis de la glucosa sanguínea. Es interesante observar que al nacimiento, la menor expresión en la membrana plasmática de transportadores GLUT2 funcionales, refleja un estado fisiológico de transición, mientras que en la etapa adulta, esta condición conlleva al desarrollo de DM2, caracterizada por intolerancia a la glucosa con hipoinsulinemia e hiperglucemia (Del Guerra et al., 2005; Valera et al., 1994).

En las neuronas y los miocitos presentan un patrón cambiante de la expresión de los canales de calcio durante el desarrollo (Liu et al., 2003; Pravettoni et al., 2000; Jones et al., 1997; Vance et al., 1998). Sin embargo, este tipo de regulación no ha sido previamente reportada para las células β del páncreas, que puede ser importante para la maduración funcional de las células β .

El influjo de Ca^{2+} a través de canales de calcio sensibles a voltaje es crítico en la secreción de insulina regulada. En nuestros experimentos, en comparación con las células adultas, las neonatas secretan una menor cantidad de insulina cuando están en una concentración basal de glucosa (5.6 mM). Nuestros resultados demuestran que las células neonatales expresan los canales de calcio sensibles a voltaje (VGCC) típicos de las células adultas, sin embargo la magnitud de la corriente total es más pequeña en los neonatos. Esta menor densidad de corriente estaría dada por una menor síntesis de canales de calcio y por la expresión disminuida de canales funcionales en la membrana plasmática (figura 7.1).

Las subunidades $\alpha 1C$ y D que forman canales de calcio tipo L, tienen propiedades electrofisiológicas y farmacológicas similares, que hacen difícil el análisis de su participación individual en la generación de la corriente total y en la secreción de insulina. Sin embargo, los canales de calcio tipo LC y D muestran una diferencia importante en relación con su modulación por NGF, que nos permitió discernir su presencia e importancia en la generación de corrientes de calcio y en la secreción de insulina, de una manera indirecta. Esto se apoya por el hecho de que la nifedipina abatió prácticamente este componente que persiste después de la supresión del NGF endógeno.

Paralelamente, observamos que el NGF aumenta la corriente de calcio en las células neonatales, pero este efecto es independiente de la síntesis de nuevos canales. Esto puede explicarse por los resultados obtenidos en el análisis de la inmunoreactividad para los canales de calcio en la membrana y el citoplasma, que revelaron que en presencia del factor, hay un incremento de la fluorescencia en la membrana; sugiriendo que a las 48 horas de cultivo, el NGF podría estar promoviendo la translocación de canales de calcio funcionales, sin afectar la síntesis de los mismos. No conocemos claramente el mecanismo por el cual el NGF induce esta translocación, sin embargo algunos datos nos hacen plantear que, éste podría ser un proceso mediado por las subunidades β de los canales de calcio (figura 7.2).

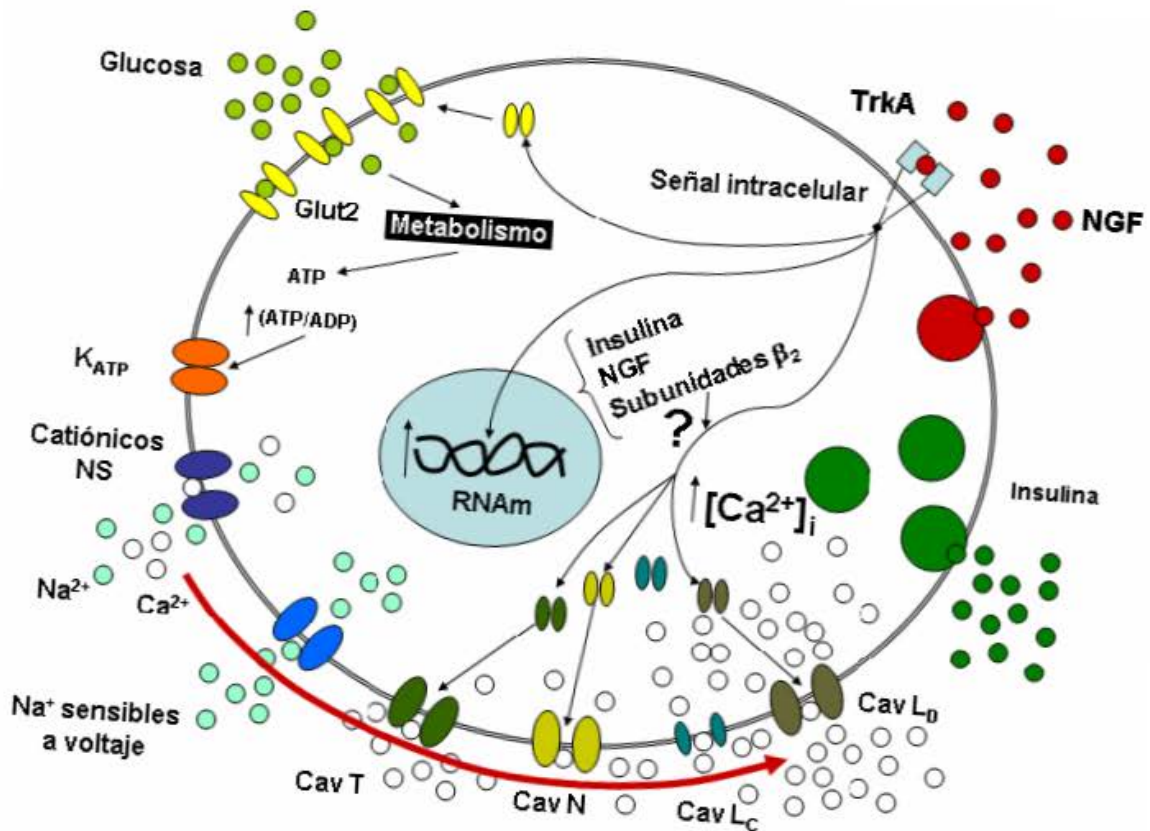


Figura 7.2. Efectos tróficos del factor de crecimiento neuronal en el la maduración funcional de la célula β neonatal. El NGF promueve la respuesta a la glucosa a través de un incremento en la expresión de transportadores GLUT2 en la membrana plasmática. Así mismo, el factor incrementa la expresión de canales de calcio en la membrana y la síntesis de insulina, NGF y de las subunidades β 2 de los canales de calcio sensibles a voltaje. Estos cambios se ven reflejados en un incremento en la cantidad de insulina en respuesta a la glucosa.

Previamente se estableció que las células β de rata expresan los RNAm para las subunidades β 2 y β 3 (Iwashima et al., 2001) y que el tráfico de los canales de calcio es modulada por la coexpresión de las subunidades β con las subunidades α 1, facilitando el anclaje de los canales a la membrana (Ihara et al., 1995; Nishimura et al., 1993). Al igual que estos datos, nuestros resultados demuestran que las células neonatales expresan los RNAm de ambas subunidades, sin embargo, en comparación con las células adultas, las neonatales expresan menos

copias de RNAm de la subunidad $\beta 2$. Mientras que el nivel del RNAm de la subunidad $\beta 3$ es similar en ambas etapas del desarrollo. Cuando las células fueron cultivadas en presencia del factor el nivel del RNAm de la subunidad $\beta 2$ se incrementó, pero no hubo cambios en la expresión del RNAm de $\beta 3$. Esto resulta interesante porque podríamos sugerir que otro de sus efectos tróficos podría ser permitir que un mayor número de canales llegara a la membrana (figura 7.2).

Así mismo, se ha sugerido una regulación negativa de la secreción de insulina por $\beta 3$, a través de un mecanismo que implica la liberación de calcio inducida por trifosfato de inositol (IP3) (Berggren et al., 2004). En nuestros resultados, observamos que el NGF disminuye la expresión de $\beta 3$ y es posible que otro de sus efectos tróficos positivos para aumentar la secreción de insulina, pudiera ser el bloquear este mecanismo inhibitorio, a través de un descenso en la síntesis de $\beta 3$; sin embargo se necesitan estudios más detallados para comprobar esta hipótesis.

Varios reportes han demostrado una expresión diferencial de VGCC en diferentes órganos y tejidos, sugiriendo que existe una correlación entre este proceso y la adquisición de funciones. Sin embargo, hasta ahora no existían suficientes evidencias directas que apoyen este punto, por lo que sigue siendo una materia de estudio.

Algunos datos demuestran que los canales de calcio LD son necesarios no sólo para la secreción estimulada, sino también para la secreción basal (Namkung et al., 2001). En nuestros datos observamos que en las células neonatas, la secreción de insulina en condiciones basales de glucosa (5.6 mM) está disminuida en más del 90 % con respecto a las células adultas. Sabemos ahora que las células neonatas tienen una menor corriente de calcio la cual está dada por una

menor síntesis de estos canales y de su expresión en la membrana. Es probable que en las células neonatales, este fenómeno explique al menos en parte, la deficiencia en la secreción basal de insulina.

Es interesante que además de una menor expresión de transportadores GLUT2 y canales de calcio en la membrana, la síntesis de insulina en las células neonatas, también sea menor. De esta manera, la deficiente secreción de insulina basal sería resultado de alteraciones en los canales de calcio y la síntesis de insulina, mientras que la secreción menor en condiciones estimuladoras de glucosa, sería resultado además, de una menor expresión de GLUT2 funcionales.

Resultados previos de nuestro laboratorio han demostrado que las células β sintetizan y secretan NGF y expresan receptores TrkA (Rosenbaum et al 1998). En las células adultas el NGF aumenta la corriente de calcio sólo después de 4 días en cultivo en presencia del factor (Rosenbaum et al., 2002) en contraste, las células neonatales responden al factor más rápidamente aumentando la densidad de corriente de calcio, la síntesis de insulina y promoviendo la expresión de transportadores GLUT2 y de canales de calcio en la membrana citoplasmática, a los dos días de cultivo.

Sin embargo, a pesar de que la cantidad de insulina secretada en respuesta a una concentración alta glucosa en las células neonatales, es mayor comparado con las células control, ésta continúa siendo mínima cuando se compara con la secreción de las células adultas. No sabemos por qué en estas condiciones, a pesar de que las células neonatales sintetizan más insulina y expresan más transportadores GLUT2 y canales de calcio funcionales en la membrana, la secreción de insulina continúa siendo escasa. Es posible que otros mecanismos o componentes del

acoplamiento entre el estímulo de glucosa y la secreción de insulina puedan estar alterados en la etapa neonatal.

En la secreción de insulina regulada, se ha sugerido que la respuesta a la glucosa está controlada por una hexocinasa tipo IV que fosforila a la glucosa (glucocinasa o GK), la cual por sus propiedades catalíticas intrínsecas podría actuar como un sensor de glucosa (Matschinsky et al., 1996, 1993). Datos previos han demostrado que durante el desarrollo existe una expresión diferencial de la GK, de tal manera que al nacimiento, la expresión de GK es aproximadamente 90 % menor que en la edad adulta (Heywoo et al., 2004), sugiriendo que la deficiencia de las células neonatas para secretar una cantidad adecuada de insulina de acuerdo a la concentración de glucosa, podría también estar relacionado a la deficiencia de esta enzima.

En suma, la inmadurez funcional que presentan las células β al primer día posnatal, es resultado de la alteración de varios componentes del acoplamiento entre el estímulo de glucosa y la secreción de insulina. Así mismo, el NGF es un importante factor trófico que promueve la capacidad de secretar insulina en respuesta a la glucosa por diversos mecanismos, pero sin que la secreción alcance los niveles de las células adultas, lo que indica que pueden existir otros factores importantes necesarios para la maduración completa de este mecanismo.

Al nacimiento, las células β expresan varios tipos de VGCC, los cuales son funcionales y regulados diferencialmente por el NGF. Las células, desde la etapa neonatal ya expresan canales de calcio tipo LC, LD, N y T los cuales participan en la generación de la corriente total de calcio y en la secreción de insulina.

Este es el primer trabajo que correlaciona directamente la expresión diferencial de los canales de calcio, durante al menos dos estadios del desarrollo de la vida de la rata y su importancia en el desarrollo funcional, implicando que la maduración de la respuesta macroscópica para secretar insulina en respuesta a la glucosa está relacionado con estos procesos. Sin embargo, desconocemos la relación entre la alta expresión de canales de calcio tipo N en las células neonatales y la fisiología celular inmadura.

Previamente describimos la existencia de subpoblaciones funcionales en las células β adultas, de acuerdo con su secreción de insulina (Hiriart y Ramírez-Medeles, 1991); sin embargo, desconocemos que la naturaleza de esta heterogeneidad. Con respecto a las células adultas, las células neonatales expresan diferente inmunoreactividad de insulina y canales de calcio, que sugiere diferentes poblaciones celulares. Es posible que la inmadurez pueda estar relacionada con la presencia de estas subpoblaciones, las cuales son claramente afectadas por el tratamiento con NGF, de tal manera que exista una relación inversa entre la cantidad de insulina acumulada y la expresión de canales de calcio en la membrana. Sin embargo, son necesarios más estudios para apoyar esta hipótesis. La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) está caracterizada por una baja secreción y resistencia a la insulina. Nuestras observaciones sugieren que las células diabéticas se comportan como las células inmaduras, en diferentes aspectos ya que en ambas condiciones,

Los canales de calcio tipo LD son muy importantes para generar la primera fase de la secreción y al igual que en las células inmaduras, en las diabéticas existen alteraciones en la expresión y función de los canales de calcio sensibles a voltaje

(VGCC) que contribuye parcialmente a la insensibilidad a la glucosa y relacionadas con la pérdida de la primera fase de la secreción, característica de la DM2 (Iwashima et al., 2001; Schulla et al., 2003; Kato et al., 1996).

Es interesante notar que las alteraciones en la primera fase están presentes no sólo en condiciones patológicas como la DM2, sino también durante el envejecimiento normal, en el cual se desarrolla un defecto en la liberación de insulina estimulada por glucosa, la cual está relacionada con un descenso en la secreción de insulina y resistencia periférica a la misma (Reaven et al., 1979), que indica que durante el desarrollo normal, las células β sufren de una involución funcional que se ve reflejada en la capacidad para secretar insulina en respuesta a la glucosa.

Durante la etapa fetal del desarrollo, la madre es responsable de la homeostasis de la glucosa en el feto y la secreción de insulina por parte de éste es mínima, monofásica y su patrón es similar al observado en la DM2 (Del Guerra et al., 2005; Pratley y Weyer 2001; Weyer et al 1999). Después del nacimiento, los cambios en la alimentación y metabolismo nutricional demandan una rápida adaptación del organismo a las nuevas condiciones, de tal manera que se establece una respuesta a la glucosa y secreción de insulina adecuadas para mantener la euglucemia en el neonato.

Es posible que los recién nacidos con bajo peso al nacer, se hayan adaptado de manera temprana a un ambiente intrauterino, potencialmente adverso que optimiza el uso restringido de nutrientes para asegurar la supervivencia, pero favoreciendo el desarrollo de ciertos órganos sobre otros, que llevaría a alteraciones persistentes en la fisiología y el metabolismo de los tejidos en

desarrollo. Existen periodos que son críticos para el desarrollo y que frecuentemente coinciden con periodos de división celular rápida durante los cuales los tejidos y órganos se diferencian y maduran, preparándose para la supervivencia después del nacimiento. De esta manera, cualquier estímulo o insulto durante estos periodos críticos, puede traer consecuencias a largo plazo sobre la función de tejidos y órganos en la etapa posnatal.

La alteración del crecimiento durante estos períodos, causados por una desnutrición materna podría resultar en un déficit irreparable en el número celular, como el caso de la diabetes tipo 1 o dependiente de insulina que se caracteriza por una destrucción celular regulada por células (autoinmune). Por ello, es importante entender los mecanismos o factores implicados en la adquisición o pérdida de funciones durante el desarrollo normal de la célula β pancreática, lo que nos permitirá entender mejor la presencia de disfunciones que llevan a desarrollar diabetes mellitus.

De manera similar a lo que sucede en las ratas, en los humanos, la maduración funcional de las células β pancreáticas toma lugar durante el desarrollo temprano, periodo que es particularmente susceptible a efectos adversos por una malnutrición materna. La respuesta a la glucosa aparece entre el primer y segundo trimestre del embarazo, pero la respuesta secretora bifásica típica aparece sólo después del nacimiento (Otonkoski et al., 1988). Se conoce que la glucosa promueve la maduración de la secreción de insulina en respuesta a la glucosa en islotes de rata en cultivo (Dudek et al., 1984) sugiriendo la posibilidad que las alteraciones en la nutrición alrededor del nacimiento podría retardar la maduración funcional de los islotes.

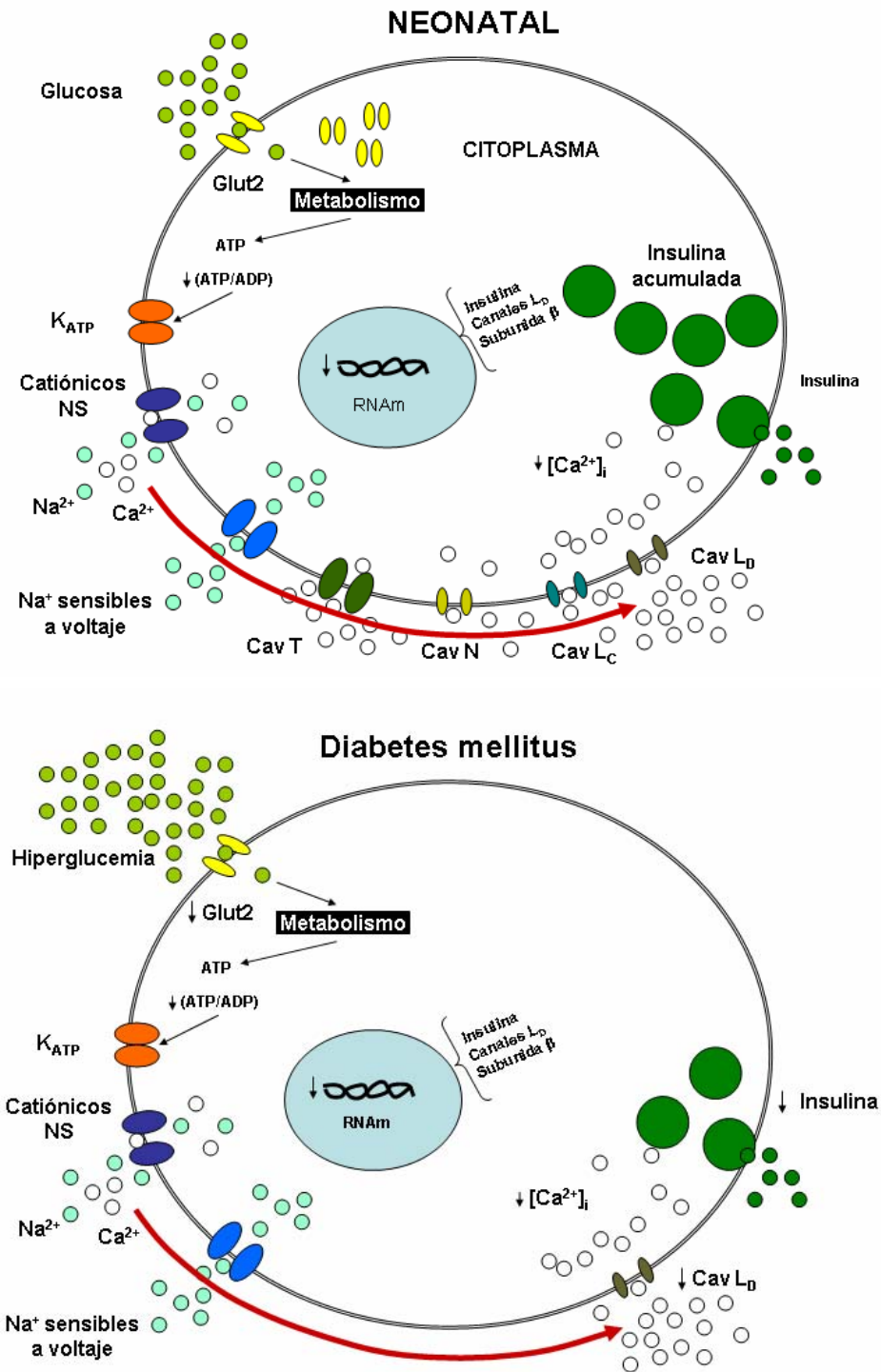


Figura 7.3. Comparación de las alteraciones en el acoplamiento entre el estímulo de glucosa y la actividad eléctrica entre una célula β pancreática inmadura y una diabética. En ambos tipos celulares, la expresión disminuida de transportadores GLUT2 y de canales de calcio es responsable en parte, de la deficiente respuesta a la glucosa y de la menor secreción. Lo anterior esta relacionado además, de una menor síntesis de insulina y de las subunidades α y β de los canales de calcio.

En el caso de la diabetes tipo 2, en la etapa temprana del desarrollo las adaptaciones menos favorables a los factores ambientales, pueden incluir alteraciones en la estructura y función del páncreas endocrino y en tejidos periféricos sensibles a la insulina, los cuales persisten hasta la vida adulta y que predisponen al desarrollo de la enfermedad. Así, en algunas personas puede ser compensada la incapacidad de la insulina para mantener la homeostasis de la glucosa mediante un aumento en la secreción de esta hormona, mientras que en otros casos la secreción es incapaz de compensar la resistencia periférica a esta hormona, desarrollándose una intolerancia a la glucosa.

Cuando se presentan alteraciones en la alimentación, existe una mayor incidencia de la resistencia a la insulina en las personas obesas (Shalitin et al., 2005). Otro factor epigenético que ha sido relacionado con el desarrollo de diabetes, son los hijos de madres que cursaron con diabetes gestacional en su embarazo, la cual está caracterizada por una resistencia temporal a la insulina que produce una condición hiperglucémica (Hales et al., 1991; Aerts et al., 1990).

El crecimiento y desarrollo tempranos que resultan anormales en las etapas fetal y posnatal tempranas, podría estar relacionado con la intolerancia a la glucosa y con resistencia a la insulina en la etapa adulta que puede implicar un desajuste en los componentes del acoplamiento entre el estímulo de la glucosa y la secreción de insulina, por ello es importante investigar más profunda y detalladamente los mecanismos y factores implicados en la adquisición de la completa madurez funcional de las células β pancreáticas, que nos permitan entender mejor las alteraciones que se presentan en las células diabéticas, para poder así; desarrollar y ofrecer mejores alternativas de tratamiento a los pacientes diabéticos.

VIII. Conclusiones

1. Las células β neonatales son funcionalmente inmaduras.
2. Las células β pancreáticas de ratas recién nacidas, expresan los canales de calcio típicos de una célula adulta. Sin embargo al nacimiento las neonatales secretan menos insulina. Esto puede explicarse por que en las células neonatales:
 - a) Las células no responden a cambios en la glucosa extracelular.
 - b) La corriente total de calcio es menor.
 - c) La expresión de transportadores GLUT2 en la membrana plasmática está disminuida.
 - d) El nivel de expresión de los RNAm de insulina y NGF son menores.
 - e) El contenido de insulina es mayor a pesar de la menor síntesis hormonal.
3. Estas características de la célula β al nacimiento, son responsables de la menor secreción basal de insulina y su incapacidad de responder a la glucosa.
4. Después del nacimiento, la célula β alcanza su madurez funcional, caracterizada por una secreción robusta de insulina en respuesta al incremento en la glucosa extracelular. Este es un proceso dinámico, en el cual están implicados diversos mecanismos.
5. El NGF es uno de los factores tróficos que modulan la maduración funcional de la célula β pancreática, durante el desarrollo normal de la rata.
6. El NGF modula diversos componentes del acoplamiento entre el estímulo de glucosa y la secreción de insulina, entre los que están: los

transportadores GLUT2, canales de calcio tipo LC, LD, N y T, biosíntesis de insulina y NGF y la capacidad para distinguir y responder a cambios en la glucosa. Lo cual se ve reflejado en un incremento en la secreción en respuesta a la glucosa.

7. Sin embargo, a pesar de que el NGF aumenta la secreción de insulina, por los diferentes mecanismos ya mencionados; la secreción hormonal no alcanza los niveles alcanzados por una célula adulta.
8. Además del NGF, podrían existir otros factores, que pueden ser importantes para que las células β pancreáticas alcancen una madurez funcional y que las capacite para mantener la homeostasis de la glucosa sanguínea. Sin embargo desconocemos que otros factores participen en este proceso.
9. En la diabetes mellitus tipo 2 (DM2), existen alteraciones en la capacidad para mantener esta homeostasis. Esto es resultado de una menor secreción hormonal y de la resistencia periférica a la insulina. Así mismo se conoce que existen alteraciones en la expresión de los canales de calcio y de los transportadores GLUT2. Esa condición tiene características similares a las de una célula β inmadura.
10. Por lo tanto, al conocer mejor el proceso normal de desarrollo y maduración funcional de la célula β pancreática, es posible que entendamos mejor también, las alteraciones que ocurren en la DM2. Esto nos permitirá desarrollar alternativas de tratamiento que estén mejor dirigidas para los defectos a nivel celular.

XI. Perspectivas

El presente trabajo indica que la maduración de la secreción de insulina en respuesta a la glucosa es un proceso dinámico durante la ontogenia de la rata, en el cual varios componentes del acoplamiento entre el estímulo de glucosa y las secreción de insulina pasan por diferentes etapas de maduración hasta alcanzar las características propias de una célula adulta. Entre éstos, se encuentran: la síntesis de insulina y de canales de calcio y la expresión de transportadores GLUT2 y de canales de calcio funcionales en la membrana citoplasmática.

Es evidente que el factor de crecimiento neuronal (NGF) es un factor trófico importante que promueve la maduración funcional de la secreción de insulina en respuesta a la glucosa. Sin embargo, comparado con las células adultas, la secreción sigue siendo menor en las células neonatales.

Nuestros resultados indican que existen otros mecanismos o factores que podrían estar implicados en la adquisición de una adecuada secreción de insulina en respuesta a la glucosa. Sin embargo, son necesarios estudios más detallados que nos permitan identificarlos.

El NGF incrementa la expresión de los canales de calcio en la membrana citoplasmática, pero desconocemos la naturaleza de estos efectos. Una de las hipótesis es que el NGF incremente la disponibilidad de subunidades β de los canales de calcio permitiendo que existe una mayor cantidad de estas subunidades que puedan unirse a las subunidades α_1 , promoviendo así su translocación a la membrana, sin embargo se necesitan otros experimentos que puedan comprobarlo.

De esta manera, nuestros resultados abren un nuevo campo de trabajo que es necesario para responder a las diferentes incógnitas, que han surgido de nuestras observaciones.

Referencias

Aerts L, Holemans K, Van Assche FA. (1990). Maternal diabetes during pregnancy: consequences for the offspring. *Diabetes Metab Rev.* 6(3):147-67.

Altier, C., Dubel, S. J., Barrere, C., Jarvis, S. E., Stotz, S. C., Spaetgens, R. L., Scout, J. D., Cornet, V., De Waard, M., Zamponi, G. W., Nargeot, J., Bourinet, E. (2002). Trafficking of L-type calcium channels mediated by the postsynaptic scaffolding protein AKAP79. *J Biol Chem.* 277 (37): 33598-603.

Angeletti, R. H., Bradshaw, R. A. and Wade, R. D. (1971). Subunit structure and amino acid composition of mouse submaxillary gland nerve growth factor. *Biochemistry.* 10 (3): 463-9.

Arikkath, J. and Campbell, K. P. (2003). Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. *Curr Opin Neurobiol.* 13 (3): 298-307.

Arkhammar, P., Juntti-Berggren, L., Larsson, O., Welsh, M., Nanberg, E., Sjöholm, A., Kohler, M. and Berggren, P. O. (1994). Protein kinase C modulates the insulin secretory process by maintaining a proper function of the beta-cell voltage-activated Ca²⁺ channels. *J Biol Chem.* 269 (4): 2743-9.

Ashcroft, F. M., Nelly, R. P. and Smith, P.A. (1990). Two types of Ca channel in rat pancreatic beta-cells. *Pflugers Arch.* 415 (4): 504-6.

Ashcroft, F. M., Proas, P., Smith, P. A., Ammala, C., Bokvist, K. and Rorsman P. (1994). Stimulus-secretion coupling in pancreatic beta cells. *J Cell Biochem.* 55 Suppl: 54-65.

Barbosa, R. M., Silva, A. M., Tome, A. R., Stamford, J. A., Santos, R. M. and Rosario, L. M. (1998). Control of pulsatile 5-HT/insulin secretion from single mouse pancreatic islets by intracellular calcium dynamics. *J Physiol.* 510 (Pt 1):135-143.

Barg, S., Ma, X., Eliasson, L., Galvanovskis, J., Gopel, S. O., Obermuller, S., Platzer, J., Renstrom, E., Trus, M., Atlas, D., Striessnig, J. and Rorsman, P. (2001). Fast exocytosis with few Ca²⁺ channels in insulin-secreting mouse pancreatic B cells. *Biophys J.* 81 (6): 3308-23.

Barnett DW, Mislisler S. (1995). Coupling of exocytosis to depolarization in rat pancreatic islet beta-cells: effects of Ca²⁺, Sr²⁺ and Ba²⁺-containing extracellular solutions. *Pflugers Arch.* 430(4):593-5.

Barnett DW, Pressel DM, Mislisler S. (1995). Voltage-dependent Na⁺ and Ca²⁺ currents in human pancreatic islet beta-cells: evidence for roles in the

generation of action potentials and insulin secretion. *Pflugers Arch.* 431(2):272-82.

Berggren, P. O., Yang, S. N., Murakami, M., Efanov, A. M., Uhles, S., Kohler, M., Molde, T., Fernstrom, A., Appelskog, I. B., Aspinwall, C. A., Zaitsev, S. V., Larsson, O., de Vargas, L. M., Fecher-Trost, C., Weissgerber, P., Ludwig, A., Leibiger, B., Juntti-Berggren, L., Barrer, C. J., Gromada, J., Freichel, M., Leibiger, I. B. and Flockerzi, V. (2004). Removal of Ca²⁺ channel beta3 subunit enhances Ca²⁺ oscillation frequency and insulin exocytosis. *Cell.* 119 (2): 273-84.

Bergsten P, Aoyagi K, Persson E, Eriksson UJ, Hellerstrom C. (1998). Appearance of glucose-induced insulin release in fetal rat beta-cells. *J Endocrinol.* 158 (1): 115-20.

Bergsten P, Aoyagi K, Persson E, Eriksson UJ, Hellerstrom C. (1998). Appearance of glucose-induced insulin release in fetal rat beta-cells. *J Endocrinol.* 158(1):115-20.

Berridge, M. J, Lipp, P. and Bootman, M. D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 1 (1): 11-21.

Bertram R, Sherman A. (2000). Dynamical complexity and temporal plasticity in pancreatic beta-cells. *J Biosci.* 25(2):197-209.

Bertram, R., Previte, J., Sherman, A., Kinard, T. A. and Satin, L. S. (2000). The phantom burster model for pancreatic beta-cells. *Biophys J.* 79(6): 2880-2892.

Bhattacharjee, A., Whitehurst, R. M. Jr, Zhang, M., Wang, L., Li, M. (1997). T-type calcium channels facilitate insulin secretion by enhancing general excitability in the insulin-secreting beta-cell line, INS-1. *Endocrinology.* 138 (9): 3735-40.

Bliss CR, Sharp GW. (1994). A critical period in the development of the insulin secretory response to glucose in fetal rat pancreas. *Life Sci.* 55(6):423-7.

Bliss, C. R and Sharp, G. W. (1994). A critical period in the development of the insulin secretory response to glucose in fetal rat pancreas. *Life Sci.* 55 (6): 423-427.

Bokvist K, Eliasson L, Ammala C, Renstrom E, Rorsman P. (1995). Co-localization of L-type Ca²⁺ channels and insulin-containing secretory granules and its significance for the initiation of exocytosis in mouse pancreatic B-cells. *EMBO J.* 14(1):50-7.

Boschero AC, Bordin S, Sener A, Malaisse WJ. (1990). D-glucose and L-leucine metabolism in neonatal and adult cultured rat pancreatic islets. *Mol Cell Endocrinol.* 73(1):63-71.

Boschero AC, Carroll PB, De Souza C, Atwater I. (1990). Effects of Ca²⁺ channel agonist-antagonist enantiomers of dihydropyridine 202791 on insulin release, ⁴⁵Ca uptake and electrical activity in isolated pancreatic islets. *Exp Physiol.* 75(4):547-58.

Catterall, W. A. (2000). Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 16: 521-55.

Catterall, W. A., Striessnig, J., Snutch, T. P. and Perez-Reyes, E. (2003). International Union of Pharmacology. XL. Compendium of voltage-gated ion channels: calcium channels. *Pharmacol Rev.* 55 (4): 579-81.

Caumo, A. and Luzi, L. (2004). First-phase insulin secretion: does it exist in real life? Considerations on shape and function. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 287(3):E371-385.

Cook, D. L., Satin, L. S. and Hopkins, W. F. (1991). Pancreatic B cells are bursting, but how? *Trends Neurosci.* 14(9):411-14.

Cruz-Cruz R, Salgado A, Sanchez-Soto C, Vaca L, Hiriart M. (2005). Thapsigargin-sensitive cationic current leads to membrane depolarization, calcium entry, and insulin secretion in rat pancreatic beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 289(3): E439-45.

Daniel, S., Noda, M., Straub, S. G., Sharp, G. W. (1999). Identification of the docked granule pool responsible for the first phase of glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes.* 48(9): 1686-90.

Davalli, A. M., Biancardi, E., Pollo, A., Socci, C., Pontiroli, A. E., Pozza, G., Clementi, F., Sher, E. and Carbone, E. (1996). Dihydropyridine-sensitive and -insensitive voltage-operated calcium channels participate in the control of glucose-induced insulin release from human pancreatic beta cells. *J Endocrinol.* 150 (2): 195-203.

Dean, P. M. and Matthews, E. K. (1968). Electrical activity in pancreatic islet cells. *Nature.* 219 (5152): 389-90.

Del Guerra, S., Lupi, R., Marsella, L., Masini, M., Bugliani, M., Sbrana, S., Torri, S., Pollera, M., Boggi, U., Mosca, F., Del Prato, S. and Marchetti, P. (2005). Functional and molecular defects of pancreatic islets in human type 2 diabetes. *Diabetes* 54: 727-735.

Dissen, G. A., Parrott, J. A., Skinner, M. K., Hill, D. F., Costa, M. E. and Ojeda, S. R. (2000). Direct effects of nerve growth factor on thecal cells from antral ovarian follicles. *Endocrinology*. 141 (12): 4736-4750.

Dudek RW, Kawabe T, Brinn JE, O'Brien K, Poole MC, Morgan CR. (1984). Glucose affects in vitro maturation of fetal rat islets. *Endocrinology*. 114(2):582-7.

Ertel, E. A., Campbell, K. P., Harpold, M. M., Hofmann, F., Mori, Y., Perez-Reyes, E., Schwartz, A., Snutch, T. P., Tanabe, T., Birnbaumer, L., Tsien, R. W. and Catterall, W. A. (2000). Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron*. 25 (3): 533-5.

Fiordeliso T, Hernandez-Cruz A. (2002). Oestrogen regulates neurofilament expression in a subset of anterior pituitary cells of the adult female rat. *J Neuroendocrinol*. 14(5): 411-24.

Furukawa Y, Furukawa S, Satoyoshi E, Hayashi K. (1984). Nerve growth factor secreted by mouse heart cells in culture. *J Biol Chem*. 259(2):1259-64.

German MS. (1993). Glucose sensing in pancreatic islet beta cells: the key role of glucokinase and the glycolytic intermediates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90 (5): 1781-5.

Giroix MH, Portha B, Kergoat M, Bailbe D, Picon L. (1983). Glucose insensitivity and amino-acid hypersensitivity of insulin release in rats with non-insulin-dependent diabetes. A study with the perfused pancreas. *Diabetes*. 32(5): 445-51.

Grabsch, H., Pereverzev, A., Weiergraber, M., Schramm, M., Henry, M., Vajna, R., Beattie, R. E., Volsen, S. G., Klockner, U., Hescheler, J. and Schneider, T. (1999). Immunohistochemical detection of alpha1E voltage-gated Ca(2+) channel isoforms in cerebellum, INS-1 cells, and neuroendocrine cells of the digestive system. *J Histochem Cytochem*. 47 (8): 981-94.

Hales CN, Barker DJ, Clark PM, Cox LJ, Fall C, Osmond C, Winter PD. (1991). Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ*. 303(6809):1019-22.

Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch*. 391(2):85-100.

Heywood WE, Mian N, Milla PJ, Lindley KJ. (2004). Programming of defective rat pancreatic beta-cell function in offspring from mothers fed a low-protein diet during gestation and the suckling periods. *Clin Sci (Lond)*. 107(1):37-45.

Hiriart M, Ramirez-Medeles MC. (1991). Functional subpopulations of individual pancreatic B-cells in culture. *Endocrinology*. 128(6):3193-8.

Hiriart, M. and D. R. Matteson, D. R. (1988). Na Channels and Two Types of Ca Channels in Rat Pancreatic B Cells Identified with the Reverse Hemolytic Plaque Assay. *J Gen Physiol*. 91 (5): 617-39.

Hole, R. L., Pian-Smith, M. C. and Sharp, G. W. (1988). Development of the biphasic response to glucose in fetal and neonatal rat pancreas. *Am J Physiol*. 254 (2 Pt 1): E167-174.

Horvath, A., Szabadkai, G., Varnai, P., Aranyi, T., Wollheim, C. B., Spat, A. and Enyedi, P. (1998). Voltage dependent calcium channels in adrenal glomerulosa cells and in insulin producing cells. *Cell Calcium*. 23 (1): 33-42.

Hughes, S. J. (1994). The role of reduced glucose transporter content and glucose metabolism in the immature secretory responses of fetal rat pancreatic islets. *Diabetologia*. 37(2):134-40.

Hullin, R., Singer-Lahat, D., Freichel, M., Biel, M., Dascal, N., Hofmann. F. and Flockerzi, V. (1992). Calcium channel beta subunit heterogeneity: functional expression of cloned cDNA from heart, aorta and brain. *EMBO J*. 11 (3): 885-90.

Ihara Y, Yamada Y, Fujii Y, Gono T, Yano H, Yasuda K, Inagaki N, Seino Y, Seino S. (1995). Molecular diversity and functional characterization of voltage-dependent calcium channels (CACN4) expressed in pancreatic beta-cells. *Mol Endocrinol*. Jan;9(1):121-30.

Iwashima Y, Abiko A, Ushikubi F, Hata A, Kaku K, Sano H, Eto M. (2001). Downregulation of the voltage-dependent calcium channel (VDCC) beta-subunit mRNAs in pancreatic islets of type 2 diabetic rats. *Biochem Biophys Res Commun*. Jan 26;280(3):923-32.

Iwashima Y, Pugh W, Depaoli AM, Takeda J, Seino S, Bell GI, Polonsky KS. (1993). Expression of calcium channel mRNAs in rat pancreatic islets and downregulation after glucose infusion. *Diabetes*. Jul;42(7):948-55.

Iwashima, Y., Abiko, A., Ushikubi, F., Hata, A., Kaku, K., Sano, H. and Eto, M. (2001). Downregulation of the voltage-dependent calcium channel (VDCC) beta-subunit mRNAs in pancreatic islets of type 2 diabetic rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 280 (3): 923-32.

Iwashima, Y., Pugh, W., Depaoli, A. M., Takeda, J., Seino, S., Bell, G.I., Polonsky, K. S. (1993). Expression of calcium channel mRNAs in rat pancreatic islets and downregulation after glucose infusion. *Diabetes*. 42 (7): 948-55.

Jefferson, L. S., Cherrington, A. D. and Goodman, H. M. Handbook of Physiology, sección 7. Sistema endocrino. Vol. II. The endocrine páncreas and regulation of metabolism. Oxford University Press. 2001. pp 49-78.

Jones OT, Bernstein GM, Jones EJ, Jugloff DG, Law M, Wong W, Mills LR. (1997). N-Type calcium channels in the developing rat hippocampus: subunit, complex, and regional expression. *J Neurosci.* 17(16):6152-64.

Kahn, S. E. (2000). The Importance of the b-Cell in the Patogénesis of Type 2 Diabetes Mellitus. *Am J Med.* 108 Suppl 6a: 2S-8S.

Kanaka-Gantenbein C, Tazi A, Czernichow P, Scharfmann R. (1995a). In vivo presence of the high.affinity NGF receptor TRK-A in the rat pancreas: differential localization during pancreatic development. *Endocrinology* 136: 761-769.

Kanaka-Gantenbein C, Dicou E, Czernichow P, Scharfmann R. (1995b). Presence of nerve growth factor and its receptor in vitro model of islets cell development: implication in normal islet morphogenesis. *Endocrinology* 136: 3154-3162.

Kato S, Ishida H, Tsuura Y, Tsuji K, Nishimura M, Horie M, Taminato T, Ikehara S, Odaka H, Ikeda I, Okada Y, Seino Y. (1996). Alterations in basal and glucose-stimulated voltage-dependent Ca²⁺ channel activities in pancreatic beta cells of non-insulin-dependent diabetes mellitus GK rats. *J Clin Invest.* 97(11):2417-25.

Kervran A, Randon J. (1980). Development of insulin release by fetal rat pancreas in vitro: effects of glucose, amino acids, and theophylline. *Diabetes.* 29(9):673-8.

Kindmark, H., Kohler, M., Arkhammar, P., Efendic, S., Larsson, O., Linder, S., Nilsson, T. and Berggren, P. O. (1994). Oscillations in cytoplasmic free calcium concentration in human pancreatic islets from subjects with normal and impaired glucose tolerance. *Diabetologia.* 37 (11): 1121-31.

King, J. C. (2006). Maternal obesity, metabolism and pregnancy outcomes. *Annu Rev Nutr.* 26: 271-91.

Kjems, L. L., Holst, J. J., Volund, A. and Madsbad, S. (2003). The influence of GLP-1 on glucose-stimulated insulin secretion: effects on b-cell sensitivity in type 2 and nondiabetic subjects. *Diabetes.* 52: 380–6.

Levi-Montalcini, R., Skaper, S. D., Dal Toso, R., Petrelli, L. and Leon, A. (1996). Nerve growth factor: from neurotrophin to neurokine. *Trends Neurosci.* 19 (11): 514-520.

Ligon, B., Boyd, A. E. 3rd and Dunlap, K. (1998). Class A calcium channel variants in pancreatic islets and their role in insulin secretion. *J Biol Chem.* 273 (22): 13905-11.

Liu G, Dilmac N, Hilliard N, Hockerman GH. (2003). Ca v 1.3 is preferentially coupled to glucose-stimulated insulin secretion in the pancreatic beta-cell line INS-1. *J Pharmacol Exp Ther.* 305(1):271-8.

Liu, G., Dilmac, N., Hilliard, N., Hockerman, G. H. (2003). Ca v 1.3 is preferentially coupled to glucose-stimulated insulin secretion in the pancreatic beta-cell line INS-1. *J Pharmacol Exp Ther.* 305 (1): 271-8.

MacDonald, P. E., Joseph, J. W. and Rorsman P. (2005). Glucose-sensing mechanisms in pancreatic beta-cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 360 (1464): 2211-25.

Magnelli, V., Avaltroni, A. and Carbone E. (1996). A single non-L-, non-N-type Ca²⁺ channel in rat insulin-secreting RINm5F cells. *Pflugers Arch.* 431 (3): 341-52.

Matschinsky, F. M. (1990). Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic beta-cells and hepatocytes. *Diabetes.* 39 (6): 647-52.

Matschinsky, F. M. (2002). Regulation of pancreatic beta-cell glucokinase: from basics to therapeutics. *Diabetes.* 51 Suppl 3:S394-S404.

Matschinsky, F., Liang, Y., Kesavan, P., Wang, L., Froguel, P., Velho, G., Cohen, D., Permutt, M. A., Tanizawa, Y., Jetton, T. L., Niswender, K. and Magnuson M. A. (1993). Glucokinase as pancreatic beta cell glucose sensor and diabetes gene. *J Clin Invest.* 92 (5): 2092-2098.

Mears, D. (2004). Regulation of insulin secretion in islets of Langerhans by Ca²⁺ channels. *J Membr Biol* 200: 57-66.

Mendonça, A. C., Carneiro, E. M., Bosqueiro, J. R., Crepaldi-Alves, S. C. and Boschero, A. C. (1998). Development of the insulin secretion mechanism in fetal and neonatal rat pancreatic B-cells: response to glucose, K⁺, theophylline, and carbamylcholine. *Braz J Med Biol Res.* 31 (6): 841-6.

Meneghel-Rozzo, T, Rozzo, A. Poppi, L. and Rupnik, M. (2004). In vivo and in vitro development of mouse pancreatic b-cells in organotypic slices. *Cell Tissue Res.* 316 (3):295-303.

Missale C, Boroni F, Sigala S, Buriani A, Fabris M, Leon A, Dal Toso R, Spano P. (1996). Nerve growth factor in the anterior pituitary: localization in mammotroph cells and cosecretion with prolactin by a dopamine-regulated mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(9):4240-5.

Namkung Y, Skrypnyk N, Jeong MJ, Lee T, Lee MS, Kim HL, Chin H, Suh PG, Kim SS, Shin HS. (2001). Requirement for the L-type Ca(2+) channel alpha(1D) subunit in postnatal pancreatic beta cell generation. *J Clin Invest.* 108(7):1015-22.

Namkung, Y., Skrypnyk, N., Jeong, M. J., Lee, T., Lee, M. S., Kim, H.L., Chin, H., Suh, P. G., Kim, S. S. and Shin, H. S. (2001). Requirement for the L-type Ca(2+) channel alpha(1D) subunit in postnatal pancreatic beta cell generation. *J Clin Invest.* 108 (7): 1015-22.

Navarro-Tableros V, Sanchez-Soto MC, Garcia S, Hiriart M. (2004). Autocrine regulation of single pancreatic beta-cell survival. *Diabetes.* 53(8):2018-23.

Nishimura S, Takeshima H, Hofmann F, Flockerzi V, Imoto K. (1993). Requirement of the calcium channel beta subunit for functional conformation. *FEBS Lett.* 324(3):283-6.

Nykjaer A, Willnow TE, Petersen CM. (2005). p75NTR-live or let die. *Curr Opin Neurobiol.* 15 (1): 49-57.

Ohta, M., Nelson, J., Nelson, D., Meglasson, M. D. and Erecinska, M. Effect of Ca++ channel blockers on energy level and stimulated insulin secretion in isolated rat islets of Langerhans. *J Pharmacol Exp Ther.* 264 (1): 35-40.

Otonkoski T, Andersson S, Knip M, Simell O. (1988). Maturation of insulin response to glucose during human fetal and neonatal development. Studies with perfusion of pancreatic isletlike cell clusters. *Diabetes.* 37(3):286-91.

Patapoutian, A. and Reichardt, L. F. (2001). Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol.* 11 (3): 272-80.

Pereverzev, A., Mikhna, M., Vajna, R., Gissel, C., Henry, M., Weiergraber, M., Hescheler, J., Smyth, N. and Schneider, T. (2002). Disturbances in glucose-tolerance, insulin-release, and stress-induced hyperglycemia upon disruption of the Ca(v)2.3 (alpha 1E) subunit of voltage-gated Ca(2+) channels. *Mol Endocrinol.* 16 (4): 884-95.

Persaud SJ, Harris TE, Burns CJ, Jones PM. (1999). Tyrosine kinases play a permissive role in glucose-induced insulin secretion from adult rat islets. *J Mol Endocrinol.* 22(1):19-28.

Porte, D. Jr. and Kahn, S. E. (1991). Mechanisms for hyperglycemia in type II diabetes mellitus: therapeutic implications for sulfonylurea treatment an update. *Am J Med.* 90 (6A): 8S-14S.

Pratley RE, Weyer C. (2001). The role of impaired early insulin secretion in the pathogenesis of Type II diabetes mellitus. *Diabetologia*. 44(8):929-45.

Pravettoni E, Bacci A, Coco S, Forbicini P, Matteoli M, Verderio C. (2000). Different localizations and functions of L-type and N-type calcium channels during development of hippocampal neurons. *Dev Biol*. 227(2):581-94.

Pressel DM, Mislér S. (1991). Role of voltage-dependent ionic currents in coupling glucose stimulation to insulin secretion in canine pancreatic islet B-cells. *J Membr Biol*. 124(3):239-53.

Pressel, D. M. and Mislér, S. (1991). Role of voltage-dependent ionic currents in coupling glucose stimulation to insulin secretion in canine pancreatic islet B-cells. *J Membr Biol*. 124 (3): 239-53.

Ramanadham S, Turk J. (1994). omega-Conotoxin inhibits glucose- and arachidonic acid-induced rises in intracellular [Ca²⁺] in rat pancreatic islet beta-cells. *Cell Calcium*. 15(3):259-64.

Ramanadham, S. and Turk, J. (1994). omega-Conotoxin inhibits glucose- and arachidonic acid-induced rises in intracellular [Ca²⁺] in rat pancreatic islet beta-cells. *Cell Calcium*. 15 (3): 259-64.

Randall, A. and Benham, C. D. (1999). Recent Advances in the Molecular Understanding of Voltage-Gated Ca_v2 Channels. *Mol Cell Neurosci*. 14 (4-5): 255-72.

Reaven EP, Gold G, Reaven GM. (1979). Effect of age on glucose-stimulated insulin release by the beta-cell of the rat. *J Clin Invest*. 64(2):591-9.

Roe MW, Worley JF 3rd, Tokuyama Y, Philipson LH, Sturis J, Tang J, Dukes ID, Bell GI, Polonsky KS. (1996). NIDDM is associated with loss of pancreatic beta-cell L-type Ca²⁺ channel activity. *Am J Physiol*. 270 (1 Pt 1): E133-140.

Roe, M. W., Worley, J. F., Tokuyama, Y., Philipson, L. H., Sturis, J., Tang, J., Dukes, I. D., Bell, G. I. and Polonsky, K. S. (1996). NIDDM is associated with loss of pancreatic β-cell L-type Ca²⁺ channel activity. *Am J Physiol* 270:E133-140.

Rorsman P, Arkhammar P, Bokvist K, Hellerstrom C, Nilsson T, Welsh M, Welsh N, Berggren PO. (1989). Failure of glucose to elicit a normal secretory response in fetal pancreatic beta cells results from glucose insensitivity of the ATP-regulated K⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 86(12):4505-9.

Rorsman P, Bokvist K, Ammala C, Eliasson L, Renstrom E, Gabel J. (1994). Ion channels, electrical activity and insulin secretion. *Diabete Metab*. 20(2):138-45.

Rorsman P, Bokvist K, Ammala C, Eliasson L, Renstrom E, Gabel. (1994). Ion channels, electrical activity and insulin secretion. *J. Diabete Metab.* 20(2):138-45.

Rorsman P, Eliasson L, Renstrom E, Gromada J, Barg S, Gopel S. (2000). The Cell Physiology of Biphasic Insulin Secretion. *News Physiol Sci.* 15: 72-7.

Rosenbaum T, Sanchez-Soto MC, Hiriart M. (2001). Nerve growth factor increases insulin secretion and barium current in pancreatic beta-cells. *Diabetes.* 50(8):1755-62.

Rosenbaum T, Vidaltamayo R, Sanchez-Herrera D, Hiriart M. (1996). Nerve growth factor increases sodium current in pancreatic beta cells. *J Membr Biol.* 153(1):53-8.

Rosenbaum, T., Sanchez-Soto, M. C. and Hiriart, M. (2001). Nerve growth factor increases insulin secretion and barium current in pancreatic beta-cells. *Diabetes.* 50 (8): 1755-62.

Rosenbaum, T., Vidaltamayo, R., Sanchez-Soto, M. C., Zentellam A., Hiriart, M. (1998). Pancreatic beta cells synthesize and secrete nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95 (13): 7784-7788.

Safayhi, H., Haase, H., Kramer, U., Bihlmayer, A., Roenfeldt, M., Ammon, H. P., Froschmayr, M., Cassidy, T. N., Morano, I., Ahlijanian, M. K. and Striessnig, J. (1997). L-type calcium channels in insulin-secreting cells: biochemical characterization and phosphorylation in RINm5F cells. *Mol Endocrinol.* 11 (5): 619-29.

Santi, C. M., Cayabyab, F. S., Sutton, K. G., McRory, J. E., Mezeyova, J., Hamming, K. S., Parker, D., Stea, A. and Snutch, T. P. (2002). Differential inhibition of T-type calcium channels by neuroleptics. *J Neurosci* 15; 22(2): 396-403.

Satin, L. S. (2000). Localized calcium influx in pancreatic beta-cells: its significance for Ca²⁺-dependent insulin secretion from the islets of Langerhans. *Endocrine.* 13 (3): 251-62.

Schor NF. (2005). The p75 neurotrophin receptor in human development and disease. *Prog Neurobiol.* 77 (3): 201-14.

Schulla V, Renstrom E, Feil R, Feil S, Franklin I, Gjinovci A, Jing XJ, Laux D, Lundquist I, Magnuson MA, Obermuller S, Olofsson CS, Salehi A, Wendt A, Klugbauer N, Wollheim CB, Rorsman P, Hofmann F. (2003). Impaired insulin secretion and glucose tolerance in beta cell-selective Ca_v1.2 Ca²⁺ channel null mice. *EMBO J.* 22(15):3844-54.

Schulla, V., Renstrom, E., Fiel, R., Fiel, S., Franklin, I., Gjinovci, A., Jing, X. J., Laux, D., Lundquist, I., Magnuson, M. A., Obermuller, S., Olofsson, C. S., Salehi, A., Wendt, A., Klugbauer, N., Wollheim, C. B., Rorsman, P., Hofmann, F. (2003). Impaired insulin secretion and glucose tolerance in beta cell-selective Ca_v1.2 Ca²⁺ channel null mice. *EMBO J.* 22(15):3844-54.

Seino S, Chen L, Seino M, Blondel O, Takeda J, Johnson JH, Bell GI. (1992). Cloning of the alpha 1 subunit of a voltage-dependent calcium channel expressed in pancreatic beta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(2):584-8.

Seino S. (1995). CACN4, the major alpha 1 subunit isoform of voltage-dependent calcium channels in pancreatic beta-cells: a minireview of current progress. *Diabetes Res Clin Pract.* 28 Suppl:S99-103.

Seino Y, Yamamoto T, Koh G. (1992). Insulin and glucose transporter gene expression in obesity and diabetes. *Proc Soc Exp Biol Med.* 200(2):210-3.

Seino, S., Chen, L., Seino, M., Blondel, O., Takeda, J., Jonson, J. H. and Bell, G. I. (1992). Cloning of the alpha 1 subunit of a voltage-dependent calcium channel expressed in pancreatic beta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89 (2): 584-8.

Shalitin S, Abrahami M, Lilos P, Phillip M. (2005). Insulin resistance and impaired glucose tolerance in obese children and adolescents referred to a tertiary-care center in Israel. *Int J Obes (Lond).* 29(6):571-8.

Sher E, Giovannini F, Codignola A, Passafaro M, Giorgi-Rossi P, Volsen S, Craig P, Davalli A, Carrera P. (2003). Voltage-operated calcium channel heterogeneity in pancreatic beta cells: physiopathological implications. *J Bioenerg Biomembr.* 35(6):687-96.

Sher, E., Biancardi, E., Pollo, A., Carbone, E., Li, G., Wollheim, C. B. and Clementi, F. (1992). Omega-Conotoxin-sensitive, voltage-operated Ca²⁺ channels in insulin-secreting cells. *Eur J Pharmacol.* 216 (3): 407-14.

Sher, E., Giovannini, F., Codignola, A., Passafaro, M., Giorgi-Rossi, P., Volsen, S., Craig, P., Davalli, A. and Carrera, P. (2003). Voltage-operated calcium channel heterogeneity in pancreatic beta cells: physiopathological implications. *J Bioenerg Biomembr.* 35 (6): 687-96.

Smith, P. A, Rorsman, P. and Ashcroft, F. M. Modulation of dihydropyridine-sensitive Ca²⁺ channels by glucose metabolism in mouse pancreatic beta-cells. *Nature.* 342 (6249): 550-3.

Smith, P. A., Rorsman, P. and Ashcroft, F. M. (1989). Modulation of dihydropyridine-sensitive Ca²⁺ channels by glucose metabolism in mouse pancreatic beta-cells. *Nature*. 342 (6249): 550-3.

Sofroniew, M. V., Howe, C. L., Mobley, W. C. (2001). Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu Rev Neurosci*. 24: 1217-81.

Sweet IR, Li G, Najafi H, Berner D, Matschinsky FM. (1996). Effect of a glucokinase inhibitor on energy production and insulin release in pancreatic islets. *Am J Physiol*. 271(3 Pt 1): E606-25.

Sweet, I. R., Li, G., Najafi, H., Berner, D. and Matschinsky, F. M. (1996). Effect of a glucokinase inhibitor on energy production and insulin release in pancreatic islets. *Am J Physiol*. 271 (3 Pt 1): E606-E625.

Tiedge, M. and Lenzen, S. (1993). Differential regulation of glucokinase and GLUT-2 glucose transporter gene expression in pancreas and liver from neonatal and 16 day old rats. *Biochem Mol Biol Int*. 29 (1):161-166.

Vajna, R., Klockner, U., Pereverzev, A., Weiergraber, M., Chen, X., Miljanich, G., Klugbauer, N., Hescheler, J., Perez-Reyes, E. and Schneider, T. (2001). Functional coupling between 'R-type' Ca²⁺ channels and insulin secretion in the insulinoma cell line INS-1. *Eur J Biochem*. 268 (4): 1066-75.

Vajna, R., Schramm, M., Pereverzev, A., Arnhold, S., Grabsch, H., Klockner, U., Perez-Reyes, E., Hescheler, J. and Schneider, T. (1998). New isoform of the neuronal Ca²⁺ channel alpha1E subunit in islets of Langerhans and kidney-distribution of voltage-gated Ca²⁺ channel alpha1 subunits in cell lines and tissues. *Eur J Biochem*. 57 (1): 274-85.

Valera A, Solanes G, Fernandez-Alvarez J, Pujol A, Ferrer J, Asins G, Gomis R, Bosch F. (1994). Expression of GLUT-2 antisense RNA in beta cells of transgenic mice leads to diabetes. *J Biol Chem*. 269(46):28543-6.

Valera, A., Solanes, G., Fernandez-Alvarez, J., Pujol, A., Ferrer, J., Asins, G., Gomis, R. and Bosch, F. (1994). Expression of GLUT-2 antisense RNA in beta cells of transgenic mice leads to diabetes. *J Biol Chem*. 269 (46): 28543-28546.

Vance CL, Begg CM, Lee WL, Haase H, Copeland TD, McEnery MW. (1998). Differential expression and association of calcium channel alpha1B and beta subunits during rat brain ontogeny. *J Biol Chem*. 273(23):14495-502.

Vance, C. L., Begg, C. M., Lee, W. L., Haase, H., Copeland, T. D. and McEnery, M. W. (1998). Differential expression and association of calcium channel alpha1B and beta subunits during rat brain ontogeny. *J Biol Chem*. 273 (23): 14495-502.

Viard P, Butcher AJ, Halet G, Davies A, Nurnberg B, Heblich F, Dolphin AC. (2004). PI3K promotes voltage-dependent calcium channel trafficking to the plasma membrane. *Nat Neurosci.* 7(9):939-46.

Viard, P., Butcher, A. J., Halet, G., Davies, A., Nurnberg, B., Heblich, F. and Dolphin, A. C. (2004). PI3K promotes voltage-dependent calcium channel trafficking to the plasma membrane. *Nat Neurosci.* 7 (9): 939-46.

Vidaltamayo R, Sanchez-Soto MC, Hiriart M. (2002). Nerve growth factor increases sodium channel expression in pancreatic beta cells: implications for insulin secretion. *FASEB J.* 16(8):891-2.

Wang, L., Bhattacharjee, A., Zuo, Z., Hu, F., Honkanen, R. E., Berggren, P. O. and Li, M. (1999). A low voltage-activated Ca²⁺ current mediates cytokine-induced pancreatic beta-cell death. *Endocrinology.* 140 (3): 1200-4.

Welsh, M., Anneren, C., Lindholm, C., Kriz, V. and Oberg-Welsh, C. (2000). Role of tyrosine kinase signaling for beta-cell replication and survival. *Ups J Med Sci.* 105 (2): 7-15.

Weyer C, Bogardus C, Mott DM, Pratley RE. (1999). The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 104(6):787-94.

Weyer, C., Bogardus, C. and Pratley, R. E. Metabolic characteristics of individuals with impaired fasting glucose and/or impaired glucose tolerance. 1999. *Diabetes* 48: 2197-2203.

Weyer, C., Tataranni, P. A., Bogardus, C. and Pratley, R. E. (2001). Insulin resistance and insulin secretory dysfunction are independent predictors of worsening of glucose tolerance during each stage of type 2 diabetes development.. *Diabetes Care* 24: 89-94.

Wiesmann, C. and de Vos, A. M. (2001). Nerve growth factor: structure and function. *Cell Mol Life Sci.* 58(5-6):748-59.

Wiser, O., Trus, M., Hernandez, A., Renstrom, E., Barg, S., Rorsman, P. and Atlas, D. (1999). The voltage sensitive Lc-type Ca²⁺ channel is functionally coupled to the exocytotic machinery. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96 (1): 248-53.

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

Yang SN, Berggren PO. (2005). Beta-cell Ca^v channel regulation in physiology and pathophysiology. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 288 (1): E16-28.

Yang, S. N. and Berggren, P. O. (2005). Beta-cell CaV channel regulation in physiology and pathophysiology. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 288 (1): E16-28.

Yasuda K, Yamada Y, Inagaki N, Yano H, Okamoto Y, Tsuji K, Fukumoto H, Imura H, Seino S, Seino Y. (1992). Expression of GLUT1 and GLUT2 glucose transporter isoforms in rat islets of Langerhans and their regulation by glucose. *Diabetes.* 41(1):76-81.

Zampieri, N. and Chao, M. V. (2004). The p75 NGF receptor exposed. *Science.* 7; 304(5672):833-4.

Zhuang H, Bhattacharjee A, Hu F, Zhang M, Goswami T, Wang L, Wu S, Berggren PO, Li M. (2000). Cloning of a T-type Ca²⁺ channel isoform in insulin-secreting cells. *Diabetes.* 49(1):59-64.