



5
2ej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE
POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

EFFECTOS DEL FACTOR DE CRECIMIENTO NEURAL Y DEL
AMP CICLICO SOBRE LA DIFERENCIACION MORFOLOGICA
DE CELULAS BETA PANCREATICAS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE LICENCIADO
EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA
P R E S E N T A

ROMAN VIDAL TAMAYO RAMIREZ

MEXICO, D.F.

1994

TESIS CON
FALTA DE CRICEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está 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.

**A ROMAN Y CATALINA: MIS PADRES,
QUE CON SU AMOR, APOYO Y COMPRENSION
ME HAN HECHO Y DEJADO SER LO QUE SOY.
GRACIAS POR SER MIS SINODALES MAS CRITICOS.**

**A MIS TRES HERMANOS: RAFAEL, RODRIGO Y ROSAURA,
POR HABER CRECIDO CONMIGO.**

A RAFAEL, POR SER SIEMPRE MI MEJOR AMIGO.

**A RODRIGO Y ROSAURA, POR QUE CON USTEDES
CONOCI EL PLACER DE ENSEÑAR.**

**A TAMARA, POR COMPARTIR Y POR NUESTRA RELACION.
GRACIAS POR APOYARME SIEMPRE Y POR AYUDARME
A TERMINAR ESTE TRABAJO, QUE EN MUCHO, ES LA
PRIMERA META A LA QUE LLEGAMOS JUNTOS.**

**A CARLOS, POR AYUDARME A DAR LOS PRIMEROS PASOS
EN ESTE NEGOCIO, Y POR ENSEÑARME QUE EN ESTA CARRERA,
LO MAS IMPORTANTE ES HABLAR SIEMPRE CON LA VERDAD.**

**A EDA, POR APOYARME EN MI PRIMER PROYECTO,
DURANTE TODO UN LARGO AÑO.**

**A MEMO, POR ENSEÑARME QUE ESTE BUSINESS DEBE
SER DIVERTIDO Y EMOCIONANTE. GRACIAS POR DARME LA
OPORTUNIDAD DE CONTINUAR CON MIS PININOS COMO MAESTRO.**

**A TOÑO, POR ENSEÑARME EL VALOR DE LA IRREVERENCIA,
Y POR CONFIAR EN MI LO SUFICIENTE COMO PARA
ECHAR A PERDER DOS GENERACIONES DE BIOLOGOS.**

**A TODOS USTEDES, PORQUE MAS QUE MAESTROS,
HAN SIDO MIS AMIGOS.**

**A EMA, POR QUE GRACIAS A TI PUEDO CONTINUAR
DISFRUTANDO DE LA SONRISA DE MI MADRE.**

**A ALEXA Y MIGÜELIN, PORQUE LA AMISTAD VA
MAS ALLA DE LA PRESENCIA Y EL TIEMPO.**

**A NINA E ISAAC, POR LOS MICROCHIPS, Y PORQUE
LA AMISTAD TAMBIEN SIGNIFICA APRENDER JUNTOS.**

**A TODOS MIS AMIGOS EN LOS DIFERENTES LABORATORIOS: FABIOLA,
NACHO, RAFAEL Y ALEX, EL VEN Y EL WILOX, GABO Y GABY, EMMY,
LA ENANA, ALCLONSO Y DANIEL (AUNQUE NO LO CREA); PORQUE
GRACIAS A USTEDES, LA ESTANCIA FUE MAS DIVERTIDA
Y FACIL DE SOPORTAR.**

**A TODOS MIS "ALUMNILLOS DE INDIAS", POR SOPORTAR
EL PROCESO DE APRENDIZAJE DE SER MAESTRO.**

Mi primer contacto con la teoría del sistema neuroendocrino difuso, fue a finales del segundo año de mi carrera, cuando el Dr. Carlos Valverde nos dió una clase sobre este tema en el curso de biología celular. Desde ese día me interesé por el estudio de la fisiología y la biología del desarrollo, lo que a final de cuentas me llevó a realizar este trabajo. Por esto, quiero externar mi más sincero agradecimiento al Dr. Valverde, por encausarme en este tema, y por dedicar mucho de su valioso tiempo a la revisión de este trabajo, y a la discusión del mismo, que fructificó en correcciones muy valiosas para mi tesis de licenciatura.

De alguna manera, el proceso creativo es como el desarrollo de un hijo; de una masa informe de ideas surge algo coherente y ligado, que a veces, como los hijos mismos, nos harta y lo dejamos volar por un momento con sus alas propias. Si las bases son firmes, nuestros vástagos no caerán y emprenderán el vuelo hacia un lugar incierto, que es su destino final.

Por mucho tiempo, he oído y pensado, que terminar este trabajo me llevó más tiempo del necesario; sin embargo, la academia no es el único medio de crecer como persona; porque los seres humanos también se forman escalando cinco dieces o dando clases, o simplemente, compartiendo el tiempo con alguien querido. A fin de cuentas, todo se resume a lo que dijo M. W. Little: "There is no pleasure in having nothing to do; the fun is in having lots to do and not doing it."

Román Vidal Tamayo Ramírez

Mayo de 1994.

AGRADEZCO PROFUNDAMENTE A LOS DOCTORES: MAURICIO DIAZ,
FRANCISCO FERNANDEZ, MARCIA HIRIART, ANA LUISA PIÑA
Y ALEJANDRO ZENTELLA, QUE HAYAN DEDICADO PARTE DE SU
TIEMPO A LA REVISION DE ESTE TRABAJO.

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO BAJO LA DIRECCION
DE LA DRA. MARCIA HIRIART URDANIVIA, Y FUE
APOYADO POR LA DIRECCION GENERAL DE ASUNTOS
DEL PERSONAL ACADEMICO DE LA UNAM,
MEDIANTE UNA BECA PARA SU AUTOR.

INDICE

RESUMEN	1
I. INTRODUCCION	3
1. ONTOGENIA DEL ISLOTE PANCREATICO.	4
a) Estructura y organización del islote pancreático.	4
b) Desarrollo embrionario del páncreas.	6
b.1) Desarrollo del páncreas exocrino.	6
b.2) Desarrollo del islote pancreático.	7
2. FACTOR DE CRECIMIENTO NEURAL.	12
a) El descubrimiento del factor de crecimiento neural.	12
b) Estructura del factor de crecimiento neural.	12
c) Efectos del NGF sobre sus células blanco.	13
d) Receptores a NGF.	16
3. MECANISMOS CELULARES INVOLUCRADOS EN EL CRECIMIENTO DE LOS PROCESOS NEURÍTICOS.	18
II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	22
III. MATERIAL Y METODOS	23
a) Cultivo de células.	23
b) Inmunocitoquímica e inmunofluorescencia.	25
c) Evaluación de cambios morfológicos.	26
d) Conteo de neuritas positivas por inmunofluorescencia.	27

e) Análisis estadístico.	27
IV. RESULTADOS	28
1. CAMBIOS MORFOLOGICOS INDUCIDOS POR NGF Y dbAMPc EN CELULAS β DE ADULTO.	28
a) Células β testigo.	28
b) Células β tratadas con dbAMPc.	28
c) Células β tratadas con NGF.	31
d) Células β tratadas con NGF y dbAMPc.	33
2. CAMBIOS MORFOLOGICOS INDUCIDOS POR NGF Y dbAMPc EN CELULAS FETALES	37
3. SITIOS DE UNION A NGF 2.5S EN CELULAS β DE ADULTO	39
4. PRESENCIA DE TUBULINA, PROTEINA TAU, GABA E INSULINA EN LAS NEURITAS DE LAS CELULAS β DE ADULTO	42
V. DISCUSION	47
VI. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	55
VII. GLOSARIO	58
VIII. BIBLIOGRAFIA	60

RESUMEN

Las células β del páncreas tienen la capacidad de extender procesos citoplásmicos al ser cultivadas *in vitro*. Estos procesos expresan componentes propios del citoesqueleto neuronal, por y por analogía se les llama procesos neuríticos o neuritas. En este trabajo se evaluaron los efectos del factor de crecimiento neural (NGF) y del monofosfato cíclico de dibutilil adenosina (dbAMPc) sobre el crecimiento de los procesos de las células β ; ya que estos factores promueven el desarrollo de las neuritas en varios tipos celulares. Estos efectos se estudiaron en cultivos *in vitro* de células β provenientes de ratas de dos edades distintas, adultos juveniles y fetos de 18 días de gestación.

Los datos obtenidos indican que tanto el NGF como el dbAMPc promueven un aumento en el porcentaje de las células β que extienden neuritas, y éstas son de mayor longitud cuando las células son cultivadas en presencia de los dos factores simultáneamente. También se encontró que el crecimiento de los procesos no depende de la edad celular, porque tanto las células β de adulto como las fetales fueron capaces de extender los procesos en respuesta a los dos factores.

Otra característica de los procesos neuríticos es la presencia de microtúbulos en su interior, los cuales son necesarios para la función de las neuritas; por esto, también se estudio la expresión de tubulina β en los procesos neuríticos de las células β , ya que esta proteína es uno de los unidades básicas de formación de microtúbulos. Se encontró que los procesos de las células β expresan tubulina y proteína Tau, que es otro componente del citoesqueleto neuronal y que solamente expresan los tipos celulares derivados del neuroectodermo, esto indica también la homología entre las neuritas y los procesos de las células β .

Los cambios morfológicos no influyen en la función de las células β , ya que éstas siguen sintetizando insulina y ácido γ -amino butírico (GABA), los cuales las células β sintetizan *in vivo*; sin embargo, estas dos moléculas se redistribuyen a lo largo de las neuritas de las células β , lo que indica que los microtúbulos presentes en estos procesos son activos y funcionales, en cuanto al transporte de vesículas de secreción.

El desarrollo de neuritas y la síntesis de GABA, que es un neurotransmisor, por parte de las células β han cuestionado su origen embrionario, ya que estas células se encuentran dispersas entre el tejido acinar pancreático, que tiene un claro origen endodérmico; aunque se ha propuesto

que existe un origen común para las células β y el tejido acinar, éste no se ha podido comprobar; y el hecho de que las células β compartan varias características, como el GABA y el crecimiento de neuritas, con los tipos celulares derivados del neuroectodermo ha llevado a proponer un origen ectodérmico para las células β , que ha sido debatido durante largo tiempo.

En este trabajo demostramos que las células β son sensibles a la acción del NGF sobre su morfología. Esta sensibilidad también es compartida por las células derivadas del neuroectodermo, y aunque el NGF puede ejercer sus efectos sobre células que no se originan del ectodermo, estos efectos nunca son a nivel de la morfología; por esto, la sensibilidad de las células β al NGF se puede considerar como una característica más que comparten las células β y las células neuroectodérmicas. A pesar de que esto no es un marcador definitivo de origen embrionario, los datos obtenidos en este trabajo podrían ser una evidencia más a favor del origen neuroectodérmico para las células β del islote pancreático.

Abreviaturas utilizadas: AMPc: monofosfato cíclico de adenosina; dbAMPc: monofosfato cíclico de dibutiril adenosina; APUD: vía de captura y descarboxilación de precursores de aminas fluorogénicas; β TC3: células β de ratón transgénico no. 3; ESM: error estándar de la media; FACS: clasificador de células activado por fluorescencia; GABA: ácido γ -amino butírico; HBSS: solución salina balanceada de Hanks; HBSS-BSA: HBSS suplementada con gentamicina y albúmina sérica bovina; IC: inmunocitoquímica; IF: inmunofluorescencia indirecta; NGF: factor de crecimiento neural; NGF 2.5S: fracción del NGF con coeficiente de sedimentación de 2.5S; NGF 7S: fracción del NGF con coeficiente de sedimentación de 7S; PC12: feocromocitoma de rata no. 12; p75^{NGFR}: receptor de NGF de baja afinidad; p140^{trkA}: receptor de NGF de alta afinidad; RIN5F: insulinoma de rata no. 5F; TBS: solución salina amortiguada por Tris; TBS-SNC: TBS suplementada con suero normal de cabra.

"...You killed him for pride and because you are a fisherman. You loved him when he was alive and you loved him after. If you love him, it is not a sin to kill him. Or is it more?..."

- Ernest Hemingway. *The old man and the sea.*

I. INTRODUCCION

El desarrollo embrionario de las células β pancreáticas no es conocido claramente, ya que los islotes pancreáticos, de los cuales forman parte estas células, se encuentran inmersos y distribuidos entre los alvéolos acinares del páncreas, los cuales tienen un claro origen endodérmico ⁶⁶.

Aunque las células β parecen provenir de las mismas células primordiales del tejido acinar, poseen varias características que comparten con células de origen neuroectodérmico ⁸⁰. Entre estas características, propias de células provenientes de la cresta neural, se encuentran tanto antígenos y receptores ²³, así como enzimas expresadas por neuronas y por tipos celulares del sistema neuroendocrino difuso ^{71,82}. Asimismo, las células β sintetizan y almacenan un neurotransmisor, el ácido γ -amino butírico ⁶⁰ (GABA).

Además de los marcadores antigénicos y bioquímicos, las células β son eléctricamente excitables; es decir, al ser estimuladas química o eléctricamente, las células β responden evocando potenciales de acción, despolarizando y repolarizando su voltaje transmembranal ¹⁹.

Este repertorio de características neuroectodérmicas se ve incrementado por la capacidad de las células β de extender procesos citoplásmicos espontáneamente, al ser cultivadas *in vitro*, disociadas y en presencia de suero fetal bovino ⁸⁰. Estos procesos expresan neurofilamentos de peso molecular bajo (160 kDa) y periferina, que son componentes del citoesqueleto de los procesos celulares extendidos por las neuronas; por lo que a los procesos de las células β también se les ha llamado neuritas o procesos neuríticos ^{80,24}.

Sin embargo, pese a que todas estas características sustentarían la idea del origen neuroectodérmico de las células β , éste no ha podido ser comprobado, porque existen varias

evidencias que apoyan la teoría de un origen endodérmico; por ejemplo, se ha observado el desarrollo de islotes pancreáticos en embriones carentes de neuroectodermo ⁶⁷.

En este trabajo se estudiará el papel que el factor de crecimiento neural (NGF) pudiera tener en el crecimiento de los procesos neuríticos, en cultivos primarios *in vitro*, de células β ; ya que el NGF fue el primer factor neurotrófico descubierto; y entre sus efectos tróficos se encuentra la inducción del crecimiento de neuritas en distintos tipos celulares ⁴⁷. Se estudiarán, además, los mecanismos celulares que podrían estar involucrados en el crecimiento de estas neuritas, como la participación del citoesqueleto y la redistribución de vesículas y gránulos de secreción en las células β .

1. ONTOGENIA DEL ISLOTE PANCREÁTICO.

a) Estructura y organización del islote pancreático.

El páncreas de los mamíferos adultos es una glándula de función mixta. Por un lado, el tejido acinar lleva a cabo la secreción exocrina de proteasas, nucleasas y otras enzimas digestivas hacia el intestino delgado. Por otra parte, los islotes de Langerhans, que se encuentran dispersos entre el tejido acinar (como se ve en la figura 1), son los encargados de la función endocrina del páncreas, principalmente de la secreción de hormonas responsables de la homeostásis energética, como glucagon, insulina y somatostatina ⁹³.

Cada una de las hormonas pancreáticas es sintetizada por un tipo celular distinto. Así, el glucagon es sintetizado por las células α , que constituyen aproximadamente el 10% de las células de un islote pancreático normal, y que por lo regular, se encuentran en la periferia de éste, como se puede ver en la figura 2.

La insulina es producida y secretada por las células β , las cuales se encuentran principalmente en el centro del islote y constituyen alrededor del 80% de la población celular. Las células δ producen somatostatina y constituyen el 8% de las células de un islote. Por último, también existe un tipo celular escaso y no siempre presente en los islotes, que secreta polipéptido pancreático ⁶¹.

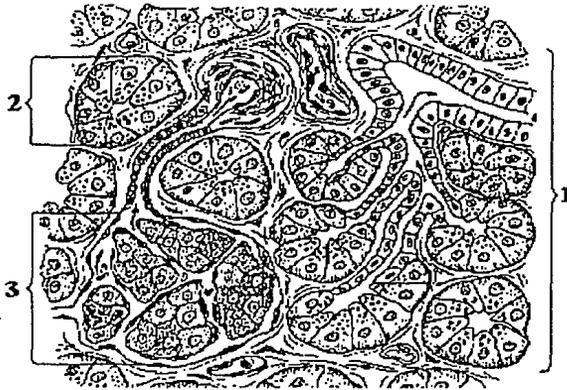


FIGURA 1. HISTOLOGIA DEL TEJIDO PANCREATICO.

Como se ve en este esquema, los islotes de Langerhans se encuentran dispersos entre el tejido acinar exocrino del páncreas. 1.- Lóbulo pancreático 2.- Alvéolo acinar 3.- Islote de Langerhans (Modificado de Yúrina, 1985)

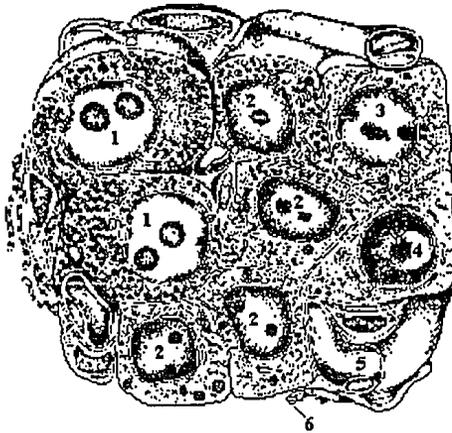


FIGURA 2. ESTRUCTURA DEL ISLOTE DE LANGERHANS.

En esta figura se esquematiza la estructura de un corte de islote pancreático, con las proporciones aproximadas de cada tipo celular, así como las relaciones espaciales que existen entre las células del islote. 1.- Células α 2.- Células β 3.- Células δ 4.- Células PP 5.- Capilar sanguíneo 6.- Fibras Nerviosas (Modificado de Yúrina, 1985)

Existen uniones comunicantes entre las células de un islote, tanto homólogas entre células β , como heterólogas entre células β y α , o bien células β y δ . Se supone que estas uniones comunicantes sirven para regular la función de estos tipos celulares ^{62,55}. Esta función podría también ser regulada por interacciones paracrinas entre las hormonas secretadas por las células del islote ⁶⁸.

b) Desarrollo embrionario del páncreas.

b.1) Desarrollo del páncreas exocrino.

El páncreas en los mamíferos se origina a partir de dos primordios: uno ventral y otro dorsal, que geman desde el epitelio intestinal anterior ⁶⁶. El primordio ventral origina la cabeza del páncreas, mientras que el primordio dorsal origina el cuerpo y la cola, que constituyen la mayor parte de la masa pancreática ⁵⁸, y en donde existe una mayor densidad de islotes de Langerhans ³⁴.

La yema pancreática dorsal aparece en la rata hacia el día 11 de gestación, cuando el embrión llega al estadio de 20 somitas. Esta yema se aprecia como una protrusión del intestino delgado anterior, y está formada, al igual que el epitelio intestinal, por una monocapa de células, cuyos ápices forman un lumen estrecho ⁶⁶, que casi no es observable mediante microscopía de luz.

La yema pancreática aumenta de volumen con el tiempo, lo cual se debe tanto a un aumento del tamaño celular, como a un aumento en el número de células. La yema se encuentra rodeada por una cubierta o "colchón" de células mesenquimales, que parecen proporcionar factores indispensables para el desarrollo del páncreas ⁶⁵.

Cuando se llega al estadio de 24 somitas, se empieza a notar una constricción en la yema pancreática, que hace que se separe en dos lóbulos: anterior y posterior, que con el tiempo aumentarán de tamaño. Dado el aumento en el número celular y la aparición de los primeros islotes, la superficie de los lóbulos se vuelve más irregular; tanto, que hacia el final del día 12 de gestación la lobulación de la yema es muy evidente.

El lumen pancreático forma en este momento una red muy ramificada, aunque no es completamente visible, dado el gran número celular y el poco aumento en el volumen de la yema pancreática. Esto hace que el espacio interapical sea muy estrecho ⁶⁶.

En los días siguientes, el crecimiento de las digitaciones pancreáticas hacia el mesénquima, dará lugar a la localización clásica de células mesenquimales entre las ramificaciones de la glándula exocrina. El lumen pancreático se expande y hacia el día 15 se hace totalmente evidente, hasta alcanzar su mayor tamaño entre los días 16 y 17. El desarrollo del lumen del tejido acinar marca el fin de la histodiferenciación del páncreas exocrino ⁶⁶.

El desarrollo del tejido acinar va acompañado de la citodiferenciación de las células productoras de zimógeno. Desde el primer día que aparece el divertículo pancreático (12 de gestación), son detectables las enzimas específicas del páncreas, tales como la amilasa, la tripsina y la ribonucleasa ⁶⁵; pese a que las primeras células con gránulos de zimógeno en su interior, no son detectables sino entre los días 15-16 de gestación, cuando la producción de enzimas pancreáticas se encuentra en una fase exponencial ⁶⁵.

b.2) Desarrollo del islote pancreático.

Las células precursoras del islote pancreático son observadas por primera vez desde el estadio de 20-22 somitas (día 11). Este es el primer momento en que las células dispersas en la yema pancreática dorsal, muestran los gránulos de secreción característicos de las células endocrinas pancreáticas, al ser teñidas con azul de metileno ⁶⁵.

Las células endocrinas primordiales aparecen dispersas entre el tejido de la yema pancreática dorsal, y aumentan de número entre los estadios de 20 a 30 somitas; sin embargo, el número de células endocrinas no aumenta por división celular; y es muy difícil encontrar figuras mitóticas en estas células ⁶⁶.

Se ha propuesto que las células acinares pudieran transformarse en células endocrinas mediante un proceso que se ha llamado transdiferenciación ⁶⁵, es decir, que un tipo celular ya diferenciado se transforme en otro de diferenciación distinta. Se han reportado células capaces de producir zimógeno y por lo menos un tipo de gránulo endocrino, cuando existen muy pocas células endocrinas en el páncreas. Esto se ha tomado como un indicio de la conversión de células acinares en endocrinas ⁶⁵; sin embargo, estas células de características mixtas, entre exocrinas y endocrinas, sólo se han observado en casos graves de diabetes tipo I, ocasionada por la destrucción de los islotes de Langerhans, y en neoplasias del tejido acinar; pero nunca en

situaciones no patológicas ⁶⁵.

Entre los estadios de 28 y 30 somitas, las células endocrinas se empiezan a encontrar formando pequeños islotes de pocas células, mismos que son excluidos del tejido de la yema pancreática, y que se recluyen entre el tejido de la matriz de la yema, y la lámina basal de éste⁶⁵. La exclusión del tejido endocrino parece deberse a un cambio en el patrón de citocinesis; ya que las células que rodean a los islotes se dividen perpendicularmente al eje del lumen pancreático, al contrario del resto de las células acinares, cuyo eje de división es paralelo al eje del lumen⁶⁵.

Cuando el embrión llega al día 12 de gestación y presenta entre 35 y 40 somitas, la mayoría de las células endocrinas se encuentran en islotes de hasta 12 células ⁶⁵. Estos islotes, con el tiempo, aumentarán en número celular; pero, como ya se dijo, es probable que no se deba a la división de las células del islote, ya que es muy difícil encontrar figuras mitóticas entre estas células, cuyos núcleos casi no incorporan timidina tritiada ⁶⁵.

Los islotes forman grupos celulares unidos a uno o más acinos, hacia el día 15 de gestación. Varios islotes pequeños se van uniendo para formar islotes cada vez más grandes que, al menos bajo el microscopio de luz, son indistinguibles del tejido acinar, debido a que se mantiene una relación muy estrecha entre los distintos tipos celulares ⁶⁵.

Sólo hasta etapas tardías del desarrollo del feto de rata (20-21 días), se pueden encontrar islotes que no mantienen ningún tipo de unión con el tejido exocrino, y que aparecen con la típica morfología redonda, casi libres del tejido exocrino ⁶⁵.

Como se puede ver en la figura 3, la diferenciación del tejido pancreático endocrino es concomitante y contemporánea con la diferenciación del tejido pancreático exocrino. Las células que producen las hormonas pancreáticas aparecen secuencialmente en la yema pancreática dorsal.

Así, las células α son detectables, por medio de anticuerpos contra glucagon, entre los días 11 y 12 de gestación ⁸¹. Las primeras células que sintetizan insulina (β), aparecen por primera vez el día 13 ⁸¹, aunque es posible encontrar insulina en el tejido pancreático desde el día 11 de gestación ⁶⁵. Las células δ , que sintetizan somatostatina, son evidentes el día 18. Mientras que las células productoras de polipéptido pancreático no aparecen sino hasta el nacimiento ⁸³.



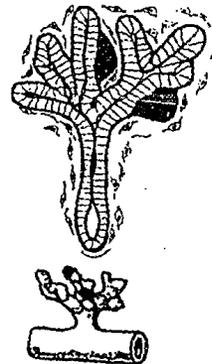
A) Cuando el embrión tiene 10 días de gestación (menos de 20 somitas), las células que originarán la yema pancreática dorsal son indistinguibles del resto de la monocapa celular del epitelio intestinal.



B) Cuando el embrión presenta 20 somitas, el primordio pancreático dorsal comienza a gemar desde el epitelio intestinal anterior. Las células endocrinas (en negro) se encuentran dispersas entre el epitelio acinar.



C) Con el paso del tiempo la yema pancreática aumenta de tamaño (25-28 somitas). Como el aumento en el número de células es mayor al aumento en el volumen, el primordio se segmenta. Las células endocrinas comienzan a ser excluidas del tejido acinar.



D) El crecimiento del primordio pancreático hacia el mesénquima, da lugar a la estructura característica de las interdigitaciones de los ductos pancreáticos. Las células endocrinas comienzan a formar acúmulos, que aumentarán de tamaño; y que al excluirse del tejido exocrino darán lugar a los islotes de Langerhans.

FIGURA 3.- DESARROLLO EMBRIONARIO DEL PANCREAS.

En esta figura se esquematiza el desarrollo embrionario del páncreas de la rata, entre el día 10 de gestación, cuando el embrión presenta menos de 20 somitas, y el día 15 de gestación, cuando el embrión presenta de 28 a 30 somitas. (Modificada de Pictet y Rutter, 1972)

Existen varias evidencias que apoyan la teoría de un origen neuroectodérmico para las células del islote pancreático. Entre ellas se encuentran varios marcadores celulares, que son expresados por las células β y que han sido considerados como marcadores propios de células de origen neuroectodérmico ⁴³.

Los primeros de estos marcadores identificados, son las monoaminas fluorogénicas, características de las células del sistema neuroendocrino difuso, también llamado APUD, porque las células capturan y descarboxilan precursores de aminas ⁶⁴. Este sistema fue propuesto como una teoría para explicar las similitudes, entre las células del sistema nervioso y el endocrino, porque solamente las células de estos dos sistemas sintetizan monoaminas que fluorescen al ser fijadas con vapores de formaldehído ⁶³ (fenotipo APUD). Estas características compartidas llevaron a proponer un origen común para el sistema nervioso y el sistema endocrino, con lo cual el sistema endocrino se convertía en una rama más del sistema nervioso ⁶⁴.

Otros marcadores expresados por las células β , y que son compartidos por las células de origen neuroectodérmico, son: la enolasa específica neuronal ⁷¹, enzima que es sintetizada por neuronas y astrocitos del sistema nervioso central. También son sintetizadas por la célula β varias enzimas necesarias para expresar el fenotipo APUD, como la dopa descarboxilasa ⁸⁴, la tirosina hidroxilasa y la feniletanolamina N-metiltransferasa ⁸².

Además de esas proteínas, las células β expresan las enzimas indispensables para la síntesis y el almacenamiento del GABA, como la glutamato descarboxilasa ⁶⁰; ya que el GABA se almacena en microvesículas distintas de los gránulos de secreción de insulina ⁷³. Otra proteína del aparato secretor, compartida por las células β y las células del neuroectodermo, es la sinaptofisina ⁹⁰, una glicoproteína transmembranal presente en las vesículas presinápticas neuronales, y que también se encuentra en diversos carcinomas epiteliales ⁹⁰.

Los marcadores bioquímicos compartidos por las células β y otros tipos celulares de origen neuroectodérmico, también incluyen componentes de la membrana plasmática, como el antígeno A₂B₅, y los receptores a toxina tetánica, que son gangliósidos presentes en neuronas y astrocitos ²³.

Además de compartir estos marcadores bioquímicos, las células β también comparten características fisiológicas y morfológicas con células ectodérmicas. Una de estas características fisiológicas compartidas es la actividad eléctrica de las células β , que es necesaria e indispensable

para la secreción de insulina ⁶; porque las células β desarrollan potenciales de acción al ser estimuladas por glucosa ¹⁹ y esto induce la secreción de insulina ⁶.

La principal característica morfológica que comparten las células β con las células neuroectodérmicas, es la extensión de procesos parecidos a neuritas al ser cultivadas *in vitro* ⁸⁰. Para esto, las células β deben de estar disociadas, ya que al parecer, el crecimiento de los procesos es inhibido por el contacto entre las células ⁸⁰.

Todas estas características compartidas no son las únicas evidencias que sugieren un origen neuroectodérmico para las células β ; al menos una serie de experimentos llevados a cabo en ratones transgénicos, también apoyan esta idea ². En estos experimentos se encontró que tanto las células β del páncreas, como las células del tubo neural, expresan a lo largo del desarrollo embrionario un transgene, construido con el promotor del gene de insulina II de rata y la región codificadora del antígeno T grande del virus SV40 ². Esto hace pensar en una ontogenia común para las células β y las células del tubo neural.

Sin embargo, también existen evidencias experimentales que apoyan la teoría de un origen mesoendodérmico. Por un lado se encuentran los experimentos con quimeras de embriones de pollo y codorniz, en los que el neuroectodermo de una especie es transplantado al mesoendodermo de la otra, precisamente antes del comienzo de la migración de la cresta neural. En estos experimentos se observa que, tanto las células del islote como las del tejido acinar, provienen de la especie donadora del mesoendodermo ^{44,25}. Con esto se descarta que las células del islote provengan de la cresta neural.

Por otra parte, existe otra evidencia a favor del origen mesoendodérmico, que son los experimentos con embriones de rata de 9 días de gestación, a los que se les disecta el ectodermo y se cultiva *in vitro* el mesoendodermo durante 11 días. Sin embargo, la falta de ectodermo no afecta el desarrollo de las células β , ya que éstas aparecen al fin del cultivo ⁶⁷.

Aunque existen evidencias para los dos posibles orígenes embriológicos de las células β , no se ha podido comprobar incontrovertiblemente ninguno de ellos; puesto que los experimentos en los que se manipulan las capas germinales de embriones no pueden descartar migraciones más tempranas. Pero tampoco la expresión de un marcador celular indica conclusivamente el origen embrionario ⁴³.

2. FACTOR DE CRECIMIENTO NEURAL

a) El descubrimiento del factor de crecimiento neural.

El primer factor de crecimiento con propiedades neurotróficas en ser descrito, fue el factor de crecimiento neural (NGF). La existencia de un factor que fomentaba la sobrevivencia y el desarrollo de fibras nerviosas simpáticas, se sospechaba desde 1948. En ese año se encontró que un sarcoma murino inducía el crecimiento de fibras nerviosas, al ser transplantado a embriones de pollo de 3 días de gestación¹¹. Se concluyó que este sarcoma proporcionaba las condiciones histoquímicas necesarias para el crecimiento de fibras nerviosas sensoriales.

Al intentar esclarecer cuáles podrían ser las condiciones propicias para el crecimiento de fibras nerviosas, se descubrió un factor difusible y soluble; ya que no era necesario el contacto entre los tejidos neoplásicos y los embriones de pollo para inducir el crecimiento de los haces nerviosos, porque estos crecían si el tejido neoplásico era transplantado a la membrana corioalantoidea de los embriones, de tal forma que sólo existía comunicación por medio del sistema circulatorio⁴⁸.

Los primeros intentos para aislar y caracterizar este factor de crecimiento datan de 1954, cuando se obtuvieron extractos del sarcoma murino 180, que mantenían la capacidad de inducir el crecimiento de haces nerviosos simpáticos¹⁷, y fue hasta 1956, cuando se encontró una proteína termolábil, de masa aproximada de 20 kDa, que acarrecaba esta actividad biológica. Esta proteína se aisló del veneno de víbora mocasín, que resultó una fuente de grandes cantidades del NGF¹⁶.

b) Estructura del NGF.

Poco después de ser identificado en el veneno de la mocasín, el NGF también fue aislado y purificado de las glándulas submaxilares del ratón¹⁵. La existencia de una fuente de NGF accesible permitió, en 1971, su secuenciación⁵, que fue seguida en 1983 por la clonación del gene del NGF de ratón⁷⁹.

El gene de NGF codifica para una proteína de 307 aminoácidos, la cual es hidrolizada postraduccionalmente y origina una proteína de 118 aminoácidos, que se puede ver en la figura 4. Esta proteína, al formar un dímero con otra proteína idéntica, da lugar a la subunidad β del NGF⁷, la cual es responsable de toda la actividad biológica de este factor de crecimiento⁷⁶.

en las neuronas sensoriales ⁴⁸ y en otras células derivadas de la cresta neural. Entre éstas se encuentran las células cromafines de la médula adrenal ⁴² y sus derivados neoplásicos, como la línea celular PC12, obtenida de un feocromocitoma de rata ²⁹. Además, el NGF tiene efecto sobre la diferenciación, la sobrevivencia y posiblemente la proliferación de sus células blanco ⁵⁰.

El NGF, regularmente, es producido por los tejidos que van a ser inervados por las fibras simpáticas, las cuales extienden sus neuritas hacia el tejido productor de NGF, en respuesta al estímulo ⁴⁷. Por lo anterior, se ha propuesto también, un efecto trópico del NGF para los conos de crecimiento de las neuronas en los haces simpáticos ⁸. Esto también es apoyado por el crecimiento de fibras nerviosas hacia tejidos y lugares anormales, donde se inyecta NGF periódicamente ⁴⁵.

Si el tejido fuente del NGF es disectado, los haces simpáticos degeneran y desaparecen⁴⁹; esta degeneración se logra también inyectando animales neonatos con anticuerpos contra NGF²⁸. Tales evidencias, aunadas al hecho del salvamento de estas mismas fibras con la administración de NGF exógeno ³⁷, hacen pensar en el papel del NGF como un factor indispensable para la sobrevivencia de las neuronas simpáticas ⁴⁷.

El ejemplo más claro sobre la diferenciación celular, esto es, cambios inducidos en las características morfológicas o fisiológicas de un tipo celular ²⁷, promovida por NGF, lo constituyen los cambios morfológicos inducidos en las células cromafines ⁴². Estas células, al ser cultivadas en presencia del NGF, extienden procesos neuríticos de considerable longitud, con lo que adquieren una apariencia "neuronal". Esto contrasta con la morfología redonda que exhiben estas células *in vivo*. Este efecto también se observa en la línea celular PC12 ²⁹, que es la contraparte neoplásica de las células cromafines.

Además de los cambios morfológicos inducidos en estos tipos celulares, el NGF también induce la expresión de varios genes, que podrían ser considerados marcadores de diferenciación celular; como los canales de sodio, que son inducidos de *ново* por el NGF. Esta inducción acarrea un incremento muy marcado en la actividad eléctrica de estas células ²¹.

La sensibilidad de las células cromafines al NGF fue una evidencia más para comprobar su origen embrionario, ya que las células cromafines provienen de la cresta neural ⁴²; sin embargo, las condiciones fisiológicas que prevalecen en la médula adrenal, principalmente la alta concentración de corticoesteroides ⁸⁷, llevan a las células cromafines por un programa de

diferenciación distinto, que puede ser revertido por el NGF ⁸⁶.

Entre los efectos biológicos del NGF, las acciones sobre la reproducción celular son las más controvertidas, porque dependiendo del tipo de célula blanco y del estado de diferenciación de ellas, el NGF puede promover o inhibir la división celular ⁵⁰. Por ejemplo, en las células cromafines de rata neonata, el NGF promueve varios ciclos de reproducción celular ⁵¹; sin embargo, en la línea PC12, el mismo tratamiento inhibe la proliferación ⁸⁷; y si esto fuera poco, el NGF no tiene efectos sobre la división de los neuroblastos simpáticos ²⁰, aunque sí promueve la proliferación de células que no se derivan del neuroectodermo, como las células cebadas del bazo, las cuales forman grandes colonias después de un mes de tratamiento con este factor de crecimiento ¹.

Los efectos del NGF sobre las células cebadas esplénicas, que forman parte del sistema inmune, abrieron nuevas perspectivas en la función fisiológica de este factor de crecimiento, y revelaron al NGF como un modulador pleiotrópico ⁴⁷; porque estos efectos no sólo son a nivel de la reproducción celular, sino también a nivel funcional; porque el NGF induce la producción y secreción de histamina ¹². Esto indica que el NGF podría jugar un papel importante en las interacciones del sistema nervioso y el sistema inmune ⁴⁷.

Es necesario recalcar que aunque el NGF induce proliferación celular en tipos celulares no derivados del neuroectodermo, no existe ninguna acción de este factor de crecimiento sobre la diferenciación morfológica de estas células ¹, ya que conservan su morfología natural; esto hace pensar que los efectos del NGF sobre la morfología están restringidos a las células derivadas del neuroectodermo, como se puede ver en la tabla I.

CELULA BLANCO	ORIGEN EMBRIONARIO	EFECTOS BIOLÓGICOS INDUCIDOS POR NGF
Neuronas simpatoadrenales	Cresta neural	Crecimiento de neuritas. Sobrevivencia. Diferenciación.
Células cromafines	Cresta neural	Crecimiento de neuritas. Proliferación. Diferenciación.
Feocromocitoma PC12 (Tejido neoplásico)	Cresta neural	Crecimiento de neuritas. Inhibición de la proliferación. Diferenciación.
Neuronas colinérgicas y adrenérgicas del SNC	Tubo neural	Crecimiento de neuritas. Sobrevivencia. Diferenciación.
Células cebadas	Mesodermo extraembrionario	Proliferación. Producción y secreción de histamina.

TABLA I. CELULAS BLANCO Y EFECTOS BIOLÓGICOS DEL NGF.

En esta tabla se enumeran varios de los tipos celulares que son sensibles al NGF. También se puede observar su origen embrionario y los efectos biológicos inducidos por este factor de crecimiento. (SNC; sistema nervioso central)

d) Receptores del NGF.

Los efectos del NGF son mediados por la interacción con sus receptores presentes en las membranas plasmáticas de las células blanco³⁵, como sucede con otros factores de crecimiento hidrosolubles, dada la incapacidad de estas moléculas para cruzar el espacio hidrofóbico de la membrana plasmática¹⁸.

En las células blanco del NGF, como las PC12, se pueden distinguir dos sitios de unión diferentes para este factor: un sitio de alta afinidad por el NGF, con una constante de disociación de 10^{-11} M, y un sitio de baja afinidad, con una constante de disociación de 10^{-9} M⁵⁶. Como se puede ver en la figura 5, cada uno de estos sitios de unión corresponde a dos receptores proteicos distintos. Así, el receptor de alta afinidad es una proteína de 140 kDa, llamada prototr A (p140^{trkA}), mientras que el receptor de baja afinidad es una proteína de 75 kDa, que recibió el nombre de receptor del NGF (p75^{NGFR}) por ser el primero en ser caracterizado²⁶ y clonado³⁸.

El receptor $p75^{NGFR}$ es una proteína de 400 aminoácidos, con una región transmembranal que separa el dominio extracelular del intracelular ⁵⁶. En la mayoría de los receptores a factores de crecimiento, el dominio intracelular es el responsable de la actividad biológica del receptor; pero hasta la fecha, no se ha comprobado ninguna interacción del dominio intracelular del $p75^{NGFR}$ con cualquiera de los mecanismos de transducción de señales conocidos, y tampoco se ha demostrado una actividad catalítica intrínseca de este receptor ³⁵.

Se supone la existencia de algún tipo de transducción de señales por parte del $p75^{NGFR}$, ya que al unirse el NGF a esta proteína, el complejo NGF- $p75^{NGFR}$ es internalizado ⁸. Por otra parte, una serie de experimentos realizados con receptores quiméricos, sugieren la existencia de algún mecanismo de transducción; porque con estas proteínas quiméricas, construidas con el dominio extracelular del receptor al factor de crecimiento epidérmico (EGF), y los dominios transmembranal y citoplásmico del $p75^{NGFR}$, se demostró que el EGF, al unirse a estos receptores quiméricos, induce los mismos cambios morfológicos que el NGF en células PC12 ⁹².

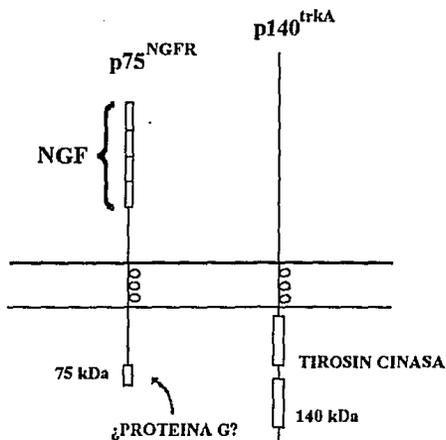


FIGURA 5. RECEPTORES MEMBRANALES A NGF.

Las diferencias básicas entre los dos receptores a NGF se esquematizan en esta figura; también se pueden observar los mecanismos de transducción de señales con los que interactúan. La molécula de NGF se representa por los rectángulos (Modificado de Meakin y Shooter, 1992)

El receptor p140^{trkA} fue identificado inicialmente como un oncogene en un carcinoma de colon ⁵³; pero este oncogene representa una versión truncada del gene normal, el cual sólo se expresa en neuronas sensoriales derivadas de la cresta neural ⁵⁴.

El p140^{trkA} pertenece a la familia de las cinasas de proteínas que fosforilan sus sustratos en residuos de tirosina ³⁹ (cinasas de tirosina), que es un mecanismo de acción compartido por varios receptores a factores de crecimiento ¹⁸. Esta proteína resultó ser el receptor de alta afinidad del NGF ³⁹, que había sido identificado en varios tipos celulares blanco, como las neuronas simpáticas del pollo ⁵⁶. De hecho, sólo la expresión del p140^{trkA} es necesaria e imprescindible para que un tipo celular sea sensible a NGF, porque la carencia del p75^{NGFR} no afecta la sensibilidad al NGF en diversos tipos celulares ⁵⁶.

Otras proteínas de la familia trk, como las cinasas de tirosina trk b y c, parecen ser los receptores a otros factores de crecimiento de la familia del NGF, llamados neurotrofinas. Así, la trk c es el receptor de la neurotrofina 3, mientras que la trk b es el receptor del factor de crecimiento neural derivado del cerebro. ⁵⁶. La semejanza entre los receptores de las distintas neurotrofinas hace que puedan existir reacciones cruzadas entre ellas, porque a un sólo receptor se puede unir cualquiera de las neurotrofinas, aunque con afinidades muy distintas ⁵⁶.

3. MECANISMOS CELULARES INVOLUCRADOS EN EL CRECIMIENTO DE LOS PROCESOS NEURITICOS.

Como se vió en la sección anterior, la principal función del NGF es inducir el crecimiento de neuritas; y estos procesos son los que forman a fin de cuentas las fibras nerviosas ⁷², por lo que el desarrollo de estas fibras dependerá solamente del crecimiento de los procesos neuríticos. Este crecimiento se debe al movimiento celular, del cual es responsable el cono de crecimiento neuronal ⁷².

El proceso de crecimiento de las neuritas se puede dividir en tres etapas: el transporte de precursores al cono de crecimiento, el avance y la movilización del cono, y por último, la consolidación del citoesqueleto del axón ⁵⁷. Como se ve en la figura 6 cada uno de estos procesos se encuentran localizados espacialmente en diferentes compartimentos celulares.

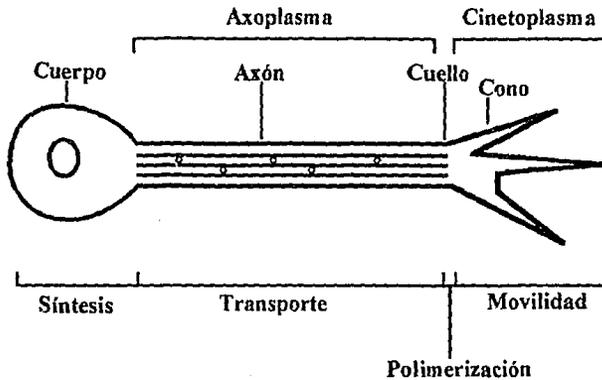


FIGURA 6. MECANISMOS CELULARES INVOLUCRADOS EN LA FORMACION DEL CONO DE CRECIMIENTO.

Como se puede ver en esta figura, los distintos procesos que acarrearán el crecimiento de las neuritas están localizados en distintos compartimentos celulares. (Modificado de Mitchison y Kirschner, 1988)

La existencia de una estructura especializada en el movimiento celular, como lo es el cono de crecimiento, implica la división del citoplasma en dos compartimentos: el túbulo axonal, o axoplasma, y el cono de crecimiento, o cinetoplasma.

El axoplasma está especializado en el transporte de precursores y vesículas de secreción⁵⁷, y su citoesqueleto está constituido principalmente por microtúbulos³⁶. Por su parte, el cinetoplasma se especializa en movilidad y locomoción, y en él predominan los microfilamentos de actina⁴⁶; sin embargo, la mayor diferencia entre el axoplasma y el cinetoplasma no es la composición proteica del citoesqueleto, sino su organización espacial y dinámica⁵⁷.

La movilidad del cono de crecimiento se debe a la extensión de un área de la membrana plasmática de apariencia delgada, aplanada y en forma de abanico, llamada lamelipodia. A partir de ésta se extienden pequeños procesos delgados, llamados filipodios, que se desarrollan por la polimerización de actina en su interior⁹¹.

El proceso de crecimiento del cono parece más bien aleatorio, ya que los filipodios se extienden y retraen constantemente¹⁰ en lo que parece ser un sondeo sobre la matriz extracelular para buscar sitios de unión¹⁰; al mismo tiempo, la tensión generada por la retracción de los

filipodios, podría ser la fuerza impulsora del crecimiento del axón⁹.

Conforme avanza el cono de crecimiento, el espacio citosólico que va dejando atrás se va convirtiendo en axoplasma, y existe una región de interfase entre el éste y el cinetoplasma, que se la ha llamado cuello del cono de crecimiento⁵⁷. En esta región de interfase se van formando microtúbulos por la polimerización de tubulina, como se ve en la figura 7. La tubulina es una proteína formada por una subunidad α y una β ⁴, y es el bloque básico de la formación de microtúbulos.

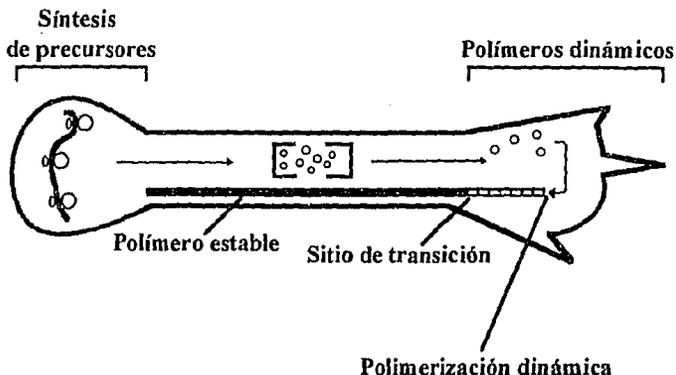


FIGURA 7. DINAMICA DEL CITOESQUELETO EN EL CRECIMIENTO DE NEURITAS. Los distintos componentes del citoesqueleto no se encuentran en el mismo estado dinámico de polimerización en los distintos compartimientos de una célula que desarrolla un proceso neurítico. (Modificado de Mitchison y Kirschner, 1988)

La polimerización de tubulina comienza el proceso de consolidación del axón, porque una vez formados los microtúbulos, las neuritas no se retraerán más, y se convertirán en una estructura celular muy estable¹³. Esta estabilidad se debe a que los microtúbulos axonales son más rígidos y menos dinámicos que los microtúbulos formados durante la mitosis celular³⁶. Probablemente, la rigidez de los microtúbulos axonales se deba a la acción de las proteínas accesorias a los microtúbulos⁵⁷, y entre éstas destaca la proteína *Tau* (τ), que es una proteína que solamente se expresa en los procesos citoplásmicos de las células originadas en el neuroectodermo, y que estabiliza varios microtúbulos y los hace formar haces más grandes y compactos²².

A lo largo de estos microtúbulos se van transportando los precursores básicos del citoesqueleto del cinetoplasma ⁸⁹, que tienen que llegar al cono de crecimiento; porque sólo ahí se agregarán las subunidades de actina, en el extremo distal de los microfilamentos del cono, que es la región más cercana a la membrana plasmática ⁸⁵. Debido a esto, la consolidación de las porciones anteriores de un axón es necesaria para continuar con el crecimiento del cono ⁵⁷.

Aunque el crecimiento de las neuritas es inducido por NGF, éste no es el único factor capaz de promover el desarrollo de estos procesos; también el monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) promueve el crecimiento de neuritas en las células PC12 ⁷⁷ y en una línea celular híbrida de un neuroblastoma y un glioma de rata ⁵⁹. Este efecto sobre el crecimiento de neuritas podría deberse a la acción del AMPc sobre la estabilidad del citoesqueleto neurítico, sobre todo, a nivel de los haces de microtúbulos, que se hacen más resistentes a la despolimerización por fármacos citotóxicos, como la colchicina ³³.

Además de los efectos que por sí sólo ejerce el AMPc, este factor también facilita la acción del NGF ³⁰, ya que el crecimiento de las neuritas es más rápido y se vuelve independiente de la transcripción y traducción de proteínas ³⁰ cuando las células son expuestas conjuntamente al NGF y al AMPc.

Esta acción sinérgica entre el AMPc y el NGF se tomó como un indicativo del probable mecanismo de transducción de señales del receptor p75^{NGFR} ⁷⁸; sin embargo, se ha demostrado que los efectos del NGF son independientes del AMPc ³¹, y como se dijo anteriormente, aún no se ha logrado asociar al p75^{NGFR} con ningún mecanismo de transducción de señales ⁵⁶. Por esto, se ha concluido que el AMPc y el NGF actúan sobre dos distintos mecanismos celulares para promover la extensión de neuritas ³³.

II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Como se ha visto, tanto el NGF como el AMPc tienen un papel importante en el desarrollo de los procesos neuríticos de diferentes tipos celulares. Esto hace importante conocer el papel desempeñado por estos dos factores en el crecimiento de las neuritas de las células β .

En este trabajo, evaluamos los efectos del NGF y del monofosfato cíclico de dibutiril adenosina (dbAMPc) sobre el desarrollo de los procesos parecidos a neuritas en las células β . El dbAMPc es un análogo del AMPc que es capaz de permear la membrana plasmática, y que conserva además la actividad biológica del AMPc⁵⁹. Estos efectos se cuantificaron en cultivos primarios *in vitro* de células β , obtenidas de islotes pancreáticos de ratas de dos distintas edades, adultos juveniles y fetos de 18 días de gestación.

Por otra parte, y para conocer más sobre los mecanismos celulares involucrados en el desarrollo de estas neuritas, también evaluamos el papel que desempeña el citoesqueleto de las células β en la formación de estos procesos. Principalmente, evaluamos la presencia de tubulina β y la proteína *Tau* a lo largo de las neuritas, ya que estas proteínas juegan un papel muy importante en la consolidación de los procesos neuríticos de otros tipos celulares.

Asimismo, estudiamos los efectos que pudiera tener el cambio morfológico en la distribución de dos marcadores de función celular: insulina y GABA, porque la expresión de estos marcadores nos daría una idea del estado fisiológico que conservan las células β después del tratamiento con NGF y dbAMPc. Además, si estos marcadores se encuentran en las neuritas extendidas por las células β , también podremos discernir si el citoesqueleto presente en los procesos es activo y funcional en el transporte de vesículas de secreción.

Por último, para discernir si el efecto del NGF no es resultado de una acción sobre los otros tipos celulares, distintos de las células β , presentes en los cultivos, se evaluó la expresión de receptores del NGF en las células β .

"...Even pure scientific discovery is an aggressive, penetrative act. It takes big equipment, and it literally changes the world afterward. Particle accelerators scar the land, and leave radioactive byproducts. Astronauts leave trash on the moon. There is always some proof that scientists were there, making their discoveries. Discovery is always a rape of the natural world. Always..."

- Michael Crichton. *Jurassic Park*.

III. MATERIAL Y METODOS

Los reactivos se obtuvieron de las fuentes siguientes:

Colagenasa tipo IV de Worthington (Freehold, NJ, USA); suero bovino fetal (SBF), solución salina balanceada de Hanks (HBSS) y soluciones de gentamicina y penicilina-estreptomycinina de Gibco (Grand Island, NY, USA); albúmina de suero bovino (BSA), medio RPMI 1640, D-[+]-glucosa, solución dispersante, sal de Spinner-Eagle, NGF 2.5S, anticuerpo monoclonal contra tubulina β , antiseros contra NGF 2.5S y proteína *Tau* de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA); antisuero contra insulina de Incstar Corp. (Stillwater, Mi, USA); antisuero contra GABA de Bidesign Intl. (Kennebunkport, ME, USA); reactivos para inmunocitoquímica de Vector Labs. (Burlingame, CA, USA); Anestesia (Pentobarbital sódico) de Smith Kline (Norden de México).

a) Cultivo de células β .

Los islotes pancreáticos fueron obtenidos de ratas Wistar machos de 250-280 g de peso, o de fetos de 18 días de gestación. Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (63 $\mu\text{g/g}$) para proceder a la disección. Los páncreas de las ratas adultas fueron perfundidos con 5 ml de solución salina balanceada de Hanks, suplementada con 0.1% de albúmina sérica bovina y 5 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina (HBSS-BSA), a través del conducto pancreático, previa oclusión de la cápsula de Vater. Los páncreas de los fetos fueron perfundidos con 500 μl de HBSS-BSA por la punción directa del páncreas fetal con una jeringa de insulina.

Los páncreas fueron macerados manualmente y sometidos a digestión con colagenasa clase IV (0.5 mg/ml en HBSS-BSA) durante 30' a 37° C. La digestión fue parada con tres lavados con

HBSS-BSA fría (4 °C), para después percolar el tejido a través de una malla de 200 µm, con el fin de separar el tejido homogéneo³².

Después de separar el tejido homogéneo, los islotes fueron purificados mediante centrifugación en un gradiente de Ficoll (27, 23 y 11% en HBSS-BSA), que separa los islotes del tejido acinar. El Ficoll fue removido con tres lavados más de HBSS-BSA fría. Para evitar que existiera tejido acinar contaminante, después de los lavados, los islotes fueron recogidos manualmente con la ayuda de una pipeta Lang-Levi y un microscopio estereoscópico⁴¹.

- Una vez aislados los islotes, las células que los conforman fueron disgregadas durante una digestión con tripsina (2.5 mg/ml) en solución salina balanceada de Spinner, suplementada con 0.5 % de albúmina sérica bovina, 200 U/ml de penicilina G y 200 µg/ml de estreptomina³².

Las células fueron cultivadas durante 11 días en medio RPMI 1640, suplementado con 1% de suero bovino fetal (SBF; para observar los cambios morfológicos), o 5% de SBF (para IF); 200 u/ml de penicilina G, 200 µg/ml de estreptomina, 0.5 µg/ml de anfotericina B y 1.2 mM de CaCl₂. Este tiempo de cultivo fue el más adecuado para observar los cambios morfológicos, porque las células β comienzan a extender procesos hacia el día tres de cultivo; estos procesos llegan a medir dos diámetros celulares hacia el día 7 de cultivo, y entre los días 11 y 20 alcanzan su longitud máxima; pero es necesario recalcar que después de 11 días de cultivo hay mucha mortalidad celular, por lo que no los resultados no son tan reproducibles como a los 11 días en cultivo.

Las células fueron tratadas con 50 ng/ml (aproximadamente 0.38 nM) de NGF 7S (morfolofga), o 40 ng/ml (aproximadamente 1.53 nM) de NGF 2.5S (morfolofga e IF) o bien 5 mM de monofosfato cíclico de dibutiriladenosina (dbAMPc), o la mezcla de los dos tratamientos. Estas concentraciones son las más utilizadas en otros modelos celulares para observar los efectos de estos dos factores sobre la morfolofga celular (Tischler *et al.*, 1982). Al menos las concentraciones de las dos fracciones del NGF se encuentran dentro del intervalo de la constante de afinidad de los receptores de NGF (10⁻¹¹-10⁻⁹ M), y la concentración de dbAMPc utilizada permitió realizar los experimentos, sin afectar la viabilidad celular; porque con concentraciones mayores se empieza a observar mortalidad, y a concentraciones menores los cambios no son tan evidentes. El grupo testigo no recibió tratamiento alguno.

b) Inmunocitoquímica e inmunofluorescencia.

Las células β fueron fijadas en solución de paraformaldehído (4 % en solución salina amortiguada por fosfatos, PBS, 0.1 M, pH 7.4) durante toda la noche; posteriormente, fueron rehidratadas y el paraformaldehído removido con tres lavados con PBS y tres lavados con solución salina amortiguada por tris (TBS, 0.1 M, pH 7.6). La membrana plasmática es permeabilizada al incubar las células con Tritón X-100 (0.3 % en TBS suplementado con 1% de suero normal de cabra, TBS-SNC) durante 30'. El tritón fue removido con tres lavados con TBS-SNC y posteriormente, las células fueron incubadas con el anticuerpo primario (que está dirigido contra el antígeno de interés), diluido en TBS-SNC, durante dos noches.

El anticuerpo primario fue removido con tres lavados de TBS-SNC, y las células fueron incubadas con anticuerpo secundario (dirigido contra el anticuerpo primario) biotinilado, durante 1 hora, tanto para inmunocitoquímica (IC) e inmunofluorescencia (IF); el anticuerpo secundario fue diluido 1:200 en TBS-SNC.

En IC, las células positivas fueron reveladas por estreptoavidina peroxidasa, utilizando como sustrato diaminobencidina y H_2O_2 ; para IF, las células fueron reveladas por estreptoavidina marcada con rojo Texas, y observadas a 450-490 nm.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron los siguientes: antisuero de cobayo contra insulina; anticuerpo monoclonal murino contra la proteína Tau; antisuero de conejo contra NGF; anticuerpo monoclonal murino contra tubulina β ; antisuero de conejo contra GABA. Las diluciones utilizadas fueron las recomendadas por las compañías que desarrollaron los anticuerpos; pero, como se sabe, los anticuerpos y antisueros varían con cada lote, por lo que las diluciones recomendadas pueden variar con el tiempo.

Como es sabido, la inmunofluorescencia indirecta es una técnica inmunohistoquímica, ya que utiliza anticuerpos y cromóforos, en este caso, un fluorógeno⁹³; pero a lo largo de este trabajo se hace la distinción de nombres (IC e IF) para indicar los diferentes cromóforos, DAB y rojo Texas, y también para hacer una diferencia entre el tipo de luz con la cual se observaron las células y se tomaron las fotografías, luz visible policromática, contra monocromática de 450-490 nm.

c) Evaluación de cambios morfológicos.

En las células β identificadas por IC fueron medidas la longitud de los procesos y el diámetro perinuclear más corto, los procesos que midieran el equivalente a dos diámetros celulares o más fueron considerados como neuritas para evaluar los cambios en el porcentaje de neurogenización, siendo el 100% el total de células β presentes en cada cultivo.

Bajo cada condición de cultivo se contabilizaron 10 campos ópticos al azar, lo que representa, en promedio, 112 células β por cada cultivo de células de adulto y 81 células β por cada cultivo de células fetales. Los datos se representan como el número de cultivos de fechas distintas que se contabilizaron (n).

Los datos exactos del número de cultivos sometidos a los distintos tratamientos, el número de células β contabilizadas en cada cultivo distinto y el promedio de células β por cultivo, tanto para los cultivos de células de adulto y fetales, se encuentran en la tabla II.

TRATAMIENTO	CULTIVOS (n)	CELULAS β	CELULAS β POR CULTIVO
CELULAS ADULTO			
TESTIGO	8	976	122
dbAMPc	8	1020	127
NGF 7S	5	502	100
NGF 2.5S	3	269	90
NGF 7S + dbAMPc	5	667	133
NGF 2.5s + dbAMPc	3	307	102
CELULAS FETALES			
TESTIGO	4	578	144
dbAMPc	4	262	65
NGF 7S	4	225	56
NGF 7S + dbAMPc	4	249	62

TABLA II. NUMERO DE CELULAS β CONTABILIZADAS.

En esta tabla se muestran el número de cultivos distintos (n) contabilizados en cada condición de cultivo, para las células de las dos edades distintas. También se muestran el número total de células β contadas en cada grupo, y el promedio de células contadas en cada cultivo. En general, las células β representaban del 80 al 90 % del total de células en cultivo.

d) Conteo de neuritas positivas por inmunofluorescencia.

Las células procesadas para IF también fueron procesadas para IC contra insulina para identificar y asegurar el conteo de células β únicamente, en 10 campos ópticos aleatorios. Las células β que extendieron neuritas, y que fluorescían a 450-490 nm fueron contadas como positivas, los resultados se expresan como el promedio de los porcentajes de células neurogenizadas positivas, tomando como 100% el total de células β que extendieron neuritas. En promedio, en los cultivos procesados para IF se contabilizaron 98 células β .

En las células β procesadas para IF contra NGF 2.5s, se contabilizaron tanto las células β que extendieron los procesos (siendo el 100% el total de células neurogenizadas), como las células β que no los extendieron (siendo el 100% el total de células sin procesos), que fueron positivas a 450-490 nm. Estos datos se obtuvieron de 6 cultivos de diferentes fechas y, en promedio, se contabilizaron 115 células β por cultivo.

e) Análisis estadístico.

Todos los datos son expresados como la media \pm error estándar de la media (ESM). Para la validación estadística de los experimento se utilizó el programa Number Cruncher Statistical System (NCSS v 4.2, Dr. Jerry L. Hintze, Kaysville, UT, USA, 1983), llevando a cabo las pruebas de análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía, seguida por la prueba de Fischer. También se evaluó la significancia estadística con la prueba T de Student para datos no apareados.

*"... Metamorfosis mata a Morfeo,
que el cambio sueña que está soñando.
El movimiento me hará cambiar
toda mi piel, toda la fe.
No dejaré que las águilas
se coman mis alas de marfil,
que este espacio deje de flotar,
y que este cielo se caiga ya..."*

- Saúl (Caifanes). *El silencio.*

IV. RESULTADOS

1. CAMBIOS MORFOLOGICOS INDUCIDOS POR NGF Y dbAMPc EN CELULAS β DE ADULTO.

Los resultados de los cambios morfológicos se pueden ver en la tabla III (p. 38), donde se pueden encontrar los valores medios para cada caso y su ESM correspondiente.

a) Células β testigo.

En el cultivo testigo, en el cual no es aplicado ningún tratamiento, las células β de rata adulto mantienen una forma redonda, de diámetro perinuclear pequeño, llegando a formar acúmulos de pocas células, como se ve en la figura 8; un bajo porcentaje (3.69 %) de estas células testigo extiende neuritas, con una longitud promedio de 46.27 μm , después de 11 días en cultivo.

b) Células β tratadas con dbAMPc.

En las células cultivadas con 5 mM de dbAMPc durante 11 días, el porcentaje de células que extiende los procesos neuríticos aumentó significativamente, con respecto al grupo testigo, a 18.80% ($p < 0.01$). Además, la morfología cambia hacia un tipo celular que principalmente presenta un diámetro perinuclear más grande, forma estrellada y extendida, y por otra parte las células β tienden a formar acúmulos con un mayor número de células, como se puede ver en la figura 9. Pese al incremento en el número de células modificadas, la longitud promedio las neuritas, que fue de 61.21 μm , no aumentó significativamente en las células tratadas con dbAMPc con respecto al grupo de células testigo.

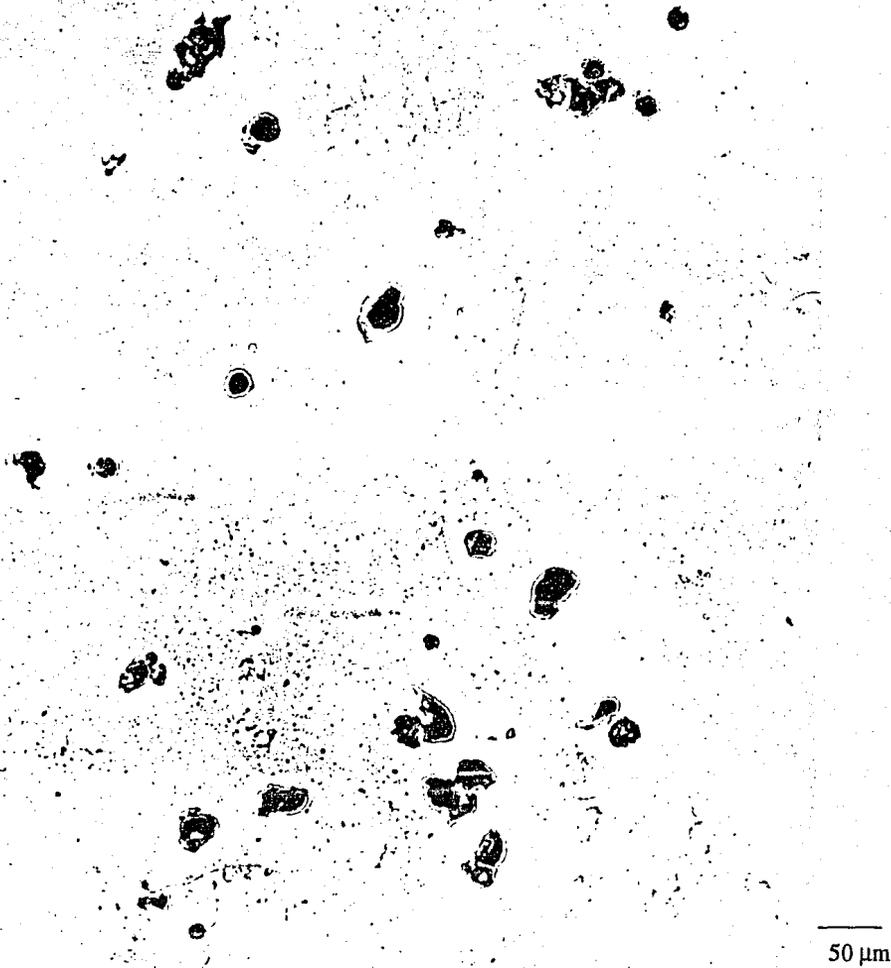


FIGURA 8. CELULAS β TESTIGO.

En esta figura se muestran dos campos ópticos característicos de dos distintos cultivos testigo células β de adulto. Como se explica anteriormente las células β testigo presentan un diámetro perinuclear pequeño y forman acúmulos de pocas células después de 11 días en cultivo. (Fotografía tomada a 200X)

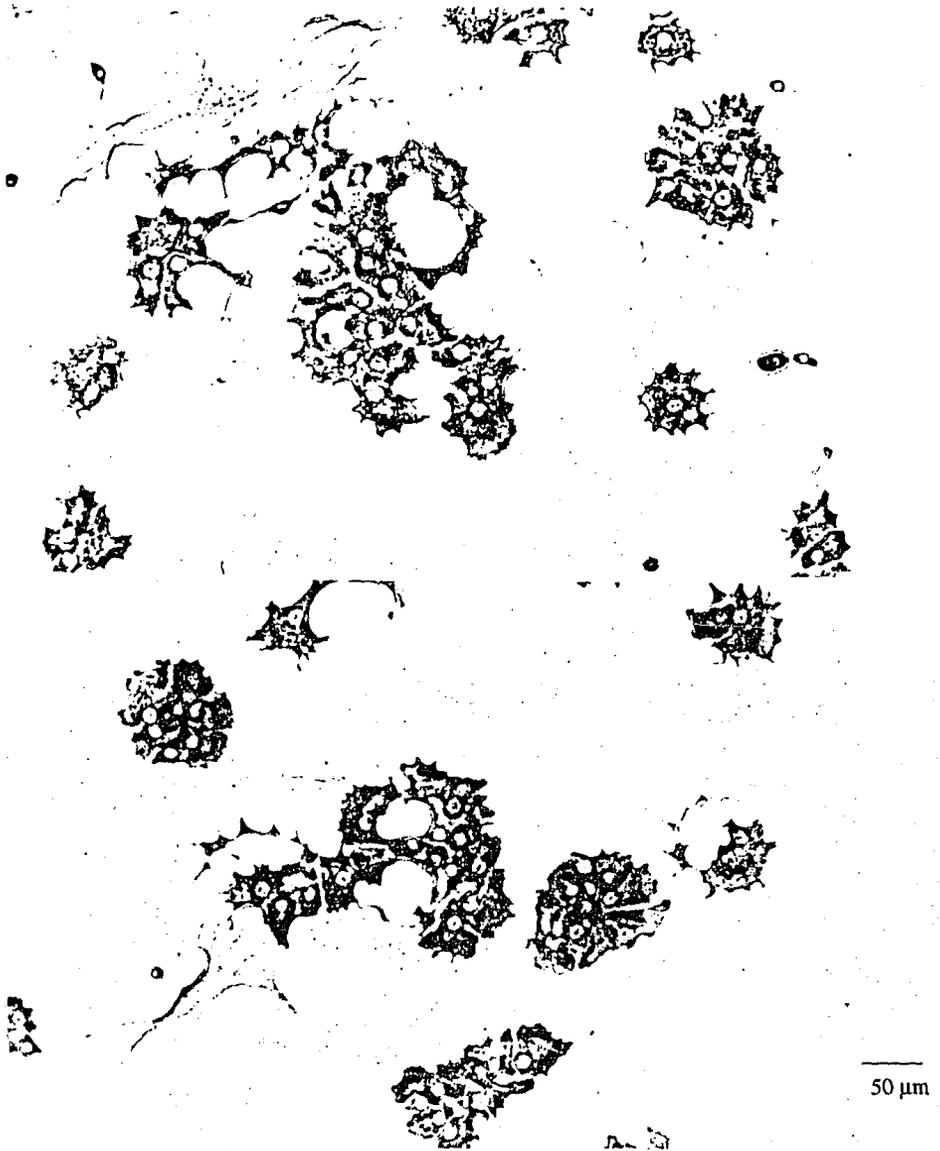


FIGURA 9. CELULAS β CULTIVADAS EN PRESENCIA DE dbAMPc.
En esta figura se muestran dos campos ópticos característicos de dos distintos cultivos de células β de adulto tratadas con dbAMPc 5mM. Como se explica anteriormente las células β expuestas al dbAMPc presentan un diámetro perinuclear más grande, extienden neuritas que no difieren en longitud de las neuritas de las células del grupo testigo, y forman grandes acúmulos celulares después de 11 días en cultivo. (Fotografía tomada a 200X)

c) Células β tratadas con NGF.

Cuando las células β fueron cultivadas en presencia de NGF 7S (50 ng/ml) no se observaron cambios significativos en el porcentaje de células con neuritas, que fue de 5.23%; y tampoco en la longitud de los procesos, 50.79 μm en promedio. De hecho, las células tratadas con NGF 7S conservan la misma morfología que las del grupo control.

Resultados preliminares (que no se muestran), indicaron que al aumentar la concentración de NGF 7S (100 ng/ml) se podía observar un efecto del factor de crecimiento sobre la morfología de la células β de adulto; por lo que se decidió evaluar los efectos del NGF 2.5S (40 ng/ml), una fracción más activa biológicamente, y que, como se sabe, representa en más del 90% a la subunidad β del NGF, que es la que acarrea la actividad biológica de este factor de crecimiento⁷.

Cuando las células de adulto fueron cultivadas en presencia NGF 2.5S, sí se observó un aumento significativo ($p < 0.01$) con respecto al grupo testigo en el porcentaje de células con neuritas, ya que el 26.15% de las células β tratadas con NGF 2.5S extendieron procesos neuríticos; sin embargo, el aumento en el número de células que desarrollaron procesos tampoco se vió acompañado de un aumento en la longitud de las neuritas, ya que el aumento en el promedio de la longitud a 57.88 μm no fue estadísticamente significativo.

Aunque el NGF 2.5S también indujo que algunas células aumentaran de diámetro perinuclear, este cambio no fue tan notorio como en las células tratadas con dbAMPc, ya que en los cultivos con NGF 2.5S predominan las células con diámetro perinuclear más pequeño y con neuritas más alargadas, como se puede ver en la figura 10.

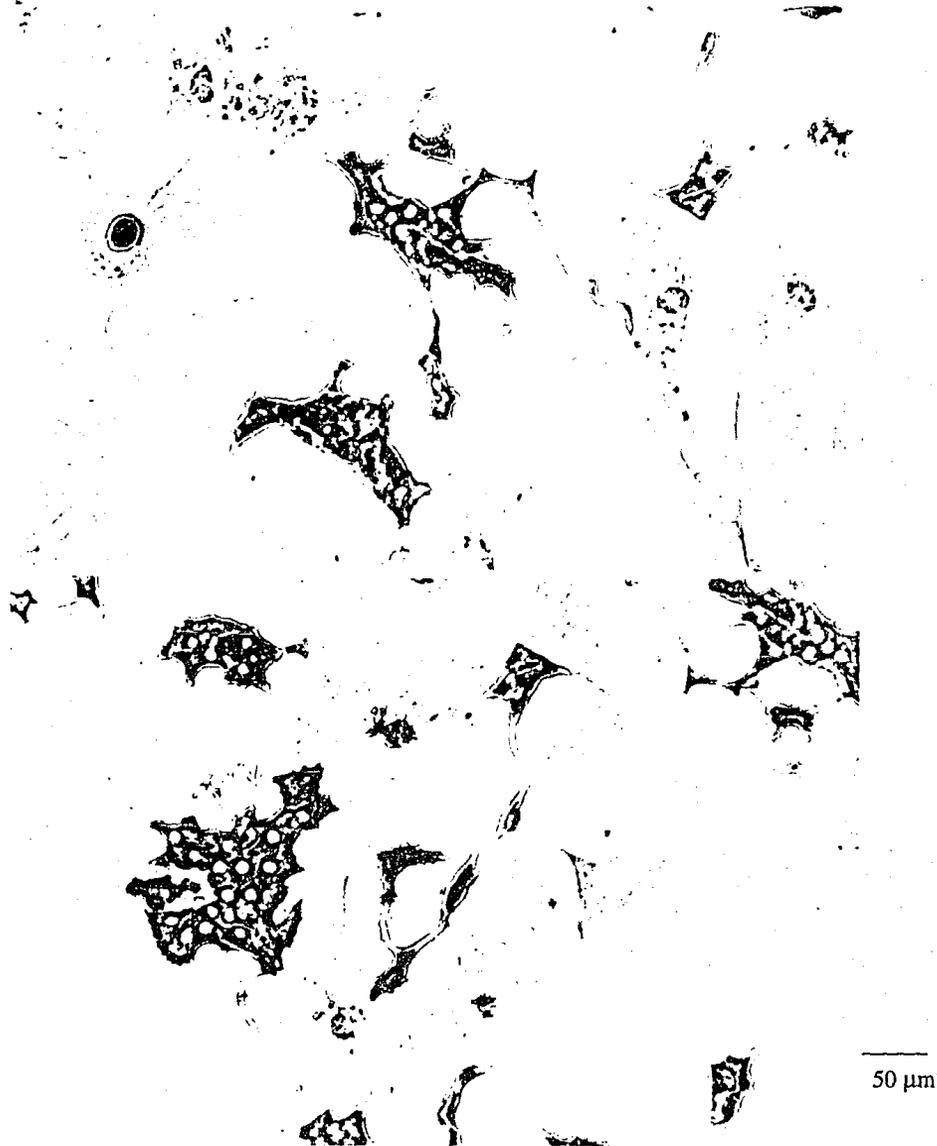


FIGURA 10. CELULAS β CULTIVADAS EN PRESENCIA DE NGF 2.5S.

En esta figura se muestran dos campos ópticos característicos de los cultivos de células β de adulto tratadas con 40 ng/ml de NGF 2.5S. Como se explica anteriormente las células β expuestas al NGF 2.5S presentan un diámetro perinuclear de tamaño intermedio, extienden neuritas más angostas y alargadas, pero que no difieren significativamente en longitud de las neuritas de las células del grupo testigo. Tienen a formar acúmulos después de 11 días en cultivo. (Fotografía tomada a 200X)

d) Células β tratadas con NGF y dbAMPc.

El efecto más marcado sobre la diferenciación morfológica de las células β se observó cuando las células β fueron cultivadas durante 11 días en presencia de los dos factores (NGF + dbAMPc); además, no se observaron diferencias significativas si la fracción de NGF utilizada en conjunto con el dbAMPc era la 7S o la 2.5S.

Cuando las células β fueron cultivadas en presencia de 50 ng/ml de NGF 7S y 5mM de dbAMPc (NGF 7S + dbAMPc), se observó un aumento significativo ($p < 0.01$) con respecto al grupo testigo en el porcentaje de células con neuritas, ya que el 50.21% de las células β presentes en los cultivos extendieron los procesos. Bajo estas condiciones de cultivo sí se observó un aumento significativo ($p < 0.05$) en la longitud promedio de las neuritas de las células β , ya que aumentó hasta 69.23 μ m.

En el grupo de células cultivadas en presencia de 40 ng/ml de NGF 2.5S y 5mM de dbAMPc, también existió un aumento significativo ($p < 0.01$) con respecto al grupo testigo en el porcentaje de células β que presentaban neuritas, que aumento a 42.96%. Como se dijo anteriormente, no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de células que extendieron neuritas del grupo tratado con NGF 7S y dbAMPc y el grupo tratado con NGF 2.5S y dbAMPc.

Además del aumento en el porcentaje de células con procesos, el tratamiento con NGF 2.5S y dbAMPc indujo el mayor aumento en la longitud de las neuritas, que midieron 100.74 μ m en promedio. Este aumento fue estadísticamente significativo ($p < 0.01$) al compararlo con el grupo testigo; y también ($p < 0.01$) al compararlo contra los demás grupos experimentales.

El crecimiento de los procesos neuríticos no fue el único efecto del tratamiento con NGF (7S y 2.5S) y dbAMPc sobre la morfología de las células β , ya que la mayoría de ellas se encontraron formando grandes acúmulos de células muy estrelladas y de diámetro perinuclear muy grande, además de la presencia de neuritas muy largas en las células de la periferia de los acúmulos, como se ve en las figuras 11, 12 y 13. Es necesario hacer notar que las células que se observan en la figura 13 fueron cultivadas más tiempo (11 días) del reportado en este trabajo, pero se muestran como un ejemplo de la plasticidad de las células β .

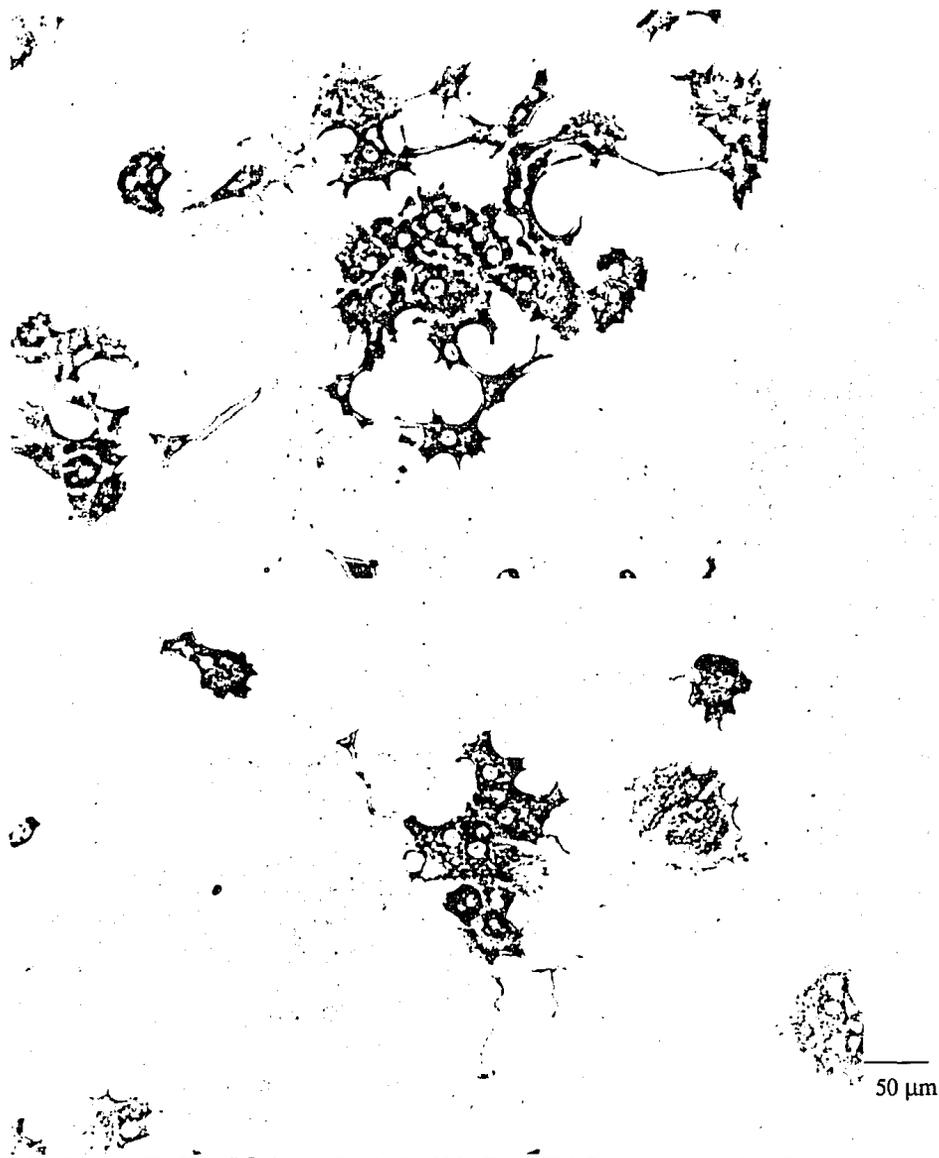


FIGURA 11. CELULAS β CULTIVADAS EN PRESENCIA DE NGF 7S y dbAMPc.

En esta figura se muestran dos campos ópticos característicos de dos distintos cultivos de células β de adulto tratadas con 50 ng/ml de NGF 7S y dbAMPc 5mM. Como se explica anteriormente en los cultivos expuestos al NGF 7S en conjunto con dbAMPc se observa el mayor incremento en el porcentaje de células β con neuritas, pero además las células en este grupo extienden neuritas considerablemente más largas que las neuritas del grupo testigo. (Fotografía tomada a 200X)

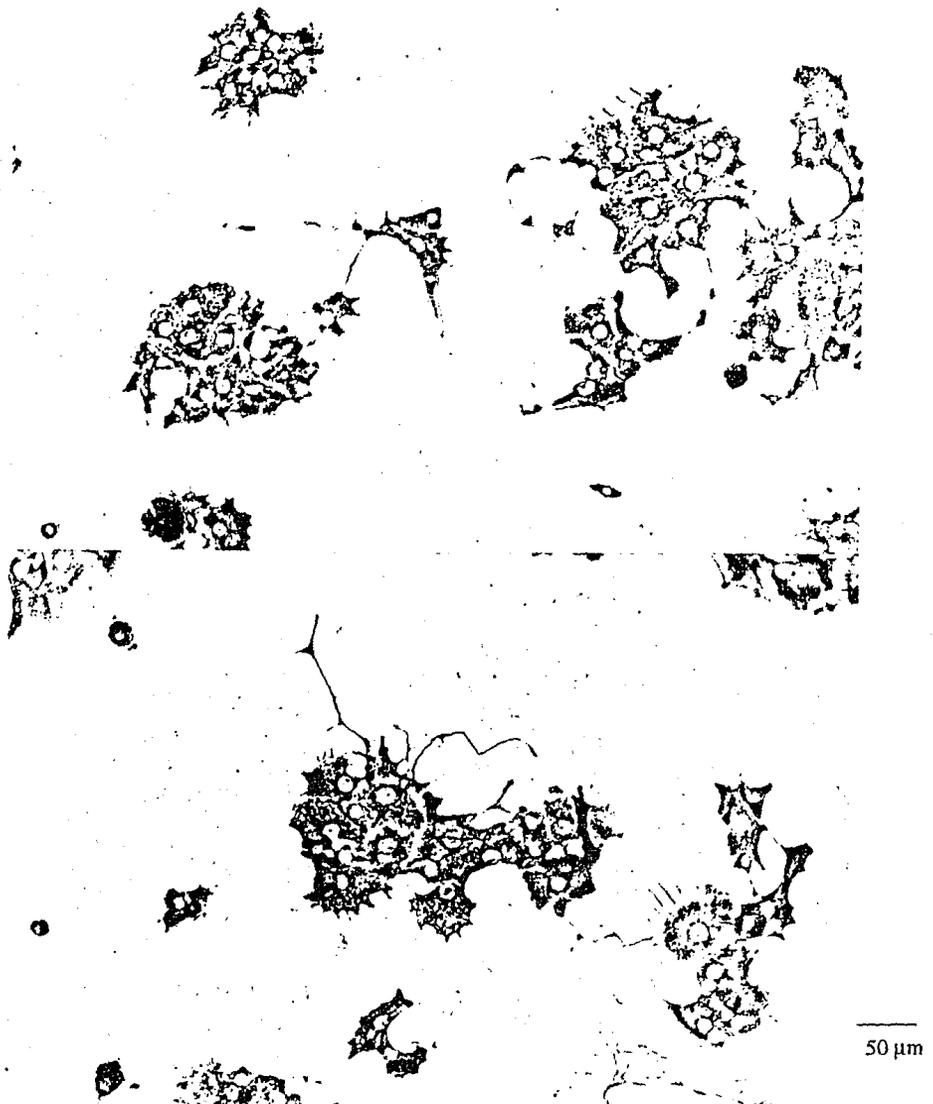
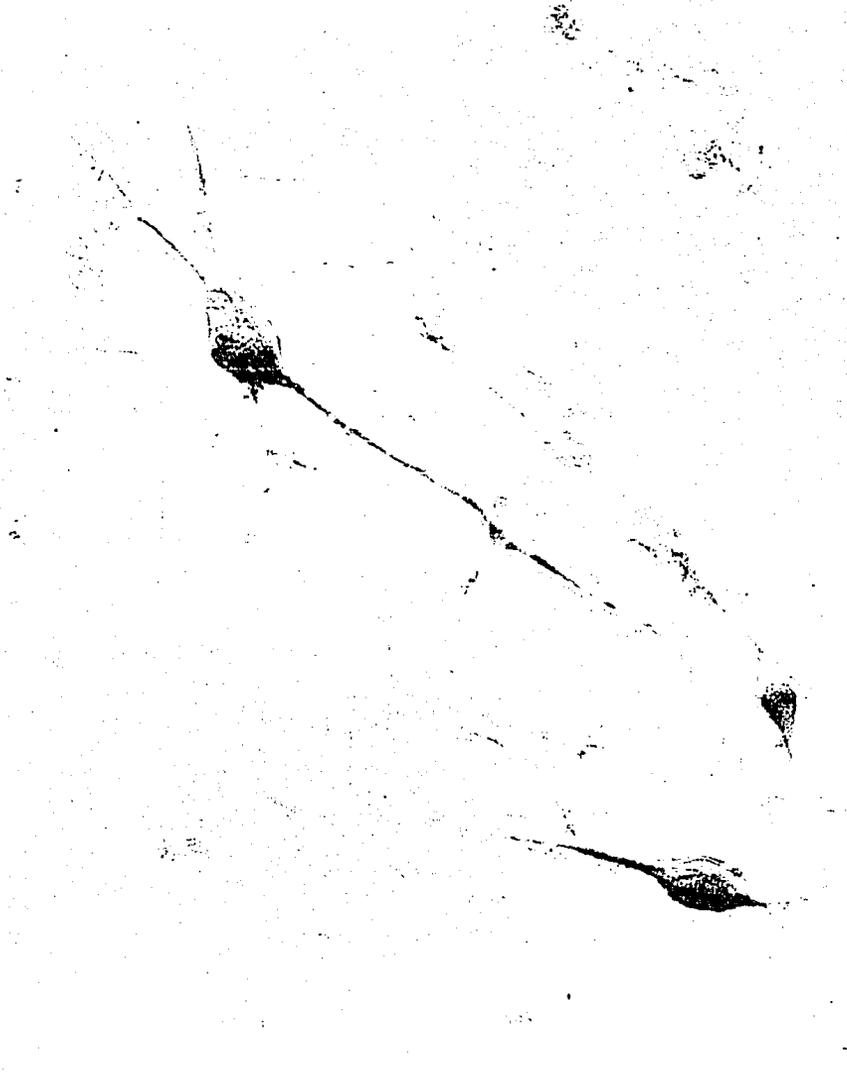


FIGURA 12. CELULAS β CULTIVADAS EN PRESENCIA DE NGF 2.5S y dbAMPc.

En esta figura se muestran dos campos ópticos característicos de dos distintos cultivos de células β de adulto tratadas con 40 ng/ml de NGF 2.5S y dbAMPc 5mM. Como se explica anteriormente en los cultivos expuestos al NGF 2.5S en conjunto con dbAMPc se observa el mayor incremento en el porcentaje de células β con neuritas, pero además las células en este grupo extienden neuritas considerablemente más largas que las extendidas por las células testigo y los demás grupos experimentales. (Fotografía tomada a 200X)



25 μ m

FIGURA 13. CELULAS β CULTIVADAS DURANTE 20 DIAS EN PRESENCIA DE NGF 7S Y dbAMPc.

En esta figura se muestra un campo \acute{o} ptico fotografiado (400X) en un cultivo de islotes pancre \acute{a} ticos β de adulto, tratados durante 20 d \acute{a} as con 50 ng/ml de NGF 7S y dbAMPc 5mM. Es necesario hacer notar que las c \acute{e} lulas fotografiadas migraron fuera del islote, y que fueron cultivadas nueve d \acute{a} as m \acute{a} s que el resto de los cultivos mencionados anteriormente.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE
POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

EFFECTOS DEL FACTOR DE CRECIMIENTO NEURAL Y DEL
AMP CICLICO SOBRE LA DIFERENCIACION MORFOLOGICA
DE CELULAS BETA PANCREATICAS.

R E S U M E N

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE LICENCIADO
EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA
P R E S E N T A

ROMAN VIDAL TAMAYO RAMIREZ

DIRECTOR DE TESIS: DRA. MARCIA HIRIART URDANIVIA

MEXICO, D.F.

1994

RESUMEN

Las células β del páncreas tienen la capacidad de extender procesos citoplásmicos al ser cultivadas *in vitro*. Estos procesos expresan componentes propios del citoesqueleto neuronal, por y por analogía se les llama procesos neuríticos o neuritas. En este trabajo se evaluaron los efectos del factor de crecimiento neural (NGF) y del monofosfato cíclico de dibutilil adenosina (dbAMPc) sobre el crecimiento de los procesos de las células β ; ya que estos factores promueven el desarrollo de las neuritas en varios tipos celulares. Estos efectos se estudiaron en cultivos *in vitro* de células β provenientes de ratas de dos edades distintas, adultos juveniles y fetos de 18 días de gestación.

Los datos obtenidos indican que tanto el NGF como el dbAMPc promueven un aumento en el porcentaje de las células β que extienden neuritas, y éstas son de mayor longitud cuando las células son cultivadas en presencia de los dos factores simultáneamente. También se encontró que el crecimiento de los procesos no depende de la edad celular, porque tanto las células β de adulto como las fetales fueron capaces de extender los procesos en respuesta a los dos factores.

Otra característica de los procesos neuríticos es la presencia de microtúbulos en su interior, los cuales son necesarios para la función de las neuritas; por esto, también se estudio la expresión de tubulina β en los procesos neuríticos de las células β , ya que esta proteína es uno de los unidades básicas de formación de microtúbulos. Se encontró que los procesos de las células β expresan tubulina y proteína Tau, que es otro componente del citoesqueleto neuronal y que solamente expresan los tipos celulares derivados del neuroectodermo, esto indica también la homología entre las neuritas y los procesos de las células β .

Los cambios morfológicos no influyen en la función de las células β , ya que éstas siguen sintetizando insulina y ácido γ -amino butírico (GABA), los cuales las células β sintetizan *in vivo*; sin embargo, estas dos moléculas se redistribuyen a lo largo de las neuritas de las células β , lo que indica que los microtúbulos presentes en estos procesos son activos y funcionales, en cuanto al transporte de vesículas de secreción.

El desarrollo de neuritas y la síntesis de GABA, que es un neurotransmisor, por parte de las células β han cuestionado su origen embrionario, ya que estas células se encuentran dispersas entre el tejido acinar pancreático, que tiene un claro origen endodérmico; aunque se ha propuesto

que existe un origen común para las células β y el tejido acinar, éste no se ha podido comprobar; y el hecho de que las células β compartan varias características, como el GABA y el crecimiento de neuritas, con los tipos celulares derivados del neuroectodermo ha llevado a proponer un origen ectodérmico para las células β , que ha sido debatido durante largo tiempo.

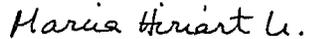
En este trabajo demostramos que las células β son sensibles a la acción del NGF sobre su morfología. Esta sensibilidad también es compartida por las células derivadas del neuroectodermo; aunque el NGF puede ejercer sus efectos sobre células que no se originan del ectodermo, estos efectos nunca son a nivel de la morfología; por esto, los efectos del NGF sobre la morfología de las células β al NGF se pueden considerar como una característica más que comparten las células β y las células neuroectodérmicas. A pesar de que esto no es un marcador definitivo de origen embrionario, los datos obtenidos en este trabajo podrían ser una evidencia más a favor del origen neuroectodérmico.



Román Vidal Tamayo Ramírez

TESISTA

Vo. Bo.



Dra. Marcia Hiriart Urdanivia

Directora de tesis.

2. CAMBIOS MORFOLOGICOS INDUCIDOS POR NGF Y dbAMPc EN CELULAS FETALES.

En los cultivos testigo de células β de fetos de rata de 18 días de gestación se observó que el 2.48% de las células extendían procesos neuríticos, con una longitud promedio de 36.67 μm . En estas condiciones de cultivo, las células β fetales, al igual que las de adulto, mantienen una forma redonda y en ocasiones se encuentran formando pequeños acúmulos.

Cuando las células β fetales fueron cultivadas en presencia de dbAMPc se observó un aumento significativo ($p < 0.05$) en el porcentaje de células que presentaban neuritas, que alcanzó el 30.51%; y al igual que en las células de adulto, el dbAMPc no indujo ningún cambio en la longitud de los procesos, que solamente midieron 28.07 μm en promedio.

Al contrario de lo observado en los cultivos de células β de adulto, el tratamiento con NGF 7S si indujo el crecimiento de neuritas en células β fetales, ya que se observó un aumento significativo ($p < 0.01$) en el porcentaje de células que extendieron procesos, que representaron 29.03 % del total de células β fetales presentes en los cultivos. Sin embargo, este aumento no se vió acompañado por un aumento en la longitud promedio de las neuritas, pese a que aumentó a 50.79 μm , lo cual no fue estadísticamente significativo.

Al igual que en las células de adulto, los cambios morfológicos más drásticos se observaron cuando las células fetales fueron cultivadas en presencia de NGF y dbAMPc, ya que el porcentaje de células neurogenizadas aumento hasta 51.49%, pero al contrario de las células de adulto, la longitud de los procesos no registró un aumento estadísticamente significativo, pues solamente alcanzó 42.05 μm en promedio.

En la tabla III se pueden comparar los efectos del NGF y el dbAMPc sobre la diferenciación morfológica de las células β de adulto y fetales. Como el objetivo principal de este trabajo, que es evaluar los efectos del NGF y del dbAMPc sobre la morfología de las células β , se cumple para las células con los datos obtenidos con el NGF 7S, no se muestran los resultados obtenidos con la fracción 2.5S, pues todavía son preliminares.

TRATAMIENTO	% DE CELULAS CON PROCESOS	LONGITUD DE LOS PROCESOS (μ)
CELULAS ADULTO		
TESTIGO	3.69 \pm 0.41	46.27 \pm 1.36
dbAMPc	18.80 \pm 3.36**	61.21 \pm 0.47
NGF 7S	5.23 \pm 0.87	50.79 \pm 1.36
NGF 2.5S	26.15 \pm 2.23**	57.88 \pm 0.66
NGF 7S + dbAMPc	50.21 \pm 8.79**	69.23 \pm 0.31*
NGF 2.5S + dbAMPc	42.96 \pm 3.49**	100.74 \pm 1.21**
CELULAS FETALES		
TESTIGO	2.48 \pm 1.55	36.67 \pm 8.46
dbAMPc	30.51 \pm 7.70*	28.07 \pm 0.41
NGF 7S	29.03 \pm 3.07**	50.79 \pm 0.67
NGF 7S + dbAMPc	51.49 \pm 11.51**	42.05 \pm 0.26

TABLA III. EFECTOS DEL NGF Y DEL dbAMPc SOBRE LA MORFOLOGIA DE LAS CELULAS β .

Los efectos del NGF y el dbAMPc sobre el porcentaje de células β neurogenizadas y la longitud de las neuritas se resumen en esta tabla. Todos los datos se muestran como la media \pm ESM. Los asteriscos denotan la significancia estadística según la prueba ANOVA: * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

El número de cultivos distintos (n) para cada grupo fue el siguiente:

Grupo testigo adultas, n=8; dbAMPc, n=8; NGF 7S, n=5; NGF 2.5S, n=3; NGF 7S + dbAMPc, n=5; NGF 2.5S + dbAMPc, n=3; Grupo testigo fetales, n=4; dbAMPc, n=4; NGF 7S, n=4; NGF 7S + dbAMPc, n=4. En promedio se contabilizaron 112 células β por cada cultivo de adulto y 82 células β por cada cultivo de fetales (ver Material y Métodos).

3. SITIOS DE UNIÓN A NGF 2.5S EN CELULAS β DE ADULTO.

Los efectos del NGF sobre la diferenciación morfológica de las células β podrían deberse a la acción del factor de crecimiento sobre algún tipo celular distinto de las células β , que indirectamente modificara la morfología de las células β , ya que en los cultivos siempre se encontraron diversos tipos celulares, células α , fibroblastos, porque se cultivan células disociadas de los islotes pancreáticos (ver Material y Métodos), y cada uno de ellos está conformado por distintos tipos celulares.

Para discernir entre el efecto indirecto y la acción directa del NGF sobre las células β se utilizó la inmunofluorescencia (IF) contra NGF 2.5S para encontrar posibles sitios de unión a NGF en las células β .

Se observó que el 94.11% de las células β de adulto que extendieron neuritas al ser cultivadas con NGF 2.5S y dbAMPc fueron también positivas a IF contra NGF 2.5S; en las células β de adulto cultivadas con NGF 2.5S, el 92.83% que desarrollaron los procesos también eran positivas a IF contra NGF 2.5S, como se ve en la figura 14.

Por otra parte, como se ve en la tabla IV, sólo el 6.05% de las células β que carecían de procesos neuríticos en los cultivos tratados con NGF 2.5S también mostraban sitios de unión a NGF positivos por IF contra NGF 2.5S. En los cultivos de células β de adulto tratadas con NGF 2.5S y dbAMPc solamente el 5.95% de las células que no extendieron los procesos eran positivas a IF contra NGF 2.5S.

Al parecer este sitio de unión a NGF no es el receptor a NGF de baja afinidad, p75^{ngfr}, ya que se realizó la IF contra esta proteína, utilizando un anticuerpo monoclonal murino, la cual fue negativa en 10 cultivos diferentes (120 células β por cultivo, en promedio), y bajo todas las condiciones de cultivo.

TRATAMIENTO	% CELULAS CON PROCESOS POSITIVAS	% CELULAS SIN PROCESOS POSITIVAS
NGF	92.83 ± 1.48	6.05 ± 0.68
NGF + dbAMPc	94.11 ± 0.89	5.95 ± 0.64

TABLA IV. SITIOS DE UNION A NGF EN CELULAS β .

Las células β adultas presentan al menos un sitio de unión a NGF 2.5s, positivo por inmunofluorescencia. (n=6 cultivos distintos, con 115 células β por cultivo).

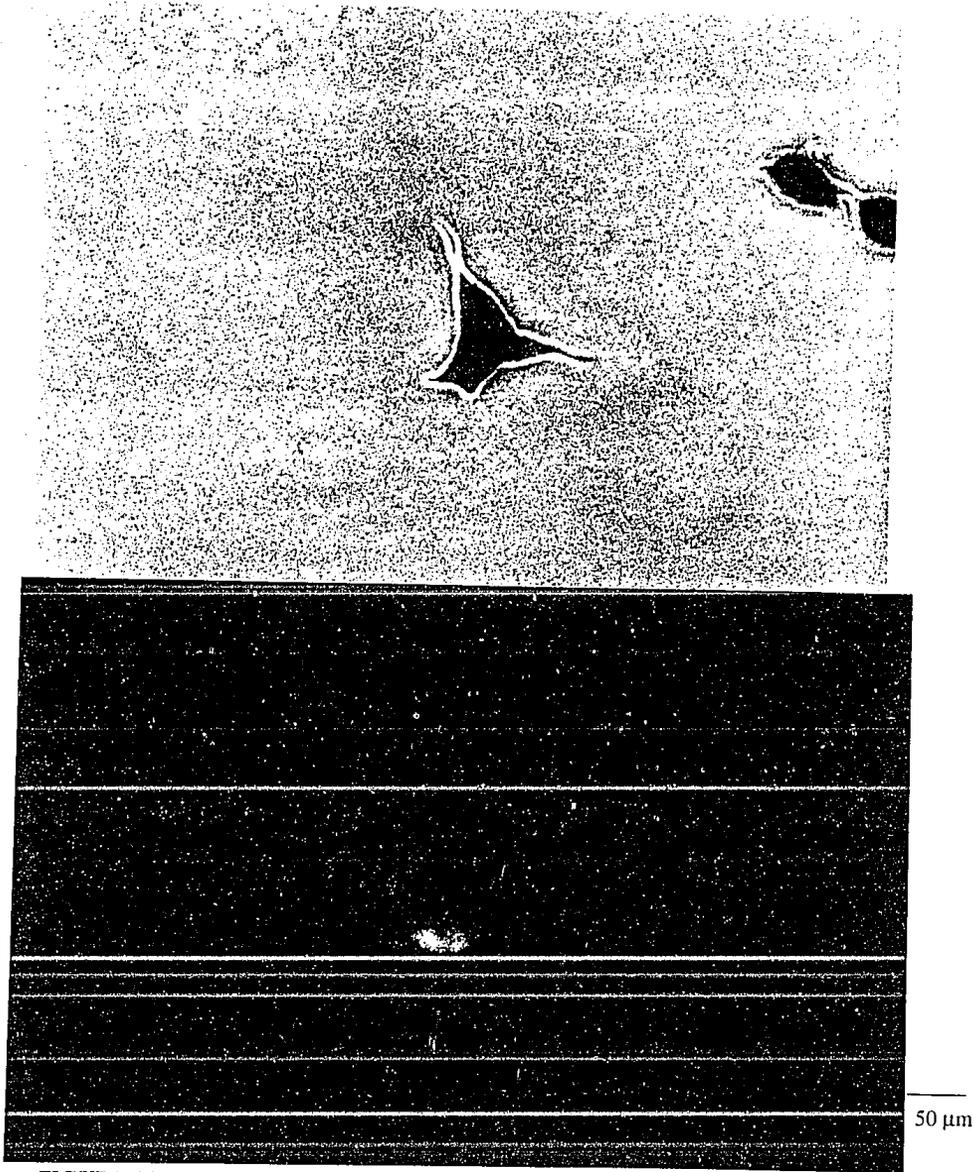


FIGURA 14. SITIOS DE UNION A NGF EN LAS CELULAS β .

La inmunofluorescencia contra NGF 2.5S revela sitios de unión a este expresados por las células β de adulto. El panel superior muestra un campo fotografiado con luz visible, mientras que el panel inferior muestra el mismo campo fotografiado con luz a 450-490 nm (200 X).

4. PRESENCIA DE TUBULINA, PROTEÍNA *TAU*, GABA E INSULINA EN LAS NEURITAS DE LAS CELULAS β DE ADULTO.

Por medio de la IF y de la inmunocitoquímica (IC), también se evaluó la participación de cuatro distintos marcadores de la función celular, en el desarrollo de las neuritas de células β de adulto, inducidas por NGF y/o dbAMPc; como se ve en la tabla V. La presencia de estos marcadores, tubulina β , proteína *Tau*, GABA e insulina, en las neuritas de las células β , también sería un indicativo de la participación activa del citoesqueleto, y la maquinaria celular de la célula β en el crecimiento de los procesos neuríticos.

Así, el 91.93% de las células β de adulto que desarrollaron neuritas al ser cultivadas en presencia de NGF 2.5S o NGF 2.5S y dbAMPc fueron positivas a IF contra tubulina β . Además de contener tubulina β ; los procesos neuríticos de las células β de adulto, inducidos por estos dos tratamientos, también presentaban proteína *Tau*; ya que 92.88% de las células que extendieron neuritas eran positivas a IF contra la proteína *Tau*.

Como se puede ver en las figuras 15 y 16 estos dos marcadores se encontraron tanto en el cuerpo celular como en las neuritas de las células β . Es importante aclarar que estos dos marcadores, también están presentes en las células β que no extendieron procesos, aunque no se puede saber si existen en la misma proporción, que en las células β con neuritas; ya que nuestro equipo de IF nos impide hacer mediciones cuantitativas.

Por otra parte, los cambios morfológicos sufridos por las células β no impidieron la síntesis de dos moléculas características de la actividad fisiológica de las células β ; el GABA y la insulina, porque 95.41% de las células β de adulto, que extendieron neuritas al ser tratadas con NGF 2.5S o NGF 2.5S y dbAMPc, fueron positivas a IF contra GABA,

Por otra parte, el 91.87% de las células con neuritas, bajo estas mismas condiciones de cultivo, fueron positivas a IC contra insulina. Al igual que los dos marcadores anteriores, el GABA y la insulina, se encuentran tanto en el cuerpo celular de las células que extendieron y que no extendieron las neuritas; como en las neuritas de las células β que sí extendieron los procesos, como se puede ver en las figuras 10, 11, 12 y 13 para el caso de la insulina, y la figura 17 para el GABA.

ANTIGENO	% PROCESOS POSITIVOS
β-TUBULINA	91.93 ± 0.30
PROTEINA TAU	92.88 ± 0.47
GABA	94.31 ± 0.42
INSULINA	91.87 ± 0.71

TABLA V. ANTIGENOS PRESENTES EN LAS NEURITAS DE LAS CELULAS β
Cuatro diferentes antígenos marcadores de la fisiología celular se encuentran en las neuritas de las células β adultas. (Tubulina, n=10; proteína *Tau*, n=6; GABA, n=3; insulina, n=3. En promedio, en los cultivos procesados para IF se contabilizaron 98 células β)

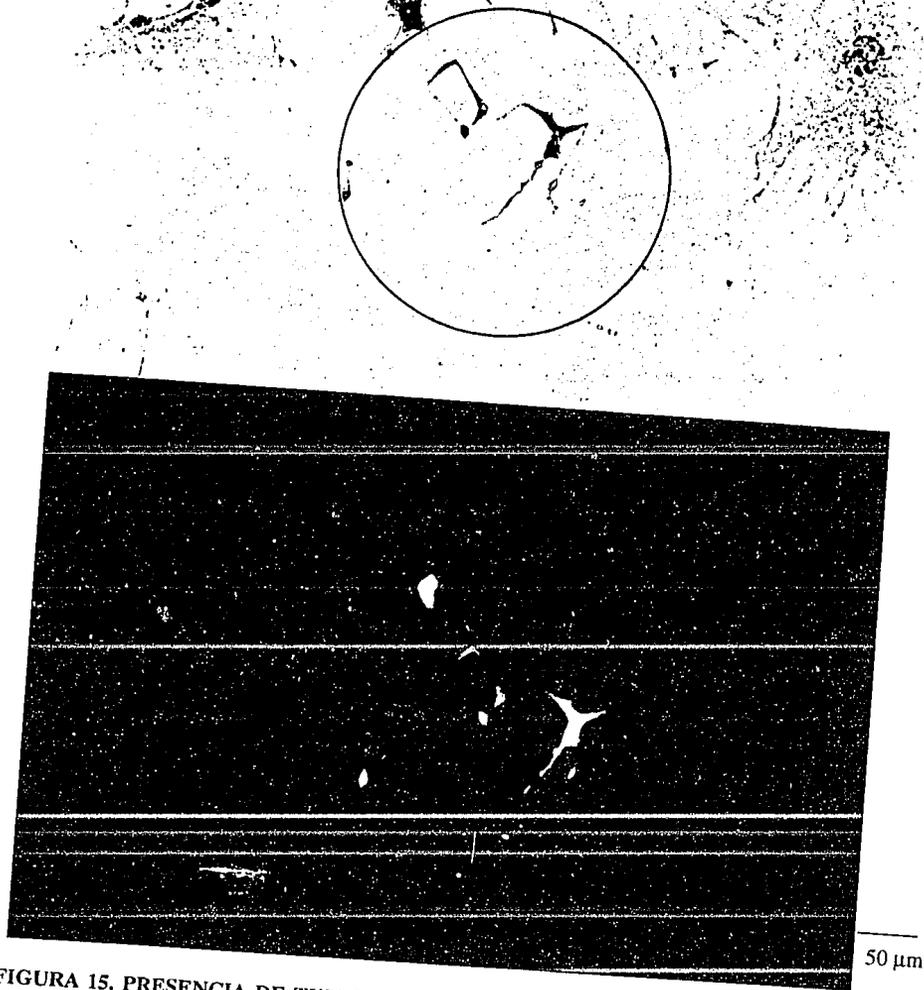


FIGURA 15. PRESENCIA DE TUBULINA β EN LAS NEURITAS DE LAS CELULAS β .
La inmunofluorescencia contra tubulina β revela la presencia de esta proteina en las neuritas de las células β de adulto. El p nel superior muestra un campo fotografiado con luz visible, mientras que en el p nel inferior se aprecia el campo enmarcado fotografiado con luz a 450-490 nm. El campo de fluorescencia presenta un  rea menor debido al cierre del diafragma, necesario para no velar la fotograf a.

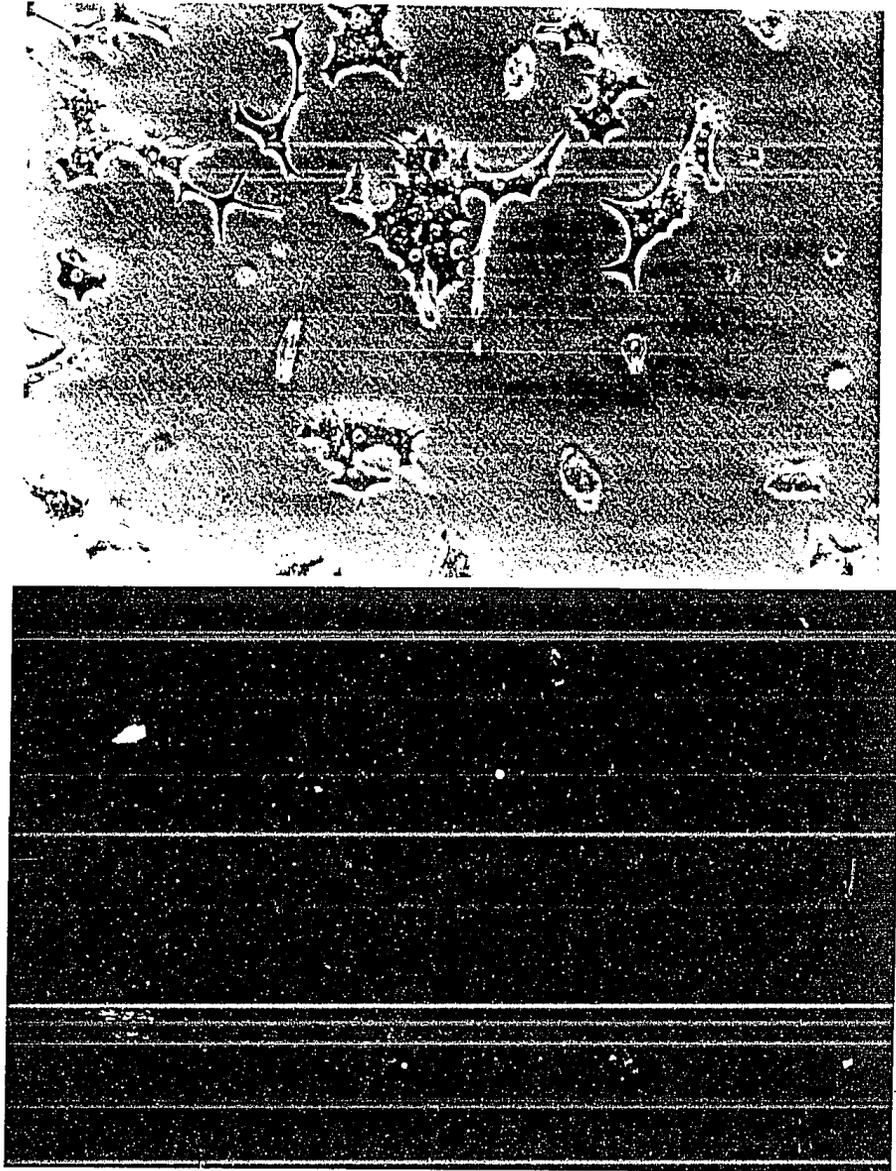


FIGURA 16. PRESENCIA DE PROTEINA *TAU* EN LAS NEURITAS DE LAS CELULAS β . La inmunofluorescencia contra proteína *Tau* revela la presencia de este antígeno en las neuritas de las células β de adulto. El p nel superior muestra un campo fotografiado con luz visible, mientras que el p nel inferior muestra el mismo campo fotografiado con luz a 450-490 nm (200 X).

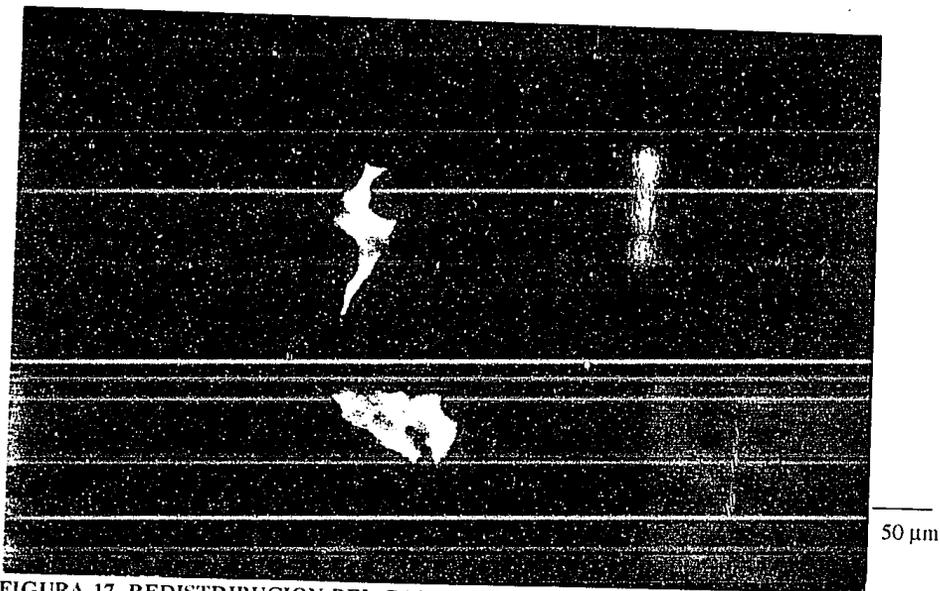


FIGURA 17. REDISTRIBUCION DEL GABA EN LAS CELULAS β .

La inmunofluorescencia contra GABA revela la presencia de este neurotransmisor en los cuerpos celulares y en las neuritas de las células β de adulto. El p nel superior muestra un campo fotografiado con luz visible (200 X), mientras que el p nel inferior muestra el mismo campo fotografiado con luz a 450-490 nm.

*"...To bleed the lyric for this song,
to write the rites to right my wrongs;
an epitaph to a broken dream,
to exorcise this silent scream,
a scream that's born from sorrow..."*

- Fish (Marillion). *Script for a jester's tear.*

V. DISCUSION

Pese a que existen varias evidencias a favor del origen endodérmico de las células β pancreáticas^{44,67}; éstas expresan una gran cantidad de marcadores celulares, tanto funcionales como morfológicos, propios de las células provenientes del neuroectodermo.

En este trabajo se ha demostrado que la diferenciación morfológica de las células β es sensible al NGF y al dbAMPc. Cuando son cultivadas en presencia de estos factores neurotróficos, la morfología de las células β cambia drásticamente, y pasan de ser unas células pequeñas y de forma redonda, hacia un tipo celular de apariencia neuronal, con procesos neuríticos de longitud y ramificaciones variables.

La extensión de estas neuritas no depende de la edad celular, porque tanto las células β fetales como las de adulto, fueron capaces de formar los procesos al ser expuestas al NGF y al dbAMPc, pese a que se tiende a pensar que las células fetales son más sensibles a los factores del medio que modifiquen su compromiso de diferenciación.

Los cambios morfológicos observados en las células β de adulto indican que ellas aún conservan la plasticidad que les permite adoptar formas muy diversas, en respuesta a las condiciones que las rodean; sin embargo, la plasticidad morfológica de las células adultas no es enteramente igual a la plasticidad de las células fetales, cuando menos en lo que se refiere a la acción ejercida por el NGF. Mientras que el porcentaje de células β fetales que extendió las neuritas, aumentó considerablemente cuando fueron tratadas con la fracción 7S del NGF, el porcentaje de células de adulto no varió en presencia de este factor; por lo que fue necesario exponerlas a la fracción 2.5S del NGF. Esto significa, de hecho, aumentar la concentración de NGF activo en el medio de cultivo; ya que la fracción 2.5S representa en más del 90% la

subunidad β del NGF, que es la responsable de los efectos biológicos de este factor de crecimiento ⁷.

Tal vez las diferencias en la plasticidad de las células fetales y las de adulto, reflejen distintas capacidades de respuesta, que podrían deberse, por un lado, a una menor expresión de receptores a NGF en las células de adulto, lo que haría necesario exponer a estas células a una concentración mayor de NGF; aunque no se puede descartar una capacidad mayor de las células fetales para convertir el NGF 7S en la subunidad activa β . Este proceso parece deberse a una proteólisis enzimática ⁴⁷, pese a que la "convertasa" de NGF no ha podido identificarse, por lo que el proceso de "activación" del NGF no es claro. Esto no impide pensar que existan diferencias en la expresión de la actividad de convertasa de NGF, entre las células β de las dos edades distintas.

Otra posibilidad, es que las diferencias observadas entre las células de distinta edad, se deban a una mayor facilidad de las células fetales para reorganizar los procesos celulares encargados de mantener la morfología. Esta propensión de las células β fetales podría ser causada por la existencia de un citoesqueleto menos estable y con mayor capacidad de respuesta. Una evidencia a favor de esto último, es la expresión de proteínas del citoesqueleto que son consideradas propias del axón, como la periferina, en primordios de páncreas de fetos de ratón; porque estas mismas proteínas no se expresan en los páncreas de los adultos ²⁴.

La falta de respuesta de las células de adulto al NGF 7S se puede revertir con la aplicación concomitante de dbAMPC, lo que facilita la acción del factor de crecimiento; porque los cambios en la morfología de las células β de adulto son más evidentes y significativos cuando son cultivadas en presencia de estos dos factores, que cuando son cultivadas con cualquiera de por separado. Esto indica que el dbAMPC aumenta la plasticidad morfológica de las células β de adulto, con lo que se asemejaría más a la plasticidad de las células fetales; porque no existen diferencias entre las células de las dos edades cuando son tratadas con los dos factores simultáneamente.

El efecto sinérgico entre el dbAMPC y el NGF podría deberse a la acción reguladora del dbAMPC sobre los mecanismos celulares involucrados en el crecimiento de las neuritas. Esta regulación podría ser a niveles de expresión génica, tanto de transcripción como de traducción; aunque también podrían existir acciones moduladoras al nivel de la regulación postraduccional,

lo que incluiría modificaciones covalentes como la fosforilación de proteínas. Al menos, la posibilidad de un efecto del dbAMPc sobre la expresión de proteínas involucradas en el crecimiento de las neuritas se ve apoyada por la evidencia experimental; ya que el AMPc induce la traducción de tubulina en las células β ⁶⁹, y esta proteína participa en el desarrollo de los procesos de éstas células, porque sus neuritas expresan tubulina β , como se demuestra en este trabajo.

El efecto sinérgico observado entre el dbAMPc y el NGF sugiere que estos factores actúan sobre distintos mecanismo de diferenciación celular, como ocurre en otros tipos celulares, por ejemplo, la línea PC12 ³³. Esta proposición se ve reforzada por las diferentes morfologías que adquieren las células β en presencia de las dos moléculas por separado: el dbAMPc induce que, en la mayoría de las células, aumente el diámetro perinuclear, y que las células adquieran una forma aplanada y estrellada. Estos cambios pueden sugerir alguna modificación en la adhesividad celular al sustrato, además de las modificaciones al citoesqueleto. Por esto, se deberá evaluar el efecto del dbAMPc sobre la expresión de moléculas de adhesión celular.

El NGF, por su parte, podría inducir directamente el crecimiento de las neuritas, ya que éstas fueron de mayor longitud cuando las células fueron cultivadas en presencia de este factor. Asimismo, el NGF también podría inducir cambios en la fisiología de la célula β , como lo demuestran otros datos obtenidos en el laboratorio, en donde se observa un aumento en la densidad de las corrientes macroscópicas de sodio de las células β ⁷⁴.

Para entender más el efecto sinérgico entre el NGF y el dbAMPc, se deberá estudiar como varía el crecimiento de los procesos durante el tiempo; porque en otros sistemas celulares, el AMPc induce que el crecimiento de las neuritas sea más rápido ³⁰, por lo que los resultados de cinética de crecimiento podrían aclarar las distintas acciones de los dos factores.

Pese a que los cambios morfológicos promovidos por los dos factores son evidentes, no todas las células β presentes en los cultivos extendieron neuritas, como se ve en la tabla III. El mayor porcentaje observado de células β con neuritas fue alrededor de 50%, tanto en células fetales como en las adultas, y fue inducido por el tratamiento simultáneo con dbAMPc y NGF (cualquiera de las dos fracciones). Esto podría indicar la existencia de dos poblaciones de células β : una población estaría representada por las células que tienen la capacidad de responder a los dos factores y modificar su morfología, y la otra sería representada por las células incapaces de

desarrollar los procesos. Si éstas poblaciones celulares están definidas por diferencias fenotípicas o genotípicas, o si son un artificio de las condiciones de cultivo, deberá ser evaluado en el futuro.

Una parte de la respuesta a la interrogante anterior se obtuvo a lo largo de este trabajo; porque se encontró que solamente las células β que extienden los procesos, expresan un sitio de unión a NGF, lo que podría indicar la expresión de un receptor a este factor de crecimiento.

Este receptor fue positivo a la inmunofluorescencia contra NGF 2.5S, y el único tipo celular que lo expresaba fueron las células β , aunque en forma diferencial. El 93 % de las células que extendieron los procesos fueron positivas a la IF; mientras que en las células sin procesos, solamente el 6 % lo fue. Estos datos correlacionan con la idea de la existencia de dos poblaciones diferentes de células β , que expresan plasticidades morfológicas distintas, las cuales podrían deberse a características fenotípicas o genotípicas diferentes.

Aparentemente, el sitio de unión a NGF en las células β no es el receptor de baja afinidad ($p75^{NGFR}$), porque al utilizar un anticuerpo monoclonal contra esta proteína en la inmunofluorescencia, todas las células fueron negativas, tanto en el grupo testigo como en los grupos tratados con NGF y/o dbAMPC. Este resultado deberá validarse experimentalmente para comprobar la eficacia del anticuerpo monoclonal, y se deberá realizar la IF en un tipo celular que sí exprese el $p75^{NGFR}$, como las células PC12.

Para comprobar que existan subpoblaciones de células β con diferentes expresiones de receptores del NGF, será necesario identificar el tipo de receptor de NGF presente en estas células; para esto, será de utilidad hacer experimentos para correlacionar la dosis del NGF utilizada con los efectos sobre la morfología. Estos resultados podrían indicar el rango en que se encuentra la constante de afinidad de este receptor, lo que serviría de base para intentar caracterizar el receptor farmacológicamente, y posteriormente, con la utilización de técnicas de biología molecular, como el Northern blot, se podría saber con certitud que subtipo de receptor a NGF es el que expresan las células β .

La caracterización del receptor a NGF servirá para comprobar si las diferentes subpoblaciones de células β están determinadas por diferencias genéticas; porque de ser así, la existencia de dos poblaciones de células β sugeriría un origen embrionario mixto para las células β , aún cuando las dos subpoblaciones provinieran de la misma capa germinal. Dentro de este marco, una subpoblación de células β estaría comprometida ontogénicamente a mantener una

plasticidad morfológica y funcional; mientras que la otra estaría comprometida a conservar una morfología única e invariable; sin embargo, no se puede descartar que las diferencias entre una población de células β y otra fueran causadas por las condiciones de cultivo o por los efectos del NGF y/o del dbAMPc sobre las células β .

Existen evidencias que hacen pensar que estas subpoblaciones de células β no son un artificio experimental; por ejemplo, los trabajos realizados en líneas celulares obtenidas de insulínoma de rata (RIN5F) y ratón (β TC3), también sugieren la existencia de dos poblaciones de células β con diferentes sensibilidades al NGF. La población sensible estaría representada por las células RIN5F, que extienden procesos al ser tratadas con NGF (100 ng/ml); por otra parte, las células β TC3 representarían una población no sensible a NGF, porque esta línea celular no extiende los procesos bajo las mismas condiciones de cultivo. La conclusión a la que llegan los autores es que las diferencias observadas entre las dos líneas celulares se deben a que cada línea representa un estadio de diferenciación y maduración distinto; así, la línea RIN5F correspondería a un grupo celular fetal; y la línea β TC3 a un grupo de células de adulto ⁷⁰. Sin embargo, como se demuestra en este trabajo, la edad celular no influye en la capacidad de las células β a cambiar su morfología en respuesta al NGF, por lo que es posible explicar estos datos pensando en dos subpoblaciones de células β .

Las diferencias a nivel de los cambios morfológicos no son el único indicativo de la existencia de subpoblaciones de heterogéneas de células β ; porque existen también poblaciones de células β que difieren en la expresión de marcadores bioquímicos. Un ejemplo de éstas son las poblaciones que mantienen diferentes relaciones entre las concentraciones de NADP y NADPH ($[NADP]/[NADPH]$). Estas subpoblaciones pueden ser separadas entre sí por medio de un clasificador de células activado por fluorescencia ⁴⁰ (FACS).

Las diferencias bioquímicas parecen correlacionar también con diferencias a nivel funcional, porque se ha propuesto que existen al menos tres subpoblaciones funcionales de células β , que se diferencian entre sí por la tasa de insulina secretada ³². Todas estas evidencias de la heterogeneidad de las células β se podrían correlacionar entre sí, pensando en una determinación genética y ontogénica para cada subpoblación. Por esto es muy importante identificar la existencia *in vivo* de las poblaciones de células β que expresan y que no expresan el receptor a

NGF, porque éste sería un marcador que se podría utilizar para separar cada subpoblación, y con esto intentar correlacionar esta diferencia con las demás.

El hecho de que el NGF y el dbAMPc promuevan el crecimiento de los procesos de las células β concuerda con lo que se ha observado en otros sistemas celulares ⁸⁷, en donde el citoesqueleto juega un papel muy importante en el desarrollo de las neuritas ²². Estas observaciones hicieron importante conocer la participación del citoesqueleto de las células β en la formación de sus procesos, y por esto se evaluó la presencia de microtúbulos en las neuritas.

Los experimentos con inmunofluorescencia demuestran que los procesos de las células β expresan tubulina β , que es uno de los monómeros formadores de microtúbulos. Esto podría indicar que el proceso de consolidación de estas neuritas es parecido al proceso observado en otros sistemas celulares ⁵⁷. Esta idea es apoyada por los datos de IF contra la proteína *Tau*, que también demuestran que ésta se encuentra en los procesos de las células β , al igual que en otros tipos celulares derivados del neuroectodermo, donde la proteína *Tau* entrelaza varios haces de microtúbulos y los hace más compactos y resistentes ²²; al parecer, esta proteína no se expresa en ningún tipo celular que no provenga del neuroectodermo ²².

La presencia de varios componentes del citoesqueleto neuronal en los procesos de las células β , como lo son la proteína *Tau* y los neurofilamentos de 160 kDa ⁸⁰, sugiere que su mecanismo de crecimiento es muy parecido al de las neuritas de otros tipos celulares; sin embargo, se deberá comprobar la presencia de conos de crecimiento y de sitios de polimerización dinámica de actina en las células β , porque este es el mecanismo básico de crecimiento de los procesos de las células derivadas del neuroectodermo ⁵⁷.

La expresión de tubulina en las neuritas de las células β no sólo explicaría los efectos sinérgicos del dbAMPc y el NGF; a su vez, esto correlaciona y explica la presencia de insulina y GABA en estos procesos; porque tanto los gránulos de secreción de insulina ⁵² como las microvesículas de GABA ⁷³, se transportan a lo largo de microtúbulos. La redistribución de las microvesículas de GABA hacia los procesos, podría sugerir un papel funcional, como regulador paracrino, para este neurotransmisor en las células β , lo que hasta ahora no ha podido ser comprobado ⁷³; aunque se ha sospechado por la expresión de receptores a este neurotransmisor en las células del islote pancreático ⁷³.

La presencia de insulina en las neuritas de las células β también prueba que las células continúan sintetizando esta hormona, lo que podría indicar que los cambios morfológicos no influyen en la función natural de las células β . Esto se ve reforzado por otros trabajos desarrollados en el laboratorio, donde se estudió la secreción de insulina en células tratadas con NGF ⁷⁵; los datos obtenidos demuestran que el tratamiento con NGF no afecta la capacidad de secretar insulina en las células β ; más aún, este tratamiento mantiene la capacidad de las células β para responder a aumentos en la concentración de glucosa extracelular con aumentos en la secreción de insulina.

La sensibilidad de las células β al NGF hacen pensar que esta molécula sea un factor trófico para las células del islote pancreático, lo que abre nuevas perspectivas para el estudio de la ontogenia de las células que lo conforman, aún cuando no provinieran de la cresta neural ⁸⁰; porque es plausible pensar en una migración de las células del islote hacia el primordio pancreático, que podría ser dirigida por el NGF, al actuar como quimioattractante.

Esta migración se puede suponer de las observaciones realizadas en los páncreas en desarrollo, donde es imposible observar células endocrinas en división pese a que aumentan en número ⁶⁵; aunque este aumento se le ha achacado a la transdiferenciación de células exocrinas en endocrinas, nunca se ha podido comprobar esta teoría ⁶⁵.

Si las células β migran desde un lugar distinto al originario del tejido acinar, se necesitaría una molécula que las dirigiera hacia su destino, y el NGF es un buen candidato para ser ese factor trófico, porque esa es una de sus funciones normales ⁸, además de que durante el desarrollo del intestino delgado en la rata, las fibras nerviosas que lo inervan producen una gran cantidad de NGF ¹⁴.

La función del NGF como quimioattractante de las células β se deberá evaluar en un futuro cercano; ya que la extensión de las neuritas, además de la simple plasticidad morfológica, pudiera indicar el movimiento y migración de las células β . La migración también implicaría la participación de la matriz extracelular; al menos uno de sus componentes, la laminina, promueve el desarrollo de procesos la línea celular RIN5F ⁷⁰.

Otro aspecto que deberá estudiarse, es el papel que juegan en la extensión de los procesos de las células β otros componentes de la matriz extracelular, como la fibronectina y la vitronectina. Aunado a esto, también se deberá evaluar la expresión de moléculas adhesión a

matriz en la membrana plasmática de las células β ; porque estos datos podrían aclarar el probable proceso de migración de las células endocrinas hacia el primordio pancreático.

Esta migración también se podrá estudiar realizando experimentos histológicos con embriones en diferentes estadios de desarrollo; en ellos se podrá seguir por inmunocitoquímica la aparición de células que expresen insulina y receptores a NGF, por lo que la identificación del receptor presente en las células β también será necesaria para este trabajo experimental.

La identificación del receptor del NGF también permitirá evaluar otro aspecto del efecto sinérgico entre el NGF y el dbAMPc; porque se sabe que el AMPc induce la transcripción del mensajero del receptor a NGF³, y si existe este mismo efecto en las células β , se podría contaría con otra explicación para la acción sinérgica entre los dos factores tróficos.

La sensibilidad al NGF no es un marcador definitivo de origen neuroectodérmico⁴⁷, y en ese sentido, los datos presentados en este trabajo no comprueban que las células β tengan este origen; sin embargo, las células β representarían el primer tipo celular que no se origina del neuroectodermo y donde el NGF induce cambios en la diferenciación morfológica⁴⁷, por lo que este factor de crecimiento tendría efectos pleiotrópicos muy distintos a los reportados hasta ahora, ya que ejercería su acción neurotrófica sobre tipos celulares de ontogénias muy distintas, tanto en células originarias del ectodermo como en las derivadas del endodermo. Aún así, el hecho de que el NGF modifique la diferenciación de las células β hacia un tipo celular de apariencia neuronal, que extiende procesos neuríticos y con una actividad eléctrica mayor⁷⁴, abre amplias perspectivas en el campo de estudio de la célula β pancreática.

"...Well, it seemed to be a song for you;
the one I wanted to write for you.
Lavender's blue, dilly, dilly, lavender's green;
when I am king, dilly, dilly, you will be queen.
Lavender's green, dilly, dilly, lavender's blue;
when You love me, dilly, dilly, I will love you..."

- Fish (Marillion). *Misplaced childhood*.

VI. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

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

- a) El NGF y el dbAMPc inducen el crecimiento de procesos neuríticos en las células β pancreáticas de rata.
- b) El crecimiento de estas neuritas no depende de la edad celular, ya que tanto las células β obtenidas de fetos, como las obtenidas de adultos juveniles, son capaces de extender las neuritas en respuesta al estímulo de estos factores.
- c) Al igual que en otros sistemas celulares, existe un efecto sinérgico entre el dbAMPc y el NGF sobre el crecimiento de las neuritas; porque el porcentaje de células con procesos llega a su máximo cuando las células β son cultivadas en presencia de los dos factores simultáneamente y, al menos en las células de adulto, los procesos son de mayor longitud.
- d) Las células β de adulto expresan, al menos, un sitio de unión al NGF 2.5S.
- e) Las neuritas de las células β están formadas, en parte, por microtúbulos; ya que expresan tubulina β . Estos microtúbulos podrían estar estabilizados por la proteína *Tau*, porque ésta también se encuentra en los procesos neuríticos de las células β .
- f) Los cambios morfológicos no influyen en la función de las células β ; ya que éstas siguen sintetizando insulina y GABA, que son dos moléculas características de las células β *in vivo*.

g) Los microtúbulos presentes en las neuritas de las células β son activos y funcionales, en lo que se refiere al transporte de vesículas de secreción, porque tanto la insulina como el GABA se distribuyen a lo largo de los procesos neuríticos.

El estudio del crecimiento de las neuritas en las células β no puede declararse completo. Aunque en la disertación anterior se mencionan algunas de las perspectivas para este proyecto, se debe hacer énfasis en aquellas, que por la necesidad o factibilidad de realización inmediata son importantes:

1°.- Se deberán estudiar los efectos de la concentración del NGF sobre la morfología celular. El contar con los datos de la relación dosis respuesta entre el NGF y el crecimiento de neuritas, permitirá entender más las diferencias observadas entre las dos fracciones del NGF en las células de adulto, al igual que las observadas entre las células de las dos edades; porque estos resultados podrían indicar si las diferencias observadas se deben nada más a la concentración del factor de crecimiento, o si se deben a alguna diferencia inherente a las fracciones.

2°.- Se deberá estudiar el efecto del NGF 2.5S sobre la morfología de las células fetales; porque es importante conocer el efecto de esta fracción del NGF sobre la morfología de las células fetales. Esto nos aportaría más información sobre las diferencias entre las dos fracciones del factor de crecimiento.

3°.- Otro aspecto que se deberá evaluar es la cinética de crecimiento de los procesos, porque ésto permitirá entender mejor el efecto sinérgico entre el dbAMPc y el NGF en las células β .

4°.- Por último, se deberá evaluar el papel del citoesqueleto en el crecimiento de los procesos de las células β . Los datos aportados por el presente trabajo, demuestran que estos procesos están formados por microtúbulos, mismos que en

otras células participan en la consolidación de las neuritas, y sólo indirectamente en su crecimiento; por ello, es importante evaluar el papel de los microfilamentos de actina, que son los responsables directos del crecimiento de las neuritas. Esto se podrá llevar a cabo con la utilización de fármacos que inhiban la polimerización de actina, tales como la citocalasina B. Los resultados podrán indicar si el mecanismo de crecimiento de los procesos en las células β es idéntico al mecanismo observado en otros tipos celulares.

*" IN OTIN IHUAN IN TONALTIN NICAN TZOQUINCA"
(Aquí terminan los caminos y los días)*

Al menos una parte de ellos.

- Proverbio náhuatl citado por Gary Jennings en *Aztec* y refraseado por mí.

*"Negro por fuera; verde por dentro,
y con un hueso de aguacate en el centro.
¿Qué podrá ser?."*

- Adivinanza infantil, muy útil
en analogías absurdas.

VII. GLOSARIO

Acino: Cualquiera de los lóbulos (dilataciones sacciformes) de una glándula compuesta⁹³.

Anticuerpo: Proteína sintetizada por los linfocitos B del sistema inmune, cuya función es reconocer y unirse a una región determinada de una molécula específica (ver **antígeno**).

Anticuerpo monoclonal: Anticuerpo sintetizado por un tipo único de linfocito B, y que no varía nunca en su composición de aminoácidos ni en su especificidad y afinidad por un antígeno.

Antígeno: Molécula capaz de inducir una respuesta del sistema inmune; tanto en forma de anticuerpos, como en forma de células citotóxicas.

Cápsula de Vater: Sitio donde el conducto pancreático se conecta con el intestino delgado⁹³.

Citocinesis: Proceso de bipartición de células. Por lo regular ocurre al final de un ciclo de división celular.

Citoesqueleto: Red de proteínas fibrilares presentes en el citoplasma de una célula. El citoesqueleto y la **matriz extracelular** son los responsables de la morfología de cada tipo celular.

Clonación: Identificación, aislamiento y reproducción de una copia de un gene determinado. El último proceso por lo regular ocurre en un tipo celular distinto del que se obtuvo la primera copia del gene.

Coefficiente de sedimentación (S): Tasa a la que se sedimenta una molécula en un gradiente de centrifugación.

Cresta neural: Estructura embrionaria derivada del ectodermo, que se encuentra adyacente al tubo neural, fuera del epitelio formado por este e incrustada en el mesodermo. Origina a varias células del sistema nervioso periférico y a las células de la médula adrenal, entre otros tipos celulares²⁷.

Cromafines, células: Células de la médula adrenal, que secretan adrenalina. Reciben su nombre por la afinidad a las tinciones con sales de cromo⁹³.

Cultivo primario: Obtener y lograr la supervivencia de células obtenidas directamente de un organismo (animal o vegetal) *in vitro*.

Despolarización: Reducción o inversión de la diferencia de potencial en la membrana plasmática.

Diferenciación: Generación de diversidad, tanto morfológica como funcional, en las células de un organismo²⁷.

Divertículo: Apéndice hueco, en forma de bolsa o saco de una cavidad o tubo principal⁹³.

Endocrino: Designación de los órganos, glándulas o células de secreción interna⁹³.

Exocrino: Designación de los órganos, glándulas o células de secreción externa⁹³.

Exógeno: Que se origina en el exterior de un organismo.

Expresión: Presencia o síntesis de una molécula.

Factor de crecimiento: Molécula que induce el crecimiento o la proliferación de un tipo celular.

Factor trófico: Molécula que promueve la supervivencia de un tipo celular, o bien induce cambios en su morfología o fisiología.

Figura mitótica: Dícese de las células en cuyos núcleos se pueden apreciar cromosomas metafásicos (condensados)⁹³.

Gránulo de zimógeno: Gránulo de secreción presente en las células acinares del páncreas, que almacena precursores de las enzimas digestivas y que es teñido por colorantes ácidos⁹³.

Gránulo endocrino: Gránulo de secreción presente en las células endocrinas del páncreas, que almacena las hormonas características de cada una de estas células, y que es teñido por la técnica de aldehído-fucsina⁹³.

Hibridización en Northern blot: Técnica utilizada para conocer la expresión de un RNA mensajero específico. Los mensajeros son obtenidos de una célula, y corridos en un gel de agarosa; para después ser transferidos a una matriz rígida, donde son expuestos a una sonda de DNA, complementaria al gene de interés. Para que exista apareamiento, las cadenas de los ácidos nucleicos deben ser desnaturalizadas.

Lámina Basal: Matriz extracelular especializada, que se encuentra en la base de los tejidos epiteliales.

Línea celular: Población celular obtenida de un tejido neoplásico que puede reproducirse indefinidamente.

Lumen: Luz (espacio libre) de un vaso o conducto⁹³.

Matriz extracelular: Red de proteínas fibrosas, depositadas en el exterior de una célula y que sirven de sustrato (sustento) para el crecimiento y/o movilidad celular. Junto con el citoesqueleto, son responsables de la morfología de un tipo celular.

Mesénquima: Tejido conjuntivo embrionario que forma la mayor parte del mesodermo, y del cual derivan los tejidos conjuntivos y los vasos sanguíneos y linfáticos²⁷.

Neoplásico: Tejido que prolifera fuera de control, de carácter canceroso.

Neuritas: Procesos citoplásmicos presentes en las neuronas. Su principal característica es que son muy estables a lo largo del tiempo; y que expresan proteínas de citoesqueleto específicas, como los neurofilamentos.

Neuroectodermo: Porción del ectodermo embrionario que origina el sistema nervioso, tanto central (Placa y tubo neural), como el periférico (Cresta neural)²⁷.

Neurofilamentos: Filamentos intermedios del citoesqueleto, expresados por las neuronas. Principalmente se clasifican de acuerdo a su peso molecular.

Neurotróficas, propiedades: Capacidad de un factor de inducir cambios que asemejan un tipo neuronal en varios tipos celulares. También se le llama a la capacidad de un factor de ejercer acciones tróficas sobre las neuronas (ver factor trófico).

Oncogene: Se les ha llamado así a los genes que al estar mutados inducen la proliferación o transformación (crecimiento incontrolado, neoplasia) de una población celular. El gene originario, sin mutaciones se le ha llamado protooncogene.

Plasticidad: Capacidad de cambio.

Pleiotrópico: Efectos múltiples de una molécula; ya sea que ejerza acciones a diferentes niveles de la fisiología celular, o bien tenga efecto sobre tipos celulares muy variados.

Posttraduccional: Modificaciones a una proteína después de que ha sido traducida por el ribosoma.

Primordio: Rudimento. Estructura que dará origen a otra completamente desarrollada. (Yúrina, 1985)

Proteólisis: Cortes sufridos por una cadena polipeptídica. Si son realizados por otra proteína, se les llama enzimáticos.

Quimioatractante: Molécula que induce el movimiento celular hacia ella.

Ratón transgénico: Cepa murina, a la cual se le introdujo un gene exógeno en el estadio de cigoto.

Sarcoma: Neoplasia derivada de un tejido originario del mesodermo.

Sinérgico: Cooperación entre dos o más factores para inducir un efecto.

Sistema APUD: También llamado neuroendocrino difuso. Esta teoría propone que el sistema endocrino es una tercera rama del sistema nervioso.

Somita: Protovértebra. Estructura del embrión que se encuentra en la región dorsal, derivado del mesodermo y compuesto por dermatoma, miotoma y esclerotoma. Se utilizan como marcadores para delimitar estadios de desarrollo en embriones animales²⁷.

Traducción: Fase de la síntesis de proteínas, en la que el código del RNA mensajero es traducido al código de las cadenas polipeptídicas. Es llevada a cabo por los ribosomas.

Transcripción: Fase de la síntesis de proteínas, en la que un gene codificado por el DNA es transcrito al código del RNA mensajero.

Transdiferenciación: Dícese del proceso en que una célula diferenciada adquiere características propias de otro tipo celular de diferenciación distinta.

Transducción de señales: Proceso mediante el cual un factor hidrosoluble transmite su señal al interior de una célula. De este proceso es responsable el receptor del factor, al interactuar con los diferentes mecanismos de transducción.

Trópico: Dícese del factor que induce el crecimiento o movilidad de un tipo celular hacia él (ver quimioatractante).

Tubo neural: Rudimento del sistema nervioso central en el embrión²⁷.

Uniones comunicantes: Uniones intercelulares por las que son capaces de permear moléculas pequeñas, como iones y aminoácidos. Están formadas por proteínas llamadas conexinas, y son capaces de formar un poro en las membranas plasmáticas de células adyacentes.

Voltaje transmembranal: Diferencia de potencial eléctrico establecida en la membrana plasmática de las células, y que se debe a la diferencia de las concentraciones de los iones en los espacios extra e intracelular.

Zimógeno: Precursor de una enzima.

(A menos de que se cite otra fuente, el significado de cada término fue obtenido de Darnell *et al.*, 1990).

VIII. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Aloe, L. y Levi-Montalcini, R. (1977). The effect of nerve growth factor on mast cells. *Brain Res.* **133**: 358-366.
- 2.- Alpert, S., Hanahan, D., Teitelman, G. (1988). Hybrid insulin genes reveal a developmental lineage for pancreatic endocrine cells and imply a relationship with neurons. *Cell* **53**: 295-308.
- 3.- Amano, T., Yamakuni, T., Kuwahara, R., Ozawa, F., Hishinuma, F. (1992). Regulation of nerve growth factor and nerve growth factor receptor production by NMDA in C6 glioma cells. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **14**: 35-42.
- 4.- Amos, L.A. y Baker, T.S. (1979). Three-dimensional image of tubulin in zinc-induced sheets, reconstructed from electronmicrographs. *Int. J. Biol. Macromol.* **1**: 146-157.
- 5.- Angeletti, R. y Bradshaw, R.A. (1971). Nerve growth factor from mouse submaxillary gland: Amino acid sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **68**: 2417-2420.
- 6.- Ashcroft, F.M. y Rorsman, P. (1989). Electrophysiology of the pancreatic β -cell. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* **54**: 87-145.
- 7.- Bocchini, V. y Angeletti, P.U. (1969). Nerve growth factor: Purification as a 30000-molecular weight protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **64**: 787-794.
- 8.- Bradshaw, R.A. (1978). Nerve growth factor. *Annu. Rev. Biochem.* **47**: 191-216.
- 9.- Bray, D. (1979). Mechanical tension produced by the nerve cells in tissue. *J. Cell. Sci.* **37**: 391-410.
- 10.- Bray, D. y Chapman, K. (1985). Analysis of microspike movements on the neuronal growth cone. *J. Neurosci.* **5**: 3204-3213.
- 11.- Bruecker, E.D. (1948). Implantation of tumors in the hind limb field of the embryonic chick and the developmental response of the lumbosacral nervous system. *Anat. Rec.* **102**: 369-390.
- 12.- Bruni, A., Bigon, E., Boarato, E., Leon, A., Toffano, G. (1982). NGF increases histamine release by mast cells. *FEBS Lett.* **198**: 315-320.
- 13.- Burton, P.R. y Paige, J.L. (1981). Polarity of axoplasmic microtubules in the olfactory nerve of the frog. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**: 3269-3273.
- 14.- Chalazonitis, A., Rothman, T.P., Gershon, M.D. (1993). Neurotrophin-3 promotes neuronal and glial differentiation in cultured neural-crest-derived cells from fetal rat gut. *Proc. 23 Annual Meeting. Soc. Neurosci.* Abs. **179.9**.
- 15.- Cohen, S. (1960). Purification of a nerve-growth promoting protein from the mouse salivary gland and its neurocytotoxic serum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **46**: 302-311.
- 16.- Cohen, S. y Levi-Montalcini, R. (1956). A nerve-growth stimulating factor isolated from snake venom. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **42**: 571-574.
- 17.- Cohen, S., Levi-Montalcini, R., Hamburger, V. (1954). A nerve-stimulating factor isolated from sarcomas 37 and 180. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **40**: 1014-1018.
- 18.- Darnell, J., Lodish, H., Baltimore, D. (1990) Molecular Cell Biology; Scientific American Books; NY, USA; Segunda edición.

- 19.- Dean, P.M. y Matthews, E.K. (1968). Electrical activity in pancreatic islet cells. *Nature* **219**: 389-390.
- 20.- DiCicco-Bloom, E., Townes-Anderson, E., Black, I.B. (1990). Neuroblast mitosis in dissociated culture: Regulation and relationship to differentiation. *J. Cell. Biol.* **110**: 2073-2086.
- 21.- Ditcher, M.A., Tischler, A.S., Greene, L.A. (1977). Nerve growth factor- induced increase in electrical excitability and acetylcholine sensitivity of rat pheochromocytoma cell line. *Nature* **268**: 501-504.
- 22.- Drubin, D.G., Feinstein, S.C., Shooter, E.M., Kirschner, M. (1985). Nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells involves the coordinate induction of microtubule assembly and assembly-promoting factors. *J. Cell. Biol.* **101**: 1799-1807.
- 23.- Eisenbarth, G.S., Shimizu, K., Bowring, M.A., Well, S. (1982). Expression of receptors for tetanus toxin and monoclonal antibody A₂B₅ by pancreatic islet cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **79**: 5066-5070.
- 24.- Ecurat, M., Djabali, K., Huc, C., Landov, F., Bécourt, C., Boitard, C., Gros, F., Portier, F. (1991). Origin of the Beta cells of the islets of Langerhans is further questioned by the expression of neuronal intermediate filament proteins, peripherin and NF-L, in the rat insulinoma RINSF cell line. *Dev. Neurosci.* **13**: 424-432.
- 25.- Fontaine, J. y Le Douarin, N.M. (1977). Analysis of endoderm formation in the avian blastoderm by the use of quail-chick chimeras. The problem of the neuroectodermal origin of the cells of the APUD series. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **41**: 209-222.
- 26.- Frazier, W.A., Angeletti, R.H., Sherman, R., Bradshaw, R.A. (1973). The topography of mouse 2.5S nerve growth factor: The reactivity of tyrosine and tryptophan. *Biochemistry* **12**: 3281-3293.
- 27.- Gilbert, S.F. (1988). Developmental Biology; Sinauer Associates; Sunderland, MA. Segunda edición.
- 28.- Gorin, P.D. y Johnson, E.M. (1979). Experimental autoimmune model of nerve growth factor deprivation: Effects on developing peripheral sympathetic and sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**: 5382-5386.
- 29.- Greene, L.A. y Tischler, A.S. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **73**: 2424-2428.
- 30.- Gunning, P.W., Landreth, G.E., Bothwell, M.A., Shooter, E.M. (1981). Differential and synergistic actions of nerve growth factor and cyclic AMP in PC12 cells. *J. Cell. Biol.* **89**: 240-245.
- 31.- Hatanaka, H., Otten, U., Thoenen, H. (1978). Nerve growth factor mediated selective induction of ornithine decarboxylase in rat pheochromocytoma; a cyclic AMP independent process. *FEBS Lett.* **92**: 313-316.
- 32.- Hiriart, M. y Ramirez-Medeles, C. (1991). Functional subpopulations of individual pancreatic B-cells in culture. *Endocrinology* **128**: 3193-3198.
- 33.- Heidenmann, S.R., Joshi, H., Schlechter, J., Fletcher, J., Bothwell, M. (1985). Synergistic effects of cyclic AMP and nerve growth factor on neurite outgrowth and microtubule stability of PC12 cells. *J. Cell Biol.* **100**: 916-927.
- 34.- Hellman, B. (1970). Methodological approaches to studies on the pancreatic islets. *Diabetologia* **6**: 110-117.
- 35.- Hempstead, L., Martin-Zanca, D., Kaplan, D.R., Parada, L.F., Chao, M. (1991). High-affinity NGF binding requires coexpression of the *trk* proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature* **350**: 678-683.
- 36.- Hirokawa, N. (1982). Cross-linker system between neurofilaments, microtubules and membranous organelles in frog axons revealed by the quick-freeze, deep-etching method. *J. Cell. Biol.* **94**: 129-142.

- 37.- Johnson, E.M., Gorin, P.D., Brandeis, L.D., Pearson, J. (1980). Dorsal root ganglion neurons are destroyed by exposure in utero to maternal antibody to nerve growth factor. *Science* **210**: 916-918.
- 38.- Johnson, D., Lanahan, A., Buck, C.R., Sehgal, A., Morgan, C., Mercer, E., Bothwell, M., Chao, M. (1986). Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell* **47**: 545-554
- 39.- Kaplan, D.R., Hempstead, B.L., Martin-Zanca, D., Chao, M.V., Parada, L.F. (1991). The *trk* proto-oncogene product: A signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science* **252**: 554-558.
- 40.- Kiekens, R., In'tt' Ved, P., Mahler, T., Schuit, F., van DE Winkel, M., Pipeleers. (1992). Differences in glucose recognition by individual pancreatic B cells are associated with intercellular differences in glucose-induced biosynthetic activity. *J. Clin. Invest.* **89**:117-125.
- 41.- Lacy, P.E. y Kostianovsky, M.D. (1967). Method for isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* **16**: 35-39.
- 42.- Le Douarin, N.M. (1982). The neural crest; Cambridge Univ. Press; London; primera edición.
- 43.- Le Douarin, N.M. (1988). On the origin of pancreatic endocrine cells. *Cell* **53**: 169-171
- 44.- Le Douarin, N.M. y Teillet, M.A. (1973). The migration of neural crest to the wall of the digestive tract in avian embryo. *J. Embr. Exp. Morph.* **30**: 31-36.
- 45.- Le Tourneau, P.C. (1978). Chemotactic response of nerve fiber elongation to nerve growth factor. *Dev. Biol.* **66**: 183-196.
- 46.- Le Tourneau, P.C. (1983). Differences in the organization of actin in the growth cones compared with the neurites of cultured neurons from chick embryos. *J. Cell. Biol.* **97**: 963-973.
- 47.- Levi-Montalcini, R. (1987). The nerve growth factor: Thirty-five years later. *EMBO J.* **6**: 1145-1154.
- 48.- Levi-Montalcini, R., Hamburger, V. (1953). A diffusible agent of mouse sarcoma, producing hyperplasia of sympathetic ganglia and hyperneurotization of viscera in the chick embryo. *J. Expo. Zool.* **123**: 233-287.
- 49.- Levi-Montalcini, R. y Booker, B. (1960). Destruction of the sympathetic ganglia in mammals by an antiserum to the nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **42**: 384-391.
- 50.- Levi-Montalcini, R., y Calissano, P. (1986). Nerve growth factor as a paradigm for other polypeptide growth factors. *Trends Neurosci.* **9**: 473-476.
- 51.- Lillien, L.E. y Claude, P. (1985). Nerve growth factor is a mitogen for cultured chromaffin cells. *Nature* **317**: 632-634.
- 52.- Malaisse, W.J., Malaisse-Lagae, F., Walker, M.M., Lacy, P.E. (1971). The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. V. The participation of a microtubular-microfilamentous system. *Diabetes* **20**: 257-265.
- 53.- Martin-Zanca, D., Hughes, S.H., Barbacid, M. (1986). A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences. *Nature* **319**: 743-748.
- 54.- Martin-Zanca, D., Barbacid, M., Parada, L.F. (1990). Expression of the *trk* proto-oncogene is restricted to the sensory cranial and spinal ganglia of neural crest origin in mouse development. *Genes Dev.* **4**: 683-694.
- 55.- Meda, P., Deneff, J.-F., Perrelet, A., Orci, L. (1980). Nonrandom distribution of gap junctions between pancreatic β -cells. *Am. J. Physiol.* **238**: C114-C119.

- 56.- Meakin, S.O. y Shooter, E.M. (1992). The nerve growth factor family of receptors. *TINS* 15(9): 323-331.
- 57.- Mitchison, T. y Kirschner, M. (1988). Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron* 1: 761-772.
- 58.- Moore, K.L. (1975) The Developing Human. Capítulo 12; W.B. Saunders; NY, USA; primera edición; pp. 241-254.
- 59.- Nerson, P., Christian, C., Nirenberg, M. (1976). Synapse formation between clonal neuroblastoma X glioma hybrid cells and striated muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 73: 123-127.
- 60.- Okada, Y., Taniguchi, H., Shimada, C. (1976). High concentration of GABA and high glutamate decarboxylase activity in rat pancreatic islets and human insulinoma. *Science* 194: 620-622.
- 61.- Orci, L. y Unger, R.H. (1975) Functional subdivision of islets of Langerhans and the possible role of D-cells. *Lancet* 2: 1243-1244.
- 62.- Orci, L., Malaisse-Lagac, F., Ravazolla, M., Rouiller, D., Renold, A.E., Perrelet, A., Unger, R. (1975). A morphological basis for intercellular communication between α - and β -cells in the endocrine pancreas. *J. Clin. Invest.* 56: 1066-1070.
- 63.- Pearse, A.G.E. (1966). Common cytochemical properties of cells producing polypeptide hormone, with particular reference to calcitonin and the thyroid cells. *Vet. Rec.* 79: 587-590.
- 64.- Pearse, A.G.E. (1976). Peptides in brain and intestine. *Nature* 262: 92-94.
- 65.- Pictet, R. y Rutter, W.J. (1972). Development of the embryonic endocrine pancreas. En Handbook of Physiology, Sec. 7, vol. I; D.F. Steiner y M.Frenkel, eds. (Washington, D.C.; American Physiology Society), pp. 25-66.
- 66.- Pictet, R., Clark, W.R., Williams, R.H., Rutter, W.J. (1972). An ultrastructural analysis of the developing embryonic pancreas. *Develop. Biol.* 29: 436-467.
- 67.- Pictet, R., Rall, L.B., Phelps, P., Rutter, W.J. (1976). The neural crest and origin of the insulin-producing and other gastrointestinal hormone-producing cells. *Science* 191: 191-193.
- 68.- Pipeleers, D. (1984). Islet cell interactions with pancreatic B-cells. *Experientia* 40: 114-1126.
- 69.- Pipeleers, D., Pipeleers-Marichal, M., Kipnis, D. (1976). Regulation of tubulin synthesis in islets of Langerhans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 3188-3191.
- 70.- Polak, M., Scharfmann, R., Seilheimer, B., Eisenbarth, G., Dressler, D., Verma, I., Potter, H. (1993). Nerve growth factor induces neuron-like differentiation of an insulin-secreting pancreatic β -cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90: 5781-5785.
- 71.- Polak, J.M., Bloom, S.R., Marangos, P.J. (1984) En Evolution and Tumor Pathology of the Neuroendocrine System, S. Falkner, R.Hakanson y F. Sundler, eds (Amsterdam:Elsevier), pp. 433-542.
- 72.- Ramon y Cajal, S. (1909). Histologie du système nerveux de l'homme et des vertebres. Vols. I y II; Maloine; Paris; primera edición.
- 73.- Reetz, A., Solimena, M., Matteoli, M., Folli, F., Takei, K., De Camilli, P. (1991). GABA and pancreatic β -cells: colocalization of glutamic acid decarboxylase (GAD) and GABA which synaptic-like microvesicles suggests their role in GABA storage and secretion. *EMBO J.* 10: 1275-1284.
- 74.- Rosenbaum, T. (1994). Análisis del efecto del factor de crecimiento neural (NGF) sobre las corrientes iónicas de células β pancreáticas de rata. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias. UNAM.

- 75.- Sánchez, C. (1994). Análisis de la secreción de insulina por células β pancreáticas aisladas en cultivo tratadas con NGF y AMPc. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM.
- 76.- Server, A. y Shooter, E. (1977). Nerve growth factor. *Adv. Protein Chem.* 31: 339-343.
- 77.- Schubert, D., Heinemann, S., Kidokoro, Y. (1977). Cholinergic metabolism and synapse formation by a rat nerve cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 2579-2583.
- 78.- Schubert, D y Whillock, C. (1977). Alterations of cellular adhesion by nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 4491-4495.
- 79.- Scott, J., Selby, M., Urdea, M., Quiroga, M., Bell, G., Rutter, W.J. (1983). Isolation and nucleotide sequence of a cDNA encoding the precursor of mouse nerve growth factor. *Nature* 302: 538-540.
- 80.- Teitelman, G. (1990). Insulin cells of pancreas extend neurites but do not arise from the neuroectoderm. *Dev. Biol.* 142: 368-379.
- 81.- Teitelman, G. y Lee, J.K. (1987). Cell lineage analysis of pancreatic islet cell development: glucagon and insulin cells arise from catecholaminergic precursors present in the pancreatic duct. *Dev. Biol.* 121: 454-466.
- 82.- Teitelman, G. y Evinger, M.J. (1988). Expression of neural antigens by pancreatic islet cells: Developmental implications. En Current communications in molecular biology: The pancreatic β cell: Development, cell and molecular biology and immunology; Cold Spring Harbor, NY; USA; primera edición; pp.37-42.
- 83.- Teitelman, G., Joh, T.H., Reis, D.J. (1981). Transformation of catecholaminergic precursors into glucagon (A) cells in mouse embryonic pancreas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78: 5225-5229.
- 84.- Teitelman, G., Lee, J.K., Alpert, S. (1987). Expression of cell type-specific markers during pancreatic development in the mouse: Implications for pancreatic cell lineages. *Cell Tissue Res.* 250: 435-439.
- 85.- Tilney, L.G. e Inanoue, S. (1982). Interactions between actin and membranes gives spacial organization to cells. *Mod. Cell. Biol.* 2: 163-199.
- 86.- Tischler, A.S., Perlman, R.L., Nunnemacher, G., Morse, G.M., DeLellis, R.A., Wolfe, H.J., Sheard, B.E. (1982). Long-term effects of the dexamethasone and nerve growth factor on adrenal medulary cells cultured from young adult rats. *Cell Tissue Res.* 225: 525-542.
- 87.- Unsicker, K., Kirsch, B., Otten, U., Thoenen, H. (1978). Nerve growth factor-induced fiber outgrowth from isolated rat adrenal chromaffin cells: Impairment by glucocorticoids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75: 3498-3502.
- 88.- Varon, S., Nomura, J., Shooter, E.M. (1967). The isolation of the mouse nerve growth factor protein in a high molecular weight form. *Biochemistry* 6: 2202-2209.
- 89.- Wang, Y-L. (1985). Exchange of actin subunits at the leading edge of living fibroblasts: Possible role of treadmilling. *J. Cell. Biol.* 101: 597-602.
- 90.- Weidenmann, B., Franke, W.W., Kuhn, C., Moll, R., Gould, V.E. (1986). Synaptophysin: A marker protein for neuroendocrine cells and neoplasms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 3500-3504.
- 91.- Yamada, K.M., Spooner, B.S., Wessells, N.K. (1971). Localization of actin and myosin for the study of ameoid movement in Dictyostelium using improved immunofluorescence. *J. Cell. Biol.* 99: 894-899.
- 92.- Yan, H., Schlessinger, J., Chao, M. (1991). Chimeric receptors suggest transductional interactions for p75LNGFR. *Science* 252: 561-562.
- 93.- Yúrina, N.A. (1985). Sistema Digestivo. En Histología; Eliséiev, V.G., Afanasiev, Y.U., Yúrina, N.A. Eds.; MIR; Moscú; URSS; primera edición; pp.414-498.