

163
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ANALISIS DEL EFECTO DEL FACTOR DE
CRECIMIENTO NEURAL (NGF) SOBRE LAS
CORRIENTES IONICAS DE CELULAS BETA
PANCREATICAS DE RATA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :

TAMARA LUTI ROSENBAUM EMIR



MEXICO, D. F.,

1994



FACULTAD DE CIENCIAS
SECRETARIA GENERAL

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

"WHERE THE WORLD CEASES TO BE THE SCENE OF OUR PERSONAL HOPES
AND WISHES, WHERE WE FACE IT AS FREE BEINGS, ADMIRING, ASKING AND
OBSERVING, THERE WE ENTER THE REALM OF ART AND SCIENCE"

A. EINSTEIN

A MIS PADRES,

**MARCOS ROSENBAUM PITLUCK Y MERYEM ROSENBAUM EMIR
POR SU EJEMPLO DE SOBREVIVENCIA, FORTALEZA Y EXCELENCIA.**

**GRACIAS POR SU PACIENCIA, ALIENTO Y CARÍO,
Y POR ENSEÑARME LAS REGLAS EN LA VIDA Y EN LA ACADEMIA.**

¡POR FIN COMIENZO A CAMINAR SOLA!

**A MI HERMANO, MUSTAFA EMIR-BAYER: POR SER SIEMPRE UN
EJEMPLO QUE SEGUIR, A PESAR DE SUS BROMAS E INTERMINABLES
PERSECUCIONES QUE ME ATORMENTARON HASTA QUE FUI CAPAZ DE
DEFENDERME.**

**A MI ABUELA, LEYLA EMIR:
POR SU CARÍÑO.**

**A ROMAN: POR TODO SU APOYO, PACIENCIA E INTERES EN MIS
METAS. POR ENSEÑARME A CONFIAR EN LO QUE SE Y POR TODA
LA AYUDA PRESTADA PARA LA REALIZACION DE ESTA TESIS.**

A MIS COMPAÑEROS:

**A DANIEL: POR UNA CARRERA COMPARTIDA. POR LA AYUDA
PRESTADA EN LOS EXPERIMENTOS.**

**A CARMEN: POR SER UNA EXCELENTE MAESTRA Y POR SER UNA
AMIGA INCONDICIONAL.**

**A ELEAZAR: POR TANTOS MOMENTOS FELICES EN LA
CARRERA.**

A ALCCLONSO: POR SU INTERES Y CURIOSIDAD EN MI TRABAJO.

**A LOS DOCTORES ANTONIO PEÑA Y PABLO RUDOMIN POR ALENTARME A
TERMINAR CON ESTA PARTE DE MI CARRERA.**

**A MIS AMIGOS: Fabiola, Alejandro y Mónica. Por su aliento
y su confianza en mí.**

Agradezco a mis sinodales: M. en C. Silvia Devars, Dr. María Luisa Fanjul, Dr. Marcia Hiriart, Dr. Jesús Manuel León Cázares y Dr. María Eugenia Mendoza por su valiosa contribución y crítica a mi trabajo.

Este trabajo fue realizado bajo la dirección de la Dra. Marcia Hiriart Urdanivia y apoyado por la D.G.P.A de la UNAM, mediante una beca para su autor.

INDICE

RESUMEN	1
D) INTRODUCCION	3
A) EL PANCREAS Y SU ESTRUCTURA.	3
A.1) Tipos celulares de los islotes pancreáticos.	3
A.2) Heterogeneidad funcional.	6
B) LA INSULINA Y SU ESTRUCTURA.	6
B.1) Síntesis de insulina.	6
C) ACTIVIDAD ELECTRICA Y SECRECIÓN DE INSULINA.	9
C.1) Propiedades generales de los canales iónicos.	9
C.2) Canales iónicos de las células β .	12
C.3) Canales de Ca^{2+} .	13
C.4) Canales de Na^+ .	15
C.5) Canales de K^+ .	16
D) EL DESCUBRIMIENTO DEL FACTOR DE CRECIMIENTO NEURAL.	18
E) ESTRUCTURA DEL NGF.	20
F) EL RECEPTOR AL NGF.	22
G) FUNCION DEL NGF SOBRE SUS CELULAS BLANCO.	24
H) ORIGEN DE LAS CELULAS β .	25
II) HIPOTESIS	30
III) OBJETIVOS ESPECIFICOS	31
IV) MATERIALES Y METODOS	32
A) OBTENCION DE CELULAS β PANCREATICAS DE RATA.	33
A.1) Disección de los páncreas de rata.	33
A.2) Gradiente con Ficoll.	33
A.3) Dispersión de las células del islote pancreático.	34
A.4) Cultivo de las células del islote.	34
B) IDENTIFICACION DE LAS CELULAS β POR MEDIO DEL RIIPA.	34
B.1) Conjugación de eritrocitos de borrego (RBC) con la proteína A.	35

B.2) Preparación de cámaras de Cunningham.	35
B.3) Ensayo hemolítico inverso (RHPA).	35
C) EXPERIMENTOS ELECTROFISIOLÓGICOS.	36
C.1) Soluciones de registro.	36
C.2) Registro de corrientes de Na ⁺ y Ca ²⁺ por medio de la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana (patch clamp).	37
D) ANALISIS DE RESULTADOS.	39
V) RESULTADOS	41
A) EFECTO DEL NGF SOBRE LA CORRIENTE MACROSCOPICA DE Na ⁺ DE CELULAS B PANCREATICAS AISLADAS EN CULTIVO.	41
B) CAMBIOS INDUCIDOS POR EL NGF SOBRE LA CONDUCTANCIA Y LAS CINÉTICAS DE ACTIVACION E INACTIVACION DE LA CORRIENTE DE Na ⁺ .	43
C) EFECTO DEL NGF SOBRE LAS CORRIENTES MACROSCOPICAS DE Ca ²⁺ DE CELULAS B AISLADAS EN CULTIVO.	44
D) CORRELACION ENTRE LA MAGNITUD DE LA CORRIENTE DE Na ⁺ DE LAS CELULAS B PANCREATICAS Y LA SECRECION DE INSULINA.	45
VI) DISCUSION Y CONCLUSIONES	57
VII) GLOSARIO	63
VIII) REFERENCIAS	66

RESUMEN

Las células β pancreáticas exhiben varias características de tipo neuronal entre las cuales se incluyen su actividad eléctrica y la capacidad de extender neuritas cuando son cultivadas *in vitro*. Los estudios realizados previamente en el laboratorio indican que el factor de crecimiento neural (NGF) promueve que las células β desarrollen procesos de tipo neurítico, por lo cual fue interesante investigar si estos cambios morfológicos se encuentran acompañados por cambios fisiológicos en las corrientes iónicas de estas células.

En este trabajo, se estudió el efecto del NGF sobre las corrientes iónicas de las células β pancreáticas de rata, utilizando la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana (patch clamp). Se demostró que el NGF induce cambios en la corriente de Na^+ ya que la densidad de canales de Na^+ sensibles a tetrodotoxina (TTX) aumenta en un 30.65% con respecto al control. La cinética de activación de la corriente iónica no se modifica en las células tratadas. En cambio, la cinética de inactivación en estado estacionario de la corriente de Na^+ de las células expuestas al factor trófico, exhibe cambios con respecto a las células testigo. Se observa, que la curva de inactivación para la corriente de Na^+ , se desplaza aproximadamente 9 mV con respecto a la curva de las células testigo, lo cual es un indicativo de que las células tratadas con el factor de crecimiento poseen más canales listos para ser activados por un estímulo eléctrico.

Las células β exhiben una extraordinaria plasticidad para responder ante los diferentes estímulos a los que son expuestas, ya que son capaces de extender procesos de tipo neurítico en presencia del NGF así como de presentar cambios en las propiedades eléctricas de sus canales iónicos lo cual abre nuevas perspectivas en el campo del estudio de la fisiología de las células β .

ABREVIATURAS UTILIZADAS: ACh, Acetilcolina; AADC, L-aminoácidos aromáticos; ADP, Difosfato de adenosina; AMPc, Monofosfato de adenosina cíclico 3'-5'; APUD, Vía de captura y descarboxilación de precursores de aminas fluorogénicas; ATP, Trifosfato de adenosina; BIP, Proteína de unión a cadenas pesadas; BSA, Albúmina sérica bovina; CA, catecolamina; CGS, Colagenasa; D600 α -[isopropil- α -[N-metil-N-homoveratil)- α -aminopropil]-

3,4,5-trimetoxifenilacetónitrilo; **DHP**, Dihidropiridina; **FD**, Desactivación rápida; **GABA**, Acido gamma aminobutírico; **GAD**, Descarboxilasa del ácido glutámico; **GTP**, Trifosfato de guanosina; **HBSS**, Insulinoma de Hanster; **IF**, Inmunofluorescencia; **IFP**, Proteínas de filamentos intermedios; **INa⁺**, Corriente de sodio; **KDEL**, Lys-Asp-Glu-Leu; **L-DOPA**, L-3,4-dihidroxifeniletilamina; **MΩ**, Megaohmios; **ms**, milisegundos; **mV**, milivoltios; **NF-L**, Neurofilamento de bajo peso molecular; **NFP**, Proteínas de neurofilamentos; **NGF**, Factor de crecimiento neural; **NSE**, enolasa neuronal específica; **ODC**, Descarboxilasa de ornitina; **pA**, Picoamperios; **PDI**, Proteína disulfuro isomerasa; **PEF**, Anfotericina B; **pF**, Picofaradios; **PKA**, Proteína cinasa A; **PKC**, Proteína cinasa C; **RBC**, Eritrocitos de borrego; **RE**, Retículo endoplásmico; **RHPA**, Ensayo hemolítico inverso; **RINmSF**, Insulinoma de rata; **S**, Coeficiente de sedimentación; **SBF**, Suero bovino fetal; **SD**, Desactivación lenta; **STX**, Saxitoxina; **TH**, Tirosina hidroxilasa; **TTX**, Tetrodotoxina; **VIP**, Polipéptido intestinal vasoactivo.

"It's not what you do that matters, it's that you do well in whatever you do that really counts."

M. y M. Rosenbaum.

I) INTRODUCCION

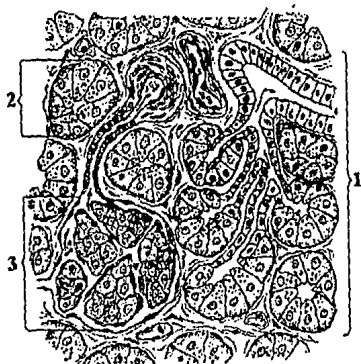
A) EL PANCREAS Y SU ESTRUCTURA.

A.1) Tipos celulares de los islotes pancreáticos.

El páncreas es una glándula mixta que incluye las partes exocrina y endocrina. En la parte exocrina se elabora el jugo pancreático, rico en enzimas- tripsina, lipasa, amilasa, etc.- que pasa por los conductos excretores al duodeno, donde sus enzimas participan en la desintegración de las proteínas, las grasas y los hidratos de carbono hasta obtener los productos finales. En la parte endocrina se sintetizan varias hormonas: insulina, glucagon, somatostatina, VIP y polipéptido pancreático, que participan en la regulación del metabolismo tisular de los hidratos de carbono, de las proteínas y la grasa ^{20,60}.

La superficie del páncreas está cubierta con una cápsula conjuntiva fina que se fusiona con la hoja visceral del peritoneo. Su parénquima está dividido en lobulillos, entre los cuales pasan cordones conjuntivos. En los mismos están alojados vasos sanguíneos, nervios, corpúsculos lamíneos (de Vater-Pacini) y conductos excretorios. La parte exocrina de la glándula en los lobulillos está representada por los acinos y los conductos excretorios intralobulares, así como por los conductos excretorios interlobulillares y el conducto pancreático que se abre al duodeno (figura 1) ²⁰. Los islotes pancreáticos se encuentran distribuidos en todo el órgano con una mayor densidad en la región caudal ³¹. En la rata adulta, el tamaño de los islotes varía entre 50 y 500 μm ⁴⁵.

A



B

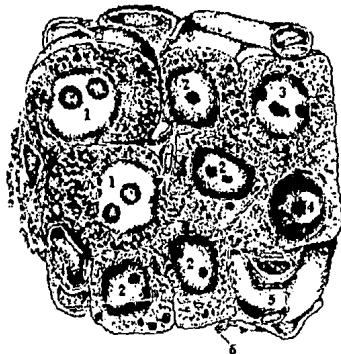


Figura 1) ESTRUCTURA DEL TEJIDO PANCREÁTICO. (A) Esquema de la histología del páncreas: 1- Lóbulo pancreático; 2- Alvéolo acinar; 3- Islote de Langerhans. (B) Esquema del islote de Langerhans: 1- Células alfa; 2- Células beta; 3- Células delta; 4- Células PP; 5- Capilar sanguíneo; 6- Fibras nerviosas (Modificado de Eliséev *et al.*, 1985).

Existen 4 tipos de células endocrinas en el islote pancreático: A, B, D y F. Las 3 primeras también reciben los nombres de α , β y δ respectivamente. Las células α secretan glucagón, las β secretan insulina, las δ secretan somatostatina, y las F secretan polipéptido pancreático. Las células β que son las más abundantes comprenden entre el 60 y 75% de las células del islote y se localizan principalmente en el centro del mismo. Tienden a estar rodeadas por células α , que comprenden aproximadamente el 20% del total y por las células δ que son las menos comunes ³¹.

Las hormonas secretadas por cada tipo celular pasan al lumen del capilar fenestrado (figura 2).

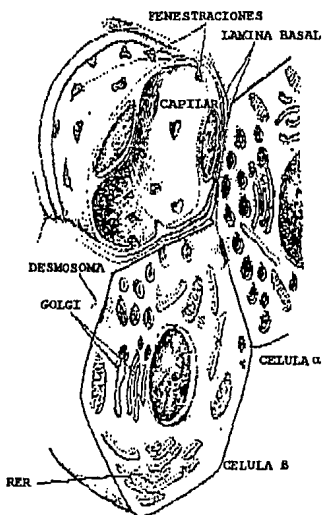


Figura 2) CELULAS α Y β DEL PANCREAS. Relación de las células con los vasos sanguíneos. La insulina y el glucagón son secretados por exocitosis y atraviesan la lámina basal de la célula y la lámina basal del capilar antes de entrar en el lumen del capilar fenestrado (Modificada de Junqueira *et al*, 1989).

A.2) Heterogeneidad funcional.

Varios experimentos han demostrado que existe una heterogeneidad funcional entre las células β , ya que la respuesta de las células individuales ante concentraciones estimuladoras de glucosa varían ampliamente. Se ha sugerido la existencia de diferentes subpoblaciones de células β que podrían ser clasificadas de acuerdo a la cantidad de insulina secretada en un tiempo dado. En 1991, Hiriart y Ramírez-Medelez demostraron que existen tres subpoblaciones secretoras de células β , las cuales se identificaron con la técnica de ensayo hemolítico inverso (RHPA) que se describe posteriormente.

B) LA INSULINA Y SU ESTRUCTURA.

La estructura de la insulina se encuentra bien conservada a través de la evolución de los vertebrados. La hormona consiste en una cadena A (con 21 aminoácidos) y una cadena B (con 30 aminoácidos) conectadas por dos puentes disulfuro intercatenarios (A7-B7 y A20-B19), con una unión intracatenaria entre A6 y A11. Algunas de las características conservadas incluyen las posiciones de los tres puentes disulfuro, las regiones terminales N y C de la cadena A y los residuos hidrofóbicos en la región terminal C de la cadena B ⁷⁰.

B.1) Síntesis de insulina.

La insulina es sintetizada inicialmente como un precursor de una sola cadena, la preproinsulina. El gen para la insulina humana se localiza en el brazo corto del cromosoma 11. El gen se transcribe

en un ARN primario. El procesamiento postranscripcional incluye la escisión de intrones y la poliadenilación del extremo 3' para producir el ARN mensajero para la preproinsulina ¹¹.

La preproinsulina se encuentra conformada por un péptido señal que se encuentra en el amino terminal formada por una secuencia de 24 aminoácidos y seguida por la cadena B de insulina, una secuencia Arg-Arg, el péptido conectante C de 31 aminoácidos, una secuencia Lys-Arg y la cadena de insulina A ¹¹.

La secuencia señal de la preproinsulina es removida por la peptidasa de la señal y degradada en el lumen del retículo endoplásmico (RE) para formar la proinsulina, ya sea mientras o poco después de la translocación ⁴⁸. La cadena se dobla para dar lugar a su configuración estable, formando los 3 puentes disulfuro de la insulina. Se piensa que este proceso se encuentra catalizado por 2 proteínas del RE: proteína de unión a cadenas pesadas (BiP) que se une a proteínas recién sintetizadas y completamente dobladas impidiendo que se agreguen ⁵⁵ y la proteína disulfuro isomerasa (PDI) que cataliza la isomerización de puentes disulfuro de proteínas ²³. Debido a que la proinsulina carece de la secuencia KDEL en el C-terminal es capaz de viajar al complejo de Golgi en donde se forman los gránulos de secreción en la sistema trans como se ilustra en la figura 3.

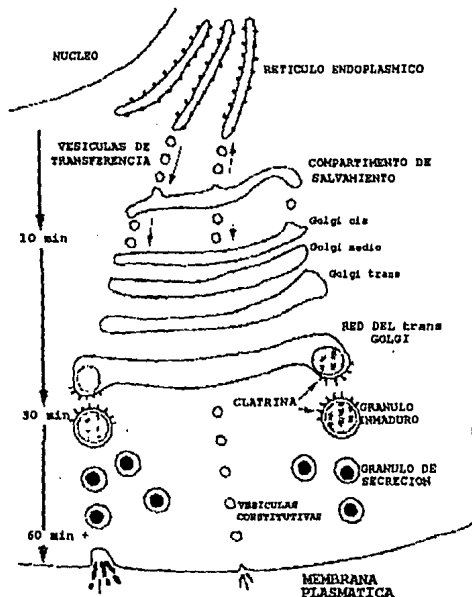


Figura 3) VIA DE SECRECION EN LA CELULA β PANCREATICA. En esta figura se muestran los eventos intracelulares necesarios para la formación de los gránulos de secreción de insulina. (Modificada de Ashcroft y Ashcroft, 1992).

La proinsulina es convertida en insulina por actividad de endopeptidasas. No se conoce bien como ocurre esto pero se ha propuesto que existen dos tipos de actividades de endopeptidasas en los gránulos de secreción. Las enzimas designadas como tipo 1 y tipo 2 poseen distinta especificidad a substratos: la endopeptidasa tipo 1 sólo corta a la proinsulina en el extremo C-terminal de la Arg31 y

Arg32, mientras que la endopeptidasa tipo 2 corta predominantemente en el lado carboxilo de la Lys64 y Arg65 y tiene algo de actividad en el sitio de la Arg31 y de la Arg32. Finalmente, después de las escisiones, el resultado es insulina (es decir, la cadena A y la cadena B unidas por puentes disulfuro más péptido C libre dentro de los gránulos de insulina) ¹⁸.

C) ACTIVIDAD ELECTRICA Y SECRECION DE INSULINA.

C.1) Propiedades generales de los canales iónicos.

Hay evidencias considerables de que la actividad eléctrica de la célula β juega un papel muy importante en el acoplamiento estímulo-secreción. Algunas de estas evidencias se han obtenido del registro del potencial de membrana de células β en islotes de Langerhans ³⁴. Tales estudios han demostrado que cuando la concentración de glucosa es subestimuladora, las células están polarizadas con un potencial de membrana de -70 mV aproximadamente. El metabolismo de la glucosa, que entra a la célula β por difusión facilitada, provoca un cambio en la relación ATP/ADP y, por lo tanto, una despolarización lenta de la membrana de la célula β debido al cierre de los canales de K^+ dependientes de ATP. A concentraciones estimuladoras de glucosa (>7 mM), la despolarización es suficiente para llevar a la membrana a un potencial umbral donde hay una despolarización rápida hasta un nivel de meseta en el que se superponen trenes de potenciales de acción, después de lo cual la célula se repolariza, continuando con una actividad eléctrica oscilatoria mientras el nivel extracelular de glucosa sea alto. La actividad eléctrica es el resultado de la actividad de diversos canales iónicos presentes en la membrana celular de las células β ⁴. La glucosa, incrementa la actividad eléctrica aumentando la activación de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje que resulta en un aumento del Ca^{2+}

intracelular y en la exocitosis de insulina ³⁷.

Los canales iónicos son glucoproteínas, con un peso molecular de entre 25,000 y 250,000, que tienen un poro central que atraviesa enteramente la membrana plasmática. Cada canal consiste de 3 o más subunidades que pueden dividirse en tres dominios distintos: la partícula de compuerta, que controla si el canal está abierto o cerrado, la vía de conductancia, que determina cuántos iones por segundo fluirán a través de la membrana en respuesta a gradientes químicos y eléctricos cuando el canal está abierto y el filtro de selectividad que discrimina cuáles serán los iones que fluyan a través de la membrana ³⁶.

Los iones están hidratados y no pueden atravesar directamente la bicapa lipídica de carácter hidrofóbico; los canales iónicos son una vía muy importante de permeabilidad para su movimiento a través de las membranas celulares.

Los canales iónicos presentan tres propiedades fundamentales ⁶⁷:

1) Conducen iones a través de la membrana plasmática a gran velocidad, de 1 a 10 millones de iones por segundo, provocando flujos de corriente iónica.

2) Los canales iónicos son altamente selectivos para uno o varios tipos de iones. Existe un filtro de selectividad en el poro del canal, se propone que los iones se unen a sitios polares específicos de la proteína. La interacción entre el ion y su sitio de unión es débil, dando como resultado una velocidad alta de conducción.

3) Los canales iónicos constituyen vías dinámicas de permeabilidad, ya que pueden estar al

menos en dos estados, abiertos y cerrados. Todos los canales estudiados son proteínas alostéricas que tienen dos o más estados conformacionales. Cada una de las conformaciones estables del canal representa un estado funcional diferente. A la transición entre los estados cerrado y abierto se le conoce como mecanismo de compuerta o "gating" e incluye necesariamente un cambio conformacional de la proteína.

Algunos tipos de canales iónicos sensibles al voltaje, después de abrirse de manera transitoria durante una despolarización larga, no se cierran sino que entran en un periodo refractario, durante el cual no es posible activarlos, a lo que se llama inactivación del canal. Un canal iónico sensible al voltaje que se inactiva, solamente puede cerrarse después de que el potencial de membrana regresa al nivel de reposo. Se piensa que la inactivación del canal se debe a un cambio conformacional de la proteína controlado por una región distinta a la compuerta que regula su activación ³⁵.

La célula no invierte directamente energía en promover el paso de iones a través de un canal abierto, ya que los iones se mueven a favor de su gradiente electroquímico. El potencial de reposo se origina por la existencia de un gradiente de concentración de iones y de potencial eléctrico a través de la membrana. Supongamos una membrana cuyos canales en reposo son exclusivamente permeables a K^+ . La concentración del K^+ es mucho mayor dentro de la célula, de manera que el movimiento de K^+ a través de los canales será hacia fuera, a favor del gradiente de concentración. Esto ocasiona que exista un exceso de cargas positivas en el exterior y dentro un exceso de cargas negativas. Esta separación de cargas impide que siga saliendo K^+ de la célula, llegando así a un estado de equilibrio, llamado estado estacionario, en el cual las fuerzas impulsoras eléctrica y química son iguales y opuestas entre

si⁴⁴.

Si se abrieran canales de Na^+ el movimiento sería de fuera hacia dentro, debido al gradiente de concentración. La entrada de Na^+ provocaría que la magnitud del voltaje transmembranal disminuyera, es decir la célula se despolarizaría.

C.2) Canales iónicos de las células β .

A la fecha han sido descritos los siguientes tipos de canales en las células β :

-Canales de Potasio:

- a) Sensibles a glucosa y ATP ^{5,17}.
- b) Activados por calcio¹⁷.
- c) Dependientes del voltaje membranal^{5,63}.

-Canales de Sodio^{22,37,56}.

-Canales de Calcio^{63,37,68,65}.

Los diferentes tipos de canales iónicos que han sido identificados en la membrana de las células β se muestran en la figura 4.

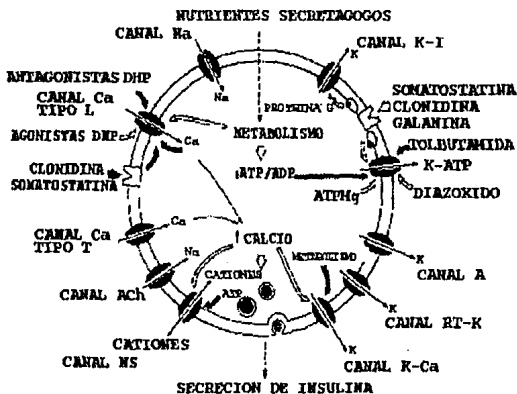


Figura 4) TIPOS DE CANALES iónicos ENCONTRADOS EN LA MEMBRANA DE LAS CELULAS β . Abreviaciones: K-I, canal de K activado por inhibidores de secreción; canal K-ATP, canal de K regulado por ATP; canal A, canal de K transitorio saliente; RT-K, canal de K rectificador tardío; K-Ca, canal activado por Ca; canal NS, canal no selectivo a cationes; canal ACh, canal activado por acetilcolina; proteína G, proteína activada por GTP. Las flechas rellenas representan las vías inhibitorias y las flechas vacías representan las vías activadoras. (Modificada de Ashcroft y Rorsman, 1989).

C.3) Canales de Ca^{2+} .

Se han descrito dos tipos de canales de Ca^{2+} en las células β de rata: tipo L y tipo T³⁷. Ambos canales difieren en sus cinéticas de inactivación y de activación así como en su habilidad para transportar cationes divalentes ya que los canales tipo L o de desactivación rápida (FD) transportan mejor el Ba^{2+} que el Ca^{2+} , mientras que la conductancia de los canales T o de lenta desactivación (SD) es igual para ambos cationes divalentes^{37,68}.

Las corrientes de Ca^{2+} tipo L, o de desactivación rápida, son sensibles a la acción de dihidropiridinas ⁶⁸ y su actividad declina con el tiempo de perfusión intracelular, que se le conoce como "lavado; este fenómeno depende de la fosforilación del canal y puede reducirse utilizando Mg-ATP dentro de la pipeta de registro ³⁷.

Se ha sugerido que los canales de Ca^{2+} tipo L son responsables tanto de la despolarización para el potencial de acción como del potencial de meseta. Lo que implica que la mayor parte del influjo de Ca^{2+} que se requiere para la secreción de insulina es a través de canales de Ca^{2+} tipo L. También es importante notar que las dihidropiridinas, que bloquean específicamente a estos canales, también bloquean la secreción de insulina en células HIT (Hamster insulinoma tumor) sugiriendo que los canales de Ca^{2+} tipo L controlan la meseta y la actividad eléctrica en espigas activada por varios secretagogos de insulina ^{49,43}. Es bien sabido que la glucosa induce potenciales de acción de calcio y que se requiere el influjo de Ca^{2+} para inducir la liberación de insulina. Si se aplican bloqueadores de los canales de Ca^{2+} o se elimina el calcio extracelular, se inhibe tanto la actividad eléctrica como la secreción de insulina.

Los canales tipo T de las células B pancreáticas se desactivan lentamente, se activan a potenciales cercanos a -40 mV, es decir a potenciales más negativos que los canales tipo L que se activan a potenciales cercanos a -20 mV, y se inactivan rápidamente. En 1988, Hiriart y Matteson propusieron que los canales tipo T podrían estar involucrados en la generación de la meseta de despolarización debido a que se activan a potenciales más negativos que los canales tipo L y que los canales tipo L podrían ser responsables de la generación de las espigas superpuestas en la meseta de

despolarización.

Los potenciales de acción de las células β se pueden inducir despolarizando la membrana hasta -40 mV con K^+ o por aplicación de corriente en la ausencia de glucosa y estos potenciales de acción son dependientes del Ca^{2+} en el medio extracelular. Son bloqueados por Mn^{2+} o Co^{2+} o bloqueadores del canal de Ca^{2+} como D-600 o nifedipina ⁴.

C.4) Canales de Na^+ .

Una gran variedad de estudios han demostrado que las células β poseen canales de Na^+ . Esta corriente puede ser identificada por su rápida activación y su rápida inactivación y por su sensibilidad a los bloqueadores de canales de Na^+ como la tetrodotoxina (TTX) y la saxitoxina (STX). Las corrientes de Na^+ se activan a potenciales más positivos que -50 mV con un pico entre 0 y +10 mV y el potencial de inversión positivo a +40 mV ^{37,6}.

En la mayoría de las células excitables, los potenciales de acción ocurren como resultado de un incremento en la conductancia al Na^+ o Ca^{2+} o de ambas. Pero en las células β , el papel del Na^+ no es tan claro. En 1968, Hales y Milner propusieron que el Na^+ externo era un requisito para la respuesta de las células β ante una estimulación con glucosa, ya que si se sustituye el Na^+ por Li^+ , que permea a través del mismo canal, se bloquea la secreción de insulina. Ellos sugirieron que el influjo de Na^+ a la célula β podría estar liberando Ca^{2+} intracelular secuestrado, que a su vez, como Ca^{2+} libre estimularía la liberación de insulina.

Varios experimentos en que se utilizó TTX, han demostrado que estos canales no tienen efecto sobre la actividad eléctrica de las células β ³². Sin embargo, en 1988 Hiriart y Matteson demostraron que las células β de rata poseen canales de Na^+ que se activan rápidamente llegando a un pico y luego se inactivan durante una despolarización mantenida. La corriente transitoria revierte su dirección de entrante a saliente entre +40 y +60 mV. La corriente se activa a -30 mV y llega a un máximo alrededor de +10 mV. Esta corriente transitoria es bloqueada por TTX y su magnitud disminuye cuando se reduce la concentración de Na^+ extracelular, lo cual indica que es acarreada por canales de Na^+ sensibles a voltaje. También se demostró que la TTX tiene un efecto sobre la secreción de insulina en las células β a concentraciones estimulatorias de glucosa (10-20 mM). Esto demuestra que los canales de Na^+ de las células β de rata son importantes en el acoplamiento estímulo-secreción ³⁷.

C.5) Canales de K^+ .

El fenómeno iónico más temprano asociado con la secreción de insulina es una disminución en el flujo de K^+ ya que la glucosa inhibe el flujo de K^+ de los islotes de rata. Se ha propuesto que las oscilaciones en la tasa glucolítica y la relación ATP/ADP en la célula beta, están relacionadas a la actividad de los canales de K^+ sensibles a ATP, que a su vez regulan el potencial de membrana, $[\text{Ca}^{2+}]$, y la liberación de insulina ³³. En la figura 5 se muestra la serie de pasos que llevan a la secreción de insulina.

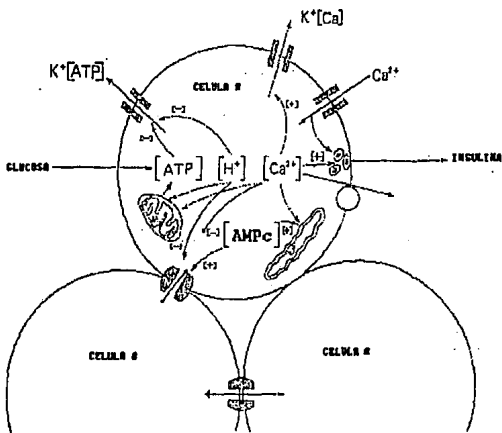


Figura 5) FENOMENOS QUE LLEVAN A LA SECRECIÓN DE INSULINA DE LAS CELULAS B POR LA ENTRADA DE GLUCOSA. El metabolismo de la glucosa provoca un cambio en la relación ATP/ADP dentro de la célula lo cual provoca el cierre de los canales de K^+ sensibles a ATP y, por lo tanto, la despolarización de la membrana permitiendo la entrada de Na^+ y Ca^{2+} . El aumento en el Ca^{2+} citosólico provoca la secreción de insulina. También se esquematizan los mecanismos celulares que existen para amortiguar el aumento en la concentración de Ca^{2+} citosólico. (Modificada de Atwater *et al*, 1989).

Hay dos tipos de canales de K^+ que son afectados por el metabolismo de la glucosa:

- 1) El canal de K^+ sensible a ATP cuya actividad disminuye cuando el metabolismo de la glucosa incrementa la concentración de ATP en la célula.
- 2) El canal de K^+ sensible a Ca^{2+} que es activado en presencia de Ca^{2+} en el citosol y cuando la membrana es despolarizada. El metabolismo de la glucosa incrementa la tasa a la cual el Ca^{2+} es removido de la célula, posiblemente incrementando el AMPc que, por lo tanto, inhibe la actividad del canal de K^+ sensible a Ca^{2+} .

El influjo de Ca^{2+} a través del canal de Ca^{2+} provoca un aumento en la concentración de este ion divalente en la vecindad del canal, lo cual dispara la liberación de gránulos de insulina por exocitosis ¹. Sin embargo, la acumulación de Ca^{2+} en el citosol también lleva a la activación del canal de K^+ sensible a Ca^{2+} que aumenta el influjo de K^+ y repolariza a la membrana, impidiendo una posterior apertura de los canales de Ca^{2+} . Un amortiguamiento rápido del Ca^{2+} por parte del retículo endoplásmico, acentuado por AMPc, mantiene el Ca^{2+} en el citosol lo suficientemente bajo como para conservar la despolarización. Cuando esta respuesta de amortiguamiento se satura, éste es bombeado fuera de la célula ⁹.

D) EL DESCUBRIMIENTO DEL FACTOR DE CRECIMIENTO NEURAL.

En 1948, Elmer Brueker, observó que al transplantar fragmentos del sarcoma 180 de ratón a embriones de pollo de 3 días, las fibras nerviosas que emergían de los ganglios dorsales presentaban acceso al tejido neoplásico mientras que las fibras nerviosas motoras no entraban en el tumor. Con base en estas observaciones se concluyó que las propiedades histoquímicas del sarcoma proporcionaban un campo favorable para el crecimiento de fibras sensoriales.

Posteriormente se descubrió que en los embriones donde se había transplantado este sarcoma, se observaba fibras nerviosas simpáticas que inervaban vísceras que nunca eran inervadas en los embriones normales. También se encontró que estas fibras simpáticas se desarrollaban dentro de las venas del hospedero donde formaban grandes neuronas que obstruían la circulación sanguínea. Con esto surge la hipótesis de que estos efectos anormales podían deberse a la presencia de un agente difusible

producido por las células neoplásicas ⁴⁷.

La existencia de este agente difusible se comprobó al transplantar el sarcoma de ratón a la membrana corioalantoidea de embriones de pollo de 4 a 6 días de tal manera que los tejidos embrionarios y neoplásicos no se encontraban en contacto directo, pero sí por el sistema circulatorio, con lo que se observó el mismo fenómeno descrito anteriormente ⁴⁷.

En experimentos subsecuentes en donde los ganglios sensoriales y simpáticos explantados de embriones de pollo de 8 días en un medio semisólido, cercanos a, pero no en contacto directo con sarcoma 180 o 37 de ratón, produjeron, en 24 horas, una red de fibras nerviosas muy densa en dirección del tumor ⁴⁷.

En 1954, Cohen *et al*, lograron aislar una fracción de nucleoproteína a partir de los dos tumores a la cual se atribuyó la actividad promotora de crecimiento neural *in vitro*. Para comprobar cual de los componentes de esta fracción, es decir, si la fracción proteica o la fracción de ácidos nucleicos tenía actividad biológica, se usó el veneno de serpiente mocsán, que contiene fosfodiesterasa, una enzima que degrada ácidos nucleicos. Se esperaba que la adición de este veneno a la fracción de nucleoproteína tumoral suprimiera la formación de la red o halo fibrilar, y por el contrario, lo que se observó fue que aumentaba la densidad del halo fibrilar, cuando el ganglio era incubado en presencia de la fracción tumoral tratada con el veneno de serpiente. Con esto fue evidente que este veneno era una rica fuente del factor de un promotor de actividad de crecimiento neural, que se describió como una proteína de peso molecular de 20,000 ¹⁵.

Los descubrimientos posteriores demostraron que la adición de extractos de glándula salival submaxilar de ratón, al medio de cultivo, provoca el desarrollo de un halo fibrilar más compacto y más denso. Estos órganos almacenaban al factor de crecimiento neural (NGF). Cohen purificó y aisló esta molécula proteica de peso molecular de 44,000 ¹⁴.

E) ESTRUCTURA DEL NGF.

El NGF aislado a partir de glándulas submaxilares de ratón es un complejo de alto peso molecular que contiene 3 tipos de cadenas polipeptídicas designadas α , β y γ asociadas por fuerzas no covalentes débiles. El complejo posee un peso molecular de aproximadamente 130 kDa y tiene un coeficiente de sedimentación de 7S. El hecho de que, a concentraciones fisiológicamente activas, el complejo 7S se encuentre totalmente dissociado en sus subunidades constitutivas sugiere que no tiene actividad biológica ¹⁰.

La caracterización química y estructural del NGF de ratón y la relación de su estructura con su mecanismo de acción no es clara. Se ha visto que su actividad promotora de crecimiento está asociada con una protefna de peso molecular de 30K con una constante de sedimentación de 2.5 S ⁸. Aunque toda la actividad promotora de crecimiento de este complejo (7S NGF) está asociada con la subunidad 2.5S (β), se ha reportado que puede presentarse actividad biológica recombinando la subunidad β con subunidades α y γ previamente separadas ⁷⁶.

Por medio del análisis de sedimentación y fraccionamiento de péptidos trópticos (obtenidos por la digestión con tripsina) solubles se encontró que el NGF 2.5S posee una estructura dimérica compuesta por 2 subunidades idénticas de peso molecular de 14,500. Posteriormente, se estableció que cada cadena polipeptídica poseía 3 enlaces disulfuro y que las subunidades se encontraban asociadas por fuerzas no covalentes. La secuencia de aminoácidos de la subunidad 2.5S del NGF se muestra en la figura 6².

La subunidad 2.5S del NGF está compuesta por 118 aminoácidos y posee un dominio con alto contenido en lisina, ácido aspártico, alanina, valina y leucina y dos dominios con alto contenido en ácido glutámico y glicina².

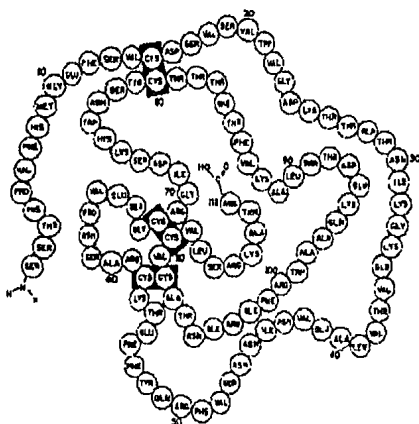


Figura 6) Subunidad 2.5S (II) del NGF, con actividad biológica (Modificada de Angeletti y Bradshaw, 1971).

F) EL RECEPTOR AL NGF.

La habilidad del NGF para ejercer sus acciones tróficas, de diferenciación y mitogénicas sobre sus células blanco está mediada por la unión de alta afinidad a los receptores de la superficie celular. Existen dos clases de receptores para el NGF: los de alta afinidad (con una constante de disociación, $K_d = 10^{-11}$ M) y los de baja afinidad ($K_d = 10^{-9}$ M) ⁵¹. En la figura 7 se muestran los dos receptores distintos donde el receptor de alta afinidad es una proteína de 140 kDa llamada prototrk A (p140^{trkA}) y el receptor de baja afinidad es una proteína de 75 kDa que se denomina p75^{NGFR}. La concentración de NGF necesaria para provocar una respuesta y la detección de una unión del NGF con alta afinidad en células sensibles a NGF indican que la respuesta biológica al NGF depende de las interacciones con el receptor de alta afinidad ³².

El receptor de baja afinidad al NGF (LNGFR o p75^{NGFR}) es una cadena peptídica sencilla de aproximadamente 400 residuos de aminoácidos, con un dominio único que atraviesa la membrana y que separa un dominio extracelular ligeramente más largo de un dominio intracelular más corto ⁵¹. Las regiones ricas en cisteína (anillos) determinan el dominio de unión del NGF ⁷⁹ y cada uno de estos anillos se requiere y ordena de tal manera que forma un sitio correcto de unión de NGF ⁶¹. Es interesante notar que a la región intracelular de este receptor no se le ha comprobado ninguna interacción con los mecanismos de transducción de señales conocidos ³²; sin embargo, se piensa que sí existe alguna relación con la transducción de señales ya que cuando el NGF se une a esta proteína, el complejo que se forma (NGF-p75^{NGFR}) es internalizado por endocitosis ¹⁹.

Se ha demostrado que el NGF se une al proto-oncogén *trk* en células PC12⁴². El producto del proto-oncogén *trk* es una glucoproteína transmembranal que se expresa selectivamente en el sistema nervioso en desarrollo. La identificación de *trk* (p140^{trk}) como un receptor al NGF en las células PC12, sugiere que puede participar en una unión de NGF de alta afinidad. Este receptor de alta afinidad pertenece a la familia de las cinasas de proteínas que fosforilan sus sustratos en residuos de tirosina (quinasas de tirosina; ⁴². Además, es interesante notar que la coexpresión de p140^{trk} y p75^{NGFR} se requieren para la formación de sitios de unión al NGF de alta afinidad. Kaplan *et al* (1991) reportan que es probable que el sitio de unión para NGF de alta afinidad esté compuesto de, por lo menos, 2 componentes de unión de NGF: el producto del gen *trk* y p75^{NGFR} que unen al NGF con una Kd de alta afinidad³².

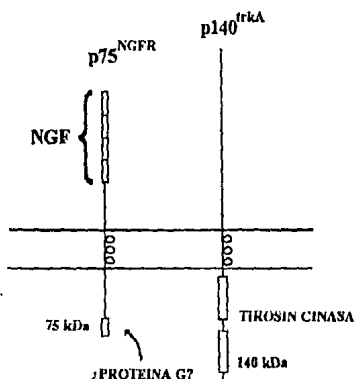


Figura 7) RECEPTORES MEMBRANALES A NGF. Las diferencias básicas entre los dos receptores a NGF se esquematizan en esta figura, al igual que los mecanismos de transducción de señales con los que interactúan. (Modificada de Meakin y Shooter, 1992).

G) FUNCION DEL NGF SOBRE SUS CELULAS BLANCO.

Las funciones biológicas más importantes del NGF incluyen: su acción neurotrófica tanto *in vitro* como *in vivo*, su habilidad para modular el programa de diferenciación de las células neuronales precursoras y su contribución al mantenimiento del fenotipo diferenciado adquirido ¹³.

El NGF es un factor neurotrófico requerido para la sobrevivencia y crecimiento de neuritas de las neuronas colinérgicas del cerebro frontal, neuronas postganglionares simpáticas y células ganglionares sensoriales derivadas a partir de la cresta neural. El NGF es producido por células en blancos periféricos de axones simpáticos y sensoriales así como por células de Schwann y los macrófagos en nervios periféricos en desarrollo. Los niveles más altos de NGF en el cerebro de los mamíferos ocurren en regiones de la formación hipocámpal y la corteza cerebral ⁷⁵.

Las células cromafines y la línea celular PC12 se han convertido en los modelos elegidos para estudiar la capacidad del NGF para modular la expresión fenotípica y los mecanismos moleculares adyacentes a este proceso.

Cuando las células PC12 son cultivadas en presencia del NGF, se diferencian dando lugar a neuronas de tipo simpático. Dejan de dividirse, se desarrollan neuritas y se vuelven eléctricamente excitables ^{28,64}.

Greene y Tischler (1982) demostraron que el NGF es capaz de inducir síntesis de proteínas

citoplásmicas y nucleares como ODC, tubulina y proteínas de neurofilamentos que juegan un papel importante en la extensión de neuritas.

Varios estudios realizados en células PC12 indican que el NGF también tiene un efecto sobre la expresión de los canales de Na^+ . Pollock *et al* (1990), demostraron que al cultivar estas células con NGF durante 10 días, la corriente de Na^+ sensible a TTX aumenta considerablemente ya que la mayoría de las células no tratadas con NGF carecen de corriente de Na^+ . El efecto del NGF en este caso es el de promover una diferenciación desde un tipo adrenal hacia un tipo neuronal con actividad eléctrica acentuada.

II) ORIGEN DE LAS CELULAS β .

La cresta neural es una estructura embrionaria temporal que aparece junto con los pliegues neurales que se cierran para formar el tubo neural. Poco después de que se forma la cresta neural, las células migran a diferentes partes del embrión para dar lugar a una gran variedad de células diferenciadas.

El origen embriológico de las células β ha sido un tema de gran controversia, porque se ha propuesto tanto un origen endodérmico como uno neuroectodérmico para el islote pancreático. La posibilidad de que las células β se originen a partir del endodermo (teoría clásica) se basa principalmente en estudios anatómicos durante la ontogenia del páncreas. Por otro lado, la posibilidad de que las células β se originen del neuroectodermo, y que sean parte del sistema APUD (amine

precursor uptake and decarboxilation), se basa en las características citoquímicas y ultraestructurales de las células secretoras de polipéptidos.

A continuación se enumeran las características que comparten las células β con las células del sistema APUD:

-Capacidad para extender neuritas ⁷¹.

-Antígenos neuronales encontrados en las células β :

Enzimas de biosíntesis de catecolaminas ^{73,72}.

Sinaptofisinas, periferina, NF-L, enolasa neuronal específica ^{78,21}.

Un alto contenido de GABA y GAD ⁶².

-Actividad eléctrica de las células β ^{37,19,6}.

Escurat *et al* (1991) demostraron la presencia de NFPs (proteínas de neurofilamentos) como la NF-L (low molecular neurofilament NFP) y de periferina en una línea celular de insulinoma de rata (RINm5F). Estas dos proteínas de filamentos intermedios (IFPs), específicas de neuronas son expresadas en primordios de los páncreas pero no en páncreas adultos. Aunque todo el sistema nervioso es de origen ectodérmico, se piensa que tanto el sistema nervioso central como el periférico se originan del neuroectodermo y que algunas células sensoriales así como sus células gliales acompañantes se originan a partir de placas que son engrosamientos del ectodermo cefálico. Es bien sabido que la periferina se expresa sólo en poblaciones neuronales bien definidas y que es un elemento IFP representativo de las células simpáticas y de las células PC12 que adquieren varias propiedades de

neuronas simpáticas en respuesta al NGF²⁷. Por lo tanto, el hecho de que las células β expresen periferina es una evidencia que apunta hacia un origen ectodérmico de las células del islote pancreático.

El hecho de que la periferina se encuentre en primordios de páncreas y no en páncreas de animales adultos, se explica tomando en cuenta que las células del islote pancreático migran, llegan a su destino final y expresan proteínas neuronales en respuesta a las señales del medio ambiente que sería similar al que rodea a las células del sistema simpático. Posteriormente, el medio ambiente cambia coincidiendo con la diferenciación de los órganos y consecuentemente con el futuro de las células endocrinas; la expresión de los marcadores neuronales se podría reprimir y las células madurarían dando lugar a células endocrinas funcionales²¹.

Teitelman *et al* (1981) demostraron que las células del islote pancreático también contienen dos enzimas de la vía biosintética de las catecolaminas (CA): la tirosina hidoxilasa (TH), que cataliza la conversión de la tirosina en L-DOPA y también la descarboxilasa de los L-aminoácidos aromáticos (AADC), que convierte los precursores de L-DOPA y 5-hidroxitriptofano en dopamina y serotonina, respectivamente.

Sin embargo, también es importante mencionar las evidencias en contra de un posible origen neuroectodérmico de las células β . Teitelman (1990) reporta que al remover el ectodermo del tejido embrionario del ratón, antes de que se inicie la migración de las células de la cresta neural, se observan rudimentos embrionarios con células inmunopositivas a glucagon, TH y NSE. Teitelman propone que

es posible que estas células correspondan a células de islotes inmaduros encontrados en el páncreas tanto *in vitro* como *in vivo* caracterizadas por la presencia de marcadores neuronales y por la presencia de, por lo menos, una hormona pancreática. La presencia de células endocrinas en los explantes demostraría que éstas no se derivan a partir de la cresta neural.

También se ha propuesto la hipótesis de que las células endocrinas del páncreas se deriven a partir de precursores neuroectodérmicos que migran hacia el endodermo antes de que se forme la cresta neural. Para comprobar la validez de esta hipótesis, se construyeron embriones quiméricos *in vitro* asociando el neuroectodermo de codorniz con el endomesodermo del pollo. En todos los explantes se observó que los ganglios entéricos se originaban a partir del ectodermo de codorniz, pero las células endocrinas eran de pollo. A partir de estas observaciones se concluye que las células endocrinas del páncreas no se originan del neuroectodermo, sino que se derivan del endodermo a medida que éste se establece al final de la gastrulación ²⁴.

Es importante notar que las células β exhiben varias características de tipo neuronal entre las cuales se incluyen su actividad eléctrica, la cual es importante para la secreción de insulina como ya se mencionó; además de esta característica fisiológica, las células β tienen la capacidad de extender neuritas cuando son cultivadas *in vitro* ⁷¹. Este cambio morfológico hacia un tipo celular que asemeja neuronas se ha reportado que también es inducido por NGF; ya que se ha observado que el NGF induce la extensión de neuritas en una línea de células β , RINm5F, que proviene de un insulinoma de rata ⁵⁷. Estos efectos del NGF sobre la morfología de las células β también se observa en células obtenidas a partir de cultivos primarios como lo demuestran los estudios realizados previamente en el laboratorio.

En estos trabajos también se demostró que el NGF actúa directamente sobre las células β ya que expresan, al menos, un receptor a este factor de crecimiento. La sensibilidad de las células β al NGF podría indicar un posible origen común entre estas células y células de tipo neuronal; es decir, que ambos tipos celulares se originan a partir del neuroectodermo.

II) HIPOTESIS

Como ya se mencionó, se ha observado que las células β poseen la capacidad de extender procesos de tipo neurítico espontáneamente *in vitro*⁷¹ y el crecimiento de estos procesos es promovido por el NGF tanto en una línea de células β tumorales (RINm5F)⁵⁷ como en cultivos primarios de ellas, lo que se debe a la expresión de un receptor a NGF en la membrana plasmática de las células β ⁷⁷.

Los efectos del NGF sobre sus células blanco no son solamente a nivel morfológico, sino también a nivel fisiológico, ya que, por ejemplo, este factor induce cambios en la actividad eléctrica de las células cromafines y PC12, en estas últimas el NGF induce la aparición de canales de Na^+ en la membrana plasmática⁴¹.

Las células β poseen canales de Na^+ y de Ca^{2+} en la membrana plasmática que son importantes en el proceso de acoplamiento estímulo-secreción. Dado que el NGF promueve la extensión de neuritas en las células β de rata, resulta de interés estudiar si estos cambios morfológicos conllevan cambios en las corrientes iónicas de Na^+ y Ca^{2+} .

De acuerdo con los datos obtenidos en el laboratorio en cuanto a los cambios inducidos por el NGF sobre la morfología de las células β pancreáticas de rata; y a los efectos de este factor sobre las corrientes iónicas entrantes en otros sistemas celulares, suponemos que, probablemente, el NGF tenga algún efecto sobre la densidad de corriente iónica de las células β pancreáticas de rata.

III) OBJETIVOS ESPECIFICOS

1) Analizar el efecto del NGF 2.5S sobre las corrientes iónicas entrantes de Na^+ y Ca^{2+} de células β aisladas y cultivadas en presencia del factor durante 5-7 días; de existir un efecto sobre las corrientes iónicas, evaluar si existe un cambio en las cinéticas de activación e inactivación de los canales iónicos de las células.

2) Evaluar si existen diferencias en la actividad eléctrica de las diferentes subpoblaciones funcionales de células β .

"El hombre es una criatura singular. Posee un cúmulo de dones que lo hacen único entre los animales; a diferencia de ellos, no es una figura del paisaje, es un modelador de este. En cuerpo y mente es el explorador de la naturaleza, el animal ubicuo que no ha encontrado sino creado su hogar en cada continente."

J. Bronowski. *El ascenso del hombre.*

IV) MATERIALES Y METODOS

Los reactivos necesarios para llevar a cabo los procedimientos experimentales se obtuvieron de las siguientes fuentes:

Colagenasa tipo IV de Worthington (Freehold, NJ, USA); anticuerpo contra insulina de Biodesign International (Keenebunkport, ME, USA); suero bovino fetal (SBF), complemento de cobayo, solución salina balanceada de Hanks (HBSS) y soluciones de gentamicina y penicilina-estreptomicina de Gibco (Grand Island, NY, USA); albúmina de suero bovino (BSA), cloruro de cromo, proteína A de estafilococo, HEPES, hidrobromuro de poli-L-lisina (peso molecular >380,000), medio RPMI 1640, D-[+]-glucosa, solución dispersante, sal de Spinner-Eagle, Iccoll tipo 400DL (peso molecular 400,000) y NGF 2.5S de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA), tetrodotoxina de Calbiochem (La Jolla, CA, USA); ácido L-aspártico de Aldrich Chemical Co; Pentobarbital sódico (Anestesal) de Smith Kline, Norden de México.

A) OBTENCION DE CELULAS β PANCREATICAS DE RATA.

A.1) Disección de los páncreas de rata.

Los páncreas fueron obtenidos a partir de ratas Wistar macho de peso de 250 a 280 g, de acuerdo con la técnica de Lacy y Kostianovsky (1967).

Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (0.063 mg/g). Se cerró el conducto de Wirsung y se canuló el conducto pancreático a la altura de su unión con el conducto biliar y se inyectaron de 5 a 10 ml de solución de Hanks suplementada con gentamicina 5 μ g/ml y 0.1% de albúmina sérica bovina (HBSA). Se disecaron y limpiaron el cuerpo y la porción caudal del páncreas insuflado y se cortaron en pedazos pequeños, posteriormente, se digirió el tejido con colagenasa tipo IV (CGS 0.1 mg/ml) durante 15 minutos a 37°C.

A.2) Gradiente con Ficoll.

Para la separación de los islotes pancreáticos se utilizó un gradiente de Ficoll (27, 23, 20 y 11% en HBSA). Una vez listo el gradiente éste se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos. Posteriormente los islotes se lavaron tres veces con HBSA y se seleccionaron manualmente con ayuda de una pipeta Lang-Levi.

A.3) Dispersión de las células del islote pancreático.

Los islotes limpios de tejido acinar fueron disgregados con tripsina durante 10 minutos a 37°C en un baño con agitación constante y rápida, y se dispersaron las células manualmente con la ayuda de una pipeta Pasteur siliconizada. Finalmente, las células se lavaron 3 veces con medio RPMI 1640, penicilina 200 µ/ml, estreptomicina 200 µg/ml, anfotericina B 0.5 µg/ml (PEF), 2 mM glutamina y 10% de SBF para inactivar a la tripsina.

A.4) Cultivo de las células del islote.

Las células se sembraron en cajas Corning para cultivo primario con medio RPMI 1640, penicilina 200 µ/ml, estreptomicina 200 µg/ml, anfotericina B 0.5 µg/ml, 2 mM glutamina y 10% SBF, (testigo) y 40 ng/ml de NGF 2.5S (tratamiento), según fuera el caso y se mantuvieron en cultivo en una incubadora humidificada (5% CO₂ en 95% de aire) durante 5 días antes de realizar el ensayo hemolítico inverso o RHPA (Reverse Hemolytic Plaque Assay) ⁵³.

B) IDENTIFICACION DE LAS CELULAS β POR MEDIO DEL RIIPA.

Las células β aisladas fueron identificadas por medio de la técnica de ensayo hemolítico inverso o RHPA para lo cual se llevó a cabo como sigue ³⁸:

B.1) Conjugación de eritrocitos de borrego (RBC) con la proteína A.

Los eritrocitos fueron conjugados con proteína A de *Staphylococcus aureus* en presencia de cloruro de cromo con el propósito de unir anticuerpo contra insulina a la membrana.

B.2) Preparación de cámaras de Cunningham.

El RHPA se llevó a cabo en cámaras de Cunningham utilizando cajas para cultivo primario Corning a las cuales se les había agregado poli-L-lisina (0.5 mg/ml en solución amortiguadora de TRIS, 0.15 M, pH= 8.2). Las cámaras se fabricaron de tal manera que la hormona secretada difundiera lateralmente concentrándose alrededor de las células B.

B.3) Ensayo hemolítico inverso (RIIPA).

El ensayo hemolítico inverso explota el fenómeno de hemólisis mediada por complemento en presencia del complejo antígeno-anticuerpo como se muestra en la figura 8³³.

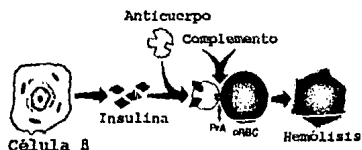


Figura 8) Representación del mecanismo de hemólisis mediada por complejos antígeno-anticuerpo en presencia de complemento (Modificada de Smith *et al*, 1989).

Las células cultivadas se despegaron de las cajas de Petri con 2 ml de solución sin calcio a 37°C. Posteriormente, se hizo una mezcla de eritrocitos y células y se colocaron 30 µl de la mezcla en las cámaras y se incubaron durante una hora para asegurar que las células se pegaran al piso de las cámaras. Después se les agregó glucosa 20 mM en Hanks junto con el anticuerpo contra insulina y se incubaron una hora. Las células fueron incubadas con complemento durante 30 minutos, y al finalizar el RHPA, las células se continuaron cultivando en medio RPMI 10% SBF + 2% PEF con y sin tratamiento.

C) EXPERIMENTOS ELECTROFISIOLÓGICOS.

C.1) Soluciones de registro.

SOLUCION EXTERNA (mM)	SOLUCION INTERNA (mM)
130 NaCl	120 CsAsp
5 KCl	10 CsCl
5 CaCl ₂	10 BAPTA
2 MgCl ₂	10 HEPES
10 HEPES	5 CsF
10 Glucosa	2 ATP-Mg
pH= 7.33	pH= 7.26
Osm= 295mOsmol/Kg	Osm= 285mOsmol/Kg

En algunos experimentos se agregó 10 mM de NaCl a la solución interna para medir el potencial de inversión y en otros, se usó tetrodotoxina en el medio externo (TTX 100 nM) para bloquear la corriente de Na⁺.

C.2) Registro de corrientes de Na⁺ y Ca²⁺ por medio de la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana (patch clamp).

Los microelectrodos de registro se fabricaron con vidrio Kimax-51 y se recubrieron con Sylgard. La resistencia de los electrodos en la solución de registro fue de 1.5 a 1.8 MΩ.

Los registros se llevaron a cabo en la configuración de célula completa de la técnica de "patch clamp" que consiste en formar un sello de alta resistencia (gigaohms) entre la punta de un microelectrodo de vidrio y la membrana celular. Después de hacer el sello se rompe la membrana que subyace al electrodo por medio de un pulso de succión haciendo posible el registro de corrientes macroscópicas ⁵⁴. La generación de pulsos y la adquisición de datos fue controlada usando un amplificador Axopatch 200 (Axon Instruments, Inc.) conectado por una interfase DMA TL-1 (Axon Instruments, Inc) a una computadora con una tarjeta Lab Master DMA (Scientific Solutions, Inc) . Los protocolos de pulsos se diseñaron y los datos se adquirieron con el programa PClamp versión 5.5.

En nuestros experimentos fue necesario estimar la capacitancia total de la membrana plasmática (*C_m*) en cada una de las células registradas. Con ese fin, aplicamos pulsos

hiperpolarizantes de 10 mV de amplitud y 15 ms de duración. Se restaron los transitorios capacitivos de la pipeta de registro y se integró el área del transitorio capacitivo de la membrana, lo cual nos proporciona una medida de cuanta carga es necesaria para crear una diferencia de potencial a través de la membrana de la célula.

Con el objeto de estudiar si existen diferencias en la actividad eléctrica y la actividad secretora de las células β se utilizó la clasificación de diferentes subpoblaciones funcionales de células β propuesta por Hiriart y Ramírez-Medeles (1989) y que es la que se muestra a continuación:

SP (PLACA CHICA) $< 2,000 \mu\text{m}^2$

MP (PLACA MEDIANA) entre 2,000 y 4,500 μm^2

LP (PLACA GRANDE) $> 4,500 \mu\text{m}^2$

También se llevaron a cabo experimentos para calcular las curvas de inactivación para I_{Na^+} tanto en células control como en células tratadas con NGF. El protocolo de pulsos para la obtención de la curva de inactivación se muestra en la figura 9.

Los recambios de solución externa normal a solución externa +TTX se llevaron a cabo con un sistema de perfusión mediante una bomba de presión y vacío. Cabe mencionar que todos los experimentos se llevaron a cabo a una temperatura de 20°C, utilizando un controlador de

temperatura (Medical System Corp).

D) ANALISIS DE RESULTADOS.

Para el análisis de los resultados se utilizó el programa Clampfit versión 5.5.

Los datos se evaluaron con una prueba de análisis de varianza (ANOVA), seguida por una prueba múltiple de Fischer o una prueba de Student de dos colas para datos pareados usando el programa NCSS (Number Cruncher Statistical System, 4.2, Dr. Jerry L. Hintze, Kaysville, UT, USA, 1983).

Todos los datos son expresados como la media \pm error estandar de la media (ESM).

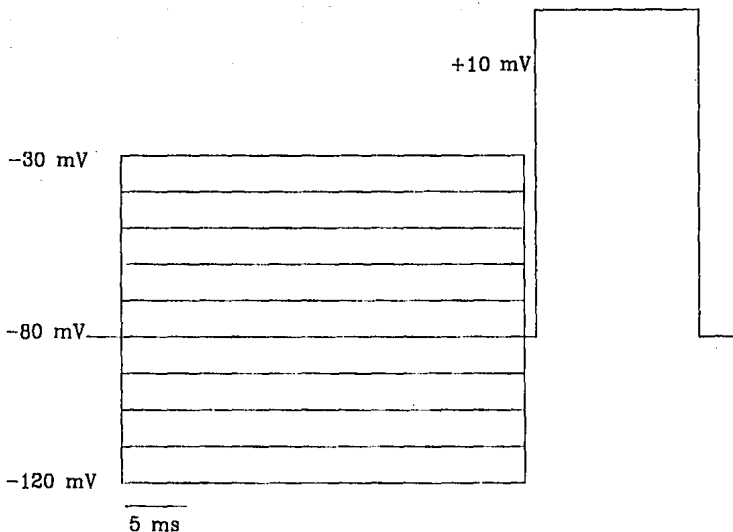


Figura 9) Protocolo de pulsos utilizado para la obtención de la curva de inactivación de la corriente de Na^+ . Se aplicó un prepulso de 35 ms para inactivar los canales de Na^+ hasta un estado estacionario. La corriente de Na^+ se registró durante pulsos de prueba de 14 ms a +10 mV para determinar la fracción de canales que no fueron inactivados por el prepulso. La amplitud al pico de la corriente fue normalizada y graficada en función del voltaje del prepulso.

"Now is no time to think of what you do not have. Think of what you can do with what there is."

E.Hemingway. *The old man and the sea.*

V) RESULTADOS

A) EFECTO DEL NGF SOBRE LA CORRIENTE MACROSCOPICA DE Na⁺ DE CELULAS β PANCREATICAS AISLADAS EN CULTIVO.

En la figura 10 se muestran los registros de una familia de corrientes iónicas entrantes a la célula β en una célula testigo y en otra tratada con NGF. En el pánel inferior se muestra el protocolo de pulsos utilizado para la obtención de estos registros. En general, para la obtención de las relaciones corriente a voltaje (curva IV), se aplicaron pulsos despolarizantes de -30 mV a +40 mV con incrementos de +10 mV. El potencial de mantenimiento fue de -80 mV para todos los casos. Las corrientes registradas tienen dos componentes, uno transitorio, que se inactiva y corresponde a la corriente de Na⁺ y otro mantenido, de menor magnitud que corresponde a la corriente de Ca²⁺.

La existencia de canales de Na⁺ sensibles a tetrodotoxina (TTX) en células β pancreáticas de rata ya ha sido demostrada anteriormente (Hiriart y Matteson, 1988; Ashcroft y Rorsman, 1989); sin embargo, se consideró importante llevar a cabo experimentos usando TTX, un bloqueante específico de los canales de Na⁺, así como experimentos para calcular el potencial de inversión de la corriente para comprobar que realmente se tratara de una corriente de Na⁺. Se

obtuvo que el 100% de las células, testigo y tratadas con NGF, poseen corrientes de Na⁺ sensibles a TTX (figura 11).

El potencial de inversión observado, es decir, el momento en que la corriente de Na⁺ invierte su dirección de entrante a saliente, fue a los +42 mV tanto para las células control como para células tratadas con NGF, lo cual es consistente con el valor calculado (+47.28 mV). Estos valores para el potencial de inversión de la corriente de Na⁺ se obtuvieron a partir de la ecuación de Nernst que se muestra a continuación:

$$E_{Na} = \frac{RT}{F} \ln \frac{[Na]_o}{[Na]_i}$$

En donde, E_{Na}= potencial de equilibrio para sodio; R= constante de los gases; T= temperatura; F= constante de Faraday; [Na]_o= concentración de sodio extracelular; [Na]_i= concentración de sodio intracelular.

En la figura 12 se muestra la relación corriente a voltaje promedio de células testigo y tratadas durante 5 a 7 días con NGF 2.5S. Es claro que el tratamiento con el factor de crecimiento provoca un incremento en la corriente de Na⁺, que es en promedio del 55.6% (n=31). En las células testigo, la magnitud de la corriente medida al pico (+10 mV) es de -36.33 pA ± 0.51, mientras que en las tratadas con NGF es de -56.53 pA ± 1.17 (n=31). Como se observa en la figura 13 en la que se grafican los cambios en la densidad de células tratadas con NGF en

relación a las células testigo a los diferentes voltajes, el aumento en la corriente de Na^+ no se debe a un aumento en el tamaño de las células sino a un aumento del 30.65% en la densidad de canales de Na^+ en la membrana plasmática de las células tratadas con NGF ($p < 0.01$, $n = 31$) (tabla I), ya que las capacitancias de los dos grupos experimentales no son significativamente diferentes.

B) CAMBIOS INDUCIDOS POR EL NGF SOBRE LA CONDUCTANCIA Y LAS CINÉTICAS DE ACTIVACION E INACTIVACION DE LA CORRIENTE DE Na^+ .

También resultó de interés estudiar si el NGF induce cambios en la conductancia (g) de los canales de Na^+ . Este resultado se obtuvo a partir de la ecuación de Hodgkin-Huxley que establece lo siguiente:

$$g_{\text{Na}^+} = \frac{I_{\text{Na}^+}}{E - E_{\text{Na}^+}}$$

En donde, g_{Na^+} = conductancia al sodio; I_{Na^+} = corriente de sodio; E = potencial de membrana; E_{Na^+} = potencial de equilibrio para sodio.

Los resultados obtenidos para la conductancia (g) de Na^+ a los diferentes potenciales se muestran en la figura 14 y, como se observa en esta figura, no existen diferencias significativas en la conductancia al Na^+ entre ninguno de los 2 grupos experimentales.

También se llevaron a cabo experimentos para determinar si el tratamiento con NGF induce cambios en las cinéticas de activación e inactivación en estado estacionario de las corrientes de Na^+ de las células β .

La activación es un proceso rápido que abre los canales de Na^+ durante una despolarización mientras que la inactivación en estado estacionario es un proceso en el cual los canales dependientes de voltaje pueden entrar en un estado refractario después de la activación y puede deberse a un cambio conformacional en los canales en una región distinta a la que controla la activación.

Los datos obtenidos demuestran que no existen diferencias significativas entre los dos grupos experimentales en lo que concierne a la cinética de activación de la corriente de Na^+ . Sin embargo, la cinética de inactivación de la corriente de Na^+ de las células tratadas con NGF sí presenta diferencias significativas con respecto al control ya que se observa que a potenciales de -70, -60, -50 y -40 mV las células tratadas con NGF se inactivan 9 mV después que las células control. Es decir, el porcentaje de inactivación para las células testigo a estos voltajes es mayor que para las células tratadas con NGF (figura 15).

C) EFECTO DEL NGF SOBRE LAS CORRIENTES MACROSCOPICAS DE Ca^{2+} DE LAS CELULAS β AISLADAS EN CULTIVO.

En la figura 16 se muestra la relación corriente a voltaje para la corriente de Ca^{2+} medida

al pico (+10 mV) tanto para células testigo como para células tratadas con NGF durante 5 a 7 días (n=10).

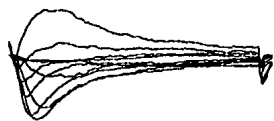
En nuestras condiciones de registro, las células β cultivadas en presencia de NGF 2.5S durante 5-7 días no presentaron un aumento significativo en la corriente de Ca^{2+} con respecto al control (figura 16). Tampoco se presentaron diferencias significativas en la capacitancia y la densidad de corriente de Ca^{2+} entre los dos grupos experimentales (Tabla II). Sin embargo, si se observó que las células tratadas con NGF presentan un corrimiento en la relación corriente a voltaje ya que la corriente al pico a se presenta a +20 mV a diferencia de las células control que tienen un pico a +10 mV. Además, se observa un hombro entre 0 y +10 mV en la curva para las células tratadas con NGF lo cual podría indicar la expresión de otro tipo de canales activados a alto voltaje (HVA).

D) CORRELACION ENTRE LA MAGNITUD DE LA CORRIENTE DE Na^+ DE LAS CELULAS β PANCREATICAS Y LA SECRECION DE INSULINA.

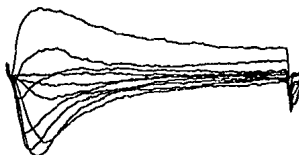
Como ya se mencionó, existe una estrecha correlación entre la actividad eléctrica de las células β y la secreción de insulina, por lo que se llevó a cabo un análisis estadístico para determinar si el tamaño de las placas de secreción de insulina correspondían de alguna manera a la magnitud de la corriente de Na^+ de estas células. No se encontró una correlación entre la magnitud de la corriente de Na^+ y el área de la inmunoplaca de insulina, como se muestra en la tabla III. Para la corriente de Ca^{2+} no fue posible llevar a cabo esta correlación ya que el número

de datos no fue suficiente para el análisis estadístico.

CONTROL



NGF



20 pA
2 ms

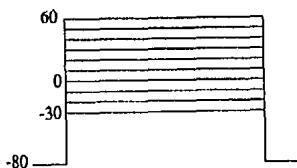


Figura 10) Corrientes de Na^+ y de Ca^{2+} de una célula control y una célula tratada con NGF 2.5S. La duración de los pulsos despolarizantes fue de 15 ms a los voltajes indicados, desde un potencial de mantenimiento de -80 mV. El protocolo de pulsos utilizado para la obtención de los registros electrofisiológicos se muestra en la parte inferior.

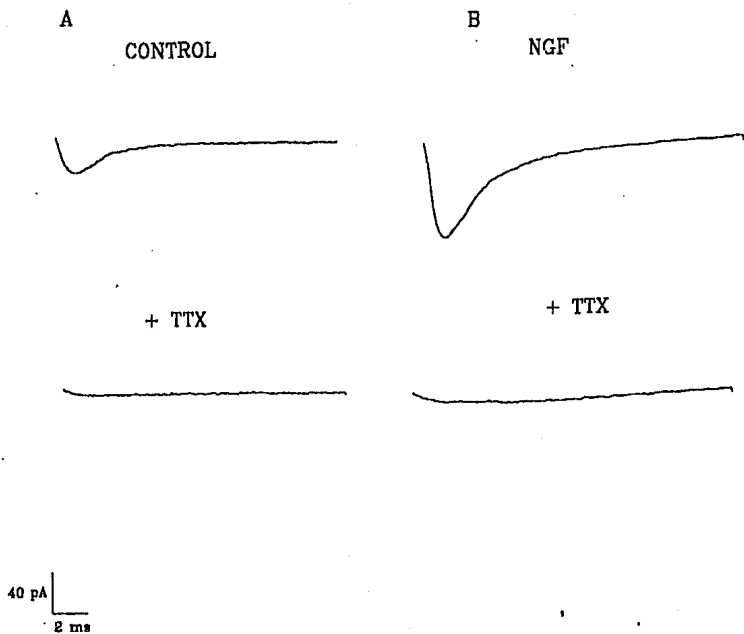


Figura 11) Efecto de la TTX (100 nM) sobre la corriente de Na^+ de las células β pancreáticas. La TTX bloqueó la corriente de Na^+ de las células β en el 100% de los casos tanto en células control (A) como en células tratadas con NGF (B). El pulso que se muestra es a +10 mV para todos los casos.

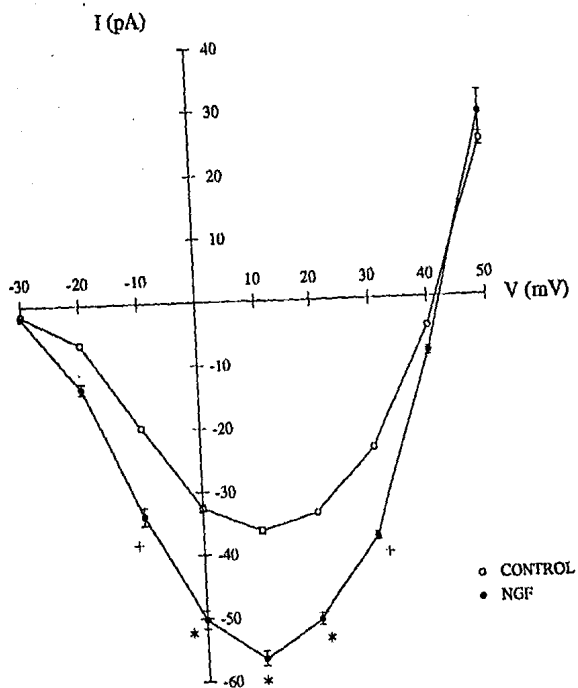


Figura 12) Efecto del NGF 2.5S sobre las corrientes de Na^+ de las células β pancreáticas. Las corrientes se registraron durante 15 ms a diferentes voltajes desde un potencial de mantenimiento de -80 mV. El potencial de inversión se observa a +42 mV. (* $p < 0.01$; + $p < 0.05$; $n=31$ para ambos casos)

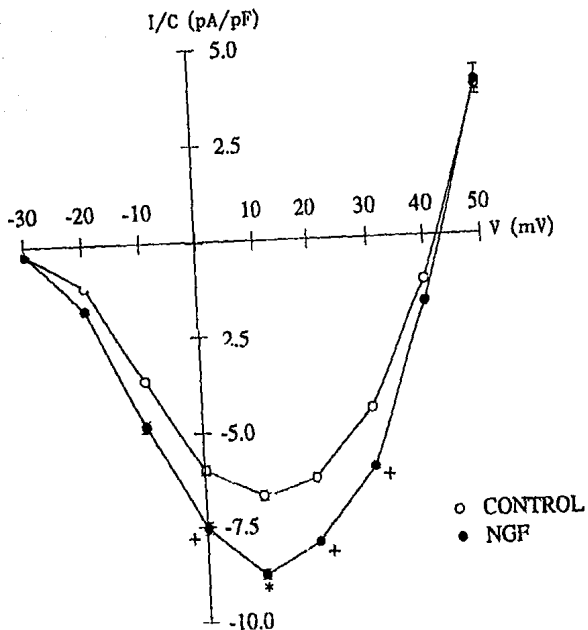


Figura 13) Efecto del NGF 2.5S sobre la densidad de corriente de Na^+ de las células β pancreáticas. La densidad se obtuvo a partir de la división del promedio de los valores de la corriente a cada uno de los pulsos despolarizantes entre la capacitancia de cada célula tanto para células control como para células tratadas con NGF. (* $p < 0.01$; + $p < 0.05$; $n=31$ para ambos casos)

TRATAMIENTO	CAPACITANCIA (pF)	DENSIDAD (pA/pF)	CORRIENTE (pA)
CONTROL	5.94 ± 0.05	-6.72 ± 0.13	-36.33 ± 0.51
NGF	6.37 ± 0.05	-8.78 ± 0.13	-56.53 ± 1.17
AUMENTO		30.65%	55.60%

TABLA I) Efecto del NGF 2.5S sobre la corriente y la densidad de corriente de Na⁺ de las células β pancreáticas. p < 0.01 para todos los casos excepto para capacitancia.

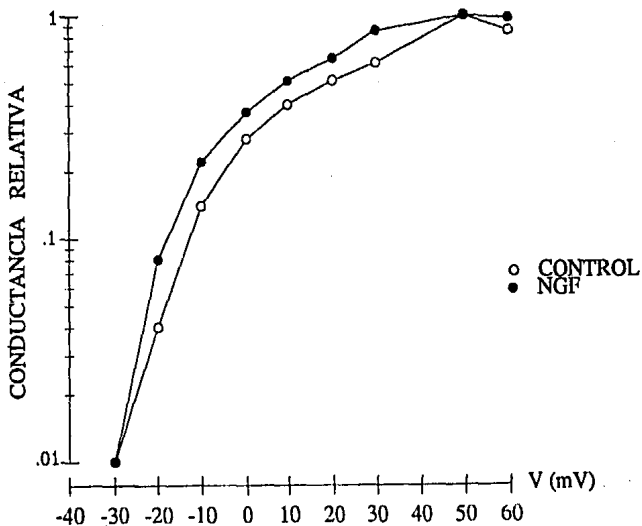


Figura 14) Efecto del NGF 2.5S sobre la conductancia de los canales de Na^+ de las células β pancreáticas. En esta figura se encuentra representada la dependencia de la conductancia de Na^+ al pico sobre el voltaje. La conductancia se encuentra normalizada; y se expresa como la fracción relativa al máximo.

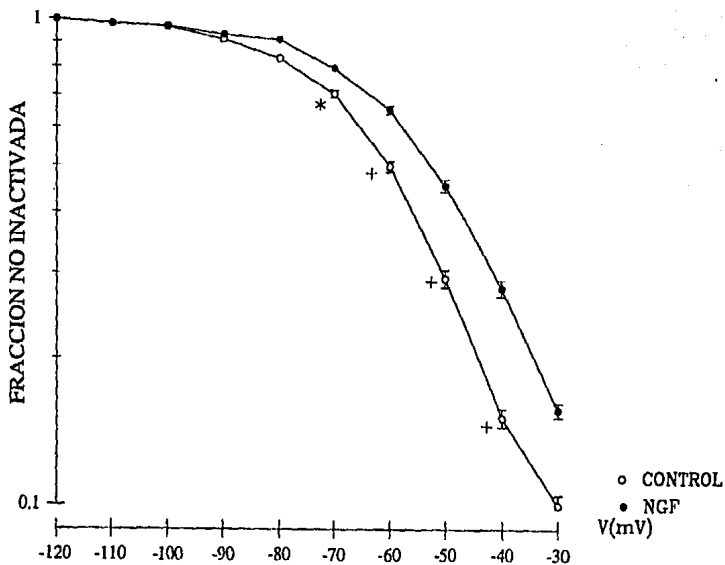


Figura 15) Efecto del NGF 2.5S sobre la cinética de inactivación de la corriente de Na^+ de las células β pancreáticas. Las corrientes de Na^+ de las células tratadas con NGF se inactivaron aproximadamente 9 mV después que las corrientes de Na^+ de las células control. (+ $p < 0.01$; * $p < 0.05$; $n = 14$)

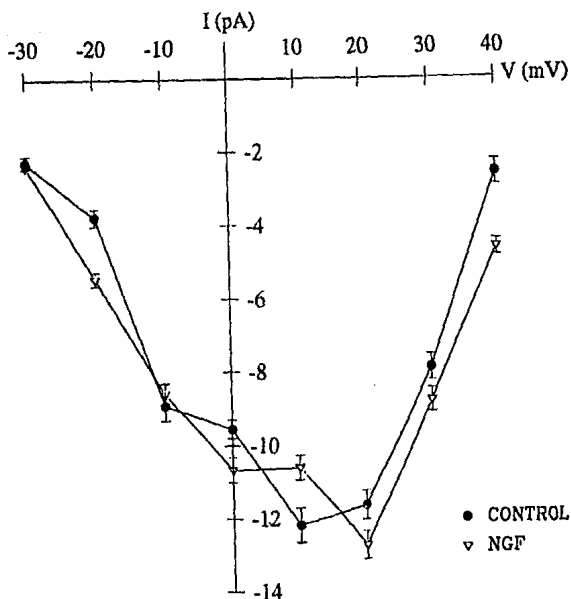


Figura 16) Efecto del NGF 2.5S sobre las corrientes de Ca^{2+} de células B pancreáticas. Las corrientes se registraron durante 15 ms a diferentes voltajes desde un potencial de mantenimiento de -80 mV. El NGF no indujo ningún cambio significativo en la amplitud de la corriente de Ca^{2+} de las células B con respecto al control.

TRATAMIENTO	CAPACITANCIA (pF)	DENSIDAD (pA/pF)		CORRIENTE (pA)	
		+10 mV	+20 mV	+10 mV	+20 mV
CONTROL	6.49 ± 0.12	-1.96 ± 0.08	-1.87 ± 0.06	-12.20 ± 0.47	-11.65 ± 0.39
NGF	6.38 ± 0.15	-1.57 ± 0.05	-1.88 ± 0.06	-10.63 ± 0.33	-12.74 ± 0.38

TABLA II) Efecto del NGF 2.5S sobre la corriente y la densidad de corriente de Ca²⁺ de las células B pancreáticas. No existen diferencias significativas para ningún caso (n= 12 para ambos grupos).

TRATAMIENTO	I_{Na} (pA)		
	SP	MP	LP
CONTROL	-33.32 ± 2.23	-33.47 ± 1.33	-29.37 ± 3.01
NGF	-57.62 ± 4.62	-44.19 ± 1.65	-65.41 ± 6.04

TABLA III).- CORRELACION ENTRE LA MAGNITUD DE LA CORRIENTE DE Na^+ DE LAS CELULAS β PANCREATICAS CON LA CANTIDAD DE INSULINA SECRETADA. Los valores que se muestran son para la corriente de Na^+ al pico (+10 mV) (SP, n=6; MP, n=12; LP, n= 9)

"QUIN OC CA TLAMATI NOYOLLO: YEHUA
NICCAQUI IN CUICATL, NIC ITTA IN OCHITLI:
MA CA IN CUETLAHUIYA"

*"Por fin lo comprende mi corazón: escucho un canto,
contemplo una flor: ¡Ojalá no se marchiten!"*

Nezahualcoyotl.

VI) DISCUSION Y CONCLUSIONES

Durante su desarrollo, las neuronas expresan canales de Na^+ como un paso necesario para convertirse en partes funcionales del sistema nervioso adulto. Los factores tróficos que regulan esta expresión son, por lo tanto, componentes críticos de los múltiples mecanismos moleculares que causan la diferenciación neuronal. En este trabajo se estudia cómo es que uno de estos factores, el NGF, afecta la expresión de los canales de Na^+ en las células β pancreáticas ya que se ha propuesto un posible origen neuroectodérmico para estas células. Varios experimentos llevados a cabo previamente en el laboratorio indican que las células β responden al NGF 2.5S extendiendo procesos de tipo neurítico, además de que presentan sitios de unión al NGF 2.5S positivos por inmunofluorescencia indirecta (IF) ⁷⁷.

Los resultados de este trabajo indican que el NGF 2.5S promueve un aumento del 30.65% en la densidad de corriente de Na^+ sensible a TTX. Además, no se observa un cambio en la conductancia máxima relativa al Na^+ , por lo tanto, la diferencia en la densidad de corriente de Na^+ antes descrita sugiere que las células tratadas con NGF expresan un mayor número de canales de Na^+ funcionales por unidad de área de membrana plasmática, ya que no existen

diferencias en la conductancia relativa de ninguno de los dos grupos experimentales. Dado que la conductancia relativa no cambia podemos concluir que no estamos observando un tipo distinto de canales.

También se encontró que el NGF induce un cambio en la cinética de inactivación de los canales de Na^+ de las células β pancreáticas ya que los canales de Na^+ de las células cultivadas en presencia de este factor se inactivan aproximadamente 9 mV después que los canales de Na^+ de las células control. Esto resulta interesante porque durante un pulso despolarizante pueden ser activados un mayor número de canales que en las células testigo.

Estos datos son consistentes con aquellos encontrados en otros sistemas celulares como lo es el de las células PC12 ya que se ha observado que el NGF induce la aparición de canales de Na^+ en estas células ⁴¹.

Se ha propuesto que, para este sistema celular, el efecto del NGF sobre la densidad de los canales de Na^+ se encuentra mediado por una PKC (proteína cinasa dependiente de fosfolípidos) y por una PKA (proteína cinasa dependiente de AMPc). Se ha sugerido que la activación de la subunidad catalítica de la PKA es un evento bioquímico importante iniciado por el NGF para incrementar el número de canales de Na^+ en las células PC12. Así mismo, debe considerarse la participación de procesos transcripcionales ya que el ARNm de los canales de Na^+ se incrementa en las células PC12 cultivadas durante una semana en presencia de NGF ⁵⁰.

La inducción del ARNm del canal de Na^+ por el NGF en las células PC12, depende de la síntesis de proteínas lo cual sugiere que es necesaria otra proteína intermediaria para activar el gen del canal de Na^+ como lo son los productos de los genes de respuesta temprana *c-fos* y *c-jun*²⁶. Sin embargo, los experimentos realizados en líneas celulares deficientes en PKA, como lo son las células AB-11, 123.7 y A126-1B2, han demostrado que el incremento del ARNm del canal de Na^+ en respuesta al NGF puede ser por una vía independiente de la PKA, pero que la PKA desempeña un papel importante en la inducción de los canales de Na^+ funcionales a un nivel postranscripcional y postraducciona²⁵.

Es probable que el NGF tenga un efecto postraducciona sobre las proteínas de los canales de Na^+ de las células β pancreáticas. Sin embargo, será necesario llevar a cabo estudios del efecto del NGF sobre la transcripción del ARNm del canal de Na^+ de las células β por medio de la utilización de técnicas como lo son el análisis de hibridización por la técnica de Northern Blot ya que si no se observan efectos en la transcripción, se deberán estudiar los efectos sobre la proteína del canal ya traducida.

También sería interesante llevar a cabo experimentos con saxitoxina tritjada (³H-ST) la cual se une específicamente a los canales de Na^+ y hace posible una cuantificación exacta del número de canales en la membrana.

El NGF 2.5S también afecta la cinética de inactivación de la corriente de Na^+ . Esto podría deberse a un cambio en la conformación de la proteína del canal, probablemente por un

mecanismo de fosforilación. El receptor al NGF es una proteínasa de tirosina y no hay que perder de vista la posibilidad de que esta enzima, al ser activada por la unión de NGF, fosforilase las proteínas de los canales de Na^+ cambiando sus propiedades de apertura y cierre o activara a alguna otra proteína intermediaria que tuviera este efecto de fosforilación sobre las proteínas de los canales de Na^+ , lo que podría explicar los cambios observados en la cinética de inactivación, en las células tratadas con el NGF.

En cuanto al efecto del NGF sobre las corrientes de Ca^{2+} , no se observó ningún cambio significativo ni en la amplitud, ni en la densidad de la corriente lo cual es consistente con los datos de secreción de insulina obtenidos en el laboratorio ya que ésta no aumenta en presencia de NGF⁶⁶. Sin embargo, existe una tendencia a un cambio en la forma de la relación corriente-voltaje de las células cultivadas en presencia de NGF 2.5S con respecto a las células testigo. Será necesario llevar a cabo experimentos tanto de secreción de insulina, como electrofisiología para esclarecer si la secreción y la corriente de Ca^{2+} aumentan con un mayor tiempo en cultivo, ya que los cambios observados en la forma de la curva podrían ser más evidentes si las células se mantuvieran más tiempo en cultivo en presencia del factor de crecimiento.

Este cambio podría indicar la inducción de otro tipo de canales de Ca^{2+} de alto umbral por el NGF ya que en células β de humano y en la línea celular RINm5F (insulinoma de rata) se ha observado la presencia de un componente sensible a dihidropiridinas (DHPs) y otro no sensible a DHPs⁵⁸. Para confirmar esta hipótesis será necesario llevar a cabo experimentos con ω -conotoxina y nifedipina ya que esto nos permitirá discernir entre los dos tipos de canales de

Ca²⁺ de alto umbral: los canales tipo N y los canales tipo L. También será necesario llevar a cabo experimentos sustituyendo el Ca²⁺ por Ba²⁺ en el medio extracelular ya que algunos canales conducen mejor a este ion, con lo que se lograrían observar las diferencias entre los distintos tipos de canales.

Los resultados obtenidos con respecto a la relación entre la densidad de la corriente de Na⁺ y la cantidad de insulina secretada demuestran que no existen diferencias significativas entre la actividad de los canales de Na⁺ en las distintas subpoblaciones secretoras. Estos datos sugieren que estos canales iónicos no son la única vía necesaria para la estimulación de la secreción de insulina en las células β pancreáticas. También se encuentran involucrados segundos mensajeros como lo es el AMPc el cual, como ya se demostró anteriormente en el laboratorio, aumenta la secreción de insulina en un 193%⁶⁶. Sin embargo, es necesaria la realización de más experimentos para ampliar la población de datos ya que para el caso de los lactotropos³⁹ se encuentran diferencias en la densidad de corriente de Na⁺ de las diferentes subpoblaciones secretoras. Para el caso del papel que juegan los canales de Ca²⁺ sería necesario llevar experimentos bajo condiciones de registro distintas ya que, como ya se mencionó, lo más adecuado sería la utilización de Ba²⁺ en lugar de Ca²⁺, ya que la permeabilidad de los canales de Ca²⁺ tipo L transportan mejor Ba²⁺ que Ca²⁺ y se piensa que estos canales son más importantes para la secreción de insulina que los demás tipos de canales de Ca²⁺³⁷.

Las células β exhiben una extraordinaria plasticidad para responder ante los diferentes estímulos a los que son expuestas, ya que son capaces de extender procesos de tipo neurítico en

presencia del NGF así como de presentar cambios en las propiedades eléctricas de sus canales iónicos lo cual abre nuevas perspectivas en el estudio de la fisiología de las células B.

"You'll say the hill's too steep to climb, climbing. You say you'd like to see me try, climbing. You pick the place and I'll choose the time. And I'll climb the hill in my own way. Just wait a while for the right day. And as I rise above the tree line and the clouds, I look down hearing the sound of the things you've said today."

A mis padres con mucho cariño.

*"Caminante, no hay camino; se hace camino al andar.
Al andar se hace camino, y al volver la vista atrás
se ve la senda que nunca se ha de volver a pisar.
Caminante, no hay camino; sólo estelas en la mar."*

A. Machado

VII) GLOSARIO

Actino Cualesquiera de los lóbulos (dilataciones sacíferas) de una glándula compuesta.

Activación Proceso que abre los canales iónicos durante una despolarización.

AMP cíclico (AMPe) Nucleótido cíclico (monofosfato de adenosina cíclico 3':5') muy ubicuo, producido por la acción de la adenilato ciclasa sobre el ATP; es un importante agente regulador que actúa como segundo mensajero celular de algunas hormonas y neurotransmisores.

Anticuerpo Inmunoglobulina formada por cuatro cadenas proteicas con una secuencia específica de aminoácidos.

Antígeno Sustancia capaz de causar la producción de anticuerpos y de reaccionar luego con ellos específicamente.

ATP (trifosfato de adenosina) Molécula de alto contenido energético que participa en varios procesos dependientes de energía.

BAPTA (Tetrasodio) Quelante de iones calcio.

Calcio, respuesta del Despolarización graduada debida a una débil corriente regenerativa causada por movimiento de iones calcio hacia el interior de la célula.

Canal iónico Glicoproteína con un peso molecular de entre 25 000 y 250 000 que tiene un poro central que atraviesa enteramente la membrana plasmática.

Capacitancia (C) Es una medida de cuanto carga debe de ser transferida de un conductor a otro para dar lugar a un potencial dado.

Catecolaminas Grupo de compuestos relacionados entre sí que ejercen acción simpatomimética en el tejido nervioso; ejemplo de ellas son la adrenalina, la noradrenalina y la dopamina.

Células endocrinas Células especializadas en la secreción de hormonas que viajan por el torrente sanguíneo hacia sus células

diana.

Células exocrinas La secreción de estas células no es hacia el torrente sanguíneo sino hacia un conducto. Ejemplos de tejidos exocrinos son las glándulas salivales y sudoríparas.

Coefficiente de sedimentación (S) Medida que equivale a la velocidad promedio por unidad de aceleración; tasa a la cual se sedimenta cada componente en un gradiente de centrifugación, depende de la forma y de su tamaño lo cual se describe en términos de su tasa de sedimentación.

Complemento Sustancia que amplifica la acción de un anticuerpo.

Conductancia (g) Medida de la facilidad con que un conductor transporta una corriente eléctrica.

Constante de disociación $K' = [H^+][A^-]/[HA]$. Es la medida empírica del grado de disociación de un par ácido básico conjugado en solución.

Corriente retardada (corriente retardada de potasio) Corriente de K^+ hacia el exterior a través de canales que se abren con un retraso temporal respecto al inicio de la despolarización; es responsable de la fase de repolarización del potencial de acción.

Cresta neural Estructura embrionaria temporal que aparece junto con los pliegues neurales que se cierran para formar el tubo neural.

Cromafines, células Células secretoras de adrenalina de la médula adrenal; llamadas así por su elevada afinidad hacia los colorantes de sales de cromo.

D600 α -Isopropil- α -[N-metil-N-homoveratril]- α -aminopropil]]

-3,4,5-trimetilfenilacetionitrilo; compuesto orgánico que bloquea la entrada de calcio a través de la membrana celular.

Repolarización Reducción o inversión de la diferencia de potencial a través de la membrana en reposo.

Dihidropiridina Compuesto liposoluble que bloquea preferencialmente los canales de Ca^{2+} tipo L.

Dopamina Producto de la descarboxilación de la dopa, un intermediario en la síntesis de la noradrenalina; es un neurotransmisor del sistema nervioso central.

Endodermo La más interna de las capas que dan origen al epitelio del aparato digestivo.

Equilibrio electroquímico Estado en el que el gradiente de concentración de un ion a través de la membrana está contrarrestado precisamente por el potencial eléctrico.

Exocitosis Proceso de secreción de una proteína.

Factor de crecimiento Sustancia capaz de promover la proliferación, diferenciación o supervivencia de algún tipo celular.

Factor trófico Molécula que induce cambios en la morfología o en la fisiología de un tipo celular.

Filamentos intermedios Filamentos largos sin ramificaciones que se encuentran entre los microtúbulos y los microfilamentos.

Fosfolipasa Enzima hidrolítica del citoplasma que degrada el AMPc proporcionando AMP.

Fosforilación Incorporación de un grupo PO_4 en una molécula orgánica.

Gastrulación Proceso de formación de las hojas germinales.

Término embriológico que designa los movimientos celulares que se producen en casi todos los animales al final del periodo de segmentación.

Hemólisis Proceso que describe el hinchamiento y posterior lisis de los eritrocitos.

Hiperpolarización Incremento en la diferencia de potencial a través de la membrana, haciéndose el interior más negativo que en reposo.

Hormona Sustancia química sintetizada y secretada al torrente sanguíneo por un tejido endocrino que influye en la actividad de un tejido diana.

Inactivación en estado estacionario Proceso en el cual los canales dependientes de voltaje pueden entrar en un estado refractario después de la activación.

Inmunofluorescencia indirecta Técnica que revela la expresión de antígenos en las células estudiadas por medio de un anticuerpo dirigido contra el antígeno de interés, y de un anticuerpo marcado con fluorógeno dirigido contra el primer anticuerpo.

Inmunopositivo Célula blanca que expresa el antígeno en cuestión.

Insulina Hormona proteica sintetizada y secretada por

las células beta de los islotes pancreáticos; controla el ingreso de carbohidratos a las células e influye en el metabolismo de los lípidos y aminoácidos.

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

Lumen Luz (espacio libre) de un vaso o conducto.

Neoplásico Tejido que prolifera fuera de control, tejido canceroso.

Nernst, ecuación de Ecuación para el cálculo de la diferencia de potencial a través de una membrana que equilibrará el gradiente osmótico de un ion.

Neuritas Prolongaciones celulares que se extienden desde el soma neuronal.

Neuroectodermo Porción del ectodermo embrionario que origina el sistema nervioso, tanto central (placa y tubo neural), como el periférico (cresta neural).

Neurotróficas, propiedades Capacidad de un factor para inducir cambios que asemejan un tipo neuronal en varios tipos celulares.

Nifedipina Dihidropiridina que bloquea específicamente los canales de Ca^{2+} tipo L.

PC12 (feocromocitoma) Línea celular derivada de la médula adrenal de rata.

Péptido señal La secuencia peptídica que dirige a los ribosomas que contienen la proteína nascente al retículo endoplásmico rugoso.

Permeabilidad Aptitud con la que las sustancias pueden pasar a través de una membrana.

Posttraduccional Modificaciones a una proteína después de haber sido traducida por el ribosoma.

Potencial de equilibrio Diferencia de potencial a través de una membrana para la que las formas iónicas implicadas se hallan en equilibrio electroquímico; es dependiente del gradiente de concentraciones de los iones, tal y como lo describe la ecuación de Nernst.

Potencial de inversión Potencial de membrana al cual la corriente invierte su dirección ya sea de entrante a saliente o viceversa.

Potencial de mantenimiento Potencial eléctrico al cual se mantiene la membrana celular por medio de técnicas como el patch clamp.

Potencial de membrana Potencial eléctrico medido en el interior de la célula en relación con el del fluido extracelular, que es por convención igual a cero; es la diferencia de potencial entre los dos lados opuestos de la membrana celular.

Potencial de reposo Potencial de la membrana de una célula, en ausencia de estimulación.

Potencial de acción Inversión transitoria de tipo todo-nada del potencial de membrana producida por una corriente regenerativa hacia el interior en membranas excitables.

Preproinsulina Proinsulina más la secuencia de péptido señal. La preproinsulina es cortada en proinsulina durante la transferencia de la proteína naciente al retículo endoplásmico.

Proinsulina Un precursor de la insulina que consiste de insulina y un péptido conectante (C). La proinsulina se corta o rompe en insulina en el complejo de Golgi y en los gránulos de secreción inmaduros.

Sarcoma Tumor que se origina a partir de tejido conectivo o muscular.

Secretagogo Sustancia que estimula o promueve la secreción.

Serotonina 5-hidroxitriptamina, 5-HT, actúa como neurotransmisor, $C_{10}H_{11}N_2O$.

Sulfonilurea Fármacos que estimulan la secreción de insulina de las células β pancreáticas al bloquear los canales de K^+ regulados por ATP.

Tetrodotoxina (TTX) Toxina que bloquea específicamente los canales de sodio.

Traducción Utilización de la secuencia de bases del ADN para la organización lineal de restos aminoácidos en un polipéptido, llevada a cabo por un ARNm.

Transcripción Formación de una cadena de ARN con secuencia de bases complementaria a la secuencia del ADN.

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

"These are the last words
I have to say; that's why this
took so long to write: there
will be other words some day,
but that's the story of my life."

B. Joel. *Famous last words.*

VIII) REFERENCIAS

- (1) Ammälä, C; Elinsson, L; Bokvist, K; Larsson, O; Ashcroft, F.M; Rorsman, P. (1993). Exocytosis elicited by action potentials and voltage-clamp calcium currents in individual mouse pancreatic B-cells. *J. Physiol.* 472: 665-688.
- (2) Angeletti, H.R. y Bradshaw, R. (1971) Nerve growth factor from mouse submaxillary gland: amino acid sequence. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 16(68): 2417-2420.
- (3) Ashcroft, M.F. y Ashcroft, S.J.H. (1992) Mechanism of insulin secretion. En: *Insulin molecular biology to pathology.* IRL PRESS, New York.
- (4) Ashcroft, S.J.H., Hammonds, P y Harrison, D.E. (1986) Insulin secretory response of a clonal cell line of simian virus 40-transformed B-cells. *Diabetologia* 29: 727-733.
- (5) Ashcroft, F.M., Harrison, D.E. y Ashcroft, S.J.H. (1984) Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic B-cells. *Nature* 312: 446-448.
- (6) Ashcroft, F.M. y Rorsman, P. (1989) Electrophysiology of the pancreatic B-cell. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 54: 87-145.
- (7) Atwater, I., Rojas, E. y Soria, B. (1989) Biophysics of the pancreatic B-cells. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 211.
- (8) Bocchini, V. y Angeletti, P.U. (1969) Nerve growth factor: purification as a 30,000- molecular-weight protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 64: 787-794.
- (9) Boyd, A.E. III. (1992) The role of ion channels in insulin secretion. *J. Cell. Biochem.* 48: 234-241.
- (10) Bradshaw, R.A. (1978) Nerve Growth Factor. *Annu. Rev. Biochem.* 47: 191-216.
- (11) Briggs, M.S. y Gierasch, L.M. (1986) Molecular mechanisms of protein secretion: the role of the signal sequence. *Adv. Prot. Chem.* 38: 109-180.
- (12) Bruecker, F.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.
- (13) Calissano, P., Cattaneo, A., Aloe, L. y Levi-Montalcini, R. (1984) The nerve growth factor (NGF). *Horm. Prot. Pept.* 12: 1-56.
- (14) 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.
- (15) Cohen, S. y Levi-Montalcini, R. (1956). A nerve-growth stimulating factor isolated from snake venom. *Proc.*

Natl. Acad. Sci. USA 42: 571-574.

- (16) Cohen, S., Levi-Montalcini, R. y Hamburger, V. (1954) A nerve growth-stimulating factor isolated from sarcomas 37 and 180. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 40: 1014-1018.
- (17) Cook, D.L., Ikeuchi, M. y Fujimoto, W.Y. (1984) Lowering of pH_i inhibits Ca²⁺- activated K⁺ channels in pancreatic β -cells. *Nature* 311: 269-271.
- (18) Davidson, H.W., Rhodes, C.J. y Hutton, J.C. (1988) Intracellular calcium and pH control proinsulin cleavage in the pancreatic β cell via two distinct site-specific endopeptidases. *Nature* 333: 92-96.
- (19) Dean, P.M. y Matthews, E.K. (1968). Electrical activity in pancreatic islet cells. *Nature* 219: 389-390.
- (20) Elliséiev, V.G., Afanasiev, Yu.I., Yúrina, N.A. (1985). *Histologiya*. Ed. Mir., Moscú; pp 584.
- (21) Ecurat, M., Djabali, K., Huc, C., London, F., Bécourt, Ch., Boitard, CH., Gros, F. y Porter, M-M. (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 RIN5mF cell line. *Dev. Neurosci.* 13: 424-432.
- (22) Findlay I. y Dunne, M.J. (1985) Voltage-activated calcium currents in insulin-secreting cells. *FEBS Letters* 189: 281-285.
- (23) Freedman, R.B. (1984) Native disulphide bond formation in protein biosynthesis: evidence for the role of protein disulphide isomerase. *TIBS* 9: 438-441.
- (24) Fontaine, J. y Le Douarin, N.M. (1974) New studies of the neural crest origin of the avian ultimobranchial glandular cells. Interspecific combinations and cytochemical characterization of cells based on the uptake of biogenic amine precursors. *Histochemistry* 38:297-305.
- (25) Ginty, D., Fanger, G., Wagner, J y Mauc, R. (1992) The activity of cAMP-dependent protein kinase is required at a posttranslational level for induction of voltage-dependent sodium channels by peptide growth factors in PC12 cells. *J. Cell. Biol.* 116(6): 1465-1473.
- (26) Greenberg, M.E. y Greene, L.A.; Ziff, E.H. (1985) Nerve growth factor and epidermal growth factor induced rapid and transient changes in protooncogene transcription in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 260: 14101-14110.
- (27) Greene, L.A. y Shooter, E.M. (1980) The nerve growth factor: biochemistry, synthesis and mechanism of action. *Annu. Rev. Neurosci.* 3: 353-402.
- (28) 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.
- (29) Greene, L.A. y Tischler, A.S. (1982). PC12 pheochromocytoma cultures in neurobiological research. *Adv. Cell. Neurobiol.* 3: 373-414.
- (30) Hales, C.N. y Milner, R.D.G. (1968) The role of sodium and potassium in insulin secretion from rabbit pancreas. *J. Physiol. (London)* 194: 725-743.
- (31) Hellman, B. (1970) Methodological approaches to studies on the pancreatic islets. *Diabetologia* 6: 110.
- (32) Hempstead, L., Martin-Zanca, D., Kaplan, D.R., Parada, L.F. y Chao, M. (1991) High-affinity NGF binding

requires coexpression of the *trk* protooncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature*. 350: 678-683.

(33) Henquin, J.C. (1990) Role of voltage- and Ca^{2+} -dependent K^+ channels in the control of glucose-induced electrical activity in pancreatic B-cells. *Pflügers Arch*. 416: 568-573.

(34) Henquin, J.C. y Meissner, H.P. (1984) Significance of ionic fluxes and changes in membrane potential for stimulus-secretion coupling in pancreatic B-cells. *Experientia* 40: 1043-1052.

(35) Hille, B. (1992) Ionic channels of excitable membranes. 2a ed. Sinauer Associates, Inc. Mass. USA.

(36) Hiriart, M. (1993). La actividad de los canales iónicos y la secreción de insulina de células B- pancreáticas. En: Comunicación neuroendócrina: bases celulares y moleculares. Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, A.C.; pp. 149-164.

(37) Hiriart, M. y Mattesson, D.R. (1988) Na channel and two types of Ca channels in rat pancreatic B cell identified with the reverse hemolytic plaque assay. *J. Gen. Physiol.* 91: 617-639.

(38) Hiriart, M. y Ramirez-Medelez, M.C. (1991) Functional subpopulations of individual pancreatic B-cells in culture. *Endocrinology*. 128(6): 3193-3198.

(39) Horta, J; Hiriart, M. y Cota, G. (1991) Differential effects of Na channels in functional subpopulations of rat lactotropes. *Am. J. Physiol.* 261 (Cell Physiol. 30): C865-C871.

(40) Junqueira, I.C., Carneiro, J. y Kelley, R.O. (1989) Basic Histology. Appleton and Lange, N.Y., USA, 6ª edición.

(41) Kalman, D., Wong, B., Horvai, A., Cline, M. y O'Laugue, P. (1990) Nerve growth factor acts through cAMP-dependent protein kinase to increase the number of sodium channels in PC12 cells. *Neuron* 2: 355-366.

(43) Kaplan, D.R., Hempstead, B.L., Martin-Zanca, D., Chao, M.V. y Parada, L.F. (1991) The *trk* proto-oncogene product: A signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science* 252: 554-558.

(43) Keahcy, H.H., Rajan, A.S., Boyd, A.E. III. y Kunze, D.L. (1989) Characterization of voltage-dependent calcium channels in a B-cell line. *Diabetes* 38: 188-193.

(44) Koester, J. (1991) Membrane potential. En: E.R. Kandel, J.H. Schwartz y T.M. Jessel (eds). Principles of neural science. 3a ed. Elsevier, New York, pp 81-94.

(45) Lacy, P.E. y Greider, M.H. (1971) Ultrastructural organization of mammalian pancreatic islets. En: Handbook of physiology (ed.S.R.Grainger) Section 7, 1: 77-90.

(46) Lacy, P.E. y Kostianovsky, M.D. (1967) Method for isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes*. 16: 35-39.

(47) Levi-Montalcini, R. y Hamburger, V. (1953) A diffusible agent of mouse sarcoma, producing hyperplasia of sympathetic ganglia and hyperneurotization of viscera in the chick embryo. *J. Exp. Zool.* 123: 233-287.

(48) Lively, M.O. (1989) Signal peptidase in protein biosynthesis and intracellular transport. *Curr. Opinion Cell Biol.* 1: 1188-1193.

(49) Malaisse-Lagae, F., Mathias, P.C.F. y Malaisse, W.J. (1984) Gating and blocking of calcium channels by dihydropyridines in the pancreatic B-cell. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 123: 1062-1068.

- (50) Mandel, G., Cooperman, S.S., Maue, R.A., Goodman, R.H. y Brehm, P. (1988) Selective induction of brain type II Na⁺ channels by nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85: 924-928.
- (51) Meakin, S.O. y Shooter, E.M. (1992) The nerve growth factor family of receptors. *TINS*, 15(9): 323-331.
- (52) Meissner, H.P. y Schmelz, H. (1974) Membrane potential of β -cells in pancreatic islets. *Pflügers Arch.* 351: 195-206.
- (53) Neil, J.D. y Frawley, L.S. (1983) Detection of hormone release from individual cells in mixed populations using a reverse hemolytic plaque assay. *Endocrinology*. 112: 1135-1137.
- (54) Neher, E. y Sakmann, B. (1992) The patch clamp technique. *Scientific American* 266(3): 28-35.
- (55) Pelham, H.R.B. (1989) Control of protein biosynthesis and intracellular transport. *Curr. Opinion Cell Biol.* 1: 1188-1193.
- (56) Plant, T.D. (1988) Na⁺ currents in cultured mouse pancreatic β -cells. *Pflügers Arch.* 411: 429-435.
- (57) Polak, M., Scharfmann, R., Seilheimer, B., Eisenbarth, G., Dressler, D., Verma, I. y Potter, H. (1993) Nerve growth factor induces neuron-like differentiation of insulin-secreting pancreatic β -cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90: 5781-5785.
- (58) Pullo, A., Lovallo, M., Biancardi, E., Sher, E., Socci, C. y Carbono, E. (1993) Sensitivity to dihydropyridines, ω -conotoxin and noradrenaline reveals multiple high-voltage-activated Ca²⁺ channels in rat pancreatic islet insulinoma and human pancreatic β -cells. *Pflügers Arch.* 423: 462-471.
- (59) Pollock, J., Krempin, M. y Rudy, B. (1990) Differential effects of NGF, FGF, EGF, cAMP and Dexamethasone on neurite growth and sodium channel expression in PC12 cells. *J. Neurosci.* 10(8): 2626-2637.
- (60) Quiroz, G.F. (1990) Intestinos. En: Anatomía Humana. Ed. Porrúa S.A. Vol.II: 203-213.
- (61) Radeke, M.J. y Feinstein, S. (1991) Analytical purification of the slow, high affinity NGF receptor: identification of a novel 135 kd polypeptide. *Neuron* 7: 141-150.
- (62) Retz, A., Solimena, M., Matteoli, M., Folli, F., Takei, K. y De Camilli, P. (1991). GABA and pancreatic β -cells: colocalization of glutamic acid decarboxylase (GAD) and GABA within synaptic-like microvesicles suggests their role in GABA storage and secretion. *EMBO J.* 10: 1275-1284.
- (63) Rorsman, P. y Trube, G. (1986) Calcium and delayed potassium currents in mouse pancreatic β -cells under voltage-clamp conditions. *J. Physiol.* 374: 531-550.
- (64) Rudy, B., Kirschenbaum, B. y Greider, L.A. (1982) Nerve growth factor-induced increase in saxitoxin binding to rat PC12 pheochromocytoma cells. *J. Neurosci.* 2: 1405-1411.
- (65) Sala, S. y Mattsson, D.R. (1990) Single channel recordings of calcium channels in pancreatic β -cells. *Biophys. J.* 57: 525A.
- (66) Sánchez, M.C. (1994) Análisis de la secreción de insulina por células β pancreáticas aisladas en cultivo tratadas con NGF y AMF. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias; Depto. Biología; UNAM.

- (67) Siegelbaum, S.A. y Koester, J. (1991) Ion channels. En: E.R. Kandel, J.H.Schwartz y T.M. Jessell. (eds) Principles of neural science. 3a Ed. Elsevier, New York, pp. 66-79.
- (68) Smith, P.A., Rorsman, P. y Ascroft, F.M. (1989) Modulation of dihydropyridine-sensitive Ca^{2+} - channels by glucocorticoid metabolism in pancreatic B-cells. *Nature* **342**: 550-553.
- (69) Smith, P.F., Luque, E.H. y Neill, J.D. (1989) Detection and measurement of secretion from individual neuroendocrine cells using a reverse hemolytic plaque assay. En: Neuroendocrine peptide methodology. Ed. Conn. M.P. Academic Press.
- (70) Steiner, D.F., Bell, G.I. y Tager, H.S. (1989) Chemistry and biosynthesis of pancreatic proteins. En: Endocrinology (ed.I.J. De Groot) Chapter 15. Saunders Co., Harcourt Brace Jovanovich Inc., Philadelphia.
- (71) Teitelman, G. (1990) Insulin cells of pancreas extend neurites but do not arise from the neuroectoderm. *Dev. Biol.* **142**: 368-379.
- (72) 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. pp 37-42. Cold Spring Harbor, New York.
- (73) Teitelman, G., Lee, J.K. y 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.
- (74) Teitelman, G., Joh, T.H. y Reis, D.J. (1981) Transformation of catecholaminergic precursors into glucagon (A) cells in mouse embryonic pancreas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**: 5225-5229.
- (75) Thoenen, H., Bandtlow, C. y Heumann, R. (1987) The physiological function of nerve growth factor in the central nervous system: comparison with the periphery. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **109**: 145-178.
- (76) 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.
- (77) Vidal-Tamayo, R. Efecto del NGF sobre la morfología de las células B. Tesis de Licenciatura. UNAM. 1994.
- (78) Weidenmann, B., Franke, W.W., Kuhn, C., Moll, R. y Gould, V.E. (1986) Synaptophysin: A marker protein for neuroendocrine cells and neoplasms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**: 3500-3504.
- (79) Welcher, A.A., Bitler, C.M., Radeke, M.J. y Shooter, E.M. (1991) Nerve growth factor binding domain of the nerve growth factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**(1): 159-163.