

03062

10

209



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS  
PROFESIONAL Y DE POSGRADO DEL COLEGIO  
DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

SECRECIÓN DE INSULINA POR LAS CELULAS  $\beta$   
PANCREÁTICAS FETALES AISLADAS.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN INVESTIGACION BIOMEDICA

**BASICA**

(AREA DE NEUROCIENCIAS)

PRESENTA LA BIOLOGA:

**MARIA TERESA MARTINEZ MERLOS**

MEXICO, D. F.

1995

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.

**A Daniel**

**Por el cariño tan auténtico y el apoyo que me brinda cada día.**

**A Oscar**

**Por su grata presencia.**

### **Agradecimientos**

**A los sinodales: Dr. Mauricio Díaz Muñoz, a la Dra. Elvira Galarraga, al Dr. Julio Morán Andrade, al Dr. Carlos Arámburo y a la Dra. Marcia Hiriart U., por emplear un poco de su valioso tiempo en la revisión de esta tesis.**

**A la Dra. Hiriart**

**De manera especial por contribuir a mi formación académica.**

**A Daniel Granados**

**Por su interés en mejorar las figuras y las gráficas de este trabajo.**

**A mis padres**

**Por ser un ejemplo de constancia y fortaleza.**

**Al Dr. Mauricio Díaz**

**Por sus valiosos comentarios y sugerencias y en especial por la confianza que ha puesto en mí. Gracias por no olvidarme y tender una mano amiga permitiendome formar parte de su equipo de investigación.**

**Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de la Dra. Marcia Hiriart del depto de Bioenergética del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.**

**Durante la realización de esta tesis recibí el apoyo de una beca de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM.**

## **INDICE**

	<b>Página</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>Introducción.</b>	
-El páncreas y estructura del islote pancreático	2
-Ultraestructura de las células $\beta$	3
-Origen del páncreas e hipótesis endodérmica	4
-Hipótesis neuroectodérmica	6
-Vascularización del páncreas	8
-Inervación del páncreas	9
-Estructura de la insulina	14
-Biosíntesis y regulación	15
-La glucosa regula la secreción de insulina	18
-Transporte de glucosa	21
-Heterogeneidad funcional de las células $\beta$	21
-Papel de la glucosa en el mecanismo de acoplamiento entre estimulación-secreción	22
-Papel del AMPc	25
Factores que controlan la secreción	26
Efecto de acetilcolina sobre la secreción	28
II Hipótesis y objetivos	30
III Material y métodos	32
IV Resultados	38
V.-Discusion	64
VI.- Conclusión	75
VII.- Referencias	77

## **RESUMEN**

La insulina secretada por las células  $\beta$  pancreáticas juega un papel importante en la homeostasis de la glucosa. Este monosacárido es el secretagogo más importante en la secreción de insulina y participa también en la regulación de biosíntesis de la hormona. Además de la glucosa, existen otros secretagogos que estimulan la secreción de insulina, entre los que se encuentran el agonista muscarínico carbacol (CCh) y el mensajero intracelular AMPc.

En base a resultados previos realizados en células  $\beta$  adultas (Hiriart y Ramírez-Medeles 1991 y 1993), el propósito de este trabajo fue caracterizar la respuesta a la glucosa y CCh de las células  $\beta$  fetales aisladas de ratas de 18 días de vida intrauterina (v.i.).

Se observó que la respuesta de las células  $\beta$  fetales a la glucosa es heterogénea. En la concentración de glucosa basal (5.6 mM) se observaron 2 subpoblaciones de células  $\beta$  con diferente tasa de secreción de insulina, sin embargo cuando las células fueron estimuladas con concentraciones de glucosa alta (20.6 mM) se encontró además una tercera subpoblación.

El CCh potenció la secreción de insulina en las células fetales al igual que en las células adultas (Hiriart y Ramírez-Medeles 1993) este efecto dependió de la concentración extracelular de glucosa.

Un dato interesante obtenido en este trabajo, es que el análogo db-AMPe aumentó la secreción de insulina únicamente en presencia de CCh.

En conclusión se puede decir que las células  $\beta$  fetales exhiben una extraordinaria plasticidad para responder a los diferentes estímulos a los que son expuestas, de manera similar a las células  $\beta$  adultas.

## **INTRODUCCION**

### ***El páncreas de los mamíferos.***

El páncreas es una glándula mixta, de secreción tanto exocrina, como endocrina. La función exocrina la realiza el tejido acinar que elabora y secreta el jugo pancreático hacia el duodeno. El jugo pancreático es rico en enzimas como tripsina, lipasa, amilasa etc., las cuales participan en el catabolismo de proteínas grasas y carbohidratos. La función endocrina la llevan a cabo los islotes de Langerhans, los cuales controlan el metabolismo de los nutrientes a través de hormonas como la insulina y el glucagón, que se secretan hacia el torrente sanguíneo.

### ***Estructura del islote pancreático:***

Los islotes se encuentran separados del resto del tejido pancreático por una fina membrana basal y constituyen del 1 al 3 % del total del peso del páncreas encontrándose en una densidad mayor en la cola de la glándula (Hellman, 1970).

Los islotes de Langerhans varían considerablemente en tamaño (50 a 500  $\mu\text{m}$  de diámetro) y en el número de células que los componen (Stevens y Lowe, 1992). Generalmente los islotes están compuestos por al menos 4 tipos de células endocrinas: las células  $\beta$  que secretan insulina; las células  $\alpha$ , que secretan glucagón; las células  $\delta$  que secretan somatostatina y las células  $\text{pp}$  o  $\text{F}$  que secretan polipéptido pancreático. También están presentes células endoteliales, nerviosas y fibroblastos.

En el islote las células endocrinas se encuentran en comunidades celulares organizadas (Orci et al., 1975), donde en la rata las células  $\beta$  se



distribuyen en la parte central del islote y constituyen el 80 % de la población celular del islote, las células  $\alpha$  y las células  $\delta$  se distribuyen hacia la región periférica del islote y forman el 15 % y 5 % respectivamente de la población total del islote (ver figura 1).

La organización de las células permite que los productos secretados por un determinado tipo celular interaccionen paracrinamente sobre las otras células endocrinas (Samols, et al, 1986; Lernmark y Hellman, 1970; Waldhausl, et al., 1982).

Las células endocrinas intercambian iones y moléculas de bajo peso molecular (como sustratos metabólicos) a través de uniones comunicantes. Las uniones comunicantes conducen las señales bioeléctricas y es posible que participen así en el control de la secreción hormonal (Meda et al 1983).

### ***Histología y ultraestructura de las células $\beta$ .***

Las células  $\beta$  son de forma poligonal y tienen un diámetro de 10 a 15  $\mu\text{m}$ . La membrana plasmática de las células presenta algunos signos de polaridad en su organización (Orci et al, 1989). Se encuentran agrupadas de 8 a 10 células alrededor de un capilar, con su polo apical o secretor orientado hacia la luz del mismo (Bonner-Weir 1988).

Ultraestructuralmente las células poseen un citoplasma con un núcleo prominente, retículo endoplásmico rugoso y liso, aparato de Golgi, mitocondrias, microtúbulos, microfilamentos (Hedekov, 1980) y numerosos gránulos secretores de insulina cuyo tamaño es de 250 a 275 nm (Cook y Taborsky, 1990). Los gránulos de insulina son opacos a los electrones y se tiñen de color púrpura con aldehído-fucsina.

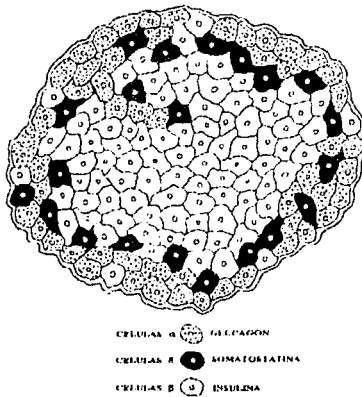


Figura 1. Anatomía del islote pancreático de rata. En la figura se representan las principales células que lo integran. Nótese la predominancia de células β y su distribución en el centro del islote (modificada de Orci y Unger, 1975).

### *Origen embriológico del páncreas*

Todavía se debate el origen embriológico de las células endocrinas pancreáticas. El punto de vista tradicional establece que derivan del endodermo, del mismo modo que las células acinares y conductos pancreáticos procedentes del intestino primitivo (Pictet y Rutter 1972).

### **Hipótesis endodérmica del desarrollo del páncreas endocrino.**

Por medio de observaciones bioquímicas y ultraestructurales, Pictet y Rutter (1972), sugirieron que el páncreas de varias especies, incluyendo la rata se desarrolla en dos fases:

- a) En la primera fase o estado protodiferenciado se forma el divertículo pancreático y se inicia la síntesis de proteínas del tejido exocrino. Las células mesenquimatosas se acumulan alrededor del intestino primitivo y forman una especie de cubierta sobre el divertículo pancreático.
- b) En la segunda fase o estado diferenciado las células  $\beta$  se diferencian y aumenta la síntesis de insulina y de proteínas exocrinas. Ambas fases se describen a continuación:

#### ***i) Formación del divertículo pancreático.***

El páncreas de rata se forma a los 11 días de gestación (20 somitas) a partir de las evaginaciones de la pared dorsal y ventral del intestino primitivo, que al proliferar forman la cabeza y la cola del páncreas.

A los 11-12 días de gestación se forma el divertículo pancreático primordial a partir de la división de las células endodérmicas en el lumen intestinal. La proliferación celular posterior da lugar a la formación del brote pancreático (20-24 somitas), en donde por división y crecimiento celular se forman los primeros islotes y acinos pancreáticos. En esta etapa temprana del desarrollo (20-22 somitas) las células endocrinas se encuentran integradas aun en la matriz exocrina, después se aíslan y se vascularizan independientemente del tejido exocrino.

Sólo hasta los 14-15 días de gestación en la rata, los islotes forman una estructura en forma de cordones situadas en uno o varios acinos y a los 20-21 días, se observan islotes maduros, con su forma redonda típica y

rodeados de fibras de colágena.

Los islotes aumentan de tamaño posnatalmente en una relación proporcional al peso corporal. Al parecer, gran parte del crecimiento de los islotes es debido al aumento de tamaño de los islotes preexistentes y no a la formación de nuevos islotes (Porte y Halter, 1985).

## ii) *Desarrollo de las células endocrinas*

En el estadio de 20-22 somitas (día 11) las células endocrinas dispersas en todo el brote pancreático se tiñeron con azul de metileno y con el análisis de microscopía electrónica se observó por primera vez la presencia de gránulos de insulina (Pictet 1972).

En el estadio de 28-30 somitas los islotes son pequeños y contienen al menos una docena de células. Posteriormente aumenta el número de células endocrinas. Este aumento no es a causa de la proliferación celular, sin embargo es posible que se deba a la fusión de islotes pequeños, lo cual formaría islotes más grandes o bien a la diferenciación de algunas células endocrinas en la matriz exocrina, ya que durante la mitosis, el eje de división de las células acinares es perpendicular al lumen, por lo cual es posible que alguna célula hija sea liberada e incorporada a los islotes. (Pictet 1972 y 1976).

Las células  $\beta$  son de las últimas que se diferencian en el islote. Aparecen aproximadamente en el día 16 de gestación y llegan a ser el tipo celular predominante por el día 18-19 de gestación; sin embargo, son funcionalmente inmaduras para secretar insulina (Ammon, 1989; Rorsman 1989), mientras que las células  $\alpha$  y  $\delta$  han sido detectadas poco antes del día 15 (Pictet, 1972).

### ***Hipótesis ectodérmica del origen del páncreas endocrino.***

En base a estudios citoquímicos y ultraestructurales se ha propuesto que las células de la cresta neural contribuyen al desarrollo de los islotes pancreáticos. Pearse (1969) consideró por primera vez a las células endocrinas secretoras de polipéptidos dentro del esquema del sistema APUD (Amine content and/or amine precursor uptake and decarboxilation) en base a una característica enzimática común y que consiste en la capacidad de captación y descarboxilación de precursores de aminoácidos de monoaminas fluorogénicas (3, 4-dihidroxifenilalanina para catecolaminas o 5-hidroxitriptofano para serotonina) y una L-aminoácido descarboxilasa, (AADC). Pearse (1968) sugirió que las células que presenten dicha propiedad derivan de la cresta neural.

### **Marcadores neuronales**

Los islotes pancreáticos comparten con las células del sistema APUD algunos marcadores neuronales como son: la expresión de antígenos neuroectodérmicos (Thompson et al., 1983), enolasa específica de neuronas (Schmechel et al., 1978), sinaptofisinas (Weidenmann et al., 1986), la tirosina hidroxilasa (TH) (Teitelman y Lee 1987), receptores para la toxina del tétano y anticuerpos monoclonales para A2B5 (Eisenbarth et al., 1982), fenil etanol amina N-metil transferasa (Teitelman y Evinger 1988), expresión de proteínas de los filamentos intermedios (NF-L) y periferinas (Ecurat, et al 1991), y un alto contenido de GABA (Reetz, et al 1991; Xiao-Hong Gu, et al 1992; Gilon, et al, 1991). Una característica observada en las células  $\beta$  es que son eléctricamente excitables (Dean, y Matthews, 1968; revisado por Ozawa y Sand, 1986) y responden a los estímulos por despolarización y exocitosis de la insulina a través de un

proceso análogo a la liberación de neurotransmisores.

Otra característica que apoya un posible origen neuroectodérmico, es que las células  $\beta$  extienden procesos parecidos a los neuronales de manera espontánea, cuando se cultivan "in vitro" (Teitelman, 1990). Además las células  $\beta$  poseen la capacidad de responder al factor de crecimiento neural cambiando su morfología redonda a una muy parecida a la neuronal (Vidal-Tamayo et al., en preparación).

#### *Evidencias en contra del origen ectodérmico del páncreas.*

Pictet (1976) observó el desarrollo del páncreas y de las células  $\beta$  en embriones de rata en cultivo a los que previamente se removió el precursor ectodérmico de la cresta neural.

Por otro lado para comprobar si las células endocrinas se derivan a partir de precursores neuroectodérmicos que migrasen al endodermo antes de que se forme la cresta neural Fontaine et al, (1977) y Le Douarin, (1988) contruyeron embriones quiméricos "in vitro" en el estado de neurula, asociando el neuroectodermo de codorniz con el endomesodermo de pollo. En el análisis de los explantes desarrollados se observó que los ganglios entéricos se originaron a partir del ectodermo de codorniz mientras que el epitelio intestinal, el páncreas y las células endocrinas se originaron del endodermo de pollo. Con estos resultados descartaron la posibilidad de que los islotes pancreáticos se deriven de un precursor ectodérmico.

#### *Vascularización del páncreas.*

El páncreas es irrigado por la arteria celiaca en su parte dorsal y por la arteria mesentérica superior en su región ventral. El páncreas recibe

ramas de la arteria celiaca a través de la arteria pancreático duodenal y esplénica y también recibe pequeñas ramas de la arteria hepática. El drenaje venoso lo llevan a cabo las venas esplénica y mesentérica

Las arteriolas aferentes se ramifican en el islote en una red de capilares fenestrados para formar un glomérulo capilar (Bonner-Weir y Orci, 1982). El 10 al 20 % de la sangre que entra al páncreas es dirigida a estos glomérulos. En la rata los glomérulos capilares se localizan en la parte central del islote y son drenados por capilares eferentes que corren a través del manto del islote. El flujo de sangre pasa a la parte central del islote, se bifurca en los capilares y regresa a la periferia del islote (Holst, 1992).

Las células endocrinas están separadas del compartimiento vascular por un espacio intersticial y por células endoteliales fenestradas, que facilitan el intercambio de pequeñas moléculas entre el espacio intersticial y vascular (Beaer y Orci 1985)

### **Regulación nerviosa de la secreción de insulina**

#### ***Inervación del páncreas.***

Cajal (1891) y Muller (1892) (citados por Coupland 1958) fueron los primeros en estudiar la inervación del páncreas, ellos observaron aferencias y células multipolares en el islote. Estas fibras procedentes de los sistemas simpático y parasimpático (De Castro 1923), forman un plexo con la pared de los vasos sanguíneos y están asociados con el tejido acinar (Coupland 1958; Porte, et al, 1981).

Las fibras nerviosas no forman sinápsis clásicas con las células del islote, pero aún así, liberan su neurotransmisor en sitios especializados. Los nervios terminan abruptamente a unos 20-30 nm de la célula

endocrina, por lo que el neurotransmisor difunde a través del espacio extracelular afectando así a varias células (Porte, 1981).

Las fibras catecolaminérgicas del simpático provienen del nervio esplácnico y entran al islote vía el ganglio celiaco (ver figura 2). La estimulación de estas fibras inhibe la secreción de insulina y estimula la secreción de glucagón.

Las fibras post-ganglionares del parasimpático en su mayor parte son colinérgicas (ver figura 2) y la estimulación de estas fibras aumenta la secreción de insulina. Sin embargo algunas de estas fibras son peptidérgicas (Furness y Costa 1980).

Algunos de los péptidos que se han identificado en los nervios pancreáticos de mamífero son los siguientes: péptidos opioides, péptido vasoactivo intestinal (VIP), colecistocinina (CCK), péptido liberador de gastrina (GRP o bombesina de mamífero), péptido inhibidor gástrico (GIP), neuropéptido Y, péptido relacionado al gen de calcitonina (CGRP), péptido histidina-isoleucinamida (PHI), galanina, sustancia P y encefalina (Smith y Porte, 1976; Alren, et al, 1986; Rehfeld, et al 1980). Los neuropéptidos podrían ser liberados de los nervios pancreáticos en paralelo con el neurotransmisor clásico (Holst, 1992). Se desconoce el efecto de estos péptidos sobre la liberación hormonal del islote pancreático aunque, es posible que modulen la secreción hormonal.

Con ayuda de técnicas histoquímicas y ultraestructurales se han podido observar ganglios positivos a acetilcolinesterasa en explantes de páncreas fetal de rata (18 días v.i.), cultivados por 6 días (Brin et al 1977). Estos ganglios están rodeados por células de Schwann y axones no mielinizadas en la periferia del islote. Asimismo con análisis químicos y con microscopía de fluorescencia se han observado nervios simpáticos en



el páncreas de rata de 21 días de v.i. (Gasparo, et al 1978). Estas observaciones sugieren que el páncreas fetal presenta una innervación simpática y parasimpática intrínseca específica del islote.

El sistema nervioso central modula la liberación de las hormonas en las células  $\beta$ , a través de la unión de los neurotransmisores a los receptores membranales específicos como son: receptores muscarínicos del subtipo M3, para acetilcolina (ACh) (Henquin y Nenquin 1988); receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos (inhibitorios) para epinefrina (Schuit y Pipeleers, 1986) y  $\beta_1$  y  $\beta_2$  adrenérgicos (estimuladores) para norepinefrina (Ahrén et al, 1986). Se han descrito también receptores (A1) para adenosina (inhibitorios) (Hillaire Buys 1994).

Es posible que el hipotálamo modifique de una manera indirecta la actividad de los nervios del sistema nervioso autónomo en el páncreas. Por ejemplo la estimulación del núcleo hipotalámico ventromedial aumenta los niveles de glucagon, sin afectar la secreción de insulina y la estimulación del núcleo ventrolateral aumenta los niveles de insulina sin afectar el nivel de glucagon (Steffens et al., 1981 y 1984).

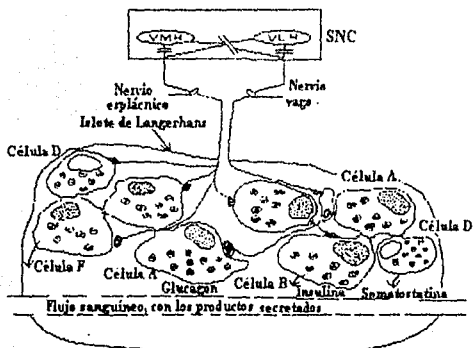


Figura 2. Representación esquemática de la innervación por el sistema nervioso autónomo del islote pancreático (modificada de Ponc et al., 1990)

**Receptores muscarínicos.**

Existen múltiples receptores muscarínicos para ACh que difieren en la acción celular y fisiológica de la ACh. Hasta ahora se han clonado y secuenciado 5 genes de receptores muscarínicos de diversos tejidos de humano (Bonner et al 1987, Hulme et al., 1990 y 1993). Todos los receptores muscarínicos forman una estructura genérica común que consiste de 7 dominios transmembranales hidrofóbicos, con un secuencia N-terminal extracelular y una C-terminal intracelular (Hulme et al., 1993).

Los receptores muscarínicos contienen varios residuos de ácido aspártico muy bien conservados, los cuales es posible estén involucrados en la unión del grupo catiónico del ligando (agonista o antagonista) (Hulme et al., 1989).

Por medio de estudios de farmacología se observó que en los islotes

pancreáticos se encuentra el subtipo M3 de receptores muscarínicos (Henquin y Nenquin, 1988 Verspohl et al., 1990), el cual también se encuentra en el páncreas exocrino (Dehaye et al., 1983), en vista de la inhibición específica de este receptor con el antagonista sila metil sulfato hexociclo (SiHC) (Verspohl et al., 1990).

#### *Sistema de transducción de los receptores muscarínicos.*

El sistema de transducción de los receptores muscarínicos involucra la activación de una determinada proteína G, por ejemplo los receptores M1 y M3 implica la activación de una Proteína Gs (estimuladora), a partir de la activación de una fosfolipasa C, esta fosfolipasa hidroliza fosfoinosítidos membranales (fosfatidil inositol 4,5 bisfosfato) (Wollheim, et al 1986; Morgan, et al 1985; Best y Malaisse 1983a) formando a su vez, dos moléculas importantes en la secreción de insulina: el inositol trisfosfato (IP<sub>3</sub>) y el diacilglicerol (DAG) (Eason, et al 1990).

Los receptores M1 y M3, dependiendo del tipo celular, también pueden producir un aumento en el AMPc por la activación de la adenilato ciclasa, lo cual es mediado por una proteína Gs.

Los receptores M2 y M4 actuando a través de una proteína Gi (inhibitoria), inhiben la actividad de adenilato ciclasa o estimulan la hidrólisis de fosfoinosítidos membranales (Hulme et al., 1990).

#### *Papel del nervio vago en la secreción de insulina.*

La secreción de insulina aumenta cuando se piensa en comer o simplemente con el olor de la comida. La fase cefálica de la secreción o respuesta anticipatoria a una comida, comienza antes de la absorción de glucosa y permanece brevemente (1 minuto) después de la ingestión de

alimentos. Esta respuesta temprana de secreción de insulina no se ha observado en ratas vagotomizadas y perfundidas con atropina (Berthoud, et al, 1980; Rasmussen, et al, 1990), lo cual apoya el papel del parasimpático en mediar la fase cefálica de la secreción de insulina.

Durante la fase intestinal de la digestión, la secreción de insulina es potenciada por hormonas del tracto gastrointestinal y finalmente la absorción de glucosa en el intestino estimula directamente la secreción de insulina (Buchan, 1989).

### ***Bioquímica de la molécula de insulina.***

#### **Estructura de la Insulina**

La insulina (PM 6000 daltones) fué la primera proteína cuya secuencia de aminoácidos fué dilucidada (Sanger, 1957). Este autor encontró que la molécula de insulina estaba formada por dos cadenas peptídicas: una cadena A (21 aminoácidos) y una cadena B (30 aminoácidos) unidas por 2 puentes disulfuro (en posiciones 7 y 20 de la cadena A y 7 y 19 de la cadena B). También hay un puente disulfuro intracatenario (que une los restos 6 y 11 de la cadena A).

La estructura de la insulina se encuentra muy conservada desde un punto de vista evolutivo, por ejemplo la cadena B de la insulina humana difiere en solo un aminoácido de la hormona porcina (Ashcroft y Ashcroft 1992). Las características invariables incluyen: la posición de los 3 enlaces disulfuro, las regiones N-terminal y C-terminal de la cadena A y los residuos hidrofóbicos en la región C-terminal de la cadena B (Bailey et al., 1992).

### *Estructura del gen de insulina*

El gen de la insulina humana está localizado en el brazo corto del cromosoma 11 y parece ser homólogo al cromosoma 7 de rata. La estructura del gen de insulina consiste de 3 exones y 2 intrones. El exón 1 está localizado en la región 5' del gen. El exón 2 contiene secuencias codificadoras del péptido señal, la cadena B y parte del péptido C, el exón 3 codifica el remanente del péptido C, la cadena A y la región 3'. La longitud y secuencia de los intrones son altamente variables entre las especies (Bell, et al 1980).

El gen de insulina es transcrito por una RNA polimerasa a RNAm, el cual contiene los exones y los intrones. El RNAm se transporta al citoplasma para la traducción, que da lugar a la molécula precursora de insulina: la preproinsulina (PM 11 500). La preproinsulina es sintetizada como un polipéptido constituido por las secuencias correspondientes al péptido señal N-terminal, las cadenas A y B y el péptido C (Ashcroft y Ashcroft 1992).

### *Biosíntesis de insulina.*

La biosíntesis de insulina es regulada por diversos agentes incluyendo la glucosa, algunos aminoácidos, neurotransmisores y hormonas (Hedekov, 1980, Permutt 1981).

La biosíntesis de insulina es independiente de la secreción de la hormona, ambos fenómenos pueden ser disociados bajo ciertas condiciones. Por ejemplo, en un medio sin calcio o con la administración de somatostatina se inhibe la secreción de insulina estimulada por una concentración de glucosa alta (20 mM), pero no se afecta la biosíntesis. Asimismo algunos agentes como el glucagon y la tolbutamida incrementan

la secreción estimulada por glucosa sin afectar la biosíntesis (Pipeleers et al., 1973). El umbral para la activación de la secreción de insulina estimulada por glucosa es (4.2 a 5.6 mM) más alto que para la síntesis de insulina (2.5 a 3.9 mM) (Pipeleers et al 1973; Schuit, et al 1991).

Los efectos de la glucosa son específicos sobre la biosíntesis de insulina, ya que cuando los islotes se incuban con una concentración baja de glucosa (2.8 mM) por 90 minutos, cerca del 6 % de las proteínas sintetizadas son proinsulina e insulina, mientras que en 15.5 mM de glucosa, la proporción de estas proteínas aumenta al 22 % (Permutt y Kipnis 1972)

#### ***Regulación de biosíntesis de insulina.***

La regulación de biosíntesis de insulina inducida por glucosa se puede ejercer a tres niveles: 1) transcripción 2) procesamiento del RNAm y su transporte hacia el citoplasma y 3) traducción del RNAm de preproinsulina (Aschroft y Aschroft 1992).

No obstante el mayor punto de control de la glucosa en la síntesis de insulina es a nivel de la traducción. La glucosa estimula la traducción del RNAm de preproinsulina en un lapso corto de tiempo (minutos), mientras que a tiempos más largos la glucosa puede afectar la producción de RNAm nuevo de la insulina y la estabilidad de este RNAm (Welsh et al., 1986).

#### ***Procesamiento biosintético de insulina.***

La traducción del RNAm de preproinsulina comienza en el citosol, con la unión de los ribosomas libres a la molécula. Durante la traducción la preproinsulina es trasladada al lumen del retículo endoplásmico y es removida la secuencia señal (por una peptidasa) con lo cual se forma la

proinsulina (PM. 9000) con los dos enlaces disulfuro. La estructura de la molécula de proinsulina es similar a la de la insulina, excepto por la presencia del péptido C (Ashcroft y Ashcroft 1992). La longitud de este péptido C es de 26 a 38 residuos de aminoácidos (Gross et al., 1989) y tiene la función de estabilidad y plegamiento de las cadenas A y B de la insulina (Bailyes et al, 1992) (Figura 3).

La molécula oxidada de proinsulina es transportada a través de los sáculos del aparato de Golgi pasando por las regiones cis, medial hasta la región trans, en vesículas cubiertas con clatrina (ricas en iones zinc), por ciclos repetidos de formación de vesículas y fusión. Este sistema de transporte de membranas requiere GTP y calcio (Beekers y Balch, 1989).

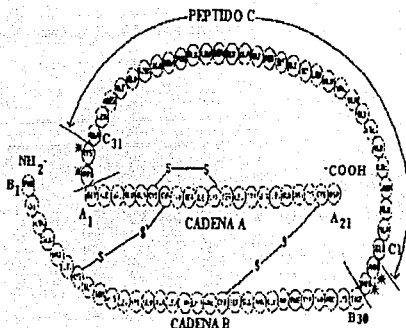


Figura 3. Estructura de la molécula de proinsulina humana. Los 4 aminoácidos básicos que se pierden durante la conversión de proinsulina a insulina se indican con asteriscos. El número de aminoácidos se indica con las letras. Las dos cadenas de la insulina se sintetizan del extremo amino de la cadena B hacia el extremo carboxilo de la cadena A, pasando por el péptido C (modificada de Kitbachi, et. al 1990)

Después de pasar por la región trans del aparato de Golgi, la proinsulina es escindida por enzimas con actividad similar a tripsina y carboxipeptidasa B formando insulina y péptido C en cantidades equimolares. Durante este proceso las vesículas de proinsulina pierden su cubierta parcial de clatrina y se convierten en vesículas secretoras maduras (Orci et al., 1989).

En el gránulo maduro la insulina forma dímeros de insulina y en presencia de zinc y a pH ácido, tres de estos dímeros forman una unidad cristalina hexamérica, lo cual hace a la molécula relativamente insoluble. Mientras que el péptido C permanece soluble en la periferia del gránulo (Cook et al 1990).

La insulina recién sintetizada se libera preferentemente (Rhodes, et al, 1987; Van Schravendijk., et al 1992), mientras que los gránulos de insulina más viejos se acumulan y, si no son secretados se fusionan con los lisosomas para ser degradados (Renold 1971).

Los gránulos maduros se mueven hacia la membrana plasmática de la célula  $\beta$  y se liberan hacia el espacio extracelular. En este movimiento de exocitosis están implicados los microtúbulos y microfilamentos del citoesqueleto de la célula  $\beta$  (Malaisse et al., 1971, Pipelcers et al 1976).

### ***La glucosa regula la secreción de insulina***

La secreción de insulina "in vivo" es regulada principalmente por la concentración de glucosa plasmática y es modulada por hormonas, neurotransmisores y otros nutrientes (Ashcroft y Ashcroft 1992). Los principales agentes que afectan la secreción de insulina (ver figura 4) se han agrupado en iniciadores, potenciadores e inhibidores (Ashcroft y Ashcroft 1992).



Los iniciadores, son agentes que por sí mismos estimulan la secreción de insulina por un mecanismo de acción común: la despolarización de la membrana. Entre estos se encuentran sustratos metabólicos (D-glucosa) y fármacos (tolbutamida).

Los potenciadores como por ejemplo acetilcolina y péptido vasoactivo intestinal, son agentes que por sí solos son inefectivos, pero que aumentan la respuesta secretora a un iniciador como la glucosa y actúan clásicamente a través de la vía de segundos mensajeros.

Los inhibidores como somatostatina y galanina son factores cuyo mecanismo de acción es variable. La integración de estos estímulos en las células  $\beta$  y la cantidad de insulina secretada, refleja el balance entre los factores estimulatorios e inhibitorios (Ashcroft y Ashcroft, 1992).

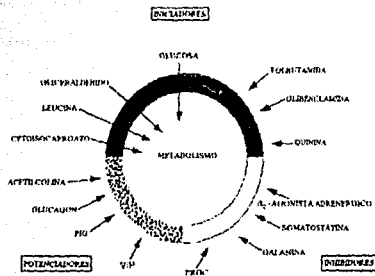


Figura 4. En la figura se representan algunos de los diferentes agentes que afectan la secreción de insulina (modificada de Panten 1987)

### *La secreción de insulina es bifásica.*

La exposición de las células  $\beta$  a una concentración elevada y sostenida de glucosa causa una secreción bifásica de insulina (Taborsky, 1989). Este patrón de secreción se ha demostrado mejor "in vitro", aunque también se ha observado "in vivo".

La primera fase de secreción de insulina es rápida y transitoria y no depende del nivel de glucosa ni se altera por bloqueo de síntesis de insulina. La cantidad liberada en la primera fase es menor del 2 % del contenido de insulina pancreática y esta liberación puede ser importante para el control glicémico como un estímulo de preparación en el hígado y en los sitios periféricos. La segunda fase depende parcialmente de la síntesis de insulina nueva, es más lenta y sostenida, dependiendo del estímulo y del nivel de glucosa. Para explicar la secreción bifásica de insulina, se ha propuesto que la insulina se libera de dos compartimentos, con diferente sensibilidad a la glucosa. El primer compartimento libera la hormona más rápidamente dando la primera fase de secreción. El segundo, en el que la mayor parte de la hormona está almacenada, libera la insulina gradualmente (Grodsky 1972).

Es posible que el movimiento de los gránulos a lo largo de la red de microtúbulos juegue un papel importante en la secreción bifásica de insulina (Malaisse et al., 1974).

Hedekov (1980) ha propuesto otro modelo limitado por señales, en el cual después de la primera fase un factor diferente o algún tipo de inhibición por retroalimentación negativa en conjunción con un factor de potenciación da lugar a la segunda fase.

### *Transporte de glucosa*

La glucosa entra a las células  $\beta$  pancreáticas por un mecanismo de difusión facilitada en el cual una molécula de glucosa se une a la proteína acarreadora y es liberada en el interior de la célula, (Alberts et al., 1994).

Los transportadores de glucosa son proteínas integrales de la membrana con 12 dominios transmembranales los cuales, posiblemente, forman un canal hidrofóbico a través del cual es transportada la glucosa (Gould y Bell, 1990).

Existen 5 transportadores de glucosa y en las células  $\beta$  se encuentra la isoforma GLUT-2 (Gould y Bell 1990). Este transportador se localiza preferentemente en las microvellosidades de las células  $\beta$  (Orci et al. 1989) y tiene una Km para la glucosa de 15-20 mM y una Vmax alta.

### *Heterogeneidad funcional de las células $\beta$ .*

Las células  $\beta$  exhiben diferencias en sus características individuales, como son:

- a) Variación en el contenido de insulina en las células  $\beta$ . Esto ha sido observado por estudios de microscopía de luz y de fluorescencia, en los cuales se indicó que el número de gránulos de insulina y la intensidad de fluorescencia con anticuerpos contra insulina, varían entre las células  $\beta$  (Pipeleers 1987).
- b) En ratas obesas se han descrito dos subpoblaciones con diferente sensibilidad a la glucosa: una población que responde a glucosa con un alto transporte de glucosa y una no responsiva con un transporte de glucosa bajo (Tominaga et al., 1986).
- c) Las células  $\beta$  difieren en su actividad biosintética al ser estimuladas por glucosa (Schuit et al., 1988).

d) Por medio de estudios de electrofisiología, Dean y Mathews, (1970) encontraron que los islotes pancreáticos de rata responden a una concentración de glucosa baja (4 mM) disparando potenciales de acción, mientras que otros islotes solamente disparan potenciales de acción en una concentración de glucosa alta (28 mM).

e) La respuesta de las células  $\beta$  individuales a la glucosa es heterogénea (Hiriart y Ramirez-Medeles 1991). Estos autores, utilizando la técnica del ensayo hemolítico inverso, demostraron que las células  $\beta$  secretan distintas cantidades de insulina frente a una misma concentración de glucosa y de acuerdo a esto, propusieron una clasificación de las células  $\beta$ . En 5.6 mM de glucosa observaron dos subpoblaciones secretoras de insulina: una que secreta una pequeña cantidad de insulina (denominada SP,  $< 2000 \mu\text{m}^2$ ) y una que secreta una cantidad media (MP, 2000 a  $4000 \mu\text{m}^2$ ). Mientras que en 20.6 mM de glucosa observaron además una tercera subpoblación que secreta una gran cantidad de insulina (LP,  $> 4000 \mu\text{m}^2$ ).

### *Mecanismos de acoplamiento entre la estimulación de la célula $\beta$ y la secreción de insulina.*

#### *Papel de la glucosa.*

Al entrar la glucosa a la célula  $\beta$ , es fosforilada a glucosa 6 fosfato por la enzima glucocinasa, al proseguir la glucólisis se transforma en piruvato y en condiciones oxidantes entra a las mitocondrias para alimentar al ciclo de Krebs y generar ATP y  $\text{CO}_2$  (Hedeskov, 1980.)

Cuando las células  $\beta$  son estimuladas con glucosa se induce una despolarización de la membrana (Ashcroft et al., 1984; Rorsman y Trube 1986; Mislser et al 1986). La actividad eléctrica es importante en el

acoplamiento entre el estímulo inducido por glucosa y la secreción de insulina, ya que se ha observado una correlación entre el tiempo en el cual la célula se mantiene disparando trenes de espigas durante la fase de meseta y la secreción de insulina (Meissner y Preissler 1979). En un medio sin glucosa el potencial de reposo es relativamente negativo (de -60 a -70 mV) y está determinado por una permeabilidad alta a  $K^+$ ; al aumentar la concentración de glucosa a 5.5 mM la célula se despolariza (10-15 mV). La estimulación por glucosa a una concentración por arriba de 8mM inicia la actividad eléctrica que consiste en oscilaciones lentas recurrentes entre un potencial de reposo y una fase despolarizada en meseta con trenes de espigas rápidas superpuestas (Meissner, 1974 y 1979).

En la respuesta eléctrica de las células  $\beta$  participan diversos canales iónicos, los cuales se han podido identificar utilizando la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana (patch clamp). Entre los canales identificados se encuentran: canales de  $K^+$ - sensibles a ATP (Ashcroft, et al 1984) canales de  $Na^+$ -sensibles a voltaje y dos tipos de canales de calcio conocidos como SD y FD o tipo T y L (Hiriart y Matteson 1987, Rorsman et al., 1988) que difieren en su cinética de activación e inactivación y en su habilidad para transportar cationes.

La apertura de los canales de calcio de desactivación lenta (SD) podrían contribuir al inicio de la despolarización y la apertura de los canales de desactivación rápida (FD) podrían contribuir a la generación de las espigas en la fase en meseta (Hiriart y Matteson, 1988)

divalentes

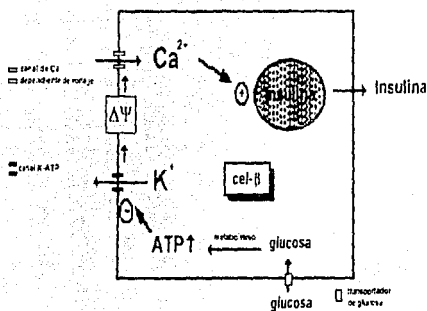


Figura 5. Al entrar la glucosa a la célula y metabolizarse, la relación ATP/ADP cambia. El ATP<sup>i</sup> cierra canales de K<sup>+</sup>-ATP dependientes y la membrana se despolariza, con lo cual se abren canales de Ca<sup>++</sup>-sensibles de voltaje. El aumento en la concentración de Ca<sup>++</sup> en el citoplasma dispara la exocitosis de insulina (modificada de Ashcroft y Ashcroft 1992).

El mecanismo de acoplamiento entre el estímulo y la secreción de insulina no está bien entendido, sin embargo se ha sugerido que el cambio en la relación ATP/ADP (producido por el metabolismo de la glucosa), es importante en el inicio de la despolarización de la membrana de las células  $\beta$ . En este esquema se considera que el ATP cierra canales de K<sup>+</sup>-sensibles a ATP con lo cual disminuye la permeabilidad a potasio y la membrana se despolariza (Ashcroft et al., 1984), esto activa canales de Na<sup>+</sup> y canales de Ca<sup>++</sup> dependientes de voltaje y entra calcio a la célula (Rorsman et al 1988). El aumento en la concentración intracelular de calcio es importante en el mecanismo de exocitosis (ver Figura 5)

El aumento en la concentración de calcio intracelular ha sido

registrado por medio de marcadores fluorescentes como fura-2 y quin-2 en las células  $\beta$  de animales adultos (Prentki y Wollheim, 1984). Por otro lado en células del islote fetal no se han detectado cambios en la concentración de calcio cuando las células son estimuladas con glucosa (Ammon, 1985).

#### *Papel del AMPc en el acoplamiento secreción-estímulo.*

El sistema AMPc-adenilato ciclasa es uno de los mecanismos de transducción de la señal que se activa por la unión de ciertos ligandos a receptores membranales, el complejo receptor-ligando activa a una proteína G que activa o inhibe a la adenilato ciclasa aumentando o disminuyendo la concentración intracelular de AMPc (Alberts et al., 1994).

El nivel de AMPc es controlado ya sea por la activación de la adenilato ciclasa o bien mediante la actividad de fosfodiesterasas del AMPc (Henquin y Meissner, 1984; Pipeleers, et al., 1985).

In vivo, la adenilato ciclasa puede ser estimulada por hormonas como glucagon incrementando los niveles de AMPc en la célula  $\beta$ , (Figura 6) y esto da como resultado un incremento en la secreción de insulina.

Los agentes que se han utilizado para estudiar el efecto del AMPc sobre los islotes pancreáticos incluyen el glucagon, toxina del cólera, metilxantinas y forskolina (Wiedenkeller y Sharp, 1983).

El aumento en el AMPc estimulado por glucagon u otros agentes amplifica la respuesta a iniciadores de la secreción como la glucosa, por lo cual es posible que el AMPc aumente la respuesta de las células  $\beta$  a la glucosa (Malaisse y Malaisse-Lagac, 1984). Se ha observado que el AMPc aumenta la secreción de insulina en el islote pancreático únicamente en concentración de glucosa alta, sin embargo el AMPc no estimula la secreción de insulina en concentraciones de glucosa baja (Christie y

Ashcroft 1984; Wollheim y Sharp, 1981).

La potenciación de secreción de insulina por AMPc involucra posiblemente la regulación de distribución de calcio en las células  $\beta$  y fosforilación de proteínas específicas.

El AMPc activa a la proteína cinasa A (PKA) que transfiere el grupo fosfato terminal del ATP a residuos de serina o treonina de las proteínas sustrato como las proteínas contráctiles de microfilamentos y microtúbulos (tubulina) (Christie y Ashcroft 1984 y 1985; Pipeleers et al., 1976). La tubulina interactúa con los gránulos secretores para llevar a cabo la exocitosis de la hormona (Suprenant y Dentler 1982).

Entre las proteínas cinasas activadas por calcio-calmodulina en el islote pancreático (Ashcroft y Ashcroft, 1992; Harrison et al., 1984), se encuentra la cinasa de las cadenas ligeras de miosina (MLCK) (Ashcroft y Ashcroft 1992). Es posible que la proteína cinasa activada por calcio-calmodulina, sea importante en la interacción de los gránulos de insulina con el citoesqueleto, durante la exocitosis de la hormona (Harrison et al., 1984).

El AMPc fosforila canales de calcio tipo L en la membrana de las células  $\beta$ . Esta fosforilación aumenta la probabilidad de apertura del canal (Reuter 1983) y promueve un aumento en la concentración intracelular del catión estimulando la exocitosis de los gránulos de insulina.

### *Control de la secreción de insulina.*

Los factores que controlan la secreción de insulina y que ya han sido mencionados anteriormente se esquematizan en la Figura 6.

La activación de la PKC por DAG (producto de la hidrólisis de



fosfoinosítidos membranales, estimulada por neurotransmisores) potencia la secreción de insulina (Persaud, 1989). La activación de la PKC podría ser importante en la integración de la vía celular que permite la respuesta máxima de secreción frente a la estimulación simultánea con calcio, neurotransmisor (ACh) y nutrientes (glucosa) (Wollheim y Regazzi, 1990, Terbush, et al 1988).

No se ha observado la presencia de la PKC en el islote fetal (20-21 días), sin embargo el tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), o la prolactina exógena en una concentración de glucosa alta (Boschero, et al 1993) inducen una pequeña secreción de insulina posiblemente a través de un mecanismo mediado por la activación y/o maduración inducida por prolactina del sistema PKC (Tuch, et al 1987).

El  $IP_3$ , otro de los productos de hidrólisis de fosfoinosítidos membranales, libera calcio del retículo endoplásmico (Mikoshiha 1993) y aumenta la concentración intracelular de calcio.

La concentración intracelular de calcio también es aumentada por drogas como sulfonilureas y agentes metabolizables como la glucosa, los cuales al despolarizar la membrana permiten la entrada de calcio a la célula a través de canales dependientes de voltaje. El aumento en la concentración intracelular del calcio estimula la exocitosis de insulina (Figura 6).

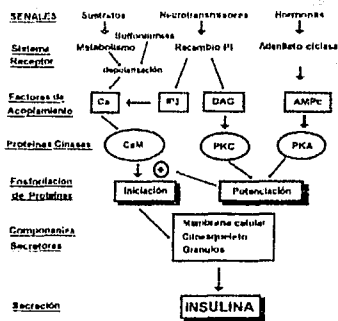


Figura 6. El esquema muestra las posibles vías involucradas en la secreción de insulina. La vía iniciadora y considerada como principal implica la activación de la cinasa dependiente de calcio-calmodulina, que fosforila proteínas del citoesqueleto (modificada de Ashcroft y Ashcroft 1992)

### *Efecto de ACh sobre la secreción de insulina.*

La ACh aumenta la secreción de insulina. El efecto de la ACh sobre la secreción de insulina depende de calcio, de sodio (Henquin y Nenquin, 1984) y de glucosa extracelular, por lo que el mecanismo de acción del neurotransmisor resulta bastante complejo. La estimulación por ACh no cambia la concentración de AMPc y GMPc (Gagerman et al., 1978), por lo cual es posible que el mecanismo de transducción de ACh sea independiente del sistema AMPc en la secreción de insulina (Wollheim et al 1980).

En estudios recientes en nuestro laboratorio se ha observado que el

agonista colinérgico carbacol (CCh) en presencia de 5.6 mM de glucosa aumenta en un 100 % la cantidad total de insulina secretada, mientras que en 20.6 mM de glucosa el CCh inhibe en un 49 % la cantidad total de insulina secretada. El efecto del CCh es bloqueado específicamente con atropina (Hiriart y Ramirez-Medeles, 1993).

Uno de los efectos de la ACh es despolarizar la membrana de las células  $\beta$  mediante un incremento en la permeabilidad a sodio (Henquin, et al, 1988). Al parecer la activación de los canales de sodio son parcialmente responsables de despolarizar la membrana de las células  $\beta$ , ya que la secreción de insulina estimulada con concentraciones de glucosa mayores de 10 mM fué inhibida por la tetrodotoxina (TTX) (Hiriart y Matteson, 1987).

## ***HIPOTESIS Y OBJETIVOS***

La respuesta secretora de insulina de las células  $\beta$  pancreáticas en la etapa fetal, es controversial. Los estudios en el islote completo refieren que las células  $\beta$  fetales no secretan insulina (Ammon, et al., 1985; Ammon, et al 1989; Espinoza, 1970), o bien que secretan pobremente (Rhoten, 1980; Otonkoski et al, 1988; Fletcher, et al 1989; Tuch, et al 1990, 1992) cuando son estimuladas por glucosa y otros agentes. Sin embargo no existe información sobre el comportamiento secretor de las células  $\beta$  fetales aisladas y se desconoce la regulación de su respuesta secretora y su modulación por agonistas muscarínicos.

En las células  $\beta$  adultas individuales, el CCh potencia la secreción de insulina y su efecto depende de la concentración extracelular de glucosa. Por ejemplo el CCh a la concentración fisiológica de glucosa (5.6 mM), induce un aumento máximo en la secreción de insulina (Hiriart y Ramírez-Medeles, 1993).

La respuesta de las células adultas aisladas a la glucosa y al carbacol es heterogénea y se han descrito subpoblaciones funcionales de células  $\beta$ , que difieren en a) la tasa de secreción de insulina, b) en el umbral a la glucosa (Hiriart y Ramírez-medeles, 1991) y c) en la respuesta al CCh (Hiriart y Ramírez-Medeles 1993).

Con los antecedentes anteriores nos planteamos las siguientes hipótesis y objetivos de trabajo:

### **Hipótesis:**

i) Si la secreción de insulina por los islotes fetales es nula o muy pobre, postulamos entonces que en las células  $\beta$  fetales aisladas la secreción de insulina esté determinada por la actividad de las células que

secretan una cantidad de insulina pequeña (SP).

ii) Si las células  $\beta$  fetales secretan insulina postulamos entonces que la actividad secretora de las células podría ser modulada por agonistas muscarínicos como el CCh.

### **Objetivo general**

Caracterizar la respuesta secretora de las células  $\beta$  fetales aisladas a la glucosa y carbacol, con el fin de comparar esta respuesta con las células  $\beta$  adultas aisladas.

### **Objetivos específicos**

a) Estudiar las características secretoras de las células  $\beta$  fetales individuales en cultivo.

b) Investigar la posible modulación colinérgica por el CCh sobre la respuesta secretora basal (glucosa 5.6 mM) y estimulada con alta glucosa (20.6 mM) de las células fetales.

c) Investigar si las subpoblaciones funcionales de células  $\beta$  existen desde la etapa fetal.

d) Investigar si en la respuesta de las células  $\beta$  fetales al CCh está involucrada otra vía de segundos mensajeros como es la del AMPc.

### **Material y métodos**

Los reactivos fueron obtenidos de las siguientes fuentes: Anestesia (Pentobarbital sódico) de **Smith Kline** (Norden de México); Colagenasa tipo IV de **Worthington** (Freehold, NJ, USA); Solución balanceada de Hanks (HBSS), medio RPMI 1640, suero bovino fetal (SBF) gentamicina, glutamina, solución dispersante sal de Spinner-Eagle, penicilina-estreptomicina (PE), antibiótico-antimicótico (PEF) y complemento de cobayo de **Gibco** (Grand Island, NJ, USA); suero anti-insulina de **BioDesing International** (Kennebunkport, ME, USA); Albúmina sérica bovina (BSA), cloruro de cromo, proteína A (*stafilococcus aureus*), 3-isobutil-1- metilxantina, hepes, poli-L-lisina (p.m. 380 000), tripsina, dibutiriladenosina 3':5' monofosfato cíclico y trizina de **Sigma Chemicals Co.** (St. Louis MO USA).

#### **D) Cultivo de células $\beta$ pancreáticas fetales**

Se utilizaron ratas Wistar (peso 300-400 g) de 18 a 19 días de gestación mantenidas en condiciones normales de luz y oscuridad y libre acceso a alimento convencional. Los islotes se aislaron y las células se dispersaron y cultivaron como se describió previamente (Hiriart y Ramírez-Medeles 1991).

##### **i) Obtención de los islotes pancreáticos.**

-Las ratas gestantes se anestesiaron con pentobarbital sódico (0.05 mg/g de peso) aplicado por vía intraperitoneal.

-Los fetos fueron extraídos. Para romper el tejido acinar y visualizar mejor el páncreas fetal facilitando su digestión con colagenasa, se inyectó el páncreas con HBSS suplementada con 10  $\mu$ g/ml de gentamicina y 0.1 %

de BSA, pH 7.35.

-Los páncreas se lavaron, se cortaron con tijeras y se pusieron en colagenasa a una concentración final de 2.5 mg/ml, incubando 10 minutos en un baño a 37° C en agitación constante.

-El tejido digerido se lavó 5 veces con HBSS frío y se pasó a través de una malla (Sigma, poro número 60) estéril. Los islotes se seleccionaron del tejido acinar con una pipeta Lang Levy en una caja de Petri negra siliconizada, y bajo el microscopio. Para evitar que las enzimas proteolíticas presentes en el tejido exocrino digirieran el tejido endocrino, fue importante separar los islotes del tejido acinar, por lo cual los islotes se seleccionaron dos veces. No obstante, como en la etapa fetal la cápsula de los islotes aún no está bien formada, resultó difícil tener una población pura de islotes.

#### ii) Disociación de las células insulares

Los islotes se incubaron a 37°C durante 10 minutos con tripsina diluida (0.5 g /100ml) en solución Spinner sin calcio, enriquecida con 15.6 mM de glucosa y 0.5 % de BSA. Después de la incubación el tejido se dispersó mecánicamente con una pipeta Pasteur siliconizada de punta angulada, haciendo entrar y salir el tejido de la pipeta de 10 a 15 veces. La suspensión celular se lavó 3 veces con medio completo, consistente en RPMI 1640 suplementado con 10 % de SBF, 200 U/ml de penicilina, 200 µg/ml de estreptomicina y 0.05 µg/ml de fungizona (PEF) y 2 mM de glutamina.

#### iii) Cultivo de las células endocrinas

Las células se resuspendieron en el RPMI 1640 y se sembraron en

cajas Petri. Las células fueron mantenidas en una incubadora húmeda (5 % CO<sub>2</sub> en 95 % de aire). Al día siguiente se les cambió el medio y se utilizaron en el ensayo hemolítico inverso (RHPA) al segundo día de cultivo.

## II) Ensayo hemolítico inverso (RHPA)

Las células secretoras de insulina se identificaron con la técnica del RHPA (Neil y Frawley, 1983; Salomón y Meda, 1986; Hiriart y Matteson 1988); con el cual es posible identificar una célula dentro de una población celular mixta, según la hormona que secreta. En dicho ensayo se explota el fenómeno de hemólisis mediada por complemento, en presencia de un complejo antígeno-anticuerpo. Ver figura 7.

En el RHPA se utilizaron cámaras de Cunningham las cuales se construyeron sobre un portaobjetos previamente tratado con poli l-lisina (0.5 mg/ml en buffer Tris, pH 8.2) para facilitar la adhesión de las células. Se adhirieron 2 cintas de doble engomado a los porta objetos y se colocó encima un cubre objetos (ver figura 8).

### *i) Acoplamiento de la proteína A a la membrana de los eritrocitos*

La proteína A fué conjugada a la membrana de los eritrocitos de borrego (eritrocitos-prot A) para que unan el anticuerpo a su membrana, en presencia del agente acoplante cloruro de cromo. En este proceso se aprovecha la alta afinidad que presenta la proteína A para unir inmunoglobulinas G (Neil y Frawley 1983, Salomón y Meda 1986). Brevemente, el protocolo consistió en lo siguiente:

Se tomaron 0.5 ml de los eritrocitos previamente lavados en



solución salina al 0.9 %, se incubaron 1 hora a 30 °C en presencia de la proteína A (0.5 mg/ml) y de cloruro de cromo.

### *ii) Preparación de las células para el ensayo hemolítico inverso*

Antes de empezar el ensayo, las células en cultivo se despegaron de la caja de Petri incubandolas a 37°C durante 10 minutos con solución Spinner sin calcio. Las células se disociaron con una pipeta Pasteur.

Las células disociadas se mezclaron con los eritrocitos-pro A y se agregaron por capilaridad a uno de los extremos de las cámaras de Cunningham.

Las células se incubaron durante 45 minutos para permitir la formación de una monocapa, se lavaron con HBSS y se incubaron 1 hora con el anticuerpo contra insulina (1:30) y en su caso los secretagogos CCh (carbamilcolina, análogo muscarínico, 10  $\mu$ M) y db-AMPC (dibutilil monofosfato cíclico de adenosina, análogo permeable a la membrana, 5 mM). Después se incubaron 30 minutos con complemento de cobayo (1:40), (ver figura 8)

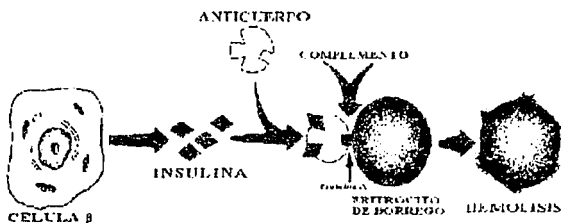


Figura 7 Esquema que representa el fenómeno de hemólisis mediada por complemento en presencia del complejo antígeno-anticuerpo (modificada de Smith, et al., 1986).

La insulina liberada fué revelada por la presencia de las placas hemolíticas formadas alrededor de las células endocrinas, resultado de la lisis de los eritrocitos mediada por complemento.

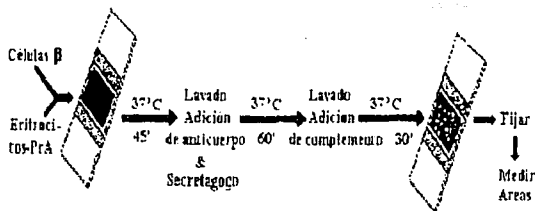


Figura 8. Método utilizado en el ensayo hemolítico inverso para cuantificar la secreción de insulina en una población mixta de células insulares (modificada de Smith, et al., 1986).

### ***b) Análisis de la secreción de insulina***

El tamaño de las inmunoplacas es proporcional a la cantidad de insulina secretada por las células; este parámetro se determinó al proyectar la imagen de la inmunoplaca formada en un monitor de una cámara de video unida a un microscopio invertido (Nikon, Axiophot) y se midió el diámetro de la inmunoplaca con el programa JAVA (Jandel Scientific), el cual se expresó como área. Para el análisis sólo se consideraron a las células aisladas y no a los acúmulos, aún cuando formaron inmunoplacas.

Se contaron las células que formaron inmunoplaca y el número se expresó como el porcentaje de células secretoras de insulina. La actividad secretora de las células β bajo una condición experimental se expresó como índice de secreción y se estimó al multiplicar el área promedio de las inmunoplacas por el porcentaje de células formadoras de placa.

Se calculó la distribución de frecuencias del área de inmunoplaaca para identificar las subpoblaciones funcionales de las células  $\beta$  y determinar si estas subpoblaciones fueron diferencialmente afectadas por los secretagogos.

#### ***IV) Análisis estadístico.***

La significancia estadística de los distintos tratamientos fué evaluada con el análisis de varianza ANOVA, la prueba de t de Student para datos no pareados y la prueba de Fisher, considerando como estadísticamente significativa una  $p < 0.01$  y  $p < 0.05$ , con el programa NCSS (4.2 Dr. Jerry L. Hintze, Kaysville, UT, USA, 1983). Todos los resultados se expresaron como promedio  $\pm$  el error estándar.

## RESULTADOS

### *1.-Secreción de insulina de las células $\beta$ fetales aisladas*

En la Figura 9 se muestra una monocapa de eritrocitos marcados con la proteína A y células  $\beta$ . Las células fueron incubadas con 5.6 mM de glucosa en presencia del anticuerpo contra insulina. La zona oscura alrededor de la célula indica la hemólisis desencadenada al adicionar el complemento.

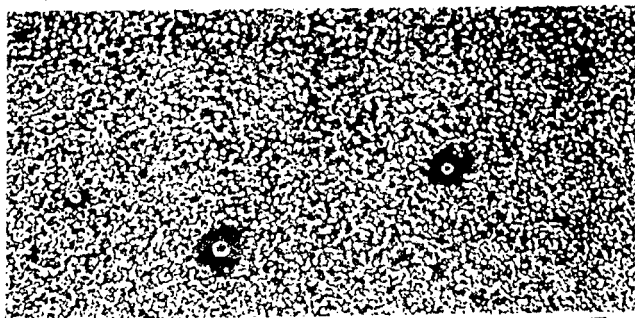


Figura 9. Micrografía de células  $\beta$  fetales identificadas con el RHPA. La micrografía fue tomada a una amplificación de 20X. Las células se incubaron 1 hora con el anticuerpo contra insulina en 5.6 mM de glucosa y posteriormente 30 minutos con complemento de cobayo. La región de hemólisis alrededor de la célula fue expresada como una

### *Secreción de insulina de las células $\beta$ fetales con respecto al tiempo y a la concentración de glucosa extracelular*

Se estudió la respuesta secretora de insulina de las células  $\beta$  fetales, incubándolas a distintos tiempos (1 a 4 horas) tanto en 5.6 como en 20.6 mM de glucosa.

El porcentaje de células secretoras de insulina durante los diferentes

tiempos de incubación en 5.6 y 20.6 mM de glucosa se muestra en la Figura 10. En 5.6 mM de glucosa el porcentaje de células que secretaron insulina aumentó significativamente en un 32 % a las dos horas de incubación y en un 41 % a las 4 horas de incubación con respecto a una hora, mientras que en 20.6 mM de glucosa el porcentaje de células secretoras aumentó significativamente en un 28 % sólo hasta las 4 horas con respecto a una hora de incubación. Esto indica que este porcentaje de células tienen una tasa de secreción más baja porque tardaron 4 h en reclutarse.

La cantidad de insulina secretada evaluada como área promedio de las inmunoplasmas fué máxima a las 2 h de incubación en ambas concentraciones de glucosa, como se puede observar en la Figura 11. En 5.6 mM de glucosa, el área promedio de las placas aumentó en un 31 % a las 2 horas de incubación, respecto a 1 hora. La secreción de insulina aún cuando continuó aumentando a las 4 h (57 %) no fué estadísticamente diferente de 2 h.

En 20.6 mM de glucosa se observó que el tamaño de las inmunoplasmas aumentaron en un 29 % a las 2 horas y en un 39 % a las 4 horas de incubación, con respecto a 1 hora.

La cantidad total de insulina secretada, evaluada por el índice de secreción aumentó en ambas concentraciones de glucosa durante los distintos tiempos de incubación. Como se muestra en la Figura 12, en 5.6 mM de glucosa el índice de secreción aumentó en un 63 % a 2 horas de incubación y en un 117 % a las 4 horas con respecto a 1 hora.

En 20.6 mM de glucosa el índice de secreción aumentó en un 40 % a las 2 horas y en un 75 % a las 4 horas, respecto a 1 hora.

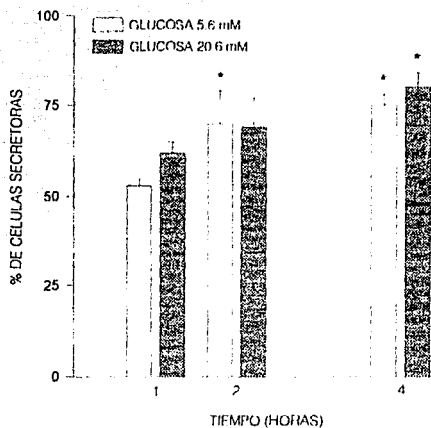


Figura 10. Respuesta de las células  $\beta$  fetales a la glucosa con respecto al tiempo, evaluada por el porcentaje de células que forman inmunoplaaca. Cada barra representa el promedio  $\pm$  el error estándar de 3-4 experimentos independientes.

\* denota el nivel de significancia estadística ( $p < 0.05$ ) con respecto a 1 hr y con respecto a cada concentración de glucosa.

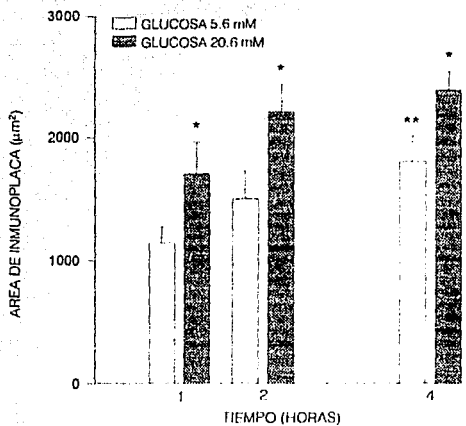


Figura 11. Análisis de la secreción de insulina evaluada por el tamaño del área promedio de inmunoplaaca. Cada barra corresponde al promedio  $\pm$  el error estándar de 3-4 experimentos independientes. \* denota las diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto a 5.6 mM de glucosa  
 \*\* denota la diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) con respecto a 1 hora.

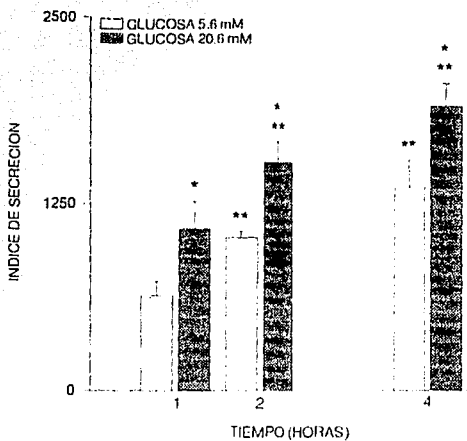


Figura 12. Cantidad total de insulina evaluada por el producto del factor de secreción por el área promedio de inmunoplaaca. Cada barra corresponde al promedio  $\pm$  el error estándar de 3-4 experimentos por separado.

\* denota las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto a 5.6 mM de glucosa.

\*\* denota la diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) con respecto a 1 hora.



Podemos concluir que las células  $\beta$  fetales pueden discriminar entre diferentes concentraciones de glucosa. Por ejemplo en 20.6 mM de glucosa, la secreción de insulina aumentó en un 109 % en relación a 5.6 mM de glucosa durante la incubación por 1 hora (Figura 13).

#### ***Secreción de insulina estimulada por diferentes concentraciones de CCh.***

La respuesta secretora de las células  $\beta$  fetales a concentraciones crecientes (de 0.1 a 1000 $\mu$ M) del agonista parasimpático CCh fué estudiada en presencia de 5.6 mM de glucosa.

En la Figura 14 se muestra el efecto de diferentes dosis del CCh sobre la cantidad total de insulina secretada (índice de secreción). A la concentración de 1.0  $\mu$ M de CCh, el índice de secreción aumentó en un 60% con respecto al testigo y este aumento fué conservado a dosis más altas del fármaco.

Como el efecto del CCh sobre la secreción de insulina no varió estadísticamente entre las dosis de 1.0, 10 y 1000  $\mu$ M, en los experimentos subsiguientes estudiamos el efecto del agonista colinérgico a la concentración de 10  $\mu$ M.

#### ***c) La respuesta de las células $\beta$ fetales al CCh depende de la concentración de glucosa extracelular.***

El CCh a la concentración basal de glucosa (5.6 mM) aumentó el porcentaje de células formadoras de placa en un 21 % y el área de las inmunoplaquetas en un 51 %, por lo tanto el índice de secreción (ver Figura

15) aumentó en un 84 % con respecto al testigo. En las células  $\beta$  adultas aisladas, Hiriart y Ramírez-Medeles, (1993) observaron que el CCh aumentó el índice de secreción, en un 100 %, lo cual resulta también de un aumento tanto en el porcentaje de células secretoras (32 %) como en el área de las inmunoplasmas (58 %). Estos datos se resumen en la tabla 1.

La respuesta de las células  $\beta$  fetales al CCh, al igual que en las células adultas, fué dependiente de la concentración de glucosa extracelular, ya que en una concentración de glucosa alta (20.6 mM) el CCh disminuyó en un 42 % el índice de secreción (Figura 15), lo cual reflejó tanto la disminución en el porcentaje de células formadoras de placa (11 %), como en el área de las inmunoplasmas formadas (34 %). Resultados muy similares se observaron en las células adultas, en las que el CCh en 20.6 mM de glucosa disminuyó el porcentaje de células formadoras de placa en un 22 %, el área de inmunoplasma disminuyó en un 34 % y en consecuencia el índice de secreción disminuyó en un 49 % (Hiriart y Ramírez-Medeles, 1993).

El efecto estimulante del CCh sobre la secreción de insulina, en 5.6 mM de glucosa, fué inhibido con el antagonista muscarínico atropina (100  $\mu$ M), sin embargo no se logró revertir el efecto inhibitorio del CCh en 20.6 mM de glucosa con atropina como se observa en la Figura 15.

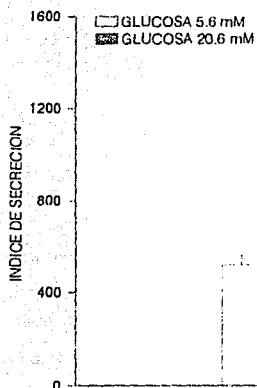
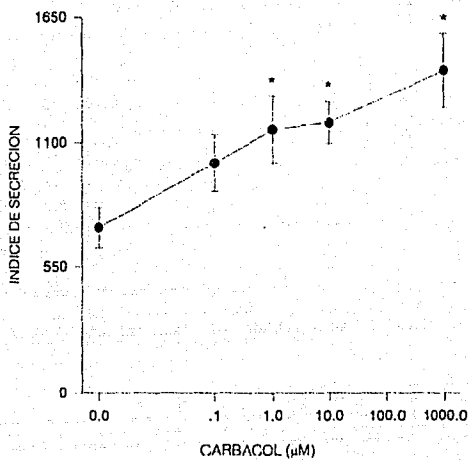


Figura 13. Efecto estimulador de la glucosa sobre la cantidad total de insulina secretada, evaluada como el resultado del producto del factor de secreción por el área de las inmunoplaquetas formadas. Cada barra representa el promedio  $\pm$  el error estándar de 9-10 experimentos independientes.

\* denota el nivel de significancia ( $p < 0.01$ ) con respecto al testigo.



**Figura 14. Efecto estimulador de diferentes dosis de carbacol sobre la cantidad total de insulina secretada, evaluada por el índice de secreción. Cada punto representa el promedio  $\pm$  el error estándar de 5 experimentos independientes.**

\* denota el nivel de significancia ( $p < 0.05$ ) con respecto al testigo.

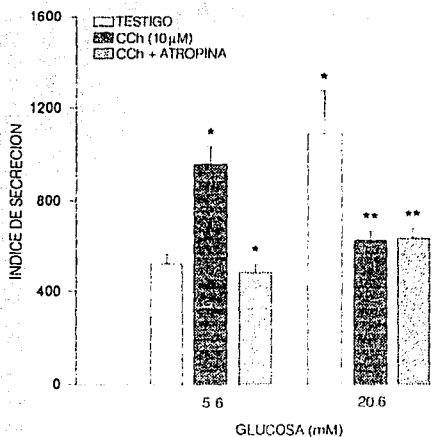


Figura 15. Efecto del CCh y de la atropina en presencia de dos diferentes concentraciones de glucosa sobre la cantidad total de insulina secretada evaluada por el índice de secreción. Cada barra representa el promedio  $\pm$  el error estándar de 9-10 experimentos independientes, a excepción de las barras que representan el efecto de CCh + atropina, las cuales son el promedio de 5-6 experimentos independientes.

\* denota la diferencia estadística ( $p < 0.01$ ) y \*\* ( $p < 0.05$ ) con respecto al testigo.

Tabla 1. Secreción de insulina  $\pm$  el error estándar de las células  $\beta$  fetales y adultas, bajo los diferentes tratamientos. La *n* indica el número de experimentos.

Glucosa (mM)	Células $\beta$	Area de placa ( $\mu\text{m}^2$ )	% de células secretoras.	n
5.6	fetales	952 $\pm$ 73	54.7 $\pm$ 1.4	10
5.6	adulta	1892 $\pm$ 192*	45.4 $\pm$ 5.2	6
+CCh	fetales	1443 $\pm$ 104*	66.1 $\pm$ 1.4*	9
+CCh	adulta	2979 $\pm$ 204*	60.2 $\pm$ 2.8*	6
20.6	fetales	1608 $\pm$ 210	66 $\pm$ 2.7	9
20.6	adulta	3220 $\pm$ 353*	59.0 $\pm$ 7.0	4
+CCh	fetales	1054 $\pm$ 53**	59.0 $\pm$ 3**	6
+CCh	adulta	2203 $\pm$ 532*	46.1 $\pm$ 6**	4

\* ( $p < 0.01$ ) y \*\* ( $p < 0.05$ ) denotan la significancia estadística con respecto a 5.6 mM y 20.6 mM de glucosa respectivamente.

• ( $p < 0.001$ ) denota la significancia estadística con respecto a las células fetales.

## 2.- Subpoblaciones funcionales de células $\beta$ fetales.

Resultados previos del laboratorio demostraron que la secreción de insulina de las células  $\beta$  adultas aisladas es heterogénea (Hiriart y Ramirez-Medeles, 1991), debido a lo cual se sugirió la existencia de distintas subpoblaciones de células  $\beta$ , que podrían ser clasificadas de acuerdo con la cantidad de insulina secretada, en una hora, como: células que forman placas pequeñas (SP área de placa  $< 2000 \mu\text{m}^2$ ), células que forman placas medianas (MP área de placa entre  $2000$  y  $4000 \mu\text{m}^2$ ) y células que forman placas grandes (LP área de placa  $> 4000 \mu\text{m}^2$ ).

Con las observaciones anteriores, resultó interesante estudiar si las

subpoblaciones funcionales, se expresan desde etapas tempranas del desarrollo.

Los resultados obtenidos mostraron que las subpoblaciones observadas en las células  $\beta$  adultas están presentes desde esta etapa del desarrollo, pero en diferentes proporciones, así como se observa en la tabla 2.

En la Figura 16 se muestran las subpoblaciones funcionales de células  $\beta$  fetales. En 5.6 mM de glucosa, se observó que el 49 % de células formaron placas pequeñas (SP) y un 4 % formaron placas medianas (MP). En esta condición el porcentaje de células fetales tipo SP, fué 50 % más alto que en las células adultas (Hiriart y Ramírez-Medeles, 1991).

Cuando las células se incubaron en 20.6 mM de glucosa el 47 % formaron placas pequeñas y el porcentaje de células formadoras de placas medianas aumentó 4 veces. Solamente el 3 % de células formaron placas grandes, como se aprecia en la Figura 16. Comparando estos resultados con el comportamiento secretor de las células  $\beta$  adultas pudimos observar una clara diferencia, ya que en el estado adulto, la subpoblación tipo LP aumentó el 12 % en 20.6 mM de glucosa (ver tabla 2).

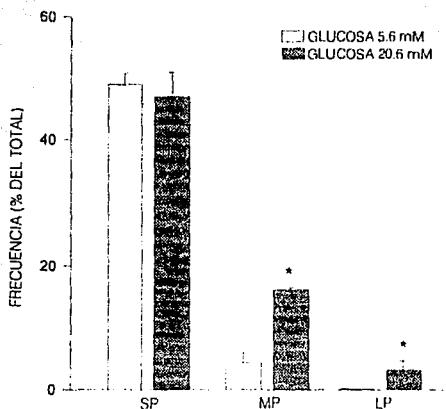


Figura 16. Efecto de la concentración de glucosa sobre la expresión de las subpoblaciones funcionales de células  $\beta$  fetales. SP indica las células que forman placas pequeñas; MP las células que forman placas medianas y LP las que forman placas grandes. Cada barra representa el promedio  $\pm$  el error estándar de 9-10 experimentos independientes.



Tabla 2. Subpoblaciones de células  $\beta$  aisladas. Se compara el porcentaje del total de las células fetales y adultas formadoras de placas, tanto en glucosa 5.6 como en 20.6 mM.

Subpoblación	5.6 mM Glucosa	+ CCh	20.6 mM Glucosa	+CCh
SP fetal	49 $\pm$ 1.9	47 $\pm$ 2.1	47 $\pm$ 4.0	55 $\pm$ 3.4
SP adulta	32 $\pm$ 4.7	30.4 $\pm$ 3.4	17.6 $\pm$ 4.6	21 $\pm$ 4.6
MP fetal	4.3 $\pm$ 1.6	17 $\pm$ 1.9*	16.2 $\pm$ 0.3	3.8 $\pm$ 0.5 $\oplus$
MP adulta	10.7 $\pm$ 2.6	17 $\pm$ 3.4	23.8 $\pm$ 7.3	15 $\pm$ 1.0
LP fetal	0.1 $\pm$ 0.1	1.4 $\pm$ 0.7	3.1 $\pm$ 1.5	0.4 $\pm$ 0.4
LP adulta	3.8 $\pm$ 1.2	10 $\pm$ 1.7*	11.6 $\pm$ 2.3	3.6 $\pm$ 0.7 $\oplus$

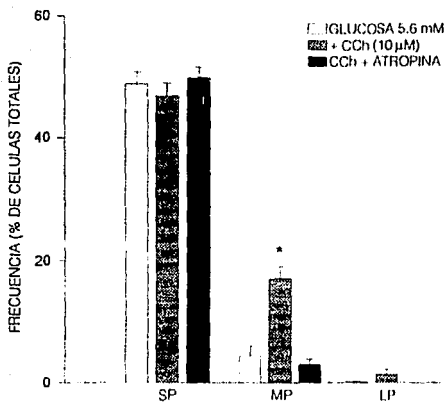
\* denota el nivel de significancia ( $p < 0.01$ ) con respecto a 5.6 mM de glucosa.

$\oplus$  denota el nivel de significancia ( $p < 0.01$ ) con respecto a 20.6 mM de glucosa.

### *El CCh modula la secreción de insulina en las subpoblaciones funcionales.*

En la Figura 17 se muestra el efecto del CCh, en 5.6 mM de glucosa sobre la actividad secretora de las poblaciones de células  $\beta$  fetales. El CCh aumentó 4 veces el porcentaje de células MP y 2 veces el porcentaje de células LP. En cambio, en las células adultas, el CCh aumentó (2.4 veces) el porcentaje de células LP (Hiriart y Ramirez-Medeles, 1993).

La atropina revirtió el efecto estimulador del CCh sobre el porcentaje de células MP, como se muestra en la Figura 17.



**Figura 17. Estimulación de las células MP, por CCh en 5.6 mM de glucosa e inhibición por atropina.** Cada barra representa el promedio  $\pm$  el error estándar de 9-10 experimentos independientes, con excepción de las barras negras, las cuales representan el promedio de 5 experimentos independientes.

\* denota el aumento significativo ( $p < 0.01$ ) con respecto al testigo.

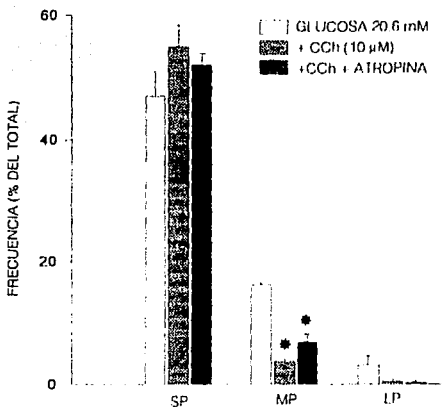
En la Figura 18 se observa el efecto del CCh en 20.6 mM glucosa sobre la actividad secretora de las subpoblaciones de células  $\beta$  fetales. El CCh disminuyó en un 76 % el porcentaje de células MP, en paralelo a la disminución en el índice de secreción (mostrado en la Figura 15), así como en el pequeño porcentaje de células LP, como se muestra en la tabla 2.

El efecto inhibitorio del CCh en 20.6 mM de glucosa sobre el porcentaje de células MP no fue revertido con atropina (Figura 18).

### ***3.- Efecto del db cAMP sobre la respuesta a CCh.***

Interesados en conocer si en las células  $\beta$  fetales la unión del agonista muscarínico CCh a su receptor, conlleva cambios en el sistema de segundos mensajeros como el AMPc, las células se incubaron en presencia del análogo permeable db-AMPc (5mM) y/o CCh en 5.6 mM de glucosa.

En la Figura 19 se muestra el efecto del db-AMPc y del CCh sobre el porcentaje de células formadoras de placa. El CCh (10  $\mu$ M) aumentó en un 35 % el porcentaje de células formadoras de placas, con respecto al testigo. El db-AMPc no aumentó significativamente el porcentaje de células formadoras de placas. El CCh y db-AMPc juntos aumentaron el porcentaje de células formadoras de inmunoplaaca en un 54 % con respecto al testigo, sin embargo este aumento no difirió significativamente de la incubación con CCh.



**Figura 18.** Efecto de CCh y de atropina en 20.6 mM de glucosa sobre las subpoblaciones funcionales. Cada barra representa el promedio de 6-9 experimentos  $\pm$  el error estándar.

\* denota el nivel de significancia ( $p < 0.01$ ) con respecto al testigo.

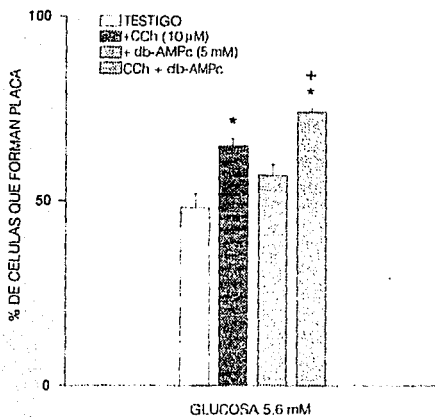


Figura 19. Efecto de CCh y de db-AMPc, en 5.6 mM de glucosa sobre el porcentaje de células que forman inmunoplaaca. Cada barra representa el promedio  $\pm$  el error estándar de 6 experimentos independientes.

\* denota la diferencia estadística ( $p < 0.01$ ) con respecto al testigo.

+ denota la diferencia estadística ( $p < 0.01$ ) con respecto al db-AMPc.

En la Figura 20 se muestra el efecto del CCh y del db-AMPc sobre el tamaño de las áreas de inmunoplaca. El CCh aumentó en un 88 % la cantidad de insulina secretada, con respecto al testigo, mientras que el db-AMPc no amplificó de manera significativa este parámetro. En presencia de db-AMPc más CCh, el área promedio de inmunoplaca aumentó en un 117 %, sin embargo este aumento no fué estadísticamente diferente de CCh y db-AMPc.

En la Figura 21, se muestra el efecto del CCh y del db-AMPc sobre la cantidad total de insulina secretada. El CCh aumentó en un 149 % la cantidad total de insulina secretada, con respecto al testigo. El db-AMPc no aumentó significativamente la cantidad de insulina secretada. En presencia de db-AMPc más CCh, se observó que el índice de secreción aumentó en un 222 % con respecto al testigo, no obstante este aumento no fué significativo con respecto al CCh aun cuando fué significativo estadísticamente con respecto a db-AMPc.

#### ***4.- Secreción de insulina de las células cultivadas con db-cAMP***

En experimentos previos (Sánchez, 1994) se observó que en las células  $\beta$  adultas cultivadas durante 5-7 días con db-AMPc (5 mM) la secreción de insulina aumentó en un 230 %. Decidimos estudiar si este efecto se presenta también en las células  $\beta$  fetales mantenidas durante dos días de cultivo con db-AMPc. Después de este pretratamiento con db-AMPc, las células se incubaron 1 hora con 5.6 mM de glucosa, en presencia de CCh y/o db-AMPc.

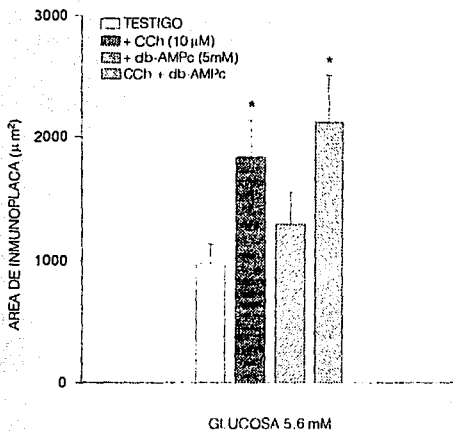
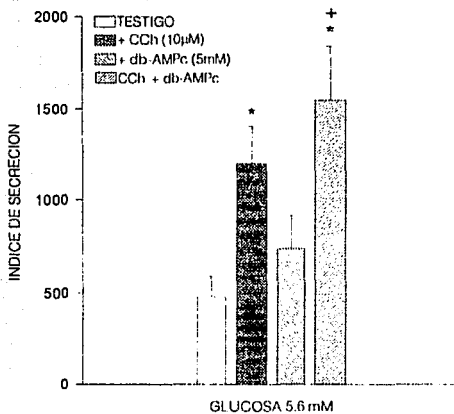


Figura 20. Efecto del CCh y de db-AMPc sobre la secreción de insulina evaluada por el tamaño de las áreas de inmunoplaquetas. Cada barra representa el promedio  $\pm$  el error estándar de 6 experimentos independientes.

\* denota la diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) con respecto al testigo.



**Figura 21.** Estimulación de la secreción de insulina por CCh y db-AMPc evaluada por el índice de secreción de insulina. Cada barra representa el promedio  $\pm$  el error estándar de 6 experimentos independientes.

\* denota la diferencia estadística ( $p < 0.01$ ) con respecto al testigo.

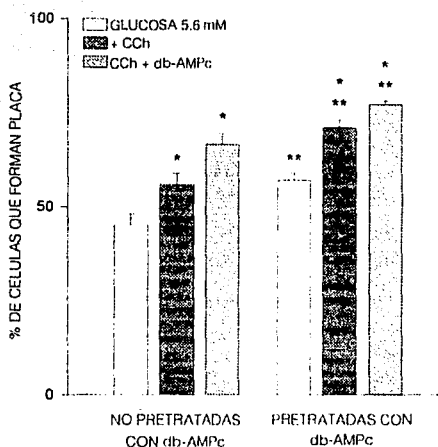
+ denota la diferencia estadística ( $p < 0.01$ ) con respecto al db-AMPc.



En la Figura 22 se muestra el porcentaje de células formadoras de placa de insulina de las células pretratadas y no pretratadas con db-AMPc. El CCh aumentó en un 24 % el porcentaje de células que forman placas con respecto al testigo, tanto en las células no pretratadas, como en las pretratadas con db-AMPc. En presencia de CCh más db-AMPc se observó que el porcentaje de células que forman inmunoplaquetas aumentó en un 48 % en las células no tratadas y en un 35 % en las células pretratadas con respecto al testigo (Figura 22).

El CCh y el db-AMPc aumentaron la cantidad de insulina secretada de manera similar, tanto en las células pretratadas como en las células no pretratadas, como se muestra en la Figura 23. En las células no pretratadas el CCh aumentó en un 38 % el área de inmunoplaqueta con respecto al testigo y en presencia de CCh más db-AMPc aumentó en un 51 %. Estos resultados fueron similares a los obtenidos en las células pretratadas con el nucleótido cíclico, como también se puede apreciar en la Figura 23

En la Figura 24 se muestra la cantidad total de insulina secretada tanto de las células pretratadas, como no pretratadas con db-AMPc. En las células pretratadas el CCh aumentó (56 %) la secreción con respecto a las células no pretratadas, mientras que el CCh más db-AMPc aumentaron la secreción de una manera similar en ambos grupos de células, así como se aprecia en la tabla 3.



**Figura 22. Efecto del CCh y del db-AMPc sobre la secreción de insulina evaluada como factor de secreción tanto de las células tratadas como de las no tratadas durante el cultivo con db-AMPc. Cada barra representa el promedio  $\pm$  el error estándar de 4-7 experimentos independientes.**

**\* denota la diferencia estadística ( $p < 0.01$ ) con respecto a 5.6 mM de glucosa.**

**\*\* denota la diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) entre las células pretratadas y no pretratadas.**

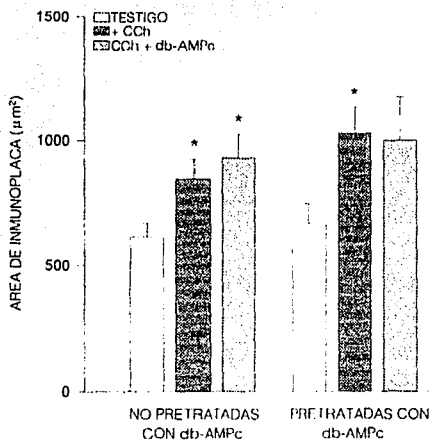
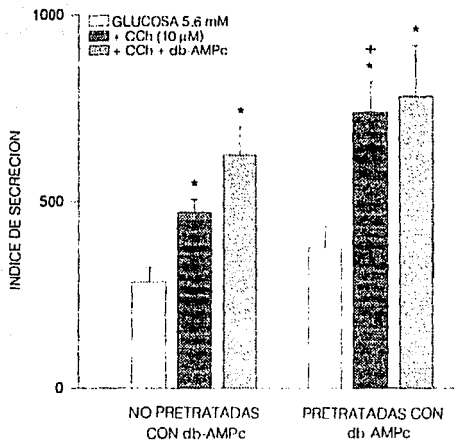


Figura 23. Efecto del CCh y del db-AMPc sobre la secreción de insulina, estimada por el tamaño del área de inmunoplaaca, de células pretratadas y no pretratadas con db-AMPc. Cada barra representa el promedio  $\pm$  el error estándar de 4-5 experimentos independientes.

\* denota la diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) con respecto al testigo.



**Figura 24. Estimulación de la secreción de insulina por CCh y db-AMPc evaluada por el índice de secreción en las células tratadas y no tratadas con el db-AMPc. Cada barra representa el promedio  $\pm$  el error estándar de 4-5 experimentos independientes.**

\* denota la diferencia estadística ( $p < 0,01$ ) con respecto a 5.6 mM de glucosa.

+ denota la diferencia estadística ( $p < 0,01$ ) con respecto a las no pretratadas.

Tabla 3. Cantidad de insulina secretada por las células  $\beta$  fetales y porcentaje de células formadoras de placa, tanto de células no pretratadas como de células pretratadas con db-AMPC durante el cultivo.

	Glucosa 5.6 mM	Area de inmunoplaaca $\mu\text{m}^2$	Factor de secreción	n
Células no Tratadas	Testigo	615±56	45±3.0	5
	+ CCh	848±78*	56±3.0*	5
	CCh+db- AMPC	931±95*	66±2.9*	3
Células pretra- tadas	Testigo	668±82	57±2.0▲	5
	+ CCh	1028±104*	71±2.0*▲	5
	CCh+db- AMPC	1000±171	77±0.8*	3

\* denota el nivel de significancia ( $p<0.05$ ), con respecto al testigo.

▲ denota el nivel de significancia ( $p<0.05$ ) con respecto a las células no pretratadas.

## DISCUSION

### *Respuesta de las células $\beta$ fetales a la glucosa*

En este trabajo se estudió la secreción de insulina de las células  $\beta$  fetales aisladas en respuesta a la glucosa y al carbacol. Fué posible aislar a las células endocrinas pancreáticas a pesar de la dificultad que esto representó ya que en esta etapa del desarrollo (18 días de v.i) los islotes no tienen bien formada la cápsula de fibras reticulares que los envuelve y no se pueden diferenciar fácilmente del resto del tejido pancreático. Las células  $\beta$  fueron identificadas con la técnica del ensayo hemolítico inverso (RHPA) con la cual es posible diferenciar una célula dentro de una población celular mixta de acuerdo con la hormona que secreta (Neil y Frawley 1983; Salomón y Meda, 1986). Nosotros hemos observado, por primera vez, que en esta etapa del desarrollo las células  $\beta$  aisladas secretan insulina en respuesta a la estimulación por glucosa, lo cual resulta interesante ya que en trabajos previos con el islote fetal completo, se había observado que las células  $\beta$  no secretan insulina al ser estimuladas por glucosa (Espinoza de los Monteros, 1970; Ammon et al., 1985; Amnon et al 1989; Rhoten 1980; Tuch et al., 1987; Tuch et al., 1991; Otonkoski et al., 1988).

Entre algunas propuestas para explicar la falta de respuesta en las células fetales (21 días de v.i.), los grupos de Tuch (1990), de Rorsman (1989) y Ammon (1985) sugirieron que en las células  $\beta$  del islote fetal existe un metabolismo oxidativo de la glucosa inmaduro (indicado con la medición del contenido de ATP), sin embargo estos autores no se explican cual es el mecanismo de la falta de respuesta a la glucosa observada en sus experimentos.

Otros grupos (Rhoten, 1980; Freinkel, et al 1984; Swenne, 1985; Otonkoski et al., 1988) observaron una secreción de insulina pequeña, en islotes fetales (21-22 días v.i.), pero únicamente si los cultivan durante 7 días en presencia de 11.1 mM de glucosa. Sin embargo estos resultados fueron atribuidos a una maduración de las células  $\beta$  durante el tiempo de cultivo, posiblemente inducida por la concentración de glucosa alta. En cambio, nuestro estudio fué realizado con animales más pequeños y las células fueron cultivadas únicamente durante 2 días.

La diferencia de nuestros resultados con los de la literatura pudiera deberse a diferencias técnicas, ya que todos los trabajos previos se hicieron en islotes completos, mientras que en este trabajo se estudió la secreción de insulina en células  $\beta$  individuales. En nuestro modelo podemos cuantificar el efecto de diversas sustancias sobre una célula específica.

La secreción de insulina por las células fetales en respuesta a la glucosa, sugiere que las células se encuentran no sólo morfológicamente diferenciadas (Pictet y Rutter, 1972), sino también funcionalmente, para llevar a cabo la función secretora.

La secreción de insulina por las células  $\beta$  fetales aumentó al doble en 20.6 mM de glucosa en comparación a 5.6 mM de glucosa, (Figura 12). No obstante, la secreción de insulina de las células fetales fué menor que la de células  $\beta$  adultas. Por ejemplo en 5.6 mM de glucosa fué 60 % y en 20.6 mM de glucosa 50 % más baja que la secreción observada en las células adultas (Hiriart y Ramirez-Medeles, 1993). La diferencia en la cantidad de insulina secretada en las células fetales y adultas podría deberse a que las primeras responden a las diferentes concentraciones de glucosa con una tasa de secreción menor (indicado por el tamaño de las inmunoplasmas), ya que no se encontró diferencia estadística en el porcentaje de células

formadoras de placa entre las células  $\beta$  fetales y adultas.

Por otro lado se sabe que la glucosa regula tanto la biosíntesis como la secreción de insulina en las células  $\beta$  adultas y que ambos mecanismos son independientes. La tasa de secreción de insulina menor, observada en las células fetales podría deberse a que las células presenten cierto grado de inmadurez en el mecanismo asociado a la exocitosis de la hormona y no al de biosíntesis. Tuch y colaboradores (1991) demostraron biosíntesis de proinsulina en las células del islote fetal completo.

#### ***Respuesta temporal de las células $\beta$ fetales a la glucosa.***

En la cinética de respuesta a la glucosa de las células  $\beta$  fetales, se observó un reclutamiento de células a la actividad secretora con respecto al tiempo y a la concentración de glucosa. A 2 horas de incubación en 5.6 mM de glucosa, el 70 % de las células formaron inmunoplaqa y este aumento fué similar al aumento observado a las 4 h (75 %) (Fig. 9).

En 1 hora de incubación en 20.6 mM de glucosa el 60 % de células secretaron insulina y sólo hasta las 4 h de incubación se observó un aumento significativo (80 %) en el porcentaje de células secretoras. Esto quiere decir que entre 1 y 4 h se reclutaron a un 20 % de las células, las cuales tienen una tasa de secreción baja, porque tardaron 4 h en reclutarse.

Podríamos decir que fué posible determinar el porcentaje máximo (80 %) de células capaces de formar placa de insulina, dentro de la sensibilidad del ensayo, ya que en la rata, el 80 % de la población total del islote, está constituida por células  $\beta$  y este es el porcentaje observado a 4 h de incubación en la concentración de glucosa alta.

También pudimos observar que a un mayor tiempo de incubación (1 a 4 h) y a una mayor concentración de glucosa (5.6 vs 20.6 mM) mayor



cantidad de insulina secretada por las células  $\beta$  fetales, así indicado por el índice de secreción.

En conclusión se puede decir que la secreción de insulina por las células fetales no es lineal con respecto al tiempo pero que la respuesta es constante con respecto al tiempo y a la concentración de glucosa.

### *Efecto del CCh sobre la secreción de insulina*

En estudios previos se ha observado que el CCh potencia la secreción de insulina en las células  $\beta$  adultas (Hiriart y Ramirez-Medeles, 1993; Hermans et al., 1987; Henquin et al., 1988). Sin embargo no se conoce el efecto del CCh sobre la secreción de insulina por las células  $\beta$  fetales aisladas. En el presente trabajo, se estudió el efecto del CCh a distintas dosis, en presencia de 5.6 mM de glucosa. La cantidad total de insulina secretada, aumentó de manera significativa, a la concentración de CCh 1  $\mu$ M. Esta acción se debió al aumento en el porcentaje de células secretoras así como en el área promedio de las inmunoplaacas.

La inhibición del efecto de CCh sobre la secreción de insulina con el antagonista atropina en 5.6 mM de glucosa (figura 12) indicó que el efecto del CCh es a través de su unión a receptores muscarínicos.

Estos resultados son interesantes ya que fisiológicamente la estimulación de los receptores muscarínicos por la ACh aumenta la secreción de insulina "in vivo" durante la fase cefálica de la digestión, antes de que aumenten los niveles plasmáticos de glucosa (5.6 mM).

El efecto del CCh sobre la secreción de insulina en 5.6 mM de glucosa (Fig. 12) apoya la especulación de Brinn y colaboradores (1977), de que la secreción de insulina por las células  $\beta$  fetales puede ser activada a través de una innervación colinérgica intrínseca del páncreas.

Por otro lado, en estudios con islotes completos de animales adultos existen discrepancias en cuanto al efecto estimulante del CCh cuando la concentración de glucosa es alta. El grupo de Wollheim (1980) observó que la ACh en presencia de 7-20 mM de glucosa, aumentó la secreción de insulina, mientras que Sharp y colaboradores (1974) encontraron que la ACh aumentó ligeramente la secreción de insulina únicamente en una concentración de glucosa alta. En el presente trabajo se observó que el CCh en presencia de 20.6 mM de glucosa disminuyó la cantidad total de insulina secretada (43 %). En donde se observó la disminución tanto del porcentaje de células formadoras de placa (11 %), como del área promedio de las placas formadas (34 %). Estos resultados fueron similares a los encontrados en las células  $\beta$  adultas aisladas (Hiriart y Ramírez-Medeles, 1993).

No conocemos la razón de este efecto del CCh, sin embargo es posible que se deba a una desensibilización de la respuesta. En algunos trabajos se ha propuesto una desensibilización de las células  $\beta$  cuando se exponen por un tiempo largo a concentraciones de glucosa altas (Nagamatsu et al., 1987), o bien cuando las células se preincubaban con colecistocimina (30-120 min) y en seguida con glucosa (Zawalich, et al., 1989).

El fenómeno de desensibilización, al parecer, afecta al mecanismo de secreción y no al de biosíntesis de insulina (Ogawara et al., 1993), sin embargo, existen discrepancias acerca de la regulación del fenómeno de desensibilización. Por un lado se propone que el fenómeno de desensibilización se puede deber a cambios en la distribución intracelular de calcio o a una disminución en la sensibilidad celular al ión calcio (Hughes et al., 1987) y por otra parte a una supresión en la vía de

activación de la proteína cinasa C (PKC), ya que en islotes desensibilizados se observó una pérdida en la respuesta a la estimulación de la PKC por TPA o estaurosporina (Bolaffi et al., 1991).

La inhibición de la secreción de insulina que nosotros observamos en las células fetales con CCh en presencia de 20.6 mM de glucosa podría deberse al fenómeno de desensibilización de las células frente a la combinación de los secretagogos.

Por otra parte Cohen-Armon et al., (1988) observaron que, en sinaptoneurosomas del tallo cerebral, la despolarización induce conversión de los receptores muscarínicos desde un estado de alta a baja afinidad proceso mediado por proteínas G. En nuestro trabajo, en una concentración de glucosa alta, cuando la membrana de las células se encuentra despolarizada es posible que cambie la afinidad del receptor al agonista colinérgico CCh.

En el presente estudio se observó que la atropina (100  $\mu$ M) no revirtió el efecto inhibitor del CCh en 20.6 mM de glucosa. Fletcher y colaboradores (1989) encontraron que en islotes de rata postnatal (1 y 3 días postparto), una mayor concentración de atropina (200  $\mu$ M) inhibió la secreción de insulina inducida por CCh en 16.7 mM de glucosa. En nuestro modelo de células aisladas, hace falta estudiar la concentración de atropina a la cual se inhibe el efecto del CCh en 20.6 mM de glucosa, o utilizar un inhibidor más específico para el receptor muscarínico.

En islotes de rata adulta, uno de los efectos de los agonistas muscarínicos sobre la secreción de insulina esta mediado probablemente, por la estimulación de la hidrólisis de fosfoinosítidos membranales; generando diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) (Wollheim et al., 1986).

El DAG y el calcio estimulan a la PKC. El  $IP_3$  libera  $Ca^{++}$  del retículo endoplásmico. Tanto la PKC como el  $Ca^{++}$  son importantes mensajeros en la respuesta secretora de insulina de las células  $\beta$  adultas. En las células fetales es poco lo que se conoce acerca del papel de estos mensajeros. Sin embargo aún cuando no se ha estimado la concentración intracelular de calcio en las células  $\beta$  fetales estimuladas con agonistas muscarínicos; sería posible especular que el mecanismo de acción del agonistas CCh en la secreción de insulina es a través de un aumento en la concentración intracelular de calcio inducido por  $IP_3$  (Wollheim y Biden, 1986), ya que en el islote fetal se ha propuesto que la vía de activación de la PKC por DAG, es inmadura (Tuch, et al 1990).

Sería interesante medir la concentración intracelular de calcio en las células  $\beta$  fetales aisladas estimuladas con glucosa y CCh para aclarar el papel de este ión en la secreción de insulina.

La secreción de insulina en las células fetales parece depender de la presencia de calcio extracelular, se ha observado una pequeña secreción de insulina en el islote fetal de humano, al ser perfundidos con 10 mM de  $Ca^{++}$  o con los ionóforos: ionomocina y A23187 (Tuch et al 1990) y que esta secreción se inhibe en ausencia de calcio extracelular. La entrada de calcio a través de canales de  $Ca^{++}$  sensibles de voltaje es necesaria para la secreción de insulina en las células adultas, es posible que en las células fetales los canales de  $Ca^{++}$  sean también importantes en el mecanismo de secreción de insulina. Los grupos de Tuch (1990) y Weinhaus (1995) observaron que en los islotes fetales (20-21 días) hay una inhibición de la secreción de insulina estimulada por  $Ca^{++}$  con los antagonistas de canales de  $Ca^{++}$  sensibles a voltaje: verapamil y nifedipina.

### *Subpoblaciones funcionales de células $\beta$*

En este estudio se observó la presencia de distintas subpoblaciones de células  $\beta$  fetales, similares a las que se describieron en las células  $\beta$  adultas (Hiriart y Ramírez-Medeles, 1991) que difieren en la tasa de secreción de insulina. Este es el primer trabajo en el que se muestra que la secreción de insulina de las células fetales aisladas es heterogénea.

Las siguientes son observaciones que apoyan la heterogeneidad funcional en las células  $\beta$  adultas a) variabilidad en el transporte de glucosa (Tominaga et al 1986), b) en la actividad de biosíntesis y contenido de insulina inducida por glucosa (Pipeleers, et al 1987; Schuit, et al., 1988), c) en la secreción de insulina (Hiriart et al., 1991 y 1993; Van Schravendijk, et al., 1992; Van de Winkel y Pipeleers, 1983; Bosco y Meda, 1991) y d) diferentes propiedades electrofisiológicas entre las células  $\beta$ . Hiriart y Matteson (1988), observaron una diferente densidad de corrientes de calcio en las células  $\beta$  adultas aisladas, así como una densidad más alta de canales de sodio en las subpoblaciones de células LP y MP (Hiriart et al., 1994). Es probable que la respuesta "in vivo" de las células  $\beta$  esté determinada por la heterogeneidad funcional en la población del islote (Pipeleers et al, 1992).

Cuando las células fetales fueron incubadas tanto en 5.6 mM como en 20.6 mM de glucosa alrededor del 50 % del total de células formaron placas de insulina pequeñas, este porcentaje fué 50 % más alto que en las células adultas (Hiriart y Ramírez-Medeles, 1991). En 20.6 mM de glucosa, aumentó 4 veces el porcentaje de células MP en paralelo al aumento en el índice de secreción (100 %). En las células  $\beta$  fetales, la subpoblación de células LP solamente constituyó el 3 % del total de las células. Esta observación es importante porque en las células adultas esta

subpoblación es la que determina principalmente la cantidad de insulina secretada y la que es modulada por los secretagogos (Hiriart y Ramirez-Medeles, 1993). En cambio en las células fetales la subpoblación MP es la que determinó la cantidad total de insulina secretada cuando las células fueron incubadas en una concentración de glucosa alta.

Sería interesante estudiar las propiedades electrofisiológicas de las células  $\beta$  fetales aisladas y correlacionarlas con el área de inmunoplaaca con la técnica de RHPA, ya que es posible que en las células que secretan una mayor cantidad de insulina, exista una mayor densidad de canales de calcio sensibles a voltaje.

#### ***Efecto del CCh sobre las subpoblaciones funcionales.***

Las células fetales tienen una actividad secretora de insulina menor que las células adultas, ya que en las primeras, la subpoblación MP fueron las células con la tasa de secreción mayor y las que fueron principalmente afectadas por el agonista CCh (Figura 14). El CCh en 5.6 mM de glucosa aumentó 4 veces el porcentaje de células MP, en paralelo al aumento en el índice de secreción (86 %). De la misma manera, cuando las células se incubaron en 20.6 mM de glucosa, el CCh disminuyó el porcentaje de células MP en un 76 % en paralelo a la disminución (43 %) en el índice de secreción. En contraste a estos resultados, en las células adultas, el CCh afectó principalmente a la subpoblación LP (Hiriart y Ramirez Medeles, 1993), pero como en las células fetales esta subpoblación LP solo fué del 3 % del total, no es sorprendente que el fármaco tuviera un efecto sobre la células MP que es la que tiene la tasa de secreción más alta en las células fetales.

No sabemos porque el CCh afecta preferentemente a una

subpoblación, es posible que se deba a que en la membrana de las células MP exista un número mayor de receptores muscarínicos.

### *El efecto de AMPc y CCh sobre la secreción de insulina.*

Como se mencionó antes, es probable que la vía de transducción del CCh sea mediada por una fosfolipasa C que al ser activada por una proteína G forme  $IP_3$  y DAG, los cuales son agentes importantes en la secreción de insulina, al liberar calcio de pozas intracelulares y activar a la PKC, respectivamente, sin embargo no se conoce si esta vía, activada por CCh, es independiente o depende en algún punto de otra vía de transducción como la del AMPc, así como se ha propuesto en eritrocitos de rana y en células PC12 (Paulssen et al., 1992; McNicol y Schulman 1992) en las que existe un mecanismo de intercomunicación ("cross-talk") entre el sistema AMPc-adenilato ciclasa y la PKC. Interesados en conocer si existe un mecanismo parecido en las células  $\beta$  fetales, en el presente trabajo se estudió el efecto de db-AMPc sobre la secreción de insulina estimulada con CCh en 5.6 mM de glucosa.

Se observó que el CCh aumentó la secreción de insulina y que el db-AMPc por sí sólo no afectó la secreción, lo cual concuerda con las observaciones de Hellman et al., (1974) en islotes completos de animales adultos. Asimismo observamos que en presencia de CCh y db-AMPc, la secreción de insulina aumentó 2.2 veces como resultado del aumento tanto en el área de inmunoplaaca como en el porcentaje de células secretoras. Sin embargo este aumento no fué estadísticamente diferente del aumento inducido por CCh, lo cual podría sugerir que el CCh actúa en la secreción de insulina, en una vía independiente del sistema de transducción del AMPc, al menos en las células  $\beta$  fetales. Estos resultados concuerdan con

los observados por Gagerman y colaboradores (1978), en los que se propuso que el AMPc no parece ser un segundo o tercer mensajero en la acción secretora de insulina por agentes colinérgicos.

Es posible que en el estado fetal, la vía de transducción AMPc-adenilato ciclasa, sea inmadura, así como se ha propuesto para la vía de activación de la PKC (Tuch et al., 1990) y por eso no observamos efecto del AMPc sobre la secreción de insulina, aunque no estudiamos su efecto en una concentración de glucosa alta, ya que al parecer el AMPc potencia la secreción de insulina únicamente en concentraciones de glucosa altas (Wiedenkeller et al., 1983).

Con los presentes resultados no es posible postular un papel preciso del AMPc como mediador en el mecanismo de transducción de las señales por los receptores muscarínicos, ni descartar un posible papel del AMPc sobre la secreción de insulina, cuando la concentración de glucosa es alta. Habría que hacer los experimentos pertinentes para postular o descartar el papel del AMPc en la secreción de insulina.

#### ***Efecto de cultivar a las células en presencia de db-AMPc sobre la secreción de insulina.***

Algunos estudios del laboratorio (Sánchez 1994) demostraron que la secreción de insulina de las células  $\beta$  adultas cultivadas con db-AMPc durante 5-7 días, aumenta en un 290 % en condiciones estimuladoras de glucosa, respecto al testigo, por lo cual resultó interesante estudiar si el AMPc afecta de manera similar la secreción de insulina de las células fetales. Bajo estas condiciones, el pretratamiento de 48 h con db-AMPc reclutó a un mayor número de células a la actividad secretora. Asimismo aumentó la cantidad total de insulina secretada en las células incubadas por



1 h con CCh. Estos resultados sugieren que aun cuando el AMPc aumente la secreción estimulada con CCh, el AMPc no es un potenciador de la secreción de insulina de las células fetales, ni en 1 h ni en 48 h de incubación con dicho análogo.

En resumen las conclusiones de este trabajo son las siguientes:

- a) Las células  $\beta$  fetales aisladas secretan insulina en respuesta a la glucosa y al CCh.
- b) La cantidad total de insulina secretada se duplicó en 20.6 mM de glucosa con respecto a 5.6 mM.
- c) El CCh aumentó la secreción de insulina en 5.6 mM de glucosa.
- d) El efecto de CCh fué a través de su unión a receptores muscarínicos presentes en la membrana de las células fetales.
- d) Las subpoblaciones funcionales de células  $\beta$  aparecen desde la etapa fetal.
- e) La subpoblación de células con una tasa de secreción media fué modulada por la glucosa y el CCh.
- f) El efecto del CCh podría ser independiente del segundo mensajero AMPc.

Los resultados observados en este trabajo abren nuevas perspectivas de trabajo como son:

- Estudiar el efecto del agonista CCh en ausencia de glucosa.
- Estudiar las propiedades electrofisiológicas de las células  $\beta$  fetales
- Explorar si en la subpoblación de células MP existe una mayor densidad de canales de calcio y/o de sodio.
- Estudiar si en la subpoblación de células MP existe un mayor número de receptores muscarínicos.
- Caracterización farmacológica del receptor muscarínico en las células

fetales.

## BIBLIOGRAFIA

Ahrén, B., Taborsky G.J. Jr. y Porte D. Jr., 1986. Neuropeptidergic versus cholinergic and adrenergic regulation of islets hormone secretion. *Diabetologia*, 29:827-836.

Amnåla C., Eliasson L.; Bokvist K.; Larsson O.; Ashcroft F.M. y Rorsman P., 1993. Exocytosis elicited by action potentials and voltage-clamp calcium currents in individual mouse pancreatic B-cells. *Journal of Physiology* 472:665-688.

Ammon H. P. T.; Faluy A.; Mark M.; Strolin W. y Wahl M.A., 1985. Failure of glucose to affect  $^{86}\text{Rb}$  efflux and  $^{45}\text{Ca}$  uptake of fetal rat pancreatic islets. *J Physiol.*, 358:365-372.

Ammon H.P.T.; Glocker C, Waldner R.G y Wahl, M.A. 1989. Insulin release from pancreatic islets of fetal rats mediated by leucine b-DCH, tolbutamide, glibenclamide, arginine, potassium chloride, and theophylline does not require stimulation of  $\text{Ca}^{2+}$  net uptake. *Cell Calcium*, 10:441-450 pp.

Ashcroft, S.J.H, Bunce J, Lowry M, Hansen S.E. y Hedeskov, C.J., 1978. The effect of sugar on (pro)insulin biosynthesis. *Biochem. J.* 174:517-

Ashcroft, F.M; Harrison, D.E. y Ashcroft, S.J.H., 1984. Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic  $\beta$ -cells. *Nature* 312:446-448.

Ashcroft M.F. y Ashcroft S.J.H 1992. Mechanism of insulin secretion. In: *Insulin molecular biology to pathology*. IRL Press, New York.

Bailey E.M., Guest P.C. y Hutton J.C, 1992. Insulin synthesis. In: *Insulin secretion molecular biology to pathology*. IRL PRESS, New York.

Bearer E.L. y Orci L., 1985. Endothelial fenestral diaphragms: a quick-freeze, deep-etch study. *J. Cell Biol.*, 100:418-28.

Beckers, C.J. y Balch, W.E., 1989.  $\text{Ca}^{2+}$  & GTP: essential components in vesicular trafficking between the ER and Golgi apparatus. *J. Cell. Biol.* 108:1245-56.

Bell G. I., Picot R. L., Rutter W. J., Cordell B., Tisher E., y Goodman H. M., 1980. Sequence of the human insulin gene. *Nature*, 284:26-32.

Berthoud H. R., Trimble E. R., Siegel E. G., Bereiter D. A., y Jeanrenaud B., 1980. Cephalic-phase insulin secretion in normal and pancreatic islet-transplanted rats. *Am. J. Physiol.*, 238:E336-E340.

Best L. y Malaisse W.J., 1983a. Phosphatidylinositol and phosphatidic acid metabolism in rat pancreatic islets by glucose and carbamylcholine. *Biochem Biophys. Res. Comm.* 116(1):9-16.

Best L. y Malaisse W.J., 1983b. Phosphatidylinositol and phosphatidic acid

metabolism in rat pancreatic islets in response to neurotransmitter and hormonal stimuli. *Biochimica et Biophysica Acta*, 750:157-163.

Biden T.J., y Carol L. B., 1993. Cross-talk between muscarinic and adenosine-receptor signalling in the regulation of cytosolic free  $Ca^{2+}$  and insulin secretion. *Biochem. J.* 293:721-728

Bonner T. I., Buckley N. J., Young A. y Brann M. R., 1987. Identification of a family of muscarinic receptor genes. *Science*, 237:527.

Bonner-Weir S., 1988. Morphological evidence for pancreatic polarity of B-cells within islets of Langerhans. *Diabetes*, 37:616-21.

Brinn E.J., Burden H.W y Schweisthal M.R., 1977. Innervation of the cultured fetal rat pancreas. *Cell Tissue Res*. 182:133-138.

Buchan A. M.J., 1989. Digestion and absorption. En Patton H.D., A.F. Fuchs, B. Hille, A. M. Scher y R. Steiner (eds) *Textbook of physiology*, pp1438-1460. W.B. Saunders Company.

Cajal R. y Sala C. 1891. Terminación de los nervios y tubos glandulares del páncreas de los vertebrados. Barcelona (citado por Coupland).

Campbell K.P., Leung A.T. y Sharp A.H. 1988. The biochemistry and molecular biology of the dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Trends Neurosci.* 11:425-430.

Castro F. De, 1923. Contribution à la connaissance de l'innervation du pancréas. *Trv. Lab. Rech. biol.*, Madrid, 21:423-457 (citado por Coupland)

Cicirelli M.F. y Smith L.D., 1985. Cyclic AMP levels during the maturation of *Xenopus* Oocytes. *Dev. Biol.* 108:254-258.

Coupland R.E., 1958. The innervation of pancreas of the rat, cat and rabbit as revealed by the cholinesterase technique. *Journal of Anatomy*, 92: 143-149.

Charles MA., Fanska R.; Schmid F.G.; Forsham P.H y Grodsky, G.M., 1973. Adenosine 3',5'-monophosphate in pancreatic islets: glucose-induced insulin release. *Science*, 179:569-571.

Charles M. A.; Lawecki J.; Pictet R., y Grodsky M., 1975. Insulin secretion. Interrelationships of glucose cyclic adenosine 3':5'-monophosphate, and calcium. *Jour. Biol. chem.*, 250(15):6134-6140.

Christie M.R. y Ashcroft S.J.H., 1984. Cyclic AMP-dependent protein phosphorylation and insulin secretion in intact islets of Langerhans. *Biochem. J.* 218:87-99.

Christie M.R. y Ashcroft, S.J.H., 1985. Substrates for cyclic AMP-dependent protein kinase in islets of Langerhans. *Biochem. J.*, 227:727-736.

Cook D.L. y Taborsky G.J. 1990. B-cell function and insulin secretion. In Diabetes Mellitus. Theory and practice. Rifkin H. y Porte D. (eds) 4a ed. Elsevier Science P. New York. 89-103 pp.

Dean P.M. y Matthews, E.K., 1968. Electrical activity in pancreatic islets cells. *Nature*, 219:388-390.

Dehaye J-P., Winand J., Hermans L., Poloczek P. y Christophe J., 1983. Inhibitory effects of pirenzepine on muscarinic stimulation of rat pancreas. *European J. Pharmacol.*, 92:259

Douarin Le N.M., 1988. On the origin of pancreatic endocrine cells. *Cell*, 53:169-171.

Doupnik C.A. y Pun, R. Y. K., 1992. Cyclic AMP-dependent phosphorylation modifies the gating properties of L-type  $Ca^{2+}$  channels in bovine adrenal chromaffin cells. *PLugers Arch. Eur. Jour. Physiol.*, 420:61-71.

Eason R. A., Landt M., Colca J.R.; Hughes H. J.; Turk J. y McDaniel M., 1990. Effects of insulin secretagogues on protein Kinase C-catalyzed phosphorylation of an endogenous substrate in isolated pancreatic islets: *Journal Biol. Chem.*, 265:14938-14946.

Eisenbarth G. S., Shimizu M. A. Bowring y S. Wells, 1982. Expression of receptors for tetanus toxin and monoclonal antibody A2B5 by pancreatic islet cells: *Proc. Natl Acad. Sci*, 79:5066-70.

Escurat M., Djabali K., Huc C., Landon F., Bécourt C., Boitard C., Gros F. y Portier 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-1, in the rat insulinoma RIN5F cell line. *Dev. Neurosci.*, 13:424-432.

Espinosa de los Monteros A. M.; Driscoli S.G. y Steinke J., 1970. Insulin release from isolated human fetal pancreatic islets. *Science* 168:1111-1112.

Fletcher D.J., Rowley, W.H.; Pabst S.J. y Brinn J.E., 1989. Age-dependent stimulation of neonatal insulin release and inositol phosphate accumulation by CCK-8 y and carbachol. *Diabetes*, 38:1337-42.

Fontaine J., Lièvre Le C. y Douarin Le N.M. 1977. What is the developmental fate of the neural crest cells which migrate into the pancreas in the avian embryo?. *General and Comparative Endocrinology*, 33:394-404.

Freinkel, N. B., 1980. Of pregnancy and progeny. *Diabetes*, 29:1023-1025.

Furness J. B. y Costa M., 1980. Types of nerves in the enteric nervous system. *Neuroscience*, 5:1-20.

Gagerman F.; Idahl H.P.; Meissner L.A.; y Tajjedal I.B., 1978. Insulin release, cGMP, cAMP and membrane potential ion acetylcholine-stimulated islets. *Am. J. Physiol.* 235:E493-

E500.

Giachetti, A. Micheletti, R. Montagna, E., 1986. Cardioselective profile of AF-DX 116 a muscarinic M<sub>2</sub> receptor antagonist. *Life Sci.* 38:1663-72.

Gilon P., Bertrand G.; Loubatieres-Mariani M.M.; Remacle C. y Henquin J.C., 1991. The influence of  $\gamma$ -aminobutyric acid on hormone release by the mouse and rat endocrine pancreas. *Endocrinology* 129:2521-2529.

Gould G. W. y Bell G. I., 1990. Facilitative glucose transporters: an expanding family. *TIBS*, 15:18-23.

Grodsky G.M., 1972. A threshold distribution hypothesis for packet storage of insulin. II Effect of calcium. *Diabetes* 21(S.2):584-593

Gross R. W.; Ramanadham S.; Kruszka K.K. y Turk J., 1993. Rat and human pancreatic islets cells contain a calcium ion independent phospholipase A<sub>2</sub> activity selective for hydrolysis of araquidonate which is stimulated by adenosine triphosphate and is specifically localized to islets  $\beta$ -cells. *Biochemistry*, 32:327-336.

Hahn H.-J., Gilfe E. y Hellman, B., 1980. Calcium and pancreatic  $\beta$ -cell function. Evidence for cyclic AMP-induced translocation of intracellular calcium. *Biochim. Biophys. Acta*, 630:425-432.

Hammer R. Berrie, C.P. Birsdall, N. J. M. Burgen A. S. V. Hulme E. C., 1980. Pirenzepine distinguishes between subclasses of muscarinic receptors. *Nature*, 283:90-92.

Harrison D.E.; Ashcroft S.J.H.; Christie M.R. y Lord J.M., 1984. Protein phosphorylation in the pancreatic  $\beta$ -cell. *Experientia* 40:1075-1084.

Heduskov, C.J., 1980. Mechanisms of glucose-induced insulin secretion. *Physiol. Rev.* 60:442-509.

Hellman B; Idahl L.-A.; Lernmark A y Taljedal I.-B., 1974. The pancreatic  $\beta$ -cell recognition of insulin secretagogues: Does cyclic AMP mediate the effect of glucose?. *Proc Natl. Acad. Sci.* 71(9):3405-3409.

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

Henquin J.C.; Garcia M.C.; Bozem M.; Hermans M.P. y Nenquin M., 1988. Muscarinic control of pancreatic  $\beta$ -cell function involves sodium-dependent depolarization and calcium influx. *Endocrinology*, 122:2134-2142.

Henquin J.C. y Nenquin M., 1988. The muscarinic receptor subtype in mouse pancreatic B-cells. *Febs Lett.*, 236(1):89-92.

Herchuelz A., y Malaisse, W.J., 1978. Regulation of calcium fluxes in pancreatic islets: dissociation between calcium and insulin release. *J. Physiol. London*, 283:409-424.

Hernans M.P.; Schmeer W. y Henquin J.C., 1987. Modulation of the effect of acetylcholine on insulin release by the membrane potential of  $\beta$  cells. *Endocrinology*, 120(5):1765-1773.

Hillaire-Buys D, Chapal J, Bertrand G, Petit P y Loubatieres-Mariani MM, 1994. Purinergic receptor on insulin-secreting cells. *Funmam-Clin-Pharmacol*, 8(2):117-27.

Hiriart M. y Matteson D.R., 1988.  $\text{Na}^+$  channels and two types of  $\text{Ca}^{2+}$  channels in rat pancreatic  $\beta$  cells identified with the reverse hemolytic plaque assay. *J. Gen Physiol.* 91:617-639.

Hiriart M. y Ramirez-Medeles M.C., 1991. Functional subpopulations of individual pancreatic  $\beta$ -cells in culture. *Endocrinology*, 128(6):3193-3198.

Hiriart M. y Ramirez-Medeles M.C., 1993. Muscarinic modulation of insulin secretion by single pancreatic  $\beta$ -cells. *Molecular and cellular Endocrinology* 93:63-69.

Hogan A.; Heyner S.; Charron M.J.; Copeland N.G.; Gilbert D.J.; Jenkins N.A.; Thorens B. y Schultz G.A., 1991. Glucose transporter gene expression in early mouse embryos. *Development*, 133:363-372.

Holst J.J.; Jensen S.L.; Knuhtsen S. y Nielsen O. V., 1983. Autonomic nervous control of pancreatic somatostatin secretion. *Am. J. Physiol.*, 245:E542-E548.

Holst J. J., 1992. Role of classical and peptidergic neurotransmitter in insulin secretion. In *nutrient regulation of insulin secretion*. (Flatt P.R. ed.) pp. 23-39. University Press, Cambridge.

Howell S. L. 1984. The mechanism of insulin secretion. *Diabetologia* 26:319-27.

Hulme E. C., Birdsall N.J.M y Buckley N.J., 1990. Muscarinic receptor subtypes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 30:633-73.

Hullme E. C., Curtis C. A. M., Page K. M. y Jones P. G., 1993. Agonist activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Cell. Signall*, 5(6):687-694.

Hurst R.D. y Morgan N.G., 1989. Intracellular events responsible for the inhibition of insulin secretion by somatostatin. *Biochem. Soc. Trans*, 17:1085-6.

Jetton T.L. y Magnuson M.A., 1992. Heterogeneous expression of glucokinase among pancreatic  $\beta$  cells. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 89:2619-2623.

Liao C-F., Themmen, A.P.N. Joho R., Barberis C., Birbaumer M.; Birbaumer L., 1989. Molecular cloning and expression of a fifth muscarinic acetylcholine receptor. *J. Biol. Chem.*, 264:7328-37.

Kitbachi A. E., Duckworth W. C. y Stentz B., 1990. Insulin synthesis proinsulin and peptides. En *Diabetes Mellitus*. Ed. Rifkin H. y POste D. (Elsevier New York), 71-80 pp.

MacNicol M y Schulman H., 1992. Cross-talk between protein kinase C and multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 267(17):12197-201.

Malaisse W. J., Malaisse-Lagac F., Walker M. M. y Lacy P. E., 1971a. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release V. The participation of a microtubular-microfilamentous system. *Diabetes*, 20:257-265.

Malaisse-Lagac, F y Malaisse W.J., 1971b. Stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. III Uptake of <sup>45</sup>Ca by isolated islets of Langerhans. *Endocrinology*, 88:71-80.

Malaisse W., 1972. Hormonal and environmental modification of islet activity. In *Handbook of physiology Endocrinology*. Vol 1. The endocrine pancreas (Steiner D.F. y Freinkel, N. eds) pp 237-260. American physiological Society, Washington D.C.

Malaisse, W.J.; Van Obberghens E.; Devis G.; Somers G., y Ravazzola M., 1974. Dynamic of insulin release and microtubular-microfilamentous systems. V.A. model for the phasic release of insulin. *Eur. J. Clin. Invest.* 4:313-318.

Meda P., Michaels, R. L. Halban P. A., Orci L. Y. Sheridan J. D., 1983. In vivo modulation of gap junctions and dye coupling between B-cells of the intact pancreatic islets. *Diabetes*, 32:858-68.

Meissner H. P. y Preissler M., 1979. Possible ionic mechanisms of the electrical activity induced by glucose and tolbutamide in pancreatic B-cells. En *Diabetes* (ed. W. K. Waldhals). International congress series 500 pp. 169-172. Excerpta Medica, Amsterdam.

Meissner H. P. y Schmelz, H., 1974. membrane potential of B-cells in pancreatic islets. *Pflugers Arch.* 351:195-206.

Mikoshiba K., 1993. Inositol 1,4,5,-trisphosphate receptor. *TIPS*, 14:86-89.

Misler D. S., Falke L. C., Gillis K y McDaniel, M. L., 1986. A metabolite regulated potassium channel in rat pancreatic B-cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83,7119-23.

Montague, W.; Morgan N. G.; Rumford G. M. y Prince C.A., 1985. Effect of glucose polyphosphoinositide metabolism in isolated islets of Langerhans. *Biochem. J.* 227:483-489.

Morgan N. G.; Rumford G.M. y W. Montague W., 1985. Studies on the role of inositol trisphosphate in the regulation of insulin secretion from isolated rat islets of Langerhans, *Biochem. J.*, 228:713-718.

Müller E. 1892. Zur Kenntniss der ausbreitung und endigungswiese der magen-darm-und pankreas-nerven. *Arch. mikr. Anat.* 40:390-409 (citado por Coupland)



Neill 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.

Nesher R. y Cerasi E., 1987. Biphasic insulin release as the expression of combined inhibitory and potentiating effects of glucose. *Endocrinology* 121:1017-1024.

Ogawara H., Kawamura M., Honda M., Karibe S., Iwasaki N., Tasaka Y. y Omori Y., 1993. Reversal of glucose insensitivity of pancreatic B-cells due to prolonged exposure to high glucose in culture: effect of nicotinamide on pancreatic B-cells. *Tohoku J. Exp. Med.*, 169(2):159-66.

Orci L., Malaisse Lagac F., Ravazolla M., Rouiller D., Renold A. E., Perrelet A. y Unger R., 1975. A morphological basis for intercellular communication between  $\alpha$  and  $\beta$  cells in the endocrine pancreas. *J Clin Invest*, 56:1066-70.

Orci L. y Unger R.H., 1975. Functional subdivision of islets of Langerhans and possible role of D-cells. *Lancet*, 2:1243-1244.

Orci L., Malhotra, V., Amherdt, M. Serafini T., y Rothman J.E. 1989. Dissection of a single round of vesicular transport: sequential intermediates for intercisternal movement in the Golgi stack. *Cell* 56:357-68.

Ozawa S. y Sand O., 1986. Electrophysiology of excitable endocrine cells. *Physiological Reviews*. 66(4):887-952.

Panten U. 1987. Rapid control of insulin secretion from pancreatic islets. *Isi Atlas Sci-Pharmacol.*, 1:307-9.

Paulssen E. J., Paulssen R. H., Gautvik K. M. y Gørdeladze J. O., 1992. "Cross-talk" between phospholipase C and adenyl cyclase involves regulation of G-protein levels in GH<sub>3</sub> rat pituitary cells. *Cellular signalling*, 4(6)747-755.

Pearse A. G. E., 1968. Common cytochemical properties of cells producing polypeptide hormones (the APUD series) and their relevance to thyroid and ultimobranchial cells and calcitonin. *Proc Roy Soc (Biol)*, 170:71-

Pearse A. G. E., 1969. The cytochemistry and ultrastructure of polypeptide hormone-producing cells of the APUD series and the embryological, physiological and pathologic implications of the concept. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 17(5):303-313.

Peralta E.G., Ashkenazi A., Winslow, J.W., Smith D.H. Ramachandran, J. Capon D.J., 1987. Distinct primary structures, ligand binding properties and tissue-specific expression of four human muscarinic acetylcholine receptors. *EMBO J.*, 6:3923-29.

Permutt, M.A. y Kipnis, D.M., 1972. Insulin biosynthesis: On the mechanism of glucose stimulation. *J. Biol. Chem.*, 247(4):1194-1199.

Permutt M. A. 1981. In islets of langerhans (ed. Cooperstain y D. t: Watkins), pp 75-95. Academic Press, New York.

Pictet R.L., Clark W.R.; Williams R.H. y Rutter W.J., 1972. An ultrastructural analysis of the developing embryonic pancreas. *Development. Biol.*, 29:436-467.

Pictet R.L. y Rutter, W.J., 1972. Development of the embryonic endocrine pancreas. En *Handbook of Physiology*, Sec. 7, vol 1; D.F. Steiner y Frenkel, eds. (Washington D.C.: American Physiology Society), pp25-66.

Pictet R.L.; Rall L.B.; Phelps P. y Rutter W.J., 1976. The neural crest and the origin of the insulin-producing and other gastrointestinal hormone-producing cells. *Science* 191:191-192.

Pipeleers D. G., Pipeleers-Marichal, M. A., Kipnis D. M., 1976. Microtubule assembly and the intracellular transport of secretory granules in pancreatic islets. *Science*, 191:88-90.

Pipeleers D. G., Marichal M., y Malaisse W. J., 1973. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. XIV glucose regulation of insular biosynthetic activity. *Endocrinology*, 93:1001-11.

Porte D. Jr. y Halter J. B., 1985. El pancreas endocrino y la diabetes mellitus. En *Tratado de endocrinología*. Williams, R. H. (ed), México, Interamericana, pp 774-917.

Porte D. y Woods S. C., 1990. Neural regulation of islet hormones and its role in energy balance and stress hyperglycemia. In *Diabetes Mellitus. Theory and practice*. Cap. 11. Rifkin H. y Porte D. (eds). Elsevier Science publishing, New York, N.Y. 175-197.

Prentki M. y Wollheim C.B., 1984. Cytosolic free  $Ca^{2+}$  in insulin secreting cells and its regulation by isolated organelles. *Experientia*, 40:1052-1060.

Rasmussen H, Zawalich K.C., Ganesan S.; Calle R. y Zawalich W.S., 1990. Physiology and pathophysiology of insulin secretion. *Diabetes Care*, 13:635-666.

Reetz A., Solimena M.; Matteoli M.; Folli F.; Takei K. y Camilli De P., 1991. GABA and pancreatic  $\beta$ -cells: colocalization of glutamic acid decarboxylase (GAD) and GABA with synaptic-like microvesicles suggests their role in GABA storage and secretion. *The EMBO J.* 10(5):1275-1284.

Rehfeld J.F, Larsson I.-I.; Goltermann N.R.; Schwartz T.W.; Holst J.J.; Jensen S.L. y Morley J.S., 1980. Neural regulation of pancreatic hormone secretion by the C-terminal tetrapeptide of CCK. *Nature (London)* 284:33-38.

Renold A., 1971. The beta cell and its responses. Summarizing remarks and some contributions from Geneva. *Diabetes*, 21:622

Reuter M., 1983. Calcium channel modulation by neurotransmitter, enzymes and drugs. *Nature* 301:569-574.

Rorsman P, y Trube G., 1986. Calcium and delayed potassium currents in mouse

pancreatic  $\beta$ -cells under voltage-clamp conditions. *J. physiol.* 374:531-550.

Rorsman, P.; Ashcroft, F.M. y Trube G. 1988. Single Ca channel currents in mouse pancreatic  $\beta$ -cells. *PNuegers. Arch.* 412:597-603.

Rorsman P.; Arkhammar P.; Bokvist K.; Hellerstrom C.; Nilsson T.; Welsh M.; Welsh N. y Berggren P-O., 1989. Failure of glucose to elicit a normal secretory response in fetal pancreatic beta cells results from glucose insensitivity of the ATP-regulated  $K^+$  channels. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 86:4505-4509.

Samols E., Bonner-Weir, S. y Weir G. C. 1986. Intra-islets insulin-glucagon-somatostatin relationships. *Clin Endocr. Metab.* 15:33-58.

Salomon D., y Meda P., 1986. Heterogeneity and contact-dependent regulation of hormone secretion by individual  $\beta$  cells. *Exp. Cell. Res.*, 162:507-520

Sánchez C., 1994. Análisis de la secreción de insulina por células  $\beta$  pancreáticas aisladas en cultivo tratadas con NGF y AMPc. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM.

Sanger F., 1959. Chemistry of insulin. *Science*, 129:1340.

Schmechel D., 1978. Neurone-specific enolase is a molecular marker for peripheral and central neuroendocrine cells. *Nature* 276:834-36.

Schuit F.C. y Pipeleers D.G., 1986. Differences in adrenergic recognition by pancreatic A and B cells. *Science (Washington A.C.)* 232:875-877.

Smith P.F.; Luque E.H y Neil J.D., 1986. Detection and measurement of secretion from individual neuroendocrine cells using a reverse hemolytic plaque assay. *Methods Enzymol.*, 124:443-465.

Steffens A. B., 1981. The modulatory effect of the hypothalamus on glucagon and insulin secretion in the rat. *Diabetologia*, 20:412-16.

Steffens A. B., Flik G. Kuipers F., Lotter E. C. y Luiten P. G., M., 1984. Hypothalamically-induced insulin release and potentiation during oral and intravenous glucose loads. *Brain Res.* 301:351-361.

Steinberg J.P; Leitner J.W.; Draznin B.y Sussman K.E., 1984. Calmodulin and Cyclic AMP. Possible different sites of action of these two regulatory agents in exocytotic hormone release. *Diabetes*, 33:339-345.

Sperling M.A., 1980. Carbohydrate metabolism: glucagon, insulin, and somatostatin. In Tulchinsky D, Ryan K.J., (eds). *Maternal-fetal endocrinology*. Philadelphia: W.B. Saunders :333-354.

Steiner D.F., Chan S.J.; Welsh J.M. y Kwok S.C.M., 1985. Structure and evolution of

the insulin gene. *Ann. Rev. Genet.*, 19:463-84.

Taborsky G.J. Jr. The endocrine pancreas control of secretion. In textbook of physiology circulation, Respiration, body fluids, metabolism and endocrinology. Patton Fuchs, Hille Scher Steiner (eds). 21a edición. Vol 2, 1989, 1522-1543.

Thams P., Capito K y Hedeskov C. J. 1984. Endogenous substrate proteins for Ca<sup>+</sup>-calmodulin-dependent, Ca<sup>+</sup>-phospholipid-dependent and cyclic AMP-dependent protein kinases in mouse pancreatic islets. *Biochem.j.m* 221:247-53.

Teitelman G. y Lee J. K., 1987. Cell lineage analysis of pancreatic islets cell development. glucagon and insulin cells arise from catecholaminergic precursors present in the pancreatic duct. *Dev. Biol.* 121:454-466.

Teitelman G., Alpert S y Hanahan D., 1988. Proliferation, senescence, and neoplastic progression of  $\beta$  cells in hyperplasic pancreatic islets. *Cell*, 52:97-105.

Teitelman G. 1990. Insulin cells of pancreas extend neurites but do not arise from the neuroectoderm. *Developmental Biology*, 142:368-379.

Tominaga M., Komiya I., Johnson J. H., Inman L., Alam T., Moltz J., Crider B., Stefan Y., Baetens D., McCorkle K., Orci L. y Unger R. H., 196. Loss of insulin response to glucose but not arginine during the development of autoimmune diabetes in BB/W rats: relationships to islet volume and glucose transport rate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:9749-9753.

Trimble F. R.; Berthoud H.R.; Siegel E.G.; Jeanrenaud B y Renold A.E., 1981. Importance of cholinergic innervation of the pancreas for glucose tolerance in the rat. *Am. J. Physiol.* 241: E337-E341.

Tuch B.E.; Osgerby K.J. y Turtle J.R., 1990. The role of calcium in insulin release from the human fetal pancreas. *Cell Calcium*, 11:1-9.

Tuch B. E.; Roberts E.C. y Darby K.B., 1992. Release of proinsulin from the human fetal  $\beta$  cell. *Journal of Endocrinology*, 132:159-167.

Valverde I, Vandermeers A., Anjaneyulu, R. y Malaisse W. J., 1979. Calmodulin activation of adenylate cyclase in pancreatic islets. *Science* 206: 225-227.

Verspohl E. J., Tacke R., Mutschler E. y Lambrecht G., 1990. Muscarinic receptor subtypes in rat pancreatic islets: Binding and functional studies. *Europ. J. Pharmacol.*, 178:303-311.

Waldhausl W. K., Gasec S., Bratusch-Marrain P., Korn A. y Nowotny P., 1982. Feedback inhibition by biosynthetic human insulin of insulin release in healthy human subjects. *Am. J. Phys.* 243:E476-E487.

Wang J., Bainbridge K.G. y Brown J.C., 1992. Glucose- and acetylcholine-induced

increase in intracellular free  $Ca^{2+}$  in subpopulations of individual rat pancreatic  $\beta$ -cells. *Endocrinology*, 131:146-152.

Welshaus A. J., Poronnik P., Cook D. I. y Tuch B. E., 1995. Insulin secretagogues, but not glucose, stimulate an increase in  $(Ca^{2+})_i$  in the fetal rat  $\beta$ -cell. *Diabetes*, 44:118-124.

Weir, G.C y Bonner-Weir, S. 1990. Islets of Langerhans: The puzzle of intraislet interactions and their relevance to diabetes. *J. Clin Inv.*, 85:983-987.

Welsh M., Scherberg, N., Gilmore R. y Steiner D. F. 1986. Translational control of insulin-biosynthesis. Evidence for regulation of elongation initiation and signal-recognition-particle-mediated translational arrest by glucose. *Biochem. J.* 235:459-67.

Wiedeneller D. E. y Sharp G.W.G., 1983. Effects of forskolin on insulin release and cyclic AMP content in rat pancreatic islets. *Endocrinology* 113(6):2311-2313.

Wollheim C. B. y Sharp G. W., 1981. Regulation of insulin release by calcium. *Physiol. Rev.*, 61(4):919-973.

Wollheim, C.B. y Biden T.J. 1986. Second messenger function of inositol 1,4,5-trisphosphate. Early changes in inositol phosphates, cytosolic  $Ca^{2+}$  and insulin release in carbamylcholine-stimulated RINm5F cells. *J. Biol. Chem.*, 261:8314-8319.

Wood S. C. y Porte D. Jr., 1974. Neural control of the endocrine pancreas. *Physiol. Rev.* 54(3):596-619.

Zawalich, W.S., Zawalich K.C. y Ramussen H., 1989. The conditions under which rat islets are labelled with [ $^3H$ ] inositol alter the subsequent responses of these islets to a high glucose concentration. *Biochem. J.*, 259:743-749.

Xiao-Hong Gu, Kurose T; Kato S; Masuda K; Tsuda K; Ishida H. y Scino Y., 1992. Suppressive effect of GABA on insulin secretion from the pancreatic beta-cells in the rat. *Life Sciences*. 52:687-694.