



UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

asa abierta al tiempo

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA AMILINA
SOBRE LA SECRECIÓN DE INSULINA Y FACTOR DE
CRECIMIENTO NEURONAL (NGF) EN CELULAS
 β PANCREÁTICAS DE RATA.**



COORDINACIÓN DE SERVICIOS
DOCUMENTALES - BIBLIOTECA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

P R E S E N T A

MARÍA DEL CARMEN NAVARRETE BECERRIL

MÉXICO D.F.

MARZO DE 2001

225710

Esta tesis se realizó en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría de la **Dra. Marcia Hiriát Urdanivia** y la asesoría del **Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar** de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y del **Dr. Vicente Díaz Sánchez** del Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán.

La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana se encuentra dentro del Padrón de Programas de Posgrado de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, según No. de registro 309-0.

Agradezco al **CONACyT** el apoyo brindado durante el desarrollo del presente trabajo a través de la beca con número de registro 124749.

***A mis padres,
por ponerme a navegar en el mar de
la vida y construir el faro que me guía.***

***A mis hermanas
Reyna y Delia, por ayudarme siempre
a mantenerme firme al timón.***

***A mis hermanos
Roberto y Emiliano, por
permanecer a bordo.***

***A Lorena, Armando y a los (las)
dos futuros (as) navegantes.***

***A Juan Carlos Yañez O.
por izar velas y compartir el viento,
apostando por esta locura.***

...y al resto de la tripulación.

Gracias

***A la Dra. Marcia Hiriart Urdanivia,
por correr el riesgo conmigo, por su paciencia, y calidez
humana.***

***Al comité de sinodales: Dr. Francisco J. Alarcón Aguilar, Dr.
Rubén Román Ramos, Dr. Román Vidaltamamayo Ramírez,
y Dra. Claudia A. Soto Peredo, por su apoyo y sus
importantes aportaciones.***

***A Elena Larrieta, Paz Vital, Raquel Cortés y Carmen
Sánchez, por su inconmensurable ayuda y por compartir la
angustia y la alegría.***

***A mis compañeros y amigos de generación de la maestría,
por la risa que me salvó y por todo lo de más...***

***...y atravesar el mar, intentar la travesía
a pesar de tormentas y espejismos,
borrar la línea invisible y cotidiana
del sueño y la cordura.***

ÍNDICE.

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 ANTECEDENTES	2
1.1.1. Páncreas	2
1.1.2. Islotes pancreáticos	2
1.1.3. Célula β	5
1.1.4. Insulina	6
1.1.5. Amilina	10
1.1.6. Factor de Crecimiento Neuronal (NGF)	16
1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
1.3. JUSTIFICACIÓN	19
2. HIPÓTESIS.....	21
3. OBJETIVOS	22
3.1. Objetivo General	22
3.2. Objetivos Específicos	22
4. METODOLOGÍA	23
4.1. Cultivo de tejidos.....	23
4.2. Inmunofluorescencia e inmunocitoquímica	24
4.3. Secreción de insulina	25
4.4. Análisis Estadístico	26
5. RESULTADOS	27
5.1. Desarrollo del modelo experimental	27
5.2. Secreción de insulina	31
5.3. Análisis de subpoblaciones	36
6. DISCUSION	38
7. CONCLUSIONES	44
8. BIBLIOGRAFÍA	45

ABREVIATURAS

Am	Amilina
CAM's	Moléculas de adhesión celular
CGRP	Péptido relacionado con el gene de la calcitonina
CT	Calcitonina
CTR	Receptor para la calcitonina
DM	Diabetes mellitus
GABA	Ácido γ amino butírico
GAD	Descarboxilasa de glutarato
GLUT1	Transportador de glucosa (humanos)
GLUT4	Transportador de glucosa (roedores)
K_{ATP}	Canal de potasio sensible a ATP
LP	Inmunoplaca grande
NGF	Factor de crecimiento neuronal
p75	Receptor de baja afinidad a neurotrofinas
RAMP	Proteína modificadora de la actividad de receptores
RER	Retículo endoplásmico rugoso
REST	Factor de transcripción silenciador del elemento represor
RHPA	Ensayo hemolítico inverso
SBF	Suero bovino fetal.
SP	Inmunoplasmas pequeñas
Trk A	Receptor para NGF de alta afinidad

RESUMEN.

Las células β pancreáticas sintetizan y secretan insulina, amilina y factor de crecimiento neuronal (NGF). La insulina y la amilina se almacenan en los mismos gránulos de secreción y se secretan bajo los mismos estímulos. El principal efecto de la insulina es el aumento en la entrada de glucosa a las células insulinosensibles (adipocitos y células musculares) a partir del torrente sanguíneo. La amilina también participa en la regulación del metabolismo de carbohidratos. En humanos la amilina es capaz de polimerizar y formar agregados amiloides tanto fuera como dentro de la célula, por lo cual se le atribuyen ciertos efectos "citotóxicos". Entre las funciones más importantes del NGF se encuentra su acción neurotrófica y su contribución al mantenimiento del fenotipo diferenciado adquirido. Se ha observado que el NGF preserva la capacidad de las células β , para responder adecuadamente ante diferentes concentraciones de glucosa.

A la fecha no han sido caracterizados completamente los efectos de la amilina y del NGF sobre la fisiología de la célula β pancreática. En el presente trabajo se estudió el efecto de la amilina sobre la secreción de insulina. Se realizaron cultivos primarios de células β y se mantuvieron en medio definido con 15.6 mM de glucosa durante seis días bajo los tratamientos: amilina (100 nM), NGF (50 ng/ml), amilina-NGF (100 nM-50 ng/ml) y anticuerpo contra amilina en una dilución 1:1000. La cuantificación de insulina secretada se realizó mediante el análisis de parámetros (área de inmunoplaaca, % de células secretoras e índice de secreción) obtenidos a partir de ensayos hemolíticos inversos (RHPA) probando dos concentraciones de glucosa: una basal (5.6 mM) y otra estimuladora (15.6 mM). No se observaron cambios significativos en la secreción de insulina en las células tratadas con amilina bajo ninguna de las dos condiciones de glucosa (basal y estimuladora) respecto a los testigos. Las células tratadas con anticuerpo contra amilina secretaron más insulina en condiciones estimuladoras de glucosa respecto al testigo y a las células tratadas con amilina. En las células tratadas con NGF observamos un aumento significativo en la secreción de insulina tanto en condiciones basales como estimuladas por glucosa, respecto a los testigos. Sin embargo, la combinación amilina-NGF, no modificó significativamente la secreción de insulina respecto a la de las células tratadas con NGF.

De acuerdo con estos resultados podemos decir que la amilina juega un papel importante en la regulación de la secreción de insulina estimulada por glucosa y que el efecto del NGF prevalece sobre el efecto de la amilina en la secreción de insulina.

*En altamar, Orión será la referencia,
mas no eternamente...*

1 INTRODUCCION

1.1. ANTECEDENTES

1.1.1. Páncreas

El páncreas es una glándula con funciones endocrina y exocrina que se localiza en la cavidad abdominal. Esta glándula se encuentra irrigada por las arterias gastroduodenales, pancreato-duodenales y esplénicas, y es drenada por las venas que forman parte del sistema de la vena porta. El páncreas está constituido por tres porciones principales: cabeza (rodeada por la primera porción del intestino delgado), cuerpo y cola (donde se encuentran los islotes pancreáticos). La porción exocrina del páncreas está formada por células acinares que producen las enzimas digestivas (amilasas, lipasas, tripsina, etc.) y la porción endocrina está constituida por los islotes pancreáticos, los cuales ocupan aproximadamente el 2% del parénquima y se encuentran distribuidos entre el tejido acinar¹.

1.1.2. Islotes pancreáticos

Los islotes pancreáticos son agrupaciones de aproximadamente 3000 células especializadas de cuatro tipos:

- a) Células α ; constituyen aproximadamente el 15 % de cada islote, están localizadas en la región periférica; producen y secretan glucagon.
- b) Células β ; forman el 75% de cada islote, se localizan en la parte central; sintetizan y secretan insulina, amilina, ácido γ -amino butírico (GABA) y factor de crecimiento neuronal (NGF).

- c) Células δ ; pueden constituir del 5 al 10% del islote, se encuentran dispersas entre las células α ; producen y secretan somatostatina .
- d) Células PP, pueden constituir del 1 al 2% de los islotes, producen y secretan polipéptido pancreático, el cual estimula la secreción de HCl gástrico y probablemente de enzimas digestivas.

En la figura 1 se esquematiza la estructura de un islote pancreático.

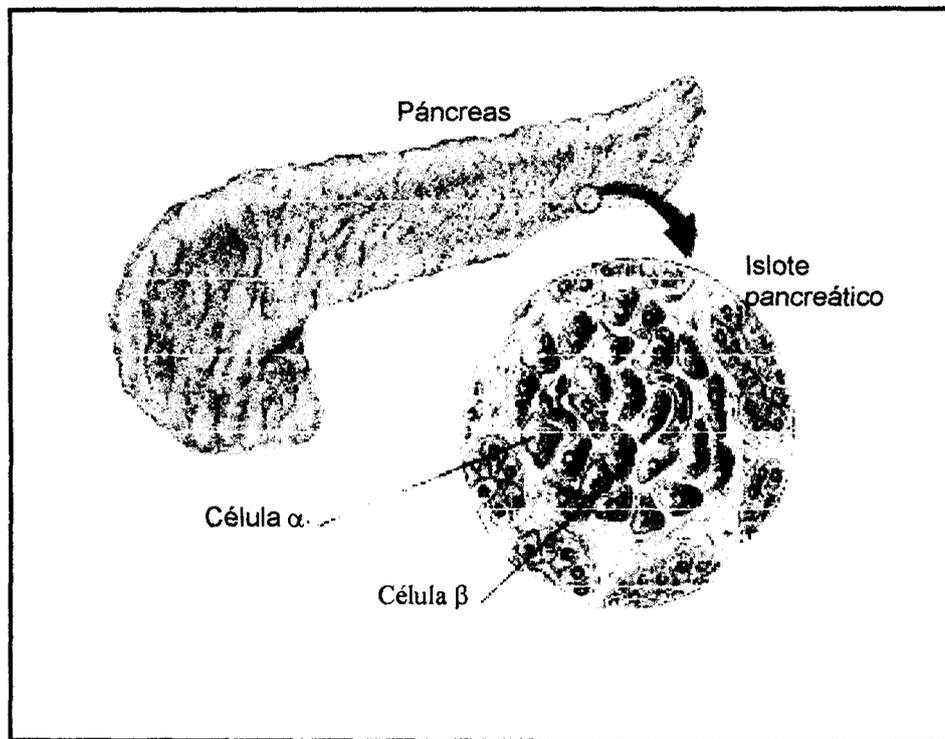


Figura 1. Páncreas e islote pancreático

Los islotes pancreáticos están muy vascularizados, el flujo sanguíneo va del centro hacia la periferia, por lo que las células α y δ son perfundidas por una sangre rica en insulina ^{1,2}.

Los islotes están inervados por el sistema nervioso autónomo, simpático y parasimpático. Las fibras simpáticas catecolaminérgicas proceden del nervio esplácnico y entran en el islote por vía del ganglio celíaco. La adrenalina y la noradrenalina inhiben la secreción de insulina y aumentan la de glucagón.

Las fibras preganglionares parasimpáticas proceden del nervio vago y terminan en un ganglio cercano al páncreas. Estas fibras son predominantemente colinérgicas, la acetilcolina media la fase cefálica de la digestión al estimular la secreción de insulina previa al ingreso de los alimentos, y por lo tanto, al aumento de la glucosa plasmática ¹.

En los islotes pancreáticos las células α , δ y PP rodean a las células β , las cuales poseen en su superficie moléculas de adhesión celular (CAM's).

La comunicación entre las células homólogas, así como entre las células heterólogas que constituyen a los islotes pancreáticos, se lleva a cabo a través uniones comunicantes, que permiten la transferencia de sustancias de bajo peso molecular ^{3,4}.

La embriogénesis de los islotes pancreáticos no es enteramente clara. Existen evidencias de que el páncreas proviene del endodermo y que se forma a partir de una evaginación del intestino en el mesodermo esplácnico. A esta interacción entre el epitelio y el mesénquima, le sigue la diferenciación entre células acinares y células insulares. Se ha propuesto que podría existir una célula multipotencial que diera origen al fenotipo exocrino y endocrino. Sin embargo, no es claro cómo se induce la diferenciación de las células insulares, probablemente en este proceso estén involucrados factores de crecimiento ⁵.

1.1.3. Células β pancreáticas

En las células β pancreáticas se han encontrado marcadores que se encuentran presentes en células de origen neuroectodérmico, tales como la enolasa específica neuronal, dopadescarboxilasa y feniletanolamina N-metiltransferasa. Además, estas células producen ácido γ amino butírico (GABA) y las enzimas responsables de su síntesis, entre ellas, la glutarato descarboxilasa (GAD) ⁶. Al igual que las neuronas, las células β expresan genes neuronales como el factor de transcripción silenciador del elemento represor (REST), el cual regula la actividad de genes específicos que determinan el genotipo neuronal ^{7,8}.

Las células β presentan actividad eléctrica asociada con el funcionamiento de diversos canales iónicos en la membrana plasmática. En ausencia de glucosa las células β se encuentran polarizadas y su potencial de reposo es de alrededor de -70 mV. Cuando las células son estimuladas con glucosa presentan un patrón de actividad eléctrica característico, relacionado directamente con la secreción hormonal ^{9, 10}.

Así mismo, existen subpoblaciones de células β aisladas, entre las que se pueden presentar diferencias en su tasa de biosíntesis y secreción de insulina, en su umbral o sensibilidad a la glucosa, en su comportamiento electrofisiológico y en su densidad de corriente de sodio y calcio ¹¹.

No es claro si esta heterogeneidad está determinada por diferencias en su estado metabólico, su etapa de maduración o si se encuentra definida genéticamente. Sin embargo, existen evidencias de que la heterogeneidad de las células β puede deberse a una diferencia en la densidad de los canales de sodio ^{11, 12}.

En las células β pancreáticas se lleva a cabo la síntesis de insulina y de amilina. Recientemente se ha demostrado que también en ellas se sintetiza el factor de crecimiento neuronal (NGF)¹³.

1.1.4. Insulina

La insulina es una hormona constituida por 51 aminoácidos que forman dos cadenas, una de 21 aminoácidos (cadena A) y otra de 30 aminoácidos (cadena B), unidas por dos puentes disulfuro de cistinas, existe además otro puente disulfuro en la cadena A, como se muestra en la figura 2. La actividad de la insulina está estrechamente relacionada con su estructura tridimensional compacta¹⁴.

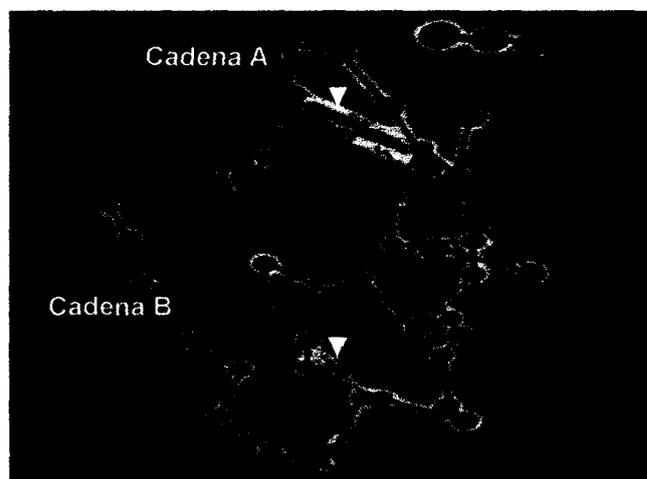


Figura 2. Estructura de insulina, se señalan los puentes disulfuro que unen a las cadenas A y B.

La insulina es un miembro de una superfamilia de proteínas en la que se encuentran los factores de crecimiento parecidos a la insulina (IGFI e IGFII). La estructura del gene de la insulina está muy conservada entre las especies y consiste de tres exones y dos intrones¹⁴.

El gene de la insulina humana está localizado en el brazo corto del cromosoma 11 y es transcrito por una polimerasa de RNA del tipo II a un preRNAm que contiene las secuencias de los exones y los intrones. Después de algunas modificaciones, el RNAm maduro es transferido al citoplasma y es traducido a un precursor de peso molecular alto, la preproinsulina. Esta molécula es un péptido lineal de 110 aminoácidos, formado por la secuencia de la proinsulina unida a la de un péptido señal de 24 aminoácidos en el extremo amino terminal, que constituye la secuencia "pre". A su paso por el retículo endoplásmico rugoso (RER), esta secuencia es escindida dando lugar a la proinsulina, constituida por 81 a 86 aminoácidos. En la luz del RER, se forman los puentes disulfuro en la proinsulina, la cual está formada por la insulina y una secuencia "pro" de 21 a 30 aminoácidos, llamada péptido conector (péptido C)¹⁵.

La proinsulina recién sintetizada es trasladada por un sistema dependiente de ATP al aparato de Golgi, donde se condensa en los gránulos secretores inmaduros, cubiertos de clatrina, que poseen la maquinaria necesaria para el procesamiento de la proinsulina. Durante la maduración del gránulo secretorio, el interior de éste se acidifica y se pierde la cubierta de clatrina. En este ambiente, la proinsulina es convertida en insulina por ruptura proteolítica en dos sitios diferentes de pares de aminoácidos básicos en las uniones de la cadena A con el péptido C y del péptido C con la cadena B, respectivamente¹⁵.

La insulina es almacenada en cristales hexaméricos formados por tres dímeros de insulina alrededor de un eje que contiene dos átomos de zinc, y el péptido C rodea a la estructura cristalina. Los gránulos maduros contienen cantidades equimolares de insulina y péptido C y son secretados por exocitosis¹⁵.

La glucosa es el regulador fisiológico más importante de la expresión genética, la traducción, la biosíntesis y la secreción de insulina, aunque los mecanismos de acción de ambos procesos son independientes. La concentración de glucosa que estimula la biosíntesis de la insulina es mucho menor (2.5 a 3.9 mM) que la necesaria para estimular la secreción (a partir de 6.5 mM) . Así mismo, la síntesis de insulina continúa aún después de que los niveles de glucosa han disminuido al nivel preestimulatorio¹⁶.

Los mecanismos de acoplamiento entre el estímulo y la secreción en las células β son complejos. No existe un receptor membranal a la glucosa, la cual entra a la célula y debe ser metabolizada para ejercer su acción estimuladora.

La glucosa entra a la célula por difusión facilitada, mediante un transportador de glucosa del tipo GLUT2 en roedores y GLUT1 en humanos, (el cual es similar al transportador de glucosa que se encuentra presente en células hepáticas), hasta que la concentración intracelular en la célula β es similar a la extracelular.

La primer reacción sobre la glucosa es la fosforilación, que constituye el paso limitante para la regulación del flujo glucolítico. Como se ilustra en la figura 3, durante el metabolismo de la glucosa se produce ATP, aumentando la relación ATP:ADP, debido a lo cual se genera el cierre de un canal de potasio sensible a ATP (canal K_{ATP}) ¹⁷. Esto produce la despolarización de la membrana y la subsecuente activación de canales de sodio y de calcio sensibles al voltaje. La actividad de los de canales de calcio del tipo L principalmente, produce la fase de meseta y las espigas ¹⁸. La repolarización podría deberse a la activación de una conductancia al potasio dependiente de calcio. La entrada de calcio a través de los canales de calcio predominantemente del tipo L, desencadena la exocitosis de insulina¹⁸.

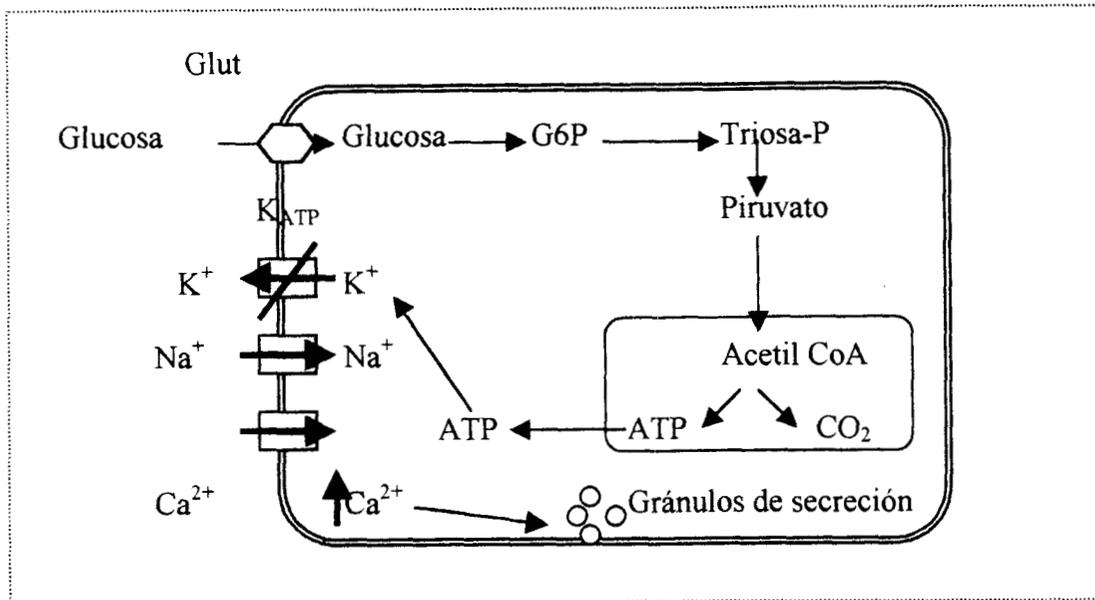


Figura 3. Metabolismo de la glucosa acoplado a la actividad eléctrica de la célula β y a la secreción de insulina.

La biosíntesis de la insulina también puede ser regulada por otros factores, como algunos aminoácidos, neurotransmisores y hormonas. Mientras que las sustancias que estimulan la secreción de insulina pueden dividirse en iniciadores (por ejemplo la glucosa y las sulfonilureas) y potenciadores (glucagon, péptido inhibitorio gastrointestinal, acetilcolina, etc.)¹⁵.

La concentración plasmática de glucosa en condiciones basales es de 4.5 a 5.5 mM. Cuando aumenta la concentración de glucosa plasmática (por ejemplo después de la ingesta de alimentos), la secreción de insulina aumenta de 5 a 10

veces. La cinética de secreción de insulina es bifásica. Después de un periodo de latencia, la liberación hormonal aumenta hasta un máximo y regresa a su nivel basal en un lapso de 2 a 5 minutos, seguido de un nuevo ascenso gradual y sostenido de la secreción. Cuando la concentración de glucosa es reducida se observa una espiga negativa transitoria¹⁹.

La insulina tiene efectos a corto y a largo plazo sobre diversos tipos celulares. A corto plazo, aumenta la entrada de glucosa de la sangre a adipocitos y células musculares mediante un aumento en el número de transportadores de glucosa y modula la actividad de diversas enzimas implicadas en el metabolismo de la glucosa. A largo plazo, aumenta la expresión de enzimas hepáticas que sintetizan glucógeno; en adipocitos aumenta la expresión de enzimas que sintetizan triglicéridos y también puede actuar como factor de crecimiento en diferentes tipos celulares como fibroblastos y neuronas en desarrollo¹⁴.

1.1.5. Amilina

La amilina, cuya molécula se identificó y caracterizó en 1987²⁰, es un péptido constituido por 37 aminoácidos con un puente disulfuro (figura 4). Esta hormona es sintetizada en las células β pancreáticas y se almacena en los mismos gránulos de secreción que la insulina^{21, 22}.

La estructura de la amilina es muy semejante a la del polipéptido relacionado con el gene de la calcitonina (CGRP) 1 y 2, que es un polipéptido neuroendocrino, constituido por 37 aminoácidos²³.

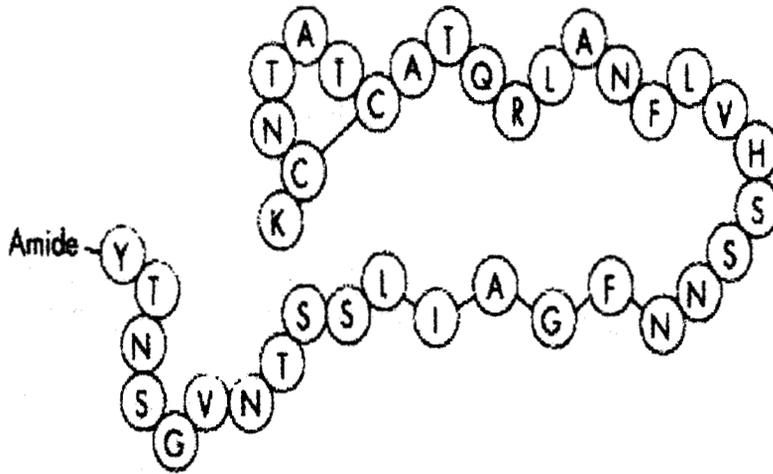


Figura 4. Estructura de la amilina.

En humanos, el gene que codifica para la amilina se localiza en el brazo corto del cromosoma 12. La transcripción del gene de la amilina origina un RNAm que contiene la secuencia de los exones que codifican para la síntesis de preproamilina²⁴.

La preproamilina contiene un péptido señal seguido por una secuencia de 89 a 93 aminoácidos que contiene lisina-arginina en el extremo N-terminal. Este precursor es transferido al aparato de Golgi, donde es transformado a proamilina. Es probable que la proamilina se transfiera a través del aparato de Golgi junto con la proinsulina hasta las vesículas de secreción, donde es procesada para originar el péptido maduro de 37 aminoácidos y posteriormente sea almacenado en los gránulos de secreción²⁵. La amilina y la insulina son cosecretadas bajo los mismos estímulos; en condiciones basales la relación amilina/insulina es 15/100 aproximadamente²⁶⁻²⁸.

Se han detectado concentraciones muy bajas de RNAm de amilina en estómago y en otras regiones del tracto gastrointestinal, así como en la raíz de los ganglios de la espina dorsal^{29, 30}.

A la fecha no se han caracterizado completamente los receptores específicos de amilina, sin embargo, se sabe que se trata de heterodímeros de receptores de calcitonina (CTRs) y diferentes proteínas modificadoras de la actividad de receptores (RAMPs)^{31, 32}.

Debido a la homología existente entre la molécula de amilina y la del CGRP, éstas comparten algunas actividades biológicas. La amilina puede unirse a los receptores de CGRP, produciendo acciones similares pero con diferente potencia, también puede ejercer una acción hipocalcémica similar a la de la calcitonina (CT)³³. Además se sabe que la amilina tiene acciones semejantes a las de la familia de péptidos de la calcitonina en el control de la secreción de la hormona de crecimiento^{34, 35}.

Aunque no se conoce con exactitud el mecanismo de acción de la amilina, se han propuesto dos mecanismos. Uno de ellos postula que la acción de la amilina es mediada por el AMPc, pues se ha observado que ésta incrementa significativamente su concentración. Esto propicia la activación prolongada de la glucógeno fosforilasa, inhibiendo la síntesis de glucógeno a través de la activación de la proteína cinasa A. El otro mecanismo propuesto sugiere que la tasa de glucólisis se regula a través de la concentración de glucosa-6-fosfato intracelular, y que la amilina juega un papel regulador sobre la fosfofructocinasa³⁶.

También se ha reportado que la amilina es capaz de modular la actividad de canales K_{ATP} y que puede inducir hiperpolarización en la membrana de las células β , trayendo como consecuencia la disminución de la secreción de insulina y de amilina³⁷.

Las acciones de la amilina son múltiples: participa en la regulación del metabolismo de carbohidratos junto con la insulina y el glucagon; en músculo esquelético la amilina inhibe la síntesis de glucógeno³⁸, activa la glucogenolisis y la glucólisis, incrementando de esta manera la producción de lactato³⁹. El lactato se transporta a través del torrente sanguíneo hasta el hígado, donde es utilizado como sustrato para la gluconeogénesis o la lipogénesis⁴⁰.

La acción de la amilina es muy importante durante el periodo posprandial, pues disminuye la velocidad de vaciado gástrico⁴¹.

La amilina juega un papel esencial en la regulación fisiológica de liberación de nutrientes desde el estómago⁴². También se ha probado que es el inhibidor gástrico más potente⁴³, lo cual se pone de manifiesto en el caso de los pacientes con diabetes mellitus tipo 1 (dependiente de insulina), donde la deficiencia de amilina se refleja en la aceleración de vaciado gástrico⁴⁴. Se ha propuesto que la modulación de la amilina sobre el vaciado gástrico se lleva a cabo vía sistema nervioso central (SNC). El control de la motilidad gástrica involucra el tracto solitario y el área postrema, órgano circunventricular con alta densidad de receptores de amilina⁴⁵. Recientemente se ha observado que tanto la concentración de glucosa como la amilina son fundamentales e interactúan en el control del vaciado gástrico⁴⁶.

Numerosos estudios han mostrado que la amilina tiene efectos sobre la sensación de saciedad⁴⁷, actividad que también es ejercida por el CGRP. Se han encontrado receptores para amilina y para CGRP en varias regiones del SNC tales como el área postrema, el núcleo del tracto solitario, el hipotálamo y la amígdala, las cuales están involucradas en el control de la ingesta de alimentos⁴⁸. Los efectos anoréticos de la amilina pueden ser mediados por la activación de sus receptores en el cerebro anterior, los cuales se encuentran en mayor proporción en esta región respecto a los receptores para CGRP, lo cual explicaría que la amilina actúe con mayor potencia^{49,50}.

La concentración basal de amilina en plasma es alrededor de 5 pM. En pacientes con diabetes tipo 2 (diabetes mellitus no dependiente de insulina) la concentración de amilina en sangre es hasta 10 veces mayor a la esperada en condiciones basales⁵¹, mientras que en personas con diabetes tipo 1 la concentración de amilina es muy baja. La deficiencia o el exceso de amilina provoca alteraciones metabólicas importantes⁵¹.

Los efectos tóxicos de la amilina se atribuyen a su capacidad de polimerizar, formar fibras y acumularse tanto intra como extracelularmente. No se conoce el mecanismo mediante el cual la amilina pasa de una forma soluble a agregados insolubles. Sin embargo, se ha observado que la región comprendida entre los aminoácidos 20 a 29 es muy importante en el proceso de formación de fibras amiloides, en particular si se encuentra presente la secuencia arginina-isoleucina-leucina-serina-serina (o alguna similar), el péptido es amiloidogénico, es decir, puede formar placas amiloides⁵². Así mismo, la presencia de prolina y su posición en el segmento 20-29 es determinante para impedir que se lleve a cabo la agregación amiloidogénica. Algunas de las posiciones cruciales para desestabilizar la formación de la placa amiloide van de la 25 a la 28⁵³. En la rata no se observa la formación de placas amiloides, y se cree que es debido a la presencia de tres residuos de prolina en el segmento 20-29⁵⁴.

Los agregados amiloides se originan a partir de la polimerización de unidades monoméricas de amilina, formando fibras de estructura laminar (láminas β). Estas fibras crecen progresivamente, originando estructuras fibrilares de tamaño intermedio (visibles por microscopía electrónica) y agregados maduros que pueden estar constituidos por más de 10^6 monómeros. Los procesos de crecimiento y maduración de los agregados amiloides son muy importantes, pues se ha observado que la toxicidad de éstos disminuye cuando han crecido más allá de cierta longitud. Es posible que los agregados amiloides hidrofóbicos (agregados

de tamaño pequeño e intermedio) interactúen con las membranas celulares, alterando su estabilidad⁵⁵.

Se han realizado estudios in vitro que revelan que los agregados amiloides pueden interactuar con membranas artificiales incrementando su conductancia, posiblemente como resultado de la formación de poros⁵⁶.

Estudios realizados en islotes pancreáticos presentan evidencias de que la citotoxicidad de los agregados amiloides se debe a daños producidos en las membranas celulares. Los daños van desde la ruptura de la membrana citoplasmática, hasta la aparición de masas anormales de estructuras parecidas a vesículas asociadas con pequeños depósitos amorfos de amilina en células muy dañadas o muertas^{55, 56}.

Por otro lado, existen evidencias de que la formación de fibras amiloides está asociada con la acumulación del proteoglicano sulfatado perlecan. Esta molécula se une a la amilina y de esta manera es retenida en la matriz favoreciendo la formación de fibras⁵⁷.

La actividad biológica del NGF se encuentra asociada a la subunidad β , cuyo peso molecular es 26.5 KD y está constituida por dos cadenas, las cuales constan de 118 aminoácidos. Las subunidades α y γ son proteasas de serina del tipo de la kalikreína, sin embargo sólo la subunidad γ posee actividad catalítica⁶¹.

El NGF es sintetizado en células blanco periféricas de axones simpáticos y sensoriales, así como en la glándula salival submaxilar, en células de Schwann y en los macrófagos de nervios periféricos en desarrollo. Recientemente se demostró que las células β pancreáticas también sintetizan NGF¹³.

Las funciones biológicas más importantes del NGF incluyen su acción neurotrófica, su habilidad para modular el programa de diferenciación de células neuronales precursoras y su contribución al mantenimiento del fenotipo diferenciado adquirido. Es importante para el desarrollo y sobrevivencia de neuronas colonérgicas del cerebro frontal, neuronas posganglionares simpáticas y células ganglionares sensoriales derivadas de la corteza neural. También actúa sobre células que no se derivan del neuroectodermo, tales como los linfocitos en los que aumenta la producción de interleucinas; así como en células del sistema endocrino^{62, 63}.

La habilidad del NGF para ejercer su acción trófica y de diferenciación sobre células blanco, está mediada por la unión a sus receptores que se encuentran en la superficie celular. Existen dos tipos de receptores para NGF: los de alta afinidad ($K_d=10^{-11}$ M) y los de baja afinidad ($K_d=10^{-9}$ M)⁶⁴.

El receptor de alta afinidad para el NGF, TrkA pertenece a la familia de las cinasas de tirosina, a la cual también pertenecen TrkB y TrkC⁶⁵. La unión del NGF a Trk A induce la dimerización y la autofosforilación del receptor⁶⁶. Las proteínas de señalamiento: SHC, fosfolipasa C gamma ($PLC\gamma$) y cinasa de inositol trifosfato, se unen específicamente al receptor fosforilado, activándose por fosforilación, desencadenando diferentes cascadas de señalización⁶⁷.

En el grupo de receptores de baja afinidad a neurotrofinas, encontramos a p75, el cual contiene en el dominio extracelular repeticiones ricas en cisteína. Este

receptor posee un dominio intracelular que funciona como sitio de unión para proteínas adaptadoras y de señalización responsables de apoptosis celular^{68, 69}.

En células β pancreáticas se han identificado receptores de alta afinidad. La actividad de Trk A es importante para la formación correcta de los islotes pancreáticos, lo cual sugiere que el NGF podría tener funciones autócrinas y parácrinas en este proceso^{13, 70}.

Se ha demostrado que el NGF induce el crecimiento de procesos citoplasmáticos parecidos a neuritas en líneas tumorales de rata y en células β pancreáticas de rata de cultivos primarios^{71, 72}.

Por otra parte, al cultivar células β en presencia de NGF durante 5-7 días se observa un aumento en la secreción de insulina en respuesta a una concentración de glucosa estimuladora (20.6 mM), comparada con la secreción de insulina a una concentración de glucosa basal (5.6 mM). De la misma manera, el NGF potencia la secreción de insulina a corto plazo, tanto en concentraciones de glucosa estimuladoras como basales^{72, 73}.

Por lo anterior, se ha postulado que el NGF puede regular algunos aspectos de la fisiología de las células β , incluyendo la secreción de insulina. La modulación de la secreción de insulina podría llevarse a cabo por las interacciones de señales intracelulares inducidas por la activación de Trk A, el metabolismo de la glucosa y el efecto que ejerce el NGF sobre la actividad eléctrica de las células β ⁷³.

1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La integración de los conocimientos acerca de las células β pancreáticas constituye un arduo trabajo, debido a que se trata de células altamente especializadas. A la fecha no han sido caracterizados completamente los efectos de la amilina y del NGF sobre la fisiología de estas células.

En particular, resulta fundamental establecer cuál es el efecto de la amilina y del NGF sobre la secreción de insulina en las células β pancreáticas.

1.3. JUSTIFICACIÓN

La diabetes mellitus (DM) representa uno de los problemas más importantes de salud a nivel mundial. En México la DM afecta aproximadamente al 10% de la población y como causa de muerte se encuentra entre el séptimo y décimo lugar⁷⁴.

La DM incluye un grupo de padecimientos que tienen en común la falta parcial o total en la producción o acción de la insulina y la elevación anormal de la concentración de glucosa sanguínea⁷⁵.

La diabetes tipo 1 (dependiente de insulina) se caracteriza por la destrucción de las células β pancreáticas. Aunque no se tiene una respuesta definitiva para las causas que llevan a la destrucción de las células β , se ha puesto de manifiesto que obedece a un trastorno inmunológico. También se ha vinculado con procesos infecciosos y se ha relacionado con el desencadenamiento de la respuesta inmune⁷⁶.

La diabetes tipo 2 (no dependiente de insulina) se origina de la combinación de dos defectos: la resistencia a la insulina y la disminución en la secreción

pancreática de insulina. La resistencia a la insulina es una condición heredada que constituye el defecto primario en la diabetes tipo 2, el cual radica en los receptores de la insulina y/o en los cambios o procesos que se originan después de la unión de la insulina con su receptor (defecto post receptor)⁷⁷.

En trabajos recientes se ha observado que la amilina juega un papel importante en la regulación del metabolismo de la glucosa. Se ha propuesto que la deficiencia de amilina en pacientes con diabetes tipo 1 agudiza el pico hiperglucémico en el periodo posprandial. Mientras que en pacientes con diabetes tipo 2, se ha asociado a la amilina con la resistencia a la insulina.

Así mismo se ha demostrado que en los pacientes con DM hay una disminución en la concentración de NGF circulante, la cual se ha relacionado con la neuropatía diabética.

Por lo antes mencionado, es muy importante avanzar en la investigación acerca de la fisiología de las células β pancreáticas, cuyos productos interactúan de forma compleja con otros tejidos y órganos, regulando el metabolismo integral del organismo.

2. HIPÓTESIS.

- La presencia de amilina en cultivos primarios de células β pancreáticas, inhibe la secreción de insulina.
- La presencia de un anticuerpo contra amilina previene los efectos de ésta sobre la secreción de insulina en células β pancreáticas.
- El NGF puede prevenir los efectos inhibitorios de la amilina sobre la secreción de insulina en cultivos primarios de células β pancreáticas.

225710

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL.

Avanzar en el conocimiento de los efectos de la amilina sobre la fisiología de las células β pancreáticas de rata.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Analizar el efecto de la amilina sobre la secreción de insulina y NGF en cultivos primarios de células β pancreáticas, probando dos concentraciones de glucosa, una basal (5.6 mM) y una estimuladora (15.6 mM) para la secreción de insulina.
2. Analizar el efecto de un anticuerpo contra amilina sobre la secreción de insulina y NGF en cultivos primarios de células β pancreáticas.
3. Evaluar los efectos de la amilina y el NGF sobre la secreción de insulina en cultivos primarios de células β pancreáticas.

Fue fundamental establecer la diferencia entre estíbor y babor.

4. METODOLOGÍA

4.1. Cultivo de tejidos.

El cuidado de los animales se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo publicado en "*NIH guide for the care and use of laboratory animals*" (National Institute of Health Publication No. 85-23 revised, 1985).

Las células β se obtuvieron de páncreas de ratas Wistar machos adultos jóvenes (250-280 g). De manera breve, los páncreas se insuflaron con solución salina balanceada de Hanks, con 0.1 % (peso/volumen) de albúmina sérica bovina y gentamicina. Después, los páncreas fueron macerados mecánicamente y digeridos con colagenasa tipo IV (0.5 mg/ml), para posteriormente someter el tejido a un gradiente de Ficoll. De este gradiente se recuperó la interfaz superior, que contiene a los islotes pancreáticos libres de tejido acinar. Los islotes fueron lavados con solución de Hanks y digeridos con tripsina (2.5 mg/ml) disuelta en solución salina balanceada de Spinner (SIGMA), durante 10 minutos. Una vez que las células insulares estuvieron dispersas, fueron cultivadas en medio de cultivo definido, cuya constitución es la siguiente: medio RPMI-1640 (GIBCO), insulina (5 μ M/ml), transferrina (5 μ m/ml), selenita de sodio (5 μ m/ml), putrescina (100 μ M) y progesterona (20 nM).

Las células se mantuvieron en cultivo con diferentes tratamientos: NGF 50 ng/ml, amilina de rata 100 nM (Peninsula Laboratories) y anticuerpo contra amilina en una dilución 1:1000 (Peninsula Laboratories).

4.2. Inmunofluorescencia e inmunocitoquímica.

Las células insulares fueron fijadas en paraformaldehído al 4% (peso/volumen) en solución salina amortiguada por fosfatos (PBS). Posteriormente, se permeabilizaron con Tritón X100 (SIGMA) al 0.01% (vol/vol) en solución salina amortiguada por TRIS (TBS).

Una vez permeabilizadas, las células se incubaron durante una noche con antisuero de cobayo contra insulina (Incstar) y antisuero de conejo contra amilina (Península), a las concentraciones recomendadas por los fabricantes. Posteriormente, se incubaron durante 1 hora con antisuero de cabra contra IgG de cobayo marcado con FITC (excitación=494 nm, emisión=520 nm), para la detección de insulina; y con antisuero de cabra contra IgG de conejo marcado con CY5 (excitación=650 nm, emisión=670 nm), para la detección de amilina. Las células se observaron bajo microscopía confocal, utilizando el canal rojo para el CY5 (amilina) y el canal verde para FITC (insulina).

Para la técnica inmunocitoquímica, las células se procesaron con la técnica descrita y se tiñeron utilizando el método ABC, para revelar la reacción se utilizó un segundo antisuero biotinilado contra IgG de conejo y un complejo estreptavidina-peroxidasa, cuyo sustrato es la 3,3'-diaminobencidina, la cual forma un precipitado de color café.

4.3. Secreción de insulina.

Para cuantificar la insulina secretada por células β cultivadas durante 6 días en presencia de amilina, NGF, amilina-NGF y anticuerpo contra amilina, se utilizó el ensayo hemolítico inverso (RHPA), el cual nos permitió conocer la secreción individual de las células, así como la actividad secretora total de las mismas¹⁸.

En forma breve: Se acopló la proteína A a la membrana de los eritrocitos utilizando cloruro de cromo. El ensayo se realizó en cámaras de Cunningham, promoviendo la adhesión de la suspensión de células β y eritrocitos marcados con proteína A, utilizando poli-l-lisina. La mezcla de células β y eritrocitos fueron incubadas durante 1 hora en presencia de antisuero policlonal contra Insulina, probando dos concentraciones de glucosa: 5.6 y 15.6 mM para cada tratamiento, bajo el que fueron cultivadas las células durante seis días. Al término de esta incubación se añadió complemento de cobayo (1:40) y se incubó por 30 minutos más. Las células que secretaron insulina aparecieron rodeadas por una placa de fantasmas de eritrocitos, los cuales fueron lisados por el complemento, en presencia de complejos antígeno-anticuerpo.

El análisis de las inmunoplasmas comprende dos aspectos principales:

1) la determinación del número de células que forman placas y 2) la medida del área de las placas, que es directamente proporcional a la cantidad de hormona secretada por la célula. Se contaron las células secretoras y las no secretoras bajo el microscopio, los datos se expresan como porcentaje de células secretoras. Para medir el área de las inmunoplasmas se utilizó un microscopio con contraste de fases, al que se acopló una cámara de video y un monitor; se

proyectaron las imágenes de las inmunoplasmas y se midió su diámetro, para obtener las áreas y se procede a su análisis estadístico. Se consideraron tres experimentos, de los cuales se contaron en promedio 450 células por tratamiento y se midió el área de inmunoplasma de 320 células por tratamiento.

También se realizó el análisis de subpoblaciones de células secretoras, estableciendo el porcentaje de células que forman placas pequeñas (SP small plaque), es decir que secretan poca insulina, con área de inmunoplasma $< 2000 \mu\text{m}^2$, y de células que forman placas grandes (LP, large plaque), secretan mucha insulina, con área de inmunoplasma $> 2000 \mu\text{m}^2$. Este análisis se llevó a cabo mediante la distribución de frecuencias seguida del análisis de varianza ANOVA.

4.4. Análisis estadístico

Para realizar el análisis estadístico, se consideraron cuatro experimentos (trabajando con duplicados para cada tratamiento) con una n promedio de 320 células por tratamiento. Se aplicó el análisis de varianza ANOVA, seguido por la prueba de Fisher, con un nivel de significancia de $p < 0.05$ y $p < 0.01$.

5. RESULTADOS

5.1. Desarrollo del modelo experimental

Para establecer las condiciones experimentales óptimas, se inició con el cultivo de las células β en un medio definido con diferentes concentraciones de glucosa: 2.6, 5.6, 11.6 y 15.6 mM durante diez días.

En estas condiciones se observó que las células cultivadas en medio con 2.6 mM de glucosa, no sobrevivieron más de cuatro días, mientras que las células mantenidas con 5.6 mM de glucosa tuvieron una supervivencia de diez días o más en cultivo, sin mostrar cambios notables en su morfología.

Las células cultivadas en concentraciones altas de glucosa (11.6 y 15.6 mM) se mantuvieron en buenas condiciones durante el tiempo de cultivo. En este caso, la mayoría de las células se aplanaron formando una monocapa, y en la mayorías de los casos, las células periféricas de las agrupaciones celulares desarrollaron prolongaciones citoplasmáticas.

Al comparar la morfología de las células cultivadas en 11.6 y 15.6 mM de glucosa no se observaron diferencias significativas, sin embargo, las prolongaciones citoplasmáticas tendieron a ser mayores en las células cultivadas en 15.6 mM de glucosa

Para detectar la presencia de amilina en las células cultivadas bajo las condiciones mencionadas, se realizaron tinciones mediante la técnica de inmunocitoquímicas. De esta manera se observó la presencia de amilina en todos los casos, llamando notablemente la atención la distribución esta molécula en el interior de las células, donde se aprecian "formaciones reticulares" alrededor del núcleo, como se observa en la figura 6.

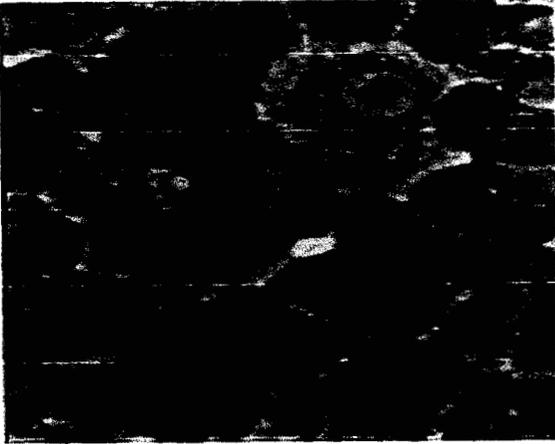
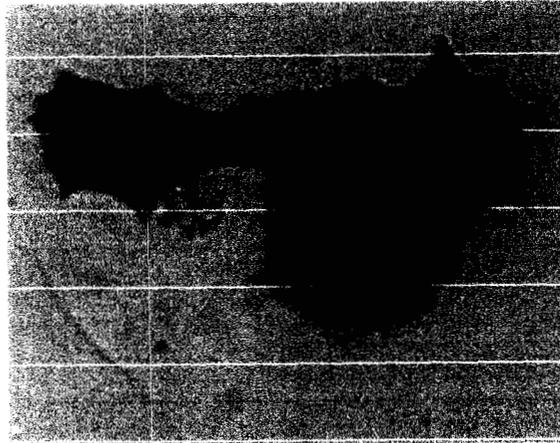
A**B**

Figura 6. Presencia de amilina en células β cultivadas durante 10 días en medio definido con una concentración de glucosa de 5.6 mM (A) y 11.6 mM (B).

Considerando estos primeros resultados, se decidió continuar con el trabajo experimental cultivando a las células durante seis días en medio definido con dos concentraciones de glucosa: 5.6 y 15.6 mM, correspondientes a una concentración basal y una concentración estimuladora para la secreción de insulina, respectivamente.

Para detectar la presencia de amilina e insulina se realizaron ensayos de inmunocitoquímicas dobles. En la figura 7 se observa la presencia de amilina (tinción roja) e insulina (tinción verde); aquí se puede apreciar las diferencias morfológicas entre las células cultivadas con glucosa 5.6 y 15.6 mM.

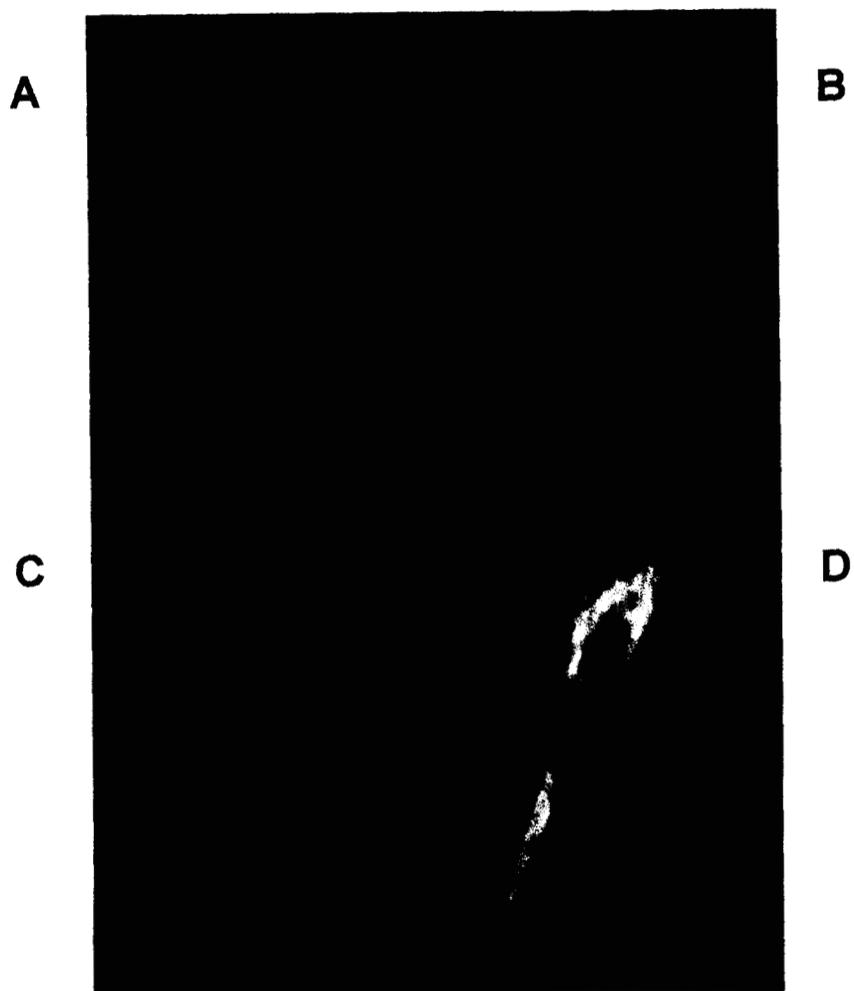


Figura 7. Presencia de amilina (rojo) e insulina (verde) en células β cultivadas durante 6 días en medio definido con concentraciones de glucosa. 5.6 mM (A y B) y 15.6 mM (C y D).

Posteriormente, se cultivó a las células durante seis días en medio definido con glucosa 5.6 y 15.6 mM en condiciones testigo y los tratamientos: amilina (Am), NGF, amilina-NGF (Am-NGF) y anticuerpo contra amilina (Ac vs Am).

En la figura 8 podemos observar que las células, bajo los tratamientos mencionados contienen insulina en todos los casos, también se aprecian las diferencias morfológicas desarrolladas durante el tiempo en cultivo.

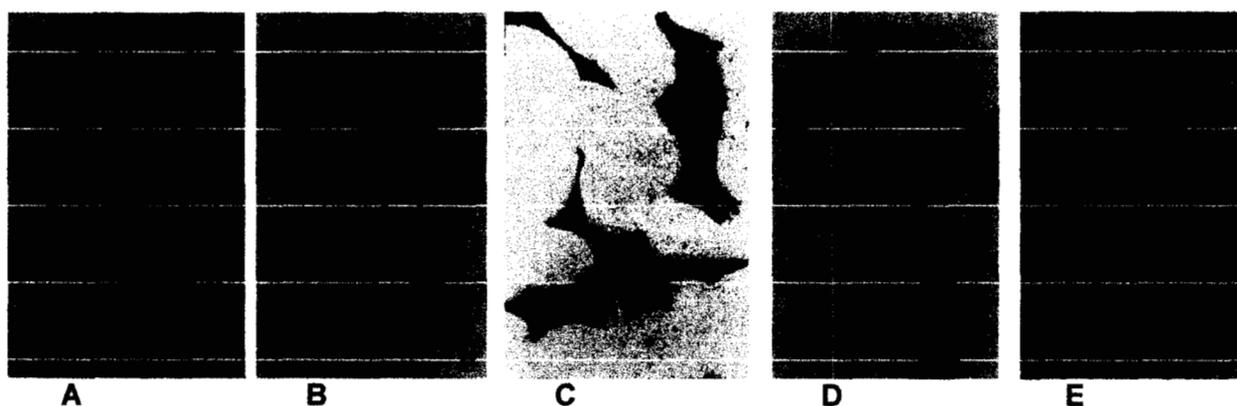


Figura 8. Presencia de insulina en células β cultivadas durante 6 días en medio definido y glucosa 15.6 mM bajo los siguientes tratamientos: Testigo (A), Amilina 100nM (B), NGF 50ng/ml(C), Amilina-NGF (D) y Anticuerpo contra amilina 1:1000 (E).

5.2. Secreción de insulina

Las células que se mantuvieron durante el cultivo con glucosa 5.6 mM, en general no secretaron suficiente insulina para ser detectada por el RHPA. En la figura 9 se observa la diferencia entre las células β secretoras (formadoras de inmunoplaaca) y no secretoras de insulina.

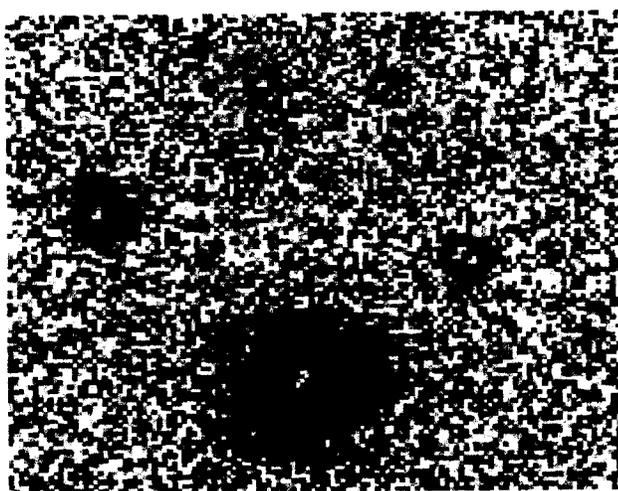


Figura 9. Formación de inmunoplaaca al realizar RHPA a células β que fueron cultivadas durante 6 días en medio definido y glucosa 15.6 mM. Las flechas señalan células no secretoras.

Por lo anterior, en los cultivos sucesivos se usó medio definido con 15.6 mM de glucosa y los diferentes tratamientos. Para esta etapa se incluyó otro testigo con 5% de suero bovino fetal (SBF), ya que los cultivos que se realizan normalmente en el laboratorio se hacen en presencia de SBF y era importante descartar que la ausencia de éste afectara negativamente la viabilidad de las células.

225710

Después de mantener en cultivo a las células durante 6 días bajo las condiciones mencionadas, se estimó la secreción de insulina de las células β aisladas bajo dos concentraciones de glucosa: 5.6 y 15.6 mM. Se midió el área de las inmunoplasmas, que es directamente proporcional a la cantidad de insulina secretada y se obtuvo el porcentaje de células secretoras. Los valores obtenidos se muestran en el cuadro 1.

La primera observación importante fue que no existieron diferencias significativas entre los testigos en medio definido y los testigos con 5% SBF, para ninguna de las dos concentraciones de glucosa (5.6 y 15.6 mM).

En condiciones testigo, se observa que la secreción estimulada por de glucosa (15.6 mM), aumentó en 80% respecto a la secreción de insulina bajo una concentración basal de glucosa (5.6 mM).

En condiciones basales de glucosa (5.6mM), todos los tratamientos aumentaron la secreción promedio de insulina de las células individuales, medida por el área de la inmunoplasma, con respecto al testigo: la amilina en 36%, el NGF en 64 %, la combinación de amilina y NGF (Am-NGF) en 69% y el anticuerpo contra amilina en 45%.

En condiciones estimuladoras de glucosa (15.6 mM) el aumento en la secreción de insulina por los tratamientos fue menor: tanto el NGF como la combinación amilina-NGF la aumentaron un de 18 % aproximadamente y el anticuerpo contra amilina en 25 %. En este caso la amilina no afectó la secreción de insulina.

En cuanto al porcentaje de células secretora, únicamente en el caso de las células tratadas con NGF se observó un aumento significativo en ambas concentraciones de glucosa.

Cuadro 1 Secreción de insulina

Tratamiento	Glucosa (mM)	Porcentaje de células secretoras	Area de Inmunoplaca (μm^2)
Testigo	5,6	63.9 ±2.1	2085 ±226
	15,6	66.5 ±3.2	3750** ±662
Amilina	5,6	64.8 ±3.9	2843* ±363
	15,6	65.6 ±1.0	3433 ±308
NGF	5,6	69.6* ±1.2	3415* ±253
	15,6	74.4+ ±2.1	4433 +& ±311
Am-NGF	5,6	64.6 ±2.6	3541* ±188
	15,6	68.3 ±4.6	4362+ ±181
Ac vs Am	5,6	69.8 ±3.1	3028* ±258
	15,6	70.5 ±2.7	4694 +ç ±415
5% SBF	5,6	61.6 ±2.14	2583 ±61
	15,6	68.0 ±9.3	3925 ±68

Cuantificación de la insulina secretada por células β cultivadas durante 6 días en medio definido con 15.6 mM glucosa y los diferentes tratamientos a través del porcentaje de células secretoras y el área de inmunoplaca. Los valores presentados representan el promedio \pm ES (n = 320)

* p< 0.05 respecto al testigo 5.6 mM glucosa, ** p< 0.01 respecto al testigo 5.6 mM glucosa

+ p<0.01 respecto al testigo 15.6 mM glucosa, & p<0.05 respecto al tratamiento correspondiente en 5.6 mM glucosa, ç p<0.01 respecto al tratamiento correspondiente en 5.6 mM glucosa

El índice de secreción nos indica la secreción de insulina de la población total de las células β , lo cual se muestra en la figura 10. Al comparar los índices de secreción de los testigos, observamos que la secreción de insulina estimulada por glucosa (15.6 mM), aumentó en un 77%, respecto a la secreción en condiciones basales de glucosa (5.6 mM).

En condiciones basales de glucosa, la secreción total de insulina de las células que fueron cultivadas en presencia de NGF, de amilina-NGF y de anticuerpo contra amilina, aumentó en 77, 72 y 59 %, respectivamente frente su testigo.

En condiciones estimuladoras de glucosa, la secreción total de insulina, solamente aumentó en las células tratadas con NGF y con anticuerpo contra amilina, en un 34 y 35 % respecto al testigo correspondiente.

Comparando los índices de secreción de los tratamientos en condiciones basales y estimuladoras de glucosa, se aprecia que la secreción de insulina estimulada por glucosa de las células tratadas con NGF y anticuerpo contra amilina aumentó en un 39 y 57% respecto a la secreción en condiciones basales de glucosa bajo los mismos tratamientos.

Secreción de Insulina

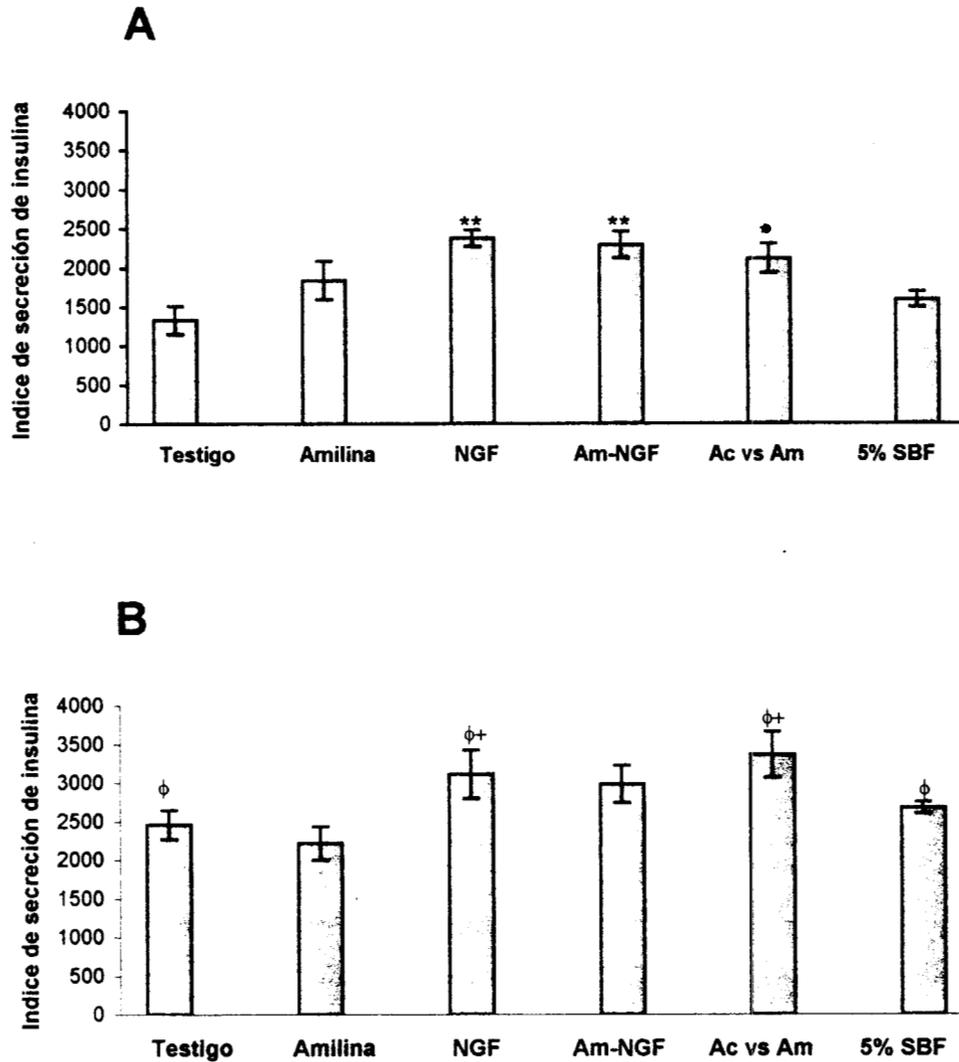


Figura 10. Índice de secreción de insulina de células β cultivadas durante 6 días en medio definido con glucosa 15.6 mM y los diferentes tratamientos. **A** Secreción de insulina en condiciones basales de glucosa (5.6 mM). **B** Secreción de insulina estimulada por glucosa (15.6 mM). Los valores representan el promedio \pm ES. * $p < 0.05$ respecto al testigo glucosa 5.6 mM. ** $p < 0.01$ respecto al testigo glucosa 5.6 mM. + $p < 0.01$ respecto al testigo glucosa 15.6 mM. ϕ $p < 0.01$ respecto al tratamiento correspondiente en glucosa 5.6 mM.

5.3. Análisis de subpoblaciones

A través del análisis de subpoblaciones de células β , es posible conocer el porcentaje de células que secretan mucha insulina (LP, large plaque) y cuya área de inmunoplaaca es $> 2000 \mu\text{m}^2$, las cuales son importantes porque determinan la cantidad total de insulina secretada.

Como se puede observar en el cuadro 2, el porcentaje de células células que secretan poca insulina (SP, small plaque), cuya área de inmunoplaaca es $\leq 2000 \mu\text{m}^2$, fluctúa entre 32 y 47%. Este porcentaje no se modifica significativamente bajo condiciones basales (glucosa 5.6 mM) o estimuladoras (glucosa 15.6 mM) para ningunos de los tratamientos respecto a los testigos.

Por otro lado, el porcentaje de células LP va de 16 a 36%. Cuando las células fueron tratadas con NGF, con amilina-NGF y con anticuerpo contra amilina, se observa un aumento de 88, 79 y 74% de células LP, en condiciones basales de glucosa, respecto a los testigos.

En condiciones de estimulación por glucosa, el incremento en el porcentaje de células LP inducido por los tratamientos de NGF, amilina-NGF y anticuerpo contra amilina, frente a los testigos fue de 32, 28 y 23 %, respectivamente.

También se observa que en condiciones de estimulación por glucosa el porcentaje de células LP aumenta respecto las condiciones basales en las células tratadas con NGF (19%), amilina-NGF (21%) y anticuerpo contra amilina (19%).

Cuadro 2. Células formadoras de inmunoplaca

Tratamiento	Glucosa (mM)	% Células formadoras de inmunoplaca $\leq 2000 \mu\text{m}^2$	% Células formadoras de inmunoplaca $> 2000 \mu\text{m}^2$
Testigo	5.6	47.4	16.5
	15.6	37.6 ζ	28.0 ζ
Amilina	5.6	41.0	23.8
	15.6	38.8	26.8
NGF	5.6	38.5	31.1*
	15.6	37.5	36.9+
Am-NGF	5.6	35.0	29.6*
	15.6	32.4	35.9+ ζ
Ac vs Am	5.6	41.0	28.8*
	15.6	36.2	34.3+
5% SBF	5.6	44.4	17.2
	15.6	39.0	29.0 ζ

Análisis de subpoblaciones de células β secretoras de insulina realizado mediante el análisis de distribución de frecuencias, seguido de un análisis de varianza. Las células cuya área de inmunoplaca \leq a $2000 \mu\text{m}^2$ son células que secretan poca insulina (SP) y las células cuya área de inmunoplaca es $>$ a $2000 \mu\text{m}^2$ son células que secretan mucha insulina (LP).

* $p < 0.01$ respecto al testigo en glucosa 5.6 mM. + $p < 0.01$ respecto al testigo en 15.6 mM.

$\zeta p < 0.05$ respecto al tratamiento correspondiente en glucosa 5.6 mM.

*Aún trazando el rumbo sobre una carta náutica
persiste el riesgo del naufragio y la deriva.*

6. DISCUSION

En el presente trabajo se investigó la influencia de la amilina sobre la secreción de insulina en células β pancreáticas de rata cultivadas en concentraciones altas de glucosa.

En la primera etapa del trabajo experimental, se probaron diferentes concentraciones de glucosa: 2.6, 5.6, 11.6 y 15.6 mM. Se pudo detectar la presencia tanto de amilina como de insulina a través de ensayos dobles de inmunocitoquímica. También se observaron las diferencias morfológicas producidas por el incremento en la concentración de glucosa. Las células que fueron cultivadas con concentraciones de glucosa 11.6 y 15.6 mM, se "aplanaron", formando una monocapa y las células periféricas de las agrupaciones celulares desarrollaron prolongaciones citoplasmáticas, lo cual no ocurrió en el caso de las células que se cultivaron con concentraciones de glucosa 2.6 y 5.6 mM, las cuales se mantuvieron redondas.

Lo anterior se explica por el hecho de que las células β sintetizan NGF¹³, el cual es secretado como respuesta a cambios en la concentración extracelular de glucosa (de manera similar a la secreción de insulina regulada por glucosa). La presencia de receptores para NGF (Trk A) en la membrana de las células β implica un efecto autocrino del NGF sobre las células, responsable del desarrollo de procesos citoplasmáticos parecidos a neuritas.

Al realizar los ensayos de inmunocitoquímica para detectar la presencia de amilina, llama la atención la tinción irregular al interior de las células, destacando la presencia de "entramados" alrededor del núcleo.

Sin embargo, se sabe que en la rata la amilina no forma agregados amiloides ni dentro ni fuera de la célula debido a la presencia de tres residuos de prolina en el segmento 20-29⁵⁴. Esto hace suponer que lo detectado en este caso, es la presencia de precursores de amilina, ya que éstos son transferidos del retículo endoplásmico al trans-Golgi durante su proceso de maduración. Es importante mencionar que como parte complementaria, se ha iniciado el trabajo para realizar observaciones con microscopía electrónica.

El análisis estadístico de los parámetros obtenidos para cuantificar la insulina secretada por las células β (área de inmunoplaca, porcentaje de células secretoras e índice de secreción) permite hacer las siguientes observaciones:

- La secreción de insulina de las células β cultivadas en condiciones testigo en medio RPMI y 5% de SBF, no cambió en forma significativa respecto a las células cultivadas en condiciones testigo en medio definido. Esta observación es importante, ya que en el laboratorio los cultivos normalmente se realizan en presencia de SBF, y de esta manera probamos que la ausencia de las hormonas y los factores presentes en el SBF no afectó la secreción de las células cultivadas en medio definido.
- En las células tratadas con amilina, la cantidad total de insulina secretada, no cambió significativamente respecto a los testigos en condiciones basales ni estimuladoras de glucosa.

Se sabe que bajo condiciones crónicas de hiperglucemia las células β pancreáticas pierden la capacidad de responder adecuadamente a la estimulación ejercida por la glucosa para secretar insulina^{78, 79}, debido a que las concentraciones altas de glucosa también estimulan la secreción de amilina⁸⁰. Sin embargo, el efecto inhibitorio de la amilina sobre la secreción de insulina se

requiere de concentraciones muy elevadas (90 veces mayor a concentraciones fisiológicas pospandriales en humanos)⁸¹. Es importante recordar que este efecto de la amilina sobre la secreción de insulina, se atribuye principalmente a la formación de placas amiloides intra y extracelulares, pero sabemos que en la rata, la amilina no polimeriza para formar agregados amiloides.

Por lo anterior pensamos que nuestras células cultivadas en presencia de amilina perdieron la capacidad de "censar" los cambios en la concentración extracelular de glucosa. Sin embargo, no conocemos el mecanismo mediante el cual ocurre esta desensibilización.

- La secreción de insulina estimulada por glucosa, de las células tratadas con anticuerpo contra amilina aumentó significativamente respecto a los testigos y respecto a las células tratadas con amilina. Así mismo, en presencia de anticuerpo contra amilina, el porcentaje de células con alta tasa de secreción de insulina (células LP) es mayor en condiciones de estimulación por glucosa que en condiciones basales de glucosa.

Efectos similares se han observado en páncreas aislados de rata tratados con antisuero contra amilina, donde la secreción de insulina en condiciones basales de glucosa no se modifica respecto los testigos manejados, sin embargo, la secreción de insulina inducida por glucosa (16.7 mM) aumenta en forma significativa⁸². También se ha reportado que la amilina inhibe la secreción de insulina estimulada por glucosa en células β aisladas, así como en páncreas de rata completo^{83, 84}.

Trabajos recientes han puesto de manifiesto que la amilina juega un papel fundamental en la fisiología de la célula β , incluso, que es necesaria para su supervivencia al regular la secreción de insulina estimulada por diferentes secretagogos, protegiéndola cuando tiene que enfrentar retos metabólicos⁸³. Se ha observado que la secreción de insulina hiperestimulada por altas concentraciones de glucosa, conlleva a la depleción de los gránulos de secreción, provocando una disfunción en las células β ⁷⁹.

También se sabe que la relación molar amilina/insulina en las células β aumenta cuando éstas se cultivan en altas concentraciones de glucosa y se sugiere que la amilina tiene efectos paracrinicos sobre la regulación de la secreción de insulina⁸⁵.

Por lo anterior y de acuerdo con las observaciones realizadas en la presente investigación, se puede decir que la amilina juega un papel importante en la regulación de la secreción de insulina estimulada por glucosa. Sin embargo, el efecto de la amilina sobre la secreción de insulina en condiciones basales de glucosa, no es claro, por lo cual, se requiere de la realización de otros estudios, donde se investigue el efecto de la amilina sobre la concentración intracelular de calcio en la célula β .

- Las células tratadas con NGF secretaron más insulina tanto en condiciones basales como en condiciones de estimulación por glucosa respecto a los testigos manejados. El mayor porcentaje de células con alta tasa de secreción de insulina se encuentra dentro de las células tratadas con NGF, tanto en condiciones basales como de estimulación por glucosa. Lo anterior es una evidencia más de la importancia del NGF en la fisiología de la célula β pancreática.

Resultados similares se han observado en trabajos realizados en el laboratorio. Se ha demostrado que el NGF juega un papel muy importante en la fisiología de las células β , pues preserva en ellas la capacidad de responder adecuadamente ante la estimulación ejercida por la glucosa para la secreción de insulina⁷².

- No se observó diferencia significativa en la cantidad de insulina secretada por las células tratadas con la combinación Amilina-NGF, respecto a la cantidad de insulina secretada por las células tratadas con NGF, como tampoco en el porcentaje de células con alta tasa de secreción de insulina.

225710

A la fecha no se han reportado trabajos donde se estudie el efecto de estas dos moléculas sobre la secreción de insulina o de la relación de las mismas en células β pancreáticas. Sin embargo, sabemos del papel que juega el NGF sobre la actividad eléctrica de la célula β ⁷³.

También se ha postulado que la amilina produce hiperpolarización en la membrana celular de la célula β , limitando de esta manera, una despolarización prolongada de la membrana y el consecuente incremento de la concentración de Ca^{2+} intracelular³⁷, lo cual podría ser un mecanismo de protección para la célula β contra el efecto "tóxico" de la hiperglucemia.

Por lo anterior, suponemos que, el efecto del NGF (probablemente sobre la actividad eléctrica de las células β) prevalece sobre el de la amilina, por lo cual, no observamos diferencias significativas entre la secreción de las células tratadas con NGF y la combinación amilina-NGF.

No fue posible estandarizar la técnica para cuantificar el NGF secretado por las células β . Sin embargo, se realizaron ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) para cuantificar el NGF secretado por células β tratadas con amilina y anticuerpo contra amilina. De los ensayos realizados, se observó que las células tratadas con amilina tendían a secretar una mayor cantidad de NGF respecto al testigo, mientras que las células tratadas con anticuerpo contra amilina tendían a secretar menos NGF que el testigo (no se muestran los resultados). La caracterización de la secreción de NGF por las células β tratadas con amilina proporcionaría información muy valiosa para tratar de establecer si existe alguna relación entre estas dos moléculas.

Algunos trabajos realizados en células nerviosas muestran evidencias de que la presencia de precursores de amilina induce el aumento de la secreción de NGF⁸⁶, pero no se conoce el mecanismo mediante el cual se lleva a cabo este proceso.

La relación que existe entre el NGF y las proteínas precursoras amiloides (o precursoras de amilina) en células nerviosas llama, adicionalmente la atención. Se ha reportado que la presencia del precursor amiloide en bajas concentraciones incrementa la afinidad de los receptores p75 de NGF por el factor, así como la fosforilación de tirosina de trkA producida por NGF, potencializando, de esta manera, su actividad neuritogénica en células PC12. Esto sugiere que el precursor amiloide potencia las acciones neurotróficas del NGF al interactuar en forma indirecta sobre los receptores p75⁸⁷. También se ha demostrado en células PC12 que es necesaria la unión del NGF a los receptores p75 para mediar los efectos de este factor sobre la morfología de las células y el metabolismo del precursor amiloide, y que la activación de los receptores trkA incrementa el proceso de secreción de precursores amiloides sin incrementar su síntesis^{88, 89}.

Considerando lo anterior, cabe preguntarse si en las células β , se lleva a cabo algún mecanismo de interacción entre el NGF y la amilina o alguno de sus precursores. De esta manera resulta interesante investigar bajo qué condiciones estas moléculas interactúan y “afectan” sus procesos de síntesis y secreción.

Existen todavía numerosas incógnitas acerca de los mecanismos que regulan la síntesis y secreción de la amilina y su interacción con la insulina y el NGF; a la fecha no se ha reportado algún trabajo en el que se estudie la relación existente entre estas tres moléculas en las células β . Por esta razón resulta importante presentar estos resultados como un primer intento de establecer nexos entre los roles que juegan la insulina, la amilina y en el NGF en la fisiología de las células β pancreáticas.

*Al fin bajó la marea,
pero el oleaje impregnó su huella.*

7. CONCLUSIONES.

1. La amilina juega un papel importante en la regulación de la secreción de insulina estimulada por glucosa.
2. El efecto del NGF prevalece sobre el efecto de la amilina en la secreción de insulina.

8. REFERENCIAS

- 1) Engelking LR. (1997) "Physiology of the endocrine pancreas" *Semin Vet Med Surg* 12:224-229.
- 2) Marks V, Samols E y Stanger J. (1992) "Intra-islet interaction" En: *Nutrient regulation of insulin secretion*. ED. Flatt, P. Ed. Portlan Press LTD, 1ª Ed. Cap 9: pp 41-57.
- 3) Meda P, Kohen E y Kohen C. (1983) "Direct communication of homologous and heterologous endocrine islet cells in culture" *J Cell Biol* 92:221-226.
- 4) In't Veld PA, Pipeleerr DG y Gepts W. (1994) "Evidence against the presence of tight junctions in normal endocrine pancreas" *Diabetes* 33:101-104
- 5) Horb LD, Slack JM. (2000) "Role of cell division in branching morphogenesis and differentiation of embryonic pancreas" *Int J Dev Biol* 44: 791-796.
- 6) Sorenson RL, Garray DG y Brejle TC. (1991) "Structural and functional considerations of GABA in islets of Langerhans. Beta-cell and nerves" *Diabetes* 40:1365-1374.
- 7) Autof F y Czermichow P. (1997) "Expression of neuronal transcript genes" *J. Biol Chem* 272: 19-29.
- 8) Rosenberg L. (1995) "In vivo cell transformation: neurogenesis of beta cell from pancreatic ductal cells" *Cell Tranplantation* 4:371-383.
- 9) Dean PM y Matthews EK. (1995) "Glucose -induced electrical activity in pancreatic islet cells" *J Physiol* 210:255-264

- 10) Deng B. (1999) "Glucose-induced period-doubling cascade in the electrical activity of pancreatic beta- cells" *J Math* 38:21-78
- 11) Hiriart M, Martinez T y Ramírez MC (1997) "Physiological behavior of functional subpopulations of single pancreatic β -cells" *Physiology and pathophysiology of the islets of Langerhans*. Plenum Press, NY pp:267-274.
- 12) Hiriart M. y Ramírez-Medeles C. (1991) "Functional subpopulations of individual pancreatic β -cells in culture" *Endocrinology* 128:3193-3198.
- 13) Rosenbaum T, Vidaltamayo R , Sánchez-Soto C. Zentella A e Hiriart M. (1998) "Pancreatic β sintetize an secrete nerve growth factor" *Proc. Nat.* 95:1493-1497.
- 14) Olsen HB, Ludvigsen S y Kaarsholn NC. (1998) "The relationship between insulin bioactivity and structure in the NH2 terminal A-chain helix." *J Mol Biol* 27: 477-488.
- 15) Regazzi R, Verechere CB, Halban PA y Polonsky KS. (1997) "Insulin production: from gene to granule" *Diabetologia* 40 (Supl) 3:1333-8.
- 16) Schuit FC, In'tVeld PA y Pipeleers DG. (1988) "Glucose stimulates proinsulin biosynthesis by a dose-dependent recruitment of pancreatic beta cells" *Proc Natl Acad Sci* 85:3865-3869.
- 17) Kohler M, Norgren S, Berggren DO, Fredholm BB, Larsson O, Rohodes CJ, Hebert TP y Luthman H. (1998) "Changes in cytoplasmatic ATP concentration parallels changes in ATP-regulated K⁺-channels activity in insulin-secreting cells" *FEBS* 11:67-102.

- 18) Hiriart M y Matteson DR. (1988) "Na⁺ channels and two types of Ca²⁺ channels in rat pancreatic cells identifies with the reverse hemolytic plaque assay" *J Gen Physiol* 91:617-639.
- 19) Getty L, Hamilton-Wesster M, Ader M, Dea MK y Bergman RN (1998) "Biphasic insulin secretion during intravenous glucose tolerance test promotes optimal interstitial insulin profile" *Diabetes* 47:1941-1947.
- 20) Cooper GJS, Willis AC, Clark A, Turner RC, Sim RB y Reid KB. (1987) "Purification and characterization of a peptide from amyloid-rich pancreas of type 2 diabetic patients" *Proc Natl Acad Sci* 84:8628-8632.
- 21) Pittner RA, Albrand K, Beaumont K, Gaeta LSL, Koda LE, Moore CX, Rittenhouse J y Rink TJ. (1994) "Molecular physiology of amylin" *J Clin. Invest* 94: 1456-1462.
- 22) Clark A, Edwards CA, Ostle LR, Sutton R, Rothbard JB, Morris JF y Turner RC. (1989) "Localization of islet amyloid peptide in secretory granules of human B-cell in islets of type 2 diabetic subjects" *Cell Tissue Res* 257: 179-185.
- 23) Westernark K P, Wernestdt C. Wilander E y Sletten K. (1986) "A novel peptide in the calcitonin gene related peptide family as an amyloid fibril protein in the endocrine pancreas" *Biochem Biophys Res Commun* 140: 827-831.
- 24) Mosselman S, Höppener JWM, Lips CJM y Jansz HS. (1988) "The complete islet amyloid polypeptide precursor is encoded by two exons" *FEBS Lett* 247:154.
- 25) Nagamatsu S, Nishi M y Steiner DF. (1991) "Biosintesis of isletamyloid polipeptide" *J Biol Chem* 266:13737.

- 26) Moore CX y Cooper GJS. (1991) "Co-secretion of amylin and insulin from cultured islet beta-cell: modulation by nutrient secretagogues, islet hormones and hypoglycemic agents" *Biochem Biophys Res Commun.* 179:1-9.
- 27) Stridsberg M, Sandler S y Wilander E. (1993) "Cosecretion of islet amyloid polipeptide (IAPP) and insulin from isolated rat pancreatic islet following stimulation or inhibition of b-cell function" *Regul Pept:* 45: 363-370.
- 28) Hartter E, Sovoboda T, Ludvik B, Schuller M, LellB, Kuenburg E, Brunnbauer M, Woloszczuk W y Prager R. (1991) "Basal and stimulates plasma levels of pancreatic amylin indicate its co-secretion with insulin in humans" *Diabetologia* 34:52-54.
- 29) Mulder H, Lindh AC, Ekblad E, Westermark P, Sundler F. (1994) "Islet amyloid polypeptide is expressed in endocrine cells of the gastric mucosa in the rat and mouse." *Gastroenterology* 107: 712-719.
- 30) Mulder H, Leckström A, Uddman R, Ekblad E, Westermark P y Sundler F. (1995) "Islet amyloid polipeptide (amylin) is expressed in sensory neurons ." *J Neurosci* 15: 7625-7632.
- 31) Chirstopoulos G, Perry KJ, Morfis M. et al. (1999) "Multiple amylin receptors arise from receptor activity-modifying protein interaction with the calcitonin receptor gene product." *Mol Pharmacol* 56: 235-242.
- 32) Muff R, Buhlmann N, Fischer JA y Born W. (1999) "An amylin receptor is revealed following co-transfection of calcitonin receptor with receptor activity modifying proteins-1 or -3." *Endocrinology* 140:2924-2927.

- 33) Poyner D. (1995) "Pharmacology of receptors for calcitonin gene-related peptide and amylin" *Trends Pharmacol. Sci.* 16:424-428.
- 34) Castillo MJ, Scheen AJ y Lefebvre PJ. (1995) "Amylin/islet amyloid polipeptide, biochemistry, physiology, pathophysiology" *Diabetes et Metabolisme* 21:3-25.
- 35) Pagani F, Netti C, Guidobono F, Lattuada N, Ticozzi C y Sibilis V. (1998) "Effects of amylin and salmon calcitonin on endorphin-induced growth hormone and prolactin secretion in the rat" *Neuroendocrinology* 68:220-228.
- 36) Castle AL, Kuo CH y Ivy LJ (1998) "Amylin influences insulin-stimulated glucose metabolism by two independent mechanisms" *The American Physiological Society* :E6-E11.
- 37) Wagoner PK, Chen C, Worley JF, Dukes ID. y Oxford GS. (1993) "Amylin modulates β -cell glucose sensing via effects on stimulus-secretion coupling" *Proc. Nat.* 90: 9145-9149.
- 38) Castle AL, Chia-Hua Kuo, Dong-Ho Han e Ivy LJ. (1998) "Amylin-mediated inhibition of insulin-stimulated glucose transport in skeletal muscle" *Am J Physiol* Sep;275: E531-E536.
- 39) Young AA, Wang MW y Cooper GJS (1991) "Amylin injection causes elevated plasma lactate and glucose in the rat" *FEBS Lett.* 343:237-241.
- 40) Young A, Pittner R, Gedulin B, Vine W y Rink T. (1995) "Amylin regulation of carbohydrate metabolism" *Biochemical Society Transactions.* 23: 325-331.

- 41) Young AA, Gedulin B, Vine W, Percy A y Rink TJ, (1995) "Gastric emptying is accelerated in diabetic BB rats and is slowed by subcutaneous injections of amylin" *Diabetologia* 38:642-648.
- 42) Young AA, Gedulin B y Rink TJ (1996) "Dose-responses for the slowing of gastric emptying in a rodent model like glucagon-like peptide (7-36)NH₂, amylin, cholecystinin, and other possible regulators of nutrient uptake" *Metabolism* 45:1-3
- 43) Nowak TV, Johnson CP, Kalbfleisch JH, Roza AM, Wood CM, Weisbruch JP y Soergel KH. (1995) "Highly variable gastric emptying in patients with insulin dependent diabetes mellitus" *Gut* 37:23-29.
- 44) Bueno L.(1996) "Assessment of CNS of gastrointestinal movility" *Handbook of Methods in Gastrointestinal Pharmacology*. Gaginella TS. Ed. Boca Raton, FL, CRC Press, p. 297-330.
- 45) Sexton PM, Paxinos G, Kenney MA, Wookey PL y Beaumont K. (1994): "In vitro autoradiographic localization of amylin binding sites in rat brain" *Neuroscience* 62: 553-567.
- 46) Bronislava R. Gedulin y Young AA. (1998) " Hypoglycemia overrides amylin-mediated regulation of gastric emptying in rats" *Diabetes* 47:93-97.
- 47) Lutz TA, Geary N, Szabaday MM, Del Prete E. y Scharer E. (1995) "Amylin decreases meal size in rats" *Physiol Behav* 58: 1197-1202.
- 48) Lutz TA, Althaus J, Rossi R y Scharrer E. (1998) "Anorectic effect of amylin is not transmitted by capsaicin-sensitive nerve fibers" *Am J Physiol* 274: R1777-R1782.

- 49) Lutz TA, , Rossi R, Althaus J, Del Prete E y Scharrer E. (1998) "Amylin reduces food intake more potently than calcitonin gene-related peptide (CGRP) when injected into the lateral brain ventricle in rats" *Peptides* 19 :1533-1540.
- 50) Butle PC, Chou J, Carter WB, Wang YN, Bu BH, Chang D, Chang JK. y Rizza RA. (1990) "Effects of meal imgestion on plasma amylin concentration in NIDDM and nondiabetic humans" *Diabetes* 39:752-756.
- 51) Rink TJ. Beaumont K, Koda J y Young A. (1993) "Structure and biology of amylin" *Trends in Pharmacological Science* 14:113-118.
- 52) Westermark P, Engstrom U, Johnson KH, Westermark GT y Betsholtz C. (1990) "Islet amyloid polypeptide: pinpointing aminoacid residues linked to amyloid fibril formation" *Proc Nalt Acad Sci USA* 87:5036-5040
- 53) Moriarty D.F y Raleigh D.P. (1999) "Effects of secuential proline substitution on amyloid formatio by human amilin₂₀₋₂₉" *Biochemistry* 38: 1811-1818.
- 54) Asai J, Nakasato M, Matsukara S y Matsuo H. (1989) "Isolation and sequence determination of rat islet amyloid polypeptide " *Biochem Byophys Res Commun* 16: 400-405
- 55) Janson J, Ashley RH, Harrison D, McIntyre S y Butler PC. (1999) "The mechanism of islet amyloid polipeptide toxicity is membrane disruption by intermediate-sized toxic amyloid particles" *Diabetes* 48:491-498.
- 56) Mirzabekov TA, Lin M y Kagan BL. (1996) "Pore formation by the cytotoxic islet amyloid peptide amylin " *J. Biol Chem.* 271:1988-1992.

225710

- 57) Castillo G, Cummings J, Yang W, Judge M, Sheardown M, Rimvall K, Bondo Hansen J y Snow DA. (1996) "Sulfate content and specific glycosaminoglycan backbone of perlecan are critical for perlecan's enhancement of islet amyloid polypeptide." *Diabetes* 47:612-620.
- 58) Segal RA y Greenberg ME. (1996) "Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors." *Annu Rev Neurosci* 19:463-89.
- 59) Sider WD y Silos-Santiago I. (1996) "Dorsal root ganglion neurons require functional neurotrophin receptors for survival during development." *Philos Trans R. Soc. Lond Biol Sci* 351: 395-403.
- 60) Shooter E. y Shooter E. (1977) "Nerve growth factor" *Adv. Prot. Chem.* 31: 339-343
- 61) Rone H, Anundi H, Rask L y Peterson PA. (1984). "7S Nerve growth factor alpha and gamma subunits are closely related proteins" *Biochemistry* 23: 1229-1234.
- 62) Aloe L., Skaper S. D., Liron A. y Levy-Montalcini R. (1994) "Nerve growth factor and autoimmune diseases" *Autoimmunity* 19: 141-150.
- 63) Levi-Montalcini R, Aloe L y Alleva E. (1990) "A role for nerve growth factor in nervous, endocrine and immune system." *Prog. Neuroendocrin Immunol.* 3: 1-10.
- 64) Barbacid M. (1995) "Structural and functional properties of the family of neurotrophin receptors" *Annu NY Acad Sci* 766: 442-458.

- 65) Klein R, Jing S, Nanduri V, O'Rourke E y Barbacid M. (1991) "The trk proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor" Cell 65: 189-197.
- 66) Curnningham ME, Stepes RM, Kaplan DR y Greene LA. (1997) "Autophosphorylation of activation loop tyrosines regulates signaling by nerve growth factor receptor" J Biol Chem 272:10957-10967.
- 67) Dikic I, Batzer AG, Blaikie P, Obermeier A, Ullrich A, Schlessinger J y Margolis B. (1995) "Shc binding of nerve growth factor receptor is mediated by phosphotyrosine interaction domain" J Biol Chem 270: 15125-15129.
- 68) Yan H y Chao MV. (1991) "Disruption of cystein rich repeats to the NGF receptor leads to loss of ligand binding" J. Biol Chem 266:12099-12104.
- 69) Yoon SO, Cassaccia-Bonnel P, Carter BD y Chao MV. (1998) "Competitive signaling between A and p75 nerve growth factor receptor determines cell survival" J. Neurosci. 18:3273-3281.
- 70) Kanaka Ganteinbein C, Dicou E, Czernichow P y Scharfman R. (1995) "Presence of nerve growth factor and receptors in an *in vitro* model of islet cell development: implication in normal islet morphogenesis" Endocrinology 136: 3154-3162.
- 71) Polak M, Scharfman R, Seilheimer B, Eisenbarth G, Dressler D, Verma IM y Potter H (1993) "Nerve growth factor induces neuro-like differentiation of an insulin-secreting pancreatic beta cell line" Proc Natl Acad Sci USA 90, 5881-5885.

- 72) Vidaltamayo R, Sanchez-Soto C, Rosenbaum T, Martínez-Merlos T e Hiriart M. (1996) "Neuron-Like Genotypic Changes in Pancreatic β -Cell Induced by NGF, FGF, and dbcAMP" *Endocrine* 4:19-26.
- 73) Rosenbaum T, Vidaltamanyo R e Hiriart M. (1998) "Effects of NGF on Ca^{++} and Na^{+} current in pancreatic β cell" *Biophys J* 74: A327.
- 74) Vázquez M y Escobedo J. (1990) "Análisis de la mortalidad por diabetes mellitus en el Instituto Mexicano del Seguro Social" *Medicina Social* 20: 157-170.
- 75) Herman WH, Wereham NJ (1999) "The diagnosis and classification of diabetes mellitus in nonpregnant adults." *Prim Care* 2:755-770.
- 76) Biotard C, Timsit J, Langer E y Dubois D (1997) "Immune mechanism leading to type 1 insulin-dependent diabetes mellitus" *Horm. Res* 48:58-62
- 77) Melville A, Richarssen R, lister-Sharp D (2000) "On the evidence type 2 diabetes." *Healt Serv* 16;110 (5696): 33
- 78) Leahy JL. (1996) " β -cell dysfunction with chonic hyperglycemia: "The overworker β -cell hypothesis." *Diabetes Rev.* 4:298-319.
- 79) Ling Z, Keikins R, Mahler T, Scuit FC, Pipeleers-Marichal M, Sener A, Klöppel G, Malaisse WJ y Pipeleers DG. (1996) "Effects of chronically elevated glucose levels on the functional properties of rat pancreatic β -cell." *Diabetes* 45: 1774-1782
- 80) Hou X, Ling Z, Quartier E, Foriers A, Schuit F, Pipeleers D y Van Scharavedijk C. (1999) "Prolongates exposure of pancreatic beta cells to raised

glucose concentrations results in increased cellular content of islet amyloid polipeptide precursors" *Diabetologia* 42:188-194.

- 81) Bretherton-Watt D, Gilbey Sg, Ghalci MA, Bcacham J, Macrac Ad, Bloom SR (1992) "Very high concentrations of islet amyloid polypeptide are necessary to alter the insulin response to intravenous glucose in man" *J Clin Endocrinol Metab* 74:1032-1035.
- 82) Wang F, Thomas EA, Westermark GT, Ding X, Gasslander T y Petermet J. (1999) "Islet amyloid polypeptide tonally inhibits α , δ and β -cell secretion in insolated rat pancreatic islets" *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 276: E19-E24.
- 83) Leaming R, Johnson A, Hook G, Hanley R y Baron A. (1995) "Amylin modulates insulin secretion in humans. Study with an amylin antagonist" *Diabetologia* 38, Suppl. 1: A113, 437.
- 84) Wang ZL, Bennet WM, Ghatel MA. Byfield PGH, Smith DM y Bloom SR. (1993) "Influence of islet amyloid polypeptide and the 8-37 fragment of islet amyloid polypeptide on insulin release from perfused rat islet" *Diabetes* 42:330-335.
- 85) Salas M, Silvestre RA, García HO, Fontela T, Rodríguez GJ y Marco J. (1995) "Inhibitory effect of amylin (islet amyloid polypeptide) on insulin response to non-glucose stimuli. Study in perfused rat pancreas" *Diabete Metab* 21:269-273.
- 86) Juhl CB, Porksen N, Sturis J, Hansen AP, Veldhuis JD, Pincus S, Fineman M y Schmitz O. (2000) "High-frequency oscillations in circulating amylin concentrations in healthy humans" *Am. J. Physiol. Endocrinol Metab.* 278: E484-E490.

- 87) Akar CA y Wallace WC. (1998) "Amyloid precursor protein modulates the interaction of nerve growth factor with p75 receptor and potentiates its activation of trkA phosphorylation" *Brain Res. Mol.* 56: 125-132.
- 88) Rossner S, Ueberham U, Schliebs R, Perez-Polo JR y Bigl V. (1999) "Regulated secretion of amyloid precursor protein by trkA receptor stimulation in rat pheochromocytoma-12 cells in mitogen activated protein kinasa sensitive." *Neurosci Lett* 20: 97-100.
- 89) Rossner S, Ueberham U, Schliebs R, Perez-Polo JR y Bigl V. (1998) " p75 and trkA receptor signaling independently regulate amyloid precursor protein mRNA expression, isoform composition, and protein secretion in PC12 cells. *J Neurochem* 71: 757-766.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, aprobó la presente tesis el 26 de marzo de 2001.



PRESIDENTE
Dr. Rubén Román Ramos.



SECRETARIO
Dr. Román Vidaltamayo R.



1er VOCAL
Dra. Marcia Hiriart Urdanivia.



2º VOCAL
Dr. Fransisco J. Alarcón A.



3er VOCAL
Dra. Claudia A. Soto P.