

Expresión de la conexina 30.2 en las células beta pancreáticas durante el desarrollo posnatal del ratón

***Cristina Corone Cruz¹, Ivonne Sánchez Cervantes² y E. Martha Pérez Armendariz¹**

Departamento de Biología Celular y Tisular¹ y Unidad de Microscopía², Facultad de Medicina, UNAM, Av. Universidad No. 3000, Código postal: 04510 Teléfono: 56226666 E-mail: cristina.coronel.c@gmail.com

INTRODUCCIÓN

Los canales de unión comunicante (tipo nexa) están formados por una familia de proteínas homólogas denominadas conexinas (Fig. 1A). Seis subunidades proteicas forman un conexón o hemicanal y el acople de dos hemicanales forma un canal de unión comunicante (Sohl and Willecke, 2004). También se ha demostrado que las mutaciones en las conexinas producen patologías en el humano (Srinivas *et al* 2018). En las células beta pancreáticas se ha demostrado que la Cx36 regula la secreción de insulina estimulada por glucosa (Calabrese *et al*, 2003; Ravier *et al*, 2005; Benninger *et al* 2008) y se ha observado que su expresión aumenta durante el desarrollo posnatal, asociándose con la maduración de las células beta (Leite *et al*, 2005; Carvahlo *et al*, 2010). Previamente nuestro grupo reportó la expresión de otra conexina en las células beta pancreáticas del ratón adulto, la conexina 30.2, observando que la expresión de su transcrito se modula por glucosa al igual que la Cx36 (Coronel-Cruz *et al*, 2013). De lo anterior, nos preguntamos si la conexina 30.2 se expresa en las células beta del islote pancreático durante el desarrollo posnatal. Más aún, si su expresión incrementa durante el periodo de lactancia y si este está asociado al incremento en la expresión del transcrito de la insulina.

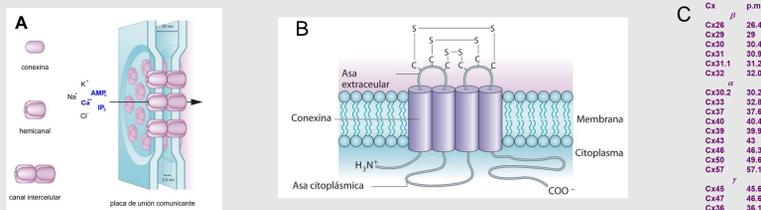


Figura 1. A) Esquema de los canales de unión comunicante (tipo nexa). Un hemicanal o conexón se forma de 6 subunidades proteicas de conexinas, el acople de 2 conexones forma un canal de unión comunicante, el cual permite el paso directo de iones y segundos mensajeros entre el citoplasma de las células vecinas. Al conglomerado de canales de unión comunicante se denomina placa de unión comunicante. B) Dominios estructurales de las conexinas. C) A la fecha se han descrito 21 genes de conexinas en el ratón y 20 en el humano, en la tabla se citan algunas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las imágenes de inmunohistoquímica mostraron que la conexina 30.2 se expresa en las células beta del ratón a partir del día 3 dpp y hasta la edad adulta del ratón, así como en la rata adulta. Las imágenes de inmunofluorescencia (IF) analizadas mediante microscopía confocal a todas las edades estudiadas, mostraron que la Cx30.2 se localizó en el citoplasma celular y también en zonas de aposición membranal entre los núcleos de las células beta. Lo cual fue consistente con lo previamente reportado en el ratón adulto (Coronel-Cruz *et al* 2013). Más aún, que la Cx30.2 se expresa en las células beta pancreáticas pero no en las células alfa del islote a los 3, 21 y 90 dpp. Respecto al análisis de los niveles relativos del transcrito de insulina, Cx30.2 y Cx36, estos aumentaron significativamente desde el día 3 al 21 dpp: 5.5, 4.5 y 11 veces, respectivamente. En tanto que del día 21 hasta los 90 dpp, el RNAm tanto de las conexinas como de la insulina no cambio significativamente.

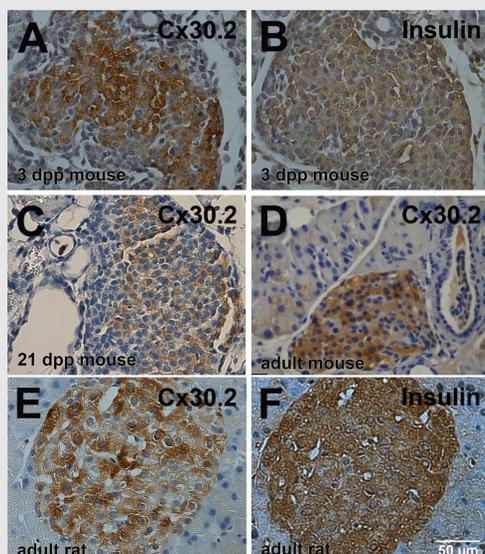


Figura 2. Expresión de la Cx30.2 en las células beta pancreáticas durante la vida postnatal. Imágenes de IHQ obtenidas en secciones pancreáticas en las edades postnatales indicadas incubadas con anti-Cx30.2. La Cx30.2 se expresa en las células centrales de los islotes en 3 (A) y 21 dpp (C), así como en 90 dpp (adulto) (D) utilizado como control positivo. La tinción de secciones en serie con anti-insulina (B) mostró que esta hormona tiene la misma distribución que la Cx30.2 (A), lo que sugiere que esta proteína de unión de brecha se expresa en las células beta durante todo el período postnatal en ratones. También en islotes pancreáticos de ratas adultas se observa tinción Cx30.2 (E) con una distribución similar en las células beta de insulina (F). Barra de calibración A-F 50 μ m.

OBJETIVO GENERAL:

Investigar si las células beta pancreáticas durante el desarrollo posnatal expresan la proteína conexina 30.2

METODOLOGÍA

Se realizaron estudios de inmunofluorescencia (IF). Brevemente, secciones pancreáticas de ratón a los 3, 21 y 90 días posparto (dpp) se co-incubaron con el anticuerpo anti-Cx30.2 y anti-insulina o anti-glucagón, los cuales fueron revelados con anticuerpos secundarios acoplados a fluorocromos. Las imágenes de IF se analizaron mediante microscopía confocal. Además, se aisló el RNA total de islotes pancreáticos de ratón a las edades mencionadas y se analizó mediante RT-PCR de tiempo real, usando oligonucleótidos específicos para los transcritos de insulina, Cx30.2, Cx36 y GAPDH. Los niveles relativos de expresión se analizaron mediante la prueba estadística de Mann-Whitney usando el software sigma plot. Para más detalles consultar Coronel-Cruz *et al* 2018.

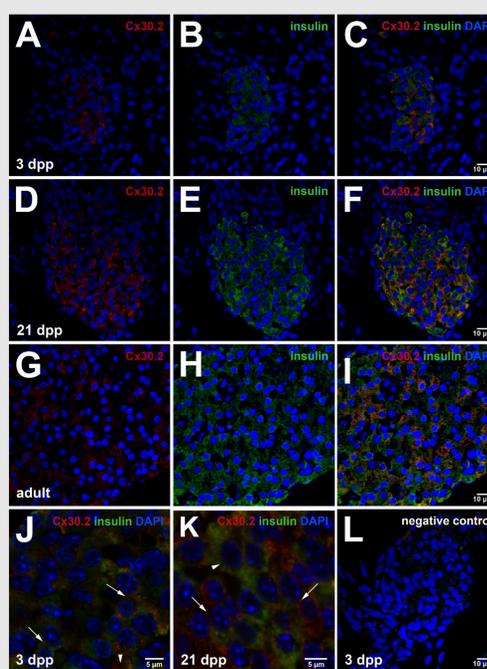


Figura 3. Expresión de la proteína conexina 30.2 en las células beta pancreáticas durante todo el período postnatal. Imágenes de IF de secciones pancreáticas con marcas positivas para la conexina 30.2 (rojo) y para la insulina (verde) a 3 (A-C), 21 (D-F) y 90 dpp (G-I, este último se usó como control positivo), pero no en una sección pancreática solo incubada con los anticuerpos secundarios (L). Una sección óptica confocal de 1 μ m de 3 (J) y 21 dpp (K) muestra que Cx30.2 se expresa en regiones de membranas celulares entre núcleos teñidos con DAPI (flechas) y en el citoplasma (puntas de flecha). Barra de calibración A-I y L de 10 μ m

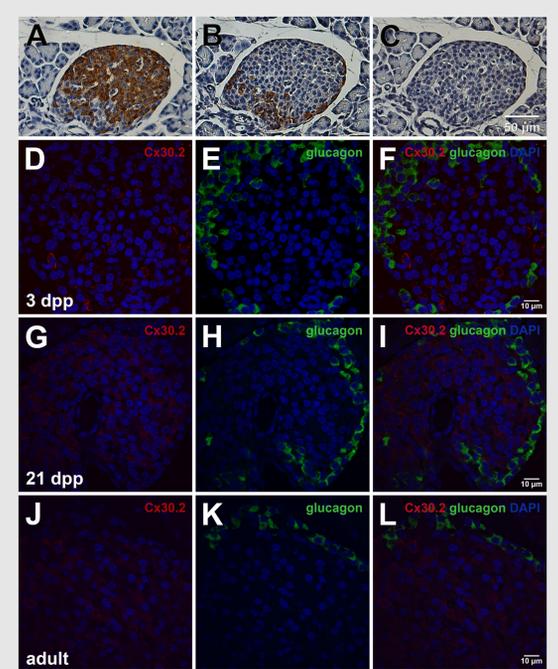


Figura 4. La conexina 30.2 NO se expresa en células alfa productoras de glucagón. Las imágenes de inmunohistoquímica de secciones pancreáticas incubadas con anti-Cx30 (A), la sección inmediata teñida con anti-glucagón (B) y la sección en serie incubada solo con el anticuerpo secundario (C), sugieren que la proteína conexina 30.2 no se expresa en las células alfa. Las imágenes de IF (D-L) analizadas por microscopía confocal (1 μ m de espesor) confirman que la conexina 30.2 (rojo) no se expresa en las células positivas a glucagón (verde) a los 3 dpp (D-F), 21 (G-I) y 90 dpp (J-L).

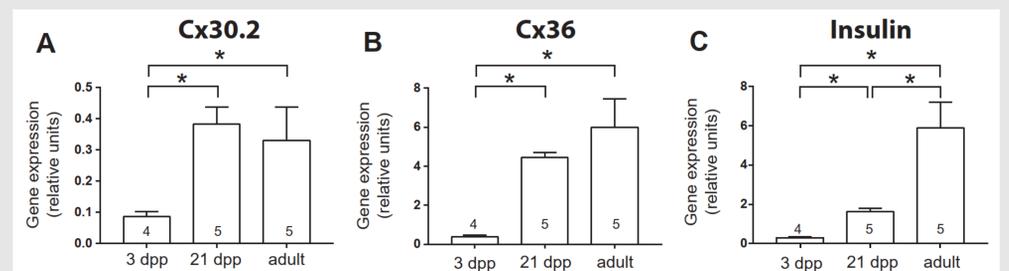


Figura 5. Incremento en la expresión del transcrito de la Cx30.2 y la insulina durante el desarrollo postnatal. A-C) Niveles relativos de expresión de ARNm de la conexina 30.2 (A), la conexina 36 (B) y la insulina (C), cuantificados en lotes de islotes pancreáticos (n= número dentro de las barras), a diferentes edades de desarrollo postnatal mediante RT-PCR de tiempo real. Los datos son promedios \pm S.E.M. y el análisis con Mann Withney mostró que los cambios fueron estadísticamente significativos (* $p < 0.05$).

CONCLUSION

La conexina 30.2 se expresa en las células beta de los islotes pancreáticos de ratón durante el período postnatal y su transcrito incrementa significativamente durante la lactancia, en paralelo con el RNAm de la insulina, lo que sugiere que esta proteína participa en la maduración funcional de las células beta pancreáticas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Sohl and Willecke, 2004. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res*, 62, 228-32.
- [2] Srinivas *et al* 2018. Human diseases associated with connexin mutations. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1860, 192-201.
- [3] Calabrese *et al* 2003. Connexin 36 Controls Synchronization of Ca²⁺ Oscillations and Insulin Secretion in MIN6 Cells. *Diabetes* 52 (2), 417-424.
- [4] Ravier *et al* 2005. Loss of connexin36 channels alters beta-cell coupling, islet synchronization of glucose-induced Ca²⁺ and insulin oscillations, and basal insulin release. *Diabetes*, 54, 1798-807
- [5] Leite *et al* 2005. Co-expression and regulation of connexins 36 and 43 in cultured neonatal rat pancreatic islets. *Can J Physiol Pharmacol*, 83, 142-51.
- [6] Carvahlo *et al* 2010. Beta cell coupling and connexin expression change during the functional maturation of rat pancreatic islets. *Diabetologia*, 53, 1428-37.
- [7] Coronel Cruz *et al* 2013. Connexin 30.2 is expressed in mouse pancreatic beta cells. *Biochim Biophys Res Commun*, 438, 772-7.
- [8] Coronel Cruz *et al* 2018. Connexin 30.2 is expressed in exocrine vascular endothelial and ductal epithelial cells throughout pancreatic postnatal development. *Acta Histochem*, 120, 558-565.