



**Instituto de Bioingeniería**  
Universidad Miguel Hernández

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA APLICADA

INSTITUTO DE BIOINGENIERÍA

**ADAPTACIONES FUNCIONALES Y ESTRUCTURALES DE LA CÉLULA  
β PANCREÁTICA EN UN MODELO DE OBESIDAD INDUCIDA POR  
DIETA RICA EN GRASA**

Memoria presentada por

**Alejandro González Álvarez**

Para optar al grado de doctor

Dirigida por

Dr. Iván Quesada Moll

Codirigida por

Dr. Sergio Soriano Úbeda

Elche, 2013



Dr. **EUGENIO VILANOVA GISBERT**, Catedrático de Toxicología y Director del Instituto de Bioingeniería,

HACE CONSTAR:

Que da su conformidad a la lectura de la tesis doctoral presentada por Alejandro González Álvarez, titulada “**Adaptaciones funcionales y estructurales de la célula  $\beta$  pancreática en un modelo de obesidad inducida por dieta rica en grasa**”, que se desarrolló dentro del programa de doctorado de Bioingeniería de este instituto de investigación.

Lo firmo en Elche, a instancias del interesado y a los efectos oportunos, en Elche a febrero de 2013.

EUGENIO VILANOVA GISBERT  
Catedrático de Toxicología  
Director del Instituto de Bioingeniería



Dr. **IVÁN QUESADA MOLL**, Profesor Titular en la Universidad Miguel Hernández de Elche y Dr. **SERGIO SORIANO ÚBEDA**, Profesor Contratado en la Universidad de Alicante,

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo de investigación titulado “**Adaptaciones funcionales y estructurales de la célula  $\beta$  pancreática en un modelo de obesidad inducida por dieta rica en grasa**”, presentado por Alejandro González Álvarez para optar al grado de doctor en Bioingeniería, ha sido realizado bajo nuestra dirección y supervisión en el Instituto de Bioingeniería, y que se encuentra en condiciones de ser defendido ante el tribunal correspondiente nombrado por esta universidad.

Y para que así conste y a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado, en Elche a febrero de 2013.

IVÁN QUESADA MOLL  
Profesor Titular  
Área de Nutrición y Bromatología  
Universidad Miguel Hernández

SERGIO SORIANO ÚBEDA  
Profesor Contratado  
Departamento de Fisiología,  
Genética y Microbiología  
Universidad de Alicante





A mi familia,  
en el más amplio  
sentido de la palabra



## CURRICULUM VITAE

---

**Alejandro González Álvarez**

Unidad de Fisiología Celular y Nutrición  
Instituto de Bioingeniería. Universidad Miguel Hernández de Elche  
Edificio Vinalopó, Avenida de la Universidad, s/n  
03202 Elche, España  
+34 965 22 20 12  
[alejandro.gonzalez@umh.es](mailto:alejandro.gonzalez@umh.es)

### EXPERIENCIA COMO INVESTIGADOR

---

Sept 2008-presente      Estudiante de doctorado en la Unidad de Fisiología Celular y Nutrición (Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández). Mi trabajo se centra en el estudio de los mecanismos que regulan la secreción y función de las células beta, alfa y delta pancreáticas. Para ello utilizo principalmente técnicas de electrofisiología (*whole-cell patch-clamp*, *patch-clamp* estándar, *perforated patch-clamp*) y técnicas de monitorización de capacitancia para estudiar los procesos de exocitosis. También utilizo técnicas de imagen como la microscopía de epifluorescencia, microscopía confocal y herramientas de marcaje inmunocitoquímico.

Oct 2007-May 2008      Investigador en la Unidad de Biomembranas (Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad Miguel Hernández). donde manejé técnicas como la Calorimetría Diferencial, la Espectroscopía de Infrarojos, la Espectroscopía de Fluorescencia y la Resonancia Magnética Nuclear para el estudio

de la interacción de fragmentos peptídicos con membranas modelo.

## EDUCACIÓN

---

- 2008            Máster en Bioingeniería. Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández. Elche, España.
- 2007            Licenciado en Bioquímica. Universidad Miguel Hernández. Elche, España.

## PUBLICACIONES

---

1. Laura Marroquí, Alejandro González, Patricia Neco, Ernesto Caballero-Garrido, Elaine Vieira, Cristina Ripoll, Angel Nadal, Ivan Quesada. ***Role of leptin in the pancreatic beta cell: effects and signaling pathways***. Journal of Molecular Endocrinology, 2012 Mar 23. [PubMed](#)
2. Laura Marroquí, Thiago M. Batista, Alejandro González, Elaine Vieira, Alex Rafacho, Simone J. Colleta, Sebastião R. Taboga, Antonio C. Boschero, Angel Nadal, Everardo M. Carneiro, Ivan Quesada. ***Functional and structural adaptations in the pancreatic alpha-cell and changes in glucagon action during protein malnutrition***. Endocrinology, 2012 Apr; 153(4):1663-72. [PubMed](#)
3. Virginia González-Vélez, Geneviève Dupont, Amparo Gil, Alejandro González, Iván Quesada. ***Model for secretion by pancreatic  $\alpha$ -cells***. PLoS ONE, 2012; 7(3):e32282. [PubMed](#)
4. Sergi Soriano, Cristina Ripoll, Esther Fuentes, Alejandro González, Paloma Alonso-Magdalena, Ana B. Ropero, Ivan Quesada and Angel Nadal. ***Regulation of  $K_{ATP}$  channel by 17- $\beta$  estradiol in pancreatic  $\beta$  cells***. Steroids, 2011 Aug; 76(9):856-60. [PubMed](#)

5. Laura Marroquí, Elaine Vieira, Alejandro González, Ángel Nadal, Iván Quesada. ***Leptin downregulates expression of the gene encoding glucagon in  $\alpha$ -TC1-9 cells and mouse islets.*** Diabetologia, 2011 Apr; 54(4):843-51. [PubMed](#)
6. Sergi Soriano, Alejandro González, Laura Marroquí, Eva Tudurí, AG Amaral, Thiago M. Batista, Alex Rafacho, Antonio C. Boschero, Angel Nadal, Everardo M. Carneiro, Ivan Quesada. ***Reduced insulin secretion in protein malnourished mice is associated to multiple failures in the beta-cell stimulus-secretion coupling.*** Endocrinology, 2010 Aug; 151(8):3543-54. [PubMed](#).
7. Bernat Soria, Eva Tudurí, Alejandro González, Abdelkrim Hmadcha, Franz Martín, Ángel Nadal and Iván Quesada. ***Pancreatic islet cells: a model for calcium-dependent peptide release.*** HFSP Journal, 2010 Apr; 4(2):52-60. [PubMed](#)
8. Guillén J, González-Álvarez A, Villalaín J. ***A membranotropic region in the C-terminal domain of Hepatitis C Virus protein NS4B. Interaction with membranes.*** Biochim Biophys Acta, 2010 Mar; 1798(3):327-337. [PubMed](#).

#### Próximas publicaciones:

Alejandro González, Beatriz Merino, Paloma Alonso-Magdalena, Laura Marroquí, Patricia Neco, Ernesto Caballero-Garrido, Sergi Soriano, Ramón Gomis, Angel Nadal and Ivan Quesada. ***Hyperinsulinemia in diet-induced obesity is associated to several functional and structural adaptations in individual beta-cells.*** En preparación

Reshma Ramracheya, Caroline Ward, Quan Zhang, Yusuke Moritoh, Makoto Shigeto, Jonathan Walker, Fernando Abdulkader, Alejandro González, Orit Braha, Anne Clark, Paul Johnson, Matthias Braun and Patrik Rorsman. ***Glucagon-like peptide-1 inhibits glucagon secretion from human islets by closure of  $\alpha$ -cell ATP-sensitive potassium channels.*** En preparación

## COMUNICACIONES A CONGRESOS

---

1. Annual Meeting of the EASD Islet Study Group.  
Rostock (Alemania). Octubre (2012)  
Póster: “*Enhanced beta-cell function allows adaptation to insulin resistance in mice submitted to high fat diet*”  
**González A**, Merino B, Alonso-Magdalena P, Neco P, Marroquí L, Caballero-Garrido E, Soriano S, Nadal A, Quesada I.  
  
Póster: “*Role of pancreatic alpha-cells in protein malnutrition*”  
Merino B, Marroquí L, Batista T, **González A**, Vieira E, Rafacho A, Colleta S, Taboga S, Bosquero A, Nadal A, Carneiro E, Quesada I.  
  
Póster: “*Effect of high fat diet on glucose metabolism in mice exposed to bisphenol-A during embryonic development*”  
García-Arévalo M, Alonso-Magdalena P, Ropero AB, **González A**, Neco P, Soriano S, Quesada I, Carneiro EM, Nadal A.
2. FEPS & Spanish Physiological Society Scientific Congress.  
Santiago de Compostela (España). Septiembre 2012  
Póster: “*Functional and Structural beta-cell adaptations during diet-induced obesity*”  
**González A**, Neco P, Merino B, Alonso-Magdalena P, Marroquí L, Caballero-Garrido E, Soriano S, Nadal A, Quesada I.  
  
Póster: “*Protein malnutrition in mice leads to functional and structural adaptations in the pancreatic alpha-cells and alterations in glucagon signaling*”  
Merino B, Marroquí L, Batista TM, **González A**, Vieira E, Rafacho A, Colleta S, Taboga SR, Bosquero AC, Nadal A, Carneiro EM, Quesada I.
3. 23<sup>th</sup> meeting of the SED islet study group.  
Vigo (España). Abril 2012  
Oral: “*Functional beta-cell adaptations during diet-induced obesity*”

**González A**, Ñeco P, Merino B, Alonso-Magdalena P, Marroquí L, Caballero-Garrido E, Soriano S, Quesada I.

4. 21<sup>th</sup> meeting of the EASD islet study group.  
Natal, Rio Grande do Norte (Brasil). Mayo 2011  
Póster: "*Leptin downregulates expression of the gene encoding glucagon in alpha TC1-9 cells and mouse islets*"  
Marroquí L, Vieira E, **Gonzalez A**, Nadal A, Quesada I.
  
5. 53<sup>th</sup> Endocrinology and Nutrition Spanish Society Congress.  
Santiago de Compostela (España). May 2011.  
Póster: "*Adaptaciones funcionales del páncreas endocrino a la restricción proteica en la dieta*".  
Marroqui L, Soriano S, **Gonzalez A**, Tudurí E, Vieira E, Nadal A, Quesada I.
  
6. 4rd CIBERDEM Annual Meeting.  
Vall de Boi (España). 2010.  
Póster: "*Alpha and beta-cell adaptations during diet-induced obesity*".  
Neco P, **Gonzalez A**, Marroqui L, Caballero-Garrido E, Vieira E, Nadal A, Quesada I.  
  
Póster: "*Effects of high fat diet on glucose metabolism in mice expose to bisphenol-A during embryonic development*".  
García-Arevalo M, Alonso-Magdalena P, Belén Ropero A, **González A**, Soriano S, Ñeco P, Quesada I, Carneiro, EM, Nadal, A.
  
7. 3rd CIBERDEM Annual Meeting.  
Prullans (España). 2010.  
Póster: "*Reduced insulin secretion in protein malnourished mice is associated with multiple changes in the  $\beta$ -cell stimulus-secretion coupling*".  
Soriano S, **Gonzalez A**, Marroqui L, Tudurí E, Vieira E, Amaral AG, Batista TM, Rafacho A, Boschero AC, Nadal A, Carneiro EM, Quesada I.
  
8. 2nd CIBERDEM Annual Meeting.  
Arnes (España). 2009.

Póster: "*Inhibitory effects on glucagon gene expression by leptin in the pancreatic  $\alpha$ -cell*".

Marroquí L, **Gonzalez A**, Caballero E, Tudurí E, Nadal A, Quesada I.

9. EASD Islet Study Group, 45th European Association for the Study of Diabetes Congress.

Steinschaler Dorfl (Austria). 2009.

Póster: "*Inhibitory effects on glucagon gene expression by leptin in the pancreatic  $\alpha$ -cell*".

Marroquí L, **Gonzalez A**, Caballero E, Tudurí E, Nadal A, Quesada I.

Póster: "*Multiple failures in the beta-cell stimulus-secretion coupling in protein malnourished mice*".

Vieira E, Soriano S, **Gonzalez A**, Marroquí L, Tudurí E, Amaral AG, Batista TM, Rafacho A, Boschero AC, Nadal A, Carneiro EM, Quesada I.

10. Seminarios de Bioingeniería.

Oral: "*Identificación y caracterización de las regiones membrano-activas de las proteínas del virus de la hepatitis c*".

Instituto de Bioingeniería, Elche (España). Julio 2008.

**Alejandro González-Álvarez.**

11. XI Encuentro peptídico Ibérico.

Santiago de Compostela (España) Marzo 2008.

Póster: "*The membrane-active regions of hcv p7 protein. Biophysical characterization of the loop region*"

Ana J. Pérez-Berná, Angela Bernabeu, Jaime Guillén, Miguel R. Moreno, Ana Isabel Gómez Sánchez, **Alejandro González-Álvarez**, Georg Pabst, Peter Laggner and José Villalaín.

12. 51<sup>st</sup> Annual Meeting of The Biophysical Society

Los Ángeles, California (USA) Febrero 2008

Póster: "*Interaction of the Pretransmembrane Domain of SARS-CoV. Implications for the Viral Fusion Mechanism*".

Jaime Guillén-Casas, Ana J. Pérez-Berná, Ana I. Gómez, Miguel R. Moreno, **Alejandro-González Álvarez**, José Villalaín.

Póster: “*The Membrane-Active Regions of the Hepatitis C Virus E1 and E2 Envelope Glycoproteins. Structural and Biophysical Characterization of the Fusogenic region*”.

Ana J. Pérez-Berná, Jaime Guillén-Casas, Miguel R. Moreno, Ana I. Gómez, **Alejandro-González Álvarez**, Georg Pabst, Peter Laggner, José Villalaín.

## ESTANCIAS EN INSTITUCIONES CIENTÍFICAS

---

2010 Laboratorio del Prof. Patrik Rorsman. *Oxford Center for Diabetes Endocrinology and Metabolism* (OCDEM). Universidad de Oxford. Reino Unido. *Duración: 3 meses.*

## CURSOS Y CONGRESOS

---

2010 PhD student course: Physiological Techniques Applied to Islets of Langerhans. 20<sup>th</sup>-21<sup>th</sup> January, Elche (España).

2010 Topical Workshop: TRP Channels and Sensory Biology. 2<sup>nd</sup>-3<sup>th</sup> Diciembre, Elche (España).

2009 II Ionic Channels Spanish Meeting (RECI<sup>II</sup>). 15<sup>th</sup>-16<sup>th</sup> Octubre, Valladolid (España).

2009 6<sup>th</sup> International Meeting on Rapid Responses to Steroid Hormones. 2<sup>nd</sup>-5<sup>th</sup> Septiembre, Elche (España).

2008 Methods for Phenotyping of Animal Models of Diabetes and Insulin Resistance. 20<sup>th</sup>-21<sup>th</sup> Noviembre, Barcelona (España).

2008 IBEC Workshop on Optical Measurement and Manipulation of Neurotransmission. 17<sup>th</sup> Octubre, Barcelona (España).

- 2006 Introductory course on Biochemistry and Molecular Biology Research. Septiembre, Alicante (España).
- 2006 Spanish Society for Biochemistry and Molecular Biology (SEBBM) Conference. Septiembre, Alicante (España).
- 2005 I Science and Society Course. Abril, Alicante (España).



# ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	xvi
ABREVIATURAS .....	xx
RESUMEN.....	xxii
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1. PÁNCREAS ENDOCRINO. EL ISLOTE DE LANGERHANS.....	3
2. HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA PLASMÁTICA .....	4
3. ALTERACIONES DE LA GLUCEMIA. DIABETES MELLITUS.....	7
4. OBESIDAD Y DIABETES.....	9
5. ACTIVIDAD ELÉCTRICA Y SECRECIÓN EN CÉLULAS PANCREÁTICAS.....	10
5.1 Canales iónicos implicados en la generación de la actividad eléctrica en células pancreáticas.....	12
5.1.1 Canales de potasio .....	13
5.1.1a Canales de potasio rectificadores de entrada sensibles a ATP ( $K_{ATP}$ ) ..	16
<i>Canales <math>K_{ATP}</math> en la célula <math>\beta</math> pancreática.....</i>	<i>19</i>
5.1.1b Canales de potasio dependientes de voltaje ( $K_V$ ) .....	20
<i>Canales <math>K_V</math> en la célula <math>\beta</math> pancreática.....</i>	<i>21</i>
5.1.1c Canales de potasio activados por calcio ( $K_{Ca}$ ) .....	24
<i>Canales <math>K_{Ca}</math> en la célula <math>\beta</math> pancreática.....</i>	<i>27</i>
5.1.2 Canales de calcio dependientes de voltaje ( $Ca_V$ ).....	29
<i>Canales <math>Ca_V</math> en la célula <math>\beta</math> pancreática .....</i>	<i>31</i>
5.2 REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA EN LA CÉLULA $\beta$ .....	33
5.3 FLUJOS IÓNICOS IMPLICADOS EN LA GENERACIÓN DEL POTENCIAL DE ACCIÓN EN CÉLULA $\beta$ .....	36
5.4 DINÁMICA VESICULAR DURANTE EL PROCESO DE EXOCITOSIS .....	39
5.5 REGULACIÓN DE LA EXOCITOSIS POR EL IÓN $Ca^{2+}$ .....	44
6. FISIOPATOLOGÍA DE LA DIABETES TIPO II ASOCIADA A LA OBESIDAD .....	46
<b>II. OBJETIVOS .....</b>	<b>51</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>55</b>
1. MODELO DE OBESIDAD EN RATÓN INDUCIDA POR DIETA.....	57
2. AISLAMIENTO DE LOS ISLOTES DE LANGERHANS .....	58

3. CULTIVO DE CÉLULAS $\beta$ AISLADAS .....	59
4. REGISTROS DE SEÑALIZACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR CON SONDAS FLUORESCENTES .....	59
4.1 Registro ratiométrico de calcio intracelular en islote completo y cultivo de células $\beta$ aisladas .....	59
4.2 Registro de calcio intracelular en célula $\beta$ individual en islote intacto .....	61
5. REGISTROS DE ELECTROFISIOLOGÍA .....	61
Registros de Corrientes de $\text{Ca}^{2+}$ .....	62
Registros de corrientes de $\text{K}^+$ .....	64
Registros simultáneo de corriente de $\text{Ca}^{2+}$ y $\text{C}_m$ .....	65
Registros de potencial de membrana .....	65
Registros de $\text{K}_{\text{ATP}}$ .....	68
6. IDENTIFICACIÓN DE LA CÉLULAS B .....	68
7. EVALUACIÓN DEL TAMAÑO DE CÉLULAS B INDIVIDUALES MEDIANTE TÉCNICAS DE INMUNOFLUORESCENCIA .....	70
8. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO Y LA SECRECIÓN DE INSULINA.....	72
9. INMUNOHISTOQUÍMICA Y EVALUACIÓN DE LA MASA DE CÉLULA $\beta$ .....	73
10. ESTADÍSTICA .....	74
<b>IV. RESULTADOS</b> .....	75
1. Establecimiento y caracterización del modelo de obesidad en ratón .....	77
2. Los ratones alimentados con dieta HFD contienen más insulina y secretan mayores cantidades de hormona .....	80
3. Las células $\beta$ de los ratones alimentados con dieta HFD son de mayor tamaño .....	81
4. La masa de célula $\beta$ no presenta alteraciones importantes en los ratones alimentados con dieta HFD.....	85
5. La forma del potencial de acción generado por las células $\beta$ de los ratones alimentados con dieta HFD presenta importantes diferencias respecto a sus controles .....	86
6. Los ratones alimentados con dieta HFD muestran alteraciones en la respuesta de las variaciones de $\text{Ca}^{2+}$ intracelular.....	89
7. Las células $\beta$ de los ratones alimentados con dieta HFD presentan un incremento de corriente de $\text{Ca}^{2+}$ proporcional a su aumento de tamaño.....	94
8. Las células $\beta$ de los ratones alimentados con dieta HFD presentan modificaciones en el comportamiento de sus corrientes de $\text{K}^+$ .....	98

9. Las células  $\beta$  de los ratones alimentados con dieta HFD muestran un incremento en su capacidad exocitótica .....100

**V. DISCUSIÓN** .....109

1. Modelo de obesidad .....112

2. Alteraciones estructurales .....113

2.1 Efecto de la dieta sobre el tamaño de las células  $\beta$  pancreática .....113

2.2 Efecto de la dieta sobre la masa de la célula  $\beta$  pancreáticas .....115

3. Alteraciones funcionales.....116

3.1 Efecto de la dieta sobre el contenido y la secreción de insulina.....116

3.2 Efecto de la dieta sobre las variaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.....117

3.3 Efecto de la dieta sobre el patrón de actividad eléctrica y la actividad del  $\text{K}_{\text{ATP}}$ ....120

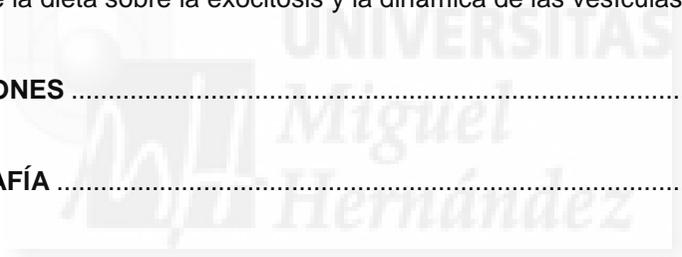
3.4 Efecto de la dieta sobre las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje.....123

3.5 Efecto de la dieta sobre las corrientes de  $\text{K}^{+}$  dependientes de voltaje .....126

3.6 Efecto de la dieta sobre la exocitosis y la dinámica de las vesículas de insulina..129

**VI. CONCLUSIONES** .....133

**VII. BIBLIOGRAFÍA** .....137



## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

<b>Fig 1.</b> Variaciones en la arquitectura de los islotes de Langerhans entre diferentes especies.....	4
<b>Fig 2.</b> Mecanismo de mantenimiento de la homeostasis de la glucosa plasmática mediante retroalimentación negativa y relaciones paracrinas entre las células que componen el islote de Langerhans. ....	5
<b>Fig 3.</b> Topología de membrana de los canales de $K^+$ .....	14
<b>Fig 4.</b> Organización estructural del $K_{ATP}$ .....	17
<b>Fig 5.</b> Diversidad funcional de los canales $K_V$ .....	21
<b>Fig 6.</b> Topología de membrana de canales $K_{Ca1}$ y relaciones funcionales con los $Ca_V$ .....	24
<b>Fig 7.</b> Organización estructural y relaciones I-V de los canales $Ca_V$ .....	31
<b>Fig 8.</b> Las células $\beta$ en islotes intactos presentan actividad eléctrica oscilatoria .....	34
<b>Fig 9.</b> Respuesta sincrónica de la actividad eléctrica, las oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$ y la secreción de insulina en islote intacto. ....	35
<b>Fig 10.</b> Acoplamiento estímulo-secreción y flujos iónicos implicados en la generación del potencial de acción en célula $\beta$ pancreática.....	38
<b>Fig 11.</b> Representación esquemática del patrón bifásico de secreción activado por un incremento de $[Glucosa]_{ext}$ .....	41
<b>Fig 12.</b> Maquinaria molecular y eventos celulares relacionados con la secreción de insulina inducida por alta $[glucosa]$ en célula $\beta$ de ratón.....	43
<b>Fig 13.</b> Relación hiperbólica entre la sensibilidad a la insulina y la secreción de la misma .....	47
<b>Fig 14.</b> Protocolos de voltaje utilizados en los registros de electrofisiología .....	67
<b>Fig 15.</b> Identificación de las células $\beta$ mediante la inactivación de la corriente de $Na^+$ en estado estacionario.....	70
<b>Fig 16.</b> Caracterización del modelo de obesidad: Aspecto, pesos corporales, insulinemias y glucemias .....	77
<b>Fig 17.</b> Caracterización del modelo de obesidad: homeostasis de la glucosa plasmática.....	78
<b>Fig 18.</b> Caracterización del modelo de obesidad: relación glucemia-insulinemia durante una GTT parcial .....	79
<b>Fig 19.</b> Secreción, contenido y expresión de insulina .....	80
<b>Fig 20.</b> Evaluación del tamaño de las células $\beta$ .....	82
<b>Fig 21.</b> Distribución de frecuencias de los tamaños de células $\beta$ individuales .....	83
<b>Fig 22.</b> Caracterización de la masa de célula $\beta$ .....	85

<b>Fig 23.</b> Alteraciones en el patrón de generación de la actividad eléctrica y en la forma del potencial de acción .....	87
<b>Fig 24.</b> Probabilidad de apertura del $K_{ATP}$ a nivel de canal unitario .....	89
<b>Fig 25.</b> Variación de $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a glucosa y KCl en islote intacto .....	90
<b>Fig 26.</b> Variación de $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a glucosa en células $\beta$ aisladas .....	91
<b>Fig 27.</b> Porcentaje de células $\beta$ aisladas en cultivo provenientes de ratones alimentados con dieta ND o HFD que muestra incrementos de $[Ca^{2+}]_i$ .....	92
<b>Fig 28.</b> Variación de $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a glucosa en célula $\beta$ individual en islote intacto .....	93
<b>Fig 29.</b> Corrientes macroscópicas de $Ca^{2+}$ en célula $\beta$ aislada .....	95
<b>Fig 30.</b> Cinética de activación e inactivación de las corrientes de $Ca^{2+}$ en célula $\beta$ aislada .....	96
<b>Fig 31.</b> Corrientes macroscópicas de $K^+$ en célula $\beta$ aislada.....	97
<b>Fig 32.</b> Relación entre las corrientes de $Ca^{2+}$ y $K^+$ en célula $\beta$ aislada.....	98
<b>Fig 33.</b> Cinética de activación e inactivación de las corrientes de $K^+$ en célula $\beta$ aislada ..	99
<b>Fig 34.</b> Respuesta exocitótica a la estimulación con pulsos despolarizantes de larga duración .....	101
<b>Fig 35.</b> Respuesta exocitótica a la estimulación con pulsos despolarizantes de corta duración .....	102
<b>Fig 36.</b> Relación entre el $\Delta C_m$ máximo y el tamaño celular .....	104
<b>Fig 37.</b> Respuesta exocitótica en los diferentes rangos de tamaños establecidos .....	105
<b>Fig 38.</b> Eficacia de la exocitosis .....	106
<b>Fig 39.</b> Relación $\Delta C_m - V_{pulso}$ .....	107
<b>Tabla 1.</b> Valores de glucemia umbrales para el diagnóstico de la DM y otras categorías de alteraciones de la glucemia .....	8
<b>Tabla 2.</b> Composición detallada de las dietas utilizadas para la alimentación de los ratones pertenecientes al grupo ND y HFD.....	57
<b>Tabla 3.</b> Porcentaje de células $\beta$ correspondiente a los rangos establecidos en función de la distribución de tamaños .....	84
<b>Tabla 4.</b> Resumen de la eficacia de la exocitosis .....	107



## AGRADECIMIENTOS

El periodo de tiempo que dura una tesis doctoral es suficiente para que nos sintamos de alguna manera partes esenciales del funcionamiento de nuestros laboratorios. No obstante, llegado el momento de finalizarla, la perspectiva permite tomar conciencia de lo transitorio de nuestro paso por ellos y de lo importante que resulta el trabajo de la gente que permanece. Por ello, creo que es justo comenzar estos agradecimientos haciendo mención a las personas que componen la Unidad de Fisiología Celular y Nutrición del Instituto de Bioingeniería. Gracias al Dr. Ángel Nadal Navajas, a la Dra. Cristina Ripoll Orts y a la Dra. Esther Fuentes Marhuenda, por hacer posible que funcione una maquinaria a veces tan difícil de mantener. Gracias en especial a mi director de tesis, el Dr. Iván Quesada, por depositar su confianza en mí y permitirme desarrollar una labor tan enriquecedora.

Esta tesis ha sido realizada en el marco del proyecto BFU2007-67607 del Ministerio de Ciencia e Innovación.

Gracias a los evaluadores externos que han revisado esta tesis doctoral.

Gracias a la Dra. Eva Tudurí y a la Dra. Mariana Todorova, que estaban cuando aterricé en el laboratorio y me ayudaron a dar los primeros pasos. Gracias a la Dra. Ana Belén Roper, hagas lo que hagas, sé que será increíble, porque no sabes hacerlo de otra forma. Gracias a la Dra. Paloma Alonso Magdalena, por ser un ejemplo de rigor y seriedad a la hora de enfrentarse al trabajo, estoy convencido de que tu forma de “hacer ciencia”, es la forma. Gracias al Dr. Sergio Soriano Úbeda, sabes mejor que nadie que durante estos 4 años el estudio de los canales iónicos se ha convertido en algo muy importante en mi vida, pero hubo un primer registro y tú estabas allí, siempre será un placer sentarme a tu lado en un *setup*. Gracias a los compañeros con los que he compartido las interminables horas en el laboratorio, al Dr. Ernesto Caballero, por las “clásicas” y las conversaciones inteligentes en los momentos adecuados, a la Dra. Laura Marroquí y la Dra. Elaine Vieira por la “magia”. Gracias a Marta por aportar “color”, eres muy buena, no dejes que nadie te convenza de lo contrario, a mi “hermana científica” Bea, hasta que llegaste al lab, no sabía como echaba de menos el carácter de mi tierra. Gracias a las

últimas en llegar, pero no por ello menos importantes, la Dra. Patricia Ñeco, Mónica y la gran “Hope”. Gracias a los técnicos de laboratorio, Diego, Salomé y la increíble Luisi, su trabajo, incluso por encima del mío, ha hecho posible que se realice esta tesis. Gracias a los que vinieron de visita y pasaron a formar parte de la familia, la Dra. Melita Vidakovic, el Dr. Alex Rafacho, Anca, Paula, Alejandra...

El primer artículo que cayó en mis manos al comenzar esta tesis era de un tal Patrik Rorsman, con el tiempo aprendí a admirarle, y trabajar en su laboratorio fue un sueño hecho realidad. Gracias al Prof. Patrik Rorsman por poner el listón tan alto y a la gente del OCDEM por hacer mi estancia en Oxford tan agradable. Gracias en especial al Dr. Matthias Braun y al Dr. Quan Zhang por compartir conmigo parte de lo que saben.

Trabajar en el proceso de generación de conocimiento es la mejor ocupación que acude a mi cabeza cuando pienso en algo en lo que merezca la pena gastar el resto de mi vida, quizá una visión un tanto radical, que a veces nos hace perder a muchos el control de las horas que pasamos en la “bancada”. Pero hay gente fuera de los muros del laboratorio que influyen de manera igual de decisiva en la construcción de nuestro “carácter científico”. En mi caso, tuve la enorme suerte de pasar gran parte de mi juventud haciendo algo que, en aquel momento, se consideraba “extraño”, con gente muy peculiar para los que no he encontrado equivalente. Gracias a mis primeros “compañeros de cordada”, en especial a Miguel, Sergi y Dani, por ser gente “transparente” y por construir una realidad paralela en la que el mundo resultaba un lugar maravilloso. Gracias también a los amigos que hoy me siguen ayudando a poner los pies en el suelo, a “Tripi”, Paula, Sergio, Dámaris, Sócrates, Maica, Quique, Casti, Vicent, Urko, Cinta, Aris... porque creo que la felicidad es conseguir vivir rodeado de buena gente, y no se me ocurren mejores personas que vosotros. Gracias a Nacho, porque del dolor también se aprende y tú me doliste mucho.

Mi afán por analizarlo todo desde un punto de vista racional me impide asumir la existencia de una “conexión cósmica” que nos una a otras personas, pero sin duda, y para mi perturbación, “la sangre” me sigue “dando tirones”. Gracias a mi familia, a mis tíos, mi primo y mi abuela, porque me vinculan al sitio de donde me siento, a mi hermana Patricia, por preocuparse toda su vida por “salvarme de los coches”, a mi hermano Sergio, porque

un día decidió que quería ser artista, a mí no me entraba en la cabeza y a él le dió igual, gracias a mi madre por...bueno, por básicamente todo, gracias a mi padre, por la exigencia que me supone hacer sentir orgullo a alguien que no está.

Aunque no nos una la sangre resulta una necesidad ampliar mi percepción del término "familia" cuando les pienso, gracias a Tino, Gloria, Antonia, Jose, Sol, Blanca, Adrián, Laura, Alba, Juan, Toñi, Héctor, Argos, Atlas, Fita, Kelev...

Me enamoró con un gesto, puede que parezca simple, pero esconde un problema complejo al que no quiero dar solución, prefiero gastar una eternidad en diseccionarlo para no dejar de disfrutar de aquel momento. Gracias a Alejandra, porque sea lo que sea, lo quiero vivir a su lado.





## ABREVIATURAS

**A:** amperios

**ADP:** *Adenosine DiPhosphate*  
(Adenosina Difosfato)

**ARN<sub>m</sub>:** *Adenosina RiboNucleótido*  
mensajero

**ATP:** *Adenosine TriPhosphate*  
(Adenosina Trifosfato)

**C:** culombios

**CaM:** Calmodulina

**Ca<sub>v</sub>:** canales de calcio dependientes de voltaje

**C<sub>m</sub>:** Capacitancia de la membrana

**DMSO:** *DiMetilSulfÓxido*

**DR:** *Delayed Rectifier* (Rectificador tardío)

**EDTA:** *Ethylene Diamine Tetraacetic Acid* (Ácido Etilendiaminotetracético)

**EGTA:** *Ethylene Glycol Tetraacetic Acid* (Ácido Etilenglicoltetracético)

**F:** faradios

**FBS:** *Fetal Serum Bovine* (Suero Fetal Bovino)

**G:** conductancia

**g:** conductancia unitaria

**GABA:** *Gamma Amino Butiric Acid* (Ácido γ-aminobutírico)

**GIP:** *Gastric Inhibitory Polypeptide* (polipéptido inhibidor gástrico)

**GK:** *Glucokinasa*

**GLP-1:** *Glucagon Like Peptide-1* (péptido similar al glucagon tipo 1)

**Hz:** Hercios

**I:** corriente

**IGF-1:** *Insulin-like Growth Factor-1* (factor de crecimiento tipo 1 similar a la insulina)

**IL-6:** *InterLeucina-6*

**I<sub>leak</sub>:** *leakage current* (corriente de fuga)

**J:** densidad de corriente

**K<sub>ATP</sub>:** canales de potasio rectificadores de entrada modulados por ATP

**K<sub>Ca</sub>:** canales de potasio activados por calcio

**K<sub>ir</sub>:** canales de potasio rectificadores de entrada

**K<sub>v</sub>:** canales de potasio dependientes de voltaje

**LDCVs:** *Large Dense Core Vesicles* (Vesículas grandes de núcleo denso)

**MCP-1:** *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (Proteína quimioatrayente de monocitos)

**ml:** mililitro

**mM:** milimolar

**MP:** membrana plasmática

**mW:** milivatios

**MΩ:** Megaohmios

**Na<sub>v</sub>**: canales de sodio dependientes de Voltaje

**NEFA**: *Non Esterified Fatty Acid* (Ácido graso no esterificado)

**nm**: nanómetros

**PBS**: *Phosphate Buffered Saline* (tampón fosfato salino)

**PC**: *Piruvato Carboxilasa*

**PKA**: *Proteína Kinasa tipo A*

**PKC**: *Proteína Kinasa tipo C*

**Q**: integral de la corriente respecto al tiempo

**RBP4**: *Retinol Binding Protein-4* (proteína de unión a retinol tipo 4)

**RE**: retículo endoplásmico

**rpm**: revoluciones por minuto

**R<sub>s</sub>**: resistencia en serie

**R<sub>sello</sub>**: resistencia del sello

**SLMVs**: *Synaptic-Like Micro-Vesicles* (microvesículas similares a las sinápticas)

**TEA**: *TetraEtilAmonio*

**TIRFM**: *Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy* (microscopía

de fluorescencia de reflexión interna total)

**TNF- $\alpha$** : *Tumour Necrosis Factor- $\alpha$*  (Factor de necrosis tumoral  $\alpha$ )

**VRAC**: *Volume Regulated Anion Channels* (Canales de aniones regulados por volumen)

**V<sub>mb</sub>**: Potencial de membrana o potencial transmembrana

**V<sub>on</sub>**: Potencial umbral de activación

**V<sub>pulso</sub>**: voltaje del pulso

**V<sub>rep</sub>**: Potencial de membrana de reposo

**V<sub>50</sub>**: Potencial al que se produce el 50% de la activación máxima

**$\lambda_{max/em}$** : longitud de onda máxima de emisión

**$\lambda_{max/ex}$** : longitud de onda máxima de excitación

**$\rho$** : densidad de carga

**$\epsilon$** : Capacitancia específica de la membrana

**$\mu$ l**: microlitro

**$\tau_m$** : constante de tiempo de activación

**$\tau_h$** : constante de tiempo de inactivación

*Nota sobre la nomenclatura: en la presente tesis se ha optado por la nomenclatura estandarizada de la IUPHAR (International Union of Pharmacology; Unión Internacional de Farmacología; <http://www.iuphar-db.org/>) para nombrar los canales iónicos.*

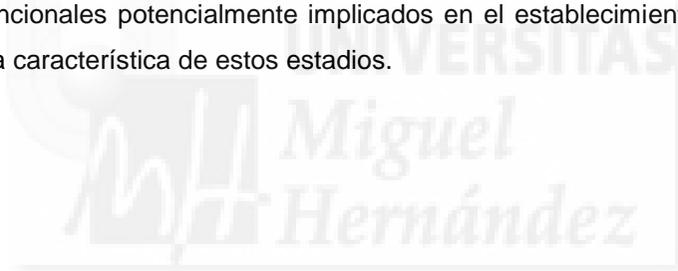
## RESUMEN

La obesidad y el riesgo de padecer diabetes de tipo II han sido relacionados de forma indiscutible en los últimos años a través de estudios clínicos y epidemiológicos. En el modelo actual para la aparición de la enfermedad en el individuo obeso, se postula que existe un estadio temprano caracterizado por una resistencia periférica a la insulina, que la célula  $\beta$  trata de compensar con un aumento de masa y/o secreción para mantener la glucemia dentro de los valores normales. Conforme la obesidad se hace más severa o se dilata en el tiempo, los requerimientos para la plasticidad del páncreas se incrementan. En el 25-30% de los individuos obesos esta situación se hace insostenible, la célula  $\beta$  entra en un proceso de disfunción y la diabetes se hace patente. Pese a que existe gran cantidad de información respecto a las adaptaciones estructurales que se producen en el contexto de la obesidad, actualmente se desconoce si la compensación inicial transcurre con una ganancia de función y los mecanismos moleculares que subyacen a la misma.

En el presente estudio, se ha establecido un modelo de obesidad inducida por dieta rica en grasas en ratones C57bl/6J hembra que presentan una sintomatología típica de estadios pre-diabéticos, para caracterizar las modificaciones funcionales y estructurales que se producen a nivel de las células pancreáticas en respuesta a esta situación. Se han utilizado técnicas "*in vivo*" para la evaluación del estado de la homeostasis de la glucosa en los ratones obesos y sus correspondientes controles, técnicas de inmunocitoquímica (ICQ) e inmunohistoquímica (IHQ) para el análisis de las alteraciones estructurales en ambos grupos, así como radioinmunoensayos (RIA), microscopía de fluorescencia con sondas sensibles a  $\text{Ca}^{2+}$ , técnicas de electrofisiología y medidas de incremento de capacitancia para profundizar en las alteraciones funcionales que se producen en los ratones obesos en comparación con sus controles.

Nuestros resultados muestran importantes alteraciones en los ratones sometidos a la dieta rica en grasa. Estructuralmente hemos comprobado que las células  $\beta$  de los ratones obesos presentan una clara hipertrofia. Los experimentos de RIA plantean la presencia de modificaciones funcionales que permiten a los ratones obesos secretar mayor cantidad de insulina. Esta alteración funcional no parece estar relacionada con efectos sobre las fases iniciales de la generación de actividad eléctrica dependientes del cierre de los canales  $\text{K}_{\text{ATP}}$ . Por el contrario, la forma del potencial de acción generado por las células  $\beta$  de los ratones obesos muestra alteraciones que pueden representar la base sobre la que explicar los incrementos de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  observados. La modulación de la forma del potencial de

acción en los ratones obesos se consigue presumiblemente a través de variaciones en las conductancias que subyacen a su generación. El análisis de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{K}^+$ , responsables respectivamente de las fases de despolarización y repolarización del potencial de acción, no permite concluir de forma definitiva que alteración es responsable de los efectos observados sobre la forma del potencial de acción. No obstante, de estos experimentos se extrae información muy interesante que apunta al efecto de la dieta HFD sobre la modulación de los canales  $\text{K}_{\text{Ca}}$ . El análisis de la dinámica vesicular en nuestro modelo indica que los ratones obesos presentan un incremento en el número de vesículas disponibles para ser liberadas en el espacio inmediatamente adyacente a la hemicapa interna de la membrana plasmática, lo cual les permite incrementar su capacidad secretora. En conjunto, los resultados de la presente tesis constituyen la primera caracterización detallada de las modificaciones funcionales que sufren las células  $\beta$  para responder a los requerimientos que plantea la existencia de la resistencia a la insulina propia de las fases iniciales de la diabetes tipo II asociada a la obesidad, y define los mecanismos funcionales potencialmente implicados en el establecimiento de la marcada hiperinsulinemia característica de estos estadios.





# **I. INTRODUCCIÓN**



## 1. PÁNCREAS ENDOCRINO. EL ISLOTE DE LANGERHANS

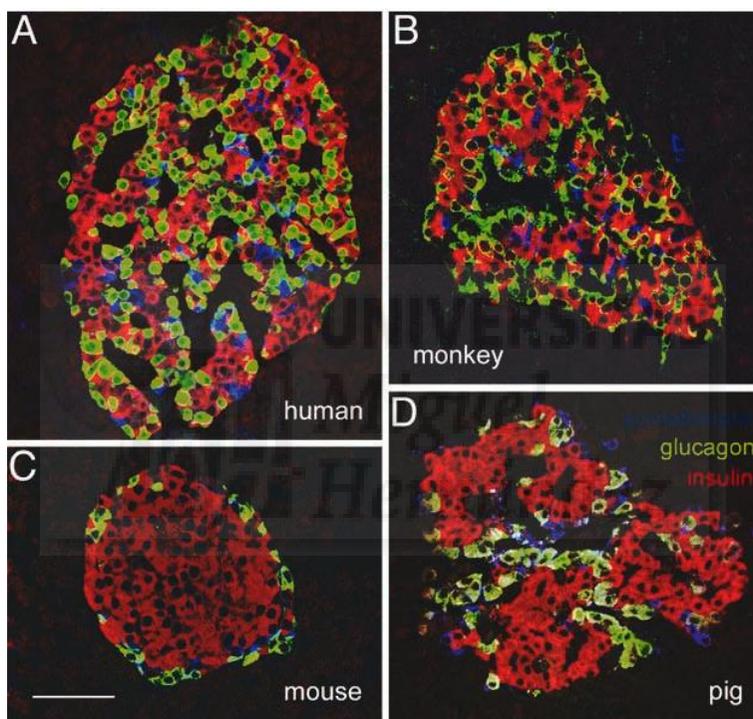
El páncreas es un órgano alojado en el espacio retroperitoneal que posee dos partes diferenciadas desde un punto de vista histológico y funcional. Por un lado, consta de una porción exocrina, constituida por células epiteliales dispuestas en estructuras esféricas u ovoides huecas denominadas acinos pancreáticos, que se encargan de la secreción de enzimas digestivas y bicarbonato al intestino delgado. Por otro lado, contiene una porción endocrina, constituida por agrupamientos de células ( $\approx 1000-3000$  células/islote) semiesféricos ( $\varnothing \approx 200-300\mu\text{m}$ ), que apenas constituye el 1-2% del órgano. Estas agrupaciones celulares se conocen como islotes de Langerhans y se encuentran distribuidas aleatoriamente en el espacio que delimita el tejido exocrino, separados de éste por una cápsula de tejido conectivo, fibras y células similares a las gliales. La función de los islotes de Langerhans es liberar las hormonas necesarias para el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa plasmática.

Los islotes están formados por distintos tipos celulares: las células  $\beta$  secretoras de insulina, las células  $\alpha$  secretoras de glucagón, las células  $\delta$  secretoras de somatostatina y las células PP (*Pancreatic Polypeptide*: Polipéptido pancreático) secretoras de polipéptido pancreático. Recientemente se ha puesto de manifiesto la existencia de un quinto tipo celular en el islote llamado  $\epsilon$  que secreta ghrelina. Aunque este último tipo celular está presente de manera destacable durante el desarrollo fetal en humanos y ratones, parece que su número decrece drásticamente tras el nacimiento (Wierup et al., 2002).

Los islotes son micro-órganos altamente vascularizados que reciben 20 veces más flujo sanguíneo por unidad de peso que la porción exocrina (Lifson et al., 1985) y en un orden determinado, que es  $\beta \rightarrow \alpha \rightarrow \delta$  (Samols et al., 1988). Los islotes también se encuentran altamente inervados por los sistemas simpático, parasimpático y sensorial, que afectan a su función y tienen importantes implicaciones en la fisiología y fisiopatología del islote (Ahren, 2000).

Es necesario remarcar las diferencias que se han descrito en cuanto a la citoarquitectura y composición porcentual de las diferentes poblaciones celulares en el islote para diferentes especies (**Fig. 1**). Refiriéndonos sólo a la especie humana y al ratón como principal modelo de experimentación, éste último posee una organización muy característica con un núcleo central de células  $\beta$  (75%) rodeado por un manto de células no- $\beta$  ( $\alpha = 19\%$ ;  $\delta = 6\%$ ), mientras que en el humano, las células  $\beta$  (54%) se encuentran entremezcladas con

los demás tipos celulares ( $\alpha = 35\%$ ;  $\delta = 11\%$ ) (Brissova et al., 2005; Cabrera et al., 2006) (**Fig. 1**). Debido a que la respuesta funcional característica del islote intacto está influenciada por el entorno que crea la comunicación intercelular  $\beta$ - $\beta$  a través de *gap-junctions* (uniones en hendidura) y las relaciones paracrinas y autocrinas que se establecen entre los tipos celulares, estas diferencias han de tener una relevancia fisiológica que sólo se ha evaluado de manera superficial (Cabrera et al., 2006).

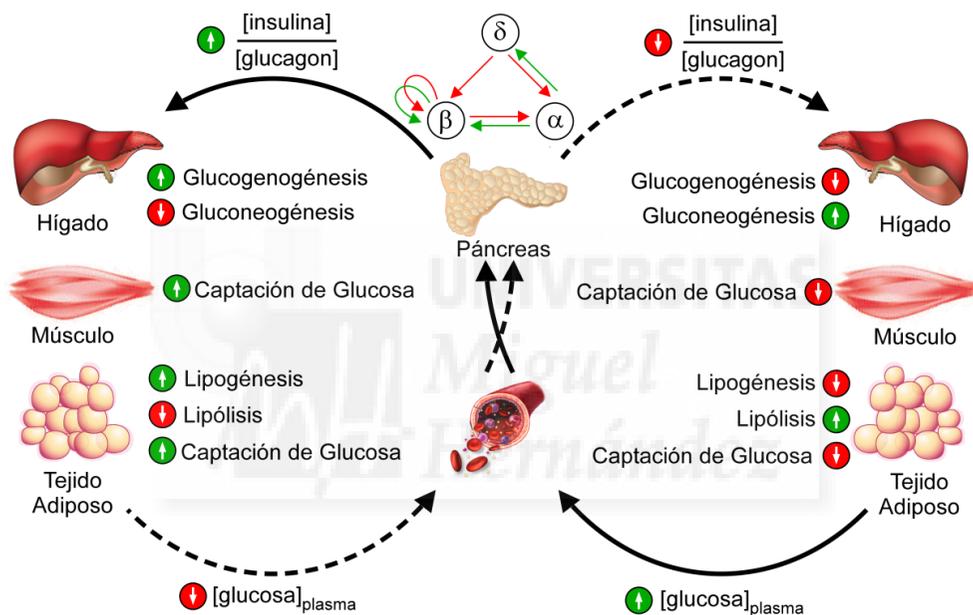


**Fig 1.** Variaciones en la arquitectura de los islotes de Langerhans entre diferentes especies. Secciones ópticas de  $\approx 1\mu\text{m}$  tomadas con microscopía confocal sobre una preparación de inmunohistoquímica con un triple marcaje anti-insulina (rojo), anti-glucagón (verde) y anti-somatostatina (azul), donde se observan las diferencias en la distribución de los principales tipos celulares que componen el islote de humano (**A**), de mono (**B**), de ratón (**C**) y de cerdo (**D**). Modificado de (Cabrera et al., 2006). Barra =  $50\mu\text{m}$ .

## 2. HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA PLASMÁTICA

Los distintos tipos celulares que componen los islotes de Langerhans liberan las hormonas especializadas en mantener la glucemia ( $[\text{glucosa}]_{\text{plasma}}$ ) dentro de unos valores

apropiados para el normal funcionamiento del organismo. Para conseguir mantener los niveles de glucemia dentro del rango adecuado, el organismo se vale principalmente de las acciones de dos hormonas liberadas por la porción endocrina del páncreas: la insulina y el glucagón. Estas dos hormonas constituyen un sistema fisiológico de homeostasis controlada por retroalimentación negativa. Otros ejemplos de este tipo de sistema son el control de la frecuencia cardíaca, de la presión arterial, del ritmo respiratorio, de la temperatura corporal o del pH de la sangre.



**Fig 2.** Mecanismo de mantenimiento de la homeostasis de la glucosa plasmática mediante retroalimentación negativa y relaciones paracrinas entre las células que componen el islote de Langerhans. Un incremento en la glucemia actúa como estímulo positivo en las células  $\beta$  pancreáticas para la liberación de insulina. La acción de la insulina sobre sus tejidos diana provoca la disminución de la glucemia, que a su vez actúa como estímulo positivo en las células  $\alpha$  pancreáticas para la secreción de glucagón. El glucagón ejerce efectos antagónicos a la insulina sobre los tejidos periféricos, aumentando de nuevo la glucemia. En la parte superior central se observa un esquema de las interacciones auto y paracrinas que se producen entre las diferentes células pancreáticas. El símbolo  $\rightarrow$  indica un efecto estimulatorio mientras que el símbolo  $\rightarrow$  indica inhibición.

El funcionamiento del sistema se basa en la acción de la insulina, que es liberada en respuesta a una glucemia elevada y actúa sobre sus tejidos diana afectando al metabolismo de carbohidratos y lípidos. Por su parte el glucagón es liberado a glucemias

bajas y actúa sobre los tejidos periféricos mediando acciones antagónicas a las de la insulina. Entre los efectos más importantes y los principales tejidos sobre los que ejerce los mismos destacan el hígado, donde la insulina estimula la ruta anabólica de almacenamiento de glucosa en forma de glucógeno (glucogénesis) e inhibe la ruta catabólica de liberación de monómeros de glucosa a partir de glucógeno (glucogenolisis), así como la ruta de biosíntesis de glucosa a partir de precursores no glucídicos (gluconeogénesis) y el tejido adiposo, donde estimula la ruta metabólica de formación de ácidos grasos y su esterificación con glicerol para formar triglicéridos (lipogénesis) e inhibe la ruta de transformación de los lípidos en ácidos grasos y glicerol para la obtención de energía (lipólisis). Además ejerce un efecto más general a nivel de múltiples tipos celulares aumentando la captación de glucosa y la ruta metabólica de oxidación de este azúcar para la obtención de energía (glucolisis). El glucagón actúa sobre los mismos tejidos pero con efectos contrarios. En el hígado estimula la glucogenolisis y la gluconeogénesis e inhibe la glucogénesis, en el tejido adiposo estimula la lipólisis y la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos para producir energía y a nivel celular disminuye la captación de glucosa (**Fig. 2**).

Pese a que estas dos hormonas se consideran las principales protagonistas del mecanismo de homeostasis, en tanto que sin ellas no existiría el proceso de retroalimentación, el funcionamiento del sistema es considerablemente más complejo, ya que se encuentra sometido a múltiples entradas que modulan tanto la liberación de las hormonas como sus efectos en los tejidos sobre los que ejercen su acción. Como ejemplo de ello citaremos brevemente la regulación auto y paracrina ejercida por los diferentes factores liberados al espacio intersticial del islote, ya que pone de manifiesto un hecho importante, la necesidad de considerar al islote de Langerhans como un solo órgano a nivel funcional. Se han descrito tanto efectos inhibitorios (Khan et al., 2001) como estimulatorios (Aspinwall et al., 1999) de la insulina sobre la propia célula  $\beta$ , así como efectos inhibitorios sobre la secreción de glucagón a través de la propia hormona (Gromada et al., 2007) o de otros factores liberados junto a ella en el proceso de secreción (GABA,  $Zn^{2+}$ ) (Franklin et al., 2005; Gromada et al., 2007). El glucagón por su parte estimula la liberación de insulina y somatostatina, mientras que esta última ejerce un efecto inhibitorio sobre la célula  $\beta$  y  $\alpha$  (Singh et al., 2007) (**Fig. 2**).

### **3. ALTERACIONES DE LA GLUCEMIA. DIABETES MELLITUS.**

La pérdida del control sobre los procesos que conservan los valores de glucemia dentro del margen adecuado tiene importantes consecuencias para la salud, siendo una de las enfermedades más comunes asociada al fallo en la función de los islotes de Langerhans la diabetes mellitus (DM).

El término DM describe un trastorno metabólico crónico de origen multifactorial caracterizado por unos niveles de glucemia elevados, con alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas, resultado de defectos en la secreción de insulina, en la acción de la insulina sobre sus tejidos diana o ambos. La DM cursa con síntomas característicos como poliuria, polidipsia, polifagia, pérdida de peso y visión borrosa. La hiperglucemia mantenida provoca alteraciones funcionales y patológicas de aparición tardía, como las retinopatías con potencial pérdida de visión, las nefropatías, que pueden progresar a fallo renal y/o las neuropatías, que llevan asociado el riesgo de aparición de múltiples alteraciones (úlceras en los pies, articulación de Charcot, amputaciones o alteraciones en la función del sistema nervioso autónomo, como la disfunción sexual). Las complicaciones agudas son asimismo peligrosas ya que las alteraciones de la osmolaridad sérica por incremento de la glucemia, como la cetoacidosis o el coma hiperosmolar no-cetósico, pueden producir el coma y la muerte del paciente en ausencia del tratamiento adecuado. Es importante señalar también que los individuos que padecen DM presentan un riesgo incrementado de padecer enfermedades cardiovasculares, cerebrovasculares y de la vasculatura periférica. Entre los procesos patológicos que se asocian con el progreso de la enfermedad y causan las alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas, se encuentran tanto aquellos que llevan a la destrucción o disfunción de las células  $\beta$  como los que provocan una resistencia de los órganos diana a la acción de la hormona.

El diagnóstico de la DM debe ser inequívoco, ya que una vez establecido que un individuo padece la enfermedad, las consecuencias de su tratamiento son considerables y de por vida. Es por ello que resulta imprescindible manejar con cautela los casos que no presentan sintomatología clara, realizando una vigilancia del paciente con pruebas de glucemia repetidas y teniendo en cuenta factores adicionales como el origen étnico, la historia familiar, la edad, la adiposidad y la presencia de desórdenes relacionados. En cuanto a los criterios diagnósticos, se establece que la presencia de síntomas característicos más una muestra de sangre casual o al azar con valores de glucemia

$\geq 200$ mg/dl son suficientes para establecer el diagnóstico. En el caso de que la muestra de sangre casual presente valores de glucemia en el límite de los niveles de corte para el diagnóstico, y que los niveles de glucemia tras al menos 8 horas de ayuno estén por debajo de 126mg/dl (7mM), se aconseja realizar un test de tolerancia oral a la glucosa (TTOG), en el que se toma una muestra de sangre en ayunas y otra a las 2 horas de una sobrecarga oral con 75g de glucosa anhidra (o 82.5g de glucosa monohidratada) diluida en 250-300ml de agua. Los criterios para la interpretación de los resultados de esta prueba se muestran en la **Tabla 1**.

Diagnóstico	glucemia en mg/dl (mM)	
<b>Diabetes Mellitus</b>	8 h de ayuno	$\geq 126$ ( $\geq 7$ )
	2 h tras SOG	$\geq 200$ ( $\geq 11.1$ )
<b>Tolerancia a la glucosa alterada</b>	8 h de ayuno	$< 126$ ( $< 7$ )
	2 h tras SOG	$\geq 140$ ( $\geq 7.8$ )
<b>Glucemia en ayuno alterada</b>	8 h de ayuno	$\geq 110$ ( $\geq 6.1$ ) y $< 126$ ( $< 7$ )
	2 h tras SOG	$< 140$ ( $< 7.8$ )

**Tabla 1.** Valores de glucemia umbrales para el diagnóstico de la DM y otras categorías de alteraciones de la glucemia que cursan con hiperglucemia mediante la realización de un test de tolerancia oral a la glucosa. SOG: *sobrecarga oral de glucosa*.

Actualmente la DM, junto con las demás categorías de hiperglucemia, se clasifican en base a diferentes parámetros (Kuzuya and Matsuda, 1997). Por un lado, se usan criterios clínicos relacionados con las fases a través de las que progresa la enfermedad y el grado de hiperglucemia asociado a cada una de ellas. Por otro lado, la comprensión cada vez mayor de las causas que originan la enfermedad ha permitido establecer una clasificación etiológica de la misma. Esta clasificación pone de manifiesto el hecho de que, para cualquier fase clínica determinada, se puede conocer el proceso patológico de base que la origina y que, para un proceso patológico concreto, el paciente puede presentar síntomas asociados con una fase clínica, progresar a través de las siguientes, permanecer en una de ellas indefinidamente o incluso revertir a una fase anterior mediante el tratamiento adecuado. Las fases clínicas que se asocian con el progreso de la DM se muestran en el siguiente esquema:

Normogluemia		Hipergluemia		
TG <sup>1</sup> Normal	Regulación de la glucosa alterada (TG alterada o GA <sup>2</sup> alterada)	Diabetes Mellitus		
		No requiere tratamiento con insulina	Insulina para control	Insulina para supervivencia
<b>Fase 1</b>	<b>Fase 2</b>	<b>Fase 3</b>	<b>Fase 4</b>	<b>Fase 5</b>

<sup>1</sup>TG: Tolerancia a la glucosa. <sup>2</sup>GA: Glucosa en ayunas

Por otro lado se establece la siguiente clasificación de los desórdenes de la glucemia en función de las causas que los provocan:

- **Tipo I:** existe un déficit prácticamente absoluto de insulina debido a la destrucción de las células  $\beta$ .
  - **Autoinmune:** incluye los casos de destrucción de células  $\beta$  debida a un proceso autoinmune.
  - **Idiopática:** incluye los casos de destrucción de células  $\beta$ , así como los casos que presentan propensión a cetoacidosis, para los que no se conoce la etiología o patogénesis.
- **Tipo II:** formas de DM asociadas a un defecto en la secreción de insulina, casi siempre acompañada con resistencia a la acción de la insulina en sus tejidos diana. Comprende tanto las formas de DM con resistencia a la insulina predominante y deficiencia de insulina relativa como aquellas que presentan un defecto de secreción predominante con o sin resistencia a la insulina.
- **Diabetes gestacional:** DM provocada por una resistencia a la insulina temporal durante el embarazo.
- **Otros tipos específicos:** defectos genéticos de la función de la célula  $\beta$ , defectos genéticos de la acción de la insulina, enfermedades del páncreas exocrino, endocrinopatías, DM inducida por fármacos o productos químicos, por infecciones, formas poco comunes de DM mediada por procesos autoinmunes y otros síndromes genéticos asociados de alguna manera con la DM.

#### 4. OBESIDAD Y DIABETES

El sobrepeso y la obesidad se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa corporal que puede tener consecuencias perjudiciales para la salud. El indicador usual para evaluar la presencia de este tipo de trastornos en un individuo es el índice de

masa corporal (IMC). Este parámetro, que se obtiene al dividir el peso del individuo (en kilogramos) por el cuadrado de su talla (en metros), presenta una relación directa con la adiposidad corporal (Gray and Fujioka, 1991). Un  $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$  indica que el individuo presenta sobrepeso, mientras que se le considera obeso con un  $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$ . Se ha comprobado que un IMC elevado está asociado con el incremento en el riesgo de padecer algunas patologías graves como enfermedades cardiovasculares, ciertos cánceres y DM de tipo II (Haslam and James, 2005). En este último caso, se calcula que alrededor del 90% de los individuos que desarrollan esta enfermedad presentan valores de  $IMC > 23 \text{ kg/m}^2$  (Stevens et al., 2001).

Según estudios recientes, el número total de individuos mayores de 20 años con DM en el año 2000 era de 171 millones y los pronósticos auguran que se alcanzarán los 366 millones de afectados en el año 2030, atendiendo sólo a factores demográficos y asumiendo que la prevalencia de obesidad se mantendrá constante (Wild et al., 2004). No obstante, el hecho de que la prevalencia de la obesidad no deje de aumentar en países desarrollados y en vías de desarrollo (en 2005 ya había en todo el mundo 1.100 millones de individuos con sobrepeso, de los cuales 320 millones eran considerados obesos, (Haslam and James, 2005)) y su manifiesta relación con la aparición de DM tipo II, hace pensar que las cifras serán considerablemente mayores (Wild et al., 2004).

Las características del modo de vida actual proporcionan la base para que se produzca la aceleración del ritmo de crecimiento de la DM. Esto, junto con el efecto sinérgico asociado al marco que proporcionan los estados de sobrepeso tan comunes en las sociedades modernas, hace que la DM se haya convertido en una de las mayores epidemias de nuestro siglo, generando no sólo un aumento de la mortalidad, sino enormes pérdidas a las administraciones derivadas del manejo de la enfermedad y sus complicaciones.

## **5. ACTIVIDAD ELÉCTRICA Y SECRECIÓN EN CÉLULAS PANCREÁTICAS**

Todas las células se encuentran rodeadas de una bicapa lipídica impermeable a moléculas cargadas y/o excesivamente grandes, denominada membrana plasmática (MP). Esta membrana contribuye a delimitar y dar forma a la célula, mantener el equilibrio entre el medio intracelular y extracelular. Además de sus funciones estáticas, contiene proteínas

especializadas en el intercambio de diversos átomos y moléculas entre el citoplasma y el medio extracelular que son responsables de sus funciones dinámicas. Tradicionalmente, se han descrito dos tipos de proteínas encargadas del transporte a través de la MP: los transportadores y los canales. Los transportadores, entre los que se encuentran la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$ , el intercambiador  $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ , o la bomba  $\text{Na}^+-\text{K}^+$ , transportan iones en contra de su gradiente de concentración a costa del consumo de energía metabólica. Los canales por el contrario son proteínas que forman poros acuosos en la membrana fosfolipídica a través de los cuales pueden fluir iones de forma pasiva a favor de su gradiente electroquímico. En función del estímulo que lleva a la apertura del canal, podemos distinguir entre dos principales tipos de canales: a) dependientes de ligando (LGC: *Ligand-Gated Channels*), cuando requieren de la unión específica de una molécula directamente al canal o a una proteína asociada a él y b) canales dependientes de voltaje (VGC: *Voltage-Gated Channels*), cuando la apertura está acoplada a un cambio en el potencial transmembrana ( $V_{mb}$ ).

La presencia de proteínas no difusibles cargadas negativamente en el interior celular, junto con la permeabilidad iónica selectiva de los canales y la acción de los transportadores, hace que la MP se encuentre polarizada, es decir, existe un exceso de carga negativa en el interior respecto al exterior (potencial de membrana o potencial transmembrana). Las células excitables responden al estímulo adecuado con una descarga transitoria y rápida del  $V_{mb}$  que se conoce como potencial de acción y que lleva codificada la información para controlar un proceso fisiológico.

Los diferentes tipos celulares pancreáticos,  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\delta$ , son células excitables. La expresión y regulación diferencial de los canales, transportadores y bombas presentes en su MP les permite mantener la misma polarizada y responder a un determinado estímulo con una alteración de las conductancias iónicas subyacentes que provoca un patrón característico de actividad eléctrica. En el caso de las células pancreáticas, la información que se codifica en su forma de disparo de potenciales es la relacionada con el control de la secreción hormonal. La secreción hormonal en el islote de Langerhans es un proceso dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , que se activa tras el incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  provocado por la entrada de este ión a través de los canales de calcio dependientes de voltaje ( $\text{Ca}_V$ ) durante las fases activas de disparo de potenciales de acción (Drews et al., 2010; Kanno et al., 2002a; Rorsman, 1997). De esta manera la regulación que ejerce la glucosa sobre la excitabilidad de las células pancreáticas permite controlar de forma precisa la secreción

hormonal en respuesta a las demandas funcionales que caracterizan los periodos de hipo e hiperglucemia (acoplamiento estímulo-secreción).

La aplicación de las modificaciones sobre la técnica de *patch-clamp* (Hamill et al., 1981) desarrollada por Erwin Neher y Bert Sackmann en los años 70 (Neher and Sakmann, 1976), permitió el conocimiento de las conductancias iónicas implicadas en la generación de la actividad eléctrica en células de pequeño tamaño como las células pancreáticas. La introducción de estas técnicas al estudio de las células pancreáticas revolucionó el entendimiento de los mecanismos que controlan la secreción de las diferentes hormonas presentes en el islote de Langerhans.

### **5.1 CANALES IÓNICOS IMPLICADOS EN LA GENERACIÓN DE LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA EN CÉLULAS PANCREÁTICAS**

Los canales iónicos son proteínas de membrana que median el flujo iónico entre el interior y el exterior celular, a través de la formación de poros acuosos que conectan ambos compartimentos. A través de su papel en la mediación de estos flujos iónicos, son las principales entidades moleculares responsables de la generación de señales eléctricas. Tanto el mantenimiento del  $V_{mb}$  en reposo ( $V_{rep}$ ) como la forma característica del potencial de acción y la dinámica en la relación de las fases activas y quiescentes en la célula  $\beta$ , están determinados por una compleja relación coordinada de movimientos iónicos a través de varios tipos de canales.

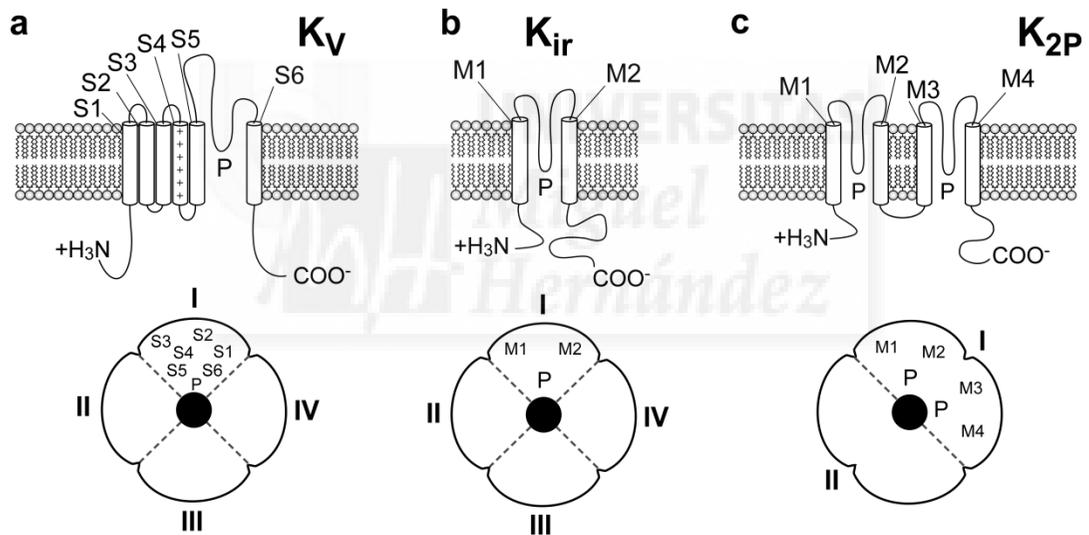
La aplicación de la técnica de *patch-clamp* ha demostrado que cada célula  $\beta$  posee múltiples copias (100-5000) de entre 10-20 canales diferentes (Ashcroft and Rorsman, 1989). Ya que discutir sobre todos ellos excedería con mucho los límites de la presente tesis, el objetivo de los siguientes apartados se limita a aportar información sobre algunos aspectos básicos de la estructura y función de los canales, que poseen especial relevancia en la generación de la actividad eléctrica y/o control de la secreción en célula  $\beta$ , para así facilitar la comprensión del acoplamiento estímulo-secreción en este tipo celular.

### 5.1.1 Canales de potasio

Los canales de  $K^+$  representan la familia más extensa y diversa de canales iónicos, a ella pertenecen los numerosos canales de  $K^+$  dependientes de voltaje ( $K_V$ ), los activados por calcio ( $K_{Ca}$ ), los rectificadores de entrada ( $K_{ir}$ ) y los de doble poro ( $K_{2P}$ ) (Gutman et al., 2005). Son un grupo de canales mucho más diverso de lo que se esperaría por el ya alto número de genes ( $> 40$  genes en humanos para  $K_V$ ), que codifican para subunidades  $\alpha$  formadoras de poro. La razón de esta diversidad descansa en diferentes factores:

- **Heteromultimerización:** en el caso de las familias  $K_{V1}$ -  $K_{V4}$  la estructura tetramérica del dominio de poro puede estar formada por el mismo miembro de una familia (homotetrámeros; Ej:  $(K_{V1.1})_4$ ) o por la combinación con otros miembros de la misma familia (heterotetrámeros; Ej:  $(K_{V1.1})_2(K_{V1.2})_2$ ;  $(K_{V1.1})_3(K_{V1.2})_1$ ; etc....). Estos heterotetrámeros dan lugar a corrientes iónicas con propiedades biofísicas considerablemente diferentes. Dentro de los  $K_{ir}$  también se dan procesos de heteromultimerización. En el caso de la familia  $K_{ir3}$ , parece ser requisito indispensable para la formación de canales funcionales; así, los canales responsables de la corriente de  $K^+$  activada por acetilcolina en el músculo atrial son complejos de  $K_{ir3.1}$  y  $K_{ir3.4}$  y también se sospecha la existencia de heteromultímeros funcionales de  $K_{ir3.1}$ ,  $K_{ir3.2}$  y  $K_{ir3.3}$  en neuronas. A diferencia de los  $K_V$ , dentro de los  $K_{ir}$ , también se dan procesos de heteromultimerización entre subunidades de familias diferentes. Los complejos entre  $K_{ir5.1}$  y  $K_{ir4.1}$  se han propuesto como sensores de  $CO_2$  en el tronco del encéfalo.
- **Subunidades “modificadoras”:** este tipo de subunidad hace referencia a productos proteicos de genes  $K_V$  que no forman canales funcionales por sí mismos, pero están presentes en heterotetrámeros modificando las propiedades del canal. Las familias  $K_{V5}$ ,  $K_{V6}$ ,  $K_{V8}$  y  $K_{V9}$  codifican este tipo de subunidades y se ha demostrado su estrecha asociación con miembros de la familia  $K_{V2}$  para formar heterotetrámeros con propiedades diferentes
- **Proteínas accesorias:** un gran número de proteínas se asocian a los tetrámeros modificando también las propiedades de las corrientes que se generan. Entre ellas se incluyen subunidades  $\beta$  (que se asocian con las familias  $K_{V1}$  y  $K_{V2}$ ), KCHIP1 ( $K_{V4}$ ), calmodulina ( $K_{V10}$ ) y minK ( $K_{V11}$ ). Los  $K_{ir}$  y los  $K_{Ca}$  también se asocian con este tipo de proteínas. El receptor de sulfonilureas (SUR) asociado a  $K_{ir6.2}$  en células  $\beta$  pancreáticas y la subunidad  $\beta$  que acompaña a los canales  $K_{Ca1.1}$  son ejemplos de ello.

- Splicing alternativo del RNAm:** La selección alternativa de intrones y exones para generar ARNm maduros diferentes (*splicing* alternativo) es un proceso que contribuye a generar variabilidad en los canales de  $K^+$ . Por un lado, los genes de la familia  $K_V1$  (a excepción de los  $K_V1.7$ ) y los  $K_V9.3$  contienen regiones intrónicas no codificantes cuyo proceso de *splicing* puede resultar importante para regular la expresión de los  $K_V$ . Además, varios miembros de las familias  $K_V3$ ,  $K_V4$ ,  $K_V6$ ,  $K_V7$ ,  $K_V9$ ,  $K_V10$  y  $K_V11$  contienen regiones codificantes formadas mezclando diferentes exones dentro del mismo gen para generar proteínas diferentes.
- Modificaciones postraduccionales:** algunos canales de  $K^+$  sufren modificaciones de este tipo como fosforilaciones, ubiquitinaciones y palmitoilaciones que modifican sus propiedades.



**Fig 3.** Topología de membrana de los canales de  $K^+$  **(a)** Topología de membrana de una subunidad formadora de poro de 6 TM característica de los canales  $K_V$  y representación esquemática de las regiones que ocupan los diferentes segmentos TM de un canal  $K_V$  en la subunidad  $\alpha$ , cuya repetición forma la estructura tetramérica del canal. Los símbolos + marcan el segmento responsable de la sensibilidad al voltaje. **(b)** igual que **(a)** pero para la subunidad de 2 TM y la estructura tetramérica  $K_{ir}$ . **(c)** igual que **(a)** pero para la subunidad de 4 TM y la estructura dimérica del  $K_{2P}$ .

Su gran diversidad hace que la clasificación de los canales de  $K^+$  muchas veces resulte compleja. En una primera aproximación, dividiremos sus miembros en 3 grupos en base a la propiedad estructural de presentar 2, 4 ó 6-7 segmentos transmembrana (TM) en la

subunidad  $\alpha$  que se repite para formar el poro permeable a  $K^+$  y en la propia arquitectura del dominio de poro:

- **Dominios de poro tetraméricos (Fig 3a, b):**

- **2 segmentos TM:** a este grupo pertenecen los  $K_{ir}$  (**Fig 3b**), dentro de los cuales encontramos 7 familias ( $K_{ir}1- K_{ir}7$ ). La función más generalizada de estos canales es el mantenimiento del  $V_{rep}$  cerca del potencial de equilibrio para el  $K^+$  y la modulación de la excitabilidad ( $K_{ir}2.1-4$ ,  $K_{ir}3.1-3$ ,  $K_{ir}7.1$ ). Algunos ejemplos de funciones específicas descritas para estos canales son la secreción y reciclado de  $K^+$  en el riñón ( $K_V1.1$  y  $K_V4.1$ ), la participación en la repolarización del potencial de acción cardíaco mediante la generación de corrientes  $I_{K1}$  ( $K_V2.1-3$ ), así como la disminución del ritmo cardíaco a través de receptores muscarínicos  $M_2$  y receptores de adenosina y somatostatina acoplados a proteína  $G_{ai}$  ( $K_V3.4$ ), la inhibición de la secreción en órganos endocrinos a través de la hiperpolarización activada por neurotransmisores ( $K_V3.1-3$ ) o la regulación de la secreción de insulina en las células  $\beta$  pancreáticas ( $K_V6.2$ ) (Kubo et al., 2005).
- **6-7 segmentos TM:** en este grupo se inscriben los  $K_V$  (**Fig 3a**), con 12 familias ( $K_V1- K_V12$ ) y los  $K_{Ca}$  con 5 familias ( $K_{Ca}1- K_{Ca}5$ ). Los  $K_V$  se encuentran ampliamente distribuidos en diferentes órganos, entre los que destacan el cerebro y el músculo, donde están relacionados con funciones como el mantenimiento del  $V_{mb}$  y la modulación de la excitabilidad ( $K_V1.1-2$ ,  $K_V1.5$ ,  $K_V2.1-2$  y  $K_V1.1$ ), y el corazón, donde median las corrientes  $I_{Kur}$  ( $K_V1.5$  y  $K_V1.7$ ),  $I_{to1}$  ( $K_V4.2$  y  $K_V4.3$ ),  $I_{Ks}$  ( $K_V7.1$ ) y  $I_{Kr}$  ( $K_V11.1$ ) responsables de la repolarización del potencial de acción cardíaco. Además, regulan el  $V_{mb}$  y la señalización de  $Ca^{2+}$  en linfocitos y oligodendrocitos ( $K_V1.3$ ), la liberación de GABA por las interneuronas gabaérgicas ( $K_V3.1$  y  $K_V3.2$ ) mediante la regulación de la duración del potencial de acción, determinan la excitabilidad subumbral de las neuronas ( $K_V7.2-3$ ,  $K_V7.5$ ) y ejercen un papel en el control de ciclo celular y la proliferación ( $K_V10.1$ ) (Gutman et al., 2005).

Entre los  $K_{Ca}$  existen canales de expresión ubicua que regulan procesos como la entrada rápida en la fase de latencia tras el disparo de cada potencial de acción en neuronas ( $K_{Ca}1.1+Ca_V2.2$ ) o la liberación de neurotransmisores en el terminal postsináptico ( $K_{Ca}1.1$ ), algunos relacionados también con los estados de latencia tras el potencial de acción ( $K_{Ca}2.1-3$ ) y otros con la regulación del volumen en los

eritrocitos, la proliferación en linfocitos y músculo liso, y la vasodilatación y angiogénesis ( $K_{Ca3.1}$ ) (Wei et al., 2005).

- **Dominios de poro diméricos (Fig 3c):**

- **4 segmentos TM:** El descubrimiento de los  $K_{2P}$  (**Fig 3c**) dotó de entidad física a la corriente de fuga ( $I_{leak}$ ) propuesta en los experimentos clásicos de Hodgkin y Huxley. La existencia de una vía específica para esta conductancia representa un mecanismo altamente regulado de control de la excitabilidad, y la necesidad de controlar este proceso hace que los  $K_{2P}$  se encuentren bajo la influencia de numerosos estímulos químicos y físicos, entre los que se incluyen la presión parcial de  $O_2$ , el pH, lípidos, fuerzas mecánicas, neurotransmisores y receptores acoplados a proteínas G (Goldstein et al., 2005). Debido a su relativamente reciente descubrimiento, no se cuenta con datos definitivos sobre la función que ejercen en procesos fisiológicos específicos más allá de los ya comentados.

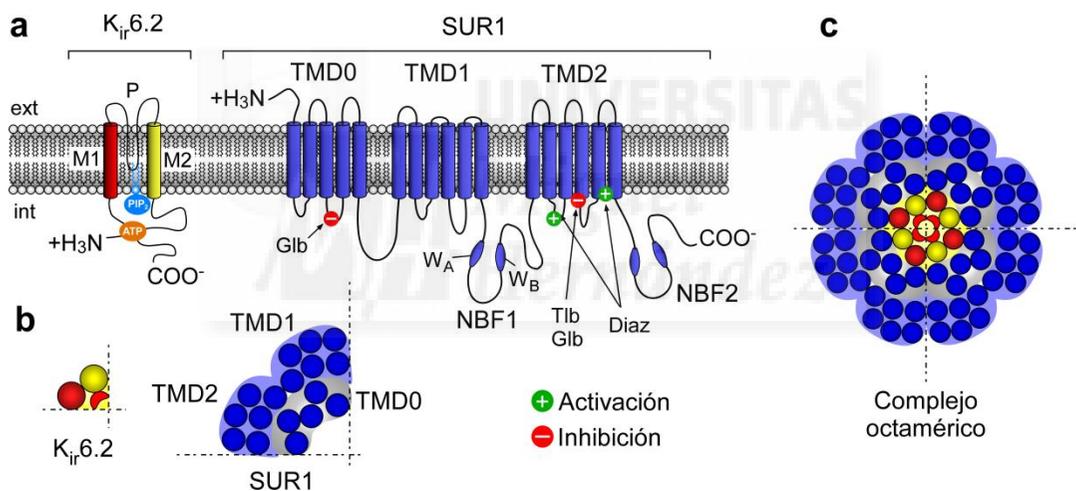
### 5.1.1.a Canales de potasio rectificadores de entrada sensibles a ATP ( $K_{ATP}$ )

Los canales  $K_{ATP}$  son una pieza esencial en múltiples tipos celulares, actuando como nexo entre el metabolismo y la excitabilidad de la célula. La introducción de técnicas de resolución de estructuras 3D y el éxito en la cristalización de algunos canales de  $K^+$  estrechamente relacionados como el KcsA, los extremos amino ( $NH_4$ ) y carboxilo ( $COOH$ ) del  $K_{ir3.1}$  y  $K_{ir2.1}$  y los homólogos procariotas  $K_{irBac1.1}$  y  $K_{irBac3.1}$  han permitido proponer un modelo consensuado para la estructura del canal que concuerda de forma bastante satisfactoria con los resultados funcionales acumulados utilizando mutagénesis dirigida (Antcliff et al., 2005; Haider et al., 2005).

En cuanto a su estructura molecular, el  $K_{ATP}$  es un complejo hetero-octamérico (4:4) compuesto por 2 tipos de proteína diferentes:  $K_{ir6.x}$  y SUR (**Fig 4a, b**), ambas divididas en varios subtipos ( $K_{ir6.1}$ ,  $K_{ir6.2}$  y SUR1, SUR2A, SUR2B) específicos de tejido.

$K_{ir6.x}$  pertenece a la familia de los canales de  $K^+$  rectificadores de entrada ( $K_{ir}$ ). La característica rectificación de entrada que comparten todos los miembros de esta familia hace referencia a su capacidad de conducir mayor cantidad de corriente de entrada a valores de  $V_m < V_{rev}$  que corriente de salida a valores de  $V_m > V_{rev}$ , incluso cuando  $[K^+]_i =$

$[K^+]_o$ . Esta relación (denominada inicialmente “anómala” en comparación a la bien conocida rectificación de salida de los  $K_v$ ) entre la resistencia de la membrana y la polaridad de la corriente está relacionada con la fuerte dependencia del voltaje que presenta el bloqueo del canal por cationes intracelulares como  $Mg^{2+}$  y poliaminas; estos cationes obstruyen el acceso del  $K^+$  al vestíbulo del conducto permeable en la cara interna del canal, afectando así a la conductividad. La afinidad que presenta el canal por estos cationes permite establecer grupos en función del grado de rectificación (Lu, 2004). En cuanto a su estructura 3D, los canales  $K_{ir}$  son tetrámeros en los que cada subunidad presenta 2 hélices transmembrana que se denominan TM1 y TM2, unidas por un bucle P (poro o H) que se inserta en la membrana para conformar el poro selectivo a  $K^+$  y 2 dominios  $NH_4$  y  $COOH$  citoplasmáticos (Bichet et al., 2003) (**Fig 4a**).



**Fig 4.** Organización estructural del  $K_{ATP}$  (**a**) Topología de membrana de las subunidades que conforman el canal  $K_{ATP}$ : se señalan las regiones de unión a los principales reguladores fisiológicos presentes en las subunidades  $K_{ir}6.2$  y SUR1, así como las regiones de unión a diferentes fármacos que influyen en la actividad del canal; (**b**) proyección en planta de la organización estructural de una subunidad de  $K_{ir}6.2$  y SUR1; (**c**) proyección en planta de la organización estructural del complejo hetero-octamérico completo. *Diaz*: Diazóxido; *Tlb*: Tolbutamida; *Glb*: Glibenclamida

SUR (Sulfonilurea Receptor) pertenece a la subfamilia C de la familia de proteínas denominada “cassetes” de unión a ATP” o proteínas ABC. Como el resto de miembros de esta familia, posee 2 dominios de 6 hélices transmembrana (TMD1 y TMD2) que albergan 2 plegamientos implicados en la unión e hidrólisis de nucleótidos de adenina (NBF1 y

NBF2). SUR contiene además un dominio  $\text{NH}_4$  terminal de 5 hélices transmembrana (TMD0) que se ha relacionado con la regulación del tráfico de  $\text{K}_{\text{ir}}6.2$  hacia la MP y la apertura del canal (Campbell et al., 2003; Nichols, 2006) (**Fig 4a**). Esta subunidad representa la diana de unión de fármacos secretagogos que inhiben la actividad del canal (tolbutamida y glibenclamida) y se usan como antidiabéticos orales. Otros fármacos activadores (diazóxido) que también se unen a esta subunidad son usados para el tratamiento de estados de hipoglucemia y/o hiperinsulinemia no asociados a defectos en el canal.

Una compleja interacción de mecanismos controla la apertura y cierre del  $\text{K}_{\text{ATP}}$ . Entre ellos destacan la unión inhibitoria de ATP cuando la capacidad metabólica de la célula es alta y la unión activadora de  $\text{PIP}_2$  cuando la capacidad metabólica de la célula es baja. En este segundo caso también interviene la unión de  $\text{Mg}^{2+}$ -ADP y  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP, con hidrólisis de éste último, a una región diferente del canal. Las medidas de la actividad del canal unitario mediante la técnica de *patch-clamp* han puesto de manifiesto una cinética característica en la que las rápidas aperturas y cierres del canal se agrupan en ráfagas separadas por periodos de inactividad.

La cinética de apertura del  $\text{K}_{\text{ATP}}$  es compleja incluso en ausencia de ligando. Las evidencias experimentales y los modelos cinéticos construidos a partir de ellas apuntan a la existencia de dos compuertas independientes en la ruta de entrada selectiva, una de cinética rápida dependiente de voltaje pero independiente de ligando que se encuentra en la región que confiere selectividad al  $\text{K}^+$  (Proks et al., 2001) y da lugar a los eventos de apertura y cierre dentro de una ráfaga y otra de cinética lenta que se regula por la unión de nucleótidos de adenina y  $\text{PIP}_2$  (Drain et al., 2004; Enkvetchakul et al., 2000) y que da lugar a los eventos entre ráfagas. Atendiendo sólo al mecanismo dependiente de ligando, se sabe que la unión a ATP (en presencia o ausencia de  $\text{Mg}^{2+}$ ) desplaza el equilibrio conformacional hacia el estado cerrado, mientras que el  $\text{PIP}_2$  lo desplaza hacia el abierto, ambos a través de su unión a los 4 sitios específicos que se forman en la interfase entre las colas citoplasmáticas de cada subunidad  $\text{K}_{\text{ir}}6.x$  (Enkvetchakul and Nichols, 2003).

El modelo cinético de regulación de la compuerta parte de las premisas de que cada sitio de unión está predominantemente ocupado por ATP o  $\text{PIP}_2$  en un momento determinado para mantener la estabilidad de las subunidades, que esta unión es mutuamente excluyente (Enkvetchakul and Nichols, 2003) y que el mantenimiento de una de las subunidades en la conformación “cerrada” es suficiente para cerrar el canal (Enkvetchakul

et al., 2000). No obstante, la implementación de estas características en el modelo predice que la probabilidad de apertura del canal en condiciones normales (valores fisiológicos de  $[Glucosa]_{plasma}$ ) sería despreciable. Esto no ocurre por la influencia que ejerce la unión de  $Mg^{2+}$ -ATP y su posterior hidrólisis a  $Mg^{2+}$ -ADP en la interfase catalítica que se forma entre NBF1 y NBF2 en el dominio intracelular de cada subunidad SUR. Esta hidrólisis provoca un cambio conformacional que anula la influencia bloqueante del ATP.

### ***Canales $K_{ATP}$ en la célula $\beta$ pancreática.***

Debido al papel central del  $K_{ATP}$  como punto de control de la excitabilidad de las células pancreáticas, a la constatación de que representa la diana de regulación de múltiples compuestos celulares y a la identificación de mutaciones específicas que afectan a su función asociadas con patologías graves como el hiperinsulinismo congénito (Sharma et al., 2000), este canal ha centrado los esfuerzos de numerosos laboratorios a lo largo de los últimos años.

Hacia 1980 se constató la existencia de canales cuyo cierre era sensible a glucosa (Ashcroft et al., 1984) y ATP (Cook and Hales, 1984) en célula  $\beta$  de rata, más tarde en célula  $\beta$  de ratón (Rorsman and Trube, 1985) y posteriormente se comprobó que el cierre de este canal y la consiguiente despolarización del  $V_{mb}$  precedían al incremento de  $[Ca^{2+}]_i$  (Arkhammar et al., 1987; Valdeolmillos et al., 1992). La identidad de los componentes del  $K_{ATP}$  presente en la membrana de las células  $\beta$  pancreáticas de ratón se comprobó mediante técnicas de clonaje de las subunidades que lo conforman, comprobando que está formado por los subtipos  $K_{ir6.2}$  y SUR1 (Aguilar-Bryan et al., 1995; Inagaki et al., 1995a; Inagaki et al., 1995b).

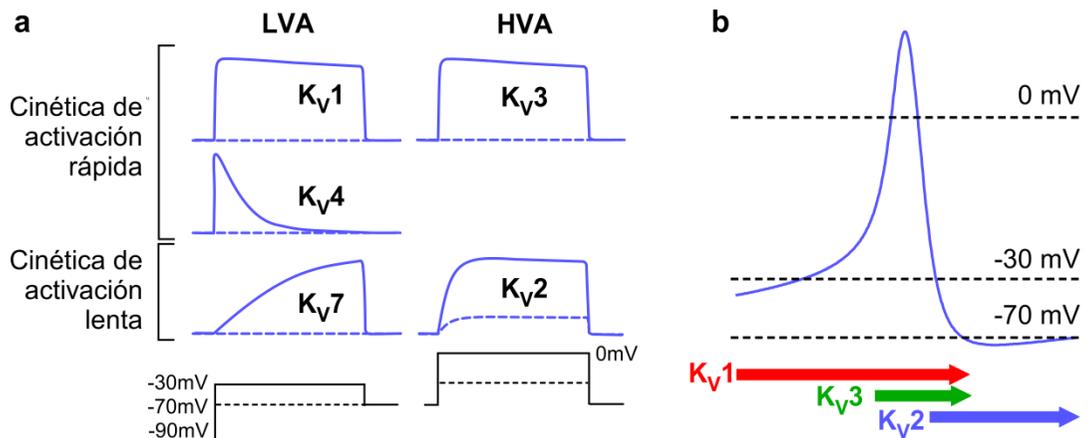
La corriente a través del  $K_{ATP}$  en configuración de *inside-out* con  $[K^+]_{int} \approx 150mM$  y  $[K^+]_{ext} \approx 5mM$  alcanza una conductancia unitaria de 20-30pS para corrientes de salida por encima de -70 mV ( $V_{rev}$  del  $K^+$ ), con  $[K^+]$  simétricas aumenta hasta 50-80pS para corrientes de entrada, en ambos casos con una I-V lineal. En configuración de *cell-attached*, en la que el mantenimiento de la estructura celular permite la acción de los cationes intracelulares, la conductancia disminuye a 13-15pS y aparece la característica rectificación con incrementos de corriente inapreciables a partir de +20mV (Ashcroft and Rorsman, 1989).

### 5.1.1.b Canales de potasio dependientes de voltaje ( $K_V$ )

La arquitectura prototípica de un canal  $K_V$  consiste en 4 subunidades que se organizan alrededor de la ruta de penetración del ión a través de la membrana. Cada una de estas subunidades contiene una estructura canónica (presente en todos los canales de  $K^+$ ) compuesta por 2 hélices transmembrana (S5 y S6) unidas por un giro (P) que contiene un fragmento de secuencia primaria muy conservado (T-V-G-Y-G). Este giro P penetra en la membrana sin atravesarla contribuyendo a formar el poro permeable. En el caso de los  $K_V$ , S5 está precedida por 4 hélices transmembrana más (S1-S4) que dotan al canal de la capacidad de detectar y responder a los cambios en el  $V_{mb}$  (**Fig 3a**) (Choe, 2002).

Atendiendo a sus propiedades electrofisiológicas en sistemas de expresión heteróloga, podemos distinguir 2 tipos de  $K_V$ : a) aquellos cuyo potencial umbral de activación ( $V_{on}$ ) es bajo, denominados LVA (*Low Voltage Activated*; Activados por voltaje bajo), entre los que encontramos miembros de las familias  $K_V1$  ( $V_{on}$  entre -60 y -40 mV),  $K_V4$  ( $V_{on}$  entre -60 y -50 mV) y  $K_V7$  ( $V_{on}$  entre -70 y -50 mV), y b)  $K_V$  cuyo  $V_{on}$  es alto, denominados HVA (*High Voltage Activated*; Activados por voltaje alto), entre los que encontramos principalmente miembros de las familias  $K_V2$  ( $V_{on}$  entre -30 y -20 mV) y  $K_V3$  ( $V_{on}$  -10 mV) (Coetzee et al., 1999; Johnston et al., 2010). Dentro de ambos grupos podemos encontrar miembros que se distinguen en función de sus cinéticas de activación e inactivación: Los  $K_V$  tipo DR (*Delayed Rectifiers*: Rectificadores tardíos) se activan con un ligero retraso tras la aplicación de un pulso despolarizante por encima de su  $V_{on}$  y una vez activados no sufren inactivación dependiente de voltaje o ésta es muy lenta (la mayoría con  $\tau_h$  en el rango de los segundos). A este grupo pertenecen los  $K_V1.1-3$ ,  $K_V1.5-7$ ,  $K_V2.1-2$ ,  $K_V3.1-2$  y los  $K_V7.1-5$ . Los  $K_V$  que median corrientes tipo A presentan una cinética de activación rápida por encima de su  $V_{on}$  y una inactivación dependiente de voltaje también rápida ( $\tau_h$  entre 10-300ms); entre los  $K_V$  que se catalogan en este grupo están los  $K_V1.4$ ,  $K_V3.3-4$  y los  $K_V4.1-3$  (**Fig 5a**). En cuanto a su relación  $I_K^+ - V_{pulsos}$  presentan una característica rectificación de salida. Todos los canales  $K_V$  comparten la característica de que la corriente que median no está influenciada por la  $[Ca^{2+}]_i$ , hecho que los distingue de los  $K_{Ca}$  (Coetzee et al., 1999; Edwards and Weston, 1995; Gutman et al., 2005).

Pese a que las propiedades biofísicas de los  $K_V$  “nativos” difieren a veces de manera significativa de las medidas en sistemas heterólogos, los rasgos distintivos de las diferentes familias son reconocibles y asignables a determinadas funciones, a veces solapadas e interrelacionadas (**Fig 5a, b**).



**Fig 5.** Diversidad funcional de los canales  $K_V$  (a) Generalización de las propiedades cinéticas de las distintas familias de  $K_V$  en células nativas. Se muestran las corrientes activadas con los protocolos inferiores para los LVA y los HVA así como su clasificación en función de la cinética de activación. Los  $K_V4$  (que median corrientes tipo A) están inactivos a  $V_{rep}$  y necesitan de una hiperpolarización previa para ser activados (b) en función de su cinética cada  $K_V$  se activa sobre una determinada fase del potencial de acción, las flechas horizontales abarcan el rango sobre el que los  $K_V$  indicados ejercen su efecto. En función de esta distribución los LVA afectarían al potencial umbral de activación del potencial de acción mientras que los HVA a la repolarización del mismo. El efecto de los  $K_V2$  está retrasado respecto a los  $K_V3$  debido a su lenta cinética de activación, pero su efecto es más duradero debido a su también lenta cinética de inactivación. *Modificado de (Johnston et al., 2010).*

### Canales $K_V$ en la célula $\beta$ pancreática.

La eliminación de la corriente repolarizante de  $K^+$  a través de los  $K_V$  (y  $K_{Ca}$ ) mediante la utilización del antagonista de amplio espectro Tetraetilamonio (TEA), aumenta la amplitud y prolonga la duración del potencial de acción (Atwater et al., 1979; Gopel et al., 1999b; Henquin, 1990), aumenta la disponibilidad de  $[Ca^{2+}]_i$  (Herrington et al., 2006; Roe et al., 1996) e incrementa la secreción de insulina (Henquin, 1990; Herrington et al., 2006) en células  $\beta$  de ratón. La interpretación de los efectos del TEA es compleja debido a su baja selectividad por un tipo específico de canal, pero la descripción de resultados similares usando bloqueantes más específicos de  $K_V$  como la 4-Aminopiridina (4-AP) (Ahren et al., 1981), el compuesto C-1 (MacDonald et al., 2002) o la guanxitoxina (Herrington et al., 2006), así como las evidencias obtenidas mediante el uso de ratones *knockout* (Jacobson et al., 2007), ponen de manifiesto el impacto funcional que ejerce la modulación de estos canales en el proceso de secreción y plantea la posibilidad de su uso como diana

terapéutica para el tratamiento de los estados hiperglucémicos que acompañan a la DM (MacDonald and Wheeler, 2003).

La presencia de una corriente de  $K^+$  de salida dependiente de voltaje con características similares a las mediadas por  $K_V$  tipo DR fue identificada hace más de 20 años en células  $\beta$  de ratón (Rorsman and Trube, 1986) y, posteriormente, de humanos (Kelly et al., 1991) y relacionada inmediatamente con el proceso de repolarización del potencial de acción en este tipo celular. Aunque en las mismas fechas se puso de manifiesto la existencia de corrientes con cinéticas y características farmacológicas similares a  $K_V$  de tipo A (Smith et al., 1989a) y estudios posteriores han confirmado la coexistencia con los DR de este tipo de corriente en células  $\beta$  de rata (MacDonald et al., 2001), líneas celulares secretoras de insulina (MacDonald et al., 2002) e incluso células  $\beta$  de humanos (Herrington et al., 2005), todavía existe controversia sobre su participación en la repolarización de la célula  $\beta$ . Estas discrepancias pueden explicarse en parte por el hecho de que la cinética y el bloqueo farmacológico de los canales  $K_V$  pueden estar muy influenciados por factores como la temperatura y el estado redox (MacDonald et al., 2003), que están a su vez relacionados con las condiciones experimentales utilizadas y también por las cada vez más patentes diferencias interespecíficas en cuanto a la expresión de canales.

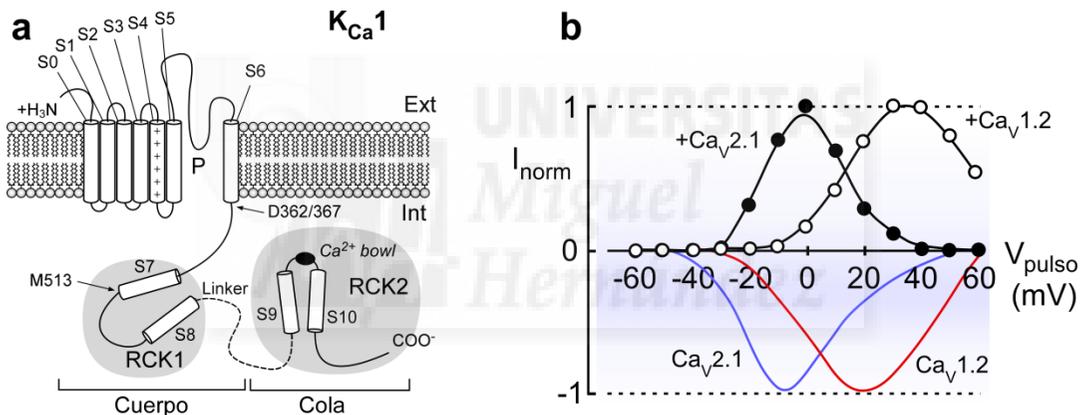
Aunque en los últimos años se ha demostrado la existencia de multitud de subunidades  $\alpha$  formadoras de poro en células secretoras de insulina, mediante técnicas de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), *western-blot* (WB) e inmunohistoquímica (IHC) (Jacobson and Philipson, 2007; MacDonald and Wheeler, 2003) resulta difícil establecer la identidad molecular de los  $K_V$  presentes en la célula  $\beta$  debido en parte a los mecanismos de aumento de la diversidad comentados (apartado 5.1.1) y a la falta de herramientas farmacológicas específicas para muchos de los canales. No obstante, la combinación de estas técnicas con análisis cinéticos, farmacológicos y de ingeniería genética, ha permitido incrementar sustancialmente nuestro conocimiento acerca de este aspecto de la fisiología de la célula  $\beta$ . Actualmente, se sabe que la corriente de  $K^+$  de salida dependiente de voltaje mediada por los  $K_V2$ , es un importante componente en la regulación del acoplamiento estímulo-secreción en células  $\beta$  de ratones (MacDonald et al., 2002) y humanos (Braun et al., 2008). La inhibición de los  $K_V2.1$  con el antagonista C-1 bloquea el  $\approx 80\%$  de la corriente de  $K^+$  de salida en células  $\beta$  de ratón; este componente sensible a C-1 se activa a un  $V_{on}$  de  $-30\text{mV}$  y se ajusta a una exponencial simple con una constante de tiempo de  $\approx 9\text{ms}$  en su activación ( $[K^+]_{in}$

=140mM; ( $[K^+]_{out}$  =4mM;  $T^a$  = 32-35°C). La aplicación de C-1 también provoca un aumento de la liberación de insulina tanto en la primera como en la segunda fase de la secreción (MacDonald et al., 2002). Otra evidencia a favor del papel predominante de la corriente  $K_{V2.1}$  en la repolarización del potencial de acción en células  $\beta$  de ratón, surge del uso de ratones en los que se ha interrumpido el gen que codifica para el  $K_{V2.1}$  con una delección de 102 nucleótidos que da lugar a una subunidad  $\alpha$  truncada (ratones  $K_{V2.1}^{-/-}$ ). En estos ratones se produce una disminución de la corriente de  $K^+$  de salida del  $\approx 80\%$ , similar a la reducción conseguida con bloqueantes específicos de  $K_V2$  (hanatoxina y stromatoxina) en sus controles (ratones  $K_{V2.1}^{+/+}$ ). Estos efectos también son comparables al analizar las alteraciones en la regulación de la forma del potencial de acción y el manejo del  $Ca^{2+}$  intracelular (Jacobson et al., 2007; Jacobson et al., 2010). Diferentes evidencias experimentales apuntan a los canales  $K_V1.4$ ,  $K_V3.4$  y  $K_V4.2$  como candidatos a mediar las corrientes resistentes a bloqueantes de  $K_V2$ . El análisis farmacológico de la contribución de canales diferentes al  $K_V2$  en ratones  $K_{V2.1}^{-/-}$  ha demostrado que esta corriente remanente es resistente a bloqueantes de  $K_V1.2$ ,  $K_V1.3$ ,  $K_V1.6$ ,  $K_V3.2$ ,  $K_V3.4$  y  $K_V11.1$ , mientras que resulta completamente inhibida por el compuesto CP339818. Se ha comprobado que el CP339818 inhibe al  $K_V1.4$  y  $K_V1.3$  (Nguyen et al., 1996), por lo que el canal  $K_V1.4$  representaría un firme candidato para la corriente no- $K_V2$ . No obstante, son muchas las dudas sobre la presencia del  $K_V1.4$  en célula  $\beta$  y la especificidad del CP339818 (Jacobson et al., 2010; MacDonald and Wheeler, 2003).

Es necesario remarcar las importantes diferencias interespecíficas que se han planteado respecto a la contribución de las conductancias repolarizantes entre células  $\beta$  de ratones y humanos. En nuestra especie, la corriente repolarizante de  $K^+$  presenta 2 componentes: uno principal sensible a Iberiotoxina (IbTx) y  $Co^{2+}$  (inhibidor de amplio espectro de  $Ca_V$ ) atribuido a  $K_{Ca}1.1$ , que discutiremos en los siguientes apartados; y otro resistente IbTx y  $Co^{2+}$ , pero sensible a stromatoxina-1 con características de  $K_V$  tipo DR ( $\tau_m > 10ms$ ;  $\tau_h > 1s$ ). Estableciendo una analogía simple, esta corriente DR podría estar mediada por el  $K_V2.1$ , ya que se expresa también en humanos y comparte las características electrofisiológicas de la corriente DR de ratones. No obstante, a nivel de RNAm los islotes humanos expresan más  $K_V2.2$  que  $K_V2.1$ . Las diferencias en la contribución funcional de las conductancias repolarizantes se hace patente también a nivel de la secreción: la inhibición farmacológica de  $K_V2$  no ejerce ningún efecto apreciable sobre la secreción de insulina en humanos, mientras que sí disminuye de forma notable la de ratones (Braun et al., 2008; Rorsman and Braun, 2012).

### 5.1.1.c Canales de potasio activados por calcio ( $K_{Ca}$ )

Los  $K_{Ca}$  se expresan en un amplio número de tipos celulares, en los que median la interacción entre el  $V_{mb}$  y la  $[Ca^{2+}]_i$ . Comprenden canales de alta conductancia ( $g = 250\text{-}300\text{pS}$  con  $[K^+]_{in} = [K^+]_{out} = 150\text{mM}$ ; (Magleby, 2003) ), en los que la activación se produce de forma sinérgica por voltaje y  $[Ca^{2+}]_i$  ( $K_{Ca1.1}$ ), canales sensibles a bajas  $[Ca^{2+}]_i$  pero insensibles a voltaje, que pueden ser de baja conductancia ( $g = 9\text{-}10\text{pS}$  con  $[K^+]_{in} = [K^+]_{out} = 150\text{mM}$ ; (Stocker, 2004)) ( $K_{Ca2.1}$ ,  $K_{Ca2.2}$  y  $K_{Ca2.3}$ ) o de conductancia intermedia ( $K_{Ca3.1}$ ) y canales de dudosa inclusión en este grupo ya que, pese a presentar homología estructural, no son sensibles a  $[Ca^{2+}]_i$  sino a  $[Na^+]_i$  y  $[Cl^-]_i$  ( $K_{Ca4.1}$ ,  $K_{Ca4.2}$ ) o a  $[OH^-]_i$  ( $K_{Ca5.1}$ ) (Wei et al., 2005).



**Fig 6.** Topología de membrana de canales  $K_{Ca1}$  y relaciones funcionales con los  $Ca_v$  **(a)** Topología de membrana de la subunidad  $\alpha$  formadora de poro del canal  $K_{Ca1}$  (BK). Entre los dos dominios RCK (RCK1 y RCK2) sombreados en gris, existe una región no conservada (*linker*) que los conecta y separa las secciones del cuerpo y la cola de la subunidad.  $Ca^{2+}$  bowl, M513 y D362/367 identifican las regiones que se han asociado con el mecanismo de regulación por  $Ca^{2+}$  en experimentos de mutagénesis. *Modificado de (Magleby, 2003).* **(b)** en la parte superior se muestra la relación entre la corriente normalizada ( $I_{norm}$ ) y el voltaje del pulso ( $V_{pulso}$ ) usado para activarla (*inside-out* en “parches” gigantes;  $V_h = -80$  mV;  $[Ca^{2+}]_{out} = 1.3\text{mM}$ ) para el  $K_{Ca1.1}$  coexpresado en ovocitos junto al  $Ca_v1.2$  (tipo L) o  $Ca_v2.1$  (tipo P/Q), en la parte inferior se muestra la misma relación pero para la corriente de  $Ca^{2+}$  a través de  $Ca_v1.2$  (—) y  $Ca_v2.1$  (—); *modificado de (Berkefeld and Fakler, 2008)*

Estructuralmente los  $K_{Ca1.1}$  presentan dominios de poro tetraméricos. Al igual que los  $K_v$  cada subunidad  $\alpha$  está compuesta por una región conservada S5-P-S6 y 4 hélices TM (S1-S4) que contienen las regiones que actúan como sensor de voltaje. Como

introducciones estructurales respecto a los  $K_V$  los  $K_{Ca1.1}$  incorporan una hélice TM más (S0) antes de S1 que hace que el dominio  $NH_4$  terminal sea extracelular y un extremo COOH terminal muy grande que contiene dos dominios RCK unidos por un *linker* de secuencia poco conservada (Magleby, 2003). En este gran dominio COOH terminal se encuentran las regiones responsables de la sensibilidad al  $Ca^{2+}$  (**Fig 6a**)

En cuanto a la dependencia de voltaje de los  $K_{Ca1.1}$ , comparten con los  $K_V$  la activación con pulsos despolarizantes por encima de su  $V_{on}$  y las relaciones  $I_K^+ - V_{pulsos}$  con rectificación de salida, pero a diferencia de ellos, la corriente a través de los  $K_{Ca1.1}$  sí es dependiente de la  $[Ca^{2+}]_i$  (Edwards and Weston, 1995). La implementación de los resultados funcionales y estructurales en modelos cinéticos ha demostrado que los dos estímulos ( $[Ca^{2+}]_i$  y Voltaje) convergen para regular la transición abierto-cerrado de los  $K_{Ca1.1}$  a través de mecanismos alostéricos diferentes, por lo que ambos pueden activar y/o modular la actividad del canal. Como regla general se puede establecer que la  $V_{50}$  (despolarización necesaria para alcanzar el 50% de la apertura máxima) se desplaza hacia valores más negativos conforme aumenta la  $[Ca^{2+}]_i$  y que conforme se aplican pulsos más despolarizantes, el canal se hace más sensible a  $Ca^{2+}$  y la  $[Ca^{2+}]_i$  necesaria para alcanzar una apertura equivalente disminuye (Magleby, 2003).

La activación de los canales  $K_{Ca1.1}$  a potenciales  $\leq 20mV$  requiere valores de  $[Ca^{2+}]_i \geq 10\mu M$ . En muchos tipos celulares estos niveles de  $[Ca^{2+}]_i$  están restringidos a los denominados micro/nanodominios de calcio que se forman alrededor de las zonas de entrada de  $Ca^{2+}$  al citosol, bien desde el exterior a través de los  $Ca_V$  tras una despolarización o bien desde los depósitos intracelulares. Recientemente se ha demostrado que los tetrámeros de subunidades  $\alpha$  de los  $K_{Ca1.1}$  son capaces de ensamblarse en complejos macromoleculares con algunas familias de  $Ca_V$ , (macrocomplejos  $K_{Ca1.1}-Ca_V$ ), colocando ambos canales a distancia de nanómetros el uno del otro y proporcionando niveles de  $[Ca^{2+}]_i$  suficientes para activarlos a potenciales fisiológicos (Berkefeld et al., 2006). La dependencia de voltaje y el curso temporal de las corrientes de  $K^+$  que se circunscriben a los macrocomplejos  $K_{Ca1.1}-Ca_V$  están en gran parte influenciadas por las propiedades de los  $Ca_V$  (Berkefeld and Fakler, 2008) (**Fig 6b**). Estos resultados establecen la importancia de la composición molecular de estos macrocomplejos y ponen de manifiesto cómo la respuesta repolarizante de los  $K_{Ca1.1}$  se puede adaptar a los requerimientos de un subtipo celular específico mediante la asociación con diferentes subunidades de  $Ca_V$ .

La estructura de los  $K_{Ca}$  de baja conductancia ( $K_{Ca2.1}$ ,  $K_{Ca2.2}$  y  $K_{Ca2.3}$ ) es también muy similar a la de los  $K_V$ , presentan la misma topología de membrana con una región formadora de poro S5-P-S6 y 4 hélices TM (S1-S4) previas a S5. No obstante, el segmento S4 que confiere la sensibilidad al voltaje en los  $K_V$ , muestra profundas modificaciones en su secuencia primaria. Los  $K_{Ca2}$  sólo tienen dos de los 7 aminoácidos con carga positiva presentes en la S4 de los  $K_V$ , y sólo uno de ellos corresponde a los 4 residuos de Arginina que portan las “cargas de compuerta” en los  $K_V$ . Estas diferencias se han señalado como base para la independencia del voltaje que muestran estos canales. Otro rasgo distintivo de los  $K_{Ca2}$  (y  $K_{Ca3}$ ) es que su activación no se produce por la unión directa del  $Ca^{2+}$ , ya que en la estructura primaria de sus subunidades no existe ningún motivo de unión a este ión. Por el contrario, se ha demostrado que la sensibilidad al  $Ca^{2+}$  surge de la íntima asociación de cada una de las 4 subunidades  $\alpha$  a la calmodulina (CaM) a través de un dominio de unión adyacente a S6 (Stocker, 2004).

Los  $K_{Ca2}$  representan sensores de  $Ca^{2+}$  de alta sensibilidad (50% de activación a  $[Ca^{2+}]_i = 300-700nM$ ) y rapidez (constantes de tiempo de activación entre 5-15 ms), ideales para acoplar cambios de  $[Ca^{2+}]_i$  con variaciones del  $V_{mb}$ . Pese a ser independientes de voltaje, sus relaciones  $I_K^+ - V_{pulsio}$  no son lineales sino que presentan una rectificación de entrada debido al efecto de cationes divalentes intracelulares. Esto pone de manifiesto el hecho de que, a voltajes positivos, el  $Ca^{2+}$  no sólo activa sino que bloquea el canal de forma interdependiente con el  $Mg^{2+}$  (que no activa pero sí bloquea). De esta forma, las variaciones dinámicas de la  $[Ca^{2+}]_{in}$  junto con el efecto bloqueante del  $Mg^{2+}$  y otros cationes divalentes intracelulares, modulan la corriente a través de los  $K_{Ca2}$  (Stocker, 2004).

Las corrientes a través de los  $K_{Ca2}$  también están acopladas a la activación de los  $Ca_V$  de manera específica en diferentes tipos celulares. Registros de *patch-clamp* en configuración de *cell-attached* en el soma de neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo, donde se registran canales  $Ca_V$  y  $K_{Ca2}$  simultáneamente en el mismo “parche”, han permitido constatar que ambos canales están acoplados funcionalmente y se encuentran a una distancia de 50-150nm (Marrion and Tavalin, 1998).

La introducción de las conductancias a  $K^+$  mediadas por los  $K_{Ca}$  permite la incorporación de patrones de disparo adicionales en las células que los contienen. Tanto los canales  $K_{Ca1}$  como  $K_{Ca2}$  se han relacionado con efectos sobre la modulación de la frecuencia de disparo y la transición desde un patrón de disparo de potenciales de acción continuo hacia

un patrón de disparo a ráfagas separadas por periodos de inactividad a potenciales negativos en diversos tipos celulares entre los que se incluye la célula  $\beta$  (Ammala et al., 1991; Hille, 1984; Stocker, 2004).

### ***Canales $K_{Ca}$ en la célula $\beta$ pancreática.***

La contribución de los  $K_{Ca}$  en la corriente repolarizante de  $K^+$  en célula  $\beta$  ha sido motivo de controversia durante años. Pese a que la presencia de una corriente de potasio de salida con características compatibles con las corrientes  $K_{Ca}$  (transitoria de activación rápida y dependiente de  $Ca^{2+}$ ) fue descrita en célula  $\beta$  de ratón hace más de 20 años (Satin et al., 1989; Smith et al., 1990b), su contribución a la generación de la actividad eléctrica se puso en duda tras comprobar que la Caribdotoxina (antagonista de  $K_{Ca1.1}$  extraído del veneno de escorpión) aparentemente no ejercía ningún efecto sobre la misma (Kukuljan et al., 1991). Investigaciones posteriores han llevado a la aceptación generalizada de que la corriente de  $K^+$  de salida dependiente de voltaje en la célula  $\beta$  de ratón está formada por dos componentes, uno independiente de  $Ca^{2+}$  a través de los  $K_V$  que representa  $\approx 80-85\%$  de la corriente total y otro dependiente de  $Ca^{2+}$  a través de los  $K_{Ca}$  que representa  $\approx 15-20\%$  (Herrington, 2007; MacDonald et al., 2002; Smith et al., 1990b). No obstante, la participación de esta última conductancia en la corriente responsable de la repolarización del potencial de acción sigue siendo bastante enigmática. Recientemente se ha reanalizado el efecto de los canales  $K_{Ca}$  a partir de la utilización de ratones  $K_V2.1^{-/-}$ . La constatación de que estos ratones continúan pudiendo repolarizar el potencial de acción y la consiguiente caracterización farmacológica de la corriente residual a través de canales diferentes del  $K_V$  (Jacobson et al., 2007; Jacobson et al., 2010), ha llevado a plantear una modificación del modelo de generación del potencial de acción en célula  $\beta$  de ratón que implica la incorporación de un papel predominante para el  $K_{Ca1.1}$  en la fase de repolarización (Houamed et al., 2010) (ver apartado 5.3).

Independientemente de su participación en el proceso de repolarización, uno de los efectos clásicos atribuidos a los  $K_{Ca}$  en célula  $\beta$  sobre los que más se ha investigado es su papel en la terminación de las ráfagas de potenciales por la activación cíclica de este canal producida por las oscilaciones de  $[Ca^{2+}]_i$  (Atwater et al., 1979; Sherman, 1996). Esta función "marcapasos" ha sido tradicionalmente atribuida a canales  $K_{Ca}$  en otros tipos celulares (Hille, 1984) pero en el caso de la célula  $\beta$  resulta complejo asignar una

identidad molecular a la conductancia responsable del proceso. La aplicación de registros de *perforated-patch* sobre células  $\beta$  en la superficie de islotes intactos ha permitido identificar una pequeña corriente de salida de  $K^+$  ( $K_{slow}$ ) que presenta características cinéticas ( $\tau_h \approx 6.5s$ ) compatibles con el curso temporal de los periodos activos y quiescentes característicos del disparo de potenciales de acción en células  $\beta$  de islotes intactos a  $[Glucosa]_{ext}$  intermedias (Gopel et al., 1999b). Pese a estar regulada por  $[Ca^{2+}]_i$ , la corriente  $K_{slow}$  no parece estar mediada por  $K_{Ca1.1}$  ya que es insensible a caribdotoxina y altas [TEA] (Goforth et al., 2002; Gopel et al., 1999b). Otro candidato plausible a mediar dicha corriente es el  $K_{Ca2}$  que se expresa en células  $\beta$  y regula la secreción de insulina (Tamarina et al., 2003), no obstante esta hipótesis plantea el problema de explicar porque la actividad eléctrica oscilatoria no es sensible al antagonista canónico de canales  $K_{Ca2}$  (apamina) en otros tipos celulares (Ammala et al., 1993a; Goforth et al., 2002; Gopel et al., 1999b). Por último algunos autores han sugerido que la corriente  $K_{slow}$  representa una combinación de la contribución del  $K_{ATP}$  y el  $K_{Ca}$  (Kanno et al., 2002b).

Por último es necesario señalar que a diferencia de las células  $\beta$  de ratón la corriente a través de los  $K_{Ca1.1}$  parece jugar un papel incuestionable en la repolarización del potencial de acción en células  $\beta$  de humanos. Tras un pulso estimulador a +10 mV, la corriente sensible a IbTx ( $K_{Ca1.1}$ ), que supone el  $\approx 30\%$  de la amplitud de corriente de  $K^+$  total, se activa con una constantes de tiempo de activación ( $\tau_m$ ) de  $\approx 2ms$  y se inactiva rápidamente con una constante de tiempo de inactivación ( $\tau_h$ ) de  $\approx 40ms$ . Por su parte la corriente resistente a IbTx ( $K_V2$ ) se activa con una  $\tau_m$  de  $> 10ms$  y se inactiva con una  $\tau_h$  de  $\approx 2s$ . Las características cinéticas de ambos componentes podrían explicar el efecto que ejerce su bloqueo específico sobre la forma del potencial de acción. La IbTx (bloquea los  $K_{Ca1.1}$ ) aumenta la amplitud de las espigas mientras que la Stromatoxina-1 (bloquea los  $K_V$  tipo DR) ensancha las espigas con un efecto mínimo sobre la amplitud de las mismas (en ratones). En el caso de la células  $\beta$  humanas la inhibición específica de estas conductancias tiene una correlación funcional decisiva con el proceso de secreción, la IbTx aumenta la secreción de insulina un  $\approx 70\%$  (en presencia de Tlb) mientras que la secreción a 6 o 20mM Glucosa en presencia de Stromatoxina-1 no muestra ninguna alteración significativa (Braun et al., 2008; Rorsman and Braun, 2012). Las células  $\beta$  humanas también expresan canales  $K_{Ca2}$  cuyo bloqueo incrementa la secreción de insulina, efecto asociado a la despolarización e incremento de la frecuencia de disparo de potenciales de acción (Rorsman and Braun, 2012).

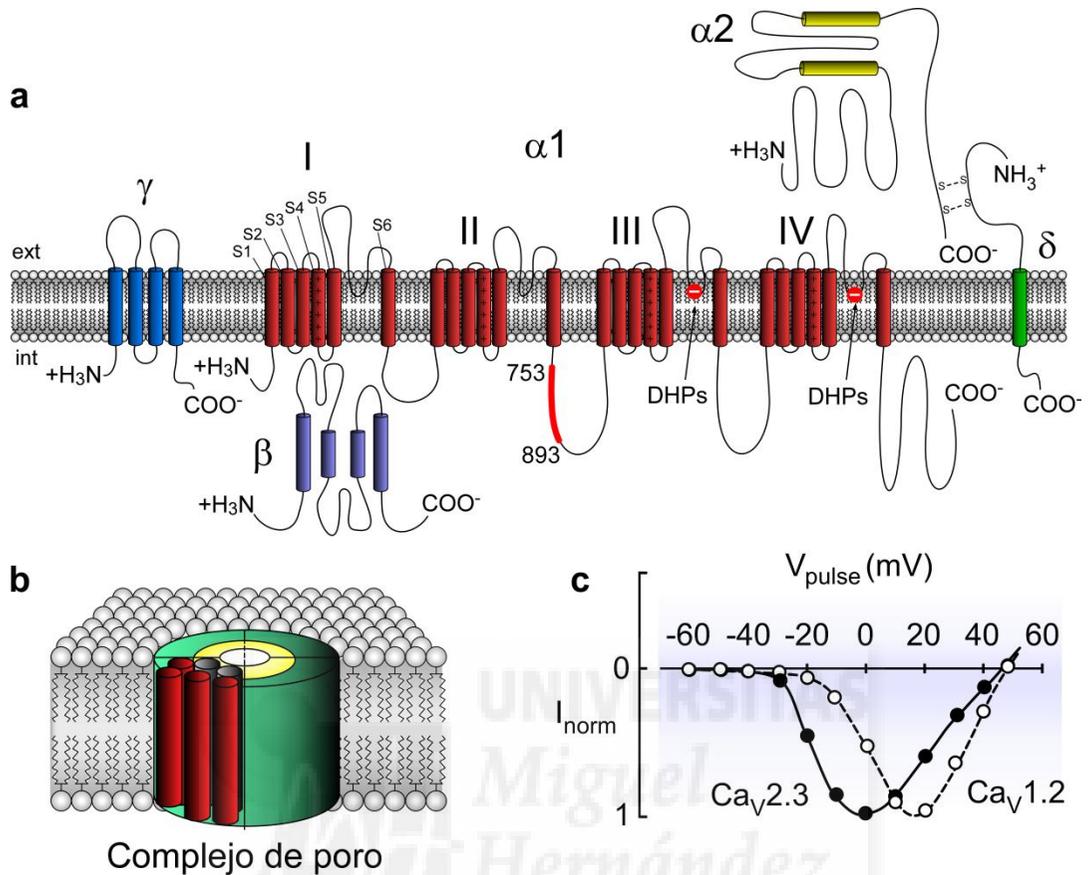
### 5.1.2 Canales de calcio dependientes de voltaje (Ca<sub>v</sub>)

El ión Ca<sup>2+</sup> ejerce una acción imprescindible como segundo mensajero en la regulación de procesos fisiológicos como la contracción muscular, la excitación neuronal o la secreción de neurotransmisores y hormonas. Los Ca<sub>v</sub> son moléculas complejas de estructura heteroligomérica que median la entrada de Ca<sup>2+</sup> al interior celular cuando el potencial transmembrana alcanza su V<sub>on</sub>; de esta manera, conectan las señales eléctricas que tienen lugar en la MP con eventos intracelulares. Los Ca<sub>v</sub> están formados por diferentes subunidades denominadas α<sub>1</sub>, α<sub>2</sub>δ, β y γ (**Fig 7a**).

La subunidad α<sub>1</sub> está formada por 4 dominios homólogos (I-IV) de 6 segmentos transmembrana (S1-S6) unidos por colas citoplasmáticas, y en ella se localizan las regiones responsables de la sensibilidad al voltaje (5-6 argininas y lisinas cargadas positivamente en S4), de la formación del poro selectivo a Ca<sup>2+</sup> (giros P que unen S5 y S6) y la mayoría de las regiones conocidas de unión a fármacos, toxinas y segundos mensajeros (Catterall et al., 2005) (**Fig 7a y b**). La principal fuente de diversidad en las propiedades electrofisiológicas y farmacológicas de los Ca<sub>v</sub> surge de la existencia de múltiples subunidades α<sub>1</sub>. Cuando las diferentes subunidades α<sub>1</sub> se expresan en sistemas de expresión heteróloga (ovocitos de *Xenopus*, HEK etc...), muestran unas características de activación e inactivación dependiente de voltaje, así como una regulación por activadores e inhibidores que son cuantitativamente diferente a las de células nativas debido a que la actividad del poro está modulada por el resto de subunidades. La estructura de la subunidad α<sub>2</sub>δ se conforma tras el procesamiento postraduccional de una única proteína, que se corta para dar 2 fragmentos (α<sub>2</sub> y δ) que permanecen unidos por un puente disulfuro. La porción δ ancla a α<sub>2</sub> a la MP a través de un segmento transmembrana y contiene regiones en su secuencia implicadas en el desplazamiento del V<sub>on</sub> y en la modulación de la cinética de inactivación (Catterall, 2011). La porción α<sub>2</sub> es puramente extracelular y contiene los elementos estructurales requeridos para la estimulación del canal (Catterall, 2011) (**Fig 7a**). La subunidad β intracelular contiene dominios SH3 (SRC Homology 3) y GK similares a las proteínas MAGUK (Membrane Associated Guanylate Kinase: Guanilato quinasa de membrana), y su dominio GK se asocia a α<sub>1</sub> a través del giro citoplasmático de unión entre I-II (Catterall, 2011) (**Fig 7a**). La subunidad β modula las propiedades electrofisiológicas y farmacológicas del Ca<sub>v</sub>, su efecto mayoritario es acelerar la activación e inactivación y desplazar la curva de inactivación en estado estacionario hacia V<sub>mb</sub> más negativos (Catterall, 2011). También se

ha asociado con el equilibrio del tráfico de la subunidad  $\alpha_1$  desde el retículo endoplasmático hacia la membrana, regulando así la densidad de corriente (Bichet et al., 2000). La subunidad  $\gamma$  es una proteína integral de membrana que presenta 4 hélices transmembrana y dominios  $\text{NH}_4$  y  $\text{COOH}$  intracelulares, los giros de unión extracelulares representan potenciales sitios de N-glicosilación (Catterall, 2011) (**Fig 7a**).

Los  $\text{Ca}_v$  se clasifican en función de sus propiedades biofísicas y farmacológicas. En un primer momento las evidencias experimentales de que algunos  $\text{Ca}_v$  necesitaban pequeñas despolarizaciones para activarse, mientras que otros necesitaban de saltos de voltaje relativamente grandes llevo a dividirlos en dos grandes grupos, los HVA (*High Voltage Activated*) que presentan un  $V_{on} > -70\text{mV}$  y los LVA (*Low Voltage Activated*) que presentan un  $V_{on} > -20\text{mV}$ . Los LVA también son conocidos como canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo T (*Transient*) por su característica conductancia unitaria de pequeña amplitud y su cinética de inactivación rápida y engloban la subfamilia  $\text{Ca}_v3$  que expresan las subunidades  $\alpha_{1G}$  ( $\text{Ca}_v3.1$ ),  $\alpha_{1H}$  ( $\text{Ca}_v3.2$ ) y  $\alpha_{1I}$  ( $\text{Ca}_v3.3$ ). Los principales representantes del grupo HVA son los canales de la subfamilia  $\text{Ca}_v1$  que expresan las subunidades  $\alpha_{1S}$  ( $\text{Ca}_v1.1$ ),  $\alpha_{1C}$  ( $\text{Ca}_v1.2$ ; **Fig 7c**),  $\alpha_{1D}$  ( $\text{Ca}_v1.3$ ) y  $\alpha_{1F}$  ( $\text{Ca}_v1.4$ ). Los  $\text{Ca}_v1$  también son denominados como canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L (*Long-lasting*) porque, al contrario que los tipo T, presentan conductancias unitarias de mayor amplitud y una cinética de inactivación lenta. Todos los  $\text{Ca}_v$  de tipo L son sensibles a las dihidropiridinas (DHPs), una familia de fármacos orgánicos que contiene tanto bloqueantes (nifedipina, nisoldipina, isradipina etc....) como activadores (BayK8644) del canal. En los años 80 se identificaron nuevos tipos de  $\text{Ca}_v$  en neuronas que presentaban valores de conductancia unitaria entre los tipo T y tipo L y se nombraron como tipo N (*Neuronal*), posteriormente se comprobó que los canales tipo N podían ser subdivididos en función de su sensibilidad a toxinas peptídicas provenientes de arañas o serpientes marinas. Los canales sensibles a  $\omega$ -conotoxina GVIA, que engloban los canales que expresan la subunidad  $\alpha_{1B}$  ( $\text{Ca}_v2.2$ ), mantuvieron la nomenclatura de tipo N, mientras que los sensibles a  $\omega$ -Agatoxina IVA se renombraron como tipo P/Q (*Purkinje*). Estos últimos engloban los canales que expresan la subunidad  $\alpha_{1A}$  ( $\text{Ca}_v2.1$ ). Por último los canales resistentes a ambas toxinas, a los que pertenecen los que expresan la subunidad  $\alpha_{1E}$  ( $\text{Ca}_v2.3$ ; **Fig 7c**), se nombraron como tipo R (*Resistant*).



**Fig 7.** Organización estructural y relaciones I-V de los canales  $\text{Ca}_V$  **(a)** Topología de membrana de las subunidades que conforman el canal  $\text{Ca}_V$  donde se observan los 4 dominios (I-IV) de la subunidad formadora del poro ( $\alpha_1$ ) con sus 6 hélices transmembrana (S1-S6), así como las subunidades accesorias asociadas a la modulación de la actividad del canal ( $\alpha_2\delta$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ). La sección desde 753-893aa ("*synprint*") marcada en rojo en el giro citoplasmático entre los dominios II y III corresponde a la zona de unión a la maquinaria de exocitosis. **(b)** Proyección en 3D de la organización estructural de los 4 dominios (I-IV) para formar el poro selectivo. **(c)** Relación entre la corriente normalizada ( $I_{\text{norm}}$ ) y el voltaje del pulso ( $V_{\text{pulso}}$ ) usado para activarla para los principales tipos de  $\text{Ca}_V$  presente en célula  $\beta$  de ratón ( $\text{Ca}_V1.2$ : tipo L;  $\text{Ca}_V2.3$ : tipo R). *DHPs*: *Dihidropiridinas*.

### Canales $\text{Ca}_V$ en la célula $\beta$ pancreática

La generación de potenciales de acción en células  $\beta$  pancreáticas de roedores es altamente dependiente de la activación de la conductancia al  $\text{Ca}^{2+}$  (Dean and Matthews, 1970; Meissner and Schmelz, 1974). Tras la demostración de esta dependencia se consiguió registrar la activación de un canal dependiente de voltaje implicado en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en células  $\beta$  de ratones (Rorsman and Trube, 1986) y humanos (Kelly et

al., 1991) y posteriormente se identificaron transcritos del  $\text{Ca}_v$  HVA-tipo L en estas especies (Seino et al., 1992).

Aunque se ha identificado otros subtipos de  $\text{Ca}_v$  en células secretoras de insulina de diferentes especies y líneas celulares su contribución a la regulación de la secreción de insulina requiere de más investigación y el subtipo HVA-tipo L se acepta actualmente como principal  $\text{Ca}_v$  responsable de la regulación de la secreción en célula  $\beta$  (Gilon et al., 1997; Satin, 2000; Schulla et al., 2003). Atendiendo específicamente a las células  $\beta$  de ratón el  $\approx 50\%$  de la corriente macroscópica en registros de *whole-cell* presenta propiedades farmacológicas típicas de  $\text{Ca}_v$  HVA-tipo L (se bloquea por nifedipina e isradipina y se activa por BayK8644), el  $\approx 60\%$  de la corriente resistente a antagonistas de  $\text{Ca}_v$  HVA-tipo L es sensible al bloqueo por SNX482, compuesto que bloquea los  $\text{Ca}_v$  HVA-tipo R y el  $\approx 97\%$  es bloqueado por la adición de una mezcla de isradipina, SNX482,  $\omega$ -conotoxina GVIA y  $\omega$ -Agatoxina IVA (Schulla et al., 2003). Respecto a los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  HVA-tipo L se ha comprobado la presencia de subunidades formadoras de poro tipo  $\alpha_{1C}$  ( $\text{Ca}_v1.2$ ) y  $\alpha_{1D}$  ( $\text{Ca}_v1.3$ ) (Yamada et al., 1995; Yang et al., 1999). No obstante, el uso de ratones modificados genéticamente defectivos para el gen que codifica la subunidad  $\alpha_{1C}$  específicamente en célula  $\beta$  (ratones  $\text{Ca}_v1.2^{-/-}$ ) o defectivos para el gen que codifica la subunidad  $\alpha_{1D}$  (ratones  $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ ) ha llevado a establecer que el subtipo  $\text{Ca}_v1.2$  es el principal  $\text{Ca}_v$  HVA-tipo L en esta especie (Barg et al., 2001; Jing et al., 2005; Schulla et al., 2003).

El ajuste de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  a una cinética de Hodgkin y Huxley tipo  $m^2$  permite calcular las constantes de tiempo de activación ( $\tau_m$ ) que alcanzan valores de  $< 1\text{ms}$  tras pulsos despolarizantes por encima de  $-30\text{mV}$  tanto en ratones como en humanos (Braun et al., 2008; Gopel et al., 1999a). También en ambas especies la corriente evocada por un pulso mantenido presenta una cinética de inactivación de curso bifásico con un componente inicial rápido y otro secundario más lento. Los valores concretos de las constantes de tiempo de inactivación ( $\tau_{h1}$  y  $\tau_{h2}$ ) difieren en función de las condiciones experimentales y de la especie, en registros de *perforated-patch* sobre células  $\beta$  en la superficie de islotes intactos  $\tau_{h1} \approx 2\text{ms}$  y  $\tau_{h2} \approx 400\text{ms}$  ( $V_{\text{pulso}} = -10\text{mV}$ ) (Rorsman et al., 2011b) mientras que en registros de *whole-cell* en células  $\beta$  humanas aisladas  $\tau_{h1} \approx 7\text{ms}$  y  $\tau_{h2} \approx 70\text{ms}$  ( $V_{\text{pulso}} = 0\text{mV}$ ) (Braun et al., 2008). En el caso de las células  $\beta$  de ratón se ha comprobado que el componente rápido de la inactivación es dependiente de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Esto se demuestra claramente por el hecho de que la sustitución de  $\text{Ca}^{2+}$  por  $\text{Ba}^{2+}$  (ión al que

también es permeable el  $\text{Ca}_v$ ) en la solución extracelular hace desaparecer la primera fase de la inactivación, quedando solo el componente más lento y mantenido dependiente de voltaje (Plant, 1988; Rorsman et al., 2011b).

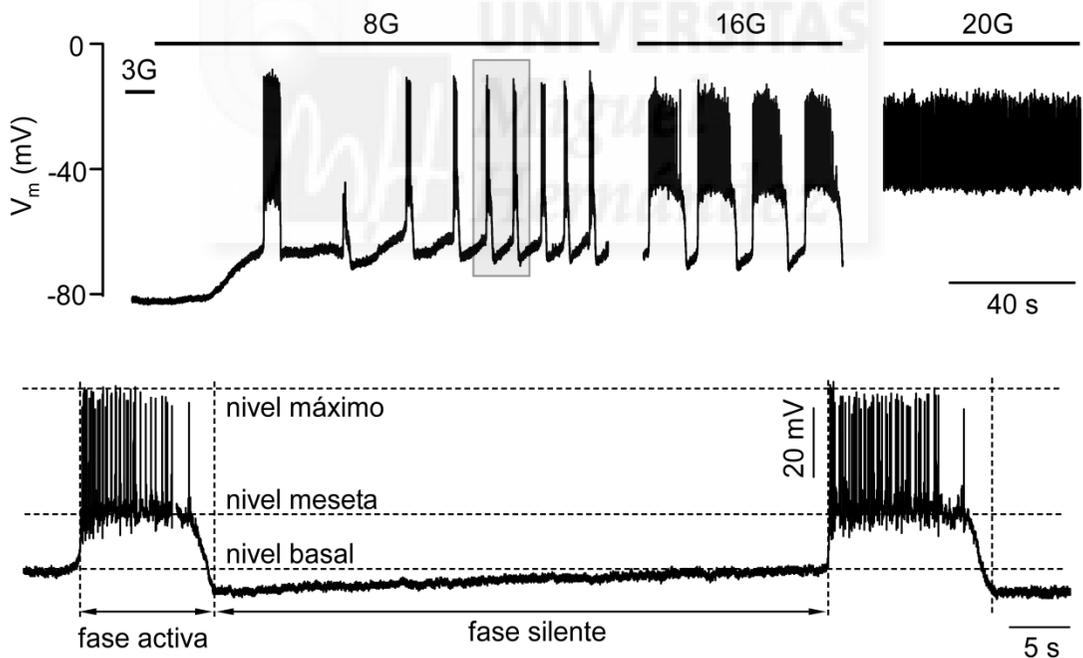
En cuanto al papel de los diferentes subtipos de  $\text{Ca}_v$  en el proceso de secreción de insulina hay que señalar que pese a representar solo el 50% de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$ , la eliminación de la contribución de los  $\text{Ca}_v$  HVA-tipo L mediante inhibidores específicos (nifedipina o isradipina) o la ingeniería genética (ratones  $\text{Ca}_v1.2^{-/-}$ ) reduce la secreción en un 80%, afectando principalmente a la primera fase y sin alterar aparentemente la segunda fase de la secreción, la actividad eléctrica o a la señalización de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Schulla et al., 2003). La eliminación del segundo representante mayoritario de  $\text{Ca}_v$  ( $\text{Ca}_v$  HVA-tipo R) mediante bloqueo farmacológico (SNX482) o ingeniería genética (ratones  $\text{Ca}_v2.3^{-/-}$ ) reduce la secreción un 80% o un 50% respectivamente (Jing et al., 2005) reduciendo principalmente la segunda fase de la secreción y sin afectar a la primera fase. En este caso si se produce una ligera reducción en la señal de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  oscilatoria (18%). Estos efectos están relacionados con la característica organización estructural y funcional de la maquinaria de exocitosis en célula  $\beta$  y su interacción con los  $\text{Ca}_v$  (ver apartados 5.4 y 5.5).

## 5.2 REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA EN LA CÉLULA $\beta$

Desde el primer registro intracelular con electrodos de alta resistencia que demostró la presencia de actividad eléctrica en islote en respuesta a glucosa hace más de 40 años (Dean and Matthews, 1968), se ha empleado mucho esfuerzo para caracterizar dicha actividad eléctrica y su comportamiento bajo diferentes estímulos importantes para la comprensión y/o tratamiento de las patologías asociadas a los desórdenes de la glucemia. Aunque aún existen puntos oscuros y aspectos controvertidos, actualmente se cuenta con suficiente información para construir un modelo preciso de cómo se genera y modula la actividad eléctrica en las diferentes células pancreáticas en respuesta a las variaciones de  $[\text{glucosa}]_{\text{plasma}}$ , su principal estímulo fisiológico.

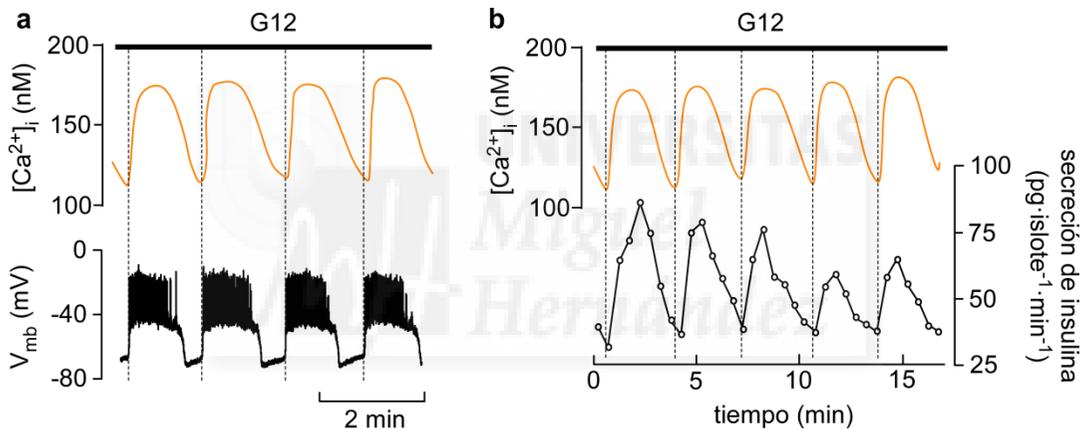
A  $[\text{glucosa}]_{\text{ext}}$  por debajo del umbral para activar la secreción de insulina (aproximadamente  $<5\text{mM}$ ), la célula  $\beta$  no genera potenciales de acción y el  $V_{\text{mb}}$  se mantiene sobre unos  $-75\text{mV}$ . El incremento de la  $[\text{glucosa}]_{\text{ext}}$  por encima del umbral para la activación de la secreción de insulina (aproximadamente  $\geq 6\text{mM}$  en ratón) provoca una despolarización del  $V_{\text{mb}}$ . Cuando se alcanza un valor de  $V_{\text{mb}}$  entre  $-55$  y  $-50\text{mV}$ , la célula  $\beta$

comienza a disparar potenciales de acción que rara vez sobrepasan los 0mV en su pico y que provocan un incremento transitorio de la  $[Ca^{2+}]_i$  (**Fig 9a**). A valores de  $[glucosa]_{out}$  entre  $\approx 6-17$  mM la actividad eléctrica es oscilatoria y consiste en ráfagas de potenciales de acción sobre un nivel meseta despolarizado, alternadas con periodos silentes de retorno a un potencial más negativo (alrededor de -60 mV). Conforme se incrementa la concentración de glucosa plasmática se produce un incremento relativo en la duración de la fase activa respecto a la fase silente. A  $[glucosa]_{ext}$  por encima de  $\approx 17$ mM, la actividad oscilatoria desaparece y se observa un disparo continuo de potenciales de acción sobre el potencial de meseta (**Fig 8**). La magnitud de los incrementos transitorios de la  $[Ca^{2+}]_i$  provocados por las ráfagas de potenciales de acción se ve lógicamente alterada en relación a la duración de las mismas (Santos et al., 1991; Valdeolmillos et al., 1993).



**Fig 8.** Las células  $\beta$  en islotes intactos presentan actividad eléctrica oscilatoria. Registro de  $V_m$  realizado mediante la técnica de *perforated-patch* en una célula  $\beta$  de la superficie de un islote intacto. En el registro superior se puede observar la respuesta oscilatoria y la diferente duración relativa de las fases activa y quiescente en respuesta a una  $[Glucosa]_{ext}$  de 8, 16 y 20mM. El registro inferior muestra el fragmento sombreado del anterior a mayor escala para señalar en detalle los niveles y fases que caracterizan la respuesta oscilatoria.

Los mecanismos que controlan la actividad eléctrica oscilatoria en célula  $\beta$  permanecen sin ser aclarados por completo. No obstante, se ha propuesto varias hipótesis para explicar este comportamiento del  $V_{mb}$ . Entre ellas destacan la activación de canales  $K_{Ca1.1}$  (BK) por la entrada masiva de  $Ca^{2+}$  que produciría la hiperpolarización hacia el periodo silente (Atwater et al., 1979; Sherman, 1996), la inactivación de los  $Ca_V$  (Cook et al., 1991), el acoplamiento intercelular (Andreu et al., 1997), la activación cíclica de una conductancia operada por compuerta (Worley et al., 1994), la activación de los canales  $K_{Ca}$  por movilización de los depósitos intracelulares (Ammala et al., 1991) o la activación de los  $K_{ATP}$  por la oscilación en los niveles de  $[ATP]_i/[ADP]_i$  a causa del metabolismo (Larsson et al., 1996).



**Fig 9.** Respuesta sincrónica de la actividad eléctrica, las oscilaciones de  $[Ca^{2+}]_i$  y la secreción de insulina en islote intacto. **(a)** Alineación temporal de la respuesta eléctrica y las oscilaciones de  $[Ca^{2+}]_i$  a  $[glucosa]_{ext} = 12mM$ . Modificado de (Gilon and Henquin, 1992) **(b)** Alineación temporal de las oscilaciones de  $[Ca^{2+}]_i$  y la secreción de insulina. Modificado de (Gilon et al., 2002).

Las células  $\beta$  que componen el islote están acopladas eléctricamente (Zhang et al., 2008), permitiendo que las oscilaciones de  $[Ca^{2+}]_i$  provocadas por el disparo de potenciales de acción en células  $\beta$  individuales estén sincronizadas a nivel del islote completo (Santos et al., 1991; Valdeolmillos et al., 1993) y, por tanto, que la secreción de insulina activada por este incremento de  $[Ca^{2+}]_i$  también lo esté. El mecanismo que subyace a esta sincronización tampoco se conoce en profundidad, pero parece que tanto la unión eléctrica vía *gap-junctions* (MacDonald and Rorsman, 2006) como las interacciones

paracrinas mediadas por las hormonas liberadas por células vecinas (Zarkovic and Henquin, 2004), están implicadas. Cualquiera que sea el mecanismo, esta señal coordinada puede tener una implicación funcional importante superponiendo la repuesta global a la heterogeneidad de respuestas individuales de cada célula  $\beta$  y propiciando una secreción más vigorosa (Pipeleers, 1992; Salomon and Meda, 1986)

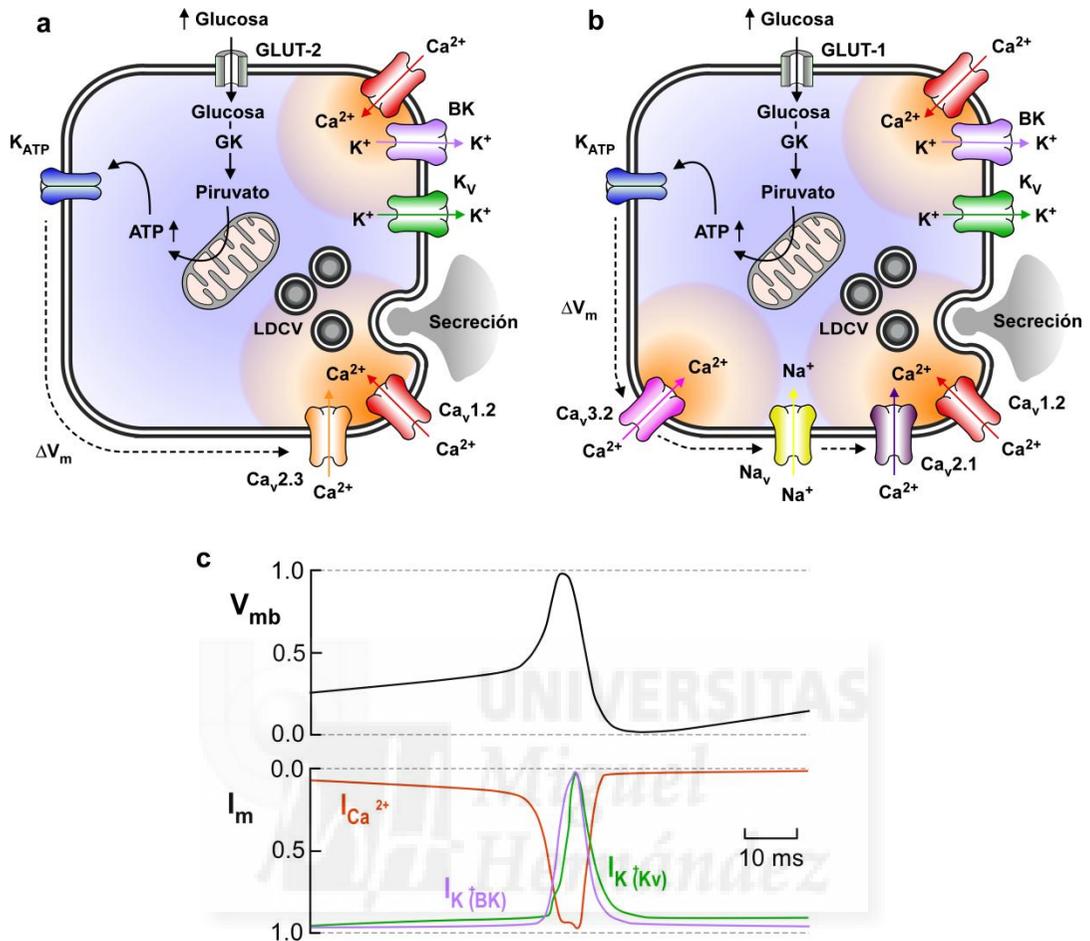
La naturaleza rítmica del disparo de potenciales de acción y el incremento de  $[Ca^{2+}]_i$ , se ha asociado con la liberación pulsátil de insulina a nivel del islote (Barbosa et al., 1998; Bergsten, 1995; Gilon et al., 2002) (**Fig 9b**) y con las oscilaciones observadas en la insulinemia en humanos (Hellman et al., 1994). Aunque los mecanismos moleculares que explican esta relación permanecen sin ser explicados, se ha comprobado que la liberación pulsátil de insulina es más efectiva reduciendo los niveles de glucemia que la liberación continua de la hormona (Matthews et al., 1983).

La dependencia que existe entre el patrón rítmico de la actividad eléctrica/incremento de  $[Ca^{2+}]_i$  y el mantenimiento del microentorno que se crea gracias a las interacciones intercelulares en el islote intacto, se pone de manifiesto por el hecho de que las células  $\beta$  aisladas y mantenidas en cultivo pierden la capacidad de responder sincrónicamente. En este tipo de preparación las células  $\beta$  responden a un incremento de glucosa con largas ráfagas de potenciales de acción (a veces de varios minutos) (Ammala et al., 1991; Gopel et al., 1999b; Larsson et al., 1996; Smith et al., 1990a). Como explicaciones de este fenómeno se han barajado los cambios en la expresión de algunos canales iónicos (Gopel et al., 1999b), la pérdida de la señalización paracrina (Grapengiesser et al., 1991) y la pérdida de la comunicación intercelular (Smolen et al., 1993).

### **5.3 FLUJOS IÓNICOS IMPLICADOS EN LA GENERACIÓN DEL POTENCIAL DE ACCIÓN EN CÉLULA $\beta$**

La conductancia mayoritaria en una célula  $\beta$  cuando la concentración de glucosa circundante es baja está asociada a la apertura espontánea del  $K_{ATP}$ , que provoca un flujo de salida de iones  $K^+$  generando un exceso de carga negativa en el interior celular. Este flujo catiónico de salida coloca el  $V_{mb}$  en un valor característico de reposo próximo a -75 mV, cerca del potencial de equilibrio para el  $K^+$ . Cuando la concentración de glucosa extracelular aumenta, se produce un incremento asociado en su incorporación al interior celular a través de su transportador específico (GLUT2) y en su metabolización

mitocondrial, lo que produce a su vez un incremento en los valores de la razón  $[ATP]_i/[ADP]_i$  y un aumento de la resistencia al flujo iónico en el  $K_{ATP}$ . Conforme aumenta la glucosa extracelular se produce la reducción paulatina de la conductancia del  $K_{ATP}$ , presentando una  $IC_{50} = 2-3\text{mM}$  de glucosa en células  $\beta$  aisladas (Ashcroft and Rorsman, 1989) y una  $IC_{50} = 5\text{mM}$  en islotes intactos (Gopel et al., 1999a). A una  $[Glucosa]_{out} = 5\text{mM}$  (valor de glucemia de un ratón sometido a ayuno) la actividad del  $K_{ATP}$  se ve reducida en un 90%, pero el 10% restante es suficiente para mantener el  $V_{mb}$  lejos del valor necesario para el disparo de potenciales de acción (Smith et al., 1990a). Cuando la  $[Glucosa]_{out}$  aumenta hasta 8-10 mM, la actividad del  $K_{ATP}$  es suprimida casi completamente. Esta drástica disminución de la conductancia del  $K_{ATP}$  desenmascara la influencia de una conductancia de entrada despolarizante mediada presumiblemente por iones  $Na^+$  y/o  $Ca^{2+}$  (Rorsman et al., 2011b) que lleva el  $V_{mb}$  a los valores necesarios para la activación de los  $Ca_v$  (entre -60 y -50 mV). Cuando el  $V_{mb}$  alcanza el umbral de activación de los canales  $Ca_v$  éstos se abren de forma regenerativa, acelerando la despolarización y conformando la fase ascendente del potencial de acción (Trube and Rorsman, 1986). Sobre el rango de voltajes asociado a la activación de los canales  $Ca_v$  se produce la activación, solapada parcialmente, de los  $K_{Ca}$  y  $K_v$  con cierto desfase temporal entre ambos. Como hemos comentado en apartados anteriores los modelos clásicos no suponían determinante la contribución del  $K_{Ca}$  en la repolarización del potencial de acción, considerando que dicha función estaba mediada exclusivamente por canales  $K_v$ . Sin embargo la aplicación de nuevas técnicas junto con el uso de antagonistas más específicos (Jacobson et al., 2007; Jacobson et al., 2010) han llevado a retocar el modelo introduciendo a participación del  $K_{Ca}$  en este proceso. Según este nuevo modelo, tras la rápida despolarización de la membrana dependiente de  $Ca_v$ , el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  y la despolarización activa los canales  $K_{Ca1.1}$  a  $\approx 3$  ms de alcanzar el pico del potencial de acción. Su influencia hiperpolarizante junto con la inactivación dependiente de voltaje de los  $Ca_v$  trunca la fase de despolarización. Los  $K_v$  tienen una menor amplitud y una cinética de activación más lenta (se activan  $\approx 2$  ms después que los  $K_{Ca1.1}$ , a  $\approx 1$  ms de alcanzar el pico del potencial de acción) por lo que afectan mínimamente a la fase de subida y a la amplitud del potencial de acción. Tanto los  $K_{Ca1.1}$  como los  $K_v$  alcanzan su máximo  $\approx 3$  ms después de que el potencial de acción alcance su pico y gobiernan la fase de repolarización, los  $K_{Ca1.1}$  la fase inicial debido a que tienen una inactivación más rápida y los  $K_v$ , la fase tardía y el  $V_{ref}$  (Houamed et al., 2010) (**Fig 10c**).



**Fig 10.** Acoplamiento estímulo-secreción y flujos iónicos implicados en la generación del potencial de acción en célula  $\beta$  pancreática. **(a)** Representación esquemática de los canales iónicos y procesos celulares implicados en el inicio y la generación de la actividad eléctrica característica de la célula  $\beta$  de ratón (ver texto para los detalles). **(b)** Representación esquemática de los canales iónicos y procesos celulares implicados en el inicio y la generación de la actividad eléctrica característica de la célula  $\beta$  de humano (ver texto para los detalles) **(c)** alineamiento temporal del  $V_{mb}$  durante un potencial de acción y los flujos iónicos ( $I$ ) relacionados con la generación del mismo. Modificado de (Houamed et al., 2010).

Los puntos básicos del modelo para el acoplamiento estímulo-secreción en ratones que establecen el inicio de la fase activa de disparo de potenciales de acción por aumento de la glucosa a través del cierre del  $K_{ATP}$  (Rorsman and Braun, 2012) y un incremento asociado de la  $[Ca^{2+}]_i$  (Quesada et al., 2006; Rorsman and Braun, 2012) que desencadenaría el proceso de excitosis (Rorsman and Braun, 2012), son también aplicables a las células  $\beta$  en humanos. No obstante, se ha puesto de manifiesto

importantes diferencias en la identidad molecular de los participantes en este proceso entre roedores y humanos. Un ejemplo clásico de estas discrepancias es la expresión de mayores cantidades del transportador de glucosa GLUT1 y GLUT3 en humano en oposición a la mayor expresión de GLUT2 en roedores (De Vos et al., 1995). Recientemente algunos grupos han logrado tener acceso a suficiente tejido pancreático de origen humano como para analizar en detalle las diferencias en la dotación de canales que existen entre estas dos especies, proponiendo un nuevo modelo de funcionamiento de la célula  $\beta$  en humanos (Braun et al., 2008). Según este nuevo paradigma, la elevación de la glucemia por encima de  $\approx 6\text{mM}$  provoca el cierre del  $K_{ATP}$  y despolariza la MP hasta el umbral de activación de los canales  $Ca_v3.2$  (Tipo T) y  $Ca_v1.2$  (Tipo L), por encima de  $-60\text{ mV}$  y  $-50\text{ mV}$ , respectivamente. La contribución de estos dos canales de calcio inicia la fase de despolarización del potencial de acción, que en su ascenso provoca la apertura de los  $Na_v$  (por encima de  $-40\text{ mV}$ ), acelerando la despolarización y permitiendo que se alcancen potenciales asociados con la apertura de los canales  $Ca_v2.1$  (Tipo P/Q), por encima de  $-20\text{ mV}$ . La repolarización del potencial de acción es dependiente de canales  $K_{Ca1.1}$  principalmente y en menor medida, de  $K_v2.2$  y  $K_v2.1$ . Este estudio también ha demostrado el hecho de que, si bien el bloqueo mediante herramientas farmacológicas de los  $Ca_v1.2$  inhibe la secreción por su efecto sobre la generación de los potenciales de acción, el principal canal de calcio asociado con la exocitosis es el  $Ca_v2.1$  (Braun et al., 2008; Rorsman and Braun, 2012) (**Fig 10b**).

#### 5.4 DINÁMICA VESICULAR DURANTE EL PROCESO DE EXOCITOSIS

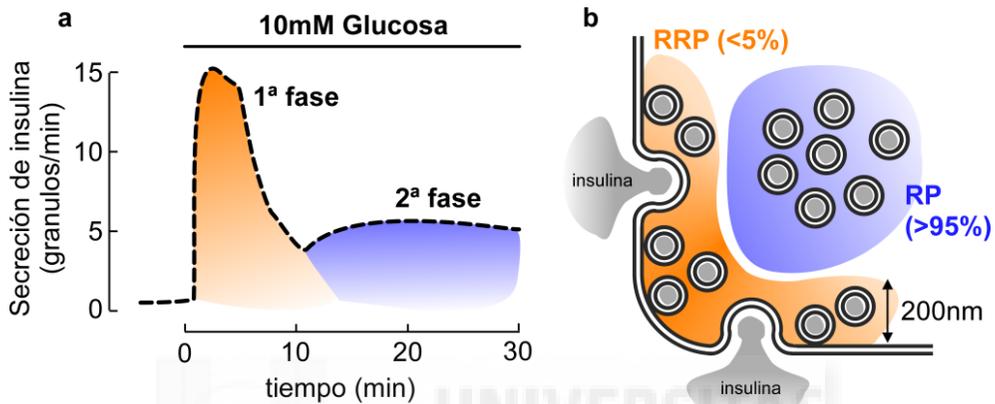
La exocitosis es el conjunto de procesos celulares por medio del cual las vesículas situadas en el citoplasma se fusionan con la MP y liberan su contenido al medio extracelular. Existen dos tipos de exocitosis: la constitutiva (no dependiente de  $Ca^{2+}$ ) y la regulada (dependiente de  $Ca^{2+}$ ). La exocitosis constitutiva está presente en todas las células y se encarga de suministrar componentes a la matriz extracelular y del recambio de proteínas de membrana por otras de nueva síntesis. La exocitosis regulada se restringe a células especializadas que almacenan sustancias (hormonas, neurotransmisores, enzimas digestivas, etc.) en vesículas de secreción y son liberadas en respuesta al estímulo adecuado. La secreción de insulina representa un proceso de exocitosis regulada que se dispara por la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de los  $Ca_v$  (Ammala et al., 1993b) y coincide con los periodos de actividad eléctrica y oscilaciones del  $[Ca^{2+}]_i$

(Gilon and Henquin, 1992; Gilon et al., 2002). Este proceso de exocitosis implica el empaquetamiento de la hormona en pequeñas ( $\varnothing \approx 300\text{nm}$ ) vesículas de secreción denominadas *Large Dense Core Vesicles* (LDCVs), la movilización de estas LDCVs desde el retículo endoplásmico (RE) hacia el espacio submembrana, la fusión exocitótica de las mismas con la MP y eventualmente su recuperación mediante endocitosis.

Atendiendo a su cinética la secreción de insulina en respuesta a glucosa en ratón y humano presenta un patrón bifásico (Anello et al., 1999; Bratanova-Tochkova et al., 2002; Henquin et al., 2002; Rorsman and Braun, 2012). La primera fase se inicia rápidamente tras un incremento de la  $[\text{Glucosa}]_{\text{out}}$  por encima del umbral para la generación de la actividad eléctrica, con un retraso de  $\approx 1\text{min}$  (tiempo necesario para metabolizar la glucosa). Esta fase es transitoria (5-10 min) y supone la liberación del  $\approx 0.14\%/ \text{min}$  del contenido total de insulina (estímulo = 15mM Glucosa). La segunda fase representa la liberación mantenida del 0.05%/min del contenido total de insulina (Anello et al., 1999) y presenta una profunda dependencia por estímulos capaces de aumentar la  $[\text{ATP}]_{\text{in}}$  (Henquin, 2000). Gracias a estudios ultraestructurales (Olofsson et al., 2002) y medidas de amperometría (Huang et al., 1995) sabemos que en cada célula  $\beta$  hay  $\approx 10000$  LDCVs y que cada una contiene  $\approx 1.6$  amoles de insulina. En base a estos datos podemos calcular que a nivel de cada célula individual en la primera fase se secretan  $\approx 15$  vesículas/min ( $\approx 40-80$  vesículas durante la fase completa en base a la integración de la zona comprendida bajo el primer transitorio) y en la segunda  $\approx 5$  vesículas/min (**Fig 11a**).

Los resultados obtenidos mediante la combinación de técnicas bioquímicas (RIA, ELISA), microscópicas (microscopía electrónica, confocal, para onda evanescente) y biofísicas (medidas de capacitancia, amperometría) junto con el establecimiento de una analogía con el proceso de secreción en otros tipos celulares (Neher, 1998) ha llevado a plantear un modelo en el que existen dos grupos funcionales de LDCVs en la célula  $\beta$  (Rorsman et al., 2000). Un primer grupo denominado RRP (*Readily Releasable Pool*) en el que se encontrarían una pequeña fracción (1-5%) de las LDCVs (Olofsson et al., 2002; Wan et al., 2004) y que se encuentra “anclado” a la MP o muy cercano a ella, presenta la característica de poder ser liberado rápidamente tras un estímulo ya que no requiere de modificaciones adicionales para adquirir la competencia para ello (Rorsman and Renstrom, 2003). Sin embargo el grupo mayoritario de LDCVs (95-99%) se encuentra en el denominado RP (*Reserve Pool*). Este grupo debe desplazarse para alcanzar la MP y sufrir una serie de modificaciones dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (Ammala et al., 1993b), ATP

(Eliasson et al., 1997) y  $T^a$  (Renstrom et al., 1996) para ser liberadas, que se conocen colectivamente como movilización o *priming*. El proceso de *priming* implica tanto el “anclaje” a la membrana como las reacciones químicas de maduración necesarias para aumentar su probabilidad de ser liberadas.



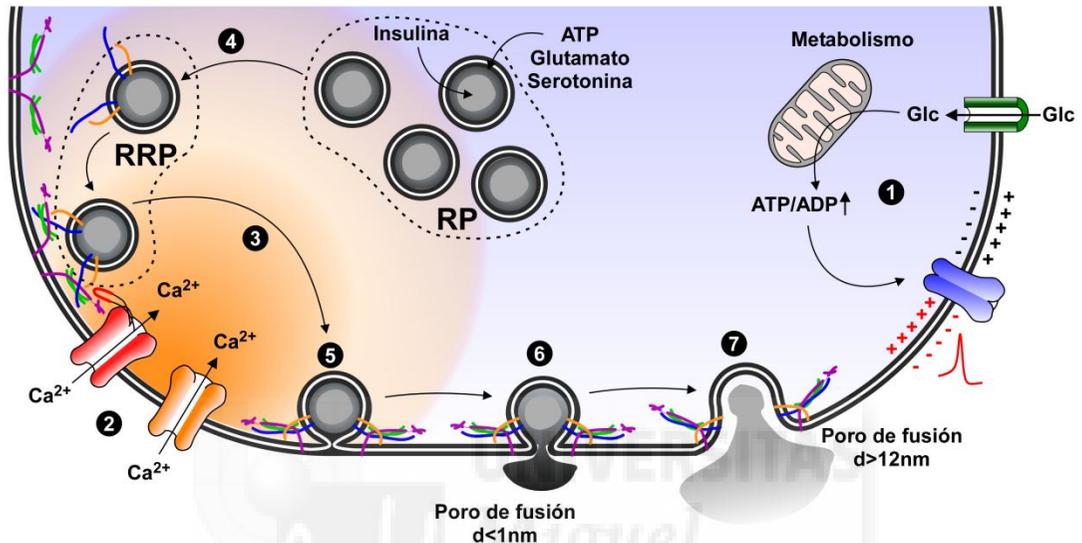
**Fig 11.** Representación esquemática del patrón bifásico de secreción activado por un incremento de  $[Glucosa]_{ext}$  a 10mM **(a)** y grupos funcionales de LDCVs presentes en la célula  $\beta$  **(b)**. En naranja se muestra la primera fase de la secreción y el grupo de LDCVs asociada con ella (RRP). En azul se muestra la segunda fase de la secreción y el grupo de LDCVs que se moviliza para dar lugar a la misma (RP). *Modificado de (Rorsman and Renstrom, 2003).*

Este marco conceptual plantea la posibilidad de explicar la dinámica bifásica de la secreción de insulina en base a la liberación secuencial de los diferentes grupos de LDCVs, hipótesis que se apoya en diversos resultados experimentales que representan un reflejo de la cinética y la dependencia metabólica de ambas fases. El análisis de la ultraestructura mediante micrografías de microscopía electrónica ha demostrado que de las  $\approx 10000$  LDCVs presentes en la célula  $\beta$ ,  $\approx 600$  están ancladas a la MP y otras  $\approx 2000$  se encuentran a menos de  $0.2\mu m$  de ella (Olofsson et al., 2002). La estimulación de la secreción de insulina con altas  $[K^+]$  en ausencia de glucosa produce un incremento de  $[Ca^{2+}]_i$  transitorio (debido a la inactivación de los  $Ca_v$ ), un aumento de secreción también transitorio y una disminución del  $\approx 30\%$  de las LDCVs ancladas a la MP. Un segundo estímulo con  $K^+$  en estas condiciones no tiene ningún efecto sobre la secreción. Sin embargo, en presencia de glucosa, la estimulación con  $K^+$  provoca una secreción de insulina mantenida y en estas condiciones un segundo estímulo si es capaz de evocar una

respuesta secretora similar a la inicial (Henquin, 2000; Olofsson et al., 2002). La presencia de un grupo de LDCVs ancladas a la MP con un comportamiento funcional equivalente también se ha demostrado mediante experimentos de co-inmunoprecipitación de las proteínas componentes del mecanismo de anclaje de las LDCVs (Daniel et al., 1999). Por su parte el análisis funcional mediante la monitorización de los incrementos de  $C_m$  en células  $\beta$  aisladas ha demostrado que la cinética del proceso de exocitosis muestra también un patrón bifásico compuesto por un componente inicial rápido y transitorio seguido de otro más lento y sostenido. Este doble componente se observa tanto si se utiliza como estímulo un incremento global de  $[Ca^{2+}]_i$  mediante la fotoliberación del ión “enjaulado” con un pulso de luz UV (Olofsson et al., 2002; Renstrom et al., 1997), como si se reconstruye la cinética a partir de los  $\Delta C_m$  evocados por pulsos cuadrados de voltaje (que activan la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de los  $Ca_v$ ) de duración progresivamente mayor (Barg et al., 2001). En base a estas medidas se ha planteado que el componente transitorio se debe a la rápida ( $vel_{max} \approx 12000-30000$  LDCVs/min a  $\approx 20-50$ ms del estímulo) liberación de  $\approx 20-100$  LDCVs que componen la porción del RRP anclada y lista para su liberación. Una vez agotado el RRP la exocitosis prosigue a una velocidad más lenta ( $\approx 300$  LDCVs/min) que refleja el ritmo de suministro de nuevos LDCVs mediante *priming* (Barg et al., 2002a; Rorsman and Renstrom, 2003). Aunque la secreción mantenida a tiempos largos lógicamente requiere de la aportación de “nuevos” LDCVs que sufran un desplazamiento hacia la MP seguido de anclaje y maduración, las primeras fases de este “rellenado” del RRP representan la fusión de los LDCVs pre-anclados que solo requerían de modificaciones químicas para su maduración final (Barg et al., 2002b). Además requiere de acceso a energía metabólica (Eliasson et al., 1997; Olofsson et al., 2002) al igual que la segunda fase de la secreción.

Como se puede observar los valores de la tasa de exocitosis medida como  $\Delta C_m$  en células  $\beta$  aisladas superan ampliamente los obtenidos en medidas de secreción de insulina con ensayos bioquímicos. Pese a que actualmente no se conoce la explicación para este fenómeno, se piensa que la pérdida de la organización estructural del islote junto con los efectos autocrinos de la insulina pueden jugar un papel importante (Gopel et al., 2004). Estudios recientes en los que se han aplicado las técnicas de monitorización de la  $C_m$  sobre células  $\beta$  en la superficie de islotes intactos han demostrado que en estas condiciones la tasa de exocitosis se reduce hasta un  $\approx 90\%$  (Gopel et al., 2004). Además las diferencias experimentales como la  $[AMPc]$  en la solución intracelular usada (Eliasson et al., 2003), la diferencia de  $T^a$  (Renstrom et al., 1996) o la dependencia del voltaje que

presenta la  $C_m$  (Gopel et al., 2004) han de ser tenidas en cuenta para introducir correcciones a la hora de comparar directamente los resultados de secreción obtenidos por ambas técnicas.



**Fig 12.** Maquinaria molecular y eventos celulares relacionados con la secreción de insulina inducida por alta [glucosa]<sub>ext</sub> en célula  $\beta$  de ratón. **(1)** El aumento de [glucosa]<sub>ext</sub> produce el cierre del  $K_{ATP}$  y la despolarización de la célula  $\beta$ . **(2)** La despolarización alcanza el potencial umbral para la activación de los canales de calcio tipo L ( $Ca_{V1.2}$ ) y R ( $Ca_{V2.3}$ ). **(3)** El incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  activa la exocitosis del grupo de gránulos preparados para su liberación inmediata (RRP) con un retardo de unos pocos milisegundos; esta exocitosis “rápida” está relacionada con la unión física de la maquinaria de exocitosis del RRP con los  $Ca_{V1.2}$  a través del segmento 753-893 presente en el giro citoplasmático entre los dominios II y III del canal. **(4)** El incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  también activa la movilización de gránulos de reserva (RP) hacia la MP, este proceso es dependiente de ATP, se inhibe a bajas temperaturas y parece estar más relacionado con la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de los  $Ca_{V2.3}$ . **(5)** Paso intermedio durante el proceso de exocitosis en el que se produce la hemifusión de las membranas vesicular y plasmática. **(6)** Cuando el poro de fusión alcanza un diámetro ( $d$ ) de  $< 1\text{nm}$  se produce la liberación de sustancias de bajo peso molecular como ATP, Glutamato o Serotonina albergadas en los gránulos de secreción junto a la insulina. **(7)** La liberación de la insulina requiere que el poro de fusión alcance un diámetro mínimo de 12nm.

Recientemente la aplicación de técnicas de TIRFM (*Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy*) al estudio de la dinámica vesicular ha planteado la introducción de un nuevo tipo de exocitosis en la que LDCVs distantes de la MP son reclutados y fusionados sin un aparente paso previo de anclaje. Según este modelo las variaciones sub y supra-

fisiológicas de  $[Ca^{2+}]_i$ , evocadas por diferentes estímulos (elevación de  $[Glucosa]_{ext}$  o  $[K^+]_{ext}$ ) activarían diferentes tipos de fusión exocitótica en función de su capacidad para romper la barrera para el anclaje establecida por la interacción de las proteínas Rim2 $\alpha$  y Rab3. Además postula que este nuevo tipo de exocitosis sería responsable de la mayoría de la secreción en la primera y segunda fase otorgando un papel regulador a la remodelación del citoesqueleto de actina (Seino et al., 2011; Shibasaki et al., 2007).

## 5.5 REGULACIÓN DE LA EXOCITOSIS POR EL IÓN $Ca^{2+}$

La exocitosis en célula  $\beta$  se ajusta perfectamente al modelo de exocitosis regulada denominada “hipótesis SNARE (*SNAP REceptor*)”. Este modelo postula la existencia de un grupo de proteínas, presentes tanto en la MP (proteínas t-SNARE como la syntaxina y la SNAP-25) como en la membrana de las vesículas (proteínas v-SNARE como la sinaptobrevina (VAMP)), cuya interacción y cambio conformacional proporciona la energía libre necesaria para facilitar un proceso tan energéticamente desfavorable como la fusión de dos membranas fosfolipídicas (Bruns and Jahn, 2002). La célula  $\beta$  está equipada con todas estas proteínas, las cuales se piensa que median las mismas funciones que en la fusión de vesículas sinápticas. No obstante la participación exclusiva de las proteínas SNARE produce fusiones lentas que no están reguladas por  $Ca^{2+}$  (Chapman, 2002), lo que plantea la necesidad de incluir otras proteínas que medien como reguladores y sensores de  $Ca^{2+}$  en el proceso de fusión. Los principales candidatos para ejercer como sensores de  $Ca^{2+}$  en este proceso son una familia de proteínas de 13 miembros denominadas sinaptotagmina I-XIII. Todos los miembros de esta familia comparten la presencia de dos motivos estructurales con varios sitios de unión a  $Ca^{2+}$  (C2A y C2B), sin embargo, cada sinaptotagmina presenta una afinidad diferente por el ión que va desde valores de  $EC_{50} \approx 10\text{-}20\mu\text{M}$  (sinaptotagmina I y II) hasta  $\approx 1\mu\text{M}$  (sinaptotagmina III y IV) (Sugita et al., 2002). Aunque la sinaptotagmina I y II parecen ser esenciales para la fusión de las vesículas sinápticas estos subtipos no se expresan en células  $\beta$  de ratón y los estudios más recientes señalan a la sinaptotagmina V y VII como las implicadas en mediar la sensibilidad al  $Ca^{2+}$  en célula  $\beta$  (Gut et al., 2001). Pese a las dificultades para establecer la identidad molecular del sensor de  $Ca^{2+}$  en células  $\beta$ , la dependencia del  $\Delta C_m$  con la  $[Ca^{2+}]_i$  se ajusta satisfactoriamente a una función de Hill con un coeficiente de  $\approx 5$ , lo que demuestra un alto grado de cooperatividad en el proceso y refuerza la idea de que varios átomos deben unirse al sensor de  $Ca^{2+}$  para iniciar la exocitosis (Barg et al., 2001).

El ión  $\text{Ca}^{2+}$  actúa como segundo mensajero en una gran variedad de rutas de señalización y reacciones químicas intracelulares. La especificidad y la rapidez que requiere el control de procesos como la exocitosis, se consigue mediante la restricción de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  a dominios espaciotemporales centrados alrededor del vestíbulo intracelular de los canales  $\text{Ca}_v$ , en cuyo entorno se consiguen variaciones de magnitud y cinética muy superiores a los que se consiguen medir con sondas fluorescentes que reportan los cambios de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  globales en todo el volumen celular (Barg et al., 2001; Bokvist et al., 1995). Por ello, para entender el proceso de exocitosis resulta imprescindible el conocimiento de la magnitud y cinética de estos cambios locales de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . La distribución espacial de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  generada en esta región del espacio submembrana tras la apertura de los  $\text{Ca}_v$  es compleja; las leyes que rigen la difusión intracelular del  $\text{Ca}^{2+}$  junto con la acción de diferentes sistemas de tamponamiento dan forma a estos dominios locales de señalización de  $\text{Ca}^{2+}$ . Estos se pueden clasificar en nanodominios y microdominios. Los nanodominios están asociados a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de un único  $\text{Ca}_v$ , su distancia de influencia es de  $\approx 20\text{-}50\text{nm}$  desde la entrada del  $\text{Ca}_v$  donde se pueden alcanzar  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  de  $\approx 100\mu\text{M}$  con cinéticas muy rápidas ( $\approx 100\mu\text{s}$ ) y los quelantes (EGTA) son inefectivos. Los microdominios se asocian al sumatorio del  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$  producido por grupos de  $\text{Ca}_v$ , su distancia de influencia es de  $< 500\text{nm}$ , las  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  alcanzadas son de  $\approx 5\text{-}10\mu\text{M}$ , la cinética es más lenta ( $\approx 100\text{ms}$ ) y son sensibles EGTA (Augustine et al., 2003; Neher, 1998).

La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula  $\beta$  se encuentra polarizada en la zona de la que mayor concentración de LDCVs presenta (Bokvist et al., 1995). Además se ha comprobado que un fragmento peptídico del giro intracelular que conecta el dominio II y III del  $\text{Ca}_v1.2$  (**Fig 7a**) se une a las proteínas syntaxina, SNAP-25 y sinaptotagmina y suprime la exocitosis evocada por un pulso único de 500ms cuando se añade en exceso a la solución intracelular (Wiser et al., 1999). Esto junto con el hecho de que la exocitosis en célula  $\beta$  opera a altas velocidades y con requerimientos elevados de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ( $K_d \approx 10\text{-}30\mu\text{M}$ ) (Barg et al., 2001; Bokvist et al., 1995; Takahashi et al., 1997) y que la densidad de  $\text{Ca}_v$  en célula  $\beta$  es muy baja ( $< 1 \text{Ca}_v/\mu\text{m}^2$  mediante análisis de fluctuación no estacionaria (Barg et al., 2001)), ha llevado a proponer una organización estructural de las proteínas participantes en el proceso de exocitosis que maximiza la eficiencia de secreción y apoya los resultados obtenidos respecto a la progresión bifásica de la liberación de LDCVs pertenecientes a grupos funcionales diferentes. Según este modelo el fragmento *synprint* ensambla las LDCVs (pertenecientes al RRP) a los  $\text{Ca}_v$  a través de la maquinaria de exocitosis permitiendo que estén expuestas a las altas  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  que se alcanzan en la región

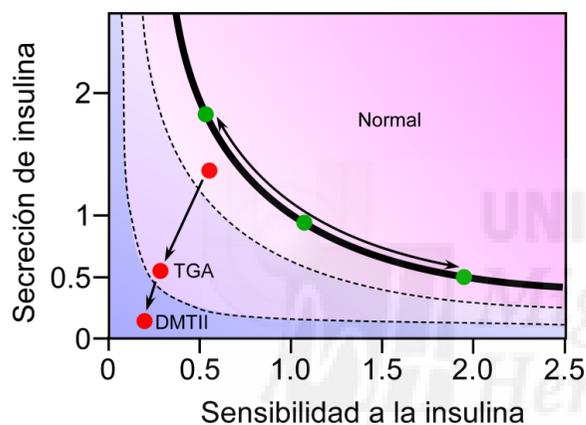
del espacio submembrana asociada a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (Barg et al., 2002a). Otro aspecto que se deriva de estos estudios es que la exocitosis no está regulada por la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de un solo  $\text{Ca}_v$  sino por grupos de ellos (presumiblemente 3) (Barg et al., 2001).

El patrón de disparo en ráfagas de potenciales de acción característico de la célula  $\beta$  tiene una especial relevancia funcional para la iniciación de la exocitosis. Las ráfagas de alta frecuencia resultan un estímulo mucho más efectivo para iniciar el proceso de exocitosis que el disparo de la misma cantidad de potenciales a baja frecuencia ( $<1\text{Hz}$ ) debido a que en el primer caso no se permite el retorno de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  a los niveles pre-estimulatorios cuando cesa el estímulo y la contribución de los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  es acumulativa (Ammala et al., 1993b).

## 6. FISIOPATOLOGÍA DE LA DIABETES TIPO II ASOCIADA A LA OBESIDAD

Tanto la obesidad como la diabetes tipo II están relacionados con un aumento de la resistencia periférica a la insulina (Reaven, 1988). El tejido adiposo y los tipos celulares que lo acompañan (macrófagos y células endoteliales) influyen en el metabolismo a través de la liberación de diversos factores como NEFAs (*Non-Esterified Fatty Acids*), glicerol, hormonas (leptina y adiponectina) y otras adipocinas (RBP4, TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1). El aumento de la proporción de tejido adiposo ligado a la obesidad lleva asociado un incremento de la liberación de estos compuestos que pueden alterar la sensibilidad a la insulina por medio de sus efectos sobre numerosas rutas de señalización celulares (Boden, 1997; Kadowaki et al., 2006; Roden et al., 1996; Scherer, 2006; Wellen and Hotamisligil, 2005). No obstante, la resistencia a la insulina no explica *per se* el desarrollo del estado hiperglucémico característico de los individuos diagnosticados como diabéticos de tipo II. Las fluctuaciones en la sensibilidad periférica a la insulina se producen en individuos delgados u obesos como un proceso “normal” asociado a etapas como la pubertad (Moran et al., 1999), la preñez (Buchanan et al., 1990), la edad avanzada (DeFronzo, 1979) o al incremento de la actividad física (Goodyear and Kahn, 1998). Estas variaciones en la sensibilidad a la insulina modulan la respuesta secretora de las células  $\beta$  promoviendo un aumento o disminución de la misma para mantener la glucemia dentro del rango adecuado y asegurar la normoglucemia (**Fig 13**). Gracias a estos mecanismos de

compensación existen muchos casos en los que la obesidad y la resistencia periférica a la insulina no evolucionan hacia estados abiertamente diabéticos. Sin embargo, en un 25-30% de los casos, en los que existe un alto riesgo de fallo funcional (asociado a unas características genéticas determinadas) la célula  $\beta$  no es capaz de responder a las demandas de los tejidos periféricos, no se produce la hiperinsulinemia compensatoria y la relación hiperbólica entre la sensibilidad y la liberación de insulina se altera promoviendo que el individuo manifieste una TG alterada que progresará paulatinamente hacia la DM tipo II en el peor de los casos (Kahn et al., 2006) (**Fig 13**).



con riesgo de padecer DM tipo II. Modificado de (Kahn et al., 2006).

**Fig 13.** Relación hiperbólica entre la sensibilidad a la insulina y la secreción de la misma. Las líneas punteadas señalan las regiones hipotéticas que caracterizarían esta relación en un individuo con una tolerancia a la glucosa normal, con una TG alterada (TGA) y con DM tipo II (DMII). El punto verde (●) representa las fluctuaciones que se producen en la secreción de insulina para compensar las variaciones en la sensibilidad a la hormona. El punto rojo (●) muestra la progresión desde una tolerancia a la glucosa normal hacia un estado de DM tipo II a través de una TGA en un individuo

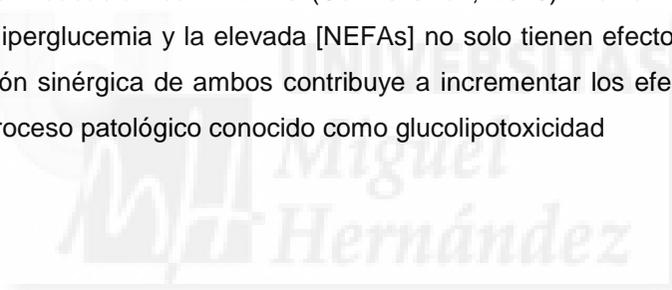
Durante la etapa de compensación la respuesta adaptativa puede implicar modificaciones estructurales encaminadas a incrementar la masa de célula  $\beta$ , modificaciones funcionales que promuevan un aumento de secreción por unidad celular o ambas. Entre los mecanismos celulares implicados en esta respuesta adaptativa de la célula  $\beta$  se ha señalado la importancia del metabolismo (Chen et al., 1994; Liu et al., 2002). Mediante la utilización de ratas *fa/fa* como modelo de obesidad y resistencia a la insulina se ha comprobado que el metabolismo de la glucosa está incrementado por efecto del aumento de la actividad de la PC y los procesos de anaplerosis. Este modelo presenta  $\approx 4$  veces más masa de célula  $\beta$  que sus controles pero el incremento de secreción llega a ser 10 veces mayor, por lo que se hace evidente que debe existir un incremento añadido de la capacidad secretora (Liu et al., 2002). Por otro lado los NEFAs han demostrado tener una importante función en la regulación de la secreción y recientemente se han señalado

como responsables directos de la hiperinsulinemia observada en la etapa de compensación (Stefanovski et al., 2011). El efecto de los NEFAs se ha relacionado con tres mecanismos: la disminución del aclaramiento hepático de la insulina (Stefanovski et al., 2011), la unión a GPR40 con activación de la exocitosis mediada por la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos intracelulares (Itoh et al., 2003) y la generación de acetil-CoA, el cual incrementa la secreción actuando directamente o indirectamente (a través de PKC) sobre la exocitosis (Prentki et al., 2002). Otros mecanismos de adaptación implican la posible alteración de la respuesta a incretinas como el GLP-1 y el GIP. Ambas estimulan la secreción de insulina a través de la unión a su receptor específico en célula  $\beta$  de forma dependiente o independiente de la activación de PKA, además actúan como señales positivas para la proliferación e inhiben la apoptosis, afectando a la masa de célula  $\beta$  en modelos animales (Drucker, 2006). Debido al papel crítico que juega el sistema nervioso central en la regulación del metabolismo y a la extensa inervación simpática y parasimpática del islote (Ahren, 2000), también se ha barajado como punto de regulación en la respuesta adaptativa.

El aumento de masa de célula  $\beta$  puede ser debido a un incremento en el número de células (hiperplasia) por neogénesis o replicación de células preexistentes, a un aumento en el tamaño de las mismas (hipertrofia), a una disminución de la apoptosis o a una combinación de todos estos factores (Bonner-Weir, 2000). Algunos de los mecanismos relacionados con estos efectos son el incremento de la ruta de señalización activada tras la unión de insulina o IGF-1 a su receptor de membrana (Bernal-Mizrachi et al., 2001), la acción mitogénica del GLP-1 ya comentada (Drucker, 2006) o la hiperactividad vagal (Kiba et al., 1996). Estos mecanismos podrían estar detrás de los efectos sobre la masa observados tanto en modelos de obesidad inducida por dieta en ratones (Hull et al., 2005) como en modelos de infusión con alta [Glucosa] o lípidos en ratas (Bonner-Weir et al., 1989; Steil et al., 2001).

Una vez que se excede la capacidad compensatoria, la célula  $\beta$  entra en una disfunción progresiva con un incremento asociado de la [glucosa]<sub>plasma</sub>. Existen diversas hipótesis para explicar el desarrollo de la disfunción de las células  $\beta$  en fases tardías de la enfermedad. Entre ellas destacan la reducción de la masa de célula  $\beta$  posiblemente debida a la acumulación de depósitos de amiloide y los efectos nocivos de la propia glucosa (glucotoxicidad) y la elevada [NEFAs] (lipotoxicidad) sobre la función y la sensibilidad a la insulina (Kahn, 2001). Los efectos de los NEFAs sobre la función de la

célula  $\beta$  son complejos. A corto plazo incrementan la secreción de insulina, efecto que se ha propuesto como causante del incremento de función responsable de la compensación (Stefanovski et al., 2011), sin embargo, el aumento crónico de la [NEFAs] resulta dañino para la función. Los mecanismos responsables de este último efecto son aún motivo de debate pero se ha propuesto que los fallos en el metabolismo, la reducción de la biosíntesis de insulina o la pérdida de células  $\beta$  pueden estar implicados (Poitout and Robertson, 2008; Yaney and Corkey, 2003). Recientemente se ha realizado una profunda caracterización del efecto de la incubación a largo plazo en presencia de NEFAs sobre el proceso de exocitosis. Estos estudios han llevado a proponer la idea de que los NEFAs afectan a la colocalización de los  $Ca_v$  con los LDCVs. Esta alteración de la estructura de los dominios funcionales de  $Ca^{2+}$  hace que se pierda efectividad en la exocitosis sin una aparente modificación de las corrientes de  $Ca^{2+}$  o las variaciones de  $[Ca^{2+}]_i$  (Hoppa et al., 2009). La obesidad inducida por dieta rica en grasa e ratones produce los mismos efectos descritos para la incubación con NEFAs (Collins et al., 2010). Por último es importante señalar que la hiperglucemia y la elevada [NEFAs] no solo tienen efectos independientes sino que la acción sinérgica de ambos contribuye a incrementar los efectos perjudiciales generando un proceso patológico conocido como glucolipotoxicidad







## **II. OBJETIVOS**



---

La obesidad representa un factor de riesgo clave en la fisiopatología de la DM tipo II, a través de su efecto sobre la sensibilidad a la insulina. Desde un punto de vista epidemiológico, la progresión de crecimiento de los casos de DM tipo II muestra una relación directa con la prevalencia de la obesidad. Esto ha llevado a plantear que la DM tipo II solamente resultará una enfermedad manejable si su gestión incorpora acciones encaminadas a solventar ambos problemas tratados como uno solo.

En el contexto de la resistencia a la insulina causada por la obesidad, las células pancreáticas muestran un alto nivel de plasticidad. Mediante la modulación de la cantidad de hormona liberada y la sensibilidad a la misma de sus tejidos diana se puede conseguir retrasar o incluso evitar la aparición de la DM tipo II en un individuo obeso. Este proceso de compensación puede implicar alteraciones cuantitativas como el incremento de la masa de célula  $\beta$  (modificaciones estructurales) y alteraciones cualitativas como el incremento de la cantidad de insulina liberada por unidad celular (modificaciones funcionales). En nuestra opinión resulta de vital importancia conocer las modificaciones que sufren las células  $\beta$  en el entorno fisiológico que plantea la obesidad a fin de entender los procesos “naturales” que utiliza para aliviar los requerimientos de insulina, de esta manera podremos identificar posibles dianas sobre las que actuar farmacológicamente y predecir qué procesos presentan un riesgo elevado de fallar en la progresión hacia estadios más avanzados de la enfermedad.

Por todo ello el objetivo general de la presente tesis es la caracterización de las adaptaciones que sufren las células  $\beta$  pancreáticas en individuos obesos, para clarificar y comprender el tipo de modificaciones que se producen en estadios tempranos de la fisiopatología de la diabetes tipo II asociada a la obesidad e identificar los mecanismos de compensación funcional que puedan servir en última instancia como posibles dianas terapéuticas.

Los objetivos específicos son:

1. Establecer un modelo de obesidad en ratones válido para el estudio de las alteraciones sufridas durante los estadios pre-diabéticos.
2. Estudiar las modificaciones estructurales y funcionales que se producen en las células  $\beta$  pancreáticas mediante dicho modelo.





### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**



## 1. MODELO DE OBESIDAD EN RATÓN INDUCIDA POR DIETA

En el presente trabajo se han utilizado ratones hembra de la cepa C57BL/6J pertenecientes a la colonia del servicio de experimentación animal (SEA) de la UMH. Inmediatamente después del destete (3 semanas), dichos ratones fueron asignados aleatoriamente a 2 grupos y mantenidos durante 12 semanas con suministro de agua *ad libitum* y una alimentación clásica en forma de pellet rica en grasa (HFD) o control (ND). Ambas dietas fueron obtenidas de la casa comercial Jackson (Jackson Laboratory, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante para el establecimiento de modelos de estadios pre-diabéticos, el uso de una casa comercial nos asegura una composición estable y sin alteraciones y/o variaciones debidas a la preparación de la misma. La composición detallada de ambas dietas se muestra en la siguiente tabla (**Tabla 2**).

producto	ND		HFD	
	g (%)	Kcal (%)	g (%)	Kcal (%)
Proteína	19.2	20	26.2	20
Carbohidrato	67.3	60	26.3	20
Grasa	4.3	10	34.9	60
<b>Total Kcal/g</b>	<b>3.85</b>	<b>100</b>	<b>5.24</b>	<b>100</b>

Ingrediente	g	Kcal	g	Kcal
Caseína	200	800	200	800
L-Cisteína	3	12	3	12
Almidón de maíz	315	1260	0	0
Maltodextrina 10	35	140	125	500
Sacarosa	350	1400	68.8	275.2
Celulosa, BW20	50	0	50	0
Aceite de soja	25	225	25	225
Manteca de cerdo	20	180	245	2205
Mix de minerales, S10026	10	0	10	0
Fosfato dicálcico	13	0	13	0
Carbonato cálcico	5.5	0	5.5	0
Citrato potásico, 1H <sub>2</sub> O	16.5	0	16.5	0
Mix de vitaminas, V10001	10	40	10	40
Bitartrato de colina	2	0	2	0
<b>Total</b>	<b>1055.05</b>	<b>4057</b>	<b>773.85</b>	<b>4057</b>

**Tabla 2.** Composición detallada de las dietas utilizadas para la alimentación de los ratones pertenecientes al grupo ND y HFD en el presente estudio.

La caracterización del modelo se realizó mediante los procedimientos que se detallan a continuación y los resultados obtenidos se muestran ampliamente en el apartado de resultados de la presente tesis. Todos los procedimientos llevados a cabo con animales de experimentación fueron aprobados por el comité ético de la UMH de acuerdo a las normativas nacionales e institucionales.

## 2. AISLAMIENTO DE LOS ISLOTES DE LANGERHANS

Para la extracción de los islotes de Langerhans los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical, tras lo cual se les sometió a una laparotomía media completa que dejó al descubierto los órganos abdominales. Una vez localizado el conducto biliar común o colédoco se realizó una sutura a la altura de su inserción en el intestino delgado y se practicó una incisión en la parte proximal por donde se introdujo una fina cánula con ayuda de unas pinzas que se sujetó mediante otra sutura. Se preparó una solución de la enzima colagenasa tipo V (Sigma, España) en 10 ml de medio de aislamiento (composición (en mM): 115 NaCl, 5 KCl, 10 NaHCO<sub>3</sub>, 1.1 MgCl<sub>2</sub>, 1.2 NaH<sub>2</sub>CO<sub>4</sub>, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 25 HEPES, 1%BSA y 5 Glucosa (ajustado a pH 7.4 con NaOH)) y se inyectaron 7 ml de ésta a través de la cánula. Se procedió a separar el páncreas de los órganos circundantes para su transferencia a un tubo tipo falcón de 15 ml, se añadieron los 3 ml restantes de medio de aislamiento con colagenasa y se mantuvo en hielo hasta su introducción en un baño a 37°C durante 9 minutos para facilitar la digestión enzimática del tejido exocrino (el tiempo de digestión depende de la actividad del lote de colagenasa). Tras este tiempo se paró la reacción enzimática añadiendo 10 ml de medio de aislamiento frío (sin colagenasa) y se completó la digestión mediante agitación mecánica e inspección visual hasta obtener una preparación homogénea. La preparación final se mantuvo en hielo durante 5-10 minutos para permitir la precipitación de los fragmentos de páncreas, tras lo que se retiró el sobrenadante con ayuda de una pipeta Pasteur y se añadieron otros 10 ml de medio de aislamiento frío (sin colagenasa), proceso que se repitió 3 veces. Los 3 sobrenadantes se transfirieron a placas Petri negras para su inspección bajo una lupa binocular (Zeiss, Alemania). Los islotes encontrados se trasladaron a una placa Petri con medio de aislamiento limpio mediante succión con una micropipeta y se mantuvieron en un incubador a 37°C y atmósfera húmeda hasta su utilización.

### 3. CULTIVO DE CÉLULAS $\beta$ AISLADAS

Transcurrido un mínimo de 1 hora de recuperación en el incubador a 37°C y atmósfera húmeda, los islotes de Langerhans aislados en el medio de aislamiento se transfirieron a un tubo falcón de 15 ml y se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se procedió a la digestión enzimática de los islotes añadiendo una solución de 0.05% Tripsina (Sigma, Madrid) + 0.02% EDTA (Sigma, Madrid) e incubándolos 3 minutos a 37°C. Se paró la reacción mediante la adición de 3 ml de medio de cultivo (RPMI 1640 suplementado con 10% FBS, 0.1mg/ml Estreptomocina, 100UI/ml Penicilina y 11mM Glucosa) y se centrifugó de nuevo a 1000 rpm durante 10 minutos para coleccionar las células disgregadas en el fondo del tubo. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en el volumen de medio de cultivo requerido para sembrar 20  $\mu$ l en cubres de vidrio de 12 mm o 24 mm (en función del experimento) previamente tratados con 0.01% poli-L-lisina (Sigma, Madrid) durante 1 hora y lavados 3 veces con H<sub>2</sub>O estéril. Una vez sembrados los cubres se mantuvieron 2 horas en el incubador para dejar que las células se depositaran sobre el cubre, a continuación se añadió 1 ml de medio de cultivo y se volvieron a transferir al incubador hasta la realización de los experimentos 24 horas después.

### 4. REGISTROS DE SEÑALIZACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR CON SONDAS FLUORESCENTES

#### 4.1 Registro ratiométrico de calcio intracelular en islote completo y cultivo de células $\beta$ aisladas

Tras la extracción de los islotes se dejaron recuperar en 1 ml de medio de aislamiento un mínimo de 1 hora en incubador a 37°C, se añadieron 2  $\mu$ l de una disolución stock de la sonda de Ca<sup>2+</sup> fluorescente fura-2-AM (Molecular Probes, Holanda) de 2 mM en DMSO (Sigma, Madrid) para obtener una concentración final de sonda de 4  $\mu$ M (0.2% de DMSO final) y se incubaron durante al menos 2 horas a temperatura ambiente en atmósfera húmeda y gaseados continuamente con carbógeno (mezcla de 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>). Durante este tiempo la forma esterificada lipofílica de la sonda atraviesa la membrana celular y es retenida en el citosol gracias a la hidrólisis de los grupos AM por las esterasas

celulares que la dotan de carga negativa. Una vez cargados los islotes se transfirieron de uno en uno a una cámara de registro termostatzada a 37°C cuyo fondo lo conforma un cubre de 24 mm pretratado con poli-L-lisina para fijar el islote. Durante los experimentos los islotes fueron perfundidos con una solución compuesta por (en mM): 120 NaCl, 5 KCl, 1.8 NaHCO<sub>3</sub>, 1.1 MgCl<sub>2</sub>, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 20 HEPES mediante una bomba peristáltica cuya velocidad se ajustó para proporcionar un flujo continuo de 1ml/min.

La cámara y el sistema de perfusión se montaron en un microscopio invertido modelo Axiovert 200 (Carl Zeiss, Alemania) con un sistema de registro basado en una lámpara de arcoxenon como fuente de radiación electromagnética cuyo paso se cortó mediante un sistema intercambiador de filtros con obturador modelo Lambda 10-2 (Sutter Instruments CO, USA) equipado con filtros de 340 nm y 380 nm (Omega Optics, Madrid). La radiación de la longitud de onda seleccionada por el filtro se refleja en un espejo dicroico que la desvía hacia un objetivo 40X Fluar de inmersión en aceite y apertura numérica (NA) 1.3 (Carl Zeiss, Alemania) a través del cual excita la muestra. La emisión del fluorocromo atraviesa de nuevo el objetivo y se transmite por el espejo dicroico primero hacia un filtro de 510 nm (Omega Optics, Madrid) y después a una cámara digital de alta resolución y amplio rango dinámico modelo ORCA C4742-95 (Hamamatsu Photonics, Barcelona) que recoge la señal y la amplifica. Las imágenes se tomaron con una frecuencia de adquisición de 1 imagen/2segundos. Para el control de los parámetros asociados a los diferentes componentes del sistema y la monitorización de la señal de calcio se utilizó la interfaz del software Aquacosmos 2.0 (Hamamatsu Photonics, Barcelona).

En el caso de las medidas ratiométricas con fura-2-AM en células aisladas en cultivo se partió de un cultivo realizado como se especifica en el apartado 3 de este capítulo. El procedimiento de cargado de la sonda, la solución de perfusión utilizada, así como el procedimiento de registro que se detalla en el párrafo anterior para la medida de islotes fueron idénticos en el caso de las células en cultivo.

En ambos casos los datos referentes a las variaciones de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> en las medidas ratiométricas con la sonda fura-2-AM se representaron como la razón entre la fluorescencia de 510nm recogida tras la excitación a 340nm y la recogida a la misma longitud de onda tras la excitación a 380nm (F340/F380). A partir de cada registro representado de esta forma se analizó el valor medio de F340/F380 basal (3mM Glucosa), el valor medio del F340/F380 máximo alcanzado a cada una de las glucosas usadas (el valor de 8 mM de glucosa corresponde al transitorio inicial de la respuesta), los

incrementos de fluorescencia ( $[F340/F380]_{\text{final}} - [F340/F380]_{\text{inicial}}$ ) tomando como fluorescencia inicial el valor a 3mM glucosa y la integral respecto al tiempo del segmento comprendido bajo la curva de variación de  $[Ca^{2+}]_i$  a cada una de las glucosas testadas. Todos estos análisis así como el análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizaron con el software Origin v7.0552 (OriginLab Corp, USA).

## 4.2 Registro de calcio intracelular en célula $\beta$ individual en islote intacto

Para el registro de células  $\beta$  individuales en islotes intactos se utilizó una modificación de la técnica explicada en el apartado anterior. En cuanto a la recuperación y cargado de los islotes el procedimiento fue idéntico a excepción de la sonda utilizada que fue Fluo-4-AM. La principal modificación responde a la utilización de un microscopio Axiovert 200 M con un módulo confocal de escaneo por láser LSM 510 (Carl Zeiss, Alemania) que nos permite, mediante la manipulación del colimador de orificio delimitante o *pinhole*, obtener secciones ópticas de entre 0.5-12.4  $\mu\text{m}$  (en nuestro caso 8  $\mu\text{m}$ ). La fuente de radiación electromagnética usada fue un láser de Argón que emite a una única longitud de onda ( $\lambda$ ) de 488 nm cuya potencia se mantuvo siempre por debajo de 15 mW para minimizar la fototoxicidad en la muestra. El objetivo utilizado fue un 40X Plan NeoFluar de inmersión en aceite y NA 1.3 (Carl Zeiss, Alemania) y los filtros de excitación y emisión se seleccionaron adecuadamente para una  $\lambda_{\text{max/ex}} = 506$  nm y una  $\lambda_{\text{max/em}} = 526$  nm del fluorocromo. Las imágenes se tomaron con una resolución de 256 x 256 píxeles y una frecuencia de adquisición de 0.5 Hz. Tanto el control del sistema como la monitorización de la señal se realizaron mediante el software LSM Pascal 5 proporcionado por el fabricante (Carl Zeiss, Alemania).

Los datos referentes a estos registros se representaron como la fluorescencia recogida a 526nm en unidades arbitrarias de fluorescencia (u.a.f.)

## 5. REGISTROS DE ELECTROFISIOLOGÍA

Los registros de electrofisiología se realizaron usando un sistema compuesto por un amplificador HEKA EPC-10 USB con una interfaz LIH 8+8 AD/DA integrada (HEKA

Elektronic, Alemania) que permite un control digital de los componentes y procesos a través del software Patchmaster (HEKA Elektronic, Alemania), sin necesidad de usar tarjeta PCI periférica. El contacto con la célula se consigue mediante un *headstage* equipado con un sistema de soporte (*holder*) de micropipetas que se controla espacialmente mediante un micromanipulador motorizado modelo MP-285 (Sutter Instruments CO, USA). El *holder* circunda un electrodo de plata clorurada que conecta con el amplificador a través del *headstage* mediante un cable coaxial con un conector BNC. Cuando se coloca una micropipeta este electrodo queda inmerso en la solución interna permitiendo el paso de corriente hacia el amplificador. Las células cultivadas en cubres de 12 mm (ver apartado 3 de este capítulo para el procedimiento de cultivo) se introdujeron en una cámara de registro modelo RC-26GLP (Warner Instruments, USA) dotada de un sistema de perfusión por gravedad controlado por válvulas. La temperatura de la perfusión se mantuvo a 32-35°C mediante un controlador bipolar de temperatura modelo CL-100 (Warner Instruments, USA) conectado a un *in-line Heater/Cooler* modelo SC-20. Las micropipetas utilizadas se fabricaron a partir de capilares de borosilicato (Sutter Instruments CO, USA) de 10 cm de longitud (diámetro interno = 0.69 mm, diámetro externo = 1.2 mm) utilizando un estirador de micropipetas horizontal modelo P-97 (Sutter Instruments CO, USA) y su punta se pulió con una microforja modelo MF-830 (Narishige, Japón), obteniéndose resistencias finales en el rango de 4-6 MΩ cuando se rellenaron con las diferentes soluciones internas. En el caso de los registros simultáneos de  $Ca_v$  y capacitancia ( $C_m$ ) se cubrió la superficie externa de la punta de la micropipeta con el elastómero *syrgard* 184 (Dow Corning Europe SA, Bélgica). La señal de corriente se filtró a 2.9 kHz mediante un filtro pasa bajas tipo *bessel* de 4 polos implementado en el amplificador. Todos los registros a excepción de los de canal unitario se realizaron a una temperatura de 32-35°C,

## Registros de Corrientes de $Ca^{2+}$

Para la medida de las corriente de  $Ca^{2+}$  se utilizó la técnica de fijación de voltaje con electrodo único en la configuración de *whole-cell* estándar con una frecuencia de adquisición de 10 kHz y una ganancia de 5 mV/pA. Durante estos registros las células se perfundieron con una solución que contenía (en mM): 118 NaCl, 10 TEA-Cl, 4.8 CsCl, 1.2  $MgCl_2$ , 5  $CaCl_2$  5 HEPES y 5 D-glucosa (pH 7.4 ajustado con NaOH). Las micropipetas se

rellenaron con una solución interna de la siguiente composición (en mM): 130 CsCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>, 10 EGTA, 3 Mg-ATP y 10 HEPES (pH 7.2 ajustado con CsOH).

El protocolo utilizado como *input* de voltaje para construir las relaciones corriente ( $I_{Ca^{2+}}$ )-voltaje ( $V_{pulsos}$ ) de las corriente de Ca<sup>2+</sup> consistió en 15 barridos con un segmento inicial y final de 20 ms a un potencial de mantenimiento ( $V_h$ ) de -70 mV, y un segmento intermedio de 50 ms en el que se incrementó el voltaje sucesivamente de -60 a +80 mV en saltos de 10 mV (**Fig 16a**). Solo se admitieron como resultados válidos para el análisis aquellos que presentaron resistencias en serie ( $R_s$ ) y corrientes de *leak* ( $I_{leak}$ ) estables y bajas (típicamente  $R_s < 12 M\Omega$ ;  $I_{leak} < 2 pA$ ), así como resistencias de sello ( $R_{sello}$ ) altas (típicamente  $R_{sello} > 3 M\Omega$ ), prestando especial atención al hecho de que no existieran diferencias significativas en ninguno de estos parámetros entre los dos grupos de estudio.

Para la medida de los parámetros relativos a las corrientes resultantes se utilizó el programa FitMaster (HEKA Elektronik, Alemania) y el procesamiento posterior de los datos así como el análisis estadístico se realizó con el programa Origin v7.0552 (OriginLab Corp, USA). Los datos relativos a la corriente de Ca<sup>2+</sup> se expresan como la integral respecto al tiempo de la corriente de entrada resultante de la activación por el pulso despolarizante a cada uno de los voltajes testados. Para la construcción de las relaciones densidad de corriente ( $\rho_{Ca^{2+}}$ )-voltaje ( $V_{pulsos}$ ) simplemente se dividió en valor de la integral por el tamaño de la célula en cada uno de los registros. La cinética de activación de la corriente de Ca<sup>2+</sup> se analizó ajustando los registros de corriente a un modelo m<sup>2</sup> de Hodgkin-Huxley mediante la herramienta que incluye el software Fitmaster para tal fin. La cinética de inactivación se analizó en base a registros realizados mediante el protocolo para corrientes de Ca<sup>2+</sup> explicado pero aumentando la duración del segmento intermedio a 500ms. Una vez obtenidos los registros de corriente se seleccionó el intervalo entre el punto máximo y la interrupción del pulso y se ajustó a una función exponencial de segundo orden de la forma:

$$I_{Ca^{2+}} = b + A_1 e^{-t/\tau_1} + A_2 e^{-t/\tau_2}$$

Donde  $I_{Ca^{2+}}$  es la corriente de Ca<sup>2+</sup>, t es el tiempo, b es la línea base,  $A_1$  y  $\tau_1$  son la amplitud y constante de tiempo del primer componente y  $A_2$  y  $\tau_2$  la amplitud y constante de tiempo del segundo componente.

## Registros de corrientes de K<sup>+</sup>

Para la medida de las corrientes de K<sup>+</sup> se utilizó la misma técnica, configuración y frecuencia de adquisición que para las corrientes de Ca<sup>2+</sup> pero la ganancia en este caso fue de 2 mV/pA. Durante estos registros las células se perfundieron con una solución que contenía (en mM): 138 NaCl, 5.6 KCl, 2.6 CaCl<sub>2</sub>, 1.2 MgCl<sub>2</sub>, 5 HEPES and 5 D-glucose (pH 7.4 ajustado con NaOH). Las micropipetas se rellenaron con una solución interna de la siguiente composición (en mM): 140 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>, 10 EGTA, 3 Mg-ATP and 10 HEPES (pH 7.2 ajustado con KOH).

El protocolo utilizado como *input* de voltaje para construir las relaciones corriente (I<sub>K<sup>+</sup></sub>)-voltaje (V<sub>pulso</sub>) consistió en 15 barridos con un segmento inicial de 100 ms a un potencial de mantenimiento (V<sub>h</sub>) de -70 mV, un segmento intermedio de 500 ms en el que se incrementó el voltaje sucesivamente de -60 a +80 mV en saltos de 10 mV y un segmento final en el que se mantuvo el voltaje a -30 mV durante 50 ms antes de volver al V<sub>h</sub> (**Fig 14b**). En este caso se aplicaron las mismas restricciones que en las corrientes de Ca<sup>2+</sup> en cuanto a las R<sub>s</sub>, I<sub>leak</sub> y R<sub>sello</sub> para la validez de los resultados.

El procesado y análisis de los datos se realizó con los mismos programas que se han indicado para los Ca<sub>v</sub>. La contribución de la corriente de Ca<sup>2+</sup> en estos registros se evaluó mediante la cuantificación del mínimo valor de corriente de entrada durante los primeros 10 ms del pulso, mientras que la contribución retrasada de la corriente de K<sup>+</sup> se evaluó midiendo el máximo de corriente evocada durante el pulso completo. La cinética de activación de la corriente de K<sup>+</sup> se analizó ajustando los registros de corriente a un modelo n<sup>4</sup> de Hodgkin-Huxley mediante la herramienta que incluye el software Fitmaster para tal fin. La cinética de inactivación se analizó en base a registros realizados mediante el protocolo para la corrientes de K<sup>+</sup> explicado pero aumentando la duración del segmento intermedio a 10s. Una vez obtenidos los registros de corriente se seleccionó el intervalo entre el punto máximo y la interrupción del pulso y se ajustó a una función exponencial de segundo orden de la forma:

$$I_{K^+} = b + A_1 e^{-t/\tau_1} + A_2 e^{-t/\tau_2}$$

Donde I<sub>K<sup>+</sup></sub> es la corriente de potasio, t es el tiempo, b es la línea base, A<sub>1</sub> y τ<sub>1</sub> son la amplitud y constante de tiempo del primer componente y A<sub>2</sub> y τ<sub>2</sub> la amplitud y constante de tiempo del segundo componente.

## Registros simultáneo de corriente de $\text{Ca}^{2+}$ y $C_m$

Los registros simultáneos de corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $C_m$  se realizaron con la técnica de fijación de voltaje con electrodo único en la configuración de *whole-cell* estándar. La monitorización de las variaciones de  $C_m$  se realizó gracias al modo *sine+DC* de la extensión *LockIn* implementada en el *software* del amplificador. Para estos experimentos se utilizó una solución de perfusión que contenía (en mM): 118 NaCl, 5.6 KCl, 20 TEA-Cl, 1.2  $\text{MgCl}_2$ , 5  $\text{CaCl}_2$ , 5 HEPES y 5 D-glucose (pH 7.4 ajustado con NaOH) y las micropipetas se rellenaron con una solución interna que contenía (en mM): 140 CsCl, 10 NaCl, 1  $\text{MgCl}_2$ , 0.05 EGTA, 3 Mg-ATP, 0.1 cAMP y 5 HEPES (pH 7.2 ajustado con CsOH).

Los protocolos fueron modificados para incluir un estímulo sinusoidal de voltaje de 20 mV de amplitud y 1 kHz de frecuencia que oscila sobre un  $V_h$  de -70 mV, lo que proporciona al amplificador la información necesaria para calcular la  $C_m$  a partir de la corriente sinusoidal resultante. Estos segmentos sinusoidales fueron interrumpidos para aplicar los pulsos cuadrados de voltaje desde un  $V_h$  de -70mV hasta 0mV. La interrupción en la medida de  $C_m$  resulta imprescindible ya que no es posible monitorizar los  $\Delta C_m$  durante la aplicación de los pulsos despolarizantes debido al incremento de G que se produce por la activación de las corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Lindau and Neher, 1988). La estimulación repetida consistió en 10 pulsos cuadrados de 500ms aplicados a una frecuencia de 1Hz o de 15 pulsos cuadrados de 50ms de duración aplicados a una frecuencia de 10Hz en función del experimento (**Fig 14e y f**). Para evaluar la dependencia de las variaciones de  $C_m$  respecto al voltaje se utilizó un protocolo de 9 barridos en el que el segmento sinusoidal se interrumpió para aplicar pulsos cuadrados de voltaje desde -40mV hasta +40mV en incrementos de 10mV (**Fig 14g**).

El procesado y análisis de los datos se realizó con los mismos programas que se han indicado para las corriente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Los datos se representan también de manera análoga a la explicada para las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  y asimismo ocurre con el cálculo de las cinéticas de inactivación.

## Registros de potencial de membrana

Los registros de  $V_{mb}$  se llevaron a cabo mediante la técnica de fijación de corriente en configuración de parche perforado. La frecuencia de adquisición fue de 5 kHz y la

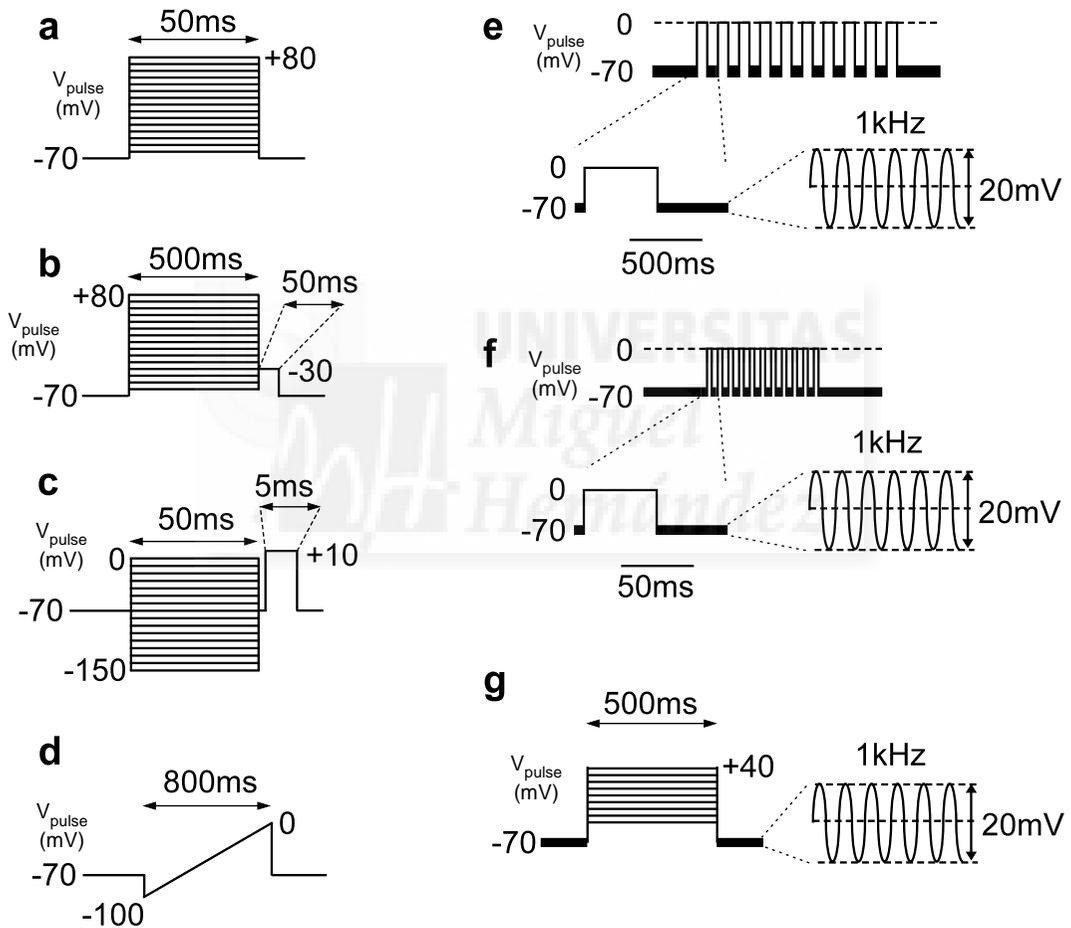
ganancia de 5 mV/pA. Para estos registros se usó una solución de perfusión que consistía en (en mM): 140 NaCl, 3.6 KCl, 1.5 CaCl<sub>2</sub>, 5 NaHCO<sub>3</sub>, 0.5 MgSO<sub>4</sub>, 0.5 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 HEPES (pH 7.4 ajustado con NaOH) y la concentración de D-glucosa que se indica en cada figura. La solución interna utilizada fue (en mM): 76 K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 NaCl, 10 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 5 HEPES (pH 7.35 ajustado con KOH) y se añadieron 0.24 mg/ml del antibiótico Anfotericina b que tiene la propiedad de formar poros en la membrana, lo que nos permite tener acceso eléctrico al interior celular. Los registros se comenzaron en fijación de voltaje para seguir el incremento en la R<sub>s</sub> hasta conseguir un valor satisfactorio (típicamente < 50 MΩ en ≈20 minutos), momento en el que se pasó a fijación de corriente y se fijó la misma a 0 pA para registrar las variaciones de voltaje mediante un protocolo consistente en un único barrido continuo de duración no limitante. El registro de voltaje se interrumpió brevemente en los tramos correspondientes a los diferentes estímulos para evaluar la conductancia del K<sub>ATP</sub> mediante rampas de voltaje. Para ello se pasó al modo de fijación de voltaje y se realizaron rampas de 800 ms en un rango de -100 a 0 mV desde un V<sub>h</sub> de -70 mV. Para cada célula se promedió la señal de corriente de 10 rampas (**Fig 14d**).

El análisis de los parámetros relativos a los registros de V<sub>mb</sub> se realizó mediante el software Clampfit 9.0 (Axon Instruments Co) y el procesamiento posterior así como el análisis estadístico con el programa Origin v7.0552 (OriginLab Corp, USA). Para el análisis de los V<sub>m</sub> a baja glucosa y entre espigas se eligieron segmentos de duración ≥2min en zonas estables y representativas de cada registro y se graficó la relación de frecuencias de cada V<sub>m</sub> en dicho fragmento. El histograma de frecuencias obtenido se ajustó a una función Gaussiana de la forma:

$$f = f_0 + \frac{A}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(V_m - \mu)^2}{2\sigma^2}}$$

Donde f es la frecuencia, f<sub>0</sub> es la línea base, A es el área bajo la curva desde f<sub>0</sub>, V<sub>m</sub> es el voltaje, μ es la media y σ la desviación estándar. Las μ obtenidas se promediaron para graficar el valor de V<sub>m</sub> alcanzado en cada segmento. El análisis de los potenciales de acción se realizó mediante la herramienta “*template search*” presente en el software de análisis Clampfit. Esta herramienta permite utilizar un potencial de acción modelo (*template*) construido en base a los registros obtenidos en los experimentos para buscar eventos similares en los fragmentos de registro seleccionados y calcular automáticamente todos los parámetros relativos a cada evento identificado.

Las rampas de voltaje se analizaron ajustando el tramo de -100 a -50 mV (donde no hay contribución de canales dependientes de voltaje) a una función lineal para calcular la conductancia (G) del  $K_{ATP}$ , este valor de G se dividió por el tamaño de la célula en cada registro para eliminar las diferencias relativas a este.



**Fig 14.** Protocolos de voltaje utilizados en los registros de electrofisiología. **(a)** protocolo para relación I-V de canales  $Ca_V$ . **(b)** protocolo para relación I-V de canales  $K_V$  **(c)** protocolo para la inactivación en estado estacionario de  $Na_V$  (identificación célula  $\beta$ ). **(d)** protocolo para la G del  $K_{ATP}$ . **(e)** protocolo para  $Ca_V$  y  $C_m$  (pulsos largos). **(f)** protocolo para  $Ca_V$  y  $C_m$  (pulsos cortos). **(g)** protocolo para relación  $I_{Ca^{2+}}-C_m$ .

## Registros de $K_{ATP}$

En el caso de los registros de canal unitario (canal  $K_{ATP}$ ) se utilizó un amplificador AXON 200B (Axon Instruments Co) conectado a un ordenador a través de una tarjeta de adquisición Digidata 1322A (Axon Instruments Co) y controlado por el software p-Clamp (Axon Instruments Co) con un sistema equivalente al ya explicado. Los registros se realizaron mediante la técnica de *patch-clamp* estándar, la señal de corriente se filtró a 1kHz y la frecuencia de adquisición fue de 10kHz. La solución de perfusión usada en este caso fue (en mM): 5 KCl, 135 NaCl, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 10 HEPES y 1.1 MgCl<sub>2</sub> (pH 7.4 ajustado con NaOH) suplementada con D-glucose como se indica en cada caso, la solución de la pipeta contenía (en mM): 140 KCl, 1MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES y 1 EGTA (pH 7.2 ajustado con KOH). Estos registros se realizaron a T<sup>a</sup> ambiente (22-24°C).

La actividad del  $K_{ATP}$  se cuantificó como el producto de la probabilidad de que el canal este abierto ( $P_0$ ) por el número de canales funcionales (N) en el parche en base a secciones de 60 segundos extraídas del registro de corriente.  $P_0$  se determinó dividiendo el tiempo total que el canal se encuentra en el estado abierto por el tiempo total de la sección analizada.

## 6. IDENTIFICACIÓN DE LA CÉLULAS $\beta$

La presencia de más de un tipo celular en el islote de Langerhans (ver apartado 1 de la introducción) hace imprescindible la utilización de métodos de identificación que nos permitan discernir si los registros han sido realizados sobre células  $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\delta$ . La identificación de las células  $\beta$  se llevó a cabo en base a diferentes parámetros en función del experimento. En el caso de las medidas ratiométricas de  $[Ca^{2+}]_i$  con la sonda fura-2-AM la utilización de un microscopio de fluorescencia convencional que nos permite recoger la señal de varios planos focales por encima y debajo del plano ecuatorial del islote, junto con la arquitectura característica del islote de Langerhans en la que todo el núcleo central está formado por células  $\beta$ , nos permite asumir que la señal detectada corresponde casi exclusivamente a la de este tipo celular. En los registros de  $Ca_v$  y los registros simultáneos de  $Ca_v$  y  $C_m$ , se identificaron las células  $\beta$  en base a su tamaño y su característica dependencia de voltaje para la inactivación de la corriente de sodio en estado estacionario. Las células  $\beta$  de ratón son típicamente más grandes que las células  $\alpha$  o  $\delta$  y la contribución transitoria de los  $Na_v$  no es observada en célula  $\beta$  de ratón a los voltajes asociados con la fase activa de disparo de potenciales de acción, mientras que sí

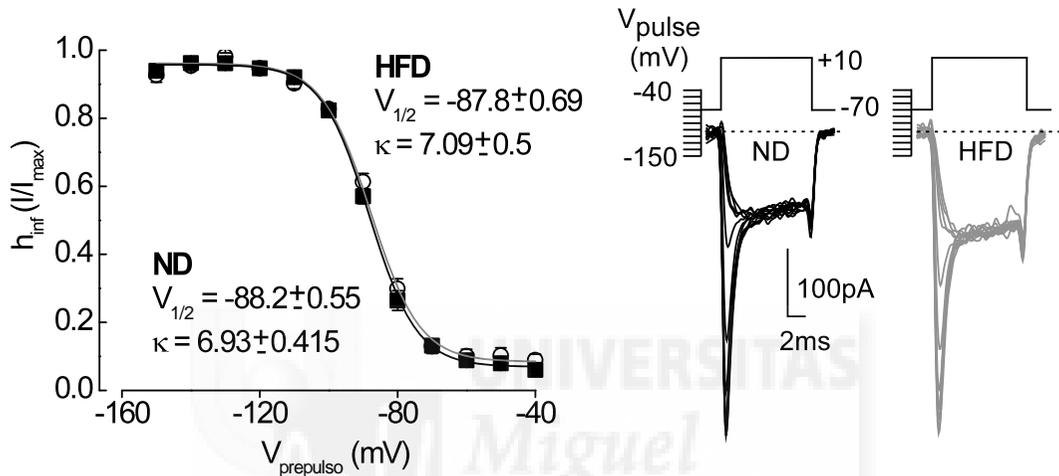
se observa en células  $\alpha$  y  $\delta$  de la misma especie (Gopel et al., 1999a). El tamaño de las células se midió mediante la compensación de la capacitancia a través del circuito implementado para tal fin en el amplificador mientras que la inactivación dependiente de voltaje de los  $\text{Na}_v$  se evaluó mediante un protocolo de 16 barridos desde un  $V_h$  de -70 mV que constó de un primer pulso (pre-pulso) de 50 ms en el que se incrementó el voltaje en saltos sucesivos de 10 mV entre -150 y 0 mV y un segundo pulso de 5 ms con un salto de -70 a +10 mV para comprobar la magnitud de la corriente remanente (**Fig 14c**). Las corrientes resultantes se representaron frente al voltaje del primer pulso y se ajustaron a una función de Boltzman de la forma:

$$h_{inf} = \frac{1}{1 + e^{\frac{(V_{1/2} - V_{pulse1})}{\kappa}}}$$

donde  $h_{inf}$  es la amplitud de corriente expresada como fracción de la amplitud máxima ( $I/I_{max}$ ),  $V_{1/2}$  es el voltaje al cual  $h_{inf} = 0.5$  y  $\kappa$  es la pendiente. En la **Figura 15** se muestran los ajustes de Boltzman para todos los registros electrofisiológicos realizados así como los valores de los parámetros  $V_{1/2}$  y  $\kappa$  obtenidos en el caso de los ratones ND y HFD. Como referencia, las células  $\alpha$  presentan valores del parámetro  $V_{1/2}$  en experimentos equivalentes de  $\approx -40\text{mV}$  (Barg et al., 2000; Gopel et al., 2000b), mientras que en las células  $\delta$  este valor se suele desplazar a valores de  $\approx -30\text{mV}$  (Gopel et al., 2000a).

En el caso de los registros de  $V_{mb}$  en células  $\beta$  aisladas en cultivo y los registros de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  con sondas fluorescentes en células individuales en islotes intactos se utilizó la respuesta característica a glucosa de los distintos tipos celulares para la identificación de las células  $\beta$ . Como se ha explicado en la introducción las células  $\beta$  expuestas a alta glucosa disparan potenciales de acción que son responsables de las variaciones de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  que activan el proceso de secreción. En el caso de las células  $\alpha$  la regulación que ejerce la glucosa sobre su patrón de disparo, y por tanto de secreción, es contrario al de célula  $\beta$ . A baja glucosa la célula  $\alpha$  dispara potenciales de acción de gran amplitud (típicamente sobrepasan los 0mV) que, según el modelo actual, disminuirían de amplitud por inactivación dependiente de voltaje de los canales implicados en la generación del mismo a alta glucosa. Esta inactivación estaría provocada por la ligera despolarización que provoca la anulación de la corriente de  $\text{K}^+$  a través del  $\text{K}_{ATP}$  cuando aumenta la glucosa (Gromada et al., 2004). Por su parte, las células  $\delta$  muestran oscilaciones de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  asociadas a la generación de potenciales de acción a  $[\text{glucosa}]_{ext}$  de 3mM y el incremento

de la misma hasta valores de 11mM no ejerce ningún efecto inhibitorio (Nadal et al., 1999). Además de esta respuesta diferencial a la glucosa de los 3 principales tipos celulares presentes en el islote, también es útil para su identificación la aparición de actividad oscilatoria sincrónica entre diferentes células que caracteriza las respuestas de la célula  $\beta$  (Nadal et al., 1999; Valdeolmillos et al., 1993).



**Fig 15.** Identificación de las células  $\beta$  mediante la inactivación de la corriente de  $Na^+$  en estado estacionario. **(a)** Ajuste de Boltzman de la relación entre  $h_{inf}$  y el voltaje del primer pulso ( $V_{prepulso}$ ). Se muestran los valores de los parámetros  $V_{1/2}$  y  $\kappa$  obtenidos en el ajuste de los datos correspondientes a los ND y HFD **(b)** Registros representativos de los experimentos realizados para evaluar la inactivación de la corriente de  $Na^+$  en estado estacionario.

## 7. EVALUACIÓN DEL TAMAÑO DE CÉLULAS $\beta$ INDIVIDUALES MEDIANTE TÉCNICAS DE INMUNOFUORESCENCIA

Las células disgregadas cultivadas en cubres de vidrio de 12 mm (ver apartado 3 de este capítulo para el procedimiento de cultivo) se fijaron por inmersión en paraformaldehído al 4% durante 12 horas, se lavaron con PBS y se sometieron a la sustitución del  $H_2O$  por alcohol, sustancia que les da rigidez y evita que se deformen, mediante la inmersión sucesiva en etanol al 30 %, 50 % y 70 % durante 3 minutos cada uno. Tras ello se lavaron con PBS, se permeabilizaron con Tritón X100 al 0.5 % durante 30 segundos y se lavaron de nuevo. Para evitar posibles uniones inespecíficas del anticuerpo se preincubaron las células con una solución bloqueante de BSA al 5 % en PBS durante 1 hora, tras lo cual se

sustituyó por una solución de suero de cabra al 1%, anticuerpo anti-glucagón hecho en ratón a una dilución 1:500 (Sigma, Madrid) y anticuerpo anti-insulina hecho en conejo a una dilución 1:200 (Santa Cruz, USA) en PBS y se incubó a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se lavó el anticuerpo primario con PBS y se sustituyó por una dilución de suero de cabra al 1%, anticuerpo anti-ratón hecho en cabra conjugado con fluorocromo Alexa-Fluor® de  $\lambda_{\text{max/ex}} = 546$  nm a una dilución 1:500 y anticuerpo anti-conejo hecho en cabra conjugado con fluorocromo Alexa-Fluor® de  $\lambda_{\text{max/ex}} = 488$  nm a una dilución 1:500 en PBS durante 2h a temperatura ambiente y en oscuridad. Pasado este tiempo se lavaron una última vez, se dejaron secar y se montaron en portas con ProLong® (Molecular Probes, Holanda) para su almacenamiento en oscuridad a 4°C hasta su utilización.

Las imágenes se tomaron en el mismo sistema confocal comentado en el apartado 4.2. La especificidad del marcaje se comprobó por la ausencia de señal en placas donde se omitió el anticuerpo primario durante el protocolo.

Para el cálculo del tamaño se eligieron las células positivas para el marcaje con insulina y se midió su radio mediante las herramientas de análisis del software LSM Zeiss Pascal 5. A partir del radio medido, se asumió la esfericidad de las células y se calculó su superficie mediante la fórmula pertinente ( $S = 4\pi r^2$ ). Una vez obtenido el dato de superficie en  $\mu\text{m}^2$  se transformó a pF usando un valor de capacidad específica de la membrana de 10 fF/ $\mu\text{m}^2$ , para su comparación directa con los tamaños obtenidos en los registros de electrofisiología.

Los datos referentes al tamaño de las células se presentan de dos formas en los resultados. Por un lado se muestran la media  $\pm$  error estándar de todas las células medidas por cada uno de los dos métodos (electrofisiología e inmunofluorescencia) y por otro se muestra la frecuencia normalizada de los tamaños celulares medidos por cada uno de los métodos, esta distribución de tamaños se ajustó a una función Gaussiana de la forma:

$$f = f_0 + \frac{A}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(p-\mu)^2}{2\sigma^2}}$$

Donde  $f$  es la frecuencia normalizada,  $f_0$  es la línea base,  $A$  es el área bajo la curva desde  $f_0$ ,  $p$  es el tamaño,  $\mu$  es la media y  $\sigma$  la desviación estándar. A partir de esta

representación se eligió un intervalo de tamaños que permitiera la comparación de los resultados en ausencia de diferencias estadísticamente significativas de este parámetro, resultando el tamaño comprendido entre 5-6.5pF indicado para tal fin ( $p > 0.05$  en todos los casos).

## **8. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO Y LA SECRECIÓN DE INSULINA**

Tras el aislamiento de los islotes se dejaron recuperar en medio de aislamiento en el incubador a 37°C y atmósfera húmeda durante 2 horas. Tras la recuperación se formaron grupos de 5 islotes (12 replicas por condición) que se transfirieron a pocillos con 400µl de una solución de secreción compuesta por (en mM): 140 NaCl, 4.5 KCl, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 20 HEPES (pH = 7.4 ajustado con NaOH) y la concentración de glucosa a testar en cada caso. Después de 1 hora, se añadieron a los pocillos 100µl de la misma solución de secreción suplementada con 5% de BSA, se dejó incubando a T<sup>a</sup> ambiente durante 3 minutos y después se depositaron las placas sobre un lecho de hielo durante 15 minutos para enfriarlas. El medio fue recogido y la cantidad de insulina en las muestras se determinó por duplicado mediante la técnica de Radioinmunoensayo (RIA) usando un kit *coat-a count* DPC (Siemens, USA). Para obtener el dato del contenido total de insulina se partió de los mismos islotes recuperados durante 2 horas. Se formaron grupos de 10 islotes y se incubaron durante toda la noche a 4°C en una solución de lisis compuesta por 70% etanol/ 0.12% HCl, esta solución destruye los islotes y permite la liberación de toda la insulina contenida en ellos. Tras la incubación se retiró la solución de etanol/HCl y se determinó la cantidad de insulina presente mediante un kit de RIA. Una vez finalizado el experimento, los islotes componentes de todas las muestras utilizadas tanto para la secreción como para el contenido de insulina se transfirieron a solución de etanol/HCl durante toda la noche y se determinó la cantidad de proteína mediante un ensayo de Bradford para establecer las relaciones insulina/proteína en cada replica.

## 9. INMUNOHISTOQUÍMICA Y EVALUACIÓN DE LA MASA DE CÉLULA $\beta$

Los páncreas completos fueron extraídos de los ratones mediante la cirugía pertinente y transferidos a una solución de paraformaldehído al 4% en la que se incubaron durante toda la noche a 4°C para su fijación. Posteriormente se embebieron en parafina y se cortaron secciones de 5  $\mu\text{m}$  de grosor mediante un micrótopo modelo RM2245 (Leica, Alemania). Tras su deshidratación mediante la inmersión sucesiva en etanol al 30 %, 50 % y 70 %, las secciones se calentaron a 100°C en presencia de 10 mM de tampón citrato (pH 6.0) durante 20 minutos. La actividad peroxidasa endógena se bloqueó mediante la incubación de las secciones en una solución de hidrógeno peroxidasa (3%) en metanol al 50% durante 30 minutos. Para evitar la unión inespecífica del anticuerpo las secciones se incubaron en una solución de BSA al 3% en PBS durante 1 hora a T<sup>a</sup> ambiente. El marcaje posterior de las células  $\beta$  se realizó mediante una solución que contuvo un anticuerpo anti-insulina humana a una dilución 1:100 (Santa Cruz Biotechnology, CA), en la que se mantuvieron las secciones toda la noche a 4°C. Al día siguiente las muestras se lavaron y se incubaron con un anticuerpo anti-conejo biotinilado IgG (H+L) (Vector Laboratories, CA) durante 1 hora a T<sup>a</sup> ambiente. Para el método de formación del complejo avidina-biotina (ABC) se utilizó el kit Vectastain ABC (Vector Laboratories, CA) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. La actividad peroxidasa se comprobó mediante 3, 3'-diaminobenzidina (DAKO, CA). Las secciones fueron contrastadas con hematoxilina, deshidratadas con una cadena de alcoholes y xileno y montadas en cubres. Para la cuantificación del área cubierta por células  $\beta$ , las secciones fueron fotografiadas en un microscopio invertido con un objetivo 20X y transferidas a un ordenador en el que se realizaron las medidas mediante el *software* de análisis Metamorph. Por cada ratón se analizaron  $\geq 2$  secciones separadas 200 $\mu\text{m}$ . Para la cuantificación del número de islotes por corte solo se tuvieron en cuenta aquellos que presentaban  $>5$  células marcadas.

Para el cálculo del tamaño de las células en los islotes intactos se partió de los mismos cortes histológicos. Se eligieron aleatoriamente islotes pertenecientes a ratones alimentados con dieta HFD o ND, se contó el número de núcleos y se calculó promedió la razón entre el área total de cada islote y el número de núcleos presentes en el mismo.

## 10. ESTADÍSTICA

En todos los casos los datos se representan como la media  $\pm$  error estándar del número de experimentos que se indica. Se consideran diferencias estadísticamente significativas cuando se obtiene un valor de  $p < 0.05$  al realizar una prueba t de student.



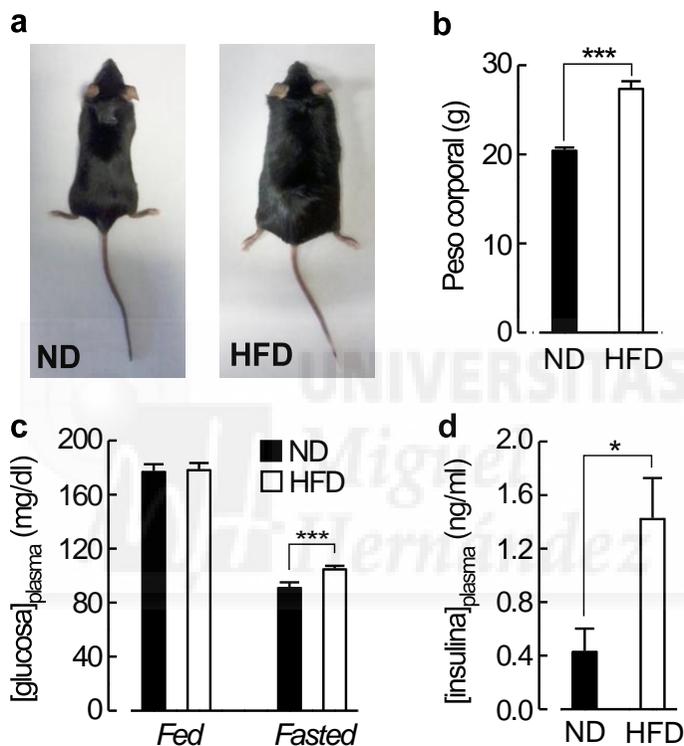


## **IV. RESULTADOS**



## 1. Establecimiento y caracterización del modelo de obesidad en ratón

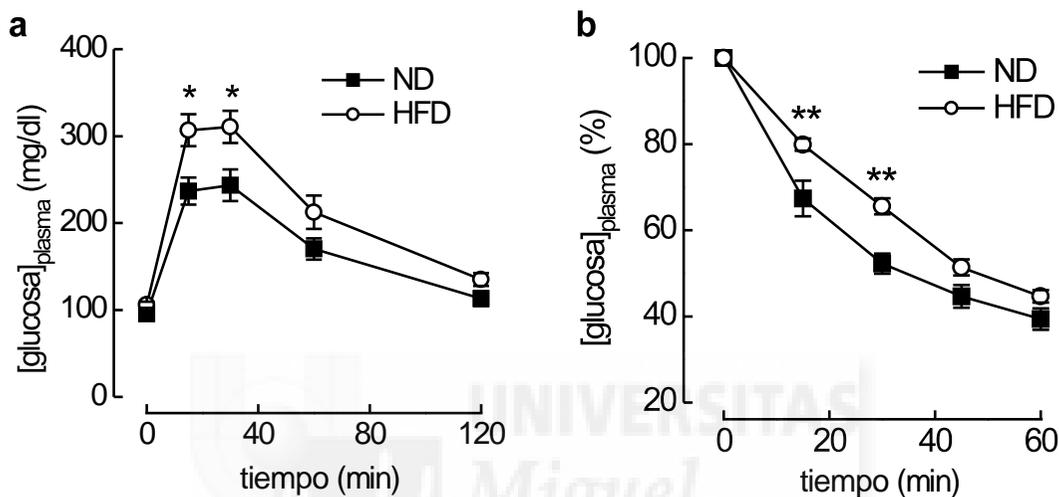
Tras 12 semanas los ratones C57BL/6J hembra alimentados con dieta rica en grasa presentaron un evidente sobrepeso (**Fig 16a**). El promedio de los valores de peso corporal fue de  $20.5 \pm 0.27$  g en los ND frente a  $27.46 \pm 0.75$  g en los HFD (**Fig 16b**).



**Fig 16.** Caracterización del modelo de obesidad: Aspecto, pesos corporales, insulinemias y glucemias. **(a)** Fotografías mostrando las diferencias cualitativas entre ratones alimentados durante 12 semanas con dieta rica en grasa (HFD) y sus controles alimentados con dieta de contenido en grasa normal (ND). **(b)** Valores de peso corporal alcanzados en los dos grupos de ratones tras las 12 semanas. **(c)** Comparación de los valores de glucosa plasmática en ambos grupos en situación de acceso libre al alimento (*Fed*) o tras un ayuno de 12 horas (*Fasted*). **(d)** Igual que en (b), pero se muestra la concentración de insulina plasmática.  $n \geq 6$  ratones para cada condición. \* $p < 0.05$  \*\*\* $p < 0.001$ .

Los niveles de glucosa plasmática en condiciones de acceso libre a la comida (*fed*) fueron idénticos, con valores de  $177.4 \pm 5.1$  mg/dl en los ND y  $178.5 \pm 4.6$  mg/dl en los HFD, mientras que sí mostraron una muy leve hiperglucemia tras 12 horas de ayuno (*fasted*),

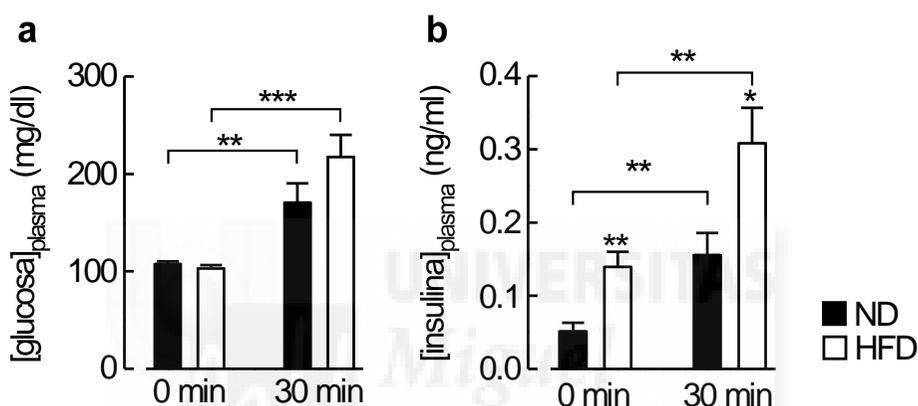
con valores de glucosa en plasma de  $91.5 \pm 3.50$  mg/dl en los ND y  $105.2 \pm 1.97$  mg/dl en los HFD (**Fig 16c**). Respecto a la concentración de insulina plasmática es necesario destacar la marcada hiperinsulinemia que presentaron los HFD frente a sus controles, con valores de  $0.43 \pm 0.2$  ng/ml en los ND frente a  $1.43 \pm 0.3$  ng/ml en los HFD (**Fig 16d**).



**Fig 17.** Caracterización del modelo de obesidad: homeostasis de la glucosa plasmática. **(a)** Progresión de los valores de glucosa plasmática durante un test de tolerancia a la glucosa en ratones alimentados con dieta rica en grasa (○) comparados con sus respectivos controles (■). **(b)** Igual que en (a) pero para un test de tolerancia a la insulina y representando la progresión respecto al punto inicial que se tomó como 100%.  $n \geq 6$  ratones para cada condición. \* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$ .

Con el fin de obtener una visión más dinámica de las alteraciones en la capacidad de mantener la homeostasis de la glucosa en estos ratones, realizamos pruebas de tolerancia a la glucosa (GTT) y de tolerancia a la insulina (ITT). En el caso de la GTT, tras un ayuno de 12 horas, los ratones presentaron niveles de glucosa en plasma de  $95.4 \pm 4.4$  mg/dl en los ND y de  $105.9 \pm 3.4$  en los HFD (**Fig 17a**), no mostrando diferencias significativas. Una vez realizada la medida inicial se les administró una sobrecarga intraperitoneal de glucosa (2g/kg) y se monitorizó la progresión de los valores de glucemia en ambos grupos. Los ratones HFD presentaron diferencias significativas en las glucemias a 15 y 30 minutos, que disminuyen a los 60 minutos, hasta desaparecer tras 2 horas, presentando valores en este último punto de  $113.0 \pm 8.4$  mg/dl en los ND y  $135 \pm 7.4$  mg/dl en los HFD (**Fig 17a**). El test de tolerancia a la insulina mostró resistencia a la hormona en

los ratones HFD. La glucemia a tiempo 0 se tomó como el 100% y se comparó la progresión de los valores de glucemia respecto a este punto. La disminución de glucemia por efecto de la insulina es más marcada en el caso de los ND. Este efecto es evidente a todos los tiempos examinados y presenta valores estadísticamente significativos en 15 y 30 minutos. La disminución (respecto al tiempo 0) en estos dos puntos es del 20.1% y 48.6% en HFD y 32.6% y 55.3% en ND para el punto de 15 y 30 minutos respectivamente (**Fig 17b**).



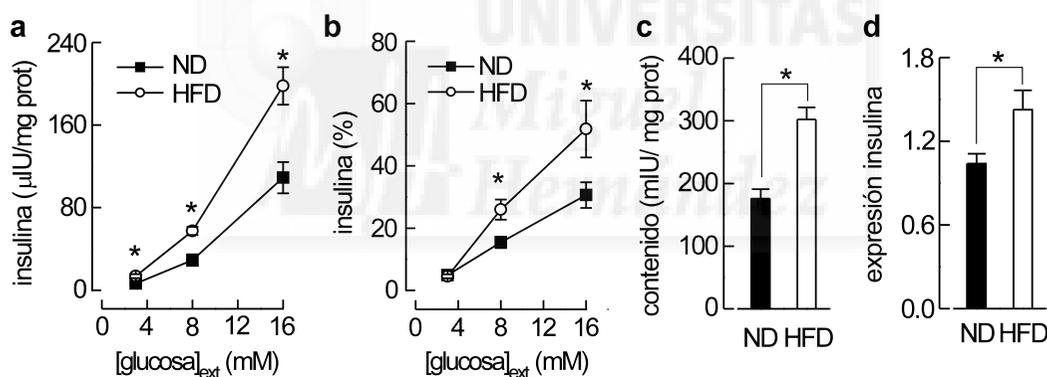
**Fig 18.** Caracterización del modelo de obesidad: relación glucemia-insulinemia durante una GTT parcial. **(a)** Comparación de los valores de glucosa plasmática en ratones ND y HFD previamente a una sobrecarga de glucosa mediante inyección intraperitoneal (0 min) y pasada media hora (30 min) desde la misma. **(b)** Valores de insulina plasmática durante el mismo experimento mostrado en (a).  $n \geq 6$  ratones para cada condición. \* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$  \*\*\* $p < 0.001$

Para evaluar de forma inequívoca que nuestro modelo se encuentra en un estadio en el que existe un incremento de los niveles circulantes de insulina para compensar la resistencia observada en la ITT y mantener la glucemia estable, realizamos una GTT parcial (solo los puntos de 0 y 30 minutos) en la que se tomaron muestras de sangre de los mismos ratones para medir la insulina plasmática asociada a las glucemias. Las glucemias a 0 minutos fueron prácticamente iguales, con valores de  $108.7 \pm 1.7$  mg/dl en los ND y de  $104.1 \pm 2.2$  mg/dl en los HFD, mientras que la insulinemia de los HFD presentó un aumento significativo respecto al ND, con valores de  $0.14 \pm 0.01$  ng/ml y  $0.05 \pm 0.01$  ng/ml respectivamente (**Fig 18a y b**). Tras 30 minutos de la administración intraperitoneal de 2g/Kg de glucosa las glucemias, pese a ser mayores en los HFD, no presentaron

diferencias significativas (ND =  $171.5 \pm 18.7$  mg/dl; HFD =  $218.6 \pm 21.5$  mg/dl;  $p = 0.1$ ). En este punto la concentración de insulina plasmática presentó un incremento aún mayor, con valores de  $0.16 \pm 0.03$  ng/ml en ND y  $0.31 \pm 0.04$  ng/ml en HFD (**Fig 18a y b**).

## 2. Los ratones alimentados con dieta HFD contienen más insulina y secretan mayores cantidades de hormona

Dado que el análisis de la insulina en plasma indicaba una actividad hipersecretora de insulina, decidimos explorar la capacidad de secreción “*in vitro*”. El análisis del contenido y la secreción de insulina mostró claras diferencias entre los ratones obesos y sus controles, aún normalizando los resultados por la cantidad de proteína para evitar diferencias debidas al tamaño de los islotes.



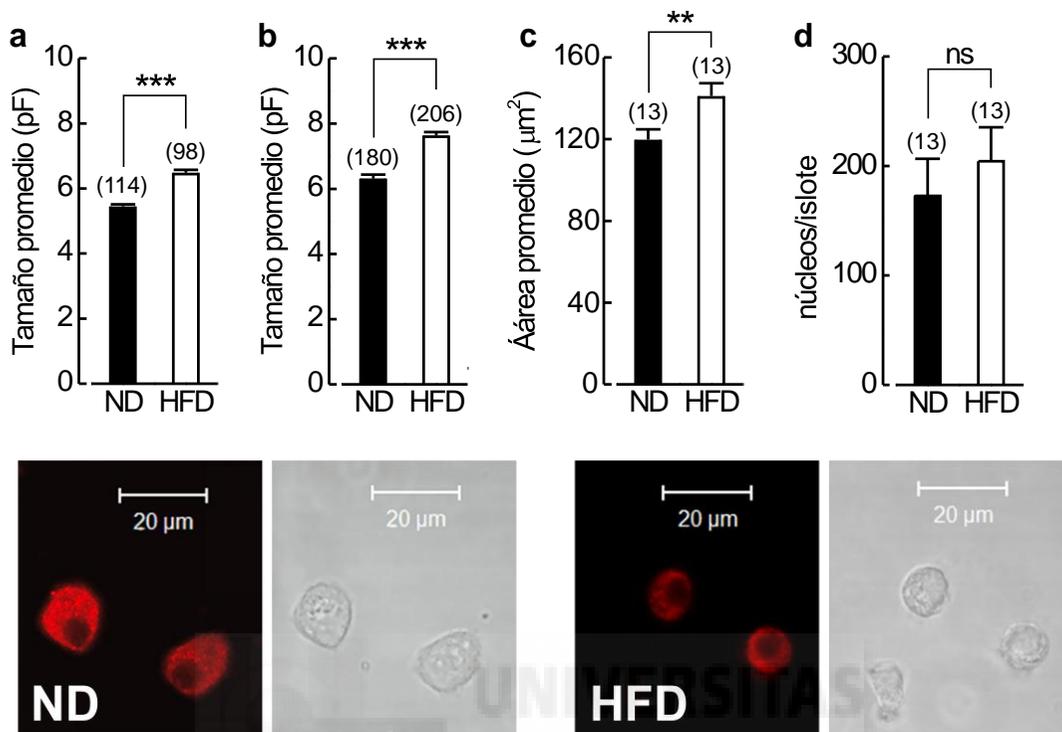
**Fig 19.** Secreción, contenido y expresión de insulina. **(a)** Secreción de insulina normalizada por el contenido de proteína en grupos de islotes aislados de ratones ND y HFD incubados estáticamente con medio de secreción suplementado con las concentraciones de glucosa que se indican. **(b)** Igual que en (a) pero esta vez normalizada por el contenido de insulina y expresada en %. **(c)** Contenido de insulina normalizado por el contenido de proteína en los islotes provenientes de los mismos ratones que en (a) y (b). **(d)** Expresión del gen de insulina.  $n \geq 6$  ratones para cada condición \* $p < 0.05$ .

En cuanto al contenido de insulina, los ratones ND presentaron valores de  $175.8 \pm 15.2$  mIU/mg proteína, mientras que los ratones HFD alcanzaron valores de  $302.2 \pm 19.1$  mIU/mg (**Fig 19c**). A su vez la secreción normalizada por contenido de proteína también se vió aumentada a todas las concentraciones de glucosa examinadas. La secreción a 3 mM glucosa en los ND fue de  $6.6 \pm 1.0$   $\mu\text{IU}/\text{mg}$  proteína frente a los  $13.7 \pm 1.9$   $\mu\text{IU}/\text{mg}$

proteína de los HFD, a 8 mM glucosa de  $29.2 \pm 5.5$   $\mu$ IU/mg proteína en ND y  $57.4 \pm 4.0$   $\mu$ IU/mg proteína en los HFD y a 16 mM glucosa de  $109.1 \pm 15.2$   $\mu$ IU/mg proteína en los ND y  $197.9 \pm 18.1$   $\mu$ IU/mg proteína en los HFD (**Fig 19a**). La progresión de la secreción respecto al aumento de la glucosa del medio en ambos grupos fue la esperada presentando los ND un incremento progresivamente mayores en 8 y 16 mM glucosa respecto a 3 mM glucosa. Los ratones HFD mantuvieron esta misma relación (**Fig 19a y b**). Cuando se expresaron los datos de secreción normalizados por el contenido de insulina, se mantuvieron las diferencias significativas a 8 y 16 mM glucosa. A 3 mM glucosa estas diferencias desaparecieron, obteniendo una secreción de  $0.05 \pm 0.008$  nIU/ml en los ND y de  $0.045 \pm 0.006$  nIU/ml en los HFD, a la vez que se mantuvo un incremento de la secreción a 8 mM glucosa (ND =  $0.15 \pm 0.018$  nIU/ml, HFD =  $0.26 \pm 0.032$  nIU/ml) y 16 mM glucosa (ND =  $0.30 \pm 0.041$  nIU/ml, HFD =  $0.52 \pm 0.091$  nIU/ml) respecto a los ND (**Fig 19b**). También comprobamos la expresión del gen de insulina mediante PCR, observándose igualmente un aumento en este experimento (**Fig 19c**).

### 3. Las células $\beta$ de los ratones alimentados con dieta HFD son de mayor tamaño

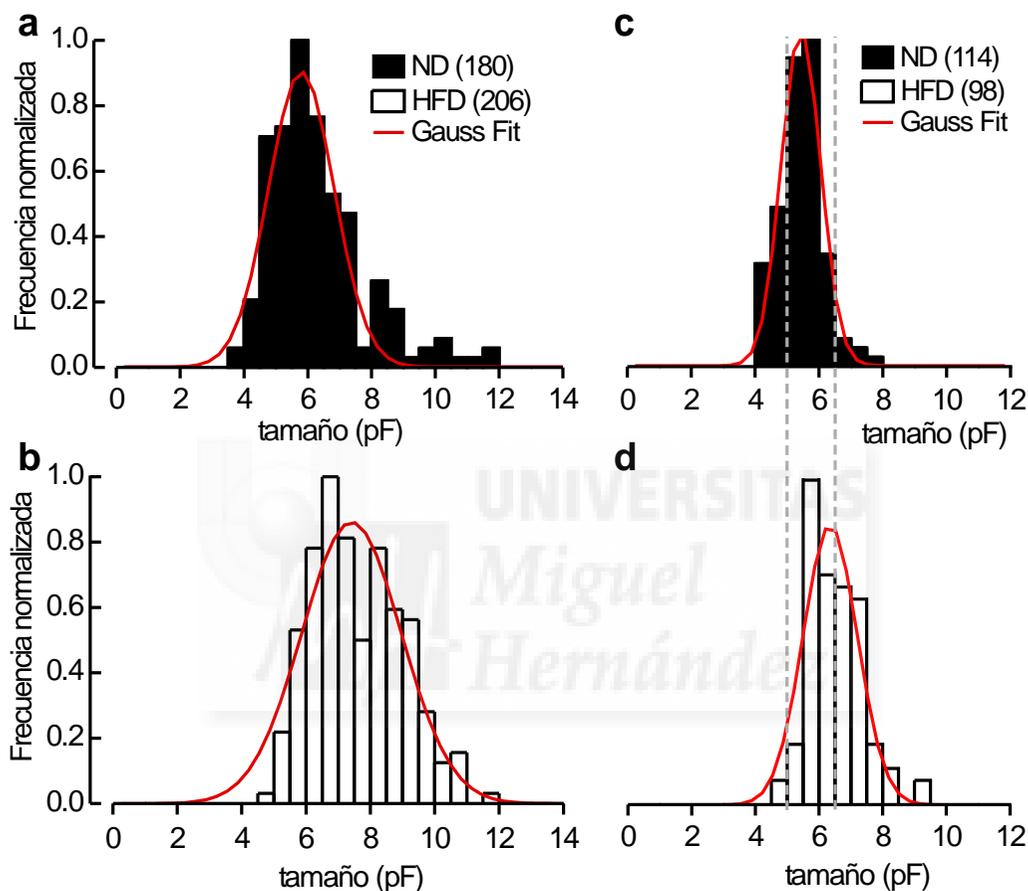
Con el fin de analizar si, además de cambios en la capacidad secretora, los ratones alimentados con dieta HFD presentaban cambios estructurales a nivel del páncreas, decidimos comenzar con el estudio del tamaño celular. Las células  $\beta$  de los ratones obesos presentaron una significativa hipertrofia, hecho que se comprobó por tres métodos diferentes. Por un lado, se midió el tamaño celular mediante la compensación de la capacitancia de la membrana en los experimentos de electrofisiología en células disgregadas en cultivo, obteniendo una media de tamaño de  $5.45 \pm 0.06$  pF en los ND frente a  $6.48 \pm 0.09$  pF en los HFD, lo que equivale a un incremento de 1.18 veces en el tamaño de las células de los HFD respecto a los ND (**Fig 20a**). Paralelamente, se evaluó el incremento de tamaño de las células mediante una inmunofluorescencia sobre un cultivo de células disgregadas, en la que se eligieron células positivas para el marcaje anti-insulina, y se midió su diámetro para calcular su superficie. En este caso se obtuvieron tamaños de  $6.3 \pm 0.12$  pF en los ND y  $7.6 \pm 0.10$  pF en los HFD (**Fig 20b**). Estos tamaños, ligeramente superiores en comparación con los obtenidos en los registros electrofisiológicos, probablemente fueron debidos a que, en la realización del experimento, el proceso de montaje de los cubres deforma ligeramente las células (Leung et al., 2005).



**Fig 20.** Evaluación del tamaño de las células  $\beta$ . **(a)** Tamaño medio de las células medido mediante la compensación de la capacitancia de la membrana en los experimentos de electrofisiología. **(b)** Igual que en (a) pero el tamaño se derivó de la medida del diámetro de células positivas para un marcaje con anticuerpos anti-insulina sobre una preparación de inmunofluorescencia y transformados a pF para su comparación. **(c)** Área media de las células calculada como la razón entre el área total del islote y el número de núcleos presentes en el mismo islote en cortes de inmunohistoquímica. **(d)** Número de núcleos por islote en el análisis de (c). En la parte inferior se muestran fotografías representativas de ND (izq) y HFD (drch) seleccionadas de la inmunocitoquímica. El número entre paréntesis encima de las barras indica el número de células (a) y (b) o de islotes (c) y (d) analizado para cada condición. \*\*  $p < 0.01$  \*\*\*  $p < 0.001$ .

No obstante, la relación se mantuvo, con un incremento de tamaño de 1.19 veces. Por último, se comprobó que este incremento de tamaño se daba también en islotes intactos. Para ello se realizó un marcaje anti-insulina en cortes de tejido pancreático fijado y parafinado, lo que permite la realización de medidas conservando la estructura nativa del tejido. El área media que ocuparon las células  $\beta$  en islotes intactos fue de  $110.97 \pm 5.0 \mu\text{m}^2$  en el caso de los ND y de  $140.10 \pm 6.3 \mu\text{m}^2$  en los HFD (**Fig 20c**), manteniéndose una vez más la relación entre ambos, con un incremento de superficie idéntico al anterior de 1.18 veces en los HFD respecto a los ND. El número de núcleos por corte que se obtuvo en esta última estimación del tamaño de las células, tampoco presentó ninguna diferencia

entre los dos grupos estudiados. En promedio se contaron un total de  $172.7 \pm 33.9$  núcleos/islote en los ND y  $204.4 \pm 31.0$  núcleos/islote en los HFD (**Fig 20d**).



**Fig 21.** Distribución de frecuencias de los tamaños de células  $\beta$  individuales. **(a-b)** Frecuencia normalizada de tamaños entre las células  $\beta$  aisladas de ratones ND **(a)** o HFD **(b)** estimada a partir del diámetro celular medido en una inmunocitoquímica con anticuerpos anti-insulina para identificar las células  $\beta$  y transformada posteriormente a pF. **(c-d)** frecuencia normalizada de tamaños entre las células  $\beta$  aisladas de ratones ND **(c)** o HFD **(d)** estimada a partir de la compensación de la capacitancia de la membrana en los experimentos de electrofisiología. — ajuste de Gauss de los datos representados. --- delimitación del rango elegido para la comparación de los grupos en ausencia de diferencias de tamaño (ver texto). El número entre paréntesis en la leyenda hace referencia al número de células analizadas en cada caso

A partir de estos datos se realizó un análisis más detallado de la distribución de los tamaños de las células  $\beta$ . En la **Figura 21** se puede observar la frecuencia normalizada de

los diferentes tamaños y su ajuste a una Gaussiana para cada caso. Los ratones ND, abarcaron un rango de tamaños entre 3.6pF-12pF en el análisis de la inmunofluorescencia, y entre 4pF-7.9pF en el análisis electrofisiológico, mientras que los HFD, abarcaron rangos de 4.6pF-11.6pF y 4.6pF-9.49pF en los mismos experimentos. Los parámetros derivados de la distribución de Gauss fueron,  $\mu = 5.80$  y  $\sigma = 2.06$  y  $\mu = 7.41$  y  $\sigma^2 = 3.09$  para los ND y HFD respectivamente en el experimento de inmunofluorescencia, y  $\mu = 5.43$  y  $\sigma = 1.22$  y  $\mu = 6.35$  y  $\sigma = 1.70$  para los ND y HFD respectivamente en la medida electrofisiológica del tamaño. Estos valores concuerdan satisfactoriamente con las medias y errores de los tamaños presentados anteriormente.

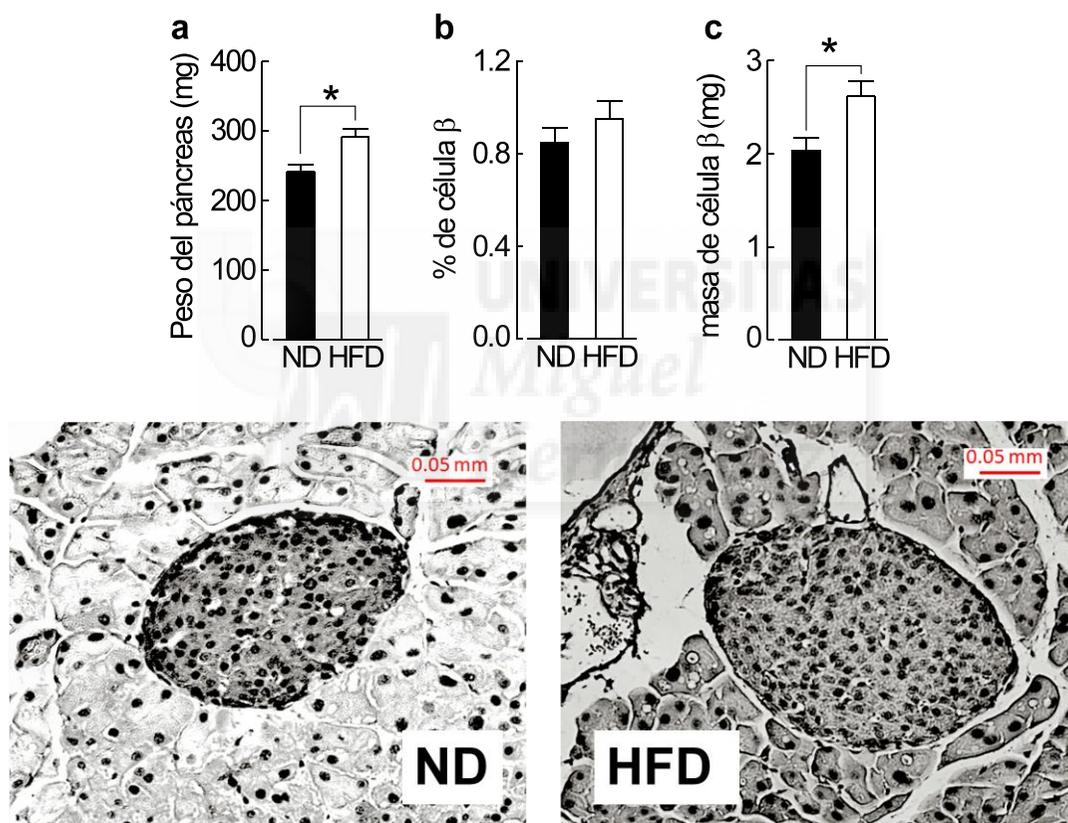
Debido a que se ha descrito una asociación entre la capacidad secretora de las células  $\beta$  y el tamaño de las mismas (Leung et al., 2005), decidimos establecer diferentes rangos de tamaños para la comparación de los resultados (Rango 1:  $x < 5\text{pF}$ ; Rango 2:  $5\text{pF} \leq x \leq 6.5\text{pF}$ ; Rango 3:  $x > 6.5\text{pF}$ ). El rango 2, a partir del cual se establecieron los demás, se eligió en base a la restricción de no presentar diferencias estadísticamente significativas al comparar los datos de tamaño pertenecientes a ambos grupos (**Fig 21c y d**). En la **Tabla 3** se resume el porcentaje de células  $\beta$  dentro de los rangos establecidos para las distribuciones realizadas a partir de las medidas de tamaño con técnicas electrofisiológicas o inmunocitoquímicas.

Rango	Tamaño (pF)	electro		inmuno	
		% de células		% de células	
		ND	HFD	ND	HFD
1	<5	25	2	42	10
2	5 - 6.5	70	52	43	45
3	>6.5	5	46	16	45

**Tabla 3.** Porcentaje de células  $\beta$  correspondiente a los rangos establecidos en función de la distribución de tamaños mostrada en la **Fig 22**. Los datos se han separado en función del experimento, electro hace referencia a los tamaños medidos en los experimentos de electrofisiología, mientras que inmuno hace referencia al análisis realizado sobre la inmunocitoquímica.

#### 4. La masa de célula $\beta$ no presenta alteraciones importantes en los ratones alimentados con dieta HFD

Uno de los procesos implicados en la respuesta adaptativa a la resistencia a la insulina y la disfunción progresiva de la célula  $\beta$  en el contexto de la DM tipo II sobre los que se posee mayor información, son las variaciones de la masa de célula  $\beta$  que ocupa los islotes de Langerhans.



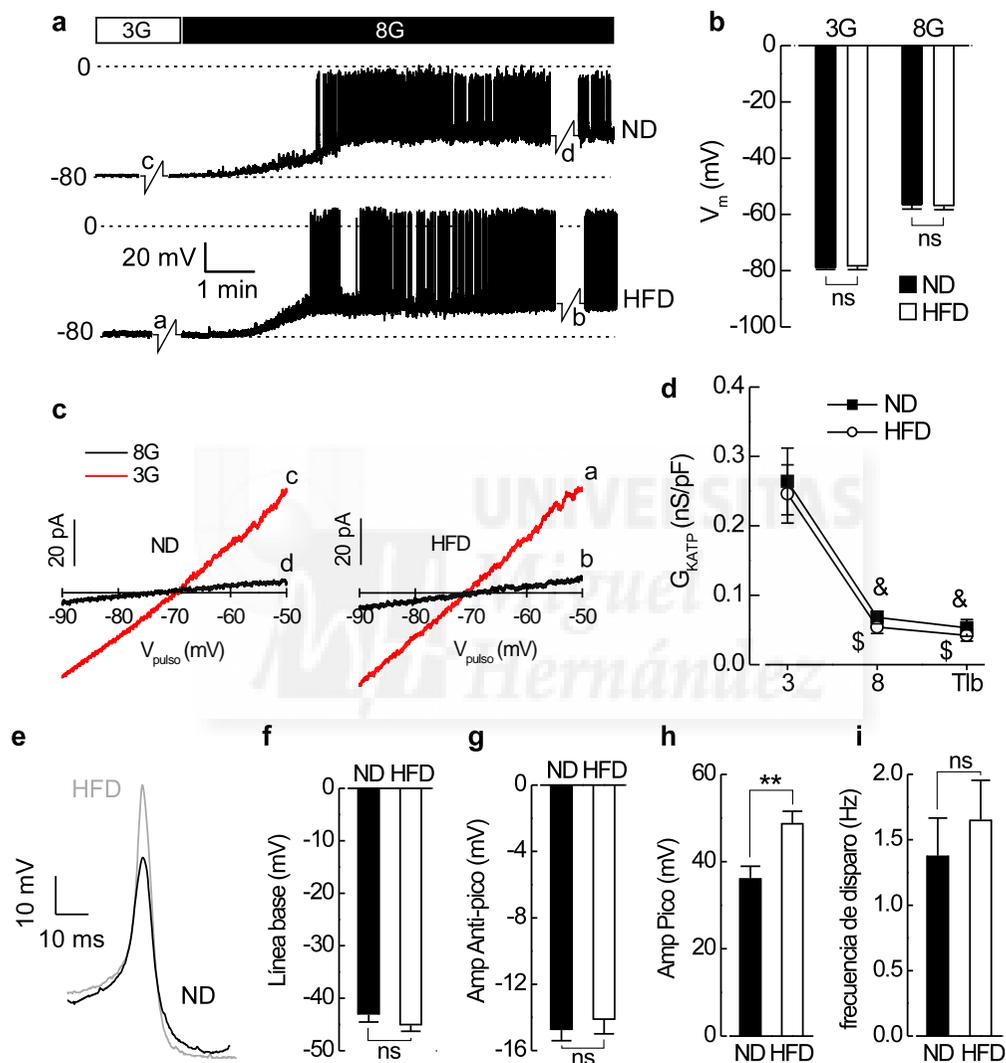
**Fig 22.** Caracterización de la masa de célula  $\beta$ . **(a)** Peso promedio de los páncreas extraídos de los ratones alimentados con dieta ND o dieta HFD. **(b)** Promedio de los Porcentajes del área total examinada ocupados por células  $\beta$  en los ratones alimentados con dieta ND o dieta HFD. **(c)** Masa de célula  $\beta$  promedio para los ratones alimentados con dieta ND o dieta HFD obtenida del producto del porcentaje de célula  $\beta$  y el peso del páncreas. Las imágenes inferiores muestran 2 islotes representativos de los cortes realizados sobre páncreas provenientes de ratones ND y HFD. ND, n = 337 islotes; HFD, n = 506 islotes \*p<0.05.

Por ello, decidimos evaluar dicho parámetro en nuestro modelo de obesidad. Los páncreas extraídos de los ratones alimentados con dieta HFD fueron significativamente más pesados que los de sus respectivos controles, con valores promedio de  $240.76 \pm 10.91$  mg en los ND y  $291.16 \pm 11.16$  mg en los HFD (**Fig 22a**). A partir de los cortes histológicos realizados con estos páncreas se cuantificó el porcentaje del área total ocupada por células  $\beta$  (masa relativa), que resultó del  $0.85 \pm 0.06$  % en los ND y del  $0.95 \pm 0.07$  % en los HFD (**Fig 22b**). Este valor, aunque superior en los HFD no resultó ser estadísticamente significativo. El valor de masa absoluta de célula  $\beta$  resulta de multiplicar el porcentaje anterior por el peso del páncreas. En nuestro modelo, la masa de célula  $\beta$  resultó de  $2.03 \pm 0.13$  mg en los ND y de  $2.62 \pm 0.16$  mg en los HFD (**Fig 22c**).

## 5. La forma del potencial de acción generado por las células $\beta$ de los ratones alimentados con dieta HFD presenta importantes diferencias respecto a sus controles

El canal  $K_{ATP}$  acopla los cambios metabólicos que producen las variaciones de  $[glucosa]_{ext}$  con la generación de potenciales de acción, que a su vez incrementan la  $[Ca^{2+}]_i$  y activan la exocitosis. Las células  $\beta$  individuales provenientes de los ratones alimentados con dieta HFD presentaron un patrón de actividad eléctrica en respuesta a glucosa normal, pero importantes variaciones en la forma de los potenciales de acción generados a 8 mM Glucosa. Estos experimentos se realizaron en configuración de *perforated-patch* para preservar intacto el medio intracelular y la capacidad metabólica de las células. Cuando se perfundieron las células con medio suplementado con 3 mM Glucosa las células de los ND se mantuvieron en un potencial de reposo de  $-78 \pm 0.7$  mV y las de los HFD en un potencial prácticamente idéntico de  $-78 \pm 1$  mV (**Fig 23a y b**) con una conductancia del  $K_{ATP}$  asociada a esta fase de  $0.26 \pm 0.05$  nS/pF en los ND y de  $0.25 \pm 0.04$  nS/pF en los HFD (**Fig 23c y d**). El valor de  $V_{rep}$  se encuentra muy próximo al valor teórico calculado a partir de la ecuación de Goldman en nuestras condiciones experimentales ( $V_{rep} = -84$  mV con  $p_{Na^+}/p_{Cl^-} = 0.1$ ,  $p_{K^+}/p_{Cl^-} = 10$ ,  $p_{K^+}/p_{Na^+} = 100$  y  $T^a = 34^\circ C$ ) y, debido a la conductancia dominante del potasio a estas concentraciones de glucosa en célula  $\beta$ , también al  $V_{rev}$  de este ión (en nuestras condiciones experimentales  $V_{rev(K^+)} = -101$  mV). El incremento de la concentración de glucosa a 8 mM produjo una paulatina despolarización en ambos grupos hasta alcanzar el umbral de disparo de potenciales de acción, el potencial entre espigas alcanzado en esta fase activa fue de  $-56 \pm 0.7$  en los ND y de  $-57 \pm 1.3$  en los HFD (**Fig 23 a y b**), con una

conductancia del  $K_{ATP}$  asociada de  $0.068 \pm 0.009$  nS/pF y  $0.054 \pm 0.009$  nS/pF en ND y HFD respectivamente (**Fig23 c y d**).



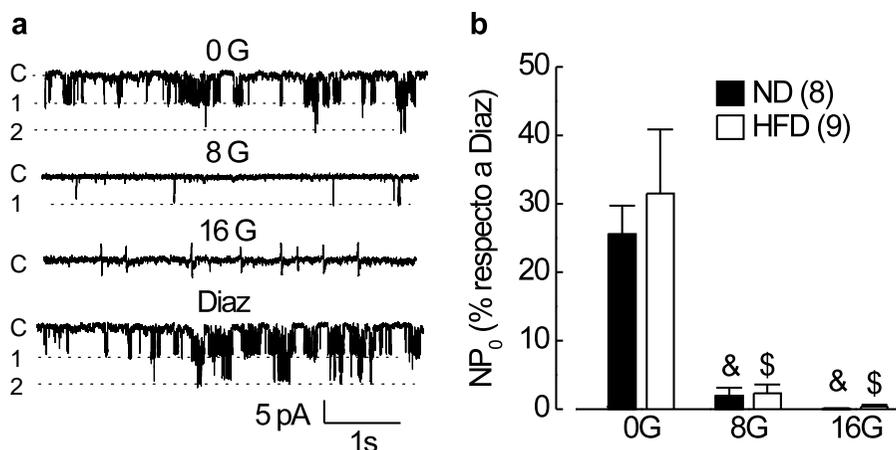
**Fig 23.** Alteraciones en el patrón de generación de la actividad eléctrica y en la forma del potencial de acción. **(a)** Registros representativos de los experimentos *perforated-patch* donde se puede ver la respuesta del  $V_{mb}$  a 3 y 8 mM de glucosa en células  $\beta$  individuales provenientes de los ratones ND y HFD, el símbolo que interrumpe el registro indica los cambios a *voltaje-clamp* para realizar las rampas mostradas en (c). **(b)** Análisis de los experimentos mostrados en (a) donde se puede ver el  $V_{mb}$  medio alcanzado a 3 y 8 mM Glucosa. **(c)** Rampas de voltaje representativas a 3 y 8 mM Glucosa en células  $\beta$  de ratones ND y HFD. **(d)** Análisis de la conductancia del  $K_{ATP}$  ( $G_{KATP}$ ) a partir

Al analizar en detalle los potenciales de acción generados a 8 mM glucosa se observó que no existían diferencias en el potencial a partir del cual arranca la fase ascendente, presentando valores de  $-43\pm 1$  mV en los ND y  $-45\pm 1$  mV en los HFD (**Fig23e** y **f**). Asimismo no se observaron diferencias en el potencial que se alcanzó en la fase refractaria, con valores de amplitud del anti-pico de  $-15\pm 0.6$  mV en los ND y de  $-14\pm 0.8$  mV en los HFD (**Fig23 e** y **g**), ni en la frecuencia de disparo (ND =  $1.4\pm 0.3$  Hz; HFD =  $1.6\pm 0.3$  Hz) (**Fig23i**). Sin embargo, donde se encontraron diferencias significativas fue en la amplitud del pico, con valores de  $36.2\pm 2.7$  mV (pico a  $-6.9\pm 2$  mV) en los ND y  $49\pm 2.7$  mV (pico a  $3.7\pm 2$  mV) en los HFD (**Fig23e** y **h**). Como se comentará más adelante en la discusión, este incremento en la amplitud del potencial de acción puede representar un factor importante de cara a la potenciación de la excitación.

El comportamiento del  $K_{ATP}$  también se evaluó mediante la realización de registros de canal unitario en la configuración de *cell-attached* (**Fig 24**). El análisis de estos registros muestra que el porcentaje de la probabilidad de apertura ( $NP_0$ ) del diazóxido (100%) alcanzado en ausencia de  $[glucosa]_{ext}$  es de  $25.54\pm 4.18$  % en los ND y  $31.50\pm 9.38$  % en los HFD (**Fig 24b**). El incremento de la  $[glucosa]_{ext}$  produce la esperada disminución de la  $NP_0$  debido al cierre del canal tras la metabolización del azúcar y el aumento de la  $[ATP]_{int}$ . A 8 mM de  $[glucosa]_{ext}$  el porcentaje disminuye hasta  $1.96\pm 1.17$  % en los ND y  $2.3\pm 1.29$  % en los HFD mientras que a 16 mM de  $[glucosa]_{ext}$  la  $NP_0$  es prácticamente 0 (ND =  $0.07\pm 0.07$  %; HFD =  $0.38\pm 0.25$  %) (**Fig 24b**). El análisis estadístico de las  $NP_0$ , mostró diferencias significativas dentro de cada grupo en 8 y 16mM de glucosa respecto a 0mM. Por el contrario, este mismo análisis comparando ambos grupos a cada  $[glucosa]_{ext}$  no mostró ninguna diferencia significativa.

---

**Fig 23 (cont)** de las rampas de voltaje mostradas en (c). **(e)** Potenciales de acción medidos a 8 mM Glucosa en células  $\beta$  provenientes de ratones ND (—) o HFD (---), alineados para que coincidan temporalmente y poder comparar diferencias en su forma. **(f)** Análisis del  $V_{mb}$  de partida de la fase ascendente del potencial de acción en ND y HFD. **(g)** Análisis de la amplitud desde el potencial de partida hasta el anti-pico en el  $V_{ref}$  del potencial de acción en ND y HFD. **(h)** Análisis de la amplitud desde el potencial de partida hasta el pico máximo alcanzado en la fase ascendente del potencial de acción en ND y HFD. **(i)** Análisis de la frecuencia de disparo de potenciales de acción en ND y HFD. ND,  $n=16$  células; HFD,  $n= 13$  células. En **(f-i)** se analizaron 2533 potenciales de acción para ND y 3539 para HFD. \*\* $p<0.01$ ; ns = no existen diferencias estadísticamente significativas;  $^{\&}p<0.05$  respecto a 3 glucosa para ND;  $^{\$}p<0.05$  respecto a 3 glucosa para HFD. G: Glucosa.



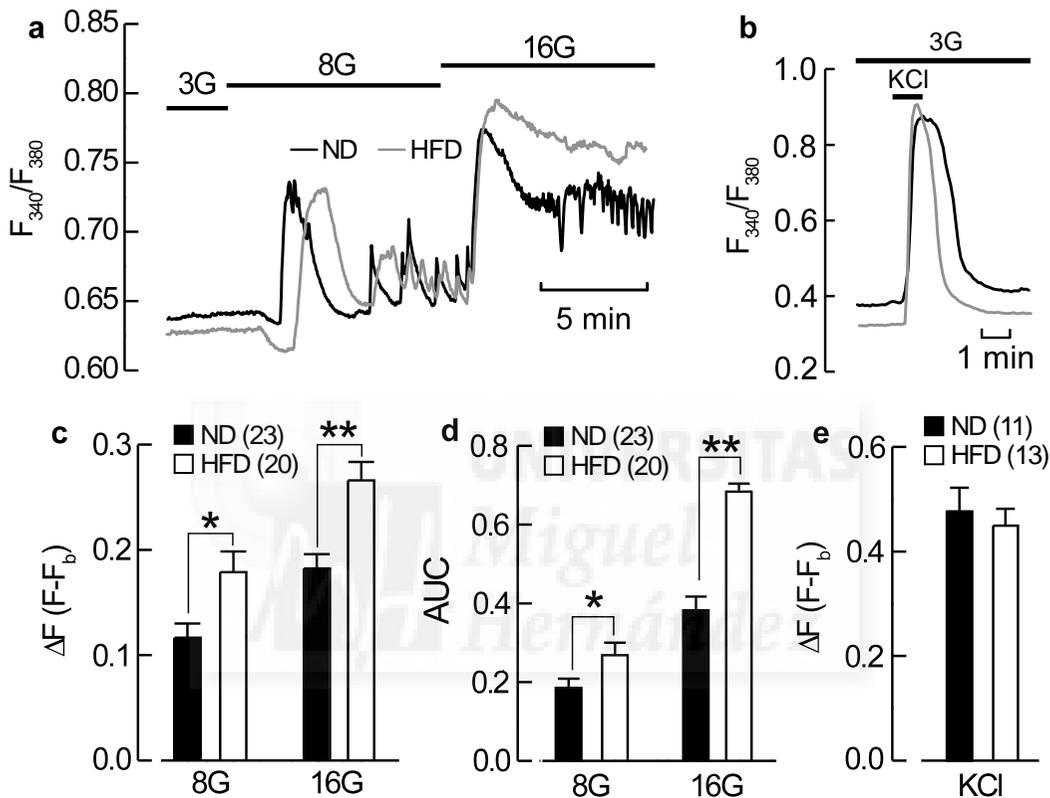
**Fig 24.** Probabilidad de apertura del K<sub>ATP</sub> a nivel de canal unitario. **(a)** Fragmentos representativos los registros de K<sub>ATP</sub> en configuración de *cell-attached* a las diferentes [glucosa]<sub>ext</sub> analizadas. **(b)** Probabilidad de apertura (NP<sub>0</sub>) del K<sub>ATP</sub> a las diferentes [glucosa]<sub>ext</sub> analizadas, representado como el porcentaje respecto al efecto del diazóxido que se estableció como el 100%. C representa el nivel de corriente basal, 1 el primer nivel correspondiente a la apertura de al menos un canal, 2 correspondería a la apertura de 2 canales. Entre paréntesis se muestra el número de células registradas en cada caso. & *p* < 0.05 respecto a 3 glucosa para ND; \$ *p* < 0.05 respecto a 3 glucosa para HFD. G: Glucosa; Diaz: Diazóxido

## 6. Los ratones alimentados con dieta HFD muestran alteraciones en la respuesta de las variaciones de Ca<sup>2+</sup> intracelular

El ión Ca<sup>2+</sup> es un segundo mensajero intracelular implicado en la regulación de una gran cantidad de procesos celulares. En el presente trabajo nos interesa especialmente debido a que el incremento de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, activado por el aumento de la [glucosa]<sub>ext</sub>, representa la señal que activa la secreción de insulina en células β. Para evaluar las diferencias en el comportamiento de las variaciones de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> entre nuestros grupos de estudio hemos utilizado experimentos de microfluorimetría con sondas sensibles a Ca<sup>2+</sup> en dos preparaciones distintas. En primer lugar, hemos realizado experimentos en islotes intactos con la sonda fura-2-AM. Los islotes provenientes de los ratones alimentados con dieta HFD mostraron una razón F<sub>340</sub>/F<sub>380</sub> basal a [glucosa]<sub>ext</sub> no estimuladora (3 mM) significativamente inferior a los controles. Los valores de esta F<sub>340</sub>/F<sub>380</sub> basal fueron de 0.68±0.010 en los ND y de 0.65±0.008 en los HFD.

Los mismos islotes sometidos a estimulación por incremento de la [glucosa]<sub>ext</sub> hasta 8 mM presentaron un patrón de incremento de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> bifásico. Este patrón, típico de la respuesta

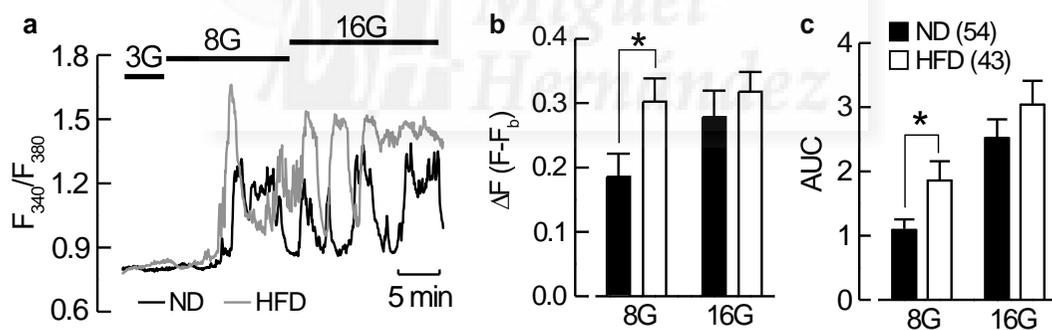
del islote intacto, se caracteriza por presentar un incremento inicial transitorio cuya magnitud descende hasta un nivel inferior al máximo alcanzado, pero superior al nivel basal, sobre el que se producen oscilaciones de mayor frecuencia (Fig 25a).



**Fig 25.** Variación de  $[Ca^{2+}]_i$  en respuesta a glucosa y KCl en islote intacto. **(a)** Registros representativos de variaciones de  $[Ca^{2+}]_i$  en respuesta a las  $[glucosa]_{ext}$  indicadas en islotes intactos de ratones ND y HFD. **(b)** Registros representativos de variaciones de  $[Ca^{2+}]_i$  en respuesta a 75mM KCl en islotes intactos de ratones ND y HFD. **(c)** Promedio de incrementos de fluorescencia máximos ( $\Delta F$ ) en islotes de ratones ND y HFD a las distintas  $[glucosa]_{ext}$  que se indican. **(d)** Promedio de  $\Delta F$  en respuesta a KCl en islotes de ratones ND y HFD. **(e)** Análisis del área bajo la curva (AUC) en los experimentos mostrados en (a). Entre paréntesis se muestra el número islotes registrados. G: Glucosa;  $F_b$ : Fluorescencia basal. \* $p < 0.05$

El incremento de  $Ca^{2+}$  alcanzado durante el primer transitorio fue de  $0.12 \pm 0.013$  en los ND y de  $0.18 \pm 0.019$  en los HFD, con diferencias estadísticamente significativas entre ambos (Fig 25c). Un posterior aumento de la  $[glucosa]_{ext}$  hasta 16 mM produjo un nuevo incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$ . El efecto esperado con este segundo aumento de la  $[glucosa]_{ext}$  a

16 mM es una disminución de la frecuencia por el ensanchamiento de las oscilaciones, no obstante, en muchos islotes se produjo un incremento de  $[Ca^{2+}]_i$  que se mantuvo a un nivel elevado y sin oscilaciones. Este último efecto se observó tanto en los ND como en los HFD. El incremento de  $[Ca^{2+}]_i$  alcanzado a 16 mM de  $[glucosa]_{ext}$  fue de  $0.18 \pm 0.013$  en los ND y de  $0.27 \pm 0.017$  en los HFD (**Fig 25c**). También se analizó el área bajo la curva (AUC) sobre los mismos registros de variación de  $[Ca^{2+}]_i$ . A una  $[glucosa]_{ext}$  de 8 mM los ND presentaron valores de AUC de  $0.19 \pm 0.02$  y los HFD un AUC significativamente superior de  $0.27 \pm 0.02$  (**Fig 25d**). Los valores de AUC a una  $[glucosa]_{ext}$  de 16 mM también fueron significativamente superiores (ND =  $0.38 \pm 0.032$ ; HFD =  $0.69 \pm 0.018$ ) (**Fig 25d**). Estos experimentos indican por tanto que el incremento de la  $[glucosa]_{ext}$  induce señales de  $[Ca^{2+}]_i$  mayores en los islotes de los ratones HFD. Por último, utilizamos KCl como estímulo para investigar el efecto de una despolarización no dependiente del incremento en la  $[ATP]_{int}$  y el cierre del  $K_{ATP}$  (**Fig 25b**). En este caso obtuvimos incrementos de  $0.48 \pm 0.045$  en los ND y de  $0.45 \pm 0.032$  en los HFD (**Fig 25e**), sin diferencias significativas entre ambos valores.

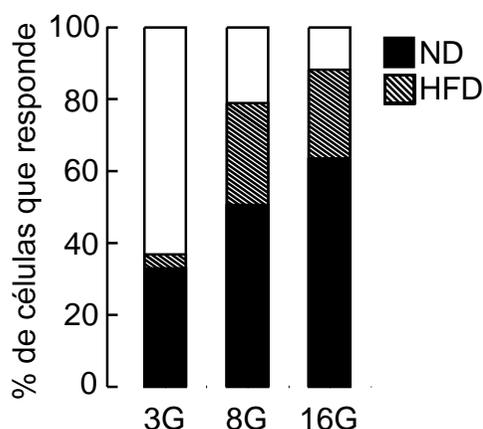


**Fig 26.** Variación de  $[Ca^{2+}]_i$  en respuesta a glucosa en células  $\beta$  aisladas. **(a)** Registros representativos de variaciones de  $[Ca^{2+}]_i$  en respuesta a las  $[glucosa]_{ext}$  indicadas en células aisladas en cultivo provenientes de ratones ND y HFD. **(b)** Promedio de incrementos de fluorescencia ( $\Delta F$ ) en células aisladas de ND y HFD a las distintas  $[glucosa]_{ext}$  que se indican. **(c)** Análisis del área bajo la curva (AUC) en los experimentos mostrados en (a). *Entre paréntesis se muestra el número islotes registrados. G: Glucosa;  $F_b$ : Fluorescencia basal. \* $p < 0.05$ .*

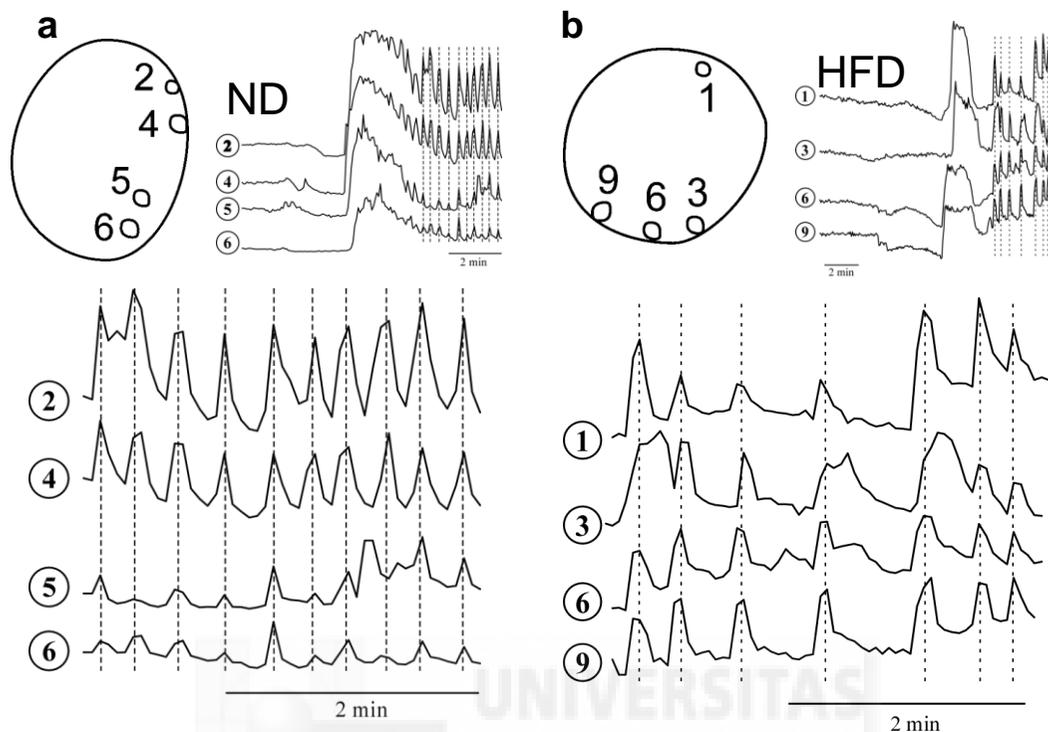
Una vez evaluados los resultados en islote procedimos a repetir el mismo experimento en células aisladas. Las células aisladas en cultivo de ambos grupos mostraron una  $F_{340}/F_{380}$  basal ( $[glucosa]_{ext} = 3$  mM) igual, con valores de  $0.86 \pm 0.016$  los ND y  $0.86 \pm 0.018$  los HFD.

El incremento de  $[glucosa]_{ext}$  produjo un aumento del  $[Ca^{2+}]_i$  con un patrón de incremento muy desigual entre células, como es habitual en este tipo de preparación (**Fig 26a**). El incremento alcanzado en este caso a 8 mM de  $[glucosa]_{ext}$  fue de  $0.18 \pm 0.036$  en los ND y de  $0.30 \pm 0.036$  en los HFD, mientras que a una  $[glucosa]_{ext}$  de 16 mM fue de  $0.28 \pm 0.041$  en los ND y de  $0.32 \pm 0.030$  en los HFD (**Fig 26b**). Respecto a este incremento, el único valor estadísticamente significativo fue el de 8 mM. Al igual que en el caso de los islotes también evaluamos el AUC a ambas  $[glucosa]_{ext}$ . A 8 mM de  $[glucosa]_{ext}$  los HFD mostraron un incremento de AUC estadísticamente significativo con valores de  $1.10 \pm 0.15$  en los ND y de  $1.87 \pm 0.29$  en los HFD (**Fig 26c**). Los valores a  $[glucosa]_{ext}$  de 16 mM también fueron significativamente superiores (ND =  $2.53 \pm 0.27$ ; HFD =  $3.05 \pm 0.35$ ) (**Fig 26c**).

Los registros de fura-2-AM en células aisladas en cultivo, también nos permitieron realizar un análisis del porcentaje de células que responden a cada una de las  $[glucosa]_{ext}$  utilizadas. A una  $[glucosa]_{ext}$  subestimuladora de 3 mM se observaron incrementos de  $[Ca^{2+}]_i$  (independientemente de su magnitud) en un 33% de las células  $\beta$  de los ND y en un 37% de las células  $\beta$  de los HFD (**Fig 27**). Tras el incremento a 8 mM respondieron el 50% de las células  $\beta$  de los ND y en un 79% de las células  $\beta$  de los HFD (**Fig 27**). Por último, el incremento a 16 mM hizo que respondieran el 63% de las células  $\beta$  de los ND y el 88% de las células  $\beta$  de los HFD (**Fig 27**), indicando que el estímulo con glucosa genera un “reclutamiento” mayor de células  $\beta$  en el caso de los HFD.



**Fig 27.** Porcentaje de células  $\beta$  aisladas en cultivo provenientes de ratones alimentados con dieta ND o HFD que muestra incrementos de  $[Ca^{2+}]_i$  a cada una de las  $[glucosa]_{ext}$  utilizadas en los experimentos de fura-2-AM. ND,  $n=85$  células; HFD  $n=76$  células. G: Glucosa.



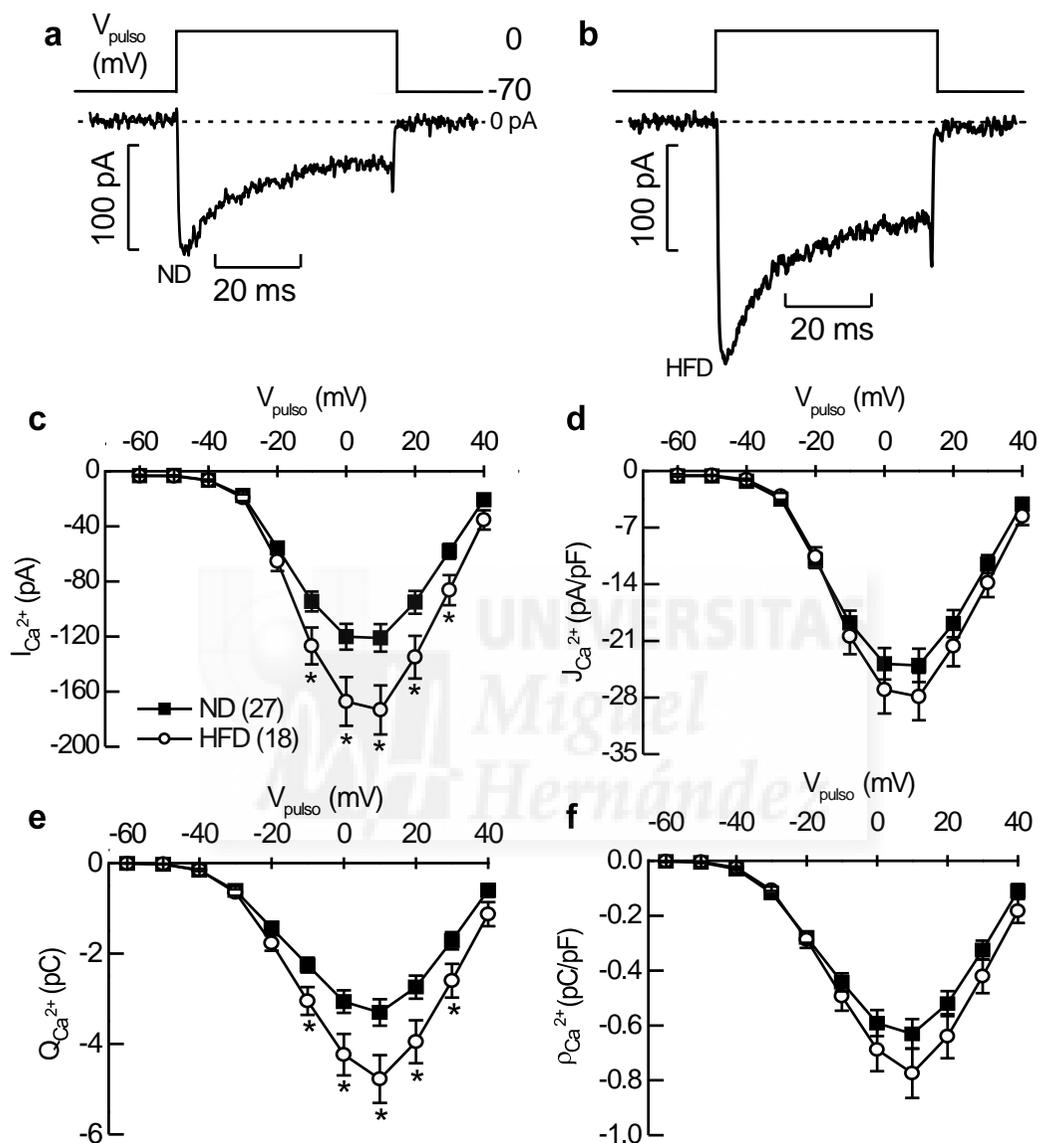
**Fig 28.** Variación de  $[Ca^{2+}]_i$  en respuesta a glucosa en célula  $\beta$  individual en islote intacto. **(a)** En la parte superior se muestran registros representativos de células  $\beta$  individuales en islotes intactos de ratones ND obtenidos tras un incremento de  $[glucosa]_{ext}$  a 11 mM (drcha), cuya posición se muestra en el esquema (izq). En la parte inferior se presentan los mismos registros pero con una escala de tiempo expandida para mostrar en detalle la sincronía de las oscilaciones de alta frecuencia. **(b)** Igual que en (a) pero para células  $\beta$  individuales en un islote intacto de HFD. Los registros mostrados son representativos de los resultados obtenidos en 19 células de 4 islotes de ratones ND y en 54 células de 7 islotes de ratones HFD.

Otro de los factores determinantes de la magnitud de la respuesta excitotica en islote intacto es la capacidad que presentan las células  $\beta$  individuales de responder de forma sincrónica cuando se conserva intacta la arquitectura del islote. Para evaluar posibles modificaciones de esta sincronía que propicien alteraciones en la capacidad secretora de los ratones HFD llevamos a cabo experimentos de microfluorimetría con sondas de  $Ca^{2+}$  en islote intacto mediante microscopía confocal. Los valores promedio de  $F_{510}$  basales obtenidos a  $[glucosa]_{ext}$  de 0.5 mM fueron de  $102 \pm 7.8$  unidades arbitrarias de fluorescencia (uaf) en los ND ( $n = 28$  células  $\beta$ ) y de  $62 \pm 3.65$  uaf en los HFD ( $n = 56$  células  $\beta$ ). Cuando aumentamos la  $[glucosa]_{ext}$  a 11 mM se produjo el mismo patrón bifásico de incremento de  $Ca^{2+}$  descrito para el islote intacto. Los valores de incremento de  $Ca^{2+}$  máximo en el

transitorio inicial tras este estímulo fueron de  $74 \pm 4.54$  uaf y de  $119 \pm 4.54$  uaf en ND y HFD respectivamente. Al igual que en los experimentos realizados en islote intacto con la sonda fura-2-AM, tanto el  $F_{510}$  basal como el incremento de fluorescencia presentan una diferencias estadísticamente significativa. El alineamiento temporal de estos registros nos permitió evaluar posibles alteraciones de la sincronía. A este respecto, no se observó ninguna anomalía entre los islotes provenientes de ratones ND ó HFD, ni a nivel del primer transitorio, ni de las oscilaciones de alta frecuencia posteriores (**Fig 28a y b**), por lo que descartamos posibles efectos debidos a la modificación en la sincronía de las señales de  $Ca^{2+}$ .

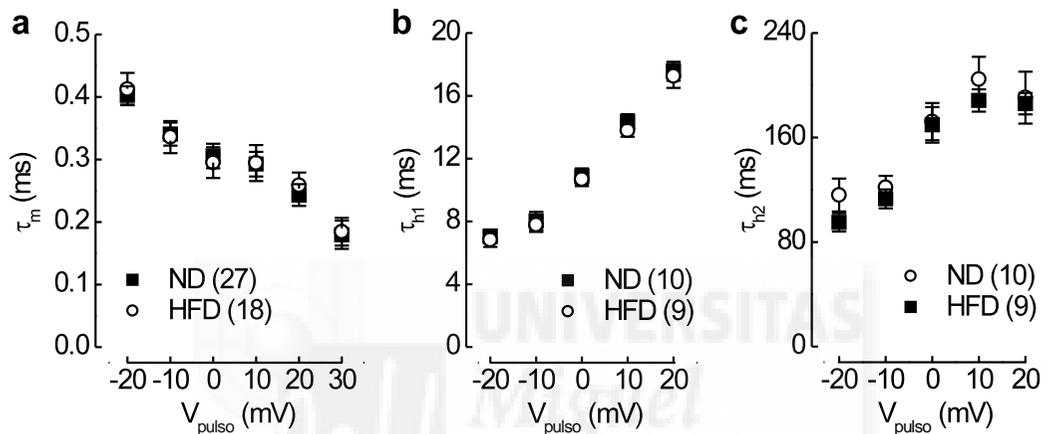
## 7. Las células $\beta$ de los ratones alimentados con dieta HFD presentan un incremento de corriente de $Ca^{2+}$ proporcional a su aumento de tamaño

Debido a su papel como mediadores del influjo de  $Ca^{2+}$  responsable de la generación del potencial de acción y la exocitosis, era necesaria la caracterización básica de los  $Ca_v$  en nuestro modelo de obesidad. La relación  $I_{Ca^{2+}}-V_{pulsos}$  muestra que la dependencia de la activación de los  $Ca_v$  con el voltaje es la misma en las células  $\beta$  de los ratones obesos y los controles (**Fig 29**). Ambos grupos presentan un  $V_{on}$  de -30mV por encima del cual la corriente se incrementa progresivamente hasta alcanzar el máximo entre 0 y +10 mV, a voltajes más positivos se produce una paulatina disminución hasta que la corriente se revierte a los +50mV. En cuanto a la magnitud de las corrientes medidas, los ratones alimentados con dieta rica en grasa presentaban mayores corrientes de entrada de calcio, pero densidades de corriente (corriente de entrada por unidad de superficie de membrana) iguales (**Fig 29c y d**). Al establecer las relaciones  $I_{Ca^{2+}}(pA)-V_{pulsos}(mV)$  se observaron diferencias significativas en la  $I_{Ca^{2+}}$  con  $V_{pulsos}$  entre -10 y +30 mV. Los valores de  $I_{Ca^{2+}}(max)$  se obtuvieron con  $V_{pulsos}$  de +10 mV, siendo de  $-121 \pm 10$  pA y  $-173 \pm 18$  pA en el caso de ND y HFD respectivamente (**Fig 29c**). Al normalizar estos datos por el tamaño de la célula para obtener las relaciones de  $J_{Ca^{2+}}(pA/pF)-V_{pulsos}(mV)$  las diferencias desaparecieron, obteniendo valores de  $-24 \pm 2$  pA/pF en los ND y  $-28 \pm 3$  pA/pF en los HFD (**Fig 29d**). Una representación alternativa de estos resultados a partir del cálculo de la integral de la corriente de entrada de  $Ca^{2+}$ , nos permitió evaluar diferencias entre los dos grupos relacionadas con cambios en la cinética de apertura o cierre del canal. En esta nueva representación se observó una respuesta máxima a  $V_{pulsos} = +10$  mV (**Fig 29e y f**).



**Fig 29.** Corrientes macroscópicas de  $Ca^{2+}$  en célula  $\beta$  aislada. Registros representativos de corrientes de  $Ca^{2+}$  a través de  $Ca_v$  en células  $\beta$  individuales aisladas de ratones alimentados con dieta ND **(a)** o HFD **(b)**, para mayor claridad solo se muestra la corriente que provoca un  $V_{pulso} = 0mV$ . **(c)** Relaciones  $I_{Ca^{2+}}-V_{pulso}$  para las corrientes de  $Ca^{2+}$  derivadas del análisis de los registros mostrados en (a)-(b). **(d)** Relaciones  $J_{Ca^{2+}}-V_{pulso}$  para las corrientes de  $Ca^{2+}$ . **(e)** Relaciones  $Q_{Ca^{2+}}-V_{pulso}$  para las corrientes de  $Ca^{2+}$ . **(f)** Relaciones  $P_{Ca^{2+}}-V_{pulso}$  para las corrientes de  $Ca^{2+}$ . La leyenda en (c) es válida también para (d), (e) y (f). Entre paréntesis se muestra el número de células registradas en cada caso. \* $p<0.05$ .

Estableciendo la relación  $Q_{Ca^{2+}}(pC)-V_{pulso}(mV)$  obtuvimos de nuevo diferencias significativas en valores de  $Q_{Ca^{2+}}(max)$ , siendo estos  $-3.3\pm 0.3 pC$  y  $-4.8\pm 0.5 pC$  para ND y HFD respectivamente (**Fig 29e**). Al igual que antes, la normalización de los datos respecto al tamaño de la célula para obtener la relación  $\rho_{Ca^{2+}}(pC/pF)-V_{pulso}(mV)$  abolió las diferencias, obteniendo valores de  $-0.63\pm 0.05 pC/pF$  en ND y  $-0.77\pm 0.09 pC/pF$  en HFD (**Fig 29f**).



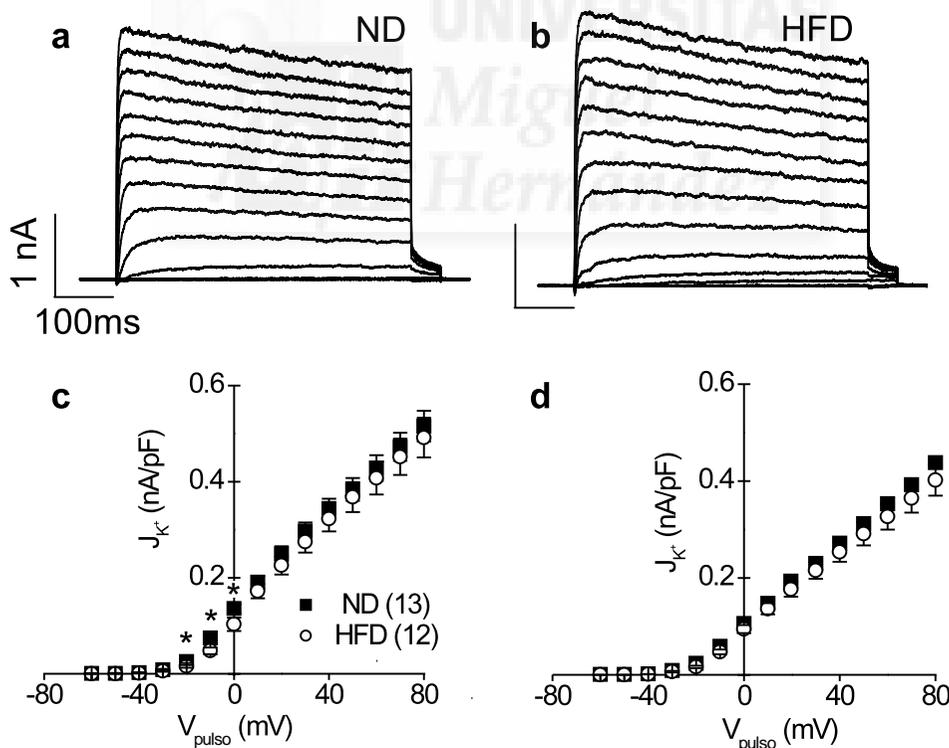
**Fig 30.** Cinética de activación e inactivación de las corrientes de  $Ca^{2+}$  en célula  $\beta$  aislada **(a)** Análisis de la constante de tiempo de activación ( $\tau_m$ ) de la corriente de  $Ca^{2+}$  evocada por saltos de voltaje desde un  $V_h$  de  $-70mV$  hasta valores de  $V_{pulso}$  entre  $-20mV$  y  $+30mV$ . **(b)** Análisis de la constante de tiempo de inactivación rápida ( $\tau_{h1}$ ) de la corriente de  $Ca^{2+}$  evocada por saltos de voltaje de  $500ms$  desde un  $V_h$  de  $-70mV$  hasta valores de  $V_{pulso}$  entre  $-20mV$  y  $+20mV$ . **(c)** Análisis de la constante de tiempo de inactivación lenta ( $\tau_{h2}$ ) de la corriente de  $Ca^{2+}$  evocada por saltos de voltaje de  $500ms$  desde un  $V_h$  de  $-70mV$  hasta valores de  $V_{pulso}$  entre  $-20mV$  y  $+20mV$ . *Entre paréntesis se muestra el número de células registradas en cada caso.*

La cinética de activación de la corriente de  $Ca^{2+}$  se estimó mediante el ajuste de los registros anteriores a un modelo  $m^2$  de Hodgkin-Huxley. Con  $V_{pulso}$  por encima del  $V_{on}$  ( $-30mV$ ) la corriente de  $Ca^{2+}$  se activa con constantes de tiempo de activación ( $\tau_m$ ) cada vez más rápidas (**Fig 30**). La  $\tau_m$  de las corrientes de  $Ca^{2+}$  no presentó diferencias estadísticamente significativas a ninguno de los  $V_{pulso}$  utilizados. Como referencia para su comparación se aporta el valor de la  $\tau_m$  para un  $V_{pulso}$  a  $0 mV$  que mostró valores de  $0.30\pm 0.02 ms$  en los ND y  $0.29\pm 0.02 ms$  en los HFD (**Fig 30a**). La cinética de inactivación se evaluó mediante el ajuste a una función exponencial de segundo orden de las

corrientes registradas. En este caso tampoco se encontraron diferencias significativas a ninguno de los  $V_{\text{pulso}}$  utilizados. Una vez más, como referencia se aporta el valor de la  $\tau_{h1}$  y  $\tau_{h2}$  para un  $V_{\text{pulso}}$  a 0 mV, la  $\tau_{h1}$  alcanzó valores de  $10.87 \pm 0.50$  ms en los ND y  $10.69 \pm 0.45$  ms en los HFD (**Fig 30b**), mientras que la  $\tau_{h2}$  alcanzó valores de  $172 \pm 14.2$  ms en los ND y  $170 \pm 13.6$  ms en los HFD (**Fig 30c**).

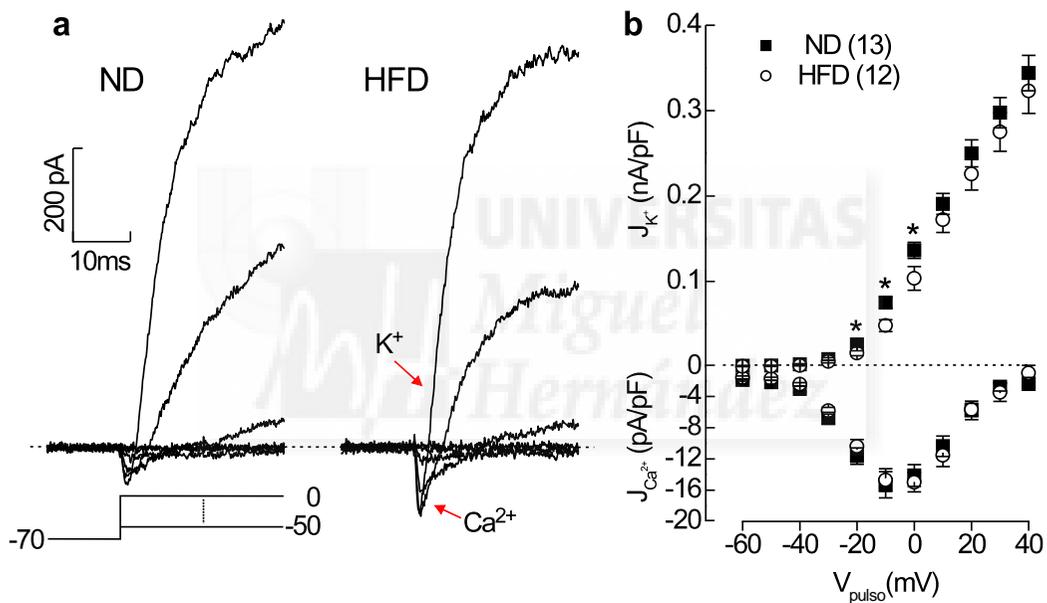
### 8. Las células $\beta$ de los ratones alimentados con dieta HFD presentan modificaciones en el comportamiento de sus corrientes de $K^+$

Los canales  $K_v$ , junto con los  $K_{Ca}$ , juegan un papel crítico en la repolarización del potencial de acción de las células  $\beta$ , y su modulación puede alterar las propiedades secretoras de las mismas (MacDonald et al., 2001; MacDonald et al., 2002; Tamarina et al., 2005).



**Fig 31.** Corrientes macroscópicas de  $K^+$  en célula  $\beta$  aislada. Registros representativos de corrientes de  $K^+$  activadas por un pulso de voltaje desde un  $V_h$  de  $-70$  mV hasta un  $V_{\text{pulso}}$  entre  $-60$  y  $+80$  mV sobre células  $\beta$  aisladas de ratones alimentados con dieta ND (**a**) o HFD (**b**). (**c**) Relación  $J_K^+ - V_{\text{pulso}}$  obtenidas del análisis de la corriente máxima (inicio del pulso) alcanzada en los registros mostrados

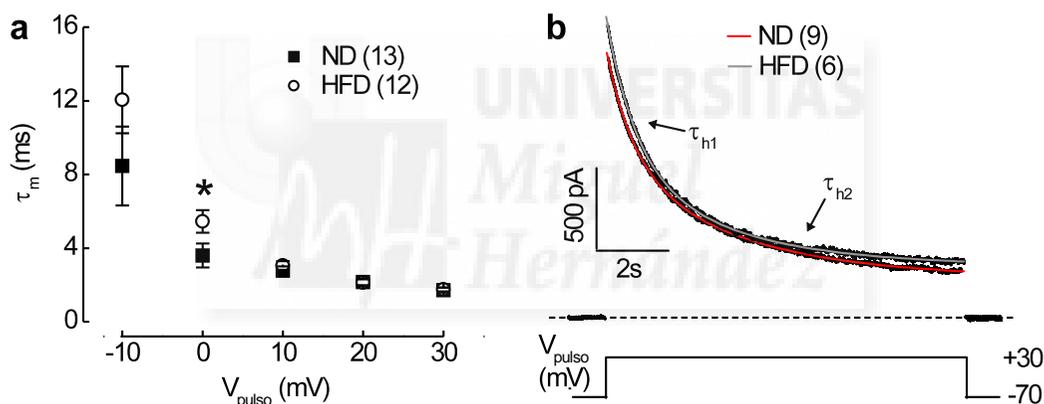
Por ello, llevamos a cabo una comparación de las propiedades electrofisiológicas de las corrientes de  $K^+$  en nuestros grupos a estudio mediante técnicas de *whole-cell patch-clamp*. Las corrientes de  $K^+$  registradas no presentan alteraciones entre ND y HFD en cuanto a la dependencia del voltaje para su activación, ambos muestran un  $V_{on}$  de -20mV por encima del cual la corriente se incrementa progresivamente hasta un máximo a +80mV de  $3.04 \pm 0.2$  nA en los ND y  $3.32 \pm 0.2$  nA en los HFD (**Fig 31**). El análisis estadístico de la relación  $I_{K^+}(nA)-V_{pulso}(mV)$  no mostró diferencias entre ambos grupos a ningún  $V_{pulso}$ .



**Fig 32.** Relación entre las corrientes de  $Ca^{2+}$  y  $K^+$  en célula  $\beta$  aislada. **(a)** Registros representativos de corrientes de  $K^+$  activadas por un pulso de voltaje desde un  $V_h$  de -70mV hasta un  $V_{pulso}$  entre -50 y 0mV sobre células  $\beta$  aisladas de ratones alimentados con dieta HFD o ND. La línea punteada define la corriente 0, por debajo de ella se observan las corrientes de  $Ca^{2+}$  y por encima las de  $K^+$ . **(b)** Análisis de los experimentos mostrados en (a). La gráfica inferior corresponde a las corrientes de  $Ca^{2+}$  y la superior a las de  $K^+$ . Entre paréntesis se muestra el número de células registradas en cada caso. \* $p < 0.05$ .

**Fig 31 (cont).** en (a)-(b). **(d)** Relación  $J_{K^+}-V_{pulso}$  obtenidas del análisis de la corriente sostenida (final del pulso) alcanzada en los registros mostrados en (a)-(b). Entre paréntesis se muestra el número de células registradas en cada caso. \* $p < 0.05$ .

No obstante, cuando procedimos a normalizar los valores de  $I_{K^+}$  por la  $C_m$  de la célula, para eliminar las contribuciones debidas a la diferencia de tamaño y establecer las relaciones  $J_{K^+}$  (nA/pF) /  $V_{pulsos}$  (mV), se observaron diferencias estadísticamente significativas a  $V_{pulsos}$  entre -20mV y 0mV, cuando la cuantificación se hizo en base a los valores de corriente de  $K^+$  máxima (corriente pico) al inicio del pulso (**Fig 31c**). Los valores de  $J_{K^+}$  (nA/pF) en estos puntos fueron de  $0.026 \pm 0.003$  nA/pF,  $0.075 \pm 0.006$  nA/pF y  $0.136 \pm 0.009$  nA/pF para  $V_{pulsos}$  de -20mV, -10mV y 0mV respectivamente en el caso de los ND y de  $0.016 \pm 0.003$  nA/pF,  $0.048 \pm 0.007$  nA/pF y  $0.103 \pm 0.013$  nA/pF para los mismos  $V_{pulsos}$  en los HFD (**Fig 31c**). Como comentaremos en la discusión, el hecho de que observemos un efecto sobre los voltajes asociados con el pico del potencial de acción, puede resultar importante para modular la forma del mismo.



**Fig 33.** Cinética de activación e inactivación de las corrientes de  $K^+$  en célula  $\beta$  aislada. **(a)** Análisis de la constante de tiempo de activación ( $\tau_m$ ) de la corriente de  $K^+$  evocada por saltos de voltaje desde un  $V_h$  de -70mV hasta valores de  $V_{pulsos}$  entre -10mV y 30mV. **(b)** Corriente promedio evocada por un salto de Voltaje de 10s desde un  $V_h$  de -70mV hasta un  $V_{pulsos}$  de 30mV, donde se puede observar que la inactivación bifásica de la corriente de  $K^+$  es idéntica entre los grupos ND y HFD. Las líneas roja y gris representan el ajuste de los datos a una exponencial de segundo orden. Entre paréntesis se muestra el número de células registradas en cada caso. \* $p < 0.05$ .

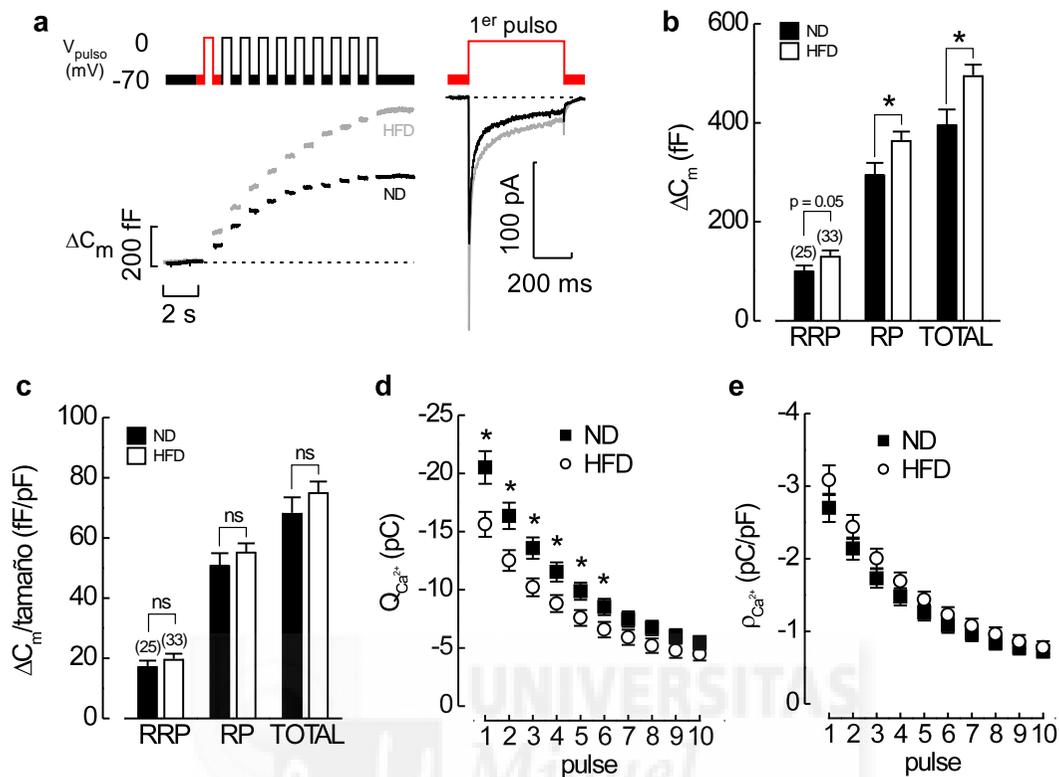
Este mismo análisis realizado en el tramo final del trazo de corriente (corriente sostenida) mostró que en este caso no hay diferencias estadísticamente significativas en ningún punto (**Fig 31d**). Los valores de corriente sostenida en los puntos correspondientes a  $V_{pulsos}$  entre -20mV y 0mV en este caso fueron de  $0.024 \pm 0.002$  nA/pF,  $0.059 \pm 0.004$  nA/pF y  $0.106 \pm 0.005$  nA/pF para  $V_{pulsos}$  de -20mV, -10mV y 0mV respectivamente en el caso de los

ND y de  $0.017 \pm 0.002$  nA/pF,  $0.048 \pm 0.005$  nA/pF y  $0.095 \pm 0.008$  nA/pF para los mismos  $V_{\text{pulso}}$  en los HFD (**Fig 31d**). El hecho de no incluir ningún antagonista de canales  $Ca_v$  durante estos registros nos permite observar la contribución de entrada de  $Ca^{2+}$  a través de ellos previa a la activación de la salida de  $K^+$  (**Fig 32**). Esta contribución fue cuantificada y a partir de ella se construyeron de nuevo las relaciones  $J_{Ca^{2+}}(\text{pA/pF})-V_{\text{pulso}}(\text{mV})$ . Al igual que sucedía en el caso de los experimentos del apartado anterior, no existen diferencias en la densidad de corriente de  $Ca^{2+}$  a ningún  $V_{\text{pulso}}$ . Como referencia para su comparación solo citaremos el valor de la corriente activada por un  $V_{\text{pulso}}$  a 0mV que fue de  $-13.06 \pm 1.40$  pA/pF en los ND y de  $-13.93 \pm 1.23$  pA/pF en los HFD (**Fig 32b**).

La cinética de activación de la corriente de  $K^+$  se estimó mediante el ajuste de los registros anteriores a un modelo  $n^4$  de Hodgkin-Huxley. Con  $V_{\text{pulso}}$  por encima del  $V_{\text{on}}$  la corriente de  $K^+$  se activa con constantes de tiempo de activación ( $\tau_m$ ) cada vez más rápidas. Los valores de  $\tau_m$  no presentan diferencias significativas entre los grupos ND y HFD salvo en el caso del  $V_{\text{pulso}}$  a 0mV en el que la estadística si muestra significancia. Los valores alcanzados en este punto fueron de  $3.6 \pm 0.6$  ms en los ND y de  $5.5 \pm 0.6$  ms en los HFD (**Fig 33a**). en cuanto a la inactivación de la corriente de  $K^+$ , la caída observada con un pulso mantenido durante 10 segundos desde un  $V_h$  de -70mV hasta un  $V_{\text{pulso}}$  de +30mV se ajusta satisfactoriamente a una función exponencial de segundo orden (**Fig 33b**). Los valores correspondientes a la constante de tiempo de inactivación de la fase rápida ( $\tau_{h1}$ ) fueron de  $775 \pm 9.7$  ms en los ND y de  $821 \pm 11.7$  en los HFD, mientras que la fase lenta arrojó valores de su constante de tiempo ( $\tau_{h2}$ ) de  $3579 \pm 40.5$  ms en los ND y  $3056 \pm 48.7$  ms en los HFD (**Fig 33b**).

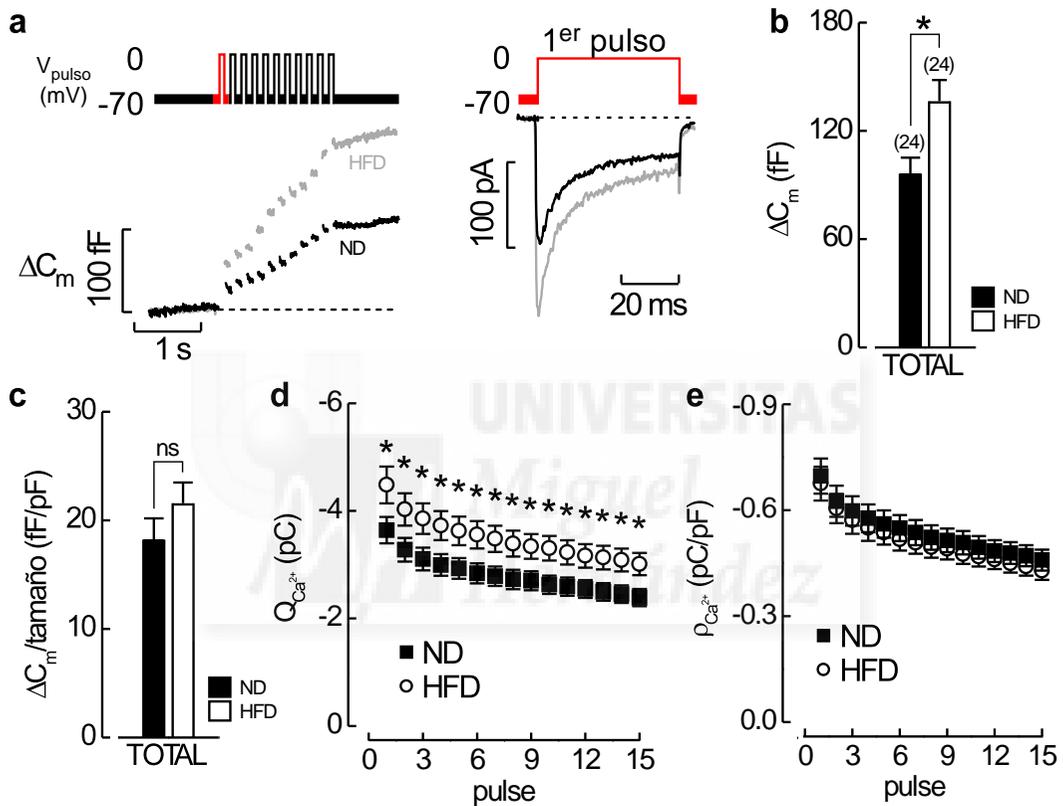
## 9. Las células $\beta$ de los ratones alimentados con dieta HFD muestran un incremento en su capacidad exocitótica

Para dilucidar si el incremento en la secreción de insulina encontrado en los ratones alimentados con dieta HFD estaba relacionado con modificaciones en el mecanismo de exocitosis, llevamos a cabo medidas simultáneas de corriente de calcio y registros de capacitancia de alta resolución en células aisladas de ambos grupos.



En una primera aproximación, estudiamos el  $\Delta C_m$  evocado por un tren de 10 pulsos de 500 ms (1Hz) (**Fig 34a**). A la  $[EGTA]_i$  usada, este estímulo provoca un incremento de  $[Ca^{2+}]_i$  más allá del espacio submembrana donde se localizan los microdominios funcionales asociados con el RRP (Hoppa et al., 2009). El  $\Delta C_m$  acumulado tras los dos primeros pulsos (asociado con la liberación del RRP) fue de  $101.0 \pm 10.8$  fF ( $\approx 35$  LDCVs;  $2.9$  fF/LDCV (Gopel et al., 2004)) en los ND y de  $131.2 \pm 10.9$  fF ( $\approx 45$  LDCVs) en los HFD (**Fig 34b**). El incremento acumulado en el resto de pulsos (asociado al “reclutamiento” de

LDCVs) fue de  $295.7 \pm 23.4$  fF ( $\approx 102$  LDCVs) en los ND y de  $365.0 \pm 17.2$  fF ( $\approx 126$  LDCVs) en los HFD (**Fig 34b**). Por último el incremento total acumulado, desde el primer al último pulso, fue de  $396.6 \pm 30.3$  fF ( $\approx 137$  vesículas) en los ND y de  $496.2 \pm 21.4$  fF ( $\approx 171$  LDCVs) en los HFD (**Fig 34b**).

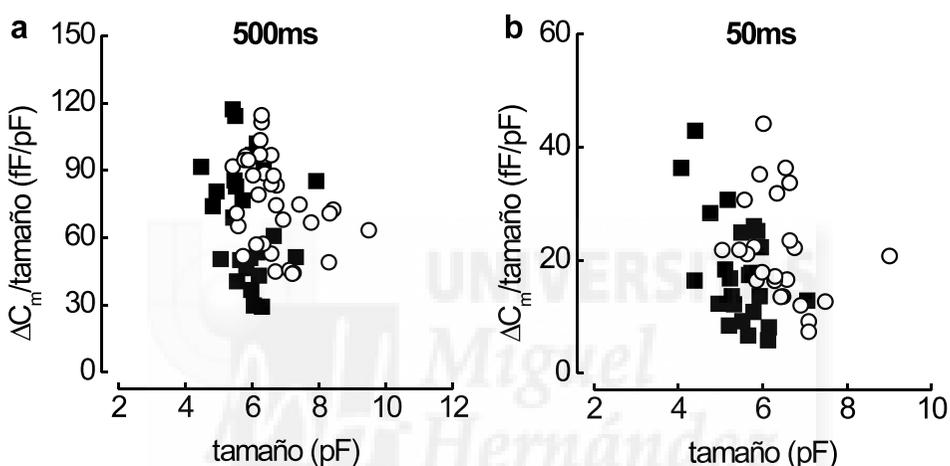


**Fig 35.** Respuesta excitotónica a la estimulación con pulsos despolarizantes de corta duración. **(a)** Registros representativos de los  $\Delta C_m$  evocados por 15 despolarizaciones (se han omitido los 4 primeros pulsos que no se asocian con la exocitosis) sucesivas de -70 mV a 0 mV y 50 ms de duración aplicadas a una frecuencia de 10Hz para células  $\beta$  provenientes de ratones ND (—) o HFD (---), a la derecha se muestra la corriente de  $Ca^{2+}$  resultante del primer pulso. **(b)** Análisis de los experimentos en **a** donde se muestra el  $\Delta C_m$  acumulado promedio asociado a la liberación del RRP. **(c)** análisis del incremento de capacitancia acumulado promedio normalizado por el tamaño de las células. **(d)**  $Q_{Ca^{2+}}$  promedio asociada a cada uno de los pulsos para los experimentos mostrados en (a). **(e)** Igual que en d pero se muestra la  $p_{Ca^{2+}}$  promedio asociada a cada uno de los pulsos. *Entre paréntesis se muestra el número de células registradas en cada caso.* \* $p < 0.05$ ; ns = no existen diferencias estadísticamente significativas.

Para evaluar si el incremento de exocitosis observado estaba asociado a la hipertrofia de la célula, realizamos el mismo análisis pero corrigiendo el valor de incremento de capacitancia de cada célula por el tamaño de la misma. Al representar los datos de esta forma observamos que no existían diferencias en la magnitud del  $\Delta C_m$  total (ND =  $68.4 \pm 5.2$  fF/pF y HFD =  $75.2 \pm 3.5$  fF/pF;  $p=0.28$ ), ni atendiendo independientemente al RRP (ND =  $17.4 \pm 1.9$  fF/pF y HFD =  $19.8 \pm 1.7$  fF/pF;  $p=0.34$ ) o al "reclutamiento" de LDCVs (ND =  $51.0 \pm 4.0$  fF/pF y HFD =  $55.4 \pm 2.8$  fF/pF;  $p=0.37$ ) (**Fig 34c**). La corriente a través de los  $Ca_v$  medida de forma simultánea al incremento de capacitancia mostró un comportamiento análogo al descrito anteriormente en los experimentos de  $Ca_v$ . La  $Q_{Ca^{2+}}$  fue significativamente superior en los HFD con valores durante el primer pulso de  $-15.6 \pm 1.1$  pC y de  $-20.5 \pm 1.4$  pC en los ND y HFD respectivamente (**Fig 34d**), pero estas diferencias desaparecieron al dividir los valores por el tamaño de la célula para obtener la densidad de corriente de  $Ca^{2+}$  (ND =  $-2.7 \pm 0.2$  pC/pF; HFD =  $-3.1 \pm 0.2$  pC/pF) (**Fig 34e**). La caída en la magnitud de la  $Q_{Ca^{2+}}$  conforme avanzan los pulsos se debe al tiempo entre pulsos ( $f = 1$ Hz). Esta frecuencia de estimulación hace que, por un lado, no haya tiempo suficiente para que el canal se recupere de la inactivación dependiente de voltaje y, por otro, que la  $[Ca^{2+}]_i$  no vuelva a los valores iniciales, perdiéndose fuerza electromotriz que actúe sobre este ión. La pérdida de capacidad secretora de la célula  $\beta$  durante estadios avanzados de la progresión de la diabetes tipo II asociada a la obesidad se ha asociado a alteraciones en la relación LDCV- $Ca_v$  en los microdominios funcionales presentes en el espacio intracelular inmediatamente adyacente a la MP (Collins et al., 2010; Hoppa et al., 2009). Debido a esto, decidimos utilizar como estímulo un tren de 15 despolarizaciones de duración similar a la del potencial de acción (50 ms; 10Hz) (**Fig 35a**), ya que la activación de la exocitosis con este tipo de estímulo depende de la correcta asociación entre las vesículas y los  $Ca_v$  (Barg et al., 2002a). El incremento de capacitancia acumulado total obtenido en estos experimentos fue de  $96.1 \pm 9.0$  fF ( $\approx 33$  LDCVs) en los ND y de  $136.4 \pm 11.8$  fF ( $\approx 47$  LDCVs) en los HFD (**Fig 35b**). Cabe destacar que estos valores son muy similares a los calculados para el RRP en el experimento con pulsos de 500ms, lo que apoya que éste tipo de estimulación provoca la liberación del mismo grupo de LDCVs (RRP).

Al igual que en el caso anterior, la corrección de estos valores por el tamaño abolió las diferencias, presentando valores en este caso de  $18.2 \pm 2.0$  fF/pF en los ND y de  $21.6 \pm 1.9$  fF/pF en los HFD ( $p=0.23$ ) (**Fig 35c**). La corriente de calcio a través de los  $Ca_v$  medida simultáneamente en estos experimentos continuó comportándose de manera análoga a

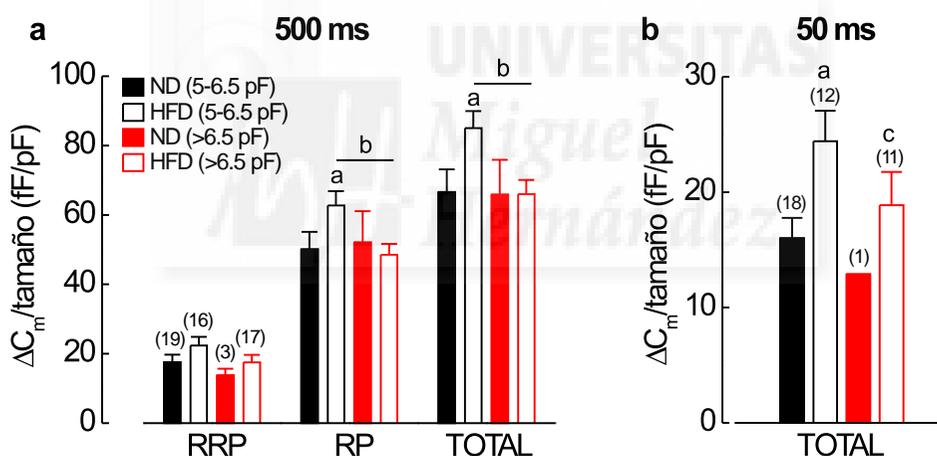
los anteriores. La  $Q_{Ca^{2+}}$  durante el primer pulso fue de  $-3.64 \pm 0.25$  pC en los ND y de  $-4.48 \pm 0.34$  pC en los HFD (**Fig 35d**), valores significativamente distintos y muy similares a los obtenidos en los experimentos de  $Ca_v$  (ND =  $-3.06 \pm 0.25$  pC; HFD =  $-4.24 \pm 0.46$  pC;  $V_{pulso} = 0$  mV) ya que se usa en esta caso un estímulo de la misma duración (50 ms). La normalización de los datos por el tamaño hizo desaparecer una vez más las diferencias, los ND presentaron valores de  $-0.68 \pm 0.05$  pC/pF y los HFD de  $-0.70 \pm 0.05$  pC/pF ( $p=0.76$ ) (**Fig 35e**).



**Fig 36.** Relación entre el  $\Delta C_m$  máximo y el tamaño celular. **(a)** Relaciones entre el  $\Delta C_m$ /tamaño máximo y el tamaño de las células para los registros realizados con pulsos de 500ms en células aisladas provenientes de ratones ND (■) y HFD (○). **(b)** Relaciones entre el  $\Delta C_m$ /tamaño máximo y el tamaño de las células para los registros realizados con pulsos de 50ms en células aisladas provenientes de ratones ND (■) y HFD (○).

En base a los datos de incremento de  $C_m$  presentados hasta el momento, cabría esperar que existiese una relación entre la capacidad excitotónica y el incremento de tamaño. No obstante, cuando se enfrentan estos dos valores tal relación no es directa (**Fig 36**). Con el fin de investigar más a fondo esta relación se calcularon los  $\Delta C_m$  promedio, en los rangos establecidos para realizar las comparaciones en ausencia de diferencias del tamaño. En cuanto a los pulsos de 500 ms, las células pertenecientes al rango 2 ( $5pF \leq x \leq 6.5pF$ ) alcanzaron  $\Delta C_m$  durante los 2 primeros pulsos (RRP) de  $17.5 \pm 2.2$  fF/pF y  $22.3 \pm 2.5$  fF/pF en el caso de los ND y los HFD respectivamente (**Fig 37a**). En el resto de pulsos (RP) el  $\Delta C_m$  fue de  $50.0 \pm 5.0$  fF/pF en los ND y  $62.7 \pm 4.1$  fF/pF en los HFD, mientras que el  $\Delta C_m$

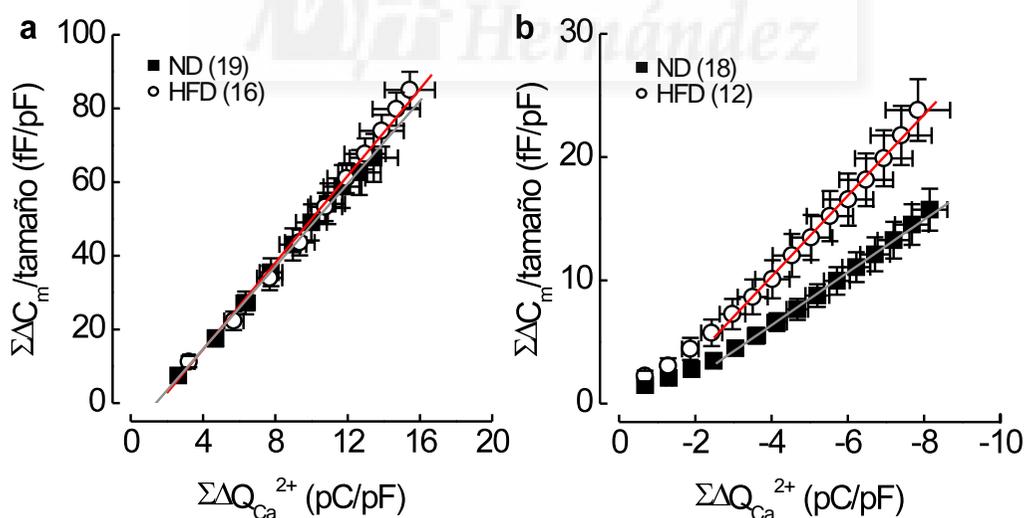
total desde el primer al último pulso fue de  $66.6 \pm 6.5$  fF/pF en los ND y  $85.0 \pm 4.9$  fF/pF en los HFD (**Fig 37a**). En este mismo rango los pulsos de 50ms produjeron  $\Delta C_m$  de  $16.0 \pm 1.7$  fF/pF y  $24.4 \pm 2.6$  fF/pF en los ND y HFD respectivamente (**Fig 37b**), siendo estas diferencias estadísticamente significativas. El rango 3 ( $x > 6.5$ pF) presentó valores significativamente menores en comparación con el rango 2. Los dos primeros pulsos de 500 ms produjeron  $\Delta C_m$  de  $13.0 \pm 2.0$  fF/pF en los ND y  $17.4 \pm 2.1$  fF/pF en los HFD (**Fig 37a**). En el resto de pulsos el  $\Delta C_m$  fue de  $52.0 \pm 9.0$  fF/pF en los ND y  $48.5 \pm 3.2$  fF/pF en los HFD y el  $\Delta C_m$  acumulado total fue de  $65.8 \pm 10.1$  fF/pF y  $66.0 \pm 4.1$  fF/pF en los ND y HFD respectivamente (**Fig 37a**). En el caso de los pulsos de 50ms, no se obtuvieron suficientes células controles de rango 3 para hacer una comparación, pero en el caso de los HFD si que se pudo llevar a cabo dicho análisis. Los pulsos de 50ms produjeron un  $\Delta C_m$  menor respecto a los controles en estas células, concretamente de  $18.9 \pm 2.9$  fF/pF (**Fig 37b**).



**Fig 37.** Respuesta excitotónica en los diferentes rangos de tamaños establecidos. **(a)**  $\Delta C_m$  acumulado promedio normalizado por tamaño de los registros mostrados en la **Fig 34a** separados en rangos de tamaño (ver texto). Se muestran por separado los datos correspondientes a cada grupo funcional de vesículas y el total. **(b)**  $\Delta C_m$  acumulado promedio normalizado por tamaño de los registros mostrados en la **Fig 35a** separados en rangos de tamaño (ver texto). RRP: *Readily Releasable Pool* y RP: *Reserve Pool*. Entre paréntesis se muestra el número de células registradas en cada caso. <sup>a</sup>  $p < 0.05$  respecto al ND de su rango; <sup>b</sup>  $p < 0.05$  en la relación que se indica; <sup>c</sup>  $p = 0.1$  en la misma relación que se indica para b.

Para investigar en qué proporción se puede asociar el incremento de la exocitosis con un aumento en la eficacia del proceso de liberación de LDCVs activado por una determinada

corriente de calcio a través de los  $Ca_v$ , se determinaron las relaciones entre la entrada de calcio acumulada corregida por el tamaño celular ( $\Sigma\rho_{Ca^{2+}}$ ) y el incremento de capacitancia acumulado corregido también por el tamaño ( $\Sigma\Delta C_m/\text{tamaño}$ ) durante los 10 o 15 pulsos aplicados en los experimentos anteriores (**Fig 39**). Estas relaciones se ajustaron satisfactoriamente a una función lineal en todos los casos ( $R \geq 0.98$ ) (**Fig 39**). En la **Tabla 4** se muestran las pendientes ( $m$ ) calculadas para estas relaciones. Cuando se incluyeron en la comparación del ajuste los datos pertenecientes al rango íntegro de tamaños no se encontraron diferencias entre ambos grupos para los pulsos de 500ms ni para los de 50ms. Al separar los datos en rangos de tamaño tampoco se observaron diferencias significativas en el valor de la pendiente para los pulsos de 500ms dentro del rango 2 ( $5pF \leq x \leq 6.5pF$ ). No, obstante sí se observó un incremento en la pendiente correspondiente al rango 2 cuando se enfrentaron los datos de los registros con pulsos de 50ms, y en este caso, las diferencias en el ajuste si fueron estadísticamente significativas. La realización de las mismas comparaciones en el caso del rango 3 permitió comprobar que en este caso no existen diferencias en el valor de las pendientes al comparar los grupos ND y HFD.

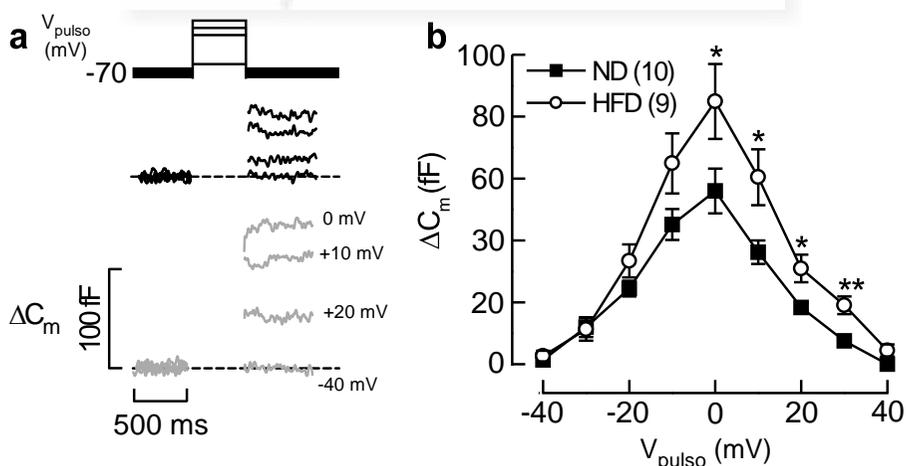


**Fig 38.** Eficacia de la exocitosis. **(a)** Relación  $\Sigma\Delta C_m/\text{tamaño}-\Sigma\Delta Q_{Ca^{2+}}$  para los registros de estimulación repetida con pulsos de 500ms sobre células  $\beta$  aisladas pertenecientes al rango 2 de tamaños. **(b)** Relación  $\Sigma\Delta C_m/\text{tamaño}-\Sigma\Delta Q_{Ca^{2+}}$  para los registros de estimulación repetida con pulsos de 50ms sobre células  $\beta$  aisladas pertenecientes al rango 2 de tamaños. Las líneas representan el mejor ajuste a una función lineal de las relaciones obtenidas en ND (—) o HFD (---). Entre paréntesis se muestra el número de células registradas en cada caso.

		500 ms				50 ms			
		ND		HFD		ND		HFD	
Rango	Tamaño (pF)	m (fF/pC)	n	m (fF/pC)	n	m (fF/pC)	n	m (fF/pC)	n
total	todos	5.45±0.11	25	5.37±0.09	33	2.55±0.06	24	2.93±0.04	24
2	5 - 6.5	5.62±0.08	19	5.89±0.22	16	2.20±0.03	18	3.36±0.07(*)	12
3	>6.5	4.39±0.06	3	4.65±0.06	17	X		2.64±0.03	11

**Tabla 4.** Resumen de la eficacia de la excitación. Resumen de las pendientes calculadas a partir del ajuste a una función lineal de las representaciones de  $\Sigma\rho_{Ca^{2+}}$  (pC/pF) Vs  $\Sigma\Delta C_m$ /tamaño (fF/pF) de los datos obtenidos con 10 trenes pulsos desde un  $V_H = -70$  mV hasta 0 mV de una duración 500ms aplicados a  $f = 1$ Hz o 15 pulsos de la misma amplitud pero de 50ms de duración aplicados a  $f = 10$ Hz. \* $p < 0.05$ .

La posible alteración en la dependencia que presenta el  $\Delta C_m$  con la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de los  $Ca_v$  se evaluó mediante medidas de  $C_m$  intercaladas con  $V_{pulso}$  de 500ms a diferentes voltajes (**Fig 39a**). A un  $V_{pulso}$  de -40mV no se produce  $\Delta C_m$  en ningún grupo. Conforme el valor de  $V_{pulso}$  se incrementa hacia valores positivos se produce un paulatino incremento del  $\Delta C_m$  evocado, hasta un máximo a  $V_{pulso} = 0$ mV en ambos grupos. El valor de  $\Delta C_m$  máximo en este punto fue significativamente mayor en los ND con valores de  $56 \pm 7.2$  fF frente a los  $85 \pm 12.1$  fF de los HFD (**Fig 39b**).



**Fig 39.** Relación  $\Delta C_m$ - $V_{pulso}$ . **(a)** Registros representativos de los  $\Delta C_m$  evocados con pulsos de voltaje desde un  $V_h$  de -70mV hasta  $V_{pulso}$  de -40, 0, +10 y +20mV. **(b)** Análisis de los  $\Delta C_m$  promedio obtenidos en los experimentos mostrados en (a) con  $V_{pulso}$  entre -40 y +40mV. Entre paréntesis se muestra el número de células registradas en cada caso \* $p < 0.05$ .

Cuando se expresó este dato normalizado por el tamaño de la célula el valor disminuyó hasta  $9.1 \pm 1.3$  fF/pF en los ND y  $12.6 \pm 1.8$  fF/pF y las diferencias desaparecieron. Por encima de  $V_{\text{pulso}} = 0\text{mV}$  los  $\Delta C_m$  comenzaron a disminuir en ambos grupos pero las diferencias significativas entre ND y HFD se mantuvieron hasta un  $V_{\text{pulso}}$  de  $+10\text{mV}$  (**Fig 39b**). A la vista de estos resultados es evidente que la dependencia del  $\Delta C_m$  con el  $V_{\text{pulso}}$  muestra un paralelismo con la dependencia de la activación de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$ , prueba de ello es que al comparar el máximo de corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  activada durante el mismo experimento este mostró la misma dependencia por el  $V_{\text{pulso}}$ , con un valor máximo a  $V_{\text{pulso}} = 0\text{mV}$  de  $-11.8 \pm 1.5$  pC en los ND y de  $-20.9 \pm 3.8$  pC en los HFD. Como en el caso del análisis de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , este último valor fue significativamente diferente entre ND y HFD y dichas diferencias se abolieron al normalizar por el tamaño celular.





## **V. DISCUSIÓN**



El estudio de la obesidad como factor determinante asociado a la aparición de resistencia a la insulina y a la DM tipo II, se ha convertido en uno de los mayores retos para la ciencia básica y la investigación clínica actual. La célula  $\beta$  ha demostrado estar dotada de una alta plasticidad que le permite modular su respuesta secretora en relación a los requerimientos que le dicta la sensibilidad a la insulina. Durante los estadios pre-diabéticos asociados con la obesidad se produce una característica resistencia a la insulina en los tejidos periféricos, que la célula  $\beta$  contrarresta mediante una adaptación compensatoria caracterizada por una marcada hiperinsulinemia. Esta respuesta tiene implicaciones decisivas en el desarrollo de la DM tipo II, ya que el grado en el que la célula  $\beta$  sea capaz de suplir las “nuevas” exigencias de disponibilidad de insulina determinará que el enfermo progrese, a través de una paulatina disfunción, hacia la etapa de hiperglucemia severa que identifica el estado abiertamente diabético (Kahn et al., 2006). En el presente trabajo, hemos explorado el efecto que tiene la obesidad sobre la función y estructura de las células  $\beta$  en etapas tempranas del desarrollo de la diabetes tipo II. Basándonos en nuestros resultados, los islotes de Langerhans pertenecientes a los ratones obesos presentan una actividad secretora mayor. Este incremento podría explicarse en base a los siguientes cambios y adaptaciones:

- Las células  $\beta$  de los ratones obesos disparan potenciales de acción de mayor amplitud.
- Este tipo de disparo lleva asociado un aumento de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los  $\text{Ca}_v$ .
- El incremento en las señales de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  potencia la exocitosis a diferentes niveles.

Estos aspectos sobre la modulación de la funcionalidad de las células  $\beta$  son sumamente importantes, ya que hasta el momento, las compensaciones que se producían en el marco de la obesidad como consecuencia de la resistencia a la insulina, y que se barajaban como causantes del aumento en la secreción, radicaban principalmente en aspectos morfológicos y estructurales, como los cambios en la masa de célula  $\beta$  (Butler et al., 2003; Hull et al., 2005; Lingohr et al., 2002; Sachdeva and Stoffers, 2009; Sone and Kagawa, 2005; Terauchi et al., 2007).

## 1. Modelo de obesidad

Los estudios que utilizan modelos basados en dietas han protagonizado un incremento exponencial en los últimos años, debido a la posibilidad que representan de inducir obesidad y desórdenes metabólicos en ratones que se asemejan a la sintomatología típica de estas alteraciones en humanos. No obstante, esta aproximación no está exenta de problemas, ya que la aplicación de diseños experimentales diferentes en cuanto a la cepa de ratón, el género, la composición o modo de preparación de la dieta y los periodos de tratamiento, pueden generar comportamientos metabólicos muy desiguales que dificultan la comparación de los resultados obtenidos por diferentes laboratorios (Buettner et al., 2007).

En el presente estudio, hemos establecido un modelo de obesidad en ratones hembra inducida por dieta que presenta síntomas típicos de los estados pre-diabéticos. La elección de los parámetros relativos al establecimiento del modelo se ha basado en estudios previos que abordan las mismas fases de la progresión de la DM tipo II. Asimismo, la elección del género, se ha realizado en base a la comprobación de que las hembras de C57BL/6J se vuelven resistentes a la insulina con relativa rapidez, pero no suelen desarrollar DM tipo II, ya que presentan una mayor protección que los machos frente al desarrollo de esta patología (Ahren and Scheurink, 1998; Fex et al., 2007; Reimer and Ahren, 2002). Su idoneidad para el estudio planteado, se ha comprobado mediante la caracterización del perfil metabólico de los ratones obesos, y su comparación con los pertinentes controles. En concreto, nuestro modelo de obesidad presenta una leve intolerancia a la glucosa, así como resistencia a la insulina y una marcada hiperinsulinemia. En base a estas características, y a que los valores de glucemia no presentan diferencias destacables entre los ratones obesos y sus controles, podemos concluir que nuestro modelo se encuentra en un estado de compensación, en el que existe un incremento de la cantidad de insulina disponible en plasma para suplir las mayores exigencias de sus tejidos diana y mantener la normogluceemia.

Como se ha avanzado en la introducción, la hiperinsulinemia compensatoria observada frecuentemente en los individuos obesos, que presentan resistencia a la insulina, puede resultar principalmente de la aportación de modificaciones estructurales y/o funcionales. La participación de las alteraciones en la masa de célula  $\beta$ , como factor crítico entre los mecanismos de la respuesta adaptativa a la obesidad, ha sido comprobada tanto en ratones como en humanos (Butler et al., 2003; Hull et al., 2005; Lingohr et al., 2002;

Sachdeva and Stoffers, 2009; Sone and Kagawa, 2005; Terauchi et al., 2007). Sin embargo, la contribución de una posible modificación funcional que participe en esta respuesta adaptativa, resulta todavía incierta. A través de la caracterización del modelo de obesidad establecido en nuestro laboratorio, el presente estudio demuestra, por primera vez, múltiples alteraciones en la función de la célula  $\beta$  que pueden intervenir en el incremento de los niveles de insulina plasmáticos característicos de las fases de compensación en la progresión de la DM tipo II.

## 2. Alteraciones estructurales

### 2.1. Efecto de la dieta sobre el tamaño de las células $\beta$ pancreática

El análisis estructural del modelo utilizado en el presente estudio, demuestra que las células  $\beta$  pertenecientes a los ratones obesos son de mayor tamaño por término medio, que las de sus controles. Esta hipertrofia adaptativa ya ha sido descrita en modelos de obesidad inducida por dieta similares al nuestro (Ahren et al., 2010). Debido a que no hemos encontrado diferencias significativas en el número medio de células por islote durante el análisis del tamaño en cortes histológicos, este aumento de tamaño, podría explicar las potenciales variaciones en la masa de célula  $\beta$  sin la aportación de un incremento en la proliferación celular. No obstante, sería indispensable un análisis específico del proceso de proliferación y apoptosis en nuestro modelo para validar dicha conclusión. A este respecto, resulta interesante señalar que las implicaciones funcionales que se derivan de modificaciones en el tamaño celular son prácticamente desconocidas.

Recientemente, se ha descrito un mecanismo por el que los NEFAs pueden controlar el volumen celular a través de la modulación de canales VRAC (*Volume Regulated Anion Channels*), y que estos mismos canales, podrían intervenir en los efectos activadores o inhibidores que ejercen los NEFAs en estadios previos o posteriores a la disfunción progresiva ocasionada por la lipotoxicidad (Best et al., 2011). Independientemente de esta posible participación de los VRAC, resulta conceptualmente interesante plantear que, en base al modelo de arquitectura del dominio local de  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ , responsable de la liberación del RRP, el aumento de la superficie que acompaña al crecimiento en tamaño llevaría asociada la incorporación de más LDCVs a la MP (asumiendo una relación LDCV- $\text{Ca}_v/\mu\text{m}^2$  constante), con el consiguiente incremento de exocitosis. Como se detallará a

continuación, la densidad de corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  en nuestro modelo de ratones obesos no presenta diferencias con los controles, y una de las potenciales explicaciones para este resultado, es que el número de  $\text{Ca}_V$  HVA-tipo L se incrementa en proporción al aumento de tamaño. Basándonos en los valores de densidad de  $\text{Ca}_V$  en célula  $\beta$  ( $\approx 1 \text{ Ca}_V/\mu\text{m}^2$ ), medidos mediante análisis de fluctuación no estacionaria (Barg et al., 2001), podemos estimar el número de  $\text{Ca}_V$  en función de nuestros tamaños ( $\epsilon = 10 \text{ fF}/\mu\text{m}^2$ ). En base a ello, podemos calcular que los ratones obesos tendrían  $\approx 100 \text{ Ca}_V$  más que los controles. Si además asumimos la estequiometría de  $1\text{LDCV}:3\text{Ca}_V$ , descrita en la bibliografía para célula  $\beta$  (Barg et al., 2001), los ratones obesos podrían formar  $\approx 35$  “complejos exocitóticos” más que los controles. Estos “complejos exocitóticos” extra, producirían un incremento teórico de  $\approx 1.2$  veces en la secreción de los ratones obesos respecto a sus controles, valor no muy alejado de los  $\approx 1.7$  veces más secreción que hemos medido por RIA con  $8\text{mM}$  de glucosa. Cuando comparamos estos valores teóricos con los resultados reales de exocitosis siempre resultan en una estimación al alza ya que, por un lado, la asociación en “complejos exocitóticos” de los LDCVs puede estar influenciada por otros procesos celulares, y por otro, no todos los LDCVs asociados tienen por qué encontrarse en un estado de alta competencia para su liberación (Barg et al., 2001). A pesar de estas discrepancias en los valores concretos, este planteamiento representa de forma clara cómo se puede incrementar la exocitosis afectando solamente al tamaño celular, y asumiendo que el número de células no varía.

Este marco conceptual puede llevar a concluir erróneamente, que el mecanismo celular por el que se incrementa la secreción en el ámbito de la compensación funcional, descansa simplemente en un incremento de tamaño de la célula (a mayores requerimientos, mayor tamaño). No obstante, los incrementos y reducciones en el volumen celular, también se han relacionado con la regulación de procesos fisiológicos entre los que se encuentran la proliferación y la muerte celular (Lambert et al., 2008). Este último podría representar un punto de regulación, que limita la capacidad de la célula  $\beta$  de incrementar su tamaño. Además, como comentaremos posteriormente, los resultados del presente trabajo demuestran que no es ésta la situación, ya que no son las células más grandes las que presentan incrementos de  $C_m$  mayores.

Por otra parte, también se ha descrito la participación del citoesqueleto sobre múltiples niveles de la regulación de la homeostasis del volumen celular (Lambert et al., 2008). Debido a que, precisamente, la remodelación de la barrera submembrana de F-actina, se

---

baraja actualmente como uno de los factores que influyen sobre la dinámica exocitótica de los LDCVs en célula  $\beta$  (Seino et al., 2011), es posible que los procesos de variación de tamaño, remodelación del citoesqueleto y exocitosis también estén relacionados.

## 2.2. Efecto de la dieta sobre la masa de la célula $\beta$ pancreáticas

La consecuencia lógica de que las células que mayoritariamente componen los islotes de Langerhans aumenten su tamaño, sería un incremento en el porcentaje del área que ocupan las células  $\beta$  respecto al área total del páncreas. Sin embargo, nuestro análisis de la masa relativa de célula  $\beta$  muestra una tendencia al alza que no llega a ser estadísticamente significativa. Pese a que, en el caso de los islotes de ratones obesos, la masa absoluta de célula  $\beta$  sí muestra un valor significativamente superior, esto puede ser debido simplemente a que los páncreas son de mayor tamaño, es decir, existen más islotes del mismo tamaño en un área mayor. Algunas de las posibles explicaciones para un aumento del tamaño de la célula  $\beta$ , que no provoque un incremento porcentual asociado del área total ocupada por este tipo celular son: a) que los ratones obesos tengan menos islotes de mayor tamaño, b) que la distribución de los tamaños de las células  $\beta$  dentro del mismo islote o entre islotes varíe o c) que exista una disminución en el área ocupada por los otros tipos celulares ( $\alpha$  y  $\delta$ ) que complete la célula  $\beta$ . Respecto a la primera opción, en base a nuestro trabajo sobre los cortes histológicos hemos visto que el tamaño medio de los islotes analizados no es diferente entre ambos grupos. Sin embargo, el número de islotes totales en HFD está aumentado respecto a los controles, este incremento puede estar asociado a un aumento en el número de islotes de menor tamaño, mientras que la cantidad de islotes mayores es prácticamente igual en los dos grupos (datos no mostrados). La segunda opción, implica que dentro de un mismo islote un porcentaje de células  $\beta$  aumente de tamaño, mientras que otro disminuya, o que ciertos islotes presenten una proporción mayoritaria de células grandes, mientras que en otros, el porcentaje mayoritario corresponda a células de tamaño reducido. No obstante, si este fuera el caso, y además asumimos que la disgregación mecánica y posterior cultivo de las células no afecta a esta segregación de tamaños, nuestro análisis de la distribución de frecuencias debería haber puesto de manifiesto la existencia de ambas poblaciones de células. La tercera opción, requeriría de un análisis específico de la masa de células no- $\beta$  en nuestro modelo. No obstante, si podemos adelantar que al calcular la diferencia entre el área total por islote analizado y el área correspondiente a célula  $\beta$  no parece que haya

diferencias (datos no mostrados). Resulta evidente que la validación de cualquiera de estas opciones, requeriría un análisis en profundidad de la arquitectura celular del islote de Langerhans. No obstante, pese a que la evaluación morfológica del páncreas a escala de islote resulta relativamente sencilla, el análisis “*in situ*” de las células que lo componen presenta importantes dificultades técnicas que no se han abordado en el presente trabajo.

Varias publicaciones han indicado que la masa de la célula  $\beta$  en condiciones de obesidad y resistencia a la insulina está muy aumentada (Butler et al., 2003; Hull et al., 2005; Lingohr et al., 2002; Sachdeva and Stoffers, 2009; Sone and Kagawa, 2005; Terauchi et al., 2007). En nuestro modelo, donde analizamos las primeras etapas de la resistencia, observamos una tendencia al alza que seguramente alcanzaría un punto más avanzado si analizásemos estadios posteriores. Es probable que en este mismo modelo estas fases avanzadas estén también asociadas a un incremento significativo de masa de célula  $\beta$ .

### **3. Alteraciones funcionales**

#### **3.1. Efecto de la dieta sobre el contenido y la secreción de insulina**

El análisis radioinmunométrico del contenido de insulina, así como la expresión génica, muestran que los islotes de los ratones obesos contienen más insulina que los controles. Este incremento no se debe a un aumento en la masa de célula  $\beta$  de los islotes, ya que las diferencias se continúan observando tras normalizar los resultados por la cantidad de proteína, lo que corrige las diferencias debidas al tamaño. Además, coincidiendo con otros estudios (Reimer and Ahren, 2002; Sone and Kagawa, 2005), los islotes provenientes de ratones obesos secretan más insulina cuando se estimulan con concentraciones de glucosa altas, efecto que tampoco es dependiente del tamaño puesto que los datos se normalizaron por el contenido total de insulina. Por último, es importante señalar que este incremento de secreción de insulina se mantiene cuando representamos los resultados como porcentaje del contenido. Estos resultados sugieren que, si bien el mayor contenido de insulina puede explicar en parte el incremento en los valores de secreción, las células  $\beta$  de los islotes provenientes de los ratones obesos, muestran una mejora de su capacidad secretora desde un punto de vista funcional. Otros trabajos han señalado una disminución en la capacidad secretora (Collins et al., 2010), posiblemente esto se debe a

que se han estudiado etapas más avanzadas de la obesidad en las que comienza a producirse un deterioro en las células  $\beta$  que favorece la progresión hacia la DM tipo II.

### 3.2. Efecto de la dieta sobre las variaciones de $\text{Ca}^{2+}$ intracelular

La caracterización de diferentes puntos clave del acoplamiento estímulo-secreción en los dos grupos de estudio, mostró importantes modificaciones en los ratones obesos en comparación con sus controles. La medida ratiométrica de las variaciones de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  mediante la sonda fura-2, demuestra que en los ratones obesos existe un incremento mantenido de la disponibilidad del ión. Atendiendo a los resultados en células  $\beta$  individuales en cultivo, hay que resaltar primero el hecho de que en los ratones obesos un  $\approx 25\%$  más de células  $\beta$  responden a un incremento de  $[\text{glucosa}]_{\text{ext}}$  desde 3 mM hasta 8 y 16 mM. Si trasladamos estos resultados al islote intacto, podrían suponer que, a una determinada  $[\text{glucosa}]_{\text{ext}}$  por encima del umbral de activación de la secreción de insulina, se “reclutarían” un mayor número de células activas para aportar magnitud al incremento de secreción resultante. Si esto fuese cierto, la secreción lógicamente aumentaría, incluso en el caso de que la función de cada célula  $\beta$  individual no estuviese aumentada. Esta opción se apoya en estudios con ratas SHR que, al igual que los ratones obesos, presentan hiperinsulinemia para compensar la resistencia periférica a la insulina. Estos estudios plantean que, el mecanismo de compensación se basa en una alteración del metabolismo por la que se produce un incremento en la sensibilidad de la célula  $\beta$  a la glucosa, debida a un aumento de la actividad catalítica de la GK (Chen et al., 1994). Un posible desplazamiento de la dependencia de la fase activa de disparo hacia valores de glucosa más bajos, también se apoya en el hecho de que, el cultivo “*in vitro*” de islotes en presencia de elevadas [NEFAs] características de la lipotoxicidad asociada a la obesidad y la DM tipo II, reduce significativamente la conductancia del  $K_{\text{ATP}}$  y provoca que un  $\approx 30\%$  de las células  $\beta$  generen potenciales de acción incluso a  $[\text{glucosa}]_{\text{ext}}$  de 1 mM (Olofsson et al., 2007). Aunque otros estudios sobre el efecto de los NEFAs, reportan precisamente el efecto contrario sobre la conductancia del  $K_{\text{ATP}}$  en células  $\beta$  de rata (Zhao et al., 2008), el aumento de la sensibilidad a la glucosa y la disminución de la conductancia del  $K_{\text{ATP}}$ , podrían contribuir a la explicación de por qué en nuestro modelo encontramos diferencias en el porcentaje de respuesta celular en cultivo a  $[\text{glucosa}]_{\text{ext}}$  subestimuladoras (3 mM) y también podrían estar relacionados con el incremento de secreción observado en los islotes provenientes de los ratones obesos a esta misma  $[\text{glucosa}]_{\text{ext}}$ . A pesar de que

representa una posibilidad interesante, en nuestros experimentos resulta complejo descartar una posible “contaminación” de la respuesta con células no- $\beta$  en el cultivo a baja concentración de glucosa, en cuanto a las señales de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Centrándonos en la magnitud de la respuesta de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , las células  $\beta$  aisladas en cultivo provenientes de los ratones obesos muestran valores de disponibilidad de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  superiores tras la estimulación con 8 mM glucosa y una tendencia en el mismo sentido a 16 mM glucosa. Los valores de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  basal medido a una  $[\text{glucosa}]_{\text{ext}}$  de 3 mM, son virtualmente idénticos entre ambos grupos en esta preparación, lo que elimina la posibilidad de que los aumentos en la respuesta tras la estimulación sean debidos a un incremento en la fuerza protón motriz que actúa sobre el  $\text{Ca}^{2+}$ . El valor medio de la razón  $F_{340}/F_{380}$  máxima es superior en los ratones obesos, lo que nos indica que los niveles de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  alcanzados son mayores. En relación a ello, es necesario aclarar que los valores de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  reportados mediante la utilización de sondas fluorescentes solo nos informan de las variaciones globales de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y no nos sirven para resolver los fuertes gradientes que se generan desde la MP hacia el interior de la célula. Pese a que estos gradientes son decisivos para evaluar los procesos dependientes de las altas  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  generadas en los “complejos excitóticos” inmediatamente adyacentes a la MP, responsables de la liberación rápida del componente correspondiente al grupo RRP (Ammala et al., 1993b; Barg et al., 2002a; Barg et al., 2001; Bokvist et al., 1995; Olofsson et al., 2002; Rorsman and Renstrom, 2003), el incremento moderado pero sostenido en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  observado en el presente estudio, ha sido relacionado con un aumento significativo de la capacidad excitótica de la célula  $\beta$  por movilización de LDCVs desde la reserva intracelular (Gromada et al., 1999; Jing et al., 2005).

Los datos correspondientes a los experimentos de fura-2 en la preparación de islote intacto muestran también un mayor incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . En este caso, los valores de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  basal son ligeramente inferiores en los ratones obesos, pero esta diferencia no es suficiente para aportar una variación de fuerza protón motriz que afecte a los incrementos de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  tras la apertura de los  $\text{Ca}_v$ . Los ratones obesos muestran valores de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  basal un  $\approx 4.34\%$  menores que los controles; si utilizamos este valor para calcular la variación en el  $V_{\text{rev}}$  del  $\text{Ca}^{2+}$  debido a esta disminución mediante la ecuación de Nernst ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}} = 2.5\text{mM}$ ;  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{int}} = 100\text{nM}$ ;  $T^a = 32^\circ\text{C}$ ) podemos comprobar que, para un pulso de voltaje a  $-10\text{mV}$  (valor aproximado del voltaje alcanzado en el pico del potencial de acción), el aumento de la fuerza protón motriz es solamente de un  $\approx 0.4\%$ , a igualdad del

resto de parámetros relacionados con la magnitud de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Este incremento resultaría poco determinante como factor promotor de una mayor entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los  $\text{Ca}_v$ . Sin embargo, no hemos encontrado diferencias a 8 ni 16 mM glucosa en cuanto a los valores medios de la razón  $F_{340}/F_{380}$  máxima en islote intacto durante el primer transitorio característico de la respuesta inicial. Esto plantea el hecho de que, partiendo de un nivel basal de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  menor, debe entrar una mayor cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  para alcanzar las mismas  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  máximas. Como ya hemos señalado, la magnitud de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  se incrementa en relación al tamaño de la célula individual en nuestro modelo, lo que podría suponer que una mayor cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  entra en las células  $\beta$  de los ratones obesos a través de los  $\text{Ca}_v$ , pero ésta se diluye en un volumen mayor, resultando en una  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  similar entre ambos grupos. No obstante, a continuación detallaremos como el análisis de los potenciales de acción generados por las células  $\beta$  aisladas de ratones obesos, muestra alteraciones que apuntan a una potenciación de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los  $\text{Ca}_v$ . Estas aparentes discrepancias podrían indicar que, los procesos encaminados a fortalecer la respuesta exocitótica durante el proceso de adaptación funcional en células aisladas, no tendrían un reflejo total con las modificaciones observadas en los islotes intactos. No obstante, el análisis de la variación de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  a través del cálculo del área bajo la curva (mediante la integración del tramo correspondiente a cada una de las glucosas testadas), nos ha permitido comprobar que el  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  se mantiene elevado durante más tiempo. Al igual que ocurría en el caso de las células aisladas en cultivo, esto puede resultar en una mayor participación del mecanismo de rellenado de vesículas desde el grupo de reserva que incrementa la tasa de exocitosis de ritmo lento tras el primer transitorio de la secreción (Gromada et al., 1999; Jing et al., 2005).

El análisis de las variaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en células  $\beta$  individuales en islotes intactos mediante microscopía confocal, muestra también diferencias en la respuesta de los ratones obesos. En estos experimentos, observamos un incremento de fluorescencia mayor en los islotes de ratones obesos bajo un estímulo de 11mM de glucosa, lo cual indicaría que en estos ratones la glucosa provoca mayores cambios en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , coincidiendo con los resultados de fura-2-AM y microscopía convencional. No obstante, hay que tener en cuenta que, a diferencia del fura-2, las medidas de confocal no son de tipo ratiométrico y no corrigen las variaciones de señal por efecto de los cambios en parámetros como el cargado de la sonda, lo que hace que las primeras sean más adecuadas en cuanto a la monitorización de las variaciones de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Esto puede

significar que los valores observados en estos experimentos podrían no corresponder a cambios “reales” en la  $[Ca^{2+}]_i$ , sino a las variaciones en alguno de estos parámetros. Por encima de esta limitación, las medidas de variación de  $Ca^{2+}$  intracelular mediante sondas no ratiométricas nos permiten analizar procesos como la sincronía en la respuesta de las células  $\beta$  individuales y la frecuencia de las oscilaciones de  $Ca^{2+}$  mantenidas tras el primer transitorio (Nadal et al., 1999; Quesada et al., 1999; Quesada et al., 2006). En relación a ambos parámetros, hemos encontrado que la capacidad de acoplamiento de las señales de  $Ca^{2+}$  es similar en ambos grupos.

Como se ha adelantado en la introducción, la capacidad de respuesta sincrónica del islote permite que la magnitud de la secreción no esté supeditada a la heterogeneidad de las respuestas individuales de cada célula, lo que permite que las respuestas sean más vigorosas (Pipeleers, 1992; Salomon and Meda, 1986). En base a nuestros resultados, las alteraciones en la sincronización no estarían detrás de las modificaciones en la funcionalidad de los islotes aislados de los ratones obesos. De este análisis se deduce de forma directa que las oscilaciones han de tener la misma frecuencia, hecho que se comprobó mediante el pertinente análisis.

### **3.3. Efecto de la dieta sobre el patrón de actividad eléctrica y la actividad del $K_{ATP}$**

El patrón de actividad eléctrica generado por las células  $\beta$  aisladas en cultivo, muestra resultados muy interesantes y aporta la base para explicar los incrementos de  $[Ca^{2+}]_i$  descritos en las secciones anteriores. En primer lugar, es necesario resaltar que los registros de  $V_{mb}$  no muestran diferencias en cuanto a la dependencia de glucosa de las fases activas y silentes entre los ratones obesos y controles. Este resultado se antoja interesante en base a la posible desviación de la dependencia de la fase activa de disparo hacia valores más bajos de glucosa (Olofsson et al., 2007). El método elegido para identificar las células  $\beta$  en nuestros experimentos de monitorización del  $V_{mb}$  plantea restricciones a la hora de abordar este problema de forma eficaz, ya que en nuestro caso, no hemos considerado como célula  $\beta$  cualquiera que disparase potenciales de acción a baja glucosa, debido a que esta característica suele ser más propia de células alfa (Rorsman et al., 2011a). No obstante, resulta poco probable que éste sea el mecanismo implicado en la modificación funcional adaptativa en nuestro modelo de obesidad, debido

a que nuestros resultados muestran que a la misma  $[glucosa]_{ext}$  no existen diferencias en los valores de  $V_{mb}$  entre potenciales de acción, ni en la frecuencia de disparo, entre los ratones obesos y sus controles. Dichas diferencias podrían surgir de variaciones en el nivel del  $V_{mb}$  de la fase activa fruto de las alteraciones en la conductancia del  $K_{ATP}$  tal como se ha observado entre los efectos de la lipotoxicidad “*in vitro*” (Olofsson et al., 2007). En nuestro caso, no sólo no hemos encontrado ese tipo de alteraciones, sino que la interrupción de los registros de  $V_{mb}$  en los tramos correspondientes a la fase silente y activa para evaluar la conductancia del  $K_{ATP}$  tampoco muestra ninguna diferencia en este parámetro, siendo los valores obtenidos equivalentes a los descritos en la literatura con preparaciones similares (Olofsson et al., 2007). En relación a esto, tampoco hemos encontrado diferencias significativas en cuanto a la probabilidad de apertura del  $K_{ATP}$  en registros de canal unitario a las diferentes  $[glucosas]_{ext}$  utilizadas. A la vista de estos resultados, no hemos considerado necesario realizar un estudio específico de la sensibilidad del  $K_{ATP}$  al ATP o la cinética de apertura y cierre del canal, ya que estos factores solo intervendrían en una eventual variación de los tiempos de transición entre fases activas y silentes. Por tanto, en base a lo presentado aquí, cabría pensar que los eventos previos a alcanzar el umbral de generación de potenciales de acción, no tendrían un impacto determinante como participantes en la generación de las diferencias en cuanto a la magnitud de la respuesta de  $Ca^{2+}$  en nuestro modelo de obesidad.

El análisis detallado de los potenciales de acción generados a una  $[glucosa]_{ext}$  de 8 mM muestra un incremento en la amplitud de los potenciales de las células  $\beta$  aisladas de los ratones obesos. Este incremento no es el resultado de variaciones en el  $V_{mb}$  de partida de la fase ascendente, ya que éste no presenta diferencias entre los dos grupos de ratones. Por tanto, podemos asegurar que los potenciales de acción de los ratones obesos alcanzan  $V_{mb}$  mayores. En base a este resultado, nos planteamos la siguiente pregunta ¿Puede el incremento de la amplitud del potencial de acción producir una potenciación de la exocitosis a través de un aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  como el observado en nuestros experimentos de microfluorimetría?. La reciente revisión sobre la participación de los canales  $K_{Ca1.1}$  en la generación del potencial de acción en célula  $\beta$  llevada a cabo por varios laboratorios, es un buen punto de partida para contestar a dicha hipótesis (Houamed et al., 2010; Jacobson et al., 2007; Jacobson et al., 2010). Estos estudios, muestran que la inhibición del canal  $K_{Ca1.1}$  con paxilina incrementa la amplitud del potencial de acción, sin afectar al  $V_{mb}$  de la línea base, la anchura o el  $V_{mb}$  del periodo refractario, y además, aumenta la secreción de insulina un  $\approx 67\%$ . Estos trabajos han

resultado en la proposición de un modelo alternativo de generación del potencial de acción en célula  $\beta$ , que otorga un papel predominante al  $K_{Ca1.1}$  en las fases iniciales de la repolarización del potencial de acción y reevalúa la contribución de los  $K_V$ . Más aún, el uso como estímulo de potenciales de acción modelados a partir de registros en presencia (alta amplitud) o ausencia (baja amplitud) de paxilina en registros de *action potential-clamp*, ha permitido comprobar que los potenciales de acción de alta amplitud generan corrientes de  $Ca^{2+}$  un  $\approx 12\%$  mayores, y que una fracción considerablemente superior de la misma, se activa durante la lenta despolarización que precede a la rápida subida del potencial (Houamed et al., 2010). Estos dos efectos podrían resultar en un incremento de la liberación exocitótica por potencial de acción (Ammala et al., 1993b) y en un aumento del número de vesículas que entran en alta competencia para su liberación previo al estímulo (Gromada et al., 1999) respectivamente. Estas modificaciones explicarían por tanto el incremento en la secreción observado en presencia del antagonista (Houamed et al., 2010). Trasladando estas observaciones previas a nuestro modelo, resulta llamativo que el efecto de la dieta HFD sobre la forma del potencial de acción generado en células  $\beta$  aisladas en cultivo encaja perfectamente con el descrito mediante la inhibición de los canales  $K_{Ca1.1}$ . En nuestro modelo, no observamos diferencias en parámetros determinantes de la forma del potencial como la duración, o el potencial alcanzado durante el periodo refractario. La ausencia de estos efectos es sumamente importante en base a la proposición clásica del modelo de repolarización del potencial de acción en ratón. Según el mismo, el principal canal implicado en dicho proceso sería el  $K_V2.1$ , cuyo bloqueo, también produce un incremento de secreción de insulina dependiente de una mayor entrada de  $Ca^{2+}$ . No obstante, la potenciación de la exocitosis que promueve la inhibición del  $K_V2.1$  descansa en otro tipo de modificaciones. La disminución de la conductancia del  $K_V2.1$  produce potenciales de acción más anchos, en los que se observa una significativa disminución del potencial alcanzado en el periodo refractario y solo se afecta marginalmente a la amplitud (Herrington, 2007; Herrington et al., 2006). A la vista de nuestros resultados, no parece que las modificaciones observadas en la forma del potencial de acción generado por las células  $\beta$  de los ratones obesos se expliquen mediante la modulación de canales  $K_V2.1$ .

Otros parámetros derivados del análisis de los potenciales de acción que apoyan un incremento en la corriente de  $Ca^{2+}$  son los relacionados con las velocidades de despolarización y repolarización. En base a la equivalencia  $dV_{mb}/dt = -I/C_m$ , cabría suponer que, en las células de mayor tamaño como las nuestras, la velocidad de variación del  $V_{mb}$

en las fases de subida y repolarización de las espigas debería ser menor. Sin embargo, la mayor amplitud encontrada en los potenciales de acción generados por los ratones obesos no está acompañada de ningún cambio en el retraso temporal para alcanzar el valor de máxima despolarización. Esto se produce a costa de un incremento en la velocidad de subida del  $\approx 26\%$  respecto a los controles. El hecho de que esta velocidad aumente de forma casi significativa, plantea la posibilidad de un incremento en la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  responsable de la despolarización rápida del potencial de acción. El mismo razonamiento se puede aplicar para explicar el incremento en la velocidad de repolarización observado en los potenciales de los ratones obesos. En este caso resulta interesante que los experimentos de fijación de voltaje utilizando potenciales de alta amplitud como estímulo muestran, además del incremento en la corriente a través de  $\text{Ca}_V$ , un aumento de 4 veces en la corriente de potasio dependiente de  $\text{K}_V$  (Houamed et al., 2010).

### 3.4. Efecto de la dieta sobre las corrientes de $\text{Ca}^{2+}$ dependientes de voltaje

Algunos trabajos sobre el efecto de los NEFAs “*in vitro*” han reportado la modulación de los canales  $\text{Ca}_V$  por estos metabolitos (Feng et al., 2008; Olofsson et al., 2007; Olofsson et al., 2004). Además, otros autores han caracterizado los efectos “*in vivo*” de dietas HFD sobre aspectos relacionados con la excitotoxicidad dependiente de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los  $\text{Ca}_V$  y los propios  $\text{Ca}_V$ , planteando el hecho de que este canal no presenta alteraciones evidentes (Collins et al., 2010). La caracterización de las propiedades del canal  $\text{Ca}_V$  en nuestro modelo de obesidad, muestra diferencias significativas en relación a lo propuesto en estos trabajos. En primer lugar, hay que señalar que las propiedades electrofisiológicas de los  $\text{Ca}_V$  aportadas en la presente tesis se ajustan perfectamente a las descritas en la literatura para las medidas de corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  en célula  $\beta$  con condiciones de registro similares (soluciones intracelulares con  $\text{Cs}^{2+}$  como catión principal) (Gilon et al., 1997; Leung et al., 2005; Vignali et al., 2006). Por otro lado, existe un desplazamiento de  $\approx 10$  mV en la dependencia de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  por el  $V_{\text{pulso}}$  entre los registros de  $\text{Ca}_V$  y los de  $\text{K}_V$ , que puede ser debida a la diferente  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$  utilizada en función del experimento ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}} = 5$  mM en los registros de  $\text{Ca}_V$ ;  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}} = 2.5$  mM en los registros de  $\text{K}_V$ ). Este tipo de desplazamientos en la dependencia por el  $V_{\text{pulso}}$  a diferentes

$[Ca^{2+}]_{ext}$  ya han sido descritos en célula  $\beta$  (Plant, 1988), y no tienen por qué afectar a la comparación de los resultados entre ambos grupos de ratones en nuestro trabajo.

Nuestros resultados, plantean que existe un incremento de corriente de  $Ca^{2+}$  proporcional al aumento de tamaño de las células, que proporciona valores de densidad de corriente similares. Asumiendo que la conductancia unitaria del canal no varía, este incremento podría estar relacionado con un aumento del número de canales (N), o con una mayor corriente de  $Ca^{2+}$  por  $Ca_v$  (sin variaciones de N). Ambas opciones, tendrían un impacto decisivo sobre la capacidad exocitótica de la célula  $\beta$ . Por un lado, ya hemos comentado como el potencial aumento del número de canales  $Ca_v$  HVA-tipo L ( $Ca_v1.2$ ), resultante del incremento de tamaño, podría elevar significativamente la cantidad de “complejos exocitóticos” formados en la MP, e incrementar la magnitud de la primera fase de la secreción. Por otra parte, debido a la dependencia que presenta la tasa de exocitosis con la  $[Ca^{2+}]_i$  (Barg et al., 2001), el aumento de la corriente de  $Ca^{2+}$  por  $Ca_v$  podría llevar acompañado una respuesta exocitótica más vigorosa. Sin embargo, respecto a este último efecto, hay que tener en cuenta que dicha dependencia no es lineal, sino que su relación se ajusta a una función de Hill (Barg et al., 2001). Esto, junto con el hecho de que las  $[Ca^{2+}]_i$  efectivas para producir exocitosis en los dominios funcionales, están cerca de los valores de saturación del proceso (Barg et al., 2001), establece un límite en la potenciación de la exocitosis producida por un incremento en la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de los  $Ca_v$ .

En base a los valores de densidad de canales  $Ca_v$  en células  $\beta$  presentados anteriormente ( $\approx 1$  canal/ $\mu m^2$ ), y de la magnitud de la corriente medida en las células  $\beta$  de nuestros ratones obesos y controles (ND  $\approx -140$ pA; HFD  $\approx -195$ pA), podemos calcular que el número de canales teórico necesarios para alcanzar el incremento de corriente observado en los ratones obesos tendría que ser de  $\approx 760$  ( $\approx 215$   $Ca_v$  más que los controles). No obstante, en base al mismo valor de densidad, hemos calculado que nuestro incremento de tamaño supondría un aumento de  $\approx 100$   $Ca_v$  en las células  $\beta$  de los ratones obesos respecto a los controles. Luego, incluso en el caso de que el incremento de corriente de  $Ca^{2+}$  resultase de un aumento en el número de  $Ca_v$ , estos deberían teóricamente corregir esta discrepancia entre ambos valores mediante un ligero incremento de la corriente de  $Ca^{2+}$  por  $Ca_v$  ( $\approx 0.07$ pA/ $Ca_v$ ). El potencial efecto sobre la amplitud de la corriente de  $Ca^{2+}$  resulta interesante, no solo en base a su participación en el proceso de exocitosis, sino a

---

la posible contribución de este incremento en la modificación de la amplitud del potencial de acción observada en los experimentos de *perforated-patch*.

Un factor adicional a tener en cuenta es la segregación funcional que se ha descrito entre los canales  $Ca_v$  presentes en la célula  $\beta$ . Como se ha presentado en la introducción, los canales  $Ca_v$  HVA-tipo L ( $Ca_v1.2$ ) están físicamente ligados a la maquinaria exocitótica a través del fragmento “*synprint*” y, por tanto, íntimamente asociados al proceso de liberación de las LDCVs pertenecientes al RRP (Schulla et al., 2003; Wisser et al., 1999), mientras que los canales  $Ca_v$  HVA-tipo R ( $Ca_v2.3$ ) han sido relacionados principalmente con el proceso de “rellenado” de las LDCVs implicado en las fases posteriores a la liberación del RRP (Jing et al., 2005). Por tanto, el impacto sobre la secreción que provocaría un incremento de un tipo específico de  $Ca_v$  sería obviamente distinto. Los experimentos de caracterización de la corriente de  $Ca^{2+}$  presentados aquí, no responderían completamente a dicha cuestión, pero sí es importante señalar que la inclusión del antagonista específico de canales  $Ca_v$  HVA-tipo L ( $Ca_v1.2$ ) nifedipina en el medio que baña las células, produce una disminución equivalente en la corriente de  $Ca^{2+}$  de los ratones obesos y sus controles (resultados no mostrados), lo que plantea que el potencial incremento de corriente por aumento del número de canales no se produce por un incremento preferencial de este subtipo de  $Ca_v$ .

Por último, hay que tener en cuenta que la caracterización de las corrientes de  $Ca^{2+}$  que se ha llevado a cabo en el presente estudio, ha sido realizada en configuración de *whole-cell* estándar. En dicha configuración de registro, el medio intracelular se dializa en el mayor volumen de la pipeta, con la consiguiente pérdida potencial de factores de regulación, metabolitos etc...esto quiere decir que, una eventual modulación bioquímica de la amplitud de la respuesta del canal  $Ca_v$  no sería apreciable en nuestros experimentos. En este sentido, la modulación de la probabilidad de apertura del canal  $Ca_v$  (Smith et al., 1989b) y el proceso de exocitosis por compuestos derivados del metabolismo de la glucosa como el NADH (MacDonald, 2011) ya ha sido descrita en célula  $\beta$ . Igualmente, es importante señalar que esta modulación por parte de metabolitos, podría estar también implicada en el efecto sobre la amplitud del potencial de acción observado, y sobre los incrementos en las señales de  $Ca^{2+}$  detectados mediante microfluorimetría en los islotes de ratones obesos.

Tanto la cinética de activación como la de inactivación, no presentan diferencias entre nuestros grupos de estudio. Esto reduce la posibilidad de una posible modificación de la

magnitud de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  por efecto de la modulación de estos parámetros. No obstante, esta posibilidad no se puede desestimar por completo debido, una vez más, al efecto de diálisis del contenido intracelular, que pueda eliminar potenciales intermediarios que alteren las propiedades cinéticas de los  $\text{Ca}_V$ . La ausencia de efecto sobre la cinética de inactivación del  $\text{Ca}_V$  puede representar una prueba indirecta de que la magnitud de la corriente no está alterada. Si este fuera el caso, habría que esperar una variación en este parámetro ya que presenta una manifiesta dependencia con la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (Plant, 1988; Rorsman et al., 2011b).

### 3.5. Efecto de la dieta sobre las corrientes de $\text{K}^+$ dependientes de voltaje

Al igual que ocurría en el caso de los  $\text{Ca}_V$ , también se han descrito acciones de los NEFAs sobre las corrientes de  $\text{K}^+$  (Feng et al., 2006). Debido a ello y al hecho de que la modulación de la corriente de  $\text{K}^+$  a través de los canales  $\text{K}_V$  ó  $\text{K}_{\text{Ca}}$  puede provocar efectos significativos en las variaciones de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y la secreción de insulina (MacDonald et al., 2001; MacDonald et al., 2002; Tamarina et al., 2005), resulta interesante evaluar los posibles efectos de la dieta HFD sobre estas corrientes.

Las corrientes de  $\text{K}^+$  registradas sobre las células  $\beta$  de ratones obesos muestran leves pero importantes modificaciones respecto a las de sus controles. Si bien es cierto que la reducción de la amplitud de la corriente de  $\text{K}^+$  observada entre -20 y 0mV es muy pequeña, ésta abarca el rango de  $V_{\text{mb}}$  correspondientes al pico del potencial de acción en célula  $\beta$ . El hecho de que esta disminución de corriente se produzca precisamente sobre estos  $V_{\text{mb}}$  plantea la posible relación de este efecto con el incremento de la amplitud del potencial de acción reportado en los experimentos de *perforated-patch*. Como ya hemos señalado en varias ocasiones, la reciente revisión del modelo de generación del potencial de acción, que postula la importancia crítica de los canales  $\text{K}_{\text{Ca}1.1}$  en las primeras fases de la repolarización (Houamed et al., 2010), resulta especialmente relevante en base a los efectos observados en nuestro modelo de obesidad. Además, este canal resulta interesante también en relación a la modulación de la exocitosis, ya que tras un incremento de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , la activación del flujo de salida de  $\text{K}^+$  a través de los  $\text{K}_{\text{Ca}}$  produce la repolarización del  $V_{\text{mb}}$  limitando la entrada de este ión y afectando a la cinética de los incrementos transitorios de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y, por tanto, a las vías de señalización que se regulan por estos cambios locales en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Fakler and Adelman, 2008). El alcance de nuestra

caracterización de las corrientes de  $K^+$  no permite concluir de forma tajante la participación del canal  $K_{Ca1.1}$  en la modificación de la forma del potencial de acción observada en los ratones obesos, ya que no hemos utilizado herramientas farmacológicas para separar las contribuciones relativas de  $K_V$  y  $K_{Ca}$  a la corriente total. No obstante, podemos analizar ciertas características que podrían resultar relevantes a este respecto. En primer lugar, las diferencias significativas en la amplitud de la corriente de  $K^+$  presentes en el análisis de la relación  $I_{K^+} - V_{pulsos}$  resultantes del máximo de corriente, desaparecen cuando establecemos la misma relación mediante el análisis de la corriente de  $K^+$  mantenida al final del pulso de 500ms. En base esta diferencia podríamos señalar que en la corriente de  $K^+$  observada en las células  $\beta$  de los ratones controles, existe una mayor contribución de una conductancia de rápida inactivación que en las de los ratones obesos. Este comportamiento cinético puede deberse a una mayor contribución de canales  $K_{Ca1.1}$  a la corriente de los ratones controles, hecho que se ha descrito previamente por otros autores (Smith et al., 1990b). No existen indicios de esta diferencia en la cinética de inactivación cuando realizamos experimentos específicos para medir este parámetro, sin embargo, hay que resaltar el hecho de que, en estos últimos, el  $V_{pulsos}$  utilizado fue de +30mV. A este  $V_{pulsos}$  tampoco encontramos diferencias en el resto de experimentos, ya que parece que los efectos se restringen a un rango de  $V_{pulsos}$  específico. En relación a esto, cuando se enfrentan las corrientes de entrada de  $Ca^{2+}$  y salida de  $K^+$  generadas en los mismos registros, podemos comprobar cómo los  $V_{pulsos}$  a los que se presentan las disminuciones de la corriente de  $K^+$ , coinciden con el máximo de corriente de  $Ca^{2+}$  evocada. Debido a que se ha demostrado la presencia de macrocomplejos de membrana formados por canales  $Ca_V$  y  $K_{Ca1.1}$  íntimamente asociados, en los cuales, la corriente de  $K^+$  a través de los  $K_{Ca1.1}$  (dependiente de  $Ca^{2+}$ ) está determinada por la dependencia de voltaje y el curso temporal de las corrientes de  $Ca^{2+}$  a través de los  $Ca_V$  (Berkefeld and Fakler, 2008; Berkefeld et al., 2006), el paralelismo entre los efectos observados en ambas corrientes, podría indicar una menor activación de los  $K_{Ca1.1}$  y explicar porque no vemos efecto sobre la inactivación a +30mV. A este respecto, también resulta interesante que la corriente de  $K^+$  de los ratones obesos muestra constantes de tiempo de activación ( $\tau_m$ ) más lentas a  $V_{pulsos}$  de -10 (no significativa) y 0mV. El hecho de que los canales  $K_{Ca1.1}$  se activen con  $\tau_m$  más rápidas que los  $K_V$  (Satin et al., 1989), podría de nuevo relacionar dicho efecto con una menor participación de los  $K_{Ca1.1}$  en la corriente de  $K^+$  generada a estos  $V_{pulsos}$ . Otro factor a tener en cuenta sobre la participación de canales  $K_V$  o  $K_{Ca}$  en la generación de los efectos observados en la amplitud de los potenciales de las células  $\beta$  de los ratones obesos es, como ya se ha señalado, que el efecto de la inhibición de los canales  $K_V$  no produce este

tipo de modificaciones en la forma del potencial de acción (Ashcroft and Rorsman, 2004; Herrington, 2007; Herrington et al., 2006). No obstante, desconocemos el efecto que puede tener una pequeña disminución de la amplitud de la corriente a través de los  $K_V$  restringida a un rango de potenciales determinado. Por ello, no podemos descartar completamente la posibilidad de que nuestros efectos estén mediados por una modulación de la conductancia de estos canales.

A pesar de los indicios presentados sobre la participación de los canales  $K_{Ca1.1}$  en los efectos observados en la generación de potenciales de acción, somos conscientes de que los resultados presentados aquí no son concluyentes y que resulta imprescindible aportar información adicional en relación a este canal. La razón por la que no hemos conseguido resolver de forma clara la contribución del canal  $K_{Ca}$  se encuentra sin duda en las condiciones experimentales utilizadas. Es una práctica común en los registros de *whole-cell patch-clamp*, incluir altas concentraciones de diferentes quelantes de  $Ca^{2+}$  (EGTA y BAPTA principalmente) para mimetizar las bajas  $[Ca^{2+}]_i$  y favorecer la consecución y estabilidad de los registros (Jackson, 2001). En el caso de las corrientes de  $K^+$  presentadas en esta tesis, se han utilizado soluciones intracelulares con fuertes condiciones amortiguadoras ( $[EGTA]_{int} = 10mM$ ;  $[Ca^{2+}]_i = 2.5mM$ ). Debido a la codependencia del  $Ca^{2+}$  y el voltaje que presenta el  $K_{Ca1.1}$ , dichas condiciones dificultan el registro de estos canales (Satin et al., 1989). La razón de este efecto es que las diferencias en concentración y propiedades cinéticas del quelante utilizado conforman diversos perfiles de disminución de  $[Ca^{2+}]_i$  desde el vestíbulo de entrada de  $Ca^{2+}$  a través del  $Ca_V$ . Por esto, en función de la distancia entre el foco de entrada de  $Ca^{2+}$  y el componente que muestra dependencia por él (en este caso el  $K_{Ca1.1}$ ) la utilización de uno u otro quelante y/o concentración del mismo, determinará que el sensor de  $Ca^{2+}$  se vea afectado por el ión (Fakler and Adelman, 2008). A este respecto, resulta interesante señalar que condiciones de registro similares a las nuestras ( $[EGTA]_{int} = 10mM$ ;  $[Ca^{2+}]_i = 1mM$ ), no han resultado problemáticas a la hora de registrar evidentes corrientes de  $K^+$  a través de  $K_{Ca1.1}$  en células  $\beta$  humanas, especie en la que se le han asignado funciones equivalentes a las comentadas, y cuyo bloqueo también produce un incremento de la amplitud del potencial de acción (Braun et al., 2008). Estas diferencias en el efecto del EGTA podrían estar relacionadas con modificaciones en la arquitectura de los macrocomplejos de membrana (Fakler and Adelman, 2008) entre células  $\beta$  de diferentes especies, o con alteraciones de los mismos en el proceso de disgregación y cultivo de las células.

### 3.6. Efecto de la dieta sobre la exocitosis y la dinámica de las vesículas de insulina

La caracterización detallada del proceso de secreción hormonal mediante medidas bioquímicas y experimentos de capacitancia, ha permitido proponer un modelo por el que se postula la existencia de diferentes grupos funcionales de vesículas de secreción en función de su estado de competencia para ser liberados (Neher, 1998). Las células  $\beta$  han demostrado ajustarse a ese modelo (Rorsman and Renstrom, 2003). De la totalidad de LDCVs presentes en el interior de la célula  $\beta$ , apenas un  $\approx 5\%$  se encuentra “anclado” a la MP y un 0.5-1% está disponible para su liberación inmediata (RRP) (Kanno et al., 2004; Rorsman and Renstrom, 2003). Este último grupo, engloba tanto los LDCVs íntimamente asociados a los  $Ca_v$ , que se liberan con una mínima latencia tras el estímulo (“anclados” y “maduros”), como los que requieren de pequeñas modificaciones químicas (“anclados” e “inmaduros”) y se liberan inmediatamente después (Barg et al., 2002a). En el presente estudio hemos utilizado experimentos de monitorización de las variaciones de  $C_m$  para evaluar las alteraciones en el proceso de exocitosis de este grupo de LDCVs en las células  $\beta$  de los ratones obesos. En una primera aproximación, hemos utilizado una estimulación repetida con 10 pulsos de larga duración (500ms; 1Hz). Es necesario aclarar que este tipo de estimulación, provoca la liberación de la práctica totalidad de los LDCVs pertenecientes al RRP durante los 2 primeros pulsos (Gillis et al., 1996; Kanno et al., 2004), tras lo cual, la exocitosis continúa a un ritmo significativamente menor debido al “reclutamiento” de nuevos LDCVs. El concepto de “reclutamiento” en este tipo de experimento no implica necesariamente que las LDCVs pertenecientes al grupo de reserva (RP) se desplacen “largas distancias” para incorporarse a la MP (Rorsman and Renstrom, 2003). Por el contrario, se ha demostrado que en célula  $\beta$  el RRP representa una pequeña fracción (3-15%) del número total de LDCVs “ancladas” a la MP (Barg et al., 2002a; Olofsson et al., 2002; Rorsman and Renstrom, 2003) y que, simplemente con la aportación de este grupo de LDCVs “pre-anclado”, la secreción de insulina estimulada por un aumento de la  $[glucosa]_{ext}$  puede extenderse teóricamente durante  $\approx 2$  horas (50 LDCVs de la primera fase + 120 minutos de exocitosis a 5 LDCVs/min) (Rorsman and Renstrom, 2003). El segundo tipo de estímulo utilizado (15 pulsos de 50ms a 10Hz), se ha elegido debido a que nos permite un análisis de los eventos exocitóticos que se producen en dominios funcionales más restringidos del espacio submembrana. Esto se debe a que los pulsos repetidos de 500ms producen un  $\Delta[Ca^{2+}]_i$  en el espacio submembrana más allá de

la evocada por los pulsos de 50ms, y por tanto una “expansión” de los microdominios de  $\text{Ca}^{2+}$  (Hoppa et al., 2009).

En nuestro modelo, el  $\Delta C_m$  registrado en las células  $\beta$  de los ratones obesos, presenta un aumento significativo respecto a sus controles en el caso de la liberación del RRP y del posterior “reclutamiento” de LDCVs. Este incremento, se produce con un aumento proporcional de la  $Q_{\text{Ca}^{2+}}$ , equivalente al descrito en el análisis de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$ . En relación a los resultados de los experimentos de caracterización de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$ , hemos comentado que el incremento observado (sin variación de la densidad de corriente), podría estar ocasionado por un aumento en el número de canales  $\text{Ca}_V$  o la magnitud de la corriente a través de los mismos. Esta dualidad, ha de ser considerada a la hora de buscar un posible mecanismo para el aumento de la tasa de exocitosis observada en nuestros resultados de monitorización del  $\Delta C_m$ . Como hemos comentado, la potencial presencia de más  $\text{Ca}_V$  en la MP de las células  $\beta$  de los ratones obesos podría suponer la formación adicional de  $\approx 35$  “complejos exocitóticos”, lo que supondría un incremento del  $\approx 19\%$  respecto al valor calculado a partir de la superficie promedio de las células  $\beta$  de los controles y la relación  $1\text{Ca}_V/\mu\text{m}^2$  (Barg et al., 2001). Debido a que, posiblemente, los dos métodos utilizados para resolver la contribución del RRP suponen la “contaminación” de la respuesta con un pequeño grupo de LDCVs que no pertenecen a él, este valor no está muy lejos de la diferencia de  $\Delta C_m$  obtenido durante los dos primeros pulsos de 500ms (28%). Además, es interesante señalar que existen estudios histológicos mediante microscopía electrónica, que demuestran un incremento del número de vesículas por célula  $\beta$  en animales sometidos a dietas HFD (Souza-Mello et al., 2011). Pese a que estos estudios no analizan específicamente el incremento de vesículas ancladas a la MP, es igualmente interesante considerar un posible efecto de este incremento en el número de vesículas en el contexto de nuestros resultados. En relación a este último punto, el hecho de que el  $\Delta C_m$  acumulado en los pulsos que siguen a los 2 primeros (“reclutamiento”) también sea mayor en los ratones obesos, podría explicarse por este aumento del número de LDCVs en la cercanía de la MP (sin alteraciones en la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$ ). En relación a los efectos sobre la exocitosis de un posible aumento de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$ , habría que tener en cuenta la arquitectura de los dominios funcionales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Como hemos comentado, estos dominios se conforman con una estequiometría de  $1\text{LDCV}:3\text{Ca}_V$  y se ha comprobado cómo esta organización mejora el rendimiento de la exocitosis evitando la influencia del comportamiento estocástico de las aperturas de un único canal (Barg et al., 2001). Por tanto, la correcta organización de los “complejos exocitóticos” ha de influir

---

decisivamente en la eventual potenciación de la exocitosis por un aumento de corriente a través de los  $Ca_v$ . Un ejemplo de la importancia del mantenimiento de la arquitectura de estos “complejos exocitóticos” es el reciente modelo propuesto como explicación al fallo en la secreción de insulina en estadios avanzados de la progresión de la DM tipo II. Según este modelo, el deterioro de la capacidad exocitótica no se produce por alteraciones en la generación de potenciales de acción, señalización intracelular y/o canales de  $Ca^{2+}$ , sino por la alteración de la relación  $Ca_v$ -LDCV en los complejos exocitóticos (Collins et al., 2010; Hoppa et al., 2009).

En base a las posibilidades comentadas, el hecho de que los efectos sobre el  $\Delta C_m$  se anulen cuando se normalizan los datos por el tamaño de las células registradas, hace pensar en una relación entre el aumento en magnitud del efecto y el mayor tamaño de la célula. No obstante, y como ya se ha adelantado, cuando enfrentamos los datos de tamaño con la respuesta de  $\Delta C_m$  máxima, podemos comprobar que no son las células más grandes las que secretan más LDCVs (tanto en los pulsos de 500ms como de 50ms). Existe un rango de tamaños intermedio ( $5pF \leq x \leq 6.5pF$ ), donde se produce el incremento de respuesta significativo, en contraposición a uno mayor que no ve modificada su capacidad secretora en comparación con los controles. Este tipo de relaciones entre la capacidad secretora y el tamaño celular ya han sido descritas en el caso de las células  $\beta$  pancreáticas, y en estos mismos estudios se descartaba una posible explicación basada en diferencias en la corriente a través de canales  $Ca_v$  (Leung et al., 2005). Alternativamente, otros estudios han puesto de manifiesto una relación entre la hipertrofia y la desdiferenciación celular dependiente de altos niveles de c-myc (Asghar et al., 2006), mecanismo que podría estar detrás de la pérdida de función de las células de mayor tamaño. Sin embargo, salvo algunos ejemplos aislados como estos, no abundan trabajos que profundicen en los mecanismos que median en las consecuencias funcionales de la hipertrofia en célula  $\beta$ , quizá debido a que en las preparaciones de células pancreáticas disgregadas se suelen elegir aquellas de tamaños más grandes para evitar registrar otros tipos celulares (las células  $\alpha$  y  $\delta$  son de menor tamaño). De nuestros resultados se deriva el potencial impacto que tendría esta heterogeneidad funcional en relación al tamaño para el desarrollo de la DM tipo II. La separación de los resultados por rangos de tamaño también nos ha permitido constatar diferencias en cuanto a la “eficacia” de la exocitosis. En el caso de las células de tamaños intermedios, la magnitud de la respuesta exocitótica frente a una determinada densidad de corriente de  $Ca^{2+}$  esta aumentada en las células  $\beta$

de los ratones obesos. Este resultado apunta, una vez más, a una modificación funcional que mejora el rendimiento secretor de la célula  $\beta$  en este rango de tamaño específico.

Por último, hay que recordar una vez más que la exocitosis de las LDCVs depende en gran medida de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los  $\text{Ca}_v$ . Debido a esta relación la magnitud de ambos procesos muestra un gran paralelismo, es decir, la dependencia de  $V_{\text{pulso}}$  para la activación de los  $\text{Ca}_v$  es un reflejo exacto de la dependencia para la activación del  $\Delta C_m$ . Esta relación propicia que los potenciales a los que se produce la respuesta secretora coincida con los que cubre el potencial de acción en su ascenso. En nuestro caso, el hecho de que los potenciales de acción de las células  $\beta$  de los ratones obesos sean de mayor amplitud, también implica que abarcan un rango de potenciales donde se concentran las mayores diferencias en cuanto al  $\Delta C_m$ . Este hecho puede también contribuir a incrementar la respuesta exocitótica de la célula  $\beta$ .





## **VI. CONCLUSIONES**



1. Los ratones C57BL/6J hembra alimentados con dieta rica en grasa durante 12 semanas representan un modelo idóneo para el estudio de las adaptaciones estructurales y funcionales que sufren las células  $\beta$  en respuesta a una situación de obesidad.
2. Las células  $\beta$  de los ratones alimentados con dieta rica en grasa presentan una significativa hipertrofia en comparación con los alimentados con dieta control, pero no muestran alteraciones evidentes en la masa de célula  $\beta$ .
3. Las células  $\beta$  de los ratones alimentados con dieta rica en grasa no presentan alteraciones en el comportamiento de los canales  $K_{ATP}$ , tanto a nivel de la conductancia global al potasio a través de ellos, como a nivel de la actividad del canal unitario.
4. Los ratones alimentados con dieta rica en grasa presentan un incremento significativo de la amplitud de los potenciales de acción generados a una concentración de glucosa externa de 8 mM, este incremento podría estar relacionado con la potenciación de las respuestas de calcio.
5. Los ratones alimentados con dieta rica en grasas muestran un incremento mantenido en la disponibilidad de calcio intracelular tras un incremento de concentración de glucosa externa. Este efecto es perceptible tanto a nivel de islote intacto como de célula aislada y podría representar la base para el aumento de secreción observado en estos ratones.
6. El porcentaje de células aisladas en cultivo que responden a un incremento de la concentración de glucosa externa es mayor en los ratones alimentados con dieta rica en grasa, lo que podría significar que, a una determinada concentración de glucosa externa, existe un mayor "reclutamiento" de células  $\beta$  que proporcionen una mayor magnitud a la respuesta secretora en este grupo.
7. Las células  $\beta$  en cultivo de los ratones alimentados con dieta rica en grasa muestran un aumento de la magnitud de la corriente de calcio, proporcional a su incremento de tamaño, que podría participar en la potenciación de su respuesta exocitótica

8. Las células  $\beta$  en cultivo de los ratones alimentados con dieta rica en grasa muestran alteraciones en las corrientes de potasio, a partir de las que se podría explicar el aumento en la amplitud de los potenciales de acción.
9. La respuesta excitotónica de las células  $\beta$  individuales provenientes de páncreas de ratones alimentados con dieta rica en grasa está aumentada en un grupo específico de células cuyo tamaño no varía en relación a sus controles.
10. **Los resultados aportados en el presente trabajo demuestran que, en el contexto de la resistencia a la insulina asociada a la obesidad, la respuesta secretora de las células  $\beta$  pancreáticas puede modularse mediante la incorporación de adaptaciones funcionales que afectan a múltiples procesos en el acoplamiento estímulo-secreción.**





## **VII. BIBLIOGRAFÍA**



---

Aguilar-Bryan, L., Nichols, C.G., Wechsler, S.W., Clement, J.P.t., Boyd, A.E., 3rd, Gonzalez, G., Herrera-Sosa, H., Nguy, K., Bryan, J., and Nelson, D.A. (1995). Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* 268, 423-426.

Ahren, B. (2000). Autonomic regulation of islet hormone secretion--implications for health and disease. *Diabetologia* 43, 393-410.

Ahren, B., Leander, S., and Lundquist, I. (1981). Effects of 4-aminopyridine on insulin secretion and plasma glucose levels in intact and adrenalectomized-chemically sympathectomized mice. *Eur J Pharmacol* 74, 221-226.

Ahren, B., and Scheurink, A.J. (1998). Marked hyperleptinemia after high-fat diet associated with severe glucose intolerance in mice. *Eur J Endocrinol* 139, 461-467.

Ahren, J., Ahren, B., and Wierup, N. (2010). Increased beta-cell volume in mice fed a high-fat diet: a dynamic study over 12 months. *Islets* 2, 353-356.

Ammala, C., Bokvist, K., Larsson, O., Berggren, P.O., and Rorsman, P. (1993a). Demonstration of a novel apamin-insensitive calcium-activated K<sup>+</sup> channel in mouse pancreatic B cells. *Pflugers Arch* 422, 443-448.

Ammala, C., Eliasson, L., Bokvist, K., Larsson, O., Ashcroft, F.M., and Rorsman, P. (1993b). Exocytosis elicited by action potentials and voltage-clamp calcium currents in individual mouse pancreatic B-cells. *J Physiol* 472, 665-688.

Ammala, C., Larsson, O., Berggren, P.O., Bokvist, K., Juntti-Berggren, L., Kindmark, H., and Rorsman, P. (1991). Inositol trisphosphate-dependent periodic activation of a Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> conductance in glucose-stimulated pancreatic beta-cells. *Nature* 353, 849-852.

Andreu, E., Soria, B., and Sanchez-Andres, J.V. (1997). Oscillation of gap junction electrical coupling in the mouse pancreatic islets of Langerhans. *J Physiol* 498 ( Pt 3), 753-761.

Anello, M., Gilon, P., and Henquin, J.C. (1999). Alterations of insulin secretion from mouse islets treated with sulphonylureas: perturbations of Ca<sup>2+</sup> regulation prevail over changes in insulin content. *Br J Pharmacol* 127, 1883-1891.

Antcliff, J.F., Haider, S., Proks, P., Sansom, M.S., and Ashcroft, F.M. (2005). Functional analysis of a structural model of the ATP-binding site of the KATP channel Kir6.2 subunit. *EMBO J* 24, 229-239.

Arkhammar, P., Nilsson, T., Rorsman, P., and Berggren, P.O. (1987). Inhibition of ATP-regulated K<sup>+</sup> channels precedes depolarization-induced increase in cytoplasmic free Ca<sup>2+</sup> concentration in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 262, 5448-5454.

Asghar, Z., Yau, D., Chan, F., Leroith, D., Chan, C.B., and Wheeler, M.B. (2006). Insulin resistance causes increased beta-cell mass but defective glucose-stimulated insulin secretion in a murine model of type 2 diabetes. *Diabetologia* 49, 90-99.

Ashcroft, F.M., Harrison, D.E., and Ashcroft, S.J. (1984). Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells. *Nature* 312, 446-448.

Ashcroft, F.M., and Rorsman, P. (1989). Electrophysiology of the pancreatic beta-cell. *Prog Biophys Mol Biol* 54, 87-143.

Ashcroft, F.M., and Rorsman, P. (2004). Molecular defects in insulin secretion in type-2 diabetes. *Rev Endocr Metab Disord* 5, 135-142.

Aspinwall, C.A., Lakey, J.R., and Kennedy, R.T. (1999). Insulin-stimulated insulin secretion in single pancreatic beta cells. *J Biol Chem* 274, 6360-6365.

Atwater, I., Ribalet, B., and Rojas, E. (1979). Mouse pancreatic beta-cells: tetraethylammonium blockage of the potassium permeability increase induced by depolarization. *J Physiol* 288, 561-574.

Augustine, G.J., Santamaria, F., and Tanaka, K. (2003). Local calcium signaling in neurons. *Neuron* 40, 331-346.

Barbosa, R.M., Silva, A.M., Tome, A.R., Stamford, J.A., Santos, R.M., and Rosario, L.M. (1998). Control of pulsatile 5-HT/insulin secretion from single mouse pancreatic islets by intracellular calcium dynamics. *J Physiol* 510 ( Pt 1), 135-143.

Barg, S., Eliasson, L., Renstrom, E., and Rorsman, P. (2002a). A subset of 50 secretory granules in close contact with L-type Ca<sup>2+</sup> channels accounts for first-phase insulin secretion in mouse beta-cells. *Diabetes* 51 Suppl 1, S74-82.

Barg, S., Galvanovskis, J., Gopel, S.O., Rorsman, P., and Eliasson, L. (2000). Tight coupling between electrical activity and exocytosis in mouse glucagon-secreting alpha-cells. *Diabetes* 49, 1500-1510.

Barg, S., Ma, X., Eliasson, L., Galvanovskis, J., Gopel, S.O., Obermuller, S., Platzer, J., Renstrom, E., Trus, M., Atlas, D., *et al.* (2001). Fast exocytosis with few Ca<sup>2+</sup> channels in insulin-secreting mouse pancreatic B cells. *Biophys J* 81, 3308-3323.

Barg, S., Olofsson, C.S., Schriever-Abeln, J., Wendt, A., Gebre-Medhin, S., Renstrom, E., and Rorsman, P. (2002b). Delay between fusion pore opening and peptide release from large dense-core vesicles in neuroendocrine cells. *Neuron* 33, 287-299.

Bergsten, P. (1995). Slow and fast oscillations of cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> in pancreatic islets correspond to pulsatile insulin release. *Am J Physiol* 268, E282-287.

Berkefeld, H., and Fakler, B. (2008). Repolarizing responses of BKCa-Cav complexes are distinctly shaped by their Cav subunits. *J Neurosci* 28, 8238-8245.

Berkefeld, H., Sailer, C.A., Bildl, W., Rohde, V., Thumfart, J.O., Eble, S., Klugbauer, N., Reisinger, E., Bischofberger, J., Oliver, D., *et al.* (2006). BKCa-Cav channel complexes mediate rapid and localized Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> signaling. *Science* 314, 615-620.

Bernal-Mizrachi, E., Wen, W., Stahlhut, S., Welling, C.M., and Permutt, M.A. (2001). Islet beta cell expression of constitutively active Akt1/PKB alpha induces striking hypertrophy, hyperplasia, and hyperinsulinemia. *J Clin Invest* 108, 1631-1638.

- Best, L., Jarman, E., and Brown, P.D. (2011). A dual action of saturated fatty acids on electrical activity in rat pancreatic beta-cells. Role of volume-regulated anion channel and KATP channel currents. *J Physiol* 589, 1307-1316.
- Bichet, D., Cornet, V., Geib, S., Carlier, E., Volsen, S., Hoshi, T., Mori, Y., and De Waard, M. (2000). The I-II loop of the Ca<sup>2+</sup> channel alpha1 subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit. *Neuron* 25, 177-190.
- Bichet, D., Haass, F.A., and Jan, L.Y. (2003). Merging functional studies with structures of inward-rectifier K(+) channels. *Nat Rev Neurosci* 4, 957-967.
- Boden, G. (1997). Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes* 46, 3-10.
- Bokvist, K., Eliasson, L., Ammala, C., Renstrom, E., and Rorsman, P. (1995). Co-localization of L-type Ca<sup>2+</sup> channels and insulin-containing secretory granules and its significance for the initiation of exocytosis in mouse pancreatic B-cells. *EMBO J* 14, 50-57.
- Bonner-Weir, S. (2000). Islet growth and development in the adult. *J Mol Endocrinol* 24, 297-302.
- Bonner-Weir, S., Deery, D., Leahy, J.L., and Weir, G.C. (1989). Compensatory growth of pancreatic beta-cells in adult rats after short-term glucose infusion. *Diabetes* 38, 49-53.
- Bratanova-Tochkova, T.K., Cheng, H., Daniel, S., Gunawardana, S., Liu, Y.J., Mulvaney-Musa, J., Schermerhorn, T., Straub, S.G., Yajima, H., and Sharp, G.W. (2002). Triggering and augmentation mechanisms, granule pools, and biphasic insulin secretion. *Diabetes* 51 Suppl 1, S83-90.
- Braun, M., Ramracheya, R., Bengtsson, M., Zhang, Q., Karanauskaite, J., Partridge, C., Johnson, P.R., and Rorsman, P. (2008). Voltage-gated ion channels in human pancreatic beta-cells: electrophysiological characterization and role in insulin secretion. *Diabetes* 57, 1618-1628.
- Brissova, M., Fowler, M.J., Nicholson, W.E., Chu, A., Hirshberg, B., Harlan, D.M., and Powers, A.C. (2005). Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *J Histochem Cytochem* 53, 1087-1097.
- Bruns, D., and Jahn, R. (2002). Molecular determinants of exocytosis. *Pflugers Arch* 443, 333-338.
- Buchanan, T.A., Metzger, B.E., Freinkel, N., and Bergman, R.N. (1990). Insulin sensitivity and B-cell responsiveness to glucose during late pregnancy in lean and moderately obese women with normal glucose tolerance or mild gestational diabetes. *Am J Obstet Gynecol* 162, 1008-1014.
- Buettner, R., Scholmerich, J., and Bollheimer, L.C. (2007). High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity* (Silver Spring) 15, 798-808.
- Butler, A.E., Janson, J., Soeller, W.C., and Butler, P.C. (2003). Increased beta-cell apoptosis prevents adaptive increase in beta-cell mass in mouse model of type 2 diabetes:

evidence for role of islet amyloid formation rather than direct action of amyloid. *Diabetes* 52, 2304-2314.

Cabrera, O., Berman, D.M., Kenyon, N.S., Ricordi, C., Berggren, P.O., and Caicedo, A. (2006). The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 2334-2339.

Campbell, J.D., Sansom, M.S., and Ashcroft, F.M. (2003). Potassium channel regulation. *EMBO Rep* 4, 1038-1042.

Catterall, W.A. (2011). Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3, a003947.

Catterall, W.A., Perez-Reyes, E., Snutch, T.P., and Striessnig, J. (2005). International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev* 57, 411-425.

Coetzee, W.A., Amarillo, Y., Chiu, J., Chow, A., Lau, D., McCormack, T., Moreno, H., Nadal, M.S., Ozaita, A., Pountney, D., *et al.* (1999). Molecular diversity of K<sup>+</sup> channels. *Ann N Y Acad Sci* 868, 233-285.

Collins, S.C., Hoppa, M.B., Walker, J.N., Amisten, S., Abdulkader, F., Bengtsson, M., Fearnside, J., Ramracheya, R., Toyne, A.A., Zhang, Q., *et al.* (2010). Progression of diet-induced diabetes in C57BL6J mice involves functional dissociation of Ca<sup>2+</sup> channels from secretory vesicles. *Diabetes* 59, 1192-1201.

Cook, D.L., and Hales, C.N. (1984). Intracellular ATP directly blocks K<sup>+</sup> channels in pancreatic B-cells. *Nature* 311, 271-273.

Cook, D.L., Satin, L.S., and Hopkins, W.F. (1991). Pancreatic B cells are bursting, but how? *Trends Neurosci* 14, 411-414.

Chapman, E.R. (2002). Synaptotagmin: a Ca<sup>2+</sup> sensor that triggers exocytosis? *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 498-508.

Chen, C., Hosokawa, H., Bumbalo, L.M., and Leahy, J.L. (1994). Mechanism of compensatory hyperinsulinemia in normoglycemic insulin-resistant spontaneously hypertensive rats. Augmented enzymatic activity of glucokinase in beta-cells. *J Clin Invest* 94, 399-404.

Choe, S. (2002). Potassium channel structures. *Nat Rev Neurosci* 3, 115-121.

Daniel, S., Noda, M., Straub, S.G., and Sharp, G.W. (1999). Identification of the docked granule pool responsible for the first phase of glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* 48, 1686-1690.

De Vos, A., Heimberg, H., Quartier, E., Huypens, P., Bouwens, L., Pipeleers, D., and Schuit, F. (1995). Human and rat beta cells differ in glucose transporter but not in glucokinase gene expression. *J Clin Invest* 96, 2489-2495.

Dean, P.M., and Matthews, E.K. (1968). Electrical activity in pancreatic islet cells. *Nature* 219, 389-390.

---

Dean, P.M., and Matthews, E.K. (1970). Electrical activity in pancreatic islet cells: effect of ions. *J Physiol* 210, 265-275.

DeFronzo, R.A. (1979). Glucose intolerance and aging: evidence for tissue insensitivity to insulin. *Diabetes* 28, 1095-1101.

Drain, P., Geng, X., and Li, L. (2004). Concerted gating mechanism underlying KATP channel inhibition by ATP. *Biophys J* 86, 2101-2112.

Draws, G., Krippeit-Draws, P., and Dufer, M. (2010). Electrophysiology of islet cells. *Adv Exp Med Biol* 654, 115-163.

Drucker, D.J. (2006). The biology of incretin hormones. *Cell Metab* 3, 153-165.

Edwards, G., and Weston, A.H. (1995). The role of potassium channels in excitable cells. *Diabetes Res Clin Pract* 28 *Suppl*, S57-66.

Eliasson, L., Ma, X., Renstrom, E., Barg, S., Berggren, P.O., Galvanovskis, J., Gromada, J., Jing, X., Lundquist, I., Salehi, A., *et al.* (2003). SUR1 regulates PKA-independent cAMP-induced granule priming in mouse pancreatic B-cells. *J Gen Physiol* 121, 181-197.

Eliasson, L., Renstrom, E., Ding, W.G., Proks, P., and Rorsman, P. (1997). Rapid ATP-dependent priming of secretory granules precedes Ca(2+)-induced exocytosis in mouse pancreatic B-cells. *J Physiol* 503 ( Pt 2), 399-412.

Enkvetchakul, D., Loussouarn, G., Makhina, E., Shyng, S.L., and Nichols, C.G. (2000). The kinetic and physical basis of K(ATP) channel gating: toward a unified molecular understanding. *Biophys J* 78, 2334-2348.

Enkvetchakul, D., and Nichols, C.G. (2003). Gating mechanism of KATP channels: function fits form. *J Gen Physiol* 122, 471-480.

Fakler, B., and Adelman, J.P. (2008). Control of K(Ca) channels by calcium nano/microdomains. *Neuron* 59, 873-881.

Feng, D.D., Luo, Z., Roh, S.G., Hernandez, M., Tawadros, N., Keating, D.J., and Chen, C. (2006). Reduction in voltage-gated K<sup>+</sup> currents in primary cultured rat pancreatic beta-cells by linoleic acids. *Endocrinology* 147, 674-682.

Feng, D.D., Zhao, Y.F., Luo, Z.Q., Keating, D.J., and Chen, C. (2008). Linoleic acid induces Ca<sup>2+</sup>-induced inactivation of voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> currents in rat pancreatic beta-cells. *J Endocrinol* 196, 377-384.

Fex, M., Nitert, M.D., Wierup, N., Sundler, F., Ling, C., and Mulder, H. (2007). Enhanced mitochondrial metabolism may account for the adaptation to insulin resistance in islets from C57BL/6J mice fed a high-fat diet. *Diabetologia* 50, 74-83.

Franklin, I., Gromada, J., Gjinovci, A., Theander, S., and Wollheim, C.B. (2005). Beta-cell secretory products activate alpha-cell ATP-dependent potassium channels to inhibit glucagon release. *Diabetes* 54, 1808-1815.

Gilon, P., and Henquin, J.C. (1992). Influence of membrane potential changes on cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> concentration in an electrically excitable cell, the insulin-secreting pancreatic B-cell. *J Biol Chem* 267, 20713-20720.

Gilon, P., Ravier, M.A., Jonas, J.C., and Henquin, J.C. (2002). Control mechanisms of the oscillations of insulin secretion in vitro and in vivo. *Diabetes* 51 Suppl 1, S144-151.

Gilon, P., Yakel, J., Gromada, J., Zhu, Y., Henquin, J.C., and Rorsman, P. (1997). G protein-dependent inhibition of L-type Ca<sup>2+</sup> currents by acetylcholine in mouse pancreatic B-cells. *J Physiol* 499 ( Pt 1), 65-76.

Gillis, K.D., Mossner, R., and Neher, E. (1996). Protein kinase C enhances exocytosis from chromaffin cells by increasing the size of the readily releasable pool of secretory granules. *Neuron* 16, 1209-1220.

Goforth, P.B., Bertram, R., Khan, F.A., Zhang, M., Sherman, A., and Satin, L.S. (2002). Calcium-activated K<sup>+</sup> channels of mouse beta-cells are controlled by both store and cytoplasmic Ca<sup>2+</sup>: experimental and theoretical studies. *J Gen Physiol* 120, 307-322.

Goldstein, S.A., Bayliss, D.A., Kim, D., Lesage, F., Plant, L.D., and Rajan, S. (2005). International Union of Pharmacology. LV. Nomenclature and molecular relationships of two-P potassium channels. *Pharmacol Rev* 57, 527-540.

Goodyear, L.J., and Kahn, B.B. (1998). Exercise, glucose transport, and insulin sensitivity. *Annu Rev Med* 49, 235-261.

Gopel, S., Kanno, T., Barg, S., Galvanovskis, J., and Rorsman, P. (1999a). Voltage-gated and resting membrane currents recorded from B-cells in intact mouse pancreatic islets. *J Physiol* 521 Pt 3, 717-728.

Gopel, S., Zhang, Q., Eliasson, L., Ma, X.S., Galvanovskis, J., Kanno, T., Salehi, A., and Rorsman, P. (2004). Capacitance measurements of exocytosis in mouse pancreatic alpha-, beta- and delta-cells within intact islets of Langerhans. *J Physiol* 556, 711-726.

Gopel, S.O., Kanno, T., Barg, S., Eliasson, L., Galvanovskis, J., Renstrom, E., and Rorsman, P. (1999b). Activation of Ca(2+)-dependent K(+) channels contributes to rhythmic firing of action potentials in mouse pancreatic beta cells. *J Gen Physiol* 114, 759-770.

Gopel, S.O., Kanno, T., Barg, S., and Rorsman, P. (2000a). Patch-clamp characterisation of somatostatin-secreting -cells in intact mouse pancreatic islets. *J Physiol* 528, 497-507.

Gopel, S.O., Kanno, T., Barg, S., Weng, X.G., Gromada, J., and Rorsman, P. (2000b). Regulation of glucagon release in mouse -cells by KATP channels and inactivation of TTX-sensitive Na<sup>+</sup> channels. *J Physiol* 528, 509-520.

Grapengiesser, E., Gylfe, E., and Hellman, B. (1991). Cyclic AMP as a determinant for glucose induction of fast Ca<sup>2+</sup> oscillations in isolated pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 266, 12207-12210.

Gray, D.S., and Fujioka, K. (1991). Use of relative weight and Body Mass Index for the determination of adiposity. *J Clin Epidemiol* 44, 545-550.

---

Gromada, J., Franklin, I., and Wollheim, C.B. (2007). Alpha-cells of the endocrine pancreas: 35 years of research but the enigma remains. *Endocr Rev* 28, 84-116.

Gromada, J., Hoy, M., Renstrom, E., Bokvist, K., Eliasson, L., Gopel, S., and Rorsman, P. (1999). CaM kinase II-dependent mobilization of secretory granules underlies acetylcholine-induced stimulation of exocytosis in mouse pancreatic B-cells. *J Physiol* 518 (Pt 3), 745-759.

Gromada, J., Ma, X., Hoy, M., Bokvist, K., Salehi, A., Berggren, P.O., and Rorsman, P. (2004). ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel-dependent regulation of glucagon release and electrical activity by glucose in wild-type and SUR1<sup>-/-</sup> mouse alpha-cells. *Diabetes* 53 Suppl 3, S181-189.

Gut, A., Kiraly, C.E., Fukuda, M., Mikoshiba, K., Wollheim, C.B., and Lang, J. (2001). Expression and localisation of synaptotagmin isoforms in endocrine beta-cells: their function in insulin exocytosis. *J Cell Sci* 114, 1709-1716.

Gutman, G.A., Chandy, K.G., Grissmer, S., Lazdunski, M., McKinnon, D., Pardo, L.A., Robertson, G.A., Rudy, B., Sanguinetti, M.C., Stuhmer, W., *et al.* (2005). International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev* 57, 473-508.

Haider, S., Antcliff, J.F., Proks, P., Sansom, M.S., and Ashcroft, F.M. (2005). Focus on Kir6.2: a key component of the ATP-sensitive potassium channel. *J Mol Cell Cardiol* 38, 927-936.

Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 391, 85-100.

Haslam, D.W., and James, W.P. (2005). Obesity. *Lancet* 366, 1197-1209.

Hellman, B., Gylfe, E., Bergsten, P., Grapengiesser, E., Lund, P.E., Berts, A., Tengholm, A., Pipeleers, D.G., and Ling, Z. (1994). Glucose induces oscillatory Ca<sup>2+</sup> signalling and insulin release in human pancreatic beta cells. *Diabetologia* 37 Suppl 2, S11-20.

Henquin, J.C. (1990). Role of voltage- and Ca<sup>2+</sup>(+)-dependent K<sup>+</sup> channels in the control of glucose-induced electrical activity in pancreatic B-cells. *Pflügers Arch* 416, 568-572.

Henquin, J.C. (2000). Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes* 49, 1751-1760.

Henquin, J.C., Ishiyama, N., Nenquin, M., Ravier, M.A., and Jonas, J.C. (2002). Signals and pools underlying biphasic insulin secretion. *Diabetes* 51 Suppl 1, S60-67.

Herrington, J. (2007). Gating modifier peptides as probes of pancreatic beta-cell physiology. *Toxicon* 49, 231-238.

Herrington, J., Sanchez, M., Wunderler, D., Yan, L., Bugianesi, R.M., Dick, I.E., Clark, S.A., Brochu, R.M., Priest, B.T., Kohler, M.G., *et al.* (2005). Biophysical and pharmacological properties of the voltage-gated potassium current of human pancreatic beta-cells. *J Physiol* 567, 159-175.

Herrington, J., Zhou, Y.P., Bugianesi, R.M., Dulski, P.M., Feng, Y., Warren, V.A., Smith, M.M., Kohler, M.G., Garsky, V.M., Sanchez, M., *et al.* (2006). Blockers of the delayed-rectifier potassium current in pancreatic beta-cells enhance glucose-dependent insulin secretion. *Diabetes* 55, 1034-1042.

Hille, B. (1984). *Ion channels in excitable membranes*, 1st Edition edn (Sinauer Associates ).

Hoppa, M.B., Collins, S., Ramracheya, R., Hodson, L., Amisten, S., Zhang, Q., Johnson, P., Ashcroft, F.M., and Rorsman, P. (2009). Chronic palmitate exposure inhibits insulin secretion by dissociation of Ca(2+) channels from secretory granules. *Cell Metab* 10, 455-465.

Houamed, K.M., Sweet, I.R., and Satin, L.S. (2010). BK channels mediate a novel ionic mechanism that regulates glucose-dependent electrical activity and insulin secretion in mouse pancreatic beta-cells. *J Physiol* 588, 3511-3523.

Huang, L., Shen, H., Atkinson, M.A., and Kennedy, R.T. (1995). Detection of exocytosis at individual pancreatic beta cells by amperometry at a chemically modified microelectrode. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9608-9612.

Hull, R.L., Kodama, K., Utzschneider, K.M., Carr, D.B., Prigeon, R.L., and Kahn, S.E. (2005). Dietary-fat-induced obesity in mice results in beta cell hyperplasia but not increased insulin release: evidence for specificity of impaired beta cell adaptation. *Diabetologia* 48, 1350-1358.

Inagaki, N., Gonoj, T., Clement, J.P.t., Namba, N., Inazawa, J., Gonzalez, G., Aguilar-Bryan, L., Seino, S., and Bryan, J. (1995a). Reconstitution of IKATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* 270, 1166-1170.

Inagaki, N., Tsuura, Y., Namba, N., Masuda, K., Gonoj, T., Horie, M., Seino, Y., Mizuta, M., and Seino, S. (1995b). Cloning and functional characterization of a novel ATP-sensitive potassium channel ubiquitously expressed in rat tissues, including pancreatic islets, pituitary, skeletal muscle, and heart. *J Biol Chem* 270, 5691-5694.

Itoh, Y., Kawamata, Y., Harada, M., Kobayashi, M., Fujii, R., Fukusumi, S., Ogi, K., Hosoya, M., Tanaka, Y., Uejima, H., *et al.* (2003). Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature* 422, 173-176.

Jackson, M.B. (2001). Whole-cell voltage clamp recording. *Curr Protoc Neurosci Chapter* 6, Unit 6 6.

Jacobson, D.A., Kuznetsov, A., Lopez, J.P., Kash, S., Ammala, C.E., and Philipson, L.H. (2007). Kv2.1 ablation alters glucose-induced islet electrical activity, enhancing insulin secretion. *Cell Metab* 6, 229-235.

Jacobson, D.A., Mendez, F., Thompson, M., Torres, J., Cochet, O., and Philipson, L.H. (2010). Calcium-activated and voltage-gated potassium channels of the pancreatic islet impart distinct and complementary roles during secretagogue induced electrical responses. *J Physiol* 588, 3525-3537.

---

Jacobson, D.A., and Philipson, L.H. (2007). Action potentials and insulin secretion: new insights into the role of Kv channels. *Diabetes Obes Metab* 9 *Suppl 2*, 89-98.

Jing, X., Li, D.Q., Olofsson, C.S., Salehi, A., Surve, V.V., Caballero, J., Ivarsson, R., Lundquist, I., Pereverzev, A., Schneider, T., *et al.* (2005). CaV2.3 calcium channels control second-phase insulin release. *J Clin Invest* 115, 146-154.

Johnston, J., Forsythe, I.D., and Kopp-Scheinflug, C. (2010). Going native: voltage-gated potassium channels controlling neuronal excitability. *J Physiol* 588, 3187-3200.

Kadowaki, T., Yamauchi, T., Kubota, N., Hara, K., Ueki, K., and Tobe, K. (2006). Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 116, 1784-1792.

Kahn, S.E. (2001). Clinical review 135: The importance of beta-cell failure in the development and progression of type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 4047-4058.

Kahn, S.E., Hull, R.L., and Utzschneider, K.M. (2006). Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 444, 840-846.

Kanno, T., Gopel, S.O., Rorsman, P., and Wakui, M. (2002a). Cellular function in multicellular system for hormone-secretion: electrophysiological aspect of studies on alpha-, beta- and delta-cells of the pancreatic islet. *Neurosci Res* 42, 79-90.

Kanno, T., Ma, X., Barg, S., Eliasson, L., Galvanovskis, J., Gopel, S., Larsson, M., Renstrom, E., and Rorsman, P. (2004). Large dense-core vesicle exocytosis in pancreatic beta-cells monitored by capacitance measurements. *Methods* 33, 302-311.

Kanno, T., Rorsman, P., and Gopel, S.O. (2002b). Glucose-dependent regulation of rhythmic action potential firing in pancreatic beta-cells by K(ATP)-channel modulation. *J Physiol* 545, 501-507.

Kelly, R.P., Sutton, R., and Ashcroft, F.M. (1991). Voltage-activated calcium and potassium currents in human pancreatic beta-cells. *J Physiol* 443, 175-192.

Khan, F.A., Goforth, P.B., Zhang, M., and Satin, L.S. (2001). Insulin activates ATP-sensitive K(+) channels in pancreatic beta-cells through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *Diabetes* 50, 2192-2198.

Kiba, T., Tanaka, K., Numata, K., Hoshino, M., Misugi, K., and Inoue, S. (1996). Ventromedial hypothalamic lesion-induced vagal hyperactivity stimulates rat pancreatic cell proliferation. *Gastroenterology* 110, 885-893.

Kubo, Y., Adelman, J.P., Clapham, D.E., Jan, L.Y., Karschin, A., Kurachi, Y., Lazdunski, M., Nichols, C.G., Seino, S., and Vandenberg, C.A. (2005). International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels. *Pharmacol Rev* 57, 509-526.

Kukuljan, M., Goncalves, A.A., and Atwater, I. (1991). Charybdotoxin-sensitive K(Ca) channel is not involved in glucose-induced electrical activity in pancreatic beta-cells. *J Membr Biol* 119, 187-195.

Kuzuya, T., and Matsuda, A. (1997). Classification of diabetes on the basis of etiologies versus degree of insulin deficiency. *Diabetes Care* 20, 219-220.

Lambert, I.H., Hoffmann, E.K., and Pedersen, S.F. (2008). Cell volume regulation: physiology and pathophysiology. *Acta Physiol (Oxf)* 194, 255-282.

Larsson, O., Kindmark, H., Brandstrom, R., Fredholm, B., and Berggren, P.O. (1996). Oscillations in KATP channel activity promote oscillations in cytoplasmic free Ca<sup>2+</sup> concentration in the pancreatic beta cell. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 5161-5165.

Leung, Y.M., Ahmed, I., Sheu, L., Tsushima, R.G., Diamant, N.E., Hara, M., and Gaisano, H.Y. (2005). Electrophysiological characterization of pancreatic islet cells in the mouse insulin promoter-green fluorescent protein mouse. *Endocrinology* 146, 4766-4775.

Lifson, N., Lassa, C.V., and Dixit, P.K. (1985). Relation between blood flow and morphology in islet organ of rat pancreas. *Am J Physiol* 249, E43-48.

Lindau, M., and Neher, E. (1988). Patch-clamp techniques for time-resolved capacitance measurements in single cells. *Pflugers Arch* 411, 137-146.

Lingohr, M.K., Buettner, R., and Rhodes, C.J. (2002). Pancreatic beta-cell growth and survival--a role in obesity-linked type 2 diabetes? *Trends Mol Med* 8, 375-384.

Liu, Y.Q., Jetton, T.L., and Leahy, J.L. (2002). beta-Cell adaptation to insulin resistance. Increased pyruvate carboxylase and malate-pyruvate shuttle activity in islets of nondiabetic Zucker fatty rats. *J Biol Chem* 277, 39163-39168.

Lu, Z. (2004). Mechanism of rectification in inward-rectifier K<sup>+</sup> channels. *Annu Rev Physiol* 66, 103-129.

MacDonald, P.E. (2011). Signal integration at the level of ion channel and exocytotic function in pancreatic beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301, E1065-1069.

MacDonald, P.E., Ha, X.F., Wang, J., Smukler, S.R., Sun, A.M., Gaisano, H.Y., Salapatek, A.M., Backx, P.H., and Wheeler, M.B. (2001). Members of the Kv1 and Kv2 voltage-dependent K(+) channel families regulate insulin secretion. *Mol Endocrinol* 15, 1423-1435.

MacDonald, P.E., and Rorsman, P. (2006). Oscillations, intercellular coupling, and insulin secretion in pancreatic beta cells. *PLoS Biol* 4, e49.

MacDonald, P.E., Salapatek, A.M., and Wheeler, M.B. (2003). Temperature and redox state dependence of native Kv2.1 currents in rat pancreatic beta-cells. *J Physiol* 546, 647-653.

MacDonald, P.E., Sewing, S., Wang, J., Joseph, J.W., Smukler, S.R., Sakellaropoulos, G., Saleh, M.C., Chan, C.B., Tsushima, R.G., Salapatek, A.M., *et al.* (2002). Inhibition of Kv2.1 voltage-dependent K<sup>+</sup> channels in pancreatic beta-cells enhances glucose-dependent insulin secretion. *J Biol Chem* 277, 44938-44945.

MacDonald, P.E., and Wheeler, M.B. (2003). Voltage-dependent K(+) channels in pancreatic beta cells: role, regulation and potential as therapeutic targets. *Diabetologia* 46, 1046-1062.

- Magleby, K.L. (2003). Gating mechanism of BK (Slo1) channels: so near, yet so far. *J Gen Physiol* 121, 81-96.
- Marrion, N.V., and Tavalin, S.J. (1998). Selective activation of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels by co-localized Ca<sup>2+</sup> channels in hippocampal neurons. *Nature* 395, 900-905.
- Matthews, D.R., Naylor, B.A., Jones, R.G., Ward, G.M., and Turner, R.C. (1983). Pulsatile insulin has greater hypoglycemic effect than continuous delivery. *Diabetes* 32, 617-621.
- Meissner, H.P., and Schmelz, H. (1974). Membrane potential of beta-cells in pancreatic islets. *Pflugers Arch* 351, 195-206.
- Moran, A., Jacobs, D.R., Jr., Steinberger, J., Hong, C.P., Prineas, R., Luepker, R., and Sinaiko, A.R. (1999). Insulin resistance during puberty: results from clamp studies in 357 children. *Diabetes* 48, 2039-2044.
- Nadal, A., Quesada, I., and Soria, B. (1999). Homologous and heterologous asynchronicity between identified alpha-, beta- and delta-cells within intact islets of Langerhans in the mouse. *J Physiol* 517 ( Pt 1), 85-93.
- Neher, E. (1998). Vesicle pools and Ca<sup>2+</sup> microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release. *Neuron* 20, 389-399.
- Neher, E., and Sakmann, B. (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260, 799-802.
- Nguyen, A., Kath, J.C., Hanson, D.C., Biggers, M.S., Canniff, P.C., Donovan, C.B., Mather, R.J., Bruns, M.J., Rauer, H., Aiyar, J., *et al.* (1996). Novel nonpeptide agents potently block the C-type inactivated conformation of Kv1.3 and suppress T cell activation. *Mol Pharmacol* 50, 1672-1679.
- Nichols, C.G. (2006). KATP channels as molecular sensors of cellular metabolism. *Nature* 440, 470-476.
- Olofsson, C.S., Collins, S., Bengtsson, M., Eliasson, L., Salehi, A., Shimomura, K., Tarasov, A., Holm, C., Ashcroft, F., and Rorsman, P. (2007). Long-term exposure to glucose and lipids inhibits glucose-induced insulin secretion downstream of granule fusion with plasma membrane. *Diabetes* 56, 1888-1897.
- Olofsson, C.S., Gopel, S.O., Barg, S., Galvanovskis, J., Ma, X., Salehi, A., Rorsman, P., and Eliasson, L. (2002). Fast insulin secretion reflects exocytosis of docked granules in mouse pancreatic B-cells. *Pflugers Arch* 444, 43-51.
- Olofsson, C.S., Salehi, A., Holm, C., and Rorsman, P. (2004). Palmitate increases L-type Ca<sup>2+</sup> currents and the size of the readily releasable granule pool in mouse pancreatic beta-cells. *J Physiol* 557, 935-948.
- Pipeleers, D.G. (1992). Heterogeneity in pancreatic beta-cell population. *Diabetes* 41, 777-781.

Plant, T.D. (1988). Properties and calcium-dependent inactivation of calcium currents in cultured mouse pancreatic B-cells. *J Physiol* 404, 731-747.

Poitout, V., and Robertson, R.P. (2008). Glucolipototoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocr Rev* 29, 351-366.

Prentki, M., Joly, E., El-Assaad, W., and Rduit, R. (2002). Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning, and glucolipototoxicity: role in beta-cell adaptation and failure in the etiology of diabetes. *Diabetes* 51 Suppl 3, S405-413.

Proks, P., Capener, C.E., Jones, P., and Ashcroft, F.M. (2001). Mutations within the P-loop of Kir6.2 modulate the intraburst kinetics of the ATP-sensitive potassium channel. *J Gen Physiol* 118, 341-353.

Quesada, I., Nadal, A., and Soria, B. (1999). Different effects of tolbutamide and diazoxide in alpha, beta-, and delta-cells within intact islets of Langerhans. *Diabetes* 48, 2390-2397.

Quesada, I., Todorova, M.G., Alonso-Magdalena, P., Beltra, M., Carneiro, E.M., Martin, F., Nadal, A., and Soria, B. (2006). Glucose induces opposite intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration oscillatory patterns in identified alpha- and beta-cells within intact human islets of Langerhans. *Diabetes* 55, 2463-2469.

Reaven, G.M. (1988). Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37, 1595-1607.

Reimer, M.K., and Ahren, B. (2002). Altered beta-cell distribution of pdx-1 and GLUT-2 after a short-term challenge with a high-fat diet in C57BL/6J mice. *Diabetes* 51 Suppl 1, S138-143.

Renstrom, E., Eliasson, L., Bokvist, K., and Rorsman, P. (1996). Cooling inhibits exocytosis in single mouse pancreatic B-cells by suppression of granule mobilization. *J Physiol* 494 ( Pt 1), 41-52.

Renstrom, E., Eliasson, L., and Rorsman, P. (1997). Protein kinase A-dependent and -independent stimulation of exocytosis by cAMP in mouse pancreatic B-cells. *J Physiol* 502 ( Pt 1), 105-118.

Roden, M., Price, T.B., Perseghin, G., Petersen, K.F., Rothman, D.L., Cline, G.W., and Shulman, G.I. (1996). Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest* 97, 2859-2865.

Roe, M.W., Worley, J.F., 3rd, Mittal, A.A., Kuznetsov, A., DasGupta, S., Mertz, R.J., Witherspoon, S.M., 3rd, Blair, N., Lancaster, M.E., McIntyre, M.S., *et al.* (1996). Expression and function of pancreatic beta-cell delayed rectifier K<sup>+</sup> channels. Role in stimulus-secretion coupling. *J Biol Chem* 271, 32241-32246.

Rorsman, P. (1997). The pancreatic beta-cell as a fuel sensor: an electrophysiologist's viewpoint. *Diabetologia* 40, 487-495.

Rorsman, P., and Braun, M. (2012). Regulation of Insulin Secretion in Human Pancreatic Islets. *Annu Rev Physiol*.

- Rorsman, P., Braun, M., and Zhang, Q. (2011a). Regulation of calcium in pancreatic alpha- and beta-cells in health and disease. *Cell Calcium* 51, 300-308.
- Rorsman, P., Eliasson, L., Kanno, T., Zhang, Q., and Gopel, S. (2011b). Electrophysiology of pancreatic beta-cells in intact mouse islets of Langerhans. *Prog Biophys Mol Biol* 107, 224-235.
- Rorsman, P., Eliasson, L., Renstrom, E., Gromada, J., Barg, S., and Gopel, S. (2000). The Cell Physiology of Biphasic Insulin Secretion. *News Physiol Sci* 15, 72-77.
- Rorsman, P., and Renstrom, E. (2003). Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 46, 1029-1045.
- Rorsman, P., and Trube, G. (1985). Glucose dependent K<sup>+</sup>-channels in pancreatic beta-cells are regulated by intracellular ATP. *Pflugers Arch* 405, 305-309.
- Rorsman, P., and Trube, G. (1986). Calcium and delayed potassium currents in mouse pancreatic beta-cells under voltage-clamp conditions. *J Physiol* 374, 531-550.
- Sachdeva, M.M., and Stoffers, D.A. (2009). Minireview: Meeting the demand for insulin: molecular mechanisms of adaptive postnatal beta-cell mass expansion. *Mol Endocrinol* 23, 747-758.
- Salomon, D., and Meda, P. (1986). Heterogeneity and contact-dependent regulation of hormone secretion by individual B cells. *Exp Cell Res* 162, 507-520.
- Samols, E., Stagner, J.I., Ewart, R.B., and Marks, V. (1988). The order of islet microvascular cellular perfusion is B---A---D in the perfused rat pancreas. *J Clin Invest* 82, 350-353.
- Santos, R.M., Rosario, L.M., Nadal, A., Garcia-Sancho, J., Soria, B., and Valdeolmillos, M. (1991). Widespread synchronous [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> oscillations due to bursting electrical activity in single pancreatic islets. *Pflugers Arch* 418, 417-422.
- Satin, L.S. (2000). Localized calcium influx in pancreatic beta-cells: its significance for Ca<sup>2+</sup>-dependent insulin secretion from the islets of Langerhans. *Endocrine* 13, 251-262.
- Satin, L.S., Hopkins, W.F., Fatherazi, S., and Cook, D.L. (1989). Expression of a rapid, low-voltage threshold K current in insulin-secreting cells is dependent on intracellular calcium buffering. *J Membr Biol* 112, 213-222.
- Scherer, P.E. (2006). Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. *Diabetes* 55, 1537-1545.
- Schulla, V., Renstrom, E., Feil, R., Feil, S., Franklin, I., Gjinovci, A., Jing, X.J., Laux, D., Lundquist, I., Magnuson, M.A., *et al.* (2003). Impaired insulin secretion and glucose tolerance in beta cell-selective Ca<sub>v</sub>1.2 Ca<sup>2+</sup> channel null mice. *EMBO J* 22, 3844-3854.
- Seino, S., Chen, L., Seino, M., Blondel, O., Takeda, J., Johnson, J.H., and Bell, G.I. (1992). Cloning of the alpha 1 subunit of a voltage-dependent calcium channel expressed in pancreatic beta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 584-588.

Seino, S., Shibasaki, T., and Minami, K. (2011). Dynamics of insulin secretion and the clinical implications for obesity and diabetes. *J Clin Invest* 121, 2118-2125.

Sharma, N., Crane, A., Gonzalez, G., Bryan, J., and Aguilar-Bryan, L. (2000). Familial hyperinsulinism and pancreatic beta-cell ATP-sensitive potassium channels. *Kidney Int* 57, 803-808.

Sherman, A. (1996). Contributions of modeling to understanding stimulus-secretion coupling in pancreatic beta-cells. *Am J Physiol* 271, E362-372.

Shibasaki, T., Takahashi, H., Miki, T., Sunaga, Y., Matsumura, K., Yamanaka, M., Zhang, C., Tamamoto, A., Satoh, T., Miyazaki, J., *et al.* (2007). Essential role of Epac2/Rap1 signaling in regulation of insulin granule dynamics by cAMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 19333-19338.

Singh, V., Brendel, M.D., Zacharias, S., Mergler, S., Jahr, H., Wiedenmann, B., Bretzel, R.G., Plockinger, U., and Strowski, M.Z. (2007). Characterization of somatostatin receptor subtype-specific regulation of insulin and glucagon secretion: an in vitro study on isolated human pancreatic islets. *J Clin Endocrinol Metab* 92, 673-680.

Smith, P.A., Ashcroft, F.M., and Rorsman, P. (1990a). Simultaneous recordings of glucose dependent electrical activity and ATP-regulated K(+)-currents in isolated mouse pancreatic beta-cells. *FEBS Lett* 261, 187-190.

Smith, P.A., Bokvist, K., Arkhammar, P., Berggren, P.O., and Rorsman, P. (1990b). Delayed rectifying and calcium-activated K<sup>+</sup> channels and their significance for action potential repolarization in mouse pancreatic beta-cells. *J Gen Physiol* 95, 1041-1059.

Smith, P.A., Bokvist, K., and Rorsman, P. (1989a). Demonstration of A-currents in pancreatic islet cells. *Pflugers Arch* 413, 441-443.

Smith, P.A., Rorsman, P., and Ashcroft, F.M. (1989b). Modulation of dihydropyridine-sensitive Ca<sup>2+</sup> channels by glucose metabolism in mouse pancreatic beta-cells. *Nature* 342, 550-553.

Smolen, P., Rinzel, J., and Sherman, A. (1993). Why pancreatic islets burst but single beta cells do not. The heterogeneity hypothesis. *Biophys J* 64, 1668-1680.

Sone, H., and Kagawa, Y. (2005). Pancreatic beta cell senescence contributes to the pathogenesis of type 2 diabetes in high-fat diet-induced diabetic mice. *Diabetologia* 48, 58-67.

Souza-Mello, V., Gregorio, B.M., Relvas-Lucas, B., da Silva Faria, T., Aguila, M.B., and Mandarim-de-Lacerda, C.A. (2011). Pancreatic ultrastructural enhancement due to telmisartan plus sitagliptin treatment in diet-induced obese C57BL/6 mice. *Pancreas* 40, 715-722.

Stefanovski, D., Richey, J.M., Woolcott, O., Lottati, M., Zheng, D., Harrison, L.N., Ionut, V., Kim, S.P., Hsu, I., and Bergman, R.N. (2011). Consistency of the disposition index in the face of diet induced insulin resistance: potential role of FFA. *PLoS One* 6, e18134.

Steil, G.M., Trivedi, N., Jonas, J.C., Hasenkamp, W.M., Sharma, A., Bonner-Weir, S., and Weir, G.C. (2001). Adaptation of beta-cell mass to substrate oversupply: enhanced function with normal gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280, E788-796.

Stevens, J., Couper, D., Pankow, J., Folsom, A.R., Duncan, B.B., Nieto, F.J., Jones, D., and Tyroler, H.A. (2001). Sensitivity and specificity of anthropometrics for the prediction of diabetes in a biracial cohort. *Obes Res* 9, 696-705.

Stocker, M. (2004). Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channels: molecular determinants and function of the SK family. *Nat Rev Neurosci* 5, 758-770.

Sugita, S., Shin, O.H., Han, W., Lao, Y., and Sudhof, T.C. (2002). Synaptotagmins form a hierarchy of exocytotic Ca(2+) sensors with distinct Ca(2+) affinities. *EMBO J* 21, 270-280.

Takahashi, N., Kadowaki, T., Yazaki, Y., Miyashita, Y., and Kasai, H. (1997). Multiple exocytotic pathways in pancreatic beta cells. *J Cell Biol* 138, 55-64.

Tamarina, N.A., Kuznetsov, A., Fridlyand, L.E., and Philipson, L.H. (2005). Delayed-rectifier (KV2.1) regulation of pancreatic beta-cell calcium responses to glucose: inhibitor specificity and modeling. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289, E578-585.

Tamarina, N.A., Wang, Y., Mariotto, L., Kuznetsov, A., Bond, C., Adelman, J., and Philipson, L.H. (2003). Small-conductance calcium-activated K<sup>+</sup> channels are expressed in pancreatic islets and regulate glucose responses. *Diabetes* 52, 2000-2006.

Terauchi, Y., Takamoto, I., Kubota, N., Matsui, J., Suzuki, R., Komeda, K., Hara, A., Toyoda, Y., Miwa, I., Aizawa, S., *et al.* (2007). Glucokinase and IRS-2 are required for compensatory beta cell hyperplasia in response to high-fat diet-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 117, 246-257.

Trube, G., and Rorsman, P. (1986). Calcium and potassium currents recorded from pancreatic beta-cells under voltage clamp control. *Adv Exp Med Biol* 211, 167-175.

Valdeolmillos, M., Nadal, A., Contreras, D., and Soria, B. (1992). The relationship between glucose-induced K<sup>+</sup>ATP channel closure and the rise in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in single mouse pancreatic beta-cells. *J Physiol* 455, 173-186.

Valdeolmillos, M., Nadal, A., Soria, B., and Garcia-Sancho, J. (1993). Fluorescence digital image analysis of glucose-induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> oscillations in mouse pancreatic islets of Langerhans. *Diabetes* 42, 1210-1214.

Vignali, S., Leiss, V., Karl, R., Hofmann, F., and Welling, A. (2006). Characterization of voltage-dependent sodium and calcium channels in mouse pancreatic A- and B-cells. *J Physiol* 572, 691-706.

Wan, Q.F., Dong, Y., Yang, H., Lou, X., Ding, J., and Xu, T. (2004). Protein kinase activation increases insulin secretion by sensitizing the secretory machinery to Ca<sup>2+</sup>. *J Gen Physiol* 124, 653-662.

Wei, A.D., Gutman, G.A., Aldrich, R., Chandy, K.G., Grissmer, S., and Wulff, H. (2005). International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. *Pharmacol Rev* 57, 463-472.

Wellen, K.E., and Hotamisligil, G.S. (2005). Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 115, 1111-1119.

Wierup, N., Svensson, H., Mulder, H., and Sundler, F. (2002). The ghrelin cell: a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. *Regul Pept* 107, 63-69.

Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., and King, H. (2004). Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27, 1047-1053.

Wiser, O., Trus, M., Hernandez, A., Renstrom, E., Barg, S., Rorsman, P., and Atlas, D. (1999). The voltage sensitive Lc-type Ca<sup>2+</sup> channel is functionally coupled to the exocytotic machinery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 248-253.

Worley, J.F., 3rd, McIntyre, M.S., Spencer, B., Mertz, R.J., Roe, M.W., and Dukes, I.D. (1994). Endoplasmic reticulum calcium store regulates membrane potential in mouse islet beta-cells. *J Biol Chem* 269, 14359-14362.

Yamada, Y., Masuda, K., Li, Q., Ihara, Y., Kubota, A., Miura, T., Nakamura, K., Fujii, Y., Seino, S., and Seino, Y. (1995). The structures of the human calcium channel alpha 1 subunit (CACNL1A2) and beta subunit (CACNLB3) genes. *Genomics* 27, 312-319.

Yaney, G.C., and Corkey, B.E. (2003). Fatty acid metabolism and insulin secretion in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 46, 1297-1312.

Yang, S.N., Larsson, O., Branstrom, R., Bertorello, A.M., Leibiger, B., Leibiger, I.B., Moede, T., Kohler, M., Meister, B., and Berggren, P.O. (1999). Syntaxin 1 interacts with the L(D) subtype of voltage-gated Ca(2+) channels in pancreatic beta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10164-10169.

Zarkovic, M., and Henquin, J.C. (2004). Synchronization and entrainment of cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> oscillations in cell clusters prepared from single or multiple mouse pancreatic islets. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287, E340-347.

Zhang, Q., Galvanovskis, J., Abdulkader, F., Partridge, C.J., Gopel, S.O., Eliasson, L., and Rorsman, P. (2008). Cell coupling in mouse pancreatic beta-cells measured in intact islets of Langerhans. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci* 366, 3503-3523.

Zhao, Y.F., Pei, J., and Chen, C. (2008). Activation of ATP-sensitive potassium channels in rat pancreatic beta-cells by linoleic acid through both intracellular metabolites and membrane receptor signalling pathway. *J Endocrinol* 198, 533-540.