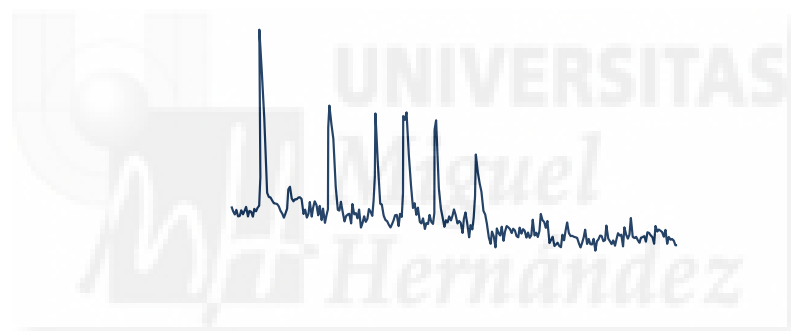


DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA APLICADA

INSTITUTO DE BIOINGENIERÍA

# REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE GLUCAGÓN POR ATP EXTRACELULAR Y LEPTINA EN CÉLULA $\alpha$ PANCREÁTICA



Memoria presentada por

**Eva Tudurí López**

Para optar al grado de doctor

Dirigida por:

Dr. Iván Quesada Moll

Elche, 2009



## PUBLICACIONES

Quesada I, **Tudurí E**, Nadal A. Regulación por glucosa de la función de las células alfa, beta y delta en el islote de Langerhans. El islote pancreático en el desarrollo y tratamiento de la diabetes, 5: 18-32, 2007. Editado por SED (Sociedad Española de Diabetes).

**Tudurí E**, Filiputti E, Carneiro EM, Quesada I. Inhibition of  $Ca^{2+}$  signaling and glucagon secretion in mouse pancreatic  $\alpha$ -cells by extracellular ATP and purinergic receptors. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294: E952–E960, 2008.

Quesada I, **Tudurí E**, Ripoll C, Nadal A. Physiology of the pancreatic  $\alpha$ -cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes. *J Endocrinol* 199: 1–16, 2008.

Juan-Picó P, Ropero AB, **Tudurí E**, Quesada I, Fuentes E, Bermúdez-Silva FJ, Rodríguez de Fonseca F, Nadal A. Regulation of glucose-induced  $[Ca^{2+}]_i$  signals by cannabinoid CB1 and CB2 receptors in pancreatic  $\alpha$ - and  $\delta$ - cells within intact islets of Langerhans. *Obesity and Metabolism* 5: 20-28, 2009.

**Tudurí E**, Marroquí L, Soriano S, Ropero AB, Batista T, Piquer S, López-Boado MA, Carneiro EM, Gomis R, Nadal A, Quesada I. Inhibitory effects of leptin on the pancreatic  $\alpha$ -cell function. *Diabetes* (in press).

**Tudurí E.**, Todorova M.G., Nadal A., Quesada I. Specificity of calcium signalling in alpha, beta and delta-cells in response to glucose. Enviado a *Eur Biophys J*.



## COMUNICACIONES A CONGRESOS

**E. Tudurí**, I. Quesada

Effects of extracellular ATP on Ca<sup>2+</sup> signalling in mouse pancreatic alpha-cells.

Póster. Physiological Society, Main Meeting 2006

UCL (Londres), 04-07 Julio 2006

I. Quesada, M.G.Todorova, **E. Tudurí**, B. Soria

Glucose produces different and characteristic metabolic patterns in alpha-, beta- and delta-cells in mouse islets of Langerhans.

Póster. Physiological Society, Main Meeting 2006

UCL (Londres), 04-07 Julio 2006

**E. Tudurí**, I. Quesada

Regulation of glucagon-containing alpha-cells by glucose and extracellular ATP

Póster. XXIX congreso de la SEBBM

UMH, Elche (Alicante) , 07-09-2006

García E., Lloret J., Ropero A., **Tudurí E.**, Quesada I., Fuentes E.

Valoración del control glucémico en Diabetes Tipo II: Comparativa de tres tratamientos diferentes.

Póster. V Congreso de la Sociedad Española de Nutrición Básica y Aplicada.

Bilbao, 2007

Quesada I., **Tudurí E**

Down-regulation of pancreatic alpha-cell secretion by glucose and extracellular ATP.

Oral. XXXIV Congress of the Spanish Society of Physiological Sciences (in association with The Physiological Society)

Valladolid, 2007

Quesada I, Nadal A., **Tudurí E.**, Todorova M.G.

Regulación de la señal de calcio y el metabolismo en célula alfa.

Oral. I Reunión de la Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas.

Cardona, 2007

**Tudurí E.**, Quesada I.

Inhibición de la función de la célula alfa pancreática por glucosa y ATP extracelular.

Oral. Reunión anual de Grupo de Islotes de la Sociedad Española de Diabetes

Sevilla, 2008

Marroquí L, **Tudurí E.**, Ropero AB, Nadal A, Quesada I

Efecto inhibitor de la leptina sobre la función de la célula alfa pancreática.

Póster. Reunión del Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas.

Barcelona, 10 de Julio, 2008

Marroquí L, **Tudurí E.**, Quesada I, Filipiutti E, Carneiro EM

ATP and adenosine modulate glucagon secretion induced by low glucose concentrations in mouse pancreatic alpha-cells.

Póster. 13th International Congress of endocrinology

Rio Janeiro, 08-12 de Noviembre 2008

## ABREVIATURAS

**AC:** Adenilato ciclasa

**ADP:** Adenosín difosfato

**AgRP:** *Agouti Related Peptide*. Péptido relacionado con la proteína Agouti

**AMP:** Adenosín monofosfato

**AMPc:** Adenosín monofosfato cíclico

**4-AP:** 4-aminopiridina

**ATP:** Adenosín trifosfato

**ATP- $\gamma$ -S:** Adenosina 5'-[ $\gamma$ -tio] trifosfato

**CREB:** *cAMP Response Element Binding*. Proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc.

**ERK:** *Extracellular signal-Regulated Kinase*. Quinasa regulada por señales extracelulares

**FADH<sub>2</sub>:** Flavina adenina dinucleótido reducido

**F(1,6)P2:** Fructosa-1,6-bifosfatasa

**F(2,6)P2:** Fructosa-2,6-bifosfatasa

**FBPasa-2:** Fructosa-2,6-bifosfatasa

**G:** Glucosa

**G-1-P:** Glucosa-1-fosfato

**G-6-P:** Glucosa-6-fosfato

**G-6-Pasa:** Glucosa-6-fosfatasa

**GDP:** Guanosín difosfato

**GP:** Glucógeno fosforilasa

**GS:** Glucógeno sintasa

**GTP:** Guanosín trifosfato

**Gln:** Glicina

**GLP:** *Glucagon Like Peptide*. Péptido similar a glucagón

**GLUT:** *Glucose Transporter*. Transportador de glucosa

**GRPP:** *Glicentin Related Pancreatic Peptide*. Péptido pancreático relacionado con glicentina

**HK:** Hexoquinasa

**IP:** *Interventing Peptide*. Péptido interventor

**IP3:** Inositol 1,4,5-trifosfato

**JAK:** *Janus Kinase*. Janus quinasa

**K<sub>ATP</sub>:** Canales de potasio dependientes de ATP

**L-PK:** Piruvato quinasa tipo L

**MAPK:** Mitogen Activated Protein Kinase. Proteína quinasa ativada por mitógeno

**MEK:** MAPK/ERK

**MCT-1:** *Mococarboxilate Transporter 1*. Transportador de monocaboxilato 1

**MPGF:** *Major Proglucagon Fragment*. Fragmento mayor de proglucagón

**NADH:** Nicotinamida adenina dinucleótido reducido

**NPY:** Neuropeptido Y

**OAA:** Oxalacetato

**PC:** Proconvertasa

**PD3B:** Fosfodiesterasa 3 B

**PEP:** Fosfoenoolpiruvato

**PEPCK:** Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa



**PFK-1:** Fosfofructoquinasa 1

**Pir:** Piruvato

**PLA:** Fosfolipasa A

**PLC $\beta$ :** Fosfolipasa C  $\beta$

**PKA:** Proteína quinasa A

**PI3K:** Fosfatidilinositol 3 quinasa

**PIP2:** Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato

**POMC:** Pro-opiomelanocortina

**Pro:** Prolina

**RE:** Retículo endoplásmico

**RRP:** *Readily Releasable Pool*. Pool de liberación rápida

**SERCA:** *Sarco Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase*. Bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoendoplásmico

**SN:** Sistema nervioso

**SNARE:** *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive Factor Attachment protein Receptor*. Proteína de unión al factor sensible a N-etil-maleimida soluble

**SNC:** Sistema nervioso central

**STAT:** *Signal Transducer and Activator of Transcription*. Transductor de señales y activador de transcripción

**SUR:** Receptor de sulfonilurea

**TEA:** Tetraetilamonio

**TTX:** Tetradoxina

**UDP:** Uridín difosfato

**UTP:** Uridín trifosfato

**VIP:** *Vasoactive Intestinal Peptide*. Péptido intestinal vasoactivo

**VOC:** *Voltage Operated Channel*. Canal operado por voltaje

## ANGLICISMOS

*Gap junction*: unión en hendidura

*Loop*: bucle

*Pool*: agrupación



<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.- PÁNCREAS ENDOCRINO: EL ISLOTE DE LANGERHANS</b>	<b>3</b>
1.1- El glucagón	5
I. La hormona	5
II. Principales funciones del glucagón	6
III. El receptor de glucagón	7
IV. Papel del glucagón en la homeostasis de la glucosa	8
1.2- Acoplamiento estímulo-secreción en la célula $\alpha$	9
I. Canales iónicos y regulación de la actividad eléctrica en la célula $\alpha$	11
II. Homeostasis del $\text{Ca}^{2+}$ intracelular	14
III. La señal de $\text{Ca}^{2+}$ en la célula $\alpha$	16
IV. Exocitosis de los gránulos secretores de glucagón	18
1.3 - Regulación de la secreción de glucagón	19
I. Regulación del metabolismo de la célula $\alpha$	19
II. Regulación endocrina y/o paracrina	22
III. Regulación autocrina	26
IV. Regulación autonómica	26
1.4- Fisiopatología de la célula $\alpha$ y su implicación en la diabetes	27
<b>2.- SEÑALIZACIÓN PURINÉRGICA</b>	<b>29</b>
2.1- ATP y nucleótidos de adenina	29
2.2- Receptores purinérgicos	30
<b>3.- LEPTINA: HORMONA DE LA SACIEDAD</b>	<b>34</b>
3.1- La leptina	34
3.2- El receptor de leptina	36
3.3- Principales vías de señalización intracelular activadas por leptina	38

Cascada de transducción de señales JAK/STAT	38
Cascada de transducción de señales MAPK	39
Cascada de transducción de señales PI3K/PDE3B/AMPC	39
3.4- Efectos fisiológicos de la leptina	40
<b>OBJETIVOS</b>	<b>43</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>47</b>
1.- Inhibición de la señal de $Ca^{2+}$ y de la secreción de glucagón en célula $\alpha$ pancreática mediada por ATP extracelular y receptores purinérgicos.	49
2.- Efectos inhibitorios de la leptina sobre la función de la célula $\alpha$ pancreática.	53
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>57</b>
1.- El ATP extracelular inhibe la señal de $[Ca^{2+}]_i$ ; y la secreción de glucagón en células $\alpha$ pancreáticas.	59
2.- La leptina produce hiperpolarización de la membrana y supresión de la actividad eléctrica, inhibición de la señal de $Ca^{2+}$ intracelular y reducción de la secreción de glucagón en célula $\alpha$ pancreática.	64
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>69</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>73</b>
<b>ANEXO I</b>	<b>103</b>
<b>ANEXO II</b>	<b>117</b>

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

<b>Figura 1.1</b> Distribución de los distintos tipos celulares que componen los islotes de Langerhans.	4
<b>Figura 1.2</b> Estructura del proglucagón y de los péptidos derivados de éste.	6
<b>Tabla 1.3</b> Principales funciones del glucagón y de la insulina sobre el metabolismo energético.	7
<b>Figura 1.4</b> Papel del glucagón y de su receptor en células hepáticas.	9
<b>Figura 1.5</b> Modelo de acoplamiento estímulo secreción en célula $\alpha$ de ratón y humano en respuesta a baja concentración de glucosa extracelular.	10
<b>Figura 1.6</b> Contribución de los canales de $\text{Ca}^{2+}$ tipo T (Ca[T]), los canales de $\text{Na}^{+}$ sensibles a TTX (Na), y los canales de $\text{K}^{+}$ tipo A (K[A]) sobre el potencial de acción de la célula $\alpha$ .	14
<b>Figura 1.7</b> Homeostasis celular del $\text{Ca}^{2+}$ .	15
<b>Figura 1.8</b> Registros de $\text{Ca}^{2+}$ citosólico tomados por microscopía confocal de células $\alpha$ y $\beta$ en respuesta a baja (3 mM) y elevada (11 mM) concentración de glucosa (G).	16
<b>Figura 1.9</b> Registro simultáneo de potencial de membrana y de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en célula $\alpha$ de ratón.	17
<b>Figura 1.10</b> Regulación endocrina, paracrina y autocrina de la secreción de glucagón en célula $\alpha$ pancreática.	26

<b>Figura 2.1</b> Esquema general de los receptores purinérgicos diana de los nucleótidos de adenina.	30
<b>Tabla 2.2</b> Subtipos de receptores purinérgicos, orden de especificidad de sus agonistas naturales y/o sintéticos, y principales sistemas de transducción de señales.	33
<b>Figura 3.1</b> Isoformas del receptor de leptina ObR.	37
<b>Figura 3.2</b> Eje adipoinsular.	41





Introducción

---

Introducción





---

## 1.- Páncreas endocrino: el islote de Langerhans

---

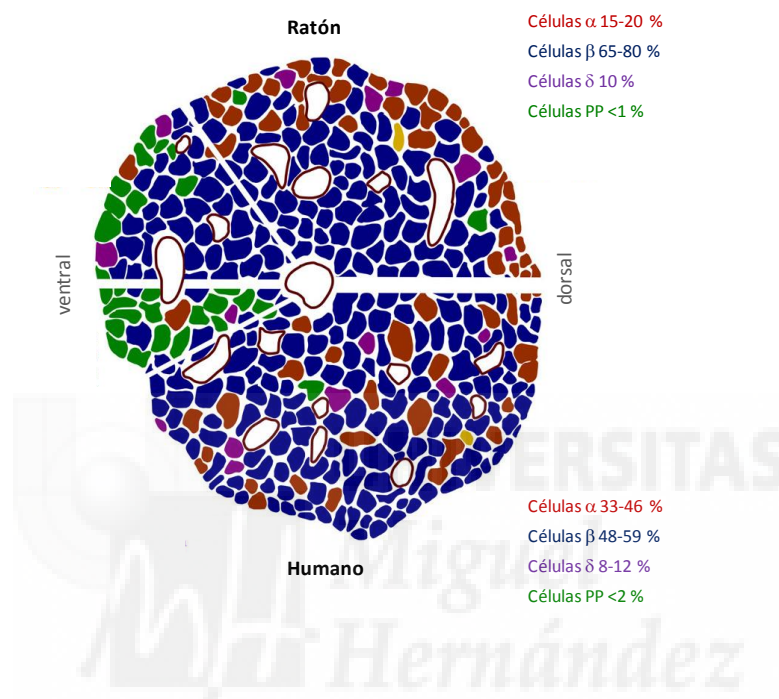
La unidad endocrina del páncreas es el islote de Langerhans, el cual está compuesto principalmente por células  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y PP, las cuales secretan glucagón, insulina, somatostatina y polipéptido pancreático, respectivamente. Estas agrupaciones celulares, que se encuentran dispersas en el páncreas exocrino, apenas constituyen un 1 % del órgano. Los islotes se encuentran distribuidos siguiendo un patrón aleatorio a lo largo de la cabeza, el cuerpo y la cola del páncreas. En humanos se observa una media de 0.5-1.5 millones de islotes, presentando cada uno de ellos un total de 1000-3000 células, lo que les confiere un diámetro de 100-500  $\mu\text{m}$ .

En islotes de rata o ratón la población mayoritaria la componen las células  $\beta$ , las cuales suponen un 65-80 % del total celular, predominantemente localizadas en el interior del islote. Las células  $\alpha$  (15-20 %), las  $\delta$  (~ 10 %) y las PP (< 1 %) aparecen, a diferencia de las células  $\beta$ , distribuidas por la periferia (figura 1.1). Los islotes humanos difieren respecto a los de roedores en cuanto a la proporción y localización de estos tipos celulares, presentando una distribución espacial de los mismos completamente aleatoria en el islote, sin guardar ningún patrón definido (figura 1.1). Dependiendo de la región del páncreas en la que estén localizados los islotes, en humanos las células  $\beta$  constituyen un 48-59 %, las  $\alpha$  33-46 % y las  $\delta$  8-12 %. Así, en rata o ratón hay un mayor porcentaje de células secretoras de insulina y una menor proporción de células secretoras de glucagón que en humanos (Cabrera et al., 2006).

La función principal de las células  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\delta$  es la de regular la concentración de glucosa en sangre. Mientras las células  $\beta$  secretan insulina a elevadas concentraciones de glucosa, las células  $\alpha$  liberan glucagón en condiciones de hipoglucemia. Estas dos hormonas generan cambios opuestos en la concentración de este azúcar. Además las células  $\delta$  secretan somatostatina, la cual inhibe la secreción hormonal de las células  $\alpha$  y  $\beta$ . Los tres tipos celulares son sensibles a los niveles de glucosa de manera que ésta regula su secreción hormonal.

Las células endocrinas de los islotes de Langerhans se encuentran bien inervadas por fibras nerviosas del sistema simpático, parasimpático y sensorial (Ahren, 2000), creyéndose que la secreción hormonal del islote a nivel nervioso está regulada, principalmente, por la rama parasimpática (Rossi et al., 2005). La anatomía y fisiología de la microvascularización del islote

muestran que la primera población perfundida es la de células secretoras de insulina, siguiéndoles las células no beta ( $\beta \rightarrow \alpha \rightarrow \delta$ ) (Samols *et al.*, 1988), y finalmente las células exocrinas peri-insulares (Papaccio, 1993). Además, los islotes de Langerhans se encuentran sometidos a un control tanto autocrino como paracrino consecuencia de la secreción hormonal de las distintas células que lo componen.



**Figura 1.1** Distribución de los distintos tipos celulares que componen los islotes de Langerhans. Modificada de (Suckale J, 2008).

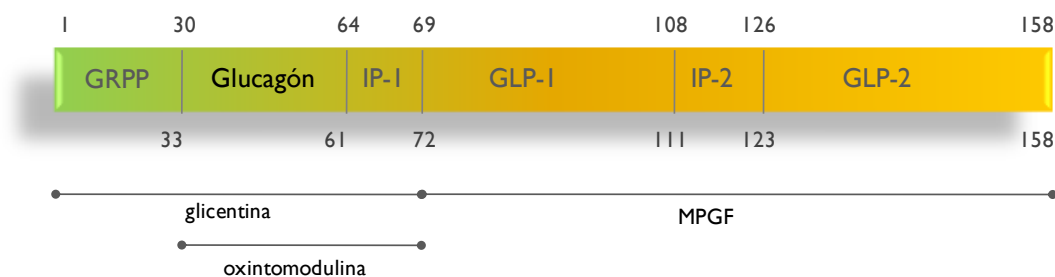
Hasta el momento se ha llevado a cabo un elevado número de estudios en células  $\beta$ , la población mayoritaria del islole. Sin embargo, a pesar de la importancia de la población  $\alpha$  pancreática en el control de la glucemia, resulta carente la información relativa a este tipo celular. Esto se debe a diversos motivos, como son la escasa contribución de las células  $\alpha$  al total celular del islole, la ausencia de modelos de identificación y la falta de metodología para analizar estas poblaciones minoritarias en el islole entero, la unidad fisiológica. Aún así, en los últimos años varios grupos han empezado a caracterizar las propiedades electrofisiológicas y las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta a glucosa de los principales grupos de células en islole intacto de ratón (Sanchez-Andres *et al.*, 1995; Berts *et al.*, 1996; Nadal *et al.*, 1999; Quesada *et al.*, 1999; Gopel *et al.*, 2000; Pertusa *et al.*, 2002).

## 1.1- El glucagón

### I. La hormona

Banting y Best ya observaron durante sus trabajos que, tras inyectar extractos pancreáticos en perros diabéticos, en ciertas ocasiones se producía una hiperglucemia transitoria que precedía a la hipoglucemia inducida por insulina. Por entonces se desconocía que el glucagón fuera la hormona responsable y se creyó que este fenómeno se debía a la acción de la adrenalina. Murlin y colaboradores, en 1923, descubrieron ese péptido con propiedades antiglucogénicas y propusieron llamarlo glucagón. Años más tarde se supo que las células  $\alpha$  eran las células pancreáticas productoras y secretoras de esta hormona, y que la liberación de ésta era resultado del estado hipoglucémico (Gromada et al., 2007).

El glucagón es una hormona peptídica de 29 aminoácidos, con un peso molecular de  $\sim$  3.5 KDa, que resulta del procesamiento proteolítico de su molécula precursora, el proglucagón, de 160 aminoácidos. El gen del proglucagón se expresa en células  $\alpha$  pancreáticas, células L intestinales y neuronas del hipotálamo y médula oblongata (Philippe, 1991). El procesamiento post-traducciona del proglucagón es un mecanismo específico de tejido. En el caso de las células  $\alpha$  pancreáticas el proglucagón es procesado principalmente a glucagón, GRPP (*Glicentin Related Pancreatic Peptide*), IP-1 (*Intervening Peptide 1*) y MPGF (*Major Proglucagon Fragment*) (Patzelt et al., 1979; Patzelt & Schiltz, 1984; Holst et al., 1994), mientras que en las células L del intestino el procesamiento resulta principalmente en la formación de glicentina, GLP-1 (*Glucagon Like Peptide 1*), IP-2 (*Intervening Peptide 2*) y GLP-2 (*Glucagon Like Peptide 2*) (George et al., 1985; Orskov et al., 1986) (figura 1.2). Se tienen evidencias para creer que las diferencias en los mecanismos de procesamiento de células  $\alpha$  y células L radican en la expresión de distintas convertasas en estos tipos celulares. Mientras las células  $\alpha$  pancreáticas expresan elevados niveles de PC2 y apenas PC3 (Marcinkiewicz et al., 1994; Neerman-Arbez et al., 1994; Rouille et al., 1994), las células L intestinales presentan PC3 inmunorreactiva pero carecen de PC2 (Scopsi et al., 1995).



**Figura 1.2** Estructura del proglucagón y de los péptidos derivados de éste. Modificada de (Drucker, 2005).

## II. Principales funciones del glucagón

El glucagón es la hormona contrarreguladora de la insulina y, al igual que ésta, desempeña funciones en diversos órganos y tejidos con el fin de contribuir al mantenimiento del metabolismo energético (tabla 1.3). Sus acciones directas sobre el metabolismo de hidratos de carbono son las que le han dotado de más relevancia. Entre ellas destacan la estimulación de glucogenolisis y gluconeogénesis, y la inhibición de la glucólisis y glucogénesis, aspectos que se detallarán más adelante. Consecuentemente con el papel que ejerce sobre estas vías metabólicas, el glucagón favorece la producción y la movilización hepática de la glucosa. No obstante, el glucagón también regula el metabolismo de ácidos grasos favoreciendo la lipólisis en los adipocitos en rata (Slavin *et al.*, 1994), aunque el efecto lipolítico en humanos es controvertido (Jensen *et al.*, 1991; Gravholt *et al.*, 2001). Ante un elevado ratio glucagón/insulina aumentan las tasas de gluconeogénesis y de  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos, así como la formación de cuerpos cetónicos (Vons *et al.*, 1991). Muy recientemente se ha evidenciado el papel del glucagón en el metabolismo de lípidos en ratón en condiciones de ayuno (Longuet *et al.*, 2008), demostrándose que el glucagón inhibe la síntesis y secreción de triglicéridos en hepatocitos, y favorece la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos. El glucagón también es capaz de estimular la incorporación de aminoácidos para gluconeogénesis en el hígado. De hecho, pacientes con hiperglucagonemia pueden desarrollar hipoaminoacidemia, especialmente para aquellos aminoácidos que están implicados en el proceso de gluconeogénesis (Cynober, 2002).

	Glucagón	Insulina
<b>Metabolismo de carbohidratos</b>	Estimula glucogenolisis	Inhibe glucogenolisis
	Estimula gluconeogénesis	Inhibe gluconeogénesis
	Inhibe glucogénesis	Estimula glucogénesis
	Inhibe glucólisis	Estimula glucólisis
<b>Metabolismo de ácidos grasos</b>	Estimula lipólisis	Inhibe degradación de triglicéridos
	Estimula $\beta$ -oxidación de ácidos grasos	Favorece síntesis de ácidos grasos

**Tabla 1.3** Principales funciones del glucagón y de la insulina sobre el metabolismo energético en rata.

### III. El receptor de glucagón

El receptor de glucagón es una proteína de membrana de 63 kDa que pertenece a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G. Contiene siete dominios transmembrana conectados por *loops* extracelulares e intracelulares alternativos, desde el dominio amino-terminal extracelular hasta la región carboxilo-terminal intracelular (Unson, 2002). Principalmente se encuentra expresado en hígado, donde su activación induce una cascada de eventos que concluyen en la síntesis y liberación de glucosa al torrente sanguíneo (Burcelin *et al.*, 1998), pero también se localiza abundantemente en tejido adiposo, riñones, corazón, bazo, islotes pancreáticos, ovarios y timo; y ligeramente en músculo esquelético, glándulas adrenales, estómago, intestino y cerebro (Burcelin *et al.*, 1996; Unson, 2002).

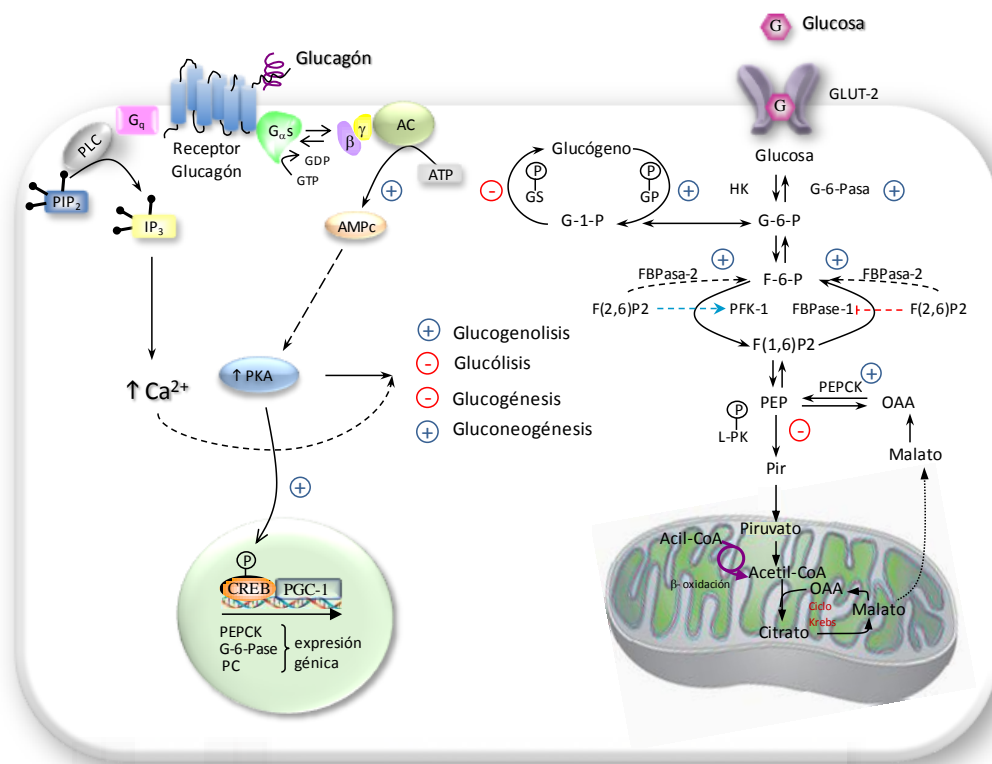
La unión del glucagón a los *loops* extracelulares de su receptor induce un cambio conformacional en este último dando lugar a la activación de las dos clases de proteínas G que están acopadas a la ruta de transducción de señales de esta hormona:  $G_s\alpha$  y  $G_q$ . La activación de la primera de ellas conduce a la activación de la AC (adenilato ciclasa), a un aumento de los niveles intracelulares de AMPc, y a la subsiguiente activación de PKA (proteína quinasa A). Por otra parte, en el caso de activarse la proteína  $G_q$ , la fosfolipasa C activa promueve la producción de IP3 (inositol 1,4,5-trifosfato), liberándose  $Ca^{2+}$  de depósitos intracelulares (Christophe, 1995; Burcelin *et al.*, 1996). Estos mecanismos confluyen en la

regulación de diversas rutas metabólicas como son la glucólisis, la glucogénesis, la gluconeogénesis y la glucogenolisis (figura 1.4). Por ejemplo, la activación de PKA por AMPc conduce a la fosforilación de diversas enzimas de la glucogenolisis, potenciando la tasa de esta vía. La participación de la PKA activa sobre la expresión génica de enzimas implicados en el metabolismo de la glucosa también ha sido corroborada en diversos estudios (Herzig *et al.*, 2001; Yoon *et al.*, 2001).

#### **IV. Papel del glucagón en la homeostasis de la glucosa**

El control de unos niveles adecuados de glucemia precisa de una correcta coordinación de la función y secreción de las células pancreáticas  $\alpha$  y  $\beta$  (Gopel *et al.*, 1999; Nadal *et al.*, 1999; Barg, 2003). La secreción de insulina, hormona que promueve principalmente la entrada de glucosa en células de músculo y tejido adiposo, resulta estimulada a elevadas concentraciones de glucosa. Sin embargo, el glucagón es liberado al torrente sanguíneo cuando la concentración de glucosa circulante es baja. El principal papel del glucagón es estimular la producción y movilización hepática de este azúcar, generando así aumentos en la glucemia. Constituye, pues, el principal mecanismo opuesto al de la insulina en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa *in vivo*.

Numerosos estudios, tanto *in vivo* como *in vitro*, han demostrado que el glucagón estimula la producción de glucosa en hígado de rata perfundido y en hepatocitos primarios en cultivo, resultando en incrementos de glucogenolisis y gluconeogénesis. Estos efectos surgen como consecuencia del efecto del glucagón sobre diversas enzimas hepáticas, tales como la glucosa-6-fosfatasa (G-6-Pasa) (Band & Jones, 1980a; Band & Jones, 1980b; Spagnoli *et al.*, 1983; Striffler *et al.*, 1984; Yoon *et al.*, 2001), la glucógeno sintasa (GS) (Ciudad *et al.*, 1984), la fructosa-1,6-bifosfatasa (F(1,6)P2) (Kurland & Pilkis, 1995) y la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) (Chakravarty *et al.*, 2005) (figura 1.4). Paralelamente, el glucagón inhibe la ruta de la glucólisis reduciendo los niveles de fructosa-2,6-bifosfatasa (F(2,6)P2) (Pilkis *et al.*, 1982; Kurland & Pilkis, 1995), lo cual produce un efecto negativo sobre la enzima fosfofructoquinasa-1 (PFK-1). Otro modo de acción sobre la glucólisis lo desarrolla inhibiendo la actividad de la L-piruvato quinasa (L-PK) vía AMPc, e impidiendo el almacenamiento de su ARNm y el aumento de la expresión génica inducida por la insulina (Yamada & Noguchi, 1999).

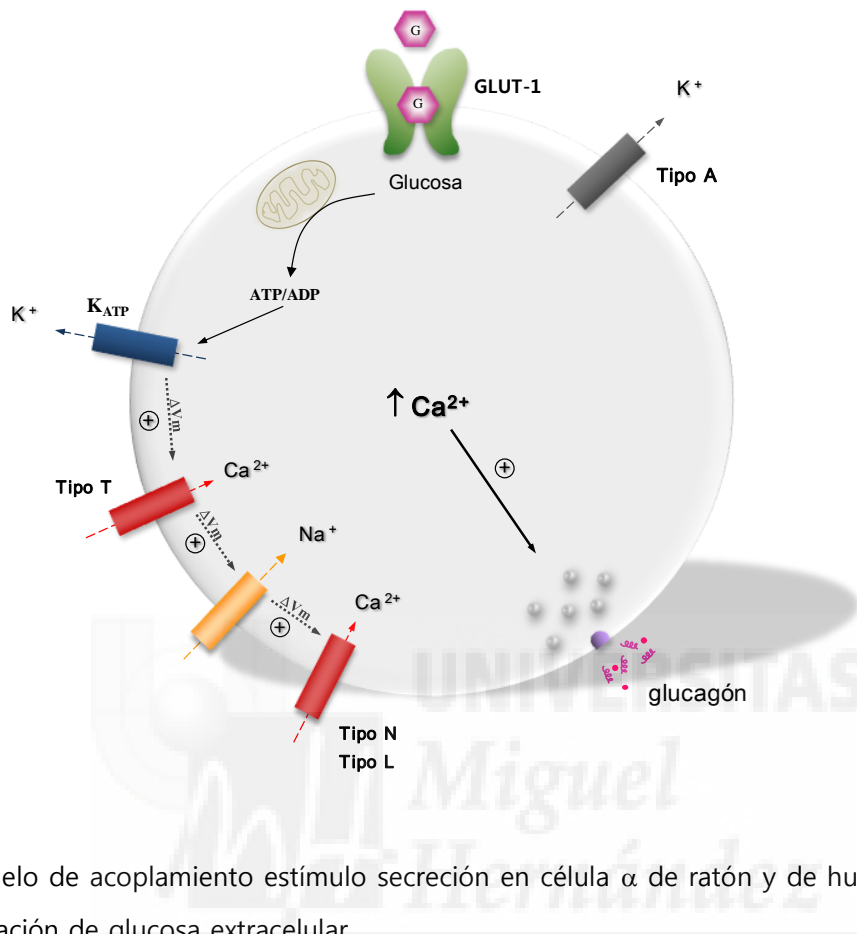


**Figura 1.4** Papel del glucagón y de su receptor en células hepáticas ((+) regulación positiva, (-) regulación negativa).

## 1.2- Acoplamiento estímulo-secreción en la célula $\alpha$

Recientemente se propuso un modelo de acoplamiento estímulo-secreción para la célula  $\alpha$  y su respuesta a glucosa (Gromada *et al.*, 2004) en base a la función de los principales canales iónicos implicados en la respuesta secretora de esta célula (figura 1.5). Atendiendo a este modelo propuesto por el grupo de Patrick Rorsman, los canales  $K_{ATP}$  en células  $\alpha$  están activos en ausencia de glucosa o a bajas concentraciones del azúcar. La densidad de estos canales es baja comparada con la de célula  $\beta$  y la conductancia de  $K^+$  resultante basta para repolarizar la célula a potenciales de membrana alrededor del umbral de inicio de los potenciales de acción (- 60 mV). El inicio de éstos se debe a la actividad de canales de  $Ca^{2+}$  tipo T, que se activan a potenciales más negativos que los canales de  $Na^+$  y los de  $Ca^{2+}$  tipo N. Cuando los canales de  $Ca^{2+}$  tipo T se activan, llevan al potencial de membrana a un rango (alrededor de -30 mV) donde los canales de  $Na^+$  se abren y se inicia el potencial de acción.

Una vez que el potencial de membrana excede de  $-20$  mV los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo N se abren y se origina entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y exocitosis (figura 1.5).



**Figura 1.5** Modelo de acoplamiento estímulo secreción en célula  $\alpha$  de ratón y de humano en respuesta a baja concentración de glucosa extracelular.

Al aumentar la concentración de glucosa extracelular, aumentaría su incorporación al citosol y su metabolismo mitocondrial, aumentando entonces la relación ATP/ADP. Esto llevaría al bloqueo de los canales  $\text{K}_{\text{ATP}}$  y a la despolarización de la membrana. La despolarización llevaría el potencial de membrana a un nivel en el que se inactivan los canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ . De esta manera, los potenciales de acción no se generan ni se alcanza el potencial de membrana requerido para activar canales tipo N, suprimiéndose la secreción de glucagón. Esta hipótesis se sustenta también porque la tolbutamida (bloqueante de  $\text{K}_{\text{ATP}}$ ) a altas concentraciones, la TTX (bloqueante de los canales de  $\text{Na}^+$ ) y la  $\omega$ -conotoxina (antagonista de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo N) suprimen la secreción de glucagón. No obstante este modelo de células  $\alpha$  tiene también detractores (Liu *et al.*, 2004).



## I. Canales iónicos y regulación de la actividad eléctrica en la célula $\alpha$

Las células  $\alpha$  son células eléctricamente excitables y, a diferencia de las células  $\beta$ , generan potenciales de acción en ausencia o a baja concentración de glucosa. Los canales iónicos responsables del inicio de los potenciales de acción y de la exocitosis han sido caracterizados en diversos estudios (figura 1.6) (Gromada *et al.*, 1997; Bokvist *et al.*, 1999; Barg *et al.*, 2000; Gopel *et al.*, 2000).

### Canales de $K^+$ dependientes de ATP: canales $K_{ATP}$

Las células  $\alpha$  pancreáticas expresan canales  $K_{ATP}$  de idéntica estructura molecular que los que se encuentran en las células  $\beta$  secretoras de insulina (Suzuki *et al.*, 1997; Bokvist *et al.*, 1999), es decir, canales compuestos por 4 subunidades SUR1 (receptor de sulfonilureas) y 4 subunidades Kir6.2 (formadoras del poro iónico y sitios de interacción del ATP). Estos canales juegan un papel fundamental en la fisiología de las células  $\alpha$ , tal como sucede en el caso de las células secretoras de insulina, dado que acoplan variaciones en los niveles de glucosa extracelular con cambios en el potencial de membrana y en la actividad eléctrica.

Diversos trabajos han demostrado una menor densidad de canales  $K_{ATP}$  en células  $\alpha$  respecto a células  $\beta$  (Barg *et al.*, 2000; Gopel *et al.*, 2000), así como diferencias en la sensibilidad de estos canales por el ATP. Las células  $\alpha$  de ratón presentan mucha mayor sensibilidad ( $K_i = 0.16$  mM) que sus homólogas en rata ( $K_i = 0.94$  mM) y que las células  $\beta$  de ambas especies ( $K_i = 0.92$  mM y  $K_i = 0.86$  mM para rata y ratón, respectivamente) (Leung *et al.*, 2005). Por consiguiente, en las células secretoras de glucagón de ratón se requieren concentraciones mucho menores de ATP que en las células  $\beta$  para obtener inhibición máxima de la conductancia de los canales  $K_{ATP}$ . Es más, se ha observado que la actividad de los  $K_{ATP}$  en células  $\alpha$  en ausencia de glucosa es tan baja como la encontrada en células  $\beta$  expuestas a concentraciones de glucosa estimuladoras de secreción de insulina (Rorsman *et al.*, 2008).

En páncreas de ratón, las células  $\alpha$  además de expresar poca cantidad de  $K_{ATP}$  presentan un elevado ratio ATP/ADP (Detimary *et al.*, 1998): requisitos para mantener el potencial de membrana lo suficientemente despolarizado. De esta forma se permite actividad eléctrica regenerativa y también se previene la inactivación dependiente de voltaje de las conductancias

iónicas que están implicadas en el inicio de los potenciales de acción a baja concentración de glucosa (Gromada *et al.*, 2004).

### **Canales de K<sup>+</sup> dependientes de voltaje**

La principal función de estos canales es la de repolarizar el potencial de acción. La existencia de canales de K<sup>+</sup> de rectificación tardía (K<sub>DR</sub>) se ha demostrado en células secretoras de glucagón en ratón, rata y cobaya (Rorsman & Hellman, 1988; Barg *et al.*, 2000; Leung *et al.*, 2005). Estas corrientes son sensibles a TEA (10 mM), compuesto que produce una reducción del componente de salida de hasta un 90 % (Barg *et al.*, 2000).

Además de K<sub>DR</sub> tanto las células  $\alpha$  como las  $\delta$  de ratón presentan corrientes de salida de K<sup>+</sup> tipo A que se diferencian en el voltaje de activación, inactivación y sensibilidad a TEA, activándose y desactivándose estas corrientes a voltajes más negativos en células  $\alpha$  (Gopel *et al.*, 2000). La corriente de K<sup>+</sup> inactivante en este tipo celular es resistente a TEA pero sensible a 4-AP (4-aminopiridina) (IC<sub>50</sub> < 10 mM) (Gopel *et al.*, 2000). Se ha observado que la inhibición que produce 4-AP sobre la secreción de glucagón a baja concentración de glucosa (1 mM G) es comparable con la que produce una concentración del azúcar igual a 20 mM (Gromada *et al.*, 2004).

### **Canales de K<sup>+</sup> acoplados a proteínas G**

Estos canales de K<sup>+</sup> han sido localizados en células  $\alpha$  de ratón y rata, y difieren de los K<sub>ATP</sub> en una serie de propiedades. Se trata de canales de baja conductancia al K<sup>+</sup>, de menor amplitud que los K<sub>ATP</sub>, son insensibles a tolbutamida, y resultan estimulados por somatostatina (Gromada *et al.*, 2001b).

### **Canales de Na<sup>+</sup>**

En las células  $\alpha$  se han descrito canales de Na<sup>+</sup> sensibles a TTX que, en el caso de ratón, se activan a potenciales alrededor de -30 mV (Gopel *et al.*, 2000). Estos canales juegan un papel imprescindible en la generación de potenciales de acción en esta población celular. Una concentración de 0.1  $\mu$ g/mL de TTX es suficiente para bloquear estas corrientes, y cuando esto sucede las conductancias que permanecen son demasiado pequeñas para dar origen a una

corriente de entrada neta durante la despolarización y, consecuentemente, no se generan potenciales de acción (Gopel *et al.*, 2000). La inhibición que se produce entonces sobre la secreción de glucagón es comparable a la que produce la máxima concentración inhibitoria de glucosa sobre la célula  $\alpha$ .

### **Canales de $\text{Ca}^{2+}$ dependientes de voltaje**

Canales tipo T: Se trata de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  que se activan a bajo voltaje; su apertura ocurre a potenciales tan negativos como -65 mV, en torno al umbral de inicio de los potenciales de acción (Gopel *et al.*, 2000).

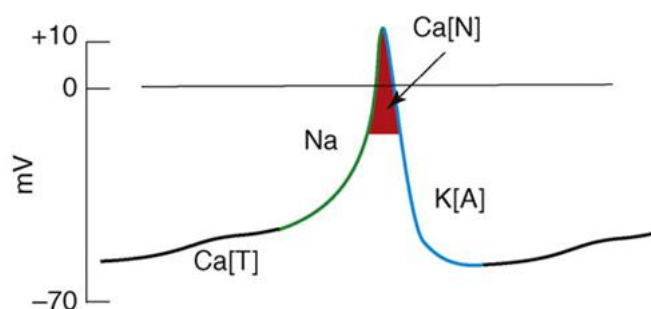
Canales tipo N: a potenciales alrededor de -20 mV a -10 mV sólo algunos canales tipo N se encuentran abiertos, mientras que se espera que casi todos lo estén a potenciales de +10 mV (Rorsman *et al.*, 2008). Medidas de la secreción de glucagón han revelado una relación muy próxima entre los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo N y la secreción estimulada por glucosa en islotes de rata y ratón. Esta relación se basa por observaciones tales como: a) en células  $\alpha$  de rata, el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de estos canales controla la secreción basal (Gromada *et al.*, 1997), y b) en el caso de ratones deficientes de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo N, los niveles de glucagón en plasma se encuentran reducidos (Takahashi *et al.*, 2005). Estudios de secreción de glucagón en islotes de ratón también demuestran la participación de estos canales en la secreción dependiente de glucosa (MacDonald *et al.*, 2007).

Canales tipo L: son dependientes de alto voltaje y se activan a potenciales de membrana correspondientes con la fase de subida rápida del potencial de acción, más concretamente, se requieren despolarizaciones en torno a -20 mV para que se produzca la apertura de estos canales (Gopel *et al.*, 2000). Aunque son responsables de dos tercios de la corriente de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (Barg *et al.*, 2000), no son los principales canales que median la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en la secreción dependiente de glucosa. Sin embargo, sí que son fundamentales en condiciones en que se elevan los niveles de AMPc y aumenta la actividad de PKA (Gromada *et al.*, 1997).

Canales tipo R: recientemente se ha descrito la presencia de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo R en células  $\alpha$  de ratón. Estos canales contienen la subunidad Cav2.3 y parecen participar también en la regulación de la secreción de glucagón por glucosa *in vitro*. (Pereverzev *et al.*, 2005; Vignali *et al.*, 2006).

## Canales de unión a nucleótidos cíclicos activados por hiperpolarización: canales HCN

En la línea celular secretora de glucagón  $\alpha$ -TC6, un estudio reciente atribuye a los canales HCN, permeables a  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , un importante papel en la regulación de la secreción de glucagón. Parece ser que estos canales modulan la actividad de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$  y el rango en el que se activan los potenciales de acción en la población  $\alpha$  (Zhang *et al.*, 2008).

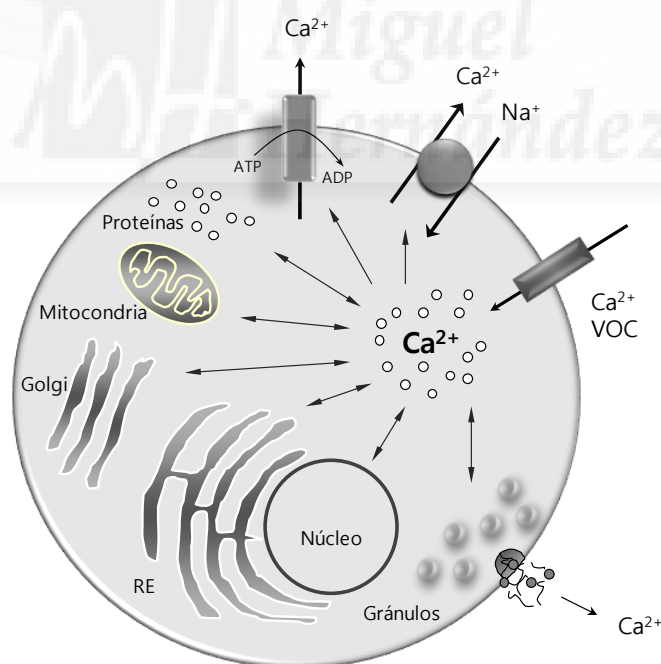


**Figura 1.6** Contribución de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T (Ca[T]), los canales de  $\text{Na}^+$  sensibles a TTX (Na), y los canales de  $\text{K}^+$  tipo A (K[A]) sobre el potencial de acción de la célula  $\alpha$ . Durante el pico del potencial de acción, los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo N se activan, como muestra la región señalada en rojo, dando lugar a exocitosis (Rorsman *et al.*, 2008).

## II. Homeostasis del $\text{Ca}^{2+}$ intracelular

El  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico juega un papel crucial como segundo mensajero, función que se debe a la gran diferencia en su concentración entre el medio extracelular (1-2 mM), el citosol (100-200 nM) y los orgánulos intracelulares (variable, entre 10  $\mu\text{M}$  y 5 mM, dependiendo del orgánulo). Debido a dichas diferencias de concentración se originan fuertes gradientes electroquímicos que favorecen la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al espacio intracelular, desencadenándose múltiples efectos en la transducción de señales a través de una extensa gama de enzimas y proteínas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ . Una vez que se ha producido la señal en la célula es necesario que se restablezcan las condiciones basales previas al estímulo para que el sistema vuelva a ser operativo. Esto implica la participación de diversos componentes reguladores, localizados tanto en la membrana plasmática de las células como en los reservorios intracelulares.

El medio extracelular supone una fuente ilimitada de  $\text{Ca}^{2+}$ . La entrada de este ión al citosol se encuentra regulada por una serie de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  activados por voltaje, por receptor, u operados por el vaciado de los reservorios intracelulares (figura 1.7). También se requiere maquinaria específica para extruir el  $\text{Ca}^{2+}$  al espacio extracelular y evitar así la toxicidad que produce este ión cuando alcanza concentraciones elevadas. La extrusión del  $\text{Ca}^{2+}$  está dirigida por intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  y bombas  $\text{Ca}^{2+}/\text{ATPasa}$  localizados en la membrana plasmática. Los orgánulos intracelulares juegan un papel fundamental en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$ , concretamente el retículo endoplásmico (RE). Este reservorio está dotado de una bomba  $\text{Ca}^{2+}/\text{ATPasa}$  tipo SERCA (*Sarco Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase*), que bombea  $\text{Ca}^{2+}$  al interior del RE al tiempo que consume ATP. La capacidad del RE de liberar  $\text{Ca}^{2+}$  desde su interior en respuesta a una estimulación fisiológica está mediada por la existencia de canales específicos localizados en su membrana: receptores de rianodina y receptores de IP3 (Bootman *et al.*, 2001). Así mismo, se ha descrito un papel importante en prácticamente todos los orgánulos intracelulares en relación tanto a la homeostasis como a la dinámica del ión  $\text{Ca}^{2+}$ .

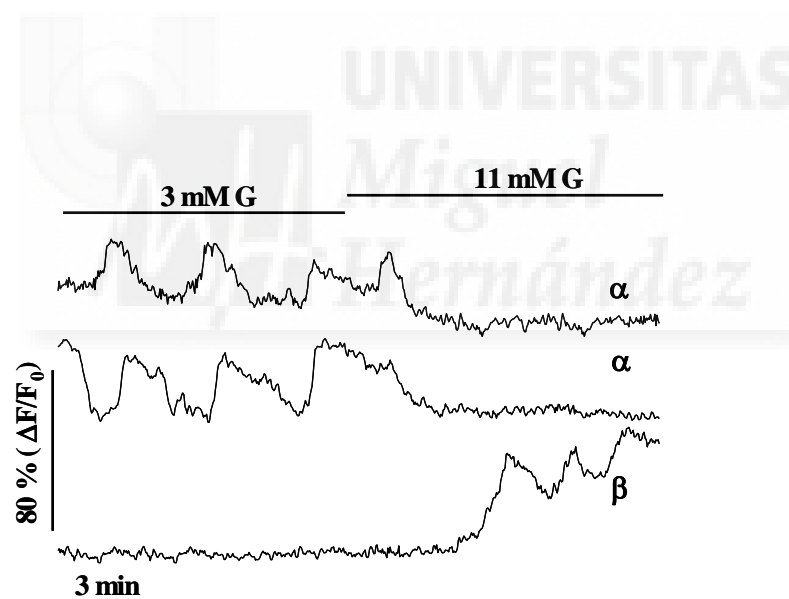


**Figura 1.7** Homeostasis celular del  $\text{Ca}^{2+}$ . Se muestran los principales componentes: canales, intercambiadores y bombas, así como los reservorios de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares.

### III. La señal de $\text{Ca}^{2+}$ en la célula $\alpha$

Se sabe que una concentración estimuladora de glucosa induce un patrón oscilatorio sincrónico y homogéneo de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en las células  $\beta$  (Valdeolmillos *et al.*, 1989; Valdeolmillos *et al.*, 1993), que da lugar a la secreción de insulina, como consecuencia del patrón de actividad eléctrica tan característico de este tipo celular. Sin embargo, las células  $\alpha$  producen potenciales de acción en ausencia de glucosa (figura 1.8), lo cual induce oscilaciones de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y secreción de los gránulos de glucagón.

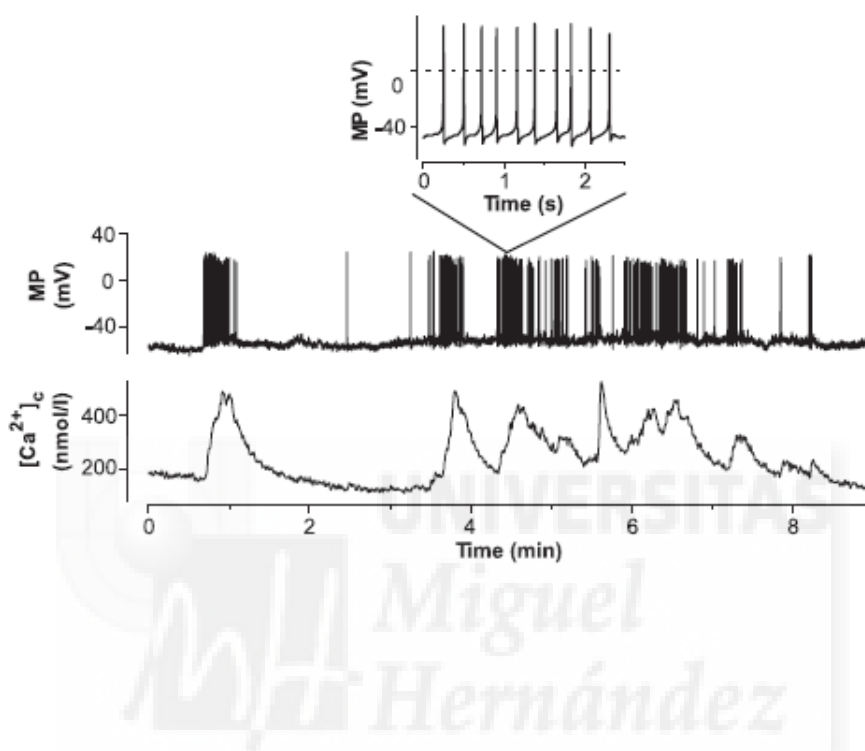
A elevadas concentraciones de glucosa se inhiben estos eventos celulares. A diferencia de lo que ocurre en las células  $\beta$ , en las células  $\alpha$  se ha observado asincronía en la señal oscilatoria entre las mismas y entre éstas y las otras células del islote (Nadal *et al.*, 1999) dado que la población  $\alpha$  no está acoplada por *gap junctions*, a diferencia de lo que ocurre en la población  $\beta$ .



**Figura 1.8** Registros de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico tomados por microscopía confocal de células  $\alpha$  y  $\beta$  de islotes humanos en respuesta a baja (3 mM) y elevada (11 mM) concentración de glucosa (G). (Quesada *et al.*, 2006a).

Recientemente se ha demostrado en célula  $\alpha$  la estrecha correlación existente entre el patrón eléctrico y la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  (Quoix *et al.*, 2009). Como se ha mencionado anteriormente, a bajas concentraciones de glucosa se genera actividad eléctrica en la célula  $\alpha$  y, a

continuación se produce la apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  e incrementos en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . La figura 1.9 muestra la correlación entre la actividad eléctrica y la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  en las células secretoras de glucagón.



**Figura 1.9** Registro simultáneo de potencial de membrana y de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en célula  $\alpha$  de ratón a 0.5 mM G (Quoix *et al.*, 2009).

Por otro lado, estímulos esenciales en la regulación de la célula  $\alpha$ , como la adrenalina, producen una movilización inicial del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular almacenado en los orgánulos seguida de un influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular debido a la activación de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje tipo L (Liu *et al.*, 2004).

Además de los mecanismos expuestos en la página 9 acerca del acoplamiento estímulo-secreción en célula  $\alpha$ , recientemente se ha propuesto que la glucosa también puede modular la actividad secretora de estas células a través de la regulación de los depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ . El retículo endoplásmico está dotado de una bomba  $\text{Ca}^{2+}$ /ATPasa tipo SERCA que facilita la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al retículo al tiempo que consume ATP. Así, en condiciones de baja glucosa estos reservorios se encuentran vacíos debido a los bajos niveles de ATP en el citosol.

El vaciamiento de los reservorios de  $\text{Ca}^{2+}$  activa un influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana plasmática conocido como entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  capacitativa. Por lo tanto, en condiciones hipoglucémicas esta corriente despolarizante produce despolarización de la membrana plasmática hasta unos niveles donde se genera actividad eléctrica en la célula  $\alpha$  y, consecuentemente, activación de la secreción de glucagón. Tras un aumento en la concentración de glucosa, el metabolismo se acelera incrementándose los niveles de ATP y la actividad de SERCA, por lo que los reservorios intracelulares se rellenan de  $\text{Ca}^{2+}$ . En estas condiciones la conductancia de entrada se reduce, la membrana se repolariza y se suprime la secreción de glucagón (Liu *et al.*, 2004). No obstante, no se conoce realmente cuál es la contribución de este mecanismo sobre la secreción de glucagón dependiente de glucosa. En islotes de ratón se ha observado que en presencia de tapsigarguina (un inhibidor de la bomba  $\text{Ca}^{2+}$ /ATPasa del RE) la acción inhibitoria de la glucosa se antagoniza parcialmente (< 30 %) (Gromada *et al.*, 2004), mientras que no se observa efecto de tapsigarguina en la inhibición por glucosa en células  $\alpha$  de rata (Olsen *et al.*, 2005).

#### IV. Exocitosis de los gránulos secretores de glucagón

La aplicación de medidas de capacitancia sobre las células  $\alpha$  ha permitido que la exocitosis de sus gránulos pueda ser monitorizada en células aisladas con una resolución de milisegundos. Se trata de un proceso dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , ligeramente más rápido que su homólogo en células  $\beta$ . Algunas diferencias en la secreción de ambas hormonas radican en el número de gránulos que componen los respectivos *pools* de liberación rápida, RRP (*Readily Releasable Pool*), 120 en células  $\alpha$  frente a 60 en las células  $\beta$ , así como en la frecuencia de relleno de este *pool*, la cual es mayor en células secretoras de glucagón (Barg, 2003). Cabe destacar, además, una segunda aceleración en el proceso de exocitosis en las células  $\alpha$  tras la depleción de RRP, que puede estar reflejando translocaciones rápidas de gránulos desde el interior de la célula a los sitios de liberación.

Tras la despolarización de la membrana plasmática y la consecuente activación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , las regiones inmediatas a estos alcanzan rápidamente (< 30 ms) una  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  suficiente para que se produzca exocitosis (Barg *et al.*, 2000). Esta dependencia del  $\text{Ca}^{2+}$  se debe a la presencia de varias proteínas que requieren este ion para su activación y/o regulación como la sinaptotagmina, la fosfatasa calcineurina o la calmodulina quinasa. Estas



proteínas, junto a otras del complejo SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein Receptor*, complejo proteico de fusión), participan en el proceso de exocitosis y/o en el tránsito de los gránulos hasta la membrana. Se ha demostrado que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje tipo N es particularmente importante para la exocitosis en condiciones basales (Gromada *et al.*, 1997). Cuando los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  se cierran, el transitorio local de  $\text{Ca}^{2+}$  que controla la exocitosis se colapsa y la exocitosis cesa. Consta que este proceso ocurre rápidamente tras repolarizar la membrana de las células  $\alpha$  (Gromada *et al.*, 1997; Barg *et al.*, 2000; Gromada *et al.*, 2001a).

La estimulación de las células  $\alpha$  con adrenalina (vía receptores  $\beta$ -adrenérgicos) o forskolina (agonista de AC que favorece la producción de AMPc) producen un notable aumento de la secreción de glucagón, tanto al aumentar el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$ , y por lo tanto la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , como por un efecto directo sobre la exocitosis dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Gromada *et al.*, 1997). Se ha observado que el incremento en la actividad eléctrica de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  alcanzada por acción del AMPc tan sólo supone < 30% del efecto estimulador total que ejerce el AMPc sobre la célula  $\alpha$ . El más importante de los mecanismos de este nucleótido es la movilización de los gránulos desde un *pool* de reserva hacia el *pool* de los gránulos preparados para ser liberados, cercano a los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L (Gromada *et al.*, 1997). La nifedipina, bloqueante de estos canales, es uno de los inhibidores más efectivos de la secreción de glucagón tras un aumento de los niveles de AMPc.

## 1.3 - Regulación de la secreción de glucagón

### I. Regulación del metabolismo de la célula $\alpha$

#### Regulación por glucosa

Como se ha descrito previamente, la secreción de glucagón se ve estimulada en condiciones de hipoglucemia y se inhibe en situación de hiperglucemia. La regulación de la función en la célula  $\alpha$  es compleja, existiendo además un amplio rango de moléculas y señales capaces de influir sobre la liberación de glucagón. A pesar de responder a otros nutrientes y factores, la glucosa es el principal regulador fisiológico de la producción y liberación de esta hormona. La gran mayoría de estudios coinciden en señalar a este azúcar como potente

inhibidor de la secreción de glucagón, no sólo en modelos animales comunes si no también, como más recientemente se ha demostrado, en humanos (Quesada *et al.*, 2006a). Diversos estudios dosis-respuesta han revelado, además, que la célula  $\alpha$  es más sensible a glucosa que la célula  $\beta$  (Gromada *et al.*, 2007). El umbral para inhibir la secreción de glucagón es 2-3 mM G, inferior al necesario para estimular la secreción de insulina ( $\sim$  5 mM G). La concentración media para suprimir la secreción de glucagón sucede a 3-6 mM G, mientras que la media para estimular la secreción de insulina se sitúa en torno a 8-10 mM G. Además, concentraciones de 6-10 mM G por lo general producen la inhibición máxima de glucagón, mientras que hace falta 20 mM G para la máxima estimulación de insulina. Estos resultados apoyarían la hipótesis de que la glucosa ejerce un efecto directo sobre la célula  $\alpha$ , independientemente del que producen las moléculas u hormonas liberadas desde células  $\beta$  vecinas (Vieira *et al.*, 2007).

Sin embargo, algunos grupos que han profundizado en el estudio del papel de la glucosa en células  $\alpha$  aisladas de rata le atribuyen una función estimuladora de la secreción comparable a la que desempeña sobre la célula  $\beta$  (Franklin *et al.*, 2005; McGirr *et al.*, 2005; Olsen *et al.*, 2005). Posiblemente esto se deba a las divergencias existentes en cuanto a canales iónicos expresados en célula  $\alpha$  de ratón o rata (Gromada *et al.*, 2007).

Las células  $\alpha$  están dotadas de glucoquinasa y del transportador de glucosa de elevada afinidad GLUT 1. A pesar de la baja expresión de este transportador, y de la tasa del mismo para transportar la glucosa al interior de la célula  $\alpha$ , la incorporación del azúcar por parte de estas células es cinco veces más rápida que la utilización de éste, por lo que la actividad del transportador GLUT 1 es suficiente para mantener el equilibrio de los niveles de glucosa y no supone un paso limitante para el metabolismo de la misma (Heimberg *et al.*, 1996).

La baja expresión de MCT-1 (*Monocarboxilate Transporter 1*) en las células  $\beta$  favorece que el piruvato producido por glucólisis en el citosol entre en la mitocondria y se metabolice en el Ciclo de Krebs. Entre los productos resultantes se obtienen NADH y FADH<sub>2</sub>, moléculas que sirven como fuente de transferencia de electrones a la cadena respiratoria donde, finalmente, se produce ATP (Sekine *et al.*, 1994). Sin embargo, la presencia de MCT-1 en la membrana plasmática de las células  $\alpha$  (Sekine *et al.*, 1994; Liang *et al.*, 1996; Ishihara *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2001), favorece el transporte de piruvato al interior celular, hecho que podría explicar la habilidad del piruvato para estimular la secreción en este tipo celular. Un estudio

reciente llevado a cabo en células  $\alpha$  de rata determinó que el metabolismo del piruvato incrementa la secreción de glucagón y que el modo de acción parece implicar el cierre de canales  $K_{ATP}$  (Ishihara *et al.*, 2003). Paralelamente, las células  $\alpha$  expresan piruvato carboxilasa en menor medida que las células  $\beta$ , mucho más lactato deshidrogenasa y menor actividad de la enzima glicerol fosfato deshidrogenasa (Sekine *et al.*, 1994; Schuit *et al.*, 1997). Estas diferencias bioquímicas explicarían tanto la observada baja activación del metabolismo aeróbico mitocondrial en estas condiciones (Quesada *et al.*, 2006b) como la escasa variación del ratio ATP/ADP que se produce en células  $\alpha$  al aumentar los niveles de glucosa extracelular (Detimary *et al.*, 1998). Los resultados obtenidos hasta el momento en células  $\alpha$  muestran, por lo tanto, un débil acoplamiento entre los sucesos glucolíticos que tienen lugar en el citosol y la síntesis de ATP por fosforilación oxidativa, hecho que aparentemente escaparía del modelo de acoplamiento estímulo-secreción propuesto para la célula secretora de glucagón en ratón y humano (Gromada *et al.*, 2004; MacDonald *et al.*, 2007). En estas células se ha observado una elevada sensibilidad al ATP por parte de los  $K_{ATP}$  (Leung *et al.*, 2005) comparado con células  $\beta$ . Conociendo el estrecho rango de potencial de membrana en que las células  $\alpha$  generan actividad eléctrica, podría suceder que la ligera variación en el ratio ATP/ADP en respuesta a elevada concentración de glucosa fuese suficiente para bloquear la población de canales  $K_{ATP}$  y despolarizar la membrana a potenciales donde los canales de  $Ca^{2+}$  y los de  $Na^+$  no son capaces de producir potenciales de acción. También es muy posible que otros mecanismos influyan en la generación de actividad eléctrica. Un estudio reciente observó que el proceso de vaciado del  $Ca^{2+}$  almacenado en el retículo endoplásmico a baja concentración de glucosa produce una corriente despolarizante que es suficiente para generar actividad eléctrica en las células  $\alpha$  y activar canales de  $Ca^{2+}$  (Liu *et al.*, 2004).

### **Regulación por ácidos grasos y aminoácidos**

La teoría de la lipotoxicidad en la diabetes tipo II relacionada con la obesidad aumentó el interés en las interacciones entre los ácidos grasos y la función endocrina del islote de Langerhans. La mayoría de los estudios han sido realizados en célula  $\beta$ , por lo que apenas se dispone de información acerca de los efectos de los ácidos grasos sobre la regulación de la célula  $\alpha$ . Los primeros trabajos que se llevaron a cabo al respecto indicaban una inhibición de la secreción de glucagón por parte de los ácidos grasos. Sin embargo, en estudios más

recientes se ha observado estimulación de la secreción hormonal tras exposición de las células  $\alpha$  a ácidos grasos a corto plazo (Bollheimer *et al.*, 2004; Olofsson *et al.*, 2004; Hong *et al.*, 2005). Dicha estimulación resultó ser dependiente de la longitud de la cadena, de la configuración espacial y del grado de saturación de éstos (Hong *et al.*, 2005).

La acción estimuladora del palmitato se ha corroborado en diversos estudios, tanto en rata (Bollheimer *et al.*, 2004) como en ratón (Olofsson *et al.*, 2004). El mecanismo por el que el palmitato promueve la exocitosis de los gránulos en las células  $\alpha$  se encuentra favorecido por un aumento del influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje tipo L, y también porque de forma concomitante se produce un 50 % de inhibición de la secreción por parte de las células  $\delta$  (Olofsson *et al.*, 2004), lo cual alivia a las células  $\alpha$  de efectos paracrinis inhibitorios. Este ácido graso, al igual que el oleato, incrementa la secreción de glucagón y la acumulación de triglicéridos de forma dosis dependiente, pero inhibe la proliferación celular (Hong 2007). El efecto de los ácidos grasos también se ha estudiado a largo plazo en islotes de rata, observándose una disminución de la secreción de glucagón así como del contenido de esta hormona, mientras que la expresión génica no se ve alterada (Gremlich *et al.*, 1997; Dumonteil *et al.*, 2000).

Además de la acción de los ácidos grasos sobre la regulación de la célula  $\alpha$ , los aminoácidos también ejercen un papel considerable. Los efectos de éstos han sido estudiados en distintos modelos animales observándose en todos ellos una fuerte tendencia a estimular la secreción de glucagón, aunque la potencia relativa de cada uno varía entre las especies. Como potentes estimuladores de la secreción de glucagón destacan la arginina, la alanina y la glutamina (Pipeleers *et al.*, 1985; Kuhara *et al.*, 1991; Dumonteil *et al.*, 2000), mientras que la isoleucina inhibe modestamente la secreción hormonal en células  $\alpha$  (Rocha *et al.*, 1972) y la leucina muestra un efecto dual: estimula a concentraciones fisiológicas e inhibe si los niveles son elevados (Leclercq-Meyer *et al.*, 1985).

## II. Regulación endocrina y/o paracrina

Gran parte de los productos secretados por la célula  $\beta$  en respuesta a elevadas concentraciones de glucosa presentan un efecto inhibitorio sobre la secreción de glucagón (figura 1.10), siendo la insulina uno de los más efectivos. Sin embargo, a pesar de su

importancia se desconoce gran parte de este proceso. La insulina inhibe la actividad eléctrica y la secreción de glucagón en células  $\alpha$  aisladas de rata de forma transitoria, principalmente por una ruta de señalización que desencadena la activación de canales  $K_{ATP}$  y, por lo tanto, hiperpolarización de la membrana (Franklin *et al.*, 2005). En la línea celular In-R1-G9, secretora de glucagón, la insulina es capaz de estimular fosforilación del sustrato-1 del receptor de insulina y activar la enzima fosfatidilinositol-3-quinasa (Kaneko *et al.*, 1999). La activación de esta enzima parece ser la causante de la inhibición de la secreción del glucagón y de la disminución de la expresión del gen, fenómenos observados en dichas células tras incubación en presencia de la hormona. Un estudio reciente observó además activación de receptores  $GABA_A$  por acción de la insulina. Este fenómeno resultó en hiperpolarización de la membrana y supresión de la secreción de glucagón (Xu *et al.*, 2006).

La somatostatina se produce y secreta en diversos tejidos aunque la fuente más importante en el islote es la célula  $\delta$  pancreática. Esta hormona inhibe tanto la secreción de insulina como la de glucagón al interactuar con receptores de membrana específicos. Estudios inmunohistoquímicos en islotes humanos han demostrado que de los cinco receptores de somatostatina caracterizados hasta el momento las células  $\alpha$  presentan el SSTR2, y las células  $\beta$  los receptores SSTR1 y SSTR5 (Kumar *et al.*, 1999). El efecto de la somatostatina sobre la célula  $\alpha$  de ratón se ha estudiado a nivel de la actividad eléctrica observándose que activa canales de  $K^+$  acoplados a proteínas G, induciendo hiperpolarización de la membrana e inhibiendo los potenciales de acción espontáneos, lo cual impide la activación de los canales de  $Ca^{2+}$  que favorecen la entrada de este ión y, por tanto, la exocitosis de los gránulos (Yoshimoto *et al.*, 1999; Gromada *et al.*, 2001b). Por otra parte, también se han realizado estudios de medidas de capacitancia en célula  $\alpha$  de rata, cuyos resultados proponen que los receptores de somatostatina se acoplan a una proteína  $G_{12}$  induciendo la activación de calcineurina y reduciendo la liberación de los gránulos cercanos a los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L (Gromada *et al.*, 2001a). Un tercer mecanismo inhibitorio fue observado en células  $\alpha$  de rata, en donde el efecto de la somatostatina sobre la exocitosis de los gránulos de glucagón podía encontrarse mediado por inhibición de la actividad de AC (Schuit *et al.*, 1989).

La amilina, o polipéptido amiloide pancreático, IAPP, es una hormona peptídica de 37 aminoácidos que se sintetiza y secreta principalmente en células  $\beta$  pancreáticas, aunque también puede ser producida por las células  $\delta$  (Mulder *et al.*, 1993). Este péptido se cosecreta

junto con insulina o somatostatina por exocitosis de los gránulos secretores de las células  $\beta$  y  $\delta$ , y se ha observado presenta una acción inhibitoria tanto sobre los niveles basales de glucagón (Panagiotidis *et al.*, 1992) como sobre los alcanzados tras estimulación de las células  $\alpha$  con L-arginina (Gedulin *et al.*, 1997; Akesson *et al.*, 2003).

La hormona incretina GLP-1 es secretada por las células L del intestino tras la ingesta de alimentos, y estimula la producción de insulina al tiempo que suprime la liberación de glucagón. Podría tratarse de un agente terapéutico en el tratamiento de la diabetes tipo II donde los pacientes muestran deficiencia de insulina e hiperglucagonemia. Sin embargo, la expresión del receptor de GLP-1 en humanos aún no ha sido investigada. Estudios en ratón *in vivo* e *in vitro* han mostrado un potente efecto supresor de GLP-1 sobre la secreción de glucagón en incubaciones estáticas (Gromada *et al.*, 2004) y sobre los niveles hormonales en plasma (Li *et al.*, 2005). Trabajos realizados en rata también le han conferido al GLP-1 un efecto inhibitor de la secreción de glucagón por mecanismos directos al interactuar con receptores específicos, y por otros indirectos a través de estimulación hormonal en células  $\beta$  y  $\delta$ . Sin embargo, en estudios recientes desarrollados en rata, los efectos de GLP-1 sobre la regulación de la secreción en células  $\alpha$  aisladas han resultado estimuladores (Gromada & Rorsman, 2004). Por interacción de GLP-1 con un receptor asociado a proteínas G, la AC se activa induciendo un incremento en los niveles de AMPc. En la célula  $\alpha$ , el AMPc (a través de PKA) interactúa con diversos procesos como la actividad iónica y la exocitosis.

La grelina es un péptido que ha sido descrito recientemente. Los niveles de esta hormona en circulación aparecen aumentados en ayuno y reducidos tras la ingesta de alimentos. Se ha observado que esta hormona potencia la supresión de la secreción de glucagón que induce la glucosa a elevadas concentraciones. Según estudios *in vivo*, la grelina suprime las rutas que implican fosfolipasa C, AMPc y  $\text{Ca}^{2+}$  (Salehi *et al.*, 2004).

Los átomos de  $\text{Zn}^{2+}$  almacenados junto a la insulina en los gránulos de las células  $\beta$  pancreáticas quedan en forma libre en el medio extracelular una vez que se ha producido la exocitosis. Los resultados obtenidos hasta el momento acerca del papel de este metal en la regulación de la liberación de glucagón son un tanto controvertidos. En células  $\alpha$  de islotes de rata se ha observado inhibición sostenida tanto de la actividad eléctrica como de la secreción hormonal en presencia de  $\text{Zn}^{2+}$  (Franklin *et al.*, 2005). Este proceso parece estar mediado por la

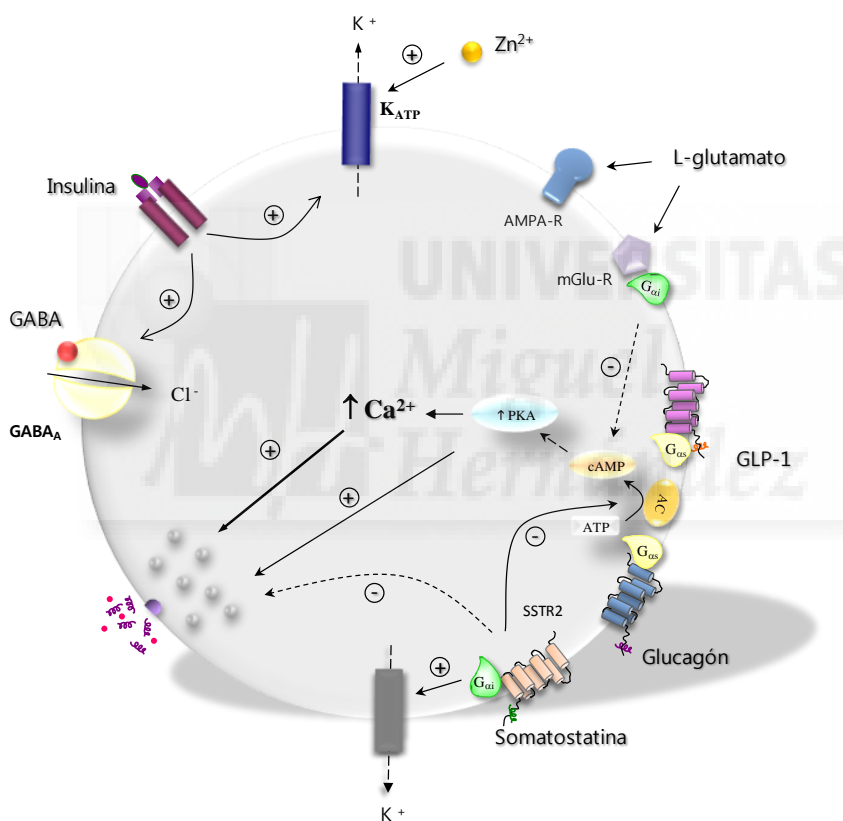
apertura de canales  $K_{ATP}$ , como ocurre en células de insulinoma (Bloc *et al.*, 2000), en vez de deberse al cierre de canales de  $Ca^{2+}$ . En cambio, estudios realizados en ratón, tanto en células  $\alpha$  aisladas como en islotes, concluyen que el  $Zn^{2+}$  no inhibe la secreción de glucagón y que tampoco se produce activación de los canales  $K_{ATP}$  (Ravier & Rutter, 2005).

El ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) se ha considerado una importante molécula de señalización paracrina en los islotes de Langerhans. Se libera mediante exocitosis dependiente de  $Ca^{2+}$  desde las células  $\beta$ , difundiendo por los intersticios del islote y activando tanto los receptores  $GABA_A$  de las células  $\alpha$  vecinas como los  $GABA_B$  de las células  $\beta$  (Brice *et al.*, 2002; Wendt *et al.*, 2004). La activación de estos receptores se encuentra acoplada a la activación de corrientes de entrada de  $Cl^-$ . La apertura de estos canales suprimirá la actividad eléctrica por hiperpolarización de la célula  $\alpha$ , inhibiéndose la liberación del glucagón fuera de la célula.

El L-glutamato, un neurotransmisor del sistema nervioso central, es también almacenado en los gránulos secretores de las células  $\alpha$  a través de transportadores vesiculares de glutamato junto con glucagón y otras moléculas (Hayashi *et al.*, 2003). En condiciones de baja glucosa es co-secretado junto con glucagón, estimulando receptores tipo AMPA y desencadenando selectivamente la secreción de ácido  $\gamma$ -aminobutírico desde células  $\beta$  (Uehara *et al.*, 2004), el cual inhibe la secreción de glucagón como se ha comentado anteriormente. Estas células muestran, además, receptores metabotrópicos funcionales como mGluR-4 (Uehara *et al.*, 2004) y mGluR-8 (Tong *et al.*, 2002). Estos receptores modulan negativamente la liberación del glucagón a través de un sistema AC/AMPC en cuanto que ciertos agonistas de mGlu inhiben la producción de AMPC estimulada por forskolina (Tong *et al.*, 2002). El L-glutamato actúa, por lo tanto, como modulador autocrino/paracrino sobre la población de células  $\alpha$  pancreáticas.

### III. Regulación autocrina

La regulación de la liberación de glucagón por la propia hormona también ha sido objeto de estudio (Ma *et al.*, 2005). Resultados electrofisiológicos basados en medidas de capacitancia confirmaron la existencia de un efecto estimulador de secreción por parte del glucagón sobre las células  $\alpha$ , aparentemente mediado por la ruta PKA (figura 1.10). Comparando ambos modelos animales se observó que la respuesta excitotónica es ligeramente menor en células  $\alpha$  de rata que en las de ratón.



**Figura 1.10** Regulación endocrina, paracrina y autocrina de la secreción de glucagón en célula  $\alpha$  pancreática.

### IV. Regulación autonómica

Los islotes de Langerhans están altamente inervados por nervios simpáticos, parasimpáticos y sensoriales, los cuales almacenan acetilcolina y noradrenalina junto con otros



neuropéptidos que pueden estimular o inhibir la secreción de glucagón en las células  $\alpha$ . Los nervios simpáticos contienen el polipéptido intestinal vasoactivo, el polipéptido activador de la adenilato ciclasa pituitaria y el péptido liberador de gastrina, mientras que los nervios simpáticos acumulan galanina y neuropéptido Y (Ahren, 2000). Diversos estudios han observado una regulación positiva en la función de las células  $\alpha$  por estimulación colinérgica, implicando activación de receptores muscarínicos y movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Ahren & Lundquist, 1982; Berts *et al.*, 1997). Respecto a la rama simpática, la activación de ésta favorece la liberación de adrenalina desde la médula adrenal. Esta hormona es un potente estimulador de la secreción de glucagón: incrementa la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L y acelera la movilización de los gránulos (Gromada *et al.*, 1997).

#### 1.4- Fisiopatología de la célula $\alpha$ y su implicación en la diabetes

La diabetes mellitus es una patología caracterizada, principalmente, por pérdida de funcionalidad de las células  $\beta$  secretoras de insulina o por resistencia a la acción de esta hormona. Sin embargo, la sintomatología de esta enfermedad no surge únicamente por fallos en la síntesis de la insulina o por resistencia a ella. Independientemente de la célula  $\beta$  y la insulina, incrementos absolutos o relativos de glucagón respecto a la insulina pueden tener un papel importante en la patogenia de la diabetes.

La hiperglucagonemia absoluta o relativa con respecto a los niveles de insulina se detecta frecuentemente tanto en la diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) como en la tipo 2 (DMT2). Se han sugerido diversas hipótesis por las que este fenómeno pueda producirse: anormalidades en la respuesta de la célula  $\alpha$  al sistema nervioso autónomo, deficiencia de insulina en los intersticios del islote, resistencia a insulina por parte de la célula  $\alpha$ , o simplemente pérdida de sensibilidad a la glucosa por parte de las células secretoras de glucagón. Sin embargo, los mecanismos implicados en la fisiopatología de las células  $\alpha$  aún no se conocen y requieren ser investigados. Un exceso de glucagón lleva a un aumento de efectos glucogenolíticos y gluconeogénicos, pudiendo favorecer de manera notable la hiperglucemia tan característica que padecen los pacientes diabéticos, empeorando considerablemente el estado en el que se encuentran. La supresión de la secreción de glucagón que promueve la hiperglucemia es una característica bien conocida de la función

normal de la célula  $\alpha$ . Sin embargo, en individuos diabéticos no se reduce la secreción de esta hormona en condiciones hiperglucémicas como sucede en sujetos sanos, son lo cual muchos pacientes presentan niveles normales o elevados de glucagón en plasma (Reaven *et al.*, 1987; Larsson & Ahren, 2000). Este hecho se traduce en un incremento en la producción de glucosa en el hígado, aumentando rápidamente los niveles de ésta en sangre. Como posibles estrategias terapéuticas y experimentales se ha ahondado en el desarrollo de antagonistas específicos del receptor de glucagón (Madsen *et al.*, 1998; Qureshi *et al.*, 2004), en la identificación de anticuerpos monoclonales anti-glucagón (Brand *et al.*, 1994; Sorensen *et al.*, 2006), así como en la producción de oligonucleótidos antisentido para su receptor (Parker *et al.*, 2002; Sloop *et al.*, 2004).

En algunos pacientes diabéticos también se constata una falta de respuesta de las células  $\alpha$  en condiciones hipoglucémicas, lo cual potencia el riesgo de padecer una hipoglucemia severa, especialmente en pacientes tratados con insulina (Cryer, 2002). En algunos pacientes de diabetes mellitus tipo 1 que han sido trasplantados se ha observado que el trasplante de islotes les dota de una independencia larga a la insulina. No obstante, la falta de respuesta de las células  $\alpha$  en condiciones hipoglucémicas persiste tras el trasplante, de forma que este proceso no restablece la fisiología de este tipo celular (Paty *et al.*, 2002). Esta anomalía se ha asociado a fallos en la regulación de la célula  $\alpha$ , pero aún no se conocen los mecanismos involucrados.

Como ya se ha comentado, existe aún mucho desconocimiento acerca de la regulación de las células  $\alpha$  y de la secreción de glucagón. En la presente tesis nos propusimos ahondar en la fisiología de esta célula. Particularmente, en este trabajo no hemos centrado en estudiar el efecto paracrino que el ATP puede ejercer sobre esta población celular tras ser liberado desde los gránulos de insulina o terminales nerviosas, así como el efecto modulador de la leptina, hormona capaz de regular la expresión génica y la secreción de insulina, sobre la célula  $\alpha$  y su secreción hormonal.

---

## 2.- Señalización purinérgica

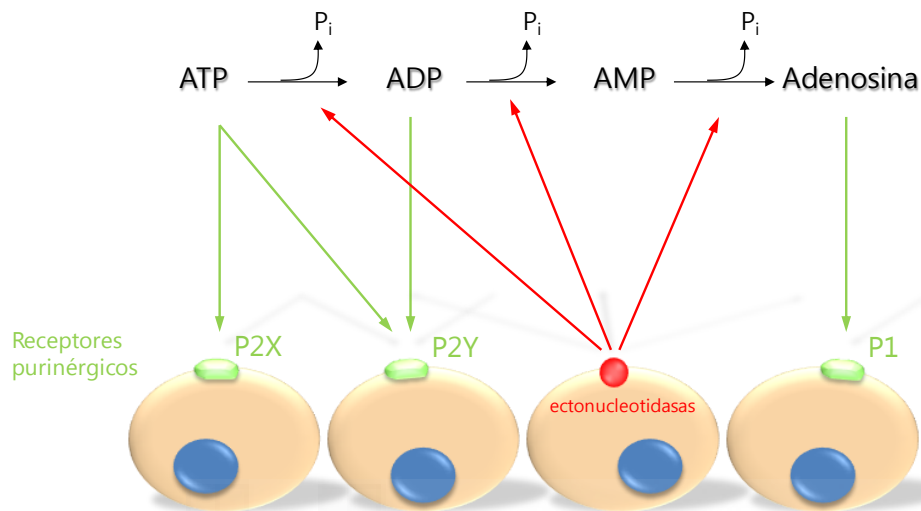
---

### 2.1- ATP y nucleótidos de adenina

El ATP es la principal molécula responsable del almacenamiento y transferencia de energía en el interior celular, de ahí que se le considere como la moneda de intercambio de energía de la célula. Se trata de una molécula del tipo de las purinas, constituida por tres partes químicas diferentes: un anillo de adenina, una ribosa y una cadena de trifosfato. La principal función del ATP es la de capturar la energía libre procedente de los procesos catabólicos para posteriormente cederla a aquellas reacciones que requieren energía. Se produce en su mayor parte por fosforilación oxidativa en las mitocondrias, empleándose principalmente como combustible la glucosa del medio extracelular. La síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato resulta del acoplamiento quimiosmótico con el transporte electrónico. La sucesiva transferencia de electrones entre los componentes de las cadenas se acopla a la generación de un potencial protónico a través de la membrana donde se ubican. En la misma, una ATP sintasa emplea dicho potencial protónico como combustible para la síntesis de ATP.

Sin embargo, al margen del papel energético, el ATP también actúa como mensajero. El citoplasma contiene ATP en una concentración alrededor de 5 mM, aunque la concentración de nucleótidos que se alcanza en las vesículas secretoras de neuronas es mucho mayor (hasta 1000 mM) (Burnstock, 2006). Estimulación de la exocitosis conduce a la liberación del ATP desde el lumen de la vesícula al espacio sináptico junto con acetilcolina, noradrenalina y otros transmisores, como VIP y/o neuropéptido Y. Existen evidencias suficientes para afirmar que el ATP actúa como un neurotransmisor excitador en la periferia y en algunas áreas del sistema nervioso central, como son las neuronas del asta dorsal y algunas neuronas del hipocampo. Pero, además de en el SN, el ATP se acumula en los gránulos de múltiples células secretoras (células  $\beta$ , mastocitos, etc.) y se libera al espacio extracelular tras la exocitosis de éstos, donde actúa como mensajero auto/paracrino. En los gránulos de insulina de las células  $\beta$  el ATP se encuentra almacenado a elevadas concentraciones (1-3 mM), y en las vesículas sinápticas que inervan el islote alcanza concentraciones superiores a 10 mM. Una vez que es librado al espacio extracelular puede alcanzar concentraciones en torno a 25  $\mu$ M en las inmediaciones de los islotes de Langerhans (Hazama *et al.*, 1998). Ya en el espacio extracelular, y por acción de

las ectonucleotidasas presentes en la superficie de las células, el ATP es rápidamente hidrolizado obteniéndose ADP, AMP y adenosina como productos de dicha hidrólisis. Se ha demostrado que tanto el ATP como el ADP y la adenosina actúan sobre receptores purinérgicos, no así el AMP (Ralevic & Burnstock, 1998).



**Figura 2.1** Esquema general de los receptores purinérgicos, diana de los nucleótidos de adenina.

## 2.2- Receptores purinérgicos

Las purinas extracelulares (adenosina, ADP y ATP) y pirimidinas (UDP y UTP) son moléculas de señalización de gran importancia que median diversos efectos biológicos a través de los receptores purinérgicos. Entre estos eventos destacan: contracción del músculo liso, neurotransmisión, secreción endocrina y exocrina, respuesta inmune, inflamación, etc. Los receptores purinérgicos se clasifican principalmente en dos familias: los receptores P1 (receptores de adenosina) y los receptores P2 (receptores que reconocen especialmente ATP, ADP, UTP y UDP). Debido a diferencias en la estructura molecular y en los mecanismos de transducción de señales este último grupo de receptores se divide, a su vez, en dos familias: los receptores ionotrópicos P2X y los receptores metabotrópicos P2Y; habiéndose caracterizado hasta el momento 7 subtipos de los P2X y 11 de los P2Y.

De la familia de receptores metabotrópicos P1, receptores de adenosina, se han identificado 4 miembros,  $A_{1}$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  y  $A_{3}$ , en base a estudios bioquímicos, moleculares y

farmacológicos. Se trata de receptores acoplados a proteínas G que se activan por adenosina y se inhiben por acción de metilxantinas. El receptor  $A_1$  se encuentra ampliamente distribuido en muchas especies y en un elevado número de tejidos, lo que le permite mediar gran diversidad de procesos biológicos. Muchas de las respuestas fisiológicas son resultado del acoplamiento a distintas proteínas G dentro de la familia de las  $G_{i/o}$ . La ruta de señalización más extensamente reconocida de este receptor es la inhibición de la AC, lo cual produce una disminución del segundo mensajero AMPc. Otro mecanismo de señalización que se promueve es la activación de la PLC, estimulándose la generación de IP3 y la movilización de  $Ca^{2+}$ . El receptor  $A_{2A}$ , por el contrario, se encuentra acoplado a proteínas  $G_s$ , por lo que su activación genera un incremento de AMPc a través de la AC. Estos receptores cuentan con una distribución variada pero restringida que incluye tejidos inmunes, plaquetas, SNC, músculo liso vascular y endotelio. El  $A_{2B}$  está acoplado a diferentes vías de señalización; por una parte promueve la activación de la AC, y por otra la vía de la PLC, generando IP3 y aumentos de  $Ca^{2+}$  intracelular. Aunque se encuentra en prácticamente todas las células de muchas especies, el número de receptores es bajo y se necesitan elevadas concentraciones de adenosina para que se produzca una respuesta. El subtipo  $A_3$  es probablemente el más enigmático de entre los receptores de adenosina ya que, en muchos casos, presenta doble naturaleza en condiciones fisiopatológicas. Su distribución es extensa en varias especies aunque existen diferencias en los niveles de expresión. Las rutas de señalización clásicas que han sido asociadas a receptores  $A_3$  son la inhibición de AC por acoplamiento a proteínas  $G_i$ , y la estimulación de PLC, IP3 y  $Ca^{2+}$  vía proteínas  $G_q$ . Al margen de estas vías clásicas se han descrito otras rutas asociadas a la activación de estos receptores (Ralevic & Burnstock, 1998).

Los receptores P2X, canales iónicos activados por unión a ATP, tienen una permeabilidad a iones ( $Na^+$ ,  $K^+$  y  $Ca^{2+}$ ) rápida y no selectiva a través de la membrana, que resulta en incremento de  $[Ca^{2+}]_i$  y en despolarización de la membrana. Su distribución principal tiene lugar en células excitables como células de músculo liso, neuronas y células glía. El flujo directo de  $Ca^{2+}$  a través del canal constituye la primera fuente de  $Ca^{2+}$  responsable del aumento de la concentración de este ión en el citosol. Además, en muchos casos esta entrada de  $Ca^{2+}$  produce una despolarización de la membrana que conduce a la activación de canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje, cuya apertura permite la entrada de  $Ca^{2+}$  desde el medio extracelular, potenciándose así al aumento de  $[Ca^{2+}]_i$  (Ralevic & Burnstock, 1998). Este grupo de

canales se clasifica a su vez en tres subgrupos atendiendo a la sensibilidad que presentan a los agonistas. Así, el subgrupo 1 incluye los receptores P2X<sub>1</sub> y P2X<sub>3</sub>, lo cuales presentan una elevada afinidad por el ATP ( $EC_{50} = 1 \mu\text{M}$ ) y son rápidamente activados y desensibilizados. En el subgrupo 2 se encuentran los receptores P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>5</sub> y P2X<sub>6</sub>, con menos afinidad por el ATP ( $EC_{50} = 10 \mu\text{M}$ ). Estos receptores muestran una corriente lenta de desensibilización y despolarización sostenida. Finalmente el subgrupo 3 está constituido tan sólo por el receptor P2X<sub>7</sub>, el cual tiene muy poca afinidad por el ATP ( $EC_{50} = 300\text{-}400 \mu\text{M}$ ), apenas muestra desensibilización y, además de funcionar como un canal iónico dependiente de ATP, también actúa como poro iónico no selectivo (Williams & Jarvis, 2000). La mayoría de los subtipos presentan extensas distribuciones y muchos tejidos expresan más de un subtipo distinto de receptor P2X.

Los receptores P2Y pueden ser activados por una amplia variedad de nucleótidos y de productos de la degradación de éstos. Se encuentran altamente distribuidos en cerebro y en todos los tejidos del organismo de los mamíferos. La mayoría de ellos activan PLC, lo que conduce a la formación de IP<sub>3</sub> y a la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Se ha descrito que algunos de estos receptores aparecen acoplados a AC y a la producción de AMPc. El tiempo de respuesta de los receptores P2Y es más largo que el de las rápidas respuestas de los P2X; este fenómeno se debe a que los receptores P2Y median la señal a través de sistemas de segundos mensajeros y/o conductancias iónicas mediadas por proteínas G (Ralevic & Burnstock, 1998). Se ha descrito además que la función de receptores P2Y es sensible a voltaje (Martinez-Pinna *et al.*, 2004) y es capaz de modular la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por la activación de estos receptores.

Receptor	Agonista	Sistema principal de transducción de señales
P2X <sub>1</sub>	BzATP >> 2-MeSATP > ATP	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup>
P2X <sub>2</sub>	2-MeSATP > ATP > α,β-MeATP	Ca <sup>2+</sup>
P2X <sub>3</sub>	BzATP > 2-MeSATP > ATP	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup>
P2X <sub>4</sub>	ATP > 2-MeSATP >> α,β-MeATP	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup>
P2X <sub>5</sub>	ATP > 2-MeSATP > ADP	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup>
P2X <sub>6</sub>	ATP > 2-MeSATP > ADP	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup>
P2X <sub>7</sub>	BzATP >> ATP <sup>4-</sup>	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> formación poro
P2Y <sub>1</sub>	2-MeSATP = ADPβS > ATP > ADP	PLCβ/IP <sub>3</sub> Ca <sup>2+</sup>
P2Y <sub>2</sub>	4-thioUTP > UTP > ATP = ADP	PLCβ/IP <sub>3</sub> Ca <sup>2+</sup>
P2Y <sub>4</sub>	UTP = UDP > ATP = ADP	PLCβ/IP <sub>3</sub> Ca <sup>2+</sup>
P2Y <sub>6</sub>	UTP > ADP = 2-MeSATP > ATP	PLCβ/IP <sub>3</sub> Ca <sup>2+</sup>
P2Y <sub>11</sub>	ATP > 2-MeSATP > ADP	PLCβ/IP <sub>3</sub> Ca <sup>2+</sup> AC
P2Y <sub>12</sub>	2-MeSADP ≥ ADP >> ATP	Inhibición AC
P2Y <sub>13</sub>	ADP - 2-MeSADP >> ATP = 2-MeSATP	Inhibición AC
P2Y <sub>14</sub>	UDP-glucosa - UDP-galactosa	PLCβ/IP <sub>3</sub> Ca <sup>2+</sup>
A <sub>1</sub>	CCPA > CPA	↓ cAMP ↑ IP <sub>3</sub>
A <sub>2A</sub>	CGS 21680C > NECA	↑ cAMP
A <sub>2B</sub>	NECA	↑ cAMP
A <sub>3</sub>	CI-IB-MECA > IB-MECA	↓ cAMP ↑ IP <sub>3</sub>

**Tabla 2.2** Subtipos de receptores purinérgicos, orden de especificidad de sus agonistas naturales y/o sintéticos, y principales sistemas de transducción de señales. Modificada de (Fields & Burnstock, 2006).

## 3.- Leptina: hormona de la saciedad

---

### 3.1- La leptina

Durante las últimas décadas se ha mantenido un debate considerable acerca de cómo el SNC es capaz de mantener la homeostasis energética del organismo, proceso que requiere de la activación de una red compleja de sistemas fisiológicos para regular el aporte, el gasto y el almacenamiento de las reservas energéticas. Emergieron dos posiciones filosóficas principales que desde su origen han competido por ser la principal línea de investigación. Una de ellas se basó en la hipótesis de que el hipotálamo controla la reserva y el metabolismo de grasas (teoría lipostática), mientras que la otra se centró en la hipótesis de que el hipotálamo registra el almacenamiento y gasto de carbohidratos (teoría glucoestática).

A principios de los años cincuenta Kennedy postuló la teoría lipostática donde defendía la existencia de una señal, producida en los depósitos de grasa, que al ser procesada en el hipotálamo regularía la ingesta de alimentos de forma que los depósitos de grasa corporal pudieran permanecer constantes (Kennedy, 1953). A finales de aquella década Hervey realizó experimentos de parabiosis (puesta en contacto de los sistemas capilares de dos animales mediante cirugía), entre ratas obesas por lesión hipotalámica y ratas sanas, y observó que este procedimiento conllevaba la muerte del animal sano por caquexia (Hervey, 1959). Hervey creía que el animal obeso producía un factor anorexigénico al que el animal no era sensible debido a su lesión en el hipotálamo. En 1973, Coleman puso de relieve la existencia de un factor saciante tras llevar a cabo estudios parabióticos semejantes a los de Hervey entre ratones normales y ratones diabéticos y obesos (Coleman, 1973). La parabiosis entre un ratón *ob/ob* (carente de leptina activa) y un ratón normal reducía la ingesta y el peso corporal del obeso. No obstante, en el caso de un ratón *db/db* (carente del receptor de leptina ObRb), su parabiosis con un ratón normal no afectaba al primero de ellos pero producía anorexia en el ratón normal. No fue hasta 1994 cuando estos trabajos encontraron una confirmación evidente al descubrirse aquella hormona adipostática con poder saciante: la leptina.

La leptina adquirió su nombre del griego *leptos*, que significa delgado, y su descubrimiento fue llevado a cabo por el grupo del Dr. Friedman (Zhang *et al.*, 1994). Se trata



de un péptido que consta de 167 aminoácidos, y presenta una secuencia señal de 21 aminoácidos que se escinde antes de que la hormona pase al torrente circulatorio. La proteína madura, de 146 aminoácidos y bajo peso molecular (16 KDa), muestra una estructura terciaria similar a la de las citoquinas clásicas de hélice larga. Contiene dos residuos de cisteína, Cys 96 y Cys 146, que forman un puente disulfuro entre el extremo carboxilo terminal de la proteína y el principio del *loop* CD (Zhang *et al.*, 1997). Esta unión disulfuro intercadena parece ser necesaria para que la leptina desarrolle su actividad biológica ya que mutaciones en cualquiera de dichos residuos de cisteína convierten a la proteína en biológicamente inactiva (Zhang *et al.*, 1997). La secuencia aminoacídica presenta muy pocas diferencias entre distintas especies: la leptina humana es un 84 % idéntica a la proteína de ratón (Zhang *et al.*, 1994), y presenta un 83 % de homología con la leptina de rata (Ogawa *et al.*, 1995).

El gen que codifica para la leptina es el gen *ob*, consta de tres exones separados por dos intrones, donde la región codificadora se encuentra contenida en los exones 2 y 3 (Isse *et al.*, 1995). Los ratones *ob/ob* muestran una mutación homocigótica en este gen y manifiestan hiperfagia, obesidad, hiperinsulinemia e hiperglucemia, convirtiéndose en excelentes candidatos para estudios de obesidad y de diabetes. La mutación *ob* es una sustitución sencilla de una base (C428T) que resulta en terminación prematura de la síntesis de la proteína en el codón 105, por lo que los ratones *ob/ob* producen una leptina que es biológicamente inactiva (Zhang *et al.*, 1994).

La leptina es producida y secretada al torrente sanguíneo principalmente por el tejido adiposo blanco. Su concentración en plasma está directamente relacionada con el tamaño de las reservas de este tejido (MacDougald *et al.*, 1995), y es mayor en mujeres que en hombres. Este hecho no sólo sucede por la distinta distribución de la masa adiposa en estos géneros, sino también porque la testosterona reduce los niveles de leptina (Luukkaa *et al.*, 1998) mientras que el estradiol los incrementa (Casabiell *et al.*, 1998). En ciertas circunstancias también se ha observado síntesis de pequeñas cantidades de leptina en tejido adiposo marrón (Maffei *et al.*, 1995), placenta (Senaris *et al.*, 1997), epitelio gástrico (Bado *et al.*, 1998), médula ósea (Laharrague *et al.*, 1998), epitelio mamario (Smith-Kirwin *et al.*, 1998), músculo esquelético (Wang *et al.*, 1998), hipotálamo, pituitaria (Morash *et al.*, 1999), islotes pancreáticos (Vickers *et al.*, 2001; Reddy *et al.*, 2004) y hueso (Morrioni *et al.*, 2004).

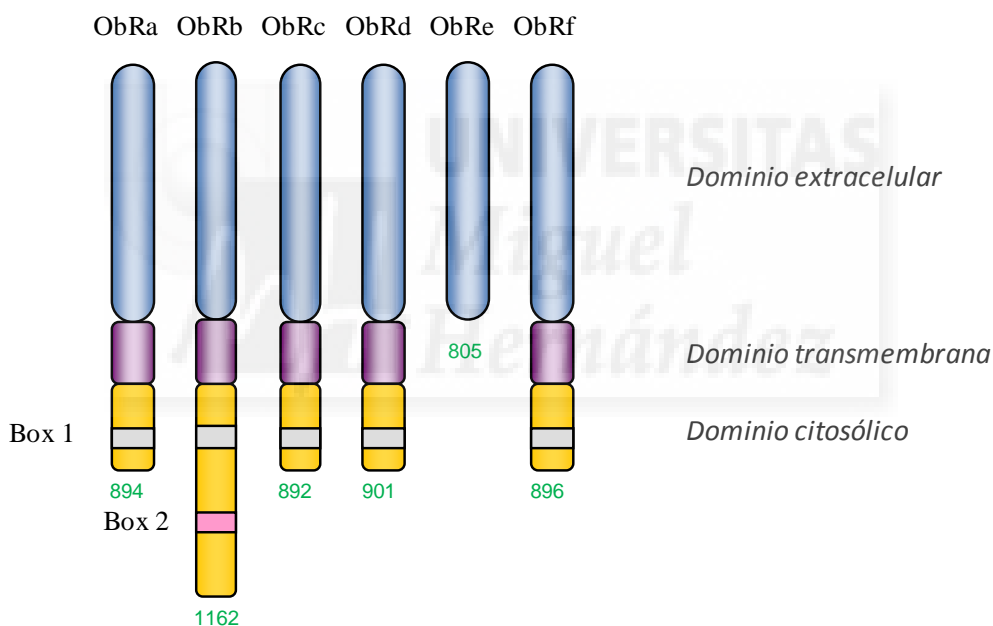
La secreción de leptina presenta un ritmo circadiano, alcanzando el valor máximo durante la noche (Licinio *et al.*, 1997), hecho que podría estar favoreciendo la supresión del apetito durante las horas de sueño (Sinha *et al.*, 1996a). La secreción es pulsátil, con una frecuencia aproximada de un pulso cada 45 minutos (Licinio *et al.*, 1997) y resulta modulada por la insulina, glucocorticoides, catecolaminas y otras hormonas.

Una vez en sangre, esta hormona circula libre o unida de manera específica y reversible a proteínas plasmáticas, lo cual podría modular su aclaramiento y/o bioactividad. En individuos delgados la leptina circula principalmente en la forma unida, predominando la libre en sujetos obesos (Sinha *et al.*, 1996b). Los niveles séricos de leptina en personas con normopeso oscilan en el rango de 1-10 ng/mL, y en individuos obesos pueden alcanzar valores de 30-100 ng/mL (Considine *et al.*, 1996; Sinha *et al.*, 1996b). El aclaramiento de la leptina se produce en gran parte a nivel renal. Se trata de un proceso rápido, con una vida media de unos 25 minutos en humanos (Klein S, 1996) y de 1h a 3h en ratón (Ahima *et al.*, 1996). Este tipo de eliminación lleva a pensar que existe una secreción continuada de proteína *ob* por las células adiposas.

### 3.2- El receptor de leptina

El receptor de leptina (ObR) fue identificado y clonado por Tartaglia *et al.* poco después del descubrimiento de su ligando natural (Tartaglia *et al.*, 1995). Este receptor está codificado por el gen *db* (Chen *et al.*, 1996) y presenta homología con la familia de receptores de citoquinas de clase I, los cuales se caracterizan por carecer de actividad enzimática intrínseca y por necesitar de la asociación de otras quinasas para activar la transducción de señales (White & Tartaglia, 1999). El ARNm del ObR codifica para 6 isoformas del receptor, constituidas todas ellas por un dominio extracelular idéntico de 816 aminoácidos en el residuo aminoacídico terminal mientras que difieren en el terminal carboxilo. Las isoformas ObRa, ObRb, ObRc, ObRd y ObRf contienen idénticos dominios transmembrana de 34 aminoácidos, mientras que la isoforma ObRe carece de dominios transmembrana y citoplásmico, y circula como un receptor soluble, pudiendo actuar como proteína de unión de la leptina circulante (Lollmann *et al.*, 1997) (figura 3.1). ObRb es la única forma larga del receptor de leptina, con un dominio intracelular de 302 residuos y los motivos necesarios para la activación de señales

intracelulares, principalmente la ruta JAK/STAT. Los motivos Box1 y Box2 son conocidos por reclutar y unir JAKs. Box1 y los aminoácidos 31-36 del dominio intracelular resultan ser indispensables para esta interacción, y los aminoácidos 37-48 para incrementar la señal. Todas las isoformas ObR contienen Box1 en el dominio intracelular, mientras que la isoforma ObRb también incluye el motivo Box2 y los sitios de unión a STAT. Esta isoforma larga se expresa principalmente en el hipotálamo, aunque también está presente en pequeñas proporciones en tejidos periféricos como músculo esquelético, adipocitos, hígado e islote pancreático (Ghilardi *et al.*, 1996; Kieffer *et al.*, 1996; De Matteis *et al.*, 1998; Burguera *et al.*, 2000). Las formas cortas del receptor presentan dominios citoplásmicos de longitud variable entre 32 y 94 aminoácidos y se localizan mayoritariamente en el plexo coroideo, endotelio vascular, riñón, hígado, pulmón y gónadas (Hoggard *et al.*, 1997; De Matteis *et al.*, 1998).



**Figura 3.1** Isoformas del receptor de leptina ObR. El número total de residuos de aminoácidos está indicado en la parte inferior del esquema correspondiente a cada subtipo.

La secuenciación del gen *db* en ratones normales y en ratones *db/db* reveló que estos últimos presentaban una mutación en el mismo. La mutación consiste en la sustitución de un nucleótido (G → T) que lleva a la inserción de un codón stop prematuro en el extremo 3' del ARNm de ObRb, resultando en la síntesis de una proteína en la que la mayoría del dominio intracelular está truncado y es idéntica a la principal isoforma corta: ObRa (Chen *et al.*, 1996;

Lee *et al.*, 1996). Como cabe esperar al no presentar receptor funcional, los ratones *db/db* son hiperfágicos, desarrollan obesidad mórbida, son diabéticos, muestran altos niveles de glucocorticoides e intolerancia al frío, son sexualmente inmaduros y no responden a tratamientos con leptina.

En ratas también se han observado mutaciones en el gen *db*, siendo el caso más conocido el de las ratas Zucker fatty (*fa/fa*). Esta mutación sucede por sustitución de una Gln por una Pro en la posición aminoacídica 269 del dominio extracelular. El resultado es una reducción drástica en la expresión de ObR en la superficie celular, así como un notable descenso en la unión de la leptina a su receptor. Aunque estos animales comparten algunos de los síntomas que presentan los ratones *db/db*, sí son capaces de responder a elevadas dosis de leptina administrada por inyección intracerebroventricular; resultado consistente con una función parcial del receptor (Chua *et al.*, 1996).

### 3.3- Principales vías de señalización intracelular activadas por leptina

La homología entre el receptor ObR y los receptores de citoquinas de clase I sugirió la posibilidad de que la interacción de la leptina con su receptor pudiera mediar señales similares a las producidas por las citoquinas, incluyendo la activación de JAKs (Janus Kinases) y STATs (transductores de señales y activadores de transcripción). Diversos estudios han demostrado que la única isoforma que contiene los motivos intracelulares necesarios para la activación de la ruta JAK/STAT es la isoforma larga, la ObRb. Todas las isoformas presentan habilidad para formar homodímeros en ausencia de ligando. Dado que esta asociación no sufre un cambio significativo tras la unión a leptina, no se considera clave en la activación del receptor. No obstante, una vez que la leptina se ha unido a su receptor se forman complejos tetraméricos receptor-ligando. El cambio conformacional que se produce en la estructura del receptor es entonces crítico para su activación.

#### **Cascada de transducción de señales JAK/STAT**

La ruta JAK/STAT comprende 4 tirosinas quinasas (JAKs) y 7 factores de transcripción (STATs), que están regulados por fosforilación en residuos específicos de serina y tirosina. El receptor ObR no presenta dominio intrínseco tirosina quinasa por lo que se une a quinasas

citoplásmicas, principalmente JAK2. La activación de JAK2 autofosforila numerosas tirosinas al tiempo que fosforila residuos de tirosina del receptor funcional de leptina. Tras unión del ligando se produce fosforilación del dominio intracelular del receptor, hecho que proporciona un sitio de unión para proteínas STAT; éstas se activan, se traslocan al núcleo y estimulan la transcripción. La activación de la unión ligando-receptor en el caso del ObR parece implicar STAT3, STAT5 y STAT6, pero no otros STATs (Ghilardi *et al.*, 1996).

Con el fin de determinar el papel de los tres residuos intracelulares de tirosina (Tyr<sup>985</sup>, Tyr<sup>1077</sup> y Tyr<sup>1138</sup>), se crearon construcciones para reemplazar cada uno de ellos de manera independiente o en combinación. De esta forma se observó que cada uno de estos residuos exhibe diferentes capacidades de señalización. Así, la Tyr<sup>985</sup> es necesaria para la activación de la vía Ras/Raf/ERK, Tyr<sup>1077</sup> y Tyr<sup>1138</sup> para fosforilar STAT5, y Tyr<sup>1077</sup> para la activación de STAT1 y STAT3 (Hekerman *et al.*, 2005). Los resultados de diversas investigaciones han sugerido que el balance energético se encuentra mediado por STAT3, mientras que el control de la expresión de Neuropeptido Y, de la glucemia y de la reproducción se logran por vías independientes de STAT3 (Bates *et al.*, 2003; Bates & Myers, 2004).

### **Cascada de transducción de señales MAPK**

Los miembros ERK de la familia MAPK son componentes bien definidos de la cascada de señalización Ras/Raf/MAPK, y se activan por un amplio rango de estímulos incluyendo la leptina. La activación de los receptores ObRa y de ObRb puede estimular esta vía, aunque en menor medida por la isoforma corta (Bjorbaek *et al.*, 1997). A pesar de que no se conoce en detalle qué moléculas están implicadas en la transmisión de la señal inducida por leptina, sí se sabe que MEKs (MAPK/ERK quinasas) activadas fosforilan ERKs, conduciendo finalmente a la expresión de genes diana específicos como *c-fos* y *egr-1* (Bjorbak *et al.*, 2001), los cuales participan en proliferación y diferenciación.

### **Cascada de transducción de señales PI3K/PDE3B/AMPC**

La actividad de PI3K puede ser regulada por un amplio espectro de ligandos, destacando la insulina entre ellos. De hecho, muchas de las acciones dependientes de insulina requieren de la activación de PI3K. La activación de ObRb regula muchas dianas conocidas de

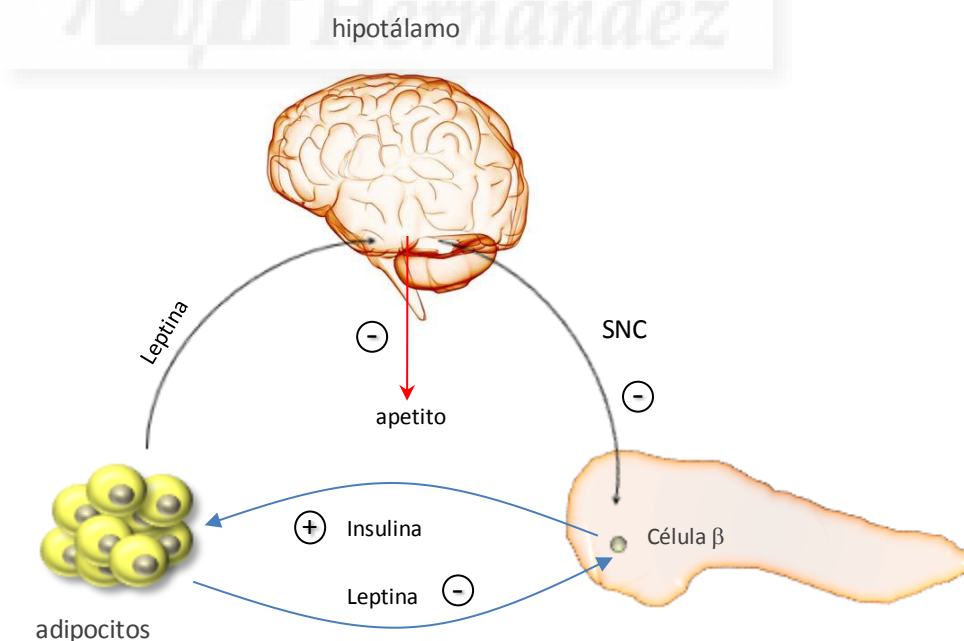
la insulina, como IRS-1, MAP quinasa, ERK, Akt, AMP quinasa y PI3K, convirtiéndose ésta última en un punto clave de intercomunicación entre las vías de señalización de insulina y leptina. En el SNC, así como en tejido adiposo, hígado y páncreas, se ha demostrado que la leptina induce rutas de señalización, implicando la activación de PDE3B dependiente de PI3K y reducción de AMPc (Zhao *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 2000). Aunque la contribución exacta en la señalización por estimulación de PI3K inducida por leptina o por insulina resulta difícil de precisar, varios estudios indican que la existencia de una interacción entre la vía PI3K/PDE3B/AMPc y la cascada JAK2/STAT3 es crítica para la señalización de leptina en el hipotálamo (Sahu, 2003). No obstante, recientemente se ha demostrado en neuronas y células  $\beta$  que la insulina y la leptina pueden inducir cascadas diferentes tras la activación de PI3K (Ning *et al.*, 2006).

### 3.4- Efectos fisiológicos de la leptina

La leptina acaparó mucha atención tras su descubrimiento, indudablemente debido a su papel crucial en la regulación del balance energético. Hay evidencias suficientes para considerar primordial su acción como factor saciante. En ratones *ob/ob*, deficientes de leptina, la administración central y periférica de esta hormona produce pérdida del apetito con notable disminución del peso corporal, principalmente por reducción del depósito graso (Halaas JL, 1995). En base a un gran número de evidencias se ha sugerido que el efecto de la leptina sobre el control del apetito está mediado a través de neuropéptidos de acción orexigénica y/o anorexigénica, siendo imprescindible la activación de STAT3 por interacción de la leptina con su receptor. El receptor ObRb se encuentra localizado en múltiples partes del hipotálamo, incluyendo neuronas del núcleo arqueado y de otros núcleos hipotalámicos como el paraventricular, el ventromedial y el lateral (Friedman & Halaas, 1998). Han sido de gran interés las acciones opuestas de la leptina en dos poblaciones de neuronas arqueadas. En una de estas poblaciones se sintetizan neuropéptido Y y AgRP (péptido relacionado Agouti), péptidos que promueven el apetito. La otra se encarga de producir POMC (Pro-opiomelanocortina), precursor de un péptido que suprime el deseo de comer. Al tiempo que la leptina estimula las neuronas productoras de POMC, inhibe las de neuropéptido Y y AgRP (Schwartz *et al.*, 2000). Se ha observado que la disrupción específica neural de STAT3 resulta en hiperfagia, obesidad, diabetes e infertilidad (Gao *et al.*, 2004), y que ratones con disrupción de STAT3

específicamente en neuronas que expresan receptor de leptina desarrollan obesidad profunda (Piper *et al.*, 2008).

Al margen de las acciones de la leptina en el SNC, se han descrito numerosos efectos periféricos. La propuesta de la existencia de un eje adipoinsular entre tejido adiposo y páncreas endocrino surgió a partir de estudios realizados durante décadas en ratones tanto diabéticos como obesos: los modelos *ob/ob* y *db/db*. Un fenómeno que destacaba en ambos casos era que la hiperinsulinemia precedía al desarrollo de la obesidad y a la resistencia a la insulina. Si en ausencia de leptina funcional había elevados niveles de insulina, esto sugería que en circunstancias normales la secreción de esta hormona se encontrase regulada por la leptina. Por otra parte, la participación de la insulina en esta hipótesis se completaba al tratarse de una hormona adipogénica. Así, al aumentar las reservas de grasa, los niveles de leptina se incrementaban, reduciendo los de insulina y, consecuentemente, disminuyendo la lipogénesis (figura 3.2). En el caso de una reducción en las reservas adiposas, el descenso en los niveles de leptina plasmática favorecería un aumento en la producción de insulina y, por lo tanto, se potenciaría la formación de grasa adicional en las reservas (Kieffer *et al.*, 1997; Kieffer & Habener, 2000; Covey *et al.*, 2006).



**Figura 3.2** Eje adipoinsular. Modificada de (Kieffer & Habener, 2000).

Muchos han sido los trabajos enfocados al estudio del efecto de cualquiera de estas dos hormonas sobre la otra, principalmente a nivel de expresión génica y de secreción. La administración de leptina inyectada, o la terapia génica, reducen los niveles de insulina en sangre en ratones *ob/ob* según han demostrado varios estudios (Muzzin *et al.*, 1996; Fei *et al.*, 1997; Seufert *et al.*, 1999a; Dhillon *et al.*, 2001). Los resultados obtenidos han demostrado que la leptina inhibe la secreción y la expresión de insulina por acción directa en las células  $\beta$ . El efecto que la leptina ejerce sobre la secreción de insulina parece que podría deberse a que la leptina activa la fosfodiesterasa 3B (Zhao *et al.*, 1998). Consecuentemente se produce una disminución en los niveles de AMPc. Por otro lado, múltiples estudios han demostrado que la leptina activa los canales  $K_{ATP}$ , lo cual hiperpolariza la membrana, inactivando los canales de  $Ca^{2+}$  y los incrementos de  $Ca^{2+}$  citosólico que llevan a la secreción de insulina en condiciones de elevada glucosa (Kieffer *et al.*, 1997; Kieffer & Habener, 2000). En cuanto a su papel sobre la expresión del gen de insulina, parece que el mecanismo responsable es la activación de la ruta de señalización JAK/STAT por interacción directa de la leptina con su receptor (Morton *et al.*, 1999). Por otra parte, la insulina secretada desde el islote incrementa la expresión del gen de leptina en el tejido adiposo y su secreción (Seufert, 2004). En la estimulación de la secreción de leptina por insulina, la activación de la PDE3 representa un paso metabólico importante. La secreción de leptina inducida por insulina puede inhibirse por agentes que aumenten los niveles de AMPc al potenciar su producción a través de la AC, al inhibir su degradación por fosfodiesterasas, o imitando su acción (Cammisotto & Bukowiecki, 2002). En diversos trabajos se ha propuesto que alteraciones en la comunicación entre el tejido adiposo y el páncreas endocrino podrían favorecer el desarrollo de diabetes en individuos obesos (Seufert *et al.*, 1999b; Covey *et al.*, 2006; Morioka *et al.*, 2007).

La leptina ejerce además otras funciones en el organismo. La administración de leptina a ratonas *ob/ob* favorece la recuperación de la fertilidad (Barash *et al.*, 1996) y acelera el proceso del desarrollo puberal (Chehab *et al.*, 1997). Esta hormona estimula la absorción de carbohidratos en el intestino delgado (Pearson *et al.*, 2001), la lipólisis en adipocitos y la expresión de UCPs (Tajima *et al.*, 2005), la actividad fagocítica de los macrófagos y la proliferación de linfocitos T y monocitos (Lord *et al.*, 1998), entre otras acciones.





Objetivos

---

Objetivos



El control de la homeostasis de la glucosa requiere una correcta coordinación de la función y secreción de las células pancreáticas  $\alpha$  y  $\beta$ , productoras y secretoras de glucagón e insulina, respectivamente. Si bien existe una abrumadora información sobre el funcionamiento de la célula  $\beta$ , se conoce poco acerca de la fisiología de la célula  $\alpha$  sobre la secreción de glucagón. Fallos en este sistema pueden conducir a la aparición de patologías como la diabetes mellitus, producida principalmente por un mal funcionamiento de las células  $\beta$  o por resistencia a la insulina. No obstante, se han demostrado alteraciones en el funcionamiento de la célula  $\alpha$  y en la secreción de glucagón en pacientes diabéticos que pueden agravar la falta de control de la glucosa en sangre en estos individuos. Es, por lo tanto, de gran importancia profundizar en el conocimiento de la fisiología de la célula  $\alpha$  pancreática, así como en su regulación.

En esta tesis hemos abordado dos aspectos significativos en la regulación de la célula  $\alpha$ . En primer lugar, dada la importancia de los factores paracrinos procedentes de la célula  $\beta$  en la regulación de la célula  $\alpha$ , hemos analizado el papel del ATP como mensajero extracelular. En segundo lugar, puesto que el tejido adiposo puede regular la función de la célula  $\beta$  a través de la leptina, hemos evaluado la función de esta hormona en la célula  $\alpha$ .

Por lo tanto, los principales objetivos de la presente tesis son estudiar el efecto del ATP extracelular y el de la leptina circulante sobre la regulación de la célula  $\alpha$  pancreática. Para ello, el trabajo se desarrollará atendiendo a los siguientes objetivos específicos:

- 1.- Identificar subtipos de receptores purinérgicos presentes en células  $\alpha$ , estudiar el efecto del ATP y de los derivados de su hidrólisis sobre la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular al interactuar con sus receptores, y cuantificar el efecto que la señalización purinérgica produce sobre la secreción de glucagón.
- 2.- Estudiar qué isoformas del receptor de leptina se expresan en las células  $\alpha$  y analizar el efecto de la leptina sobre la actividad eléctrica y la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, así como averiguar qué efecto regulador presenta en la secreción de glucagón.





Resultados

---

Resultados



## **1.- Inhibición de la señal de Ca<sup>2+</sup> y de la secreción de glucagón en célula $\alpha$ pancreática mediada por ATP extracelular y receptores purinérgicos.**

### **ANEXO I**

"Inhibition of Ca<sup>2+</sup> signaling and glucagon secretion in mouse pancreatic  $\alpha$ -cells by extracellular ATP and purinergic receptors".

Eva Tudurí, Eliane Filiputti, Everardo M. Carneiro and Ivan Quesada. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294: E952-E960, 2008.

Debido a la arquitectura celular del islote de Langerhans y a su sistema de vascularización los distintos tipos celulares que lo componen se encuentran altamente expuestos a mecanismos de regulación paracrinosa. Además del efecto inhibitorio que las hormonas insulina y somatostatina ejercen sobre la actividad secretora de las células  $\alpha$ , otras moléculas contenidas en los gránulos de células  $\beta$  y  $\delta$  también participan en la regulación de la secreción de glucagón, como es el caso del Zn<sup>2+</sup>, el ácido  $\gamma$ -aminobutírico, el L-glutamato y la amilina.

El ATP se encuentra altamente almacenado en los gránulos de insulina de las células  $\beta$  (1-3 mM) y en las vesículas sinápticas de las neuronas que inervan el islote (> 10 mM). Una vez que es liberado al medio extracelular se ha visto que puede llegar a alcanzar concentraciones de hasta 25  $\mu$ M e incluso superiores en la superficie de las células del islote de Langerhans (Hazama *et al.*, 1998). Por otra parte, esta molécula, por acción de las ectonucleotidasas presentes en la membrana celular, es rápidamente hidrolizada produciéndose metabolitos de ATP o adenosina. Estudios previos llevados a cabo en células  $\beta$  demostraron un efecto inhibitorio tanto del ATP extracelular como de la adenosina sobre la secreción de insulina en islotes de ratón. En la presente tesis nos planteamos estudiar si el ATP, que puede ser liberado desde las terminales nerviosas o desde las células  $\beta$  pancreáticas, así como los productos de su hidrólisis, ejercen algún efecto sobre la secreción de glucagón en las células  $\alpha$  y, en caso afirmativo, qué receptores purinérgicos median dicho efecto.

De entre los numerosos subtipos de receptores purinérgicos existentes, los receptores P2Y<sub>1</sub>, A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> se han visto implicados en la regulación de la secreción de insulina y glucagón

atendiendo a estudios farmacológicos, principalmente en páncreas perfundido. Sin embargo, hasta el momento no se habían estudiado estos receptores a nivel de proteína o su localización celular en el islote. En primer lugar examinamos la existencia de dichos receptores por inmunocitoquímica en cultivos de células de islotes, confirmándose la presencia de los subtipos P2Y<sub>1</sub>, A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> en las células  $\alpha$ , y tan sólo P2Y<sub>1</sub> y A<sub>1</sub> en las células  $\beta$  (Fig 1). La especificidad de los anticuerpos empleados se confirmó con el uso de péptidos bloqueantes específicos para los mismos (Supl Fig 1). Además, realizamos más experimentos de inmunocitoquímica en células aisladas con anticuerpos diferentes confirmando los mismos resultados (Supl Fig 2). Una vez corroborada la existencia de dichos receptores procedimos a analizar el efecto del ATP extracelular sobre la fisiología de las células  $\alpha$  centrado nuestro interés en el estudio de la señal de Ca<sup>2+</sup> citosólico, que es fundamental en la regulación de la exocitosis en estas células. Para ello cargamos islotes frescos con la sonda fluorescente sensible a Ca<sup>2+</sup> Fluo 3-AM y, empleando un microscopio confocal, registramos las señales de fluorescencia de células  $\alpha$  individuales de la periferia de los islotes. Esta población celular fue identificada atendiendo a su patrón oscilatorio a bajas concentraciones de glucosa (< 1mM), dado que en estas condiciones es el único tipo celular del islote en el que se genera actividad eléctrica y, consecuentemente, oscilaciones de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. La exposición de estas células a ATP extracelular, 1 y 10  $\mu$ M, redujo la frecuencia oscilatoria en ~47 % y ~ 60 %, respectivamente (Fig 2), recuperándose la señal de Ca<sup>2+</sup> citosólico una vez retirado el ATP del medio extracelular (Supl Fig 3). Con el fin de ratificar que la inhibición producida correspondía a un efecto directo del ATP, y no a efectos paracrinos desde células vecinas, llevamos a cabo nuevos registros de Ca<sup>2+</sup> intracelular tanto en células de islotes aisladas (donde es improbable que se produzcan efectos paracrinos) como en islote entero en presencia de clonidina (1  $\mu$ M), un conocido bloqueante de la secreción en células  $\beta$  que actúa como agonista de receptores  $\alpha$ 2-adrenérgicos. En ambos casos observamos nuevamente una disminución significativa de la frecuencia de las oscilaciones de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, confirmándose así la acción directa del ATP sobre las células secretoras de glucagón (Fig 5).

Ya que el ATP puede ser hidrolizado, y sus metabolitos también pueden actuar a través de receptores purinérgicos, comparamos el efecto del ATP $\gamma$ S (un derivado del ATP no hidrolizable), con el efecto del ATP, sin encontrar diferencias significativas entre las inhibiciones que ambos produjeron sobre la señal de Ca<sup>2+</sup> (Fig 2), concluyéndose que el efecto del ATP



extracelular sobre las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula  $\alpha$  se debe en mayor medida al ATP en sí y no tanto a los productos de su hidrólisis. Por otra parte, también estudiamos el efecto del ATP en presencia de suramina, un antagonista de los receptores P2. En estas condiciones, el ATP no produjo ningún efecto (Fig 2), indicando una mayor participación de receptores de la familia P2 que de la familia de receptores P1 en el efecto del ATP. Dado que las inmunocitoquímicas mostraron la existencia de dos subtipos de receptores pertenecientes a este último grupo (P1), registramos las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  de células  $\alpha$  en presencia de adenosina (1 y 10  $\mu\text{M}$ ), el ligando endógeno de los receptores P1, observando reducción en la frecuencia oscilatoria similar a la obtenida tras estimulación con ATP (Fig 2). El empleo de agonistas específicos de los subtipos de receptores identificados en las células  $\alpha$  indicó que los receptores  $\text{P2Y}_1$  y  $\text{A}_{2A}$  eran funcionales en este tipo celular, mientras que el agonista del receptor  $\text{A}_1$  no tuvo ningún efecto sobre la señal de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Fig 4). De estos resultados concluimos que de los tres receptores localizados en las células  $\alpha$  pancreáticas, los receptores  $\text{P2Y}_1$  y  $\text{A}_{2A}$  son funcionales y su activación conduce a una inhibición de las oscilaciones de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .

La exocitosis de los gránulos secretores de las células  $\alpha$  es un mecanismo que requiere incrementos en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular para llevarse a cabo. Nuestros resultados mostraron inhibición de la frecuencia oscilatoria de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  con ATP y adenosina, fenómeno que debería encontrarse reflejado en una notable reducción de la secreción hormonal. Para analizar el efecto del ATP y de la adenosina en la secreción de glucagón incubamos grupos de islotes en presencia de los distintos estímulos y medimos la secreción de glucagón por radioinmunoensayo (RIA). Los resultados mostraron inhibición significativa en la secreción de glucagón bajo estimulación con ATP (10  $\mu\text{M}$ ) (Fig 3), similar a la producida por  $\text{Co}^{2+}$ , un conocido bloqueante de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje que inhibe las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  y la secreción dependiente de este ión. Así mismo, el efecto inhibitorio del ATP fue comparable al ejercido por 10 mM y 20 mM glucosa. Sin embargo, tras incubar los islotes con adenosina 10  $\mu\text{M}$  no se observó ningún efecto significativo sobre la secreción hormonal (Fig 3). Atendiendo a los resultados previos observamos que uno de los subtipos funcionales de receptores purinérgicos en las células  $\alpha$  es el subtipo  $\text{A}_{2A}$ , el cual está acoplado a la activación de la enzima adenilato ciclasa. La exocitosis en estas células también está regulada por acción del AMPc, por lo que muy posiblemente podía suceder que el efecto estimulador del AMPc

contrarrestase el inhibitorio del  $[Ca^{2+}]_i$ , sin que varíe así la secreción en presencia de adenosina. Para confirmar esta posibilidad llevamos a cabo nuevos experimentos de secreción en presencia de H-89, un inhibidor de PKA, observando inhibición de la secreción de glucagón por acción de la adenosina y confirmando, por lo tanto, la implicación de la ruta AMPc/PKA (Fig 3). La secreción de glucagón a 0.5 mM glucosa no se vio afectada por H-89 (Supl Fig 4). Finalmente, comprobamos que al utilizar un agonista específico de  $A_{2A}$  se producía un efecto estimulador de la secreción (Fig 4). Este resultado también apuntaba a que el efecto de la adenosina estaba posiblemente mediado por este subtipo.



## 2.- Efectos inhibitorios de la leptina sobre la función de la célula $\alpha$ pancreática.

### ANEXO II

"Inhibitory effects of leptin on the pancreatic  $\alpha$ -cell function"

Eva Tudurí, Laura Marroquí, Sergi Soriano, Ana B. Ropero, Thiago M. Batista, Sandra Piquer, Miguel A. López-Boado, Everardo M. Carneiro, Ramón Gomis, Ángel Nadal, Iván Quesada. *Diabetes* (in press).

La leptina es una hormona peptídica producida casi exclusivamente por los adipocitos. Aunque en un principio se pensaba que actuaba únicamente sobre centros del hipotálamo que controlan la saciedad, posteriormente se le ha ido asignando una mayor diversidad de funciones: regulación del peso corporal y del gasto energético, reproducción, crecimiento, función inmune, etc. Se ha comprobado que la leptina actúa directamente sobre las células  $\beta$ , afectando tanto a la secreción como a la expresión de la insulina (Seufert *et al.*, 1999b; Kieffer & Habener, 2000). Por otro lado, la población  $\beta$  pancreática también ejerce un control sobre la función de los adipocitos: la insulina secretada desde el islote incrementa la expresión del gen de leptina en el tejido adiposo, así como su secreción. Se tienen evidencias para creer en la existencia de un eje adipoinsular de comunicación bidireccional entre las células  $\beta$  del islote y el tejido adiposo: la insulina es adipogénica y aumenta la producción de leptina en el tejido adiposo mientras que la leptina reduce tanto la expresión como la secreción de insulina. En cambio, a pesar de la importancia de la célula  $\alpha$  en la homeostasis de la glucosa, no se ha estudiado el papel de la leptina en la fisiología de estas células.

Existen hasta 6 isoformas del receptor de leptina, ObRa-f, donde ObRb es la isoforma larga y la principal implicada en la transducción de señales intracelulares activadas por leptina. En primer lugar, para conocer la existencia de mensajeros de ARN de cualquiera de estas isoformas en células  $\alpha$  llevamos a cabo diversas PCRs en células de la línea  $\alpha$ TC1-9 productora de glucagón. Esta línea celular ha sido ampliamente validada para el estudio de la función de las células  $\alpha$  (Ravier & Rutter, 2005). Utilizando cebadores específicos para cada isoforma del receptor de leptina observamos expresión de los transcritos de cinco de las seis isoformas (ObRa-e) (Fig 1). Con el fin de determinar si éstos se traducían a proteína estudiamos los

niveles proteicos mediante Western Blot. Para ello empleamos en primer lugar un anticuerpo específico para el dominio extracelular de ObR (el cual es idéntico para todas las isoformas), obteniendo resultados positivos (Fig 1). Dada la implicación del receptor ObRb en las vías de señalización de leptina, se realizó también un experimento con un anticuerpo específico para esta isoforma larga, confirmándose su existencia en estas células (Fig 1). A continuación, y con el fin de determinar la localización espacial de estos receptores, realizamos inmunocitoquímicas en células  $\alpha$ TC1-9 y en células  $\alpha$  de ratón y de humanos en islotes intactos (secciones de  $\sim 4 \mu\text{m}$ ). En los tres casos las células secretoras de glucagón fueron positivas para el anticuerpo que reconoce todas las isoformas del ObR y para el específico de ObRb (Fig 1).

Las células  $\alpha$  son células eléctricamente excitables que generan potenciales de acción en ausencia o a baja concentración de glucosa. La generación de esta actividad eléctrica permite la apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y la exocitosis de los gránulos secretores de glucagón. Dado que el receptor ObR está presente en las células  $\alpha$ , y concretamente el ObRb, procedimos a estudiar el efecto de la leptina sobre la fisiología de esta población celular centrándonos en su actividad eléctrica, en el patrón oscilatorio de sus señales de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y en la secreción hormonal.

La actividad eléctrica de estas células fue registrada empleando la técnica de *patch-clamp* en la configuración *whole-cell*. Como es bien conocido, a baja concentración de glucosa (0.5 mM) las células  $\alpha$  muestran una característica actividad eléctrica donde se generan potenciales de acción de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{Ca}^{2+}$ . En nuestros experimentos observamos que en estas condiciones se originaban potenciales de acción desde  $-39.9 \pm 0.2 \text{ mV}$  en células  $\alpha$ TC1-9. Al exponer estas células a leptina (6.25 nM) el potencial de membrana se hiperpolarizó en  $-21.1 \pm 1.1 \text{ mV}$ , suprimiéndose la actividad eléctrica (Fig 2). La eliminación de la leptina del medio extracelular permitió restablecer la actividad eléctrica, en la mayoría de las células estudiadas, tras despolarizarse el potencial de membrana hasta los valores iniciales. El mismo estudio se llevó a cabo en células  $\alpha$  aisladas de islotes de ratón, en donde la actividad eléctrica resultó inhibida nuevamente por la hiperpolarización producida por la leptina, que condujo al potencial de membrana desde  $-37.3 \pm 0.6 \text{ mV}$  hasta  $-60.6 \pm 0.4 \text{ mV}$  (Fig 2). Estos resultados confirmaron la funcionalidad de receptores ObR en las células secretoras de glucagón.

Una vez que se inicia un potencial de acción en la célula  $\alpha$  la membrana alcanza un valor de potencial que permite la apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , los cuales median la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en el interior de la célula. Dado que la leptina produce un efecto inhibitorio sobre la actividad eléctrica de las células  $\alpha$  era de esperar un efecto igualmente supresor sobre las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Con el empleo de la sonda fluorescente sensible a  $\text{Ca}^{2+}$  Fluo 4-AM, y un microscopio confocal que nos permitió realizar secciones ópticas ( $\sim 8 \mu\text{m}$ ) en islotes de ratón y de humano, procedimos al estudio de variaciones en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en células  $\alpha$  individuales en estos islotes, así como en células de la línea  $\alpha\text{TC1-9}$ . En todos los casos estimulamos las células  $\alpha$  a baja concentración de glucosa (0.5 mM) dado que en estas condiciones sólo este tipo celular del islote presenta un patrón de  $\text{Ca}^{2+}$  oscilatorio y es posible así proceder a su identificación. En presencia de leptina (6.25 nM) se produjo una inhibición parcial o total de las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico tanto en células  $\alpha\text{TC1-9}$  como en células  $\alpha$  de ratón y de humano, reduciéndose la frecuencia global de las oscilaciones en  $\sim 60 \%$ ,  $\sim 40 \%$  y  $\sim 58 \%$ , respectivamente (Fig 3 y 4). Al estimular estas células con concentraciones menores de leptina (0.625 nM), se produjo una inhibición de la frecuencia oscilatoria de  $\sim 45 \%$  en las células  $\alpha\text{TC1-9}$  y de  $\sim 32 \%$  en células  $\alpha$  humanas (Fig 3 y 4). En el caso de las células  $\alpha$  de ratón se observó una reducción en la frecuencia de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$ , aunque no resultó ser significativa, muy probablemente debido a la gran heterogeneidad obtenida en la respuesta de las células estudiadas (Fig 3). Tras la inhibición obtenida al exponer a las células a leptina (6.25 nM) durante un intervalo de 5 min y posterior retirada de la hormona del medio extracelular se originaron nuevamente oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en células  $\alpha\text{TC1-9}$ , revirtiéndose el efecto de la leptina como sucedía en los registros de actividad eléctrica (Supl Fig 2). Con el fin de descartar posibles interacciones paracrinas de células vecinas del islote, los registros de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular fueron realizados en células aisladas, corroborándose la acción directa de la leptina sobre las células secretoras de glucagón (Fig 3). También estudiamos el efecto de la leptina (6.25 nM) sobre el patrón oscilatorio de células  $\alpha$  en respuesta a concentraciones de glucosa más elevadas (3 mM), tanto en células  $\alpha\text{TC1-9}$  como en células  $\alpha$  de ratón, observando inhibiciones significativas en la frecuencia oscilatoria en ambos casos (Supl Fig 1).

Diversos estudios han ahondado en conocer el mecanismo por el que la leptina induce efectos rápidos sobre el potencial de membrana en células  $\beta$  pancreáticas y/o en

neuronas, y han concluido que la vía de señalización implicada en dichos casos es la vía PI3K. Con el fin de determinar si dicha vía se activaba en las células  $\alpha$  al estimularlas con leptina realizamos nuevos experimentos empleando un inhibidor de la enzima PI3K, la wortmanina. Inactivando la PI3K la leptina no produjo ningún efecto en la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  en las células  $\alpha\text{TC1-9}$  (Fig 5), sugiriendo que dicha vía de señalización se activa en células secretoras de glucagón por acción de la leptina.

Los ratones *db/db* presentan una mutación en el gen *db*, el gen que codifica para el receptor de leptina, de manera que carecen de la isoforma larga ObRb. Resultados de inmunocitoquímica con un anticuerpo específico para ObRb confirmaron la ausencia de esta isoforma del receptor en este modelo animal. La exposición de células  $\alpha$  de ratones *db/db* a esta hormona no produjo ningún efecto sobre la señal oscilatoria de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , mientras que sí provocó una reducción significativa en los ratones control (Supl Fig 3). Con estos resultados concluimos que el efecto inhibitorio de la leptina sobre las células  $\alpha$  se encontraba mediado por interacción de la misma con la isoforma ObRb.

Hasta el momento observamos que la interacción de la leptina con su receptor ObRb suprime la actividad eléctrica por hiperpolarización de la membrana e inhibe las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Estos dos mecanismos suponen puntos clave en el acoplamiento estímulo-secreción de la célula  $\alpha$ , y son necesarios para que se produzca la secreción hormonal en condiciones hipoglucémicas. El siguiente paso consistió en determinar el efecto de la leptina sobre la liberación de glucagón, por lo que estudiamos la secreción hormonal en islotes de ratón por radioinmunoensayo (RIA) (Fig 6). En presencia de leptina (6.25 nM), la secreción de glucagón en islotes de ratón resultó inhibida en un  $\sim 33\%$ , mientras que una concentración de 0.625 nM no produjo una reducción significativa al igual que sucedía en los estudios de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. En presencia de wortmanina (50 nM), un inhibidor de PI3K, la leptina (6.25 nM) no indujo ningún efecto sobre la secreción de glucagón, corroborándose así la activación de la vía PI3K. Finalmente, la exocitosis de los gránulos fue analizada empleando la sonda FM1-43 en células  $\alpha\text{TC1-9}$  (Fig 6). En presencia de leptina el incremento de fluorescencia que produce la fusión de las vesículas secretoras con la membrana plasmática resultó ser notablemente menor que en condiciones control (0.5 mM G). Nuevamente, la wortmanina (20 nM) previno el efecto de la leptina.



Discusión

---

DISCUSSION





Los islotes de Langerhans desarrollan un papel esencial en la regulación de la homeostasis de la glucosa. Al tiempo que la insulina liberada desde las células  $\beta$  promueve la entrada de glucosa en células de músculo, tejido adiposo o hígado, el glucagón secretado desde las células  $\alpha$  estimula la producción y la movilización de este azúcar en el hígado, convirtiéndose en la principal hormona contrarreguladora de la insulina. De esta forma ambas hormonas mantienen la homeostasis de la glucosa *in vivo*. Fallos en este sistema pueden llevar a la aparición de patologías como la diabetes mellitus (Prentki & Matschinsky, 1987), la cual está producida principalmente por un mal funcionamiento de las células  $\beta$  secretoras de insulina o por resistencia a esta hormona. No obstante, diversos estudios han demostrado alteraciones en el funcionamiento normal de la secreción de glucagón en pacientes diabéticos, lo cual puede conducir a una situación de hiperglucagonemia, agravándose notablemente el estado diabético (Shah *et al.*, 1999; Greenbaum *et al.*, 2002; Jiang & Zhang, 2003). Por lo tanto, es necesario conocer a fondo los mecanismos de regulación de las células  $\alpha$  y  $\beta$  del islote para comprender mejor el control de la glucemia tanto en condiciones fisiológicas como fisiopatológicas.

### **1.- El ATP extracelular inhibe la señal de $[Ca^{2+}]_i$ y la secreción de glucagón en células $\alpha$ pancreáticas.**

Los gránulos de las células pancreáticas no sólo contienen glucagón, insulina y somatostatina (que pueden actuar por mecanismos paracrinos), sino que almacenan además otras moléculas que, al igual que las hormonas, son liberadas al exterior celular tras la exocitosis de los gránulos y presentan capacidad para regular de forma paracrina la secreción hormonal u otras funciones en células vecinas. Como ejemplos se han descrito el  $Zn^{2+}$  (Franklin *et al.*, 2005; Ravier & Rutter, 2005), el L-glutamato (Uehara *et al.*, 2004) y el GABA (Wendt *et al.*, 2004). El ATP forma parte del grupo de moléculas secretadas por las células  $\beta$ , siendo además liberado junto con otros neurotransmisores desde las terminales nerviosas que inervan el páncreas (Miller, 1981). Una vez en el espacio extracelular, las moléculas de ATP pueden ser hidrolizadas por las ectonucleotidasas celulares, produciéndose ADP, AMP y adenosina como productos de dicha hidrólisis. A excepción del AMP, estos productos interactúan con receptores purinérgicos activando, consecuentemente, distintas vías de señalización (Ralevic & Burnstock, 1998).

Hasta la fecha, 19 subtipos de receptores purinérgicos han sido clasificados atendiendo a la identidad de sus secuencias, a sus propiedades farmacológicas y a los mecanismos de transducción de señales que desencadenan. En numerosos tipos celulares se ha demostrado coexistencia de receptores de funciones similares o antagónicas en una misma célula, lo cual implica la posible activación simultánea de más de una vía distinta de señalización. Dado que la farmacología actual para estos receptores no es muy selectiva, un estudio detallado de la señalización purinérgica podría llegar a ser muy complejo (Fields & Burnstock, 2006).

En la presente tesis hemos localizado por inmunocitoquímica, tanto en islotes enteros como en células disgregadas de los mismos, los subtipos P2Y<sub>1</sub>, A<sub>1</sub> y A<sub>2A</sub> en las células secretoras de glucagón. Estos subtipos habían sido caracterizados farmacológicamente (en células  $\alpha$  de rata) mediante experimentos de secreción en páncreas perfundido (Chapal *et al.*, 1985; Grapengiesser *et al.*, 2006). No obstante, ni su localización celular ni su existencia a nivel proteico habían sido demostrados aún en este tipo celular.

Tras estimulación de las células  $\alpha$  pancreáticas con ATP y/o adenosina observamos una reducción significativa de la frecuencia oscilatoria de  $[Ca^{2+}]_i$ . Registros similares se llevaron a cabo nuevamente en presencia de agonistas específicos para los 3 subtipos de receptores hallados previamente por inmunocitoquímica. Los resultados inhibitorios obtenidos mediante el empleo de los agonistas de P2Y<sub>1</sub> y A<sub>2A</sub> corroboraron no sólo la existencia sino también la funcionalidad de los mismos en la población  $\alpha$  pancreática. Sin embargo, es muy probable que coexistan además otros subtipos de receptores purinérgicos en estas células. En células  $\alpha$  de islotes de rata, por ejemplo, se ha detectado el gen para el subtipo P2Y<sub>4</sub> (Coutinho-Silva *et al.*, 2003). Por otra parte, estudios de inmunocitoquímica en ratas diabéticas tratadas con estreptozotocina y en ratones NOD han demostrado la presencia de receptores P2X<sub>7</sub> en las células secretoras de glucagón (Coutinho-Silva *et al.*, 2003; Coutinho-Silva *et al.*, 2007). Aunque existan otros subtipos en las células  $\alpha$  de ratón, en nuestro trabajo descartamos la implicación de receptores P2X<sub>7</sub> funcionales ya que su activación conduciría a la formación de poros iónicos que debería traducirse en un notable aumento de  $Ca^{2+}$  (Coutinho-Silva *et al.*, 2003; Fields & Burnstock, 2006). Nuestros experimentos de registros de  $Ca^{2+}$  no recogieron en ningún caso dicho incremento.

La existencia y función de diversos receptores purinérgicos, pertenecientes además a distintas familias, implica la activación simultánea de varias rutas de señalización en las células  $\alpha$ . El ATP media su señal a través de receptores P2X (ionotrópicos) y P2Y (metabotrópicos, activando PLC $\beta$  e incrementando los niveles de IP $_3$ , aunque también se han descrito efectos sobre otras múltiples rutas) (Ralevic & Burnstock, 1998). Respecto a la adenosina, ésta actúa vía receptores P1, en donde la adenilato ciclasa juega un papel crucial desencadenando cambios en los niveles de AMPc (Ralevic & Burnstock, 1998). En algunos tipos celulares, como es el caso de las células  $\beta$  del islote, se ha observado coexistencia de receptores P2 y P1, hecho que permite respuestas recíprocas (Poulsen *et al.*, 1999). En dicha población se ha descrito que el ATP extracelular, al activar receptores purinérgicos P2Y $_1$ , es capaz de disminuir la actividad de los canales K $_{ATP}$  vía activación de una PLA $_2$  citosólica, lo cual produce una pequeña despolarización en este tipo celular aunque tendría un efecto inhibitorio sobre la secreción (Poulsen *et al.*, 1999). También se ha observado que el ATP extracelular inhibe los potenciales de acción producidos a elevadas concentraciones de glucosa en células  $\beta$ ; fenómeno que se encontró mediado por una inhibición en los canales de Ca $^{2+}$  dependientes de voltaje tipo L por interacción del ATP con los receptores P2Y (Gong *et al.*, 2000).

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que tanto el ATP como la adenosina extracelulares inhiben las oscilaciones de Ca $^{2+}$  citosólico en las células  $\alpha$  pancreáticas. Este efecto se produce, si no totalmente, en parte, por activación de los receptores P2Y $_1$  y A $_{2A}$ , respectivamente. La activación del primero de ellos conduce en muchos casos a estimulación de PLC y generación de IP $_3$ . La formación de IP $_3$  y movilización de Ca $^{2+}$  de reservorios intracelulares, como se ha demostrado en otros tipos celulares, no estaría teniendo lugar en las células  $\alpha$  pues no se detectaron aumentos en la señal de Ca $^{2+}$  sino una inhibición de la misma. Por otro lado, la activación de P2 también puede estimular una variedad de rutas de señalización incluyendo PKC, PLA $_2$ , NOS, etc. que cabría explorar en próximos estudios para conocer exactamente qué mecanismos llevan al efecto inhibitorio del ATP sobre la señal de Ca $^{2+}$  y la secreción. La activación del receptor A $_{2A}$  se traduce en estimulación de AC. En algunos trabajos se ha observado que tras activación de AC, el incremento en los niveles de AMPc y la consecuente activación de PKA conducen a la apertura de canales K $_{ATP}$ , presumiblemente por fosforilación del canal o de alguna proteína reguladora asociada a éste (Kleppisch & Nelson, 1995).

En las células  $\alpha$  pancreáticas el patrón oscilatorio de  $\text{Ca}^{2+}$  a baja glucosa es debido a la actividad de una serie de canales como son los canales  $\text{K}_{\text{ATP}}$ , los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje y los canales de  $\text{Na}^+$  entre otros. Como se ha comentado previamente, en el caso de la célula  $\beta$  se ha descrito que el ATP extracelular es capaz de disminuir la actividad de los canales  $\text{K}_{\text{ATP}}$  vía activación de una  $\text{PLA}_2$  citosólica o de inhibir los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje tipo L (Poulsen *et al.*, 1999; Gong *et al.*, 2000). Con todo esto sería de esperar que, al igual como ocurre en la célula  $\beta$ , existiese una interacción entre la señalización purinérgica y los canales iónicos de la célula  $\alpha$  que condujese a la disminución de la frecuencia oscilatoria de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  observadas.

La secreción de glucagón es un mecanismo dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , por lo que atendiendo a los resultados obtenidos de los registros de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico cabría esperar un notable efecto igualmente inhibitorio sobre la secreción de esta hormona. Los resultados de secreción obtenidos tras incubación de los islotes con ATP extracelular mostraron una inhibición en la liberación de glucagón de  $\sim 35\%$ . Estos datos coinciden con estudios previos en células  $\beta$  de ratón donde el ATP produjo una inhibición de la exocitosis (Poulsen *et al.*, 1999). No obstante, estudios realizados en rata mostraron estimulación de la secreción hormonal en células  $\alpha$  (Grapengiesser *et al.*, 2006), lo cual probablemente se deba a las diferencias entre las distintas especies, dado que los dos modelos presentan divergencias en sus sistemas de acoplamiento estímulo-secreción y en los canales iónicos que participan. Al cuantificar igualmente el efecto de la adenosina sobre la secreción de glucagón se observó un incremento de la misma de  $\sim 24\%$ , aunque no resultó significativo. Estos resultados presentan similitud con estudios previos llevados a cabo en islotes de rata donde la adenosina produce un incremento en la liberación de glucagón a baja concentración de glucosa por activación de receptores  $\text{A}_2$  (Chapal *et al.*, 1985; Grapengiesser *et al.*, 2006). La exocitosis de glucagón es un proceso altamente sensible a incrementos en los niveles de AMPc (Gromada *et al.*, 1997), y los receptores  $\text{A}_2$ , receptores de adenosina exclusivamente, están ligados a la activación de la enzima AC (Ralevic & Burnstock, 1998). Sería muy factible, por tanto, que la producción de AMPc tras la activación de estos receptores condujese a estimulación de la exocitosis de los gránulos. Los resultados obtenidos tras exponer los islotes a adenosina en presencia y ausencia de H-89, un inhibidor de PKA, indicaron diferencias significativas en la secreción de glucagón en ambas condiciones, confirmando la implicación de la vía AMPc/PKA tras activación de

receptores  $A_{2A}$  por adenosina. Este efecto estimulador contrastaría con el efecto inhibitor provocado por la acción de la adenosina en la señal de  $Ca^{2+}$ .

En este trabajo hemos observado que el ATP y la adenosina ejercen efectos similares sobre la  $[Ca^{2+}]_i$  y, sin embargo, antagónicos sobre la secreción de glucagón. La integración de las respuestas mediadas desde los distintos receptores depende de múltiples factores, entre ellos las concentraciones locales de ATP y de adenosina, la densidad y la afinidad de los receptores, y/o la actividad de las ectonucleotidasas, entre otros (Fields & Burnstock, 2006). La incorporación de ATP al medio extracelular produce inhibición del patrón oscilatorio de  $[Ca^{2+}]_i$  así como de la secreción de glucagón. Sin embargo, la señal de  $Ca^{2+}$  no se encuentra interrumpida por estimulación con ATP en presencia de suramina, un antagonista de receptores P2. Estos resultados indican, por lo tanto, que se produce un mayor efecto directo llevado a cabo a través del ATP sobre los receptores P2 que no a través de los receptores P1 por acción de la adenosina resultante de la actividad de las ectonucleotidasas. Teniendo en cuenta las elevadas concentraciones de ATP que se alcanzan en los gránulos de insulina y en las vesículas sinápticas de las terminales nerviosas, perfectamente ésta podría ser la situación fisiológica de las células  $\alpha$  en respuesta a ATP.

De los experimentos realizados en este trabajo se puede concluir que tanto el ATP extracelular liberado desde células  $\beta$  vecinas del islote y/o terminales nerviosas, como los productos resultantes de su hidrólisis, producen un notable efecto inhibitorio sobre las oscilaciones de  $Ca^{2+}$  citosólico en las células  $\alpha$ , lo cual les confiere un importante papel en la regulación de los procesos dependientes de  $Ca^{2+}$  en este tipo celular. La inhibición de la señal de  $Ca^{2+}$  implica la participación de receptores  $P2Y_1$  y  $A_{2A}$  atendiendo a nuestros resultados, aunque muy probablemente otros subtipos podrían estar presentes y ser funcionales en las células  $\alpha$ . A diferencia de la adenosina, el ATP inhibe la secreción de glucagón en las células secretoras de esta hormona, ejerciendo un papel directo en la regulación de la secreción de glucagón al igual que otras moléculas contenidas en los gránulos de insulina. Por tanto, a parte del efecto directo de la glucosa y el efecto paracrino de GABA,  $Zn^{2+}$ , insulina y somatostatina, habría que considerar el ATP y los receptores purinérgicos en la inhibición de la función de la célula  $\alpha$ .

En algunos pacientes diabéticos se han observado alteraciones en la inhibición normal de la secreción de glucagón, lo cual desemboca en un estado de hiperglucagonemia y agrava aún más su estado diabético. Los resultados aquí obtenidos podrían explorarse a nivel terapéutico dado que la activación farmacológica selectiva de algunos receptores purinérgicos de las células  $\alpha$  podría favorecer la reducción en la secreción de glucagón. Las metilxantinas, por ejemplo, ya forman parte de los tratamientos antidiabéticos por su capacidad de estimular la secreción de insulina. Estos compuestos presentan habilidad para translocar  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y para aumentar las concentraciones intracelulares de AMPc: por inhibición de fosfodiesterasas y también por unión a receptores purinérgicos P1 (Doyle & Egan, 2003).

## **2.- La leptina produce hiperpolarización de la membrana y supresión de la actividad eléctrica, inhibición de la señal de $\text{Ca}^{2+}$ intracelular y reducción de la secreción de glucagón en célula $\alpha$ pancreática.**

El tejido adiposo es capaz de ejercer una modulación de la glucemia inhibiendo la expresión génica y la secreción de insulina por acción directa de la leptina secretada desde los adipocitos sobre las células  $\beta$  (Seufert *et al.*, 1999b; Kieffer & Habener, 2000). Algunos estudios sugieren que fallos en esta interacción con las células  $\beta$  en individuos obesos conduciría a un estado de hiperinsulinemia que desembocaría en una diabetes adipogénica (Seufert *et al.*, 1999b; Morioka *et al.*, 2007). Pese a la importancia del glucagón en el control de la glucemia la posibilidad de regulación de las células  $\alpha$  pancreáticas por el tejido adiposo aún no había sido demostrada. Un estudio reciente mostró un claro efecto inhibitorio sobre la hiperglucagonemia de ratones diabéticos tipo I producido por un tratamiento inductor de hiperleptinemia (Yu *et al.*, 2008). No obstante, en dicho trabajo no se proporcionó ninguna información detallada acerca del efecto de la leptina sobre las células  $\alpha$  ni de los mecanismos implicados.

Los niveles de leptina en plasma no son constantes y son susceptibles de sufrir alteraciones de distinta magnitud ante diversas situaciones. En condiciones de ayuno y en personas con normopeso se encuentran en el rango 1-10 ng/mL (0.0625 – 0.625 nM) (Sinha *et al.*, 1996b), aunque pueden aumentar a lo largo del día pues su secreción presenta un ritmo circadiano (Licinio *et al.*, 1997). Situaciones como embarazo, o factores como la edad o género dan lugar a niveles incrementados de leptina. Las máximas concentraciones de esta hormona

las manifiestan personas con obesidad, alcanzando valores de hasta 100 ng/mL (6.25 nM) (Considine *et al.*, 1996; Sinha *et al.*, 1996b). Pero también la leptina puede incrementarse a estos niveles en pacientes con patologías renales (Iglesias *et al.*, 2002). En la presente tesis hemos evaluado el efecto de la leptina en condiciones fisiológicas (0.625 nM) y fisiopatológicas (6.25 nM) sobre la función de las células  $\alpha$  secretoras de glucagón. Tras realizar diversas técnicas hemos demostrado la existencia de receptores de leptina funcionales en células  $\alpha$ , a través de los cuales la leptina produce hiperpolarización de la membrana, supresión de la actividad eléctrica e inhibición del patrón oscilatorio de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y de la exocitosis de los gránulos secretores de glucagón.

La presencia de receptores de leptina en islotes de Langerhans enteros, y particularmente en células  $\beta$ , ha sido ampliamente demostrada (Kieffer *et al.*, 1996; Emilsson *et al.*, 1997; Fei *et al.*, 1997; De Matteis *et al.*, 1998). En estos estudios se ha confirmado la existencia tanto de las isoformas cortas como de la larga en la población  $\beta$ , principalmente por Northern Blot, RT-PCR e inmunocitoquímica. Sin embargo, atendiendo a la literatura actual se aprecia que la existencia de receptores ObR en células secretoras de glucagón apenas ha sido investigada. De los escasos resultados publicados tan sólo algunos de inmunocitoquímica demostraron localización de receptores ObR en células  $\alpha$  de lagarto *P. Sicula* (Paolucci *et al.*, 2006), y muy débil marcaje en sus homólogas de rata (Kieffer *et al.*, 1997). En este trabajo hemos confirmado la existencia de transcritos de ARNm para las isoformas ObRa-e en la línea secretora de glucagón  $\alpha\text{TC1-9}$  y en islotes de ratón e hipotálamo. La traducción a proteína se confirmó por Western Blot, y la localización espacial en las células  $\alpha$  se determinó por inmunocitoquímica en la línea  $\alpha\text{TC1-9}$ , en islotes de ratón y en islotes humanos. Los resultados de las inmunocitoquímicas revelaron la presencia de ObR, y específicamente de ObRb, en las células secretoras de glucagón de los tres modelos estudiados. En todos los casos apareció marcaje tanto en la membrana como en el citosol de las células. Este hecho coincide con estudios previos donde se ha justificado la poca localización de estos receptores en la membrana, comparada con la existente en el citosol, debido al tráfico de ObR desde el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, y por la endocitosis con la que dan comienzo sus vías de degradación (Barr *et al.*, 1999; Belouzard *et al.*, 2004).

Las células  $\alpha$  son células eléctricamente excitables. La generación de potenciales de acción de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  en las mismas permite aumentos en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , que son necesarios para

que se active el proceso de exocitosis de los gránulos. Una vez confirmada la existencia de receptores ObR en células  $\alpha$ , concretamente la isoforma ObRb que induce distintas vías de señalización, estudiamos el efecto de la leptina sobre la fisiología de estas células comenzando por su respuesta a nivel de la actividad eléctrica. La exposición a leptina de células  $\alpha$ TC1-9 y células  $\alpha$  aisladas de islotes de ratón indujo hiperpolarización de la membrana y supresión de la actividad eléctrica en ambos modelos. Este mismo efecto ha sido descrito en otros casos como son las células  $\beta$  pancreáticas de ratones control y de ratones *ob/ob* (Kieffer *et al.*, 1997), las células secretoras de insulina CRI-G1 (Harvey *et al.*, 1997) y neuronas del hipotálamo (Spanswick *et al.*, 1997).

Atendiendo al modelo de estímulo-acoplamiento propuesto para las células  $\alpha$  de ratón y de humano, una hiperpolarización sitúa el potencial de membrana fuera del rango de membrana en el que se generan potenciales de acción, por lo que no se activarán los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje. De un modo similar actúan el  $\text{Zn}^{2+}$  y las hormonas pancreáticas insulina y somatostatina sobre las células  $\alpha$  (Yoshimoto *et al.*, 1999; Gromada *et al.*, 2001b; Franklin *et al.*, 2005). Estas moléculas inhiben la actividad eléctrica por hiperpolarización de la membrana en la población  $\alpha$ , lo cual conduce a inhibición de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y de la exocitosis de los gránulos. Acorde con este modelo de funcionamiento de la célula  $\alpha$ , los registros de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que obtuvimos tras exposición a leptina en concentraciones fisiológicas (0.625 nM) y fisiopatológicas (6.25 nM) mostraron inhibición del patrón oscilatorio de  $\text{Ca}^{2+}$  (en respuesta a baja glucosa) en células  $\alpha$  de ratón y de humano, así como en la línea  $\alpha$ TC1-9. Resultados similares fueron observados en un estudio realizado en células  $\beta$  pancreáticas de humano, donde la leptina en concentraciones fisiopatológicas indujo inhibición de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Seufert *et al.*, 1999b), y en islotes de ratón *ob/ob*, donde también se observó una reducción marcada de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  citosólico (Kieffer *et al.*, 1997). En el caso de las células  $\alpha$  de ratón observamos una clara inhibición de la frecuencia oscilatoria a 6.25 nM leptina, y una tendencia similar, aunque no significativa, a 0.625 nM. Consecuentemente, y teniendo en cuenta que el proceso de exocitosis es dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , observamos inhibición de la exocitosis de los gránulos y de la liberación de glucagón en islotes de ratón. A 6.25 nM leptina, la secreción de glucagón resultó inhibida en  $\sim 33\%$  mientras que tras la incubación con leptina a 0.625 nM la reducción en la secreción de glucagón fue de  $\sim 15\%$  pero no resultó significativa. Esta ligera diferencia



en la respuesta de las células  $\alpha$  de ratón a 0.625 nM, respecto a la respuesta de células  $\alpha$ TC1-9 y células  $\alpha$  de humano, podría deberse a distintas afinidades de estos modelos por la leptina, o a variaciones en la expresión de receptores ObR, dado que las respuestas de las células de ratón estudiadas presentaron una elevada heterogeneidad.

A pesar de que algunas isoformas cortas como la ObRa, y en tipos celulares muy concretos, parecen ser capaces de inducir algún tipo de señalización celular (Murakami *et al.*, 1997), la principal isoforma por la que se activan todas las rutas asociadas a la interacción de la leptina con su receptor es la ObRb (Fruhbeck, 2006). Esta isoforma está presente en las células  $\alpha$  pancreáticas, tanto en la línea  $\alpha$ TC1-9 como en ratón y humano. Tras exposición a leptina ésta produce múltiples efectos en las células  $\alpha$ , acciones que suceden por activación del receptor ObRb dado que en ratones *db/db*, deficientes de la isoforma larga, la leptina (6.25 nM) no indujo ningún efecto a nivel del patrón oscilatorio de  $\text{Ca}^{2+}$ .

El efecto que la leptina produce sobre las células  $\beta$  y la secreción de insulina se ha observado implica la activación de la vía PI3K (Zhao *et al.*, 1998). Esta ruta se induce por interacción de la leptina con la isoforma ObRb. Realizamos nuevos registros de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en la línea  $\alpha$ TC1-9 y estudios cuantitativos de la secreción de glucagón en islotes de ratón en presencia de wortmanina, un inhibidor de PI3K. En estas condiciones, la leptina (6.25 nM) no indujo ningún efecto sobre la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  y tampoco fue capaz de reducir la secreción de glucagón. Al igual que en las células  $\beta$  pancreáticas la leptina inhibe la secreción hormonal vía PI3K (Zhao *et al.*, 1998), este mecanismo se encuentra igualmente regulado por dicha ruta en las células secretoras de glucagón. En células  $\beta$  parece que PI3K induce alteraciones en la dinámica del citoesqueleto de actina (Ning *et al.*, 2006) que producen activación de canales  $\text{K}_{\text{ATP}}$ , lo cual llevaría a hiperpolarización. Dada la importancia de los canales  $\text{K}_{\text{ATP}}$  en células  $\alpha$  (MacDonald *et al.*, 2007) es posible que la leptina pudiera ejercer acciones similares que llevaran a hiperpolarización de la membrana y al cierre de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Algunos estudios han detectado leptina en las poblaciones  $\alpha$  y  $\delta$  del islote de Langerhans (Vickers *et al.*, 2001; Reddy *et al.*, 2004), no obstante, no se conoce si esta leptina es secretada desde dichos tipos celulares. En el caso de que sí lo fuera, la leptina podría regular de manera autocrina/paracrina la secreción de glucagón por parte de las células  $\alpha$ , del mismo modo que la somatostatina es capaz de regular la fisiología de las poblaciones  $\alpha$  y  $\beta$ .

Sin embargo, pese a la posible contribución de la leptina secretada en el islote, la principal fuente de producción de leptina es el tejido adiposo.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran una acción directa de la leptina sobre las células secretoras de glucagón, por tanto los adipocitos pueden regular la función de las células  $\alpha$ . Hasta el momento se creía que el efecto regulador de la glucemia por parte del tejido adiposo sucedía sólo sobre las células  $\beta$  y la insulina. Sin embargo, nosotros hemos demostrado que también ocurre a través de las células  $\alpha$  y el glucagón. Los niveles de esta hormona suelen estar incrementados en sujetos que padecen obesidad y/o diabetes; la hiperglucagonemia, generalmente, está presente en estados deficientes de insulina. En ratones NOD, diabéticos pero no obesos, se ha observado una notable reducción de los niveles de glucagón en plasma en respuesta a leptina (Yu *et al.*, 2008). Sería, por lo tanto, de gran interés considerar a la leptina como posible diana terapéutica para corregir los excesos de glucagón en situaciones similares, donde la secreción de insulina está notablemente afectada.

También resultaría de gran importancia ahondar en el estudio de una posible resistencia a la leptina por parte de las células  $\alpha$  en individuos obesos tal como se ha propuesto que podría ocurrir en células  $\beta$  (Covey *et al.*, 2006; Morioka *et al.*, 2007). El origen de esta incapacidad que presentan los niveles elevados de leptina para reducir la obesidad radica principalmente a nivel hipotalámico. No obstante, se ha propuesto la existencia de resistencia a leptina directamente en las células  $\beta$  del islote (Covey *et al.*, 2006; Morioka *et al.*, 2007), fenómeno que contribuiría a la aparición de diabetes asociada a la obesidad. Los resultados aquí expuestos podrían sugerir que la hiperglucagonemia detectada en algunos sujetos obesos podría ser debida, en parte, a una situación de resistencia a leptina por parte de las células  $\alpha$ .



Conclusiones

---

CONCLUSIONES



- 1.- Las células  $\alpha$  pancreáticas de ratón presentan los subtipos de receptores purinérgicos P2Y<sub>1</sub>, A<sub>1</sub> y A<sub>2A</sub>.
- 2.- El ATP extracelular, a concentraciones de 1 y 10  $\mu$ M, produce una inhibición reversible de la señal de Ca<sup>2+</sup> que presentan las células  $\alpha$  a baja concentración de glucosa.
- 3.- El efecto inhibitorio que produce el ATP sobre la señal de Ca<sup>2+</sup> se debe principalmente a la molécula del ATP en sí y no tanto a los productos derivados de su hidrólisis, e implica una mayor participación de receptores purinérgicos P2 que de receptores pertenecientes a la familia P1.
- 4.- La adenosina, producto de la hidrólisis de ATP, a concentraciones de 1 y 10  $\mu$ M también inhibe la señal de Ca<sup>2+</sup> intracelular en células  $\alpha$  de ratón.
- 5.- La funcionalidad de los subtipos de receptores P2Y<sub>1</sub> y A<sub>2A</sub> quedó confirmada dado que la activación de los mismos con agonistas específicos resultó en una inhibición significativa de la señal de Ca<sup>2+</sup> intracelular.
- 6.- El ATP, a concentración 10  $\mu$ M, produce una disminución de la secreción de glucagón similar a la registrada por Co<sup>2+</sup> o por elevadas concentraciones de glucosa (10 y 20 mM).
- 7.- La adenosina, a 10  $\mu$ M, no indujo ningún efecto significativo sobre la secreción de glucagón, posiblemente al contrarrestarse los efectos de la inhibición de Ca<sup>2+</sup> citosólico con el incremento en los niveles de AMPc y la activación de PKA, dado que en presencia de un inhibidor de PKA la adenosina sí es capaz de reducir la secreción de glucagón.
- 8.- Tanto las células  $\alpha$ CT1-9 como los islotes de ratón presentan ARN mensajero para las isoformas ObRa-e del receptor de leptina. Además, ObR también se localiza a nivel proteico en estas células.
- 9.- ObRb, la principal isoforma responsable de la activación de señales intracelulares activadas por leptina, colocaliza en células  $\alpha$ TC1-9 y en células  $\alpha$  de islotes de ratón y de humano.
- 10.- La leptina, a concentración de 6.25 nM, produce hiperpolarización de la membrana en células  $\alpha$ TC1-9 y células  $\alpha$  de ratón, suprimiendo la actividad eléctrica en las mismas.

11.- A concentraciones de 0.625 nM y 6.25 nM, la leptina reduce la frecuencia de la señal oscilatoria del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en células de la línea  $\alpha\text{TC1-9}$ , y en células  $\alpha$  de islotes humanos. Este mismo efecto se observa en células  $\alpha$  de islotes de ratón a 6.25 nM leptina, sin embargo, 0.625 nM tiene una acción inhibitoria limitada.

12.- El efecto que la leptina ejerce sobre la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular está mediado por unión de la leptina a ObRb, la isoforma larga del receptor de leptina, puesto que la leptina no ejerce ningún efecto en células  $\alpha$  de ratones *db/db*, deficientes de dicha isoforma.

13.- La leptina, a 6.25 nM, inhibe la exocitosis de los gránulos secretores y la secreción de glucagón en células  $\alpha\text{TC1-9}$  y en células  $\alpha$  de ratón, respectivamente.

14.- La ruta PI3K está implicada en el efecto inhibitorio que produce la leptina sobre la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico y la secreción de glucagón, dado que la utilización de un inhibidor específico de PI3K bloquea la acción de la leptina.





Bibliografía

---

Bibliografía





- 
- Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E & Flier JS. (1996). Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* **382**, 250-252.
- Ahren B. (2000). Autonomic regulation of islet hormone secretion--implications for health and disease. *Diabetologia* **43**, 393-410.
- Ahren B & Lundquist I. (1982). Influences of gastro-intestinal polypeptides and glucose on glucagon secretion induced by cholinergic stimulation. *Horm Metab Res* **14**, 529-532.
- Akesson B, Panagiotidis G, Westermark P & Lundquist I. (2003). Islet amyloid polypeptide inhibits glucagon release and exerts a dual action on insulin release from isolated islets. *Regul Pept* **111**, 55-60.
- Bado A, Levasseur S, Attoub S, Kermorgant S, Laigneau JP, Bortoluzzi MN, Moizo L, Lehy T, Guerre-Millo M, Le Marchand-Brustel Y & Lewin MJ. (1998). The stomach is a source of leptin. *Nature* **394**, 790-793.
- Band G & Jones CT. (1980a). Activation by glucagon of glucose 6-phosphatase activity in the liver of the foetal guinea pig. *Biochem Soc Trans* **8**, 586-587.
- Band GC & Jones CT. (1980b). Functional activation by glucagon of glucose 6-phosphatase and gluconeogenesis in the perfused liver of the fetal guinea pig. *FEBS Lett* **119**, 190-194.
- Barash IA, Cheung CC, Weigle DS, Ren H, Kabigting EB, Kuijper JL, Clifton DK & Steiner RA. (1996). Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology* **137**, 3144-3147.
- Barg S. (2003). Mechanisms of exocytosis in insulin-secreting B-cells and glucagon-secreting A-cells. *Pharmacol Toxicol* **92**, 3-13.

- Barg S, Galvanovskis J, Gopel SO, Rorsman P & Eliasson L. (2000). Tight coupling between electrical activity and exocytosis in mouse glucagon-secreting alpha-cells. *Diabetes* **49**, 1500-1510.
- Barr VA, Lane K & Taylor SI. (1999). Subcellular localization and internalization of the four human leptin receptor isoforms. *J Biol Chem* **274**, 21416-21424.
- Bates SH & Myers MG. (2004). The role of leptin-->STAT3 signaling in neuroendocrine function: an integrative perspective. *J Mol Med* **82**, 12-20.
- Bates SH, Stearns WH, Dundon TA, Schubert M, Tso AW, Wang Y, Banks AS, Lavery HJ, Haq AK, Maratos-Flier E, Neel BG, Schwartz MW & Myers MG, Jr. (2003). STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. *Nature* **421**, 856-859.
- Belouzard S, Delcroix D & Rouille Y. (2004). Low levels of expression of leptin receptor at the cell surface result from constitutive endocytosis and intracellular retention in the biosynthetic pathway. *J Biol Chem* **279**, 28499-28508.
- Berts A, Ball A, Gylfe E & Hellman B. (1996). Suppression of Ca<sup>2+</sup> oscillations in glucagon-producing alpha 2-cells by insulin/glucose and amino acids. *Biochim Biophys Acta* **1310**, 212-216.
- Berts A, Gylfe E & Hellman B. (1997). Cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> in glucagon-producing pancreatic alpha-cells exposed to carbachol and agents affecting Na<sup>+</sup> fluxes. *Endocrine* **6**, 79-83.
- Bjorbaek C, Uotani S, da Silva B & Flier JS. (1997). Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. *J Biol Chem* **272**, 32686-32695.
- Bjorbak C, Buchholz RM, Davis SM, Bates SH, Pierroz DD, Gu H, Neel BG, Myers MG, Jr. & Flier JS. (2001). Divergent Roles of SHP-2 in ERK Activation by Leptin Receptors. *J Biol Chem* **276**, 4747-4755.

- Bloc A, Cens T, Cruz H & Dunant Y. (2000). Zinc-induced changes in ionic currents of clonal rat pancreatic  $\beta$ -cells: activation of ATP-sensitive  $K^+$  channels. *J Physiol* **529 Pt 3**, 723-734.
- Bokvist K, Olsen HL, Hoy M, Gotfredsen CF, Holmes WF, Buschard K, Rorsman P & Gromada J. (1999). Characterisation of sulphonylurea and ATP-regulated  $K^+$  channels in rat pancreatic  $\beta$ -cells. *Pflugers Arch* **438**, 428-436.
- Bollheimer LC, Landauer HC, Troll S, Schweimer J, Wrede CE, Schölmerich J & Buettner R. (2004). Stimulatory short-term effects of free fatty acids on glucagon secretion at low to normal glucose concentrations. *Metabolism* **53**, 1443-1448.
- Bootman MD, Collins TJ, Peppiatt CM, Prothero LS, MacKenzie L, De Smet P, Travers M, Tovey SC, Seo JT, Berridge MJ, Ciccolini F & Lipp P. (2001). Calcium signalling--an overview. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **12**, 3-10.
- Brand CL, Rolin B, Jorgensen PN, Svendsen I, Kristensen JS & Holst JJ. (1994). Immunoneutralization of endogenous glucagon with monoclonal glucagon antibody normalizes hyperglycaemia in moderately streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* **37**, 985-993.
- Brice NL, Varadi A, Ashcroft SJ & Molnar E. (2002). Metabotropic glutamate and GABA(B) receptors contribute to the modulation of glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic  $\beta$  cells. *Diabetologia* **45**, 242-252.
- Burcelin R, Katz EB & Charron MJ. (1996). Molecular and cellular aspects of the glucagon receptor: role in diabetes and metabolism. *Diabetes Metab* **22**, 373-396.
- Burcelin R, Mrejen C, Decaux JF, De Mouzon SH, Girard J & Charron MJ. (1998). In vivo and in vitro regulation of hepatic glucagon receptor mRNA concentration by glucose metabolism. *J Biol Chem* **273**, 8088-8093.

- Burguera B, Couce ME, Long J, Lamsam J, Laakso K, Jensen MD, Parisi JE & Lloyd RV. (2000). The long form of the leptin receptor (OB-Rb) is widely expressed in the human brain. *Neuroendocrinology* **71**, 187-195.
- Burnstock G. (2006). Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol Sci* **27**, 166-176.
- Cabrera O, Berman DM, Kenyon NS, Ricordi C, Berggren PO & 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.
- Cammisotto PG & Bukowiecki LJ. (2002). Mechanisms of leptin secretion from white adipocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* **283**, C244-250.
- Casabiell X, Pineiro V, Peino R, Lage M, Camina J, Gallego R, Vallejo LG, Dieguez C & Casanueva FF. (1998). Gender differences in both spontaneous and stimulated leptin secretion by human omental adipose tissue in vitro: dexamethasone and estradiol stimulate leptin release in women, but not in men. *J Clin Endocrinol Metab* **83**, 2149-2155.
- Ciudad C, Camici M, Ahmad Z, Wang Y, DePaoli-Roach AA & Roach PJ. (1984). Control of glycogen synthase phosphorylation in isolated rat hepatocytes by epinephrine, vasopressin and glucagon. *Eur J Biochem* **142**, 511-520.
- Coleman DL. (1973). Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice. *Diabetologia* **9**, 294-298.
- Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL & et al. (1996). Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* **334**, 292-295.

- Coutinho-Silva R, Parsons M, Robson T, Lincoln J & Burnstock G. (2003). P2X and P2Y purinoceptor expression in pancreas from streptozotocin-diabetic rats. *Mol Cell Endocrinol* **204**, 141-154.
- Coutinho-Silva R, Robson T, Beales PE & Burnstock G. (2007). Changes in expression of P2X7 receptors in NOD mouse pancreas during the development of diabetes. *Autoimmunity* **40**, 108-116.
- Covey SD, Wideman RD, McDonald C, Unniappan S, Huynh F, Asadi A, Speck M, Webber T, Chua SC & Kieffer TJ. (2006). The pancreatic beta cell is a key site for mediating the effects of leptin on glucose homeostasis. *Cell Metab* **4**, 291-302.
- Cryer PE. (2002). Hypoglycaemia: the limiting factor in the glycaemic management of Type I and Type II diabetes. *Diabetologia* **45**, 937-948.
- Cynober LA. (2002). Plasma amino acid levels with a note on membrane transport: characteristics, regulation, and metabolic significance. *Nutrition* **18**, 761-766.
- Chakravarty K, Cassuto H, Reshef L & Hanson RW. (2005). Factors that control the tissue-specific transcription of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase-C. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **40**, 129-154.
- Chapal J, Loubatieres-Mariani MM, Petit P & Roye M. (1985). Evidence for an A2-subtype adenosine receptor on pancreatic glucagon secreting cells. *Br J Pharmacol* **86**, 565-569.
- Chehab FF, Mounzih K, Lu R & Lim ME. (1997). Early Onset of Reproductive Function in Normal Female Mice Treated with Leptin. *Science* **275**, 88-90.
- Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ, Lakey ND, Culpepper J, Moore KJ, Breitbart RE, Duyk GM, Tepper RI & Morgenstern JP. (1996). Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell* **84**, 491-495.

- Christophe J. (1995). Glucagon receptors: from genetic structure and expression to effector coupling and biological responses. *Biochim Biophys Acta* **1241**, 45-57.
- Chua SC, Jr., Chung WK, Wu-Peng XS, Zhang Y, Liu SM, Tartaglia L & Leibel RL. (1996). Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor. *Science* **271**, 994-996.
- De Matteis R, Dashtipour K, Ognibene A & Cinti S. (1998). Localization of leptin receptor splice variants in mouse peripheral tissues by immunohistochemistry. *Proc Nutr Soc* **57**, 441-448.
- Detimary P, Dejonghe S, Ling Z, Pipeleers D, Schuit F & Henquin JC. (1998). The changes in adenine nucleotides measured in glucose-stimulated rodent islets occur in beta cells but not in alpha cells and are also observed in human islets. *J Biol Chem* **273**, 33905-33908.
- Dhillon H, Kalra SP, Prima V, Zolotukhin S, Scarpace PJ, Moldawer LL, Muzyczka N & Kalra PS. (2001). Central leptin gene therapy suppresses body weight gain, adiposity and serum insulin without affecting food consumption in normal rats: a long-term study. *Regulatory Peptides* **99**, 69-77.
- Doyle ME & Egan JM. (2003). Pharmacological agents that directly modulate insulin secretion. *Pharmacol Rev* **55**, 105-131.
- Drucker DJ. (2005). Biologic actions and therapeutic potential of the proglucagon-derived peptides. *Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism* **1**, 22-31.
- Dumonteil E, Magnan C, Ritz-Laser B, Ktorza A, Meda P & Philippe J. (2000). Glucose regulates proinsulin and prosomatostatin but not proglucagon messenger ribonucleic acid levels in rat pancreatic islets. *Endocrinology* **141**, 174-180.

- Emilsson V, Liu YL, Cawthorne MA, Morton NM & Davenport M. (1997). Expression of the functional leptin receptor mRNA in pancreatic islets and direct inhibitory action of leptin on insulin secretion. *Diabetes* **46**, 313-316.
- Fei H, Okano HJ, Li C, Lee GH, Zhao C, Darnell R & Friedman JM. (1997). Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 7001-7005.
- Fields RD & Burnstock G. (2006). Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nat Rev Neurosci* **7**, 423-436.
- Franklin I, Gromada J, Gjinovci A, Theander S & Wollheim CB. (2005). Beta-cell secretory products activate alpha-cell ATP-dependent potassium channels to inhibit glucagon release. *Diabetes* **54**, 1808-1815.
- Friedman JM & Halaas JL. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* **395**, 763-770.
- Fruhbeck G. (2006). Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem J* **393**, 7-20.
- Gao Q, Wolfgang MJ, Neschen S, Morino K, Horvath TL, Shulman GI & Fu X-Y. (2004). Disruption of neural signal transducer and activator of transcription 3 causes obesity, diabetes, infertility, and thermal dysregulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 4661-4666.
- Gedulin BR, Rink TJ & Young AA. (1997). Dose-response for glucagonostatic effect of amylin in rats. *Metabolism* **46**, 67-70.
- George SK, Uttenthal LO, Ghiglione M & Bloom SR. (1985). Molecular forms of glucagon-like peptides in man. *FEBS Lett* **192**, 275-278.

- Ghilardi N, Ziegler S, Wiestner A, Stoffel R, Heim MH & Skoda RC. (1996). Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 6231-6235.
- Gong Q, Kakei M, Koriyama N, Nakazaki M, Morimitsu S, Yaekura K & Tei C. (2000). P2Y-purinoceptor mediated inhibition of L-type Ca<sup>2+</sup> channels in rat pancreatic beta-cells. *Cell Struct Funct* **25**, 279-289.
- Gopel SO, Kanno T, Barg S, Eliasson L, Galvanovskis J, Renstrom E & Rorsman P. (1999). 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 SO, Kanno T, Barg S, Weng XG, Gromada J & Rorsman P. (2000). Regulation of glucagon release in mouse  $\beta$ -cells by KATP channels and inactivation of TTX-sensitive Na<sup>+</sup> channels. *J Physiol* **528**, 509-520.
- Grapengiesser E, Salehi A, Qader SS & Hellman B. (2006). Glucose induces glucagon release pulses antisynchronous with insulin and sensitive to purinoceptor inhibition. *Endocrinology* **147**, 3472-3477.
- Gravholt CH, Moller N, Jensen MD, Christiansen JS & Schmitz O. (2001). Physiological levels of glucagon do not influence lipolysis in abdominal adipose tissue as assessed by microdialysis. *J Clin Endocrinol Metab* **86**, 2085-2089.
- Greenbaum CJ, Prigeon RL & D'Alessio DA. (2002). Impaired beta-cell function, incretin effect, and glucagon suppression in patients with type 1 diabetes who have normal fasting glucose. *Diabetes* **51**, 951-957.
- Gremlich S, Bonny C, Waeber G & Thorens B. (1997). Fatty acids decrease IDX-1 expression in rat pancreatic islets and reduce GLUT2, glucokinase, insulin, and somatostatin levels. *J Biol Chem* **272**, 30261-30269.



- Gromada J, Bokvist K, Ding WG, Barg S, Buschard K, Renstrom E & Rorsman P. (1997). Adrenaline stimulates glucagon secretion in pancreatic A-cells by increasing the Ca<sup>2+</sup> current and the number of granules close to the L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *J Gen Physiol* **110**, 217-228.
- Gromada J, Franklin I & Wollheim CB. (2007). Alpha-cells of the endocrine pancreas: 35 years of research but the enigma remains. *Endocr Rev* **28**, 84-116.
- Gromada J, Hoy M, Buschard K, Salehi A & Rorsman P. (2001a). Somatostatin inhibits exocytosis in rat pancreatic alpha-cells by G(i2)-dependent activation of calcineurin and depriving of secretory granules. *J Physiol* **535**, 519-532.
- Gromada J, Hoy M, Olsen HL, Gotfredsen CF, Buschard K, Rorsman P & Bokvist K. (2001b). Gi2 proteins couple somatostatin receptors to low-conductance K<sup>+</sup> channels in rat pancreatic alpha-cells. *Pflugers Arch* **442**, 19-26.
- Gromada J, Ma X, Hoy M, Bokvist K, Salehi A, Berggren PO & 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.
- Gromada J & Rorsman P. (2004). New insights into the regulation of glucagon secretion by glucagon-like peptide-1. *Horm Metab Res* **36**, 822-829.
- Halaas JL GK, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM. (1995). Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* **269**, 543-546.
- Harvey J, McKenna F, Herson PS, Spanswick D & Ashford ML. (1997). Leptin activates ATP-sensitive potassium channels in the rat insulin-secreting cell line, CRI-G1. *J Physiol* **504 ( Pt 3)**, 527-535.

- Hayashi M, Yamada H, Uehara S, Morimoto R, Muroyama A, Yatsushiro S, Takeda J, Yamamoto A & Moriyama Y. (2003). Secretory granule-mediated co-secretion of L-glutamate and glucagon triggers glutamatergic signal transmission in islets of Langerhans. *J Biol Chem* **278**, 1966-1974.
- Hazama A, Hayashi S & Okada Y. (1998). Cell surface measurements of ATP release from single pancreatic beta cells using a novel biosensor technique. *Pflugers Arch* **437**, 31-35.
- Heimberg H, De Vos A, Moens K, Quartier E, Bouwens L, Pipeleers D, Van Schaffingen E, Madsen O & Schuit F. (1996). The glucose sensor protein glucokinase is expressed in glucagon-producing alpha-cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7036-7041.
- Hekerman P, Zeidler J, Bamberg-Lemper S, Knobelspies H, Lavens D, Tavernier J, Joost HG & Becker W. (2005). Pleiotropy of leptin receptor signalling is defined by distinct roles of the intracellular tyrosines. *Febs J* **272**, 109-119.
- Hervey GR. (1959). The effects of lesions in the hypothalamus in parabiotic rats. *J Physiol* **145**, 336-352.
- Herzig S, Long F, Jhala US, Hedrick S, Quinn R, Bauer A, Rudolph D, Schutz G, Yoon C, Puigserver P, Spiegelman B & Montminy M. (2001). CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature* **413**, 179-183.
- Hoggard N, Mercer JG, Rayner DV, Moar K, Trayhurn P & Williams LM. (1997). Localization of Leptin Receptor mRNA Splice Variants in Murine Peripheral Tissues by RT-PCR and in Situ Hybridization. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **232**, 383-387.
- Holst JJ, Bersani M, Johnsen AH, Kofod H, Hartmann B & Orskov C. (1994). Proglucagon processing in porcine and human pancreas. *J Biol Chem* **269**, 18827-18833.
- Hong J, Abudula R, Chen J, Jeppesen PB, Dyrskog SE, Xiao J, Colombo M & Hermansen K. (2005). The short-term effect of fatty acids on glucagon secretion is influenced by their

- chain length, spatial configuration, and degree of unsaturation: studies in vitro. *Metabolism* **54**, 1329-1336.
- Iglesias P, Diez JJ, Fernandez-Reyes MJ, Bajo MA, Aguilera A, Mendez J, Codoceo R & Selgas R. (2002). Effects of short-term recombinant human growth hormone therapy on plasma leptin concentrations in dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* **17**, 260-264.
- Ishihara H, Maechler P, Gjinovci A, Herrera PL & Wollheim CB. (2003). Islet beta-cell secretion determines glucagon release from neighbouring alpha-cells. *Nat Cell Biol* **5**, 330-335.
- Ishihara H, Wang H, Drewes LR & Wollheim CB. (1999). Overexpression of monocarboxylate transporter and lactate dehydrogenase alters insulin secretory responses to pyruvate and lactate in beta cells. *J Clin Invest* **104**, 1621-1629.
- Isse N, Ogawa Y, Tamura N, Masuzaki H, Mori K, Okazaki T, Satoh N, Shigemoto M, Yoshimasa Y, Nishi S, Hosoda K, Inazawa J & Nakao K. (1995). Structural Organization and Chromosomal Assignment of the Human obese Gene. *J Biol Chem* **270**, 27728-27733.
- Jensen MD, Heiling VJ & Miles JM. (1991). Effects of glucagon on free fatty acid metabolism in humans. *J Clin Endocrinol Metab* **72**, 308-315.
- Jiang G & Zhang BB. (2003). Glucagon and regulation of glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **284**, E671-678.
- Kaneko K, Shirohani T, Araki E, Matsumoto K, Taguchi T, Motoshima H, Yoshizato K, Kishikawa H & Shichiri M. (1999). Insulin inhibits glucagon secretion by the activation of PI3-kinase in In-R1-G9 cells. *Diabetes Res Clin Pract* **44**, 83-92.
- Kennedy GC. (1953). The Role of Depot Fat in the Hypothalamic Control of Food Intake in the Rat. *Proceedings of the Royal Society of London Series B - Biological Sciences* **140**, 578-592.

- Kieffer TJ & Habener JF. (2000). The adipoinsular axis: effects of leptin on pancreatic beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **278**, E1-E14.
- Kieffer TJ, Heller RS & Habener JF. (1996). Leptin receptors expressed on pancreatic beta-cells. *Biochem Biophys Res Commun* **224**, 522-527.
- Kieffer TJ, Heller RS, Leech CA, Holz GG & Habener JF. (1997). Leptin suppression of insulin secretion by the activation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in pancreatic beta-cells. *Diabetes* **46**, 1087-1093.
- Klein S CS, Mohamed-Ali V, Landt M. (1996). Adipose tissue leptin production and plasma leptin kinetics in humans. *Diabetes* **45(7)**, 984-987.
- Kleppisch T & Nelson MT. (1995). Adenosine activates ATP-sensitive potassium channels in arterial myocytes via A<sub>2</sub> receptors and cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 12441-12445.
- Kuhara T, Ikeda S, Ohneda A & Sasaki Y. (1991). Effects of intravenous infusion of 17 amino acids on the secretion of GH, glucagon, and insulin in sheep. *Am J Physiol* **260**, E21-26.
- Kumar U, Sasi R, Suresh S, Patel A, Thangaraju M, Metrakos P, Patel SC & Patel YC. (1999). Subtype-selective expression of the five somatostatin receptors (hSSTR1-5) in human pancreatic islet cells: a quantitative double-label immunohistochemical analysis. *Diabetes* **48**, 77-85.
- Kurland IJ & Pilkis SJ. (1995). Covalent control of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: insights into autoregulation of a bifunctional enzyme. *Protein Sci* **4**, 1023-1037.
- Laharrague P, Larrouy D, Fontanilles A-m, Truel N, Campfield A, Tenenbaum R, Galitzky J, Corberand JX, Penicaud L & Casteilla L. (1998). High expression of leptin by human bone marrow adipocytes in primary culture. *FASEB J* **12**, 747-752.

- Larsson H & Ahren B. (2000). Islet dysfunction in insulin resistance involves impaired insulin secretion and increased glucagon secretion in postmenopausal women with impaired glucose tolerance. *Diabetes Care* **23**, 650-657.
- Leclercq-Meyer V, Marchand J, Woussen-Colle MC, Giroix MH & Malaisse WJ. (1985). Multiple effects of leucine on glucagon, insulin, and somatostatin secretion from the perfused rat pancreas. *Endocrinology* **116**, 1168-1174.
- Lee G-H, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI & Friedman JM. (1996). Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* **379**, 632-635.
- Leung YM, Ahmed I, Sheu L, Tsushima RG, Diamant NE, Hara M & Gaisano HY. (2005). Electrophysiological characterization of pancreatic islet cells in the mouse insulin promoter-green fluorescent protein mouse. *Endocrinology* **146**, 4766-4775.
- Li Y, Cao X, Li LX, Brubaker PL, Edlund H & Drucker DJ. (2005). beta-Cell Pdx1 expression is essential for the glucoregulatory, proliferative, and cytoprotective actions of glucagon-like peptide-1. *Diabetes* **54**, 482-491.
- Liang Y, Bai G, Doliba N, Buettger C, Wang L, Berner DK & Matschinsky FM. (1996). Glucose metabolism and insulin release in mouse beta HC9 cells, as model for wild-type pancreatic beta-cells. *Am J Physiol* **270**, E846-857.
- Licinio J, Mantzoros C, Negrao AB, Cizza G, Wong ML, Bongiorno PB, Chrousos GP, Karp B, Allen C, Flier JS & Gold PW. (1997). Human leptin levels are pulsatile and inversely related to pituitary-adrenal function. *Nat Med* **3**, 575-579.
- Liu YJ, Vieira E & Gylfe E. (2004). A store-operated mechanism determines the activity of the electrically excitable glucagon-secreting pancreatic alpha-cell. *Cell Calcium* **35**, 357-365.

- Lollmann B, Gruninger S, Stricker-Krongrad A & Chiesi M. (1997). Detection and quantification of the leptin receptor splice variants Ob-Ra, b, and, e in different mouse tissues. *Biochem Biophys Res Commun* **238**, 648-652.
- Longuet C, Sinclair EM, Maida A, Baggio LL, Maziarz M, Charron MJ & Drucker DJ. (2008). The Glucagon Receptor Is Required for the Adaptive Metabolic Response to Fasting. *Cell Metabolism* **8**, 359-371.
- Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR & Lechler RI. (1998). Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature* **394**, 897-901.
- Luukkaa V, Pesonen U, Huhtaniemi I, Lehtonen A, Tilvis R, Tuomilehto J, Koulu M & Huupponen R. (1998). Inverse Correlation between Serum Testosterone and Leptin in Men. *J Clin Endocrinol Metab* **83**, 3243-3246.
- Ma X, Zhang Y, Gromada J, Sewing S, Berggren PO, Buschard K, Salehi A, Vikman J, Rorsman P & Eliasson L. (2005). Glucagon stimulates exocytosis in mouse and rat pancreatic alpha-cells by binding to glucagon receptors. *Mol Endocrinol* **19**, 198-212.
- MacDonald PE, De Marinis YZ, Ramracheya R, Salehi A, Ma X, Johnson PR, Cox R, Eliasson L & Rorsman P. (2007). A K ATP channel-dependent pathway within alpha cells regulates glucagon release from both rodent and human islets of Langerhans. *PLoS Biol* **5**, e143.
- MacDougald OA, Hwang CS, Fan H & Lane MD. (1995). Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 9034-9037.
- Madsen P, Knudsen LB, Wiberg FC & Carr RD. (1998). Discovery and structure-activity relationship of the first non-peptide competitive human glucagon receptor antagonists. *J Med Chem* **41**, 5150-5157.

- Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S & et al. (1995). Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* **1**, 1155-1161.
- Marcinkiewicz M, Ramla D, Seidah NG & Chretien M. (1994). Developmental expression of the prohormone convertases PC1 and PC2 in mouse pancreatic islets. *Endocrinology* **135**, 1651-1660.
- Martinez-Pinna J, Tolhurst G, Gurung IS, Vandenberg JI & Mahaut-Smith MP. (2004). Sensitivity limits for voltage control of P2Y receptor-evoked Ca<sup>2+</sup> mobilization in the rat megakaryocyte. *J Physiol* **555**, 61-70.
- McGirr R, Ejbick CE, Carter DE, Andrews JD, Nie Y, Friedman TC & Dhanvantari S. (2005). Glucose dependence of the regulated secretory pathway in alphaTC1-6 cells. *Endocrinology* **146**, 4514-4523.
- Miller RE. (1981). Pancreatic neuroendocrinology: peripheral neural mechanisms in the regulation of the Islets of Langerhans. *Endocr Rev* **2**, 471-494.
- Morash B, Li A, Murphy PR, Wilkinson M & Ur E. (1999). Leptin gene expression in the brain and pituitary gland. *Endocrinology* **140**, 5995-5998.
- Morioka T, Asilmaz E, Hu J, Dishinger JF, Kurpad AJ, Elias CF, Li H, Elmquist JK, Kennedy RT & Kulkarni RN. (2007). Disruption of leptin receptor expression in the pancreas directly affects beta cell growth and function in mice. *J Clin Invest* **117**, 2860-2868.
- Morrone M, De Matteis R, Palumbo C, Ferretti M, Villa I, Rubinacci A, Cinti S & Marotti G. (2004). In vivo leptin expression in cartilage and bone cells of growing rats and adult humans. *J Anat* **205**, 291-296.

- Morton NM, Emilsson V, de Groot P, Pallett AL & Cawthorne MA. (1999). Leptin signalling in pancreatic islets and clonal insulin-secreting cells. *J Mol Endocrinol* **22**, 173-184.
- Mulder H, Lindh AC & Sundler F. (1993). Islet amyloid polypeptide gene expression in the endocrine pancreas of the rat: a combined in situ hybridization and immunocytochemical study. *Cell Tissue Res* **274**, 467-474.
- Murakami T, Yamashita T, Iida M, Kuwajima M & Shima K. (1997). A short form of leptin receptor performs signal transduction. *Biochem Biophys Res Commun* **231**, 26-29.
- Muzzin P, Eisensmith RC, Copeland KC & Woo SLâC. (1996). Correction of obesity and diabetes in genetically obese mice by leptin gene therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 14804-14808.
- Nadal A, Quesada I & 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.
- Neerman-Arbez M, Cirulli V & Halban PA. (1994). Levels of the conversion endoproteases PC1 (PC3) and PC2 distinguish between insulin-producing pancreatic islet beta cells and non-beta cells. *Biochem J* **300 ( Pt 1)**, 57-61.
- Ning K, Miller LC, Laidlaw HA, Burgess LA, Perera NM, Downes CP, Leslie NR & Ashford ML. (2006). A novel leptin signalling pathway via PTEN inhibition in hypothalamic cell lines and pancreatic beta-cells. *Embo J* **25**, 2377-2387.
- Ogawa Y, Masuzaki H, Isse N, Okazaki T, Mori K, Shigemoto M, Satoh N, Tamura N, Hosoda K, Yoshimasa Y & et al. (1995). Molecular cloning of rat obese cDNA and augmented gene expression in genetically obese Zucker fatty (fa/fa) rats. *J Clin Invest* **96**, 1647-1652.



- Olofsson CS, Salehi A, Gopel SO, Holm C & Rorsman P. (2004). Palmitate stimulation of glucagon secretion in mouse pancreatic alpha-cells results from activation of L-type calcium channels and elevation of cytoplasmic calcium. *Diabetes* **53**, 2836-2843.
- Olsen HL, Theander S, Bokvist K, Buschard K, Wollheim CB & Gromada J. (2005). Glucose stimulates glucagon release in single rat alpha-cells by mechanisms that mirror the stimulus-secretion coupling in beta-cells. *Endocrinology* **146**, 4861-4870.
- Orskov C, Holst JJ, Knuhtsen S, Baldissera FG, Poulsen SS & Nielsen OV. (1986). Glucagon-like peptides GLP-1 and GLP-2, predicted products of the glucagon gene, are secreted separately from pig small intestine but not pancreas. *Endocrinology* **119**, 1467-1475.
- Panagiotidis G, Salehi AA, Westermark P & Lundquist I. (1992). Homologous islet amyloid polypeptide: effects on plasma levels of glucagon, insulin and glucose in the mouse. *Diabetes Res Clin Pract* **18**, 167-171.
- Paolucci M, Buono S, Sciarrillo R & Putti R. (2006). Effects of leptin administration on the endocrine pancreas and liver in the lizard *Podarcis sicula*. *J Exp Zool A Comp Exp Biol* **305**, 383-395.
- Papaccio G. (1993). Insulinitis and islet microvasculature in type 1 diabetes. *Histol Histopathol* **8**, 751-759.
- Parker JC, Andrews KM, Allen MR, Stock JL & McNeish JD. (2002). Glycemic control in mice with targeted disruption of the glucagon receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun* **290**, 839-843.
- Paty BW, Ryan EA, Shapiro AMJ, Lakey JRT & Robertson RP. (2002). Intrahepatic Islet Transplantation in Type 1 Diabetic Patients Does Not Restore Hypoglycemic Hormonal Counterregulation or Symptom Recognition After Insulin Independence. *Diabetes* **51**, 3428-3434.

- Patzelt C & Schiltz E. (1984). Conversion of proglucagon in pancreatic alpha cells: the major endproducts are glucagon and a single peptide, the major proglucagon fragment, that contains two glucagon-like sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 5007-5011.
- Patzelt C, Tager HS, Carroll RJ & Steiner DF. (1979). Identification and processing of proglucagon in pancreatic islets. *Nature* **282**, 260-266.
- Pearson PY, O'Connor DM & Schwartz MZ. (2001). Novel Effect of Leptin on Small Intestine Adaptation. *Journal of Surgical Research* **97**, 192-195.
- Pereverzev A, Salehi A, Mikhna M, Renström E, Hescheler J, Weiergräber M, Smyth N & Schneider T. (2005). The ablation of the Cav2.3/E-type voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel causes a mild phenotype despite an altered glucose induced glucagon response in isolated islets of Langerhans. *European Journal of Pharmacology* **511**, 65-72.
- Pertusa JA, Neshher R, Kaiser N, Cerasi E, Henquin JC & Jonas JC. (2002). Increased glucose sensitivity of stimulus-secretion coupling in islets from *Psammomys obesus* after diet induction of diabetes. *Diabetes* **51**, 2552-2560.
- Philippe J. (1991). Structure and pancreatic expression of the insulin and glucagon genes. *Endocr Rev* **12**, 252-271.
- Pilkis SJ, El-Maghrabi MR, McGrane M, Pilkis J & Claus TH. (1982). Regulation by glucagon of hepatic pyruvate kinase, 6-phosphofructo 1-kinase, and fructose-1,6-bisphosphatase. *Fed Proc* **41**, 2623-2628.
- Pipeleers DG, Schuit FC, Van Schravendijk CF & Van de Winkel M. (1985). Interplay of nutrients and hormones in the regulation of glucagon release. *Endocrinology* **117**, 817-823.
- Piper ML, Unger EK, Myers MG, Jr. & Xu AW. (2008). Specific Physiological Roles for Signal Transducer and Activator of Transcription 3 in Leptin Receptor-Expressing Neurons. *Mol Endocrinol* **22**, 751-759.

- Poulsen CR, Bokvist K, Olsen HL, Hoy M, Capito K, Gilon P & Gromada J. (1999). Multiple sites of purinergic control of insulin secretion in mouse pancreatic beta-cells. *Diabetes* **48**, 2171-2181.
- Prentki M & Matschinsky FM. (1987). Ca<sup>2+</sup>, cAMP, and phospholipid-derived messengers in coupling mechanisms of insulin secretion. *Physiol Rev* **67**, 1185-1248.
- Quesada I, Nadal A & 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 MG, Alonso-Magdalena P, Beltra M, Carneiro EM, Martin F, Nadal A & Soria B. (2006a). 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.
- Quesada I, Todorova MG & Soria B. (2006b). Different metabolic responses in alpha-, beta-, and delta-cells of the islet of Langerhans monitored by redox confocal microscopy. *Biophys J* **90**, 2641-2650.
- Quoix N, Cheng-Xue R, Mattart L, Zeinoun Z, Guiot Y, Beauvois MC, Henquin JC & Gilon P. (2009). Glucose and pharmacological modulators of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels control [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> by different mechanisms in isolated mouse alpha-cells. *Diabetes* **58**, 412-421.
- Qureshi SA, Rios Candelore M, Xie D, Yang X, Tota LM, Ding VD, Li Z, Bansal A, Miller C, Cohen SM, Jiang G, Brady E, Saperstein R, Duffy JL, Tata JR, Chapman KT, Moller DE & Zhang BB. (2004). A novel glucagon receptor antagonist inhibits glucagon-mediated biological effects. *Diabetes* **53**, 3267-3273.
- Ralevic V & Burnstock G. (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* **50**, 413-492.

- Ravier MA & Rutter GA. (2005). Glucose or insulin, but not zinc ions, inhibit glucagon secretion from mouse pancreatic alpha-cells. *Diabetes* **54**, 1789-1797.
- Reaven GM, Chen YD, Golay A, Swislocki AL & Jaspan JB. (1987). Documentation of hyperglucagonemia throughout the day in nonobese and obese patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* **64**, 106-110.
- Reddy S, Lau EM & Ross JM. (2004). Immunohistochemical demonstration of leptin in pancreatic islets of non-obese diabetic and CD-1 mice: co-localization in glucagon cells and its attenuation at the onset of diabetes. *J Mol Histol* **35**, 511-519.
- Rocha DM, Faloona GR & Unger RH. (1972). Glucagon-stimulating activity of 20 amino acids in dogs. *J Clin Invest* **51**, 2346-2351.
- Rorsman P & Hellman B. (1988). Voltage-activated currents in guinea pig pancreatic alpha 2 cells. Evidence for Ca<sup>2+</sup>-dependent action potentials. *J Gen Physiol* **91**, 223-242.
- Rorsman P, Salehi SA, Abdulkader F, Braun M & MacDonald PE. (2008). K(ATP)-channels and glucose-regulated glucagon secretion. *Trends Endocrinol Metab* **19**, 277-284.
- Rossi J, Santamaki P, Airaksinen MS & Herzig KH. (2005). Parasympathetic innervation and function of endocrine pancreas requires the glial cell line-derived factor family receptor alpha2 (GFRalpha2). *Diabetes* **54**, 1324-1330.
- Rouille Y, Westermark G, Martin SK & Steiner DF. (1994). Proglucagon is processed to glucagon by prohormone convertase PC2 in alpha TC1-6 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 3242-3246.
- Sahu A. (2003). Leptin signaling in the hypothalamus: emphasis on energy homeostasis and leptin resistance. *Front Neuroendocrinol* **24**, 225-253.

- Salehi A, Dornonville de la Cour C, Hakanson R & Lundquist I. (2004). Effects of ghrelin on insulin and glucagon secretion: a study of isolated pancreatic islets and intact mice. *Regul Pept* **118**, 143-150.
- Samols E, Stagner JI, Ewart RB & 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.
- Sanchez-Andres JV, Gomis A & Valdeolmillos M. (1995). The electrical activity of mouse pancreatic beta-cells recorded in vivo shows glucose-dependent oscillations. *J Physiol* **486 ( Pt 1)**, 223-228.
- Scopsi L, Gullo M, Rilke F, Martin S & Steiner DF. (1995). Proprotein convertases (PC1/PC3 and PC2) in normal and neoplastic human tissues: their use as markers of neuroendocrine differentiation. *J Clin Endocrinol Metab* **80**, 294-301.
- Schuit F, De Vos A, Farfari S, Moens K, Pipeleers D, Brun T & Prentki M. (1997). Metabolic fate of glucose in purified islet cells. Glucose-regulated anaplerosis in beta cells. *J Biol Chem* **272**, 18572-18579.
- Schuit FC, Derde MP & Pipeleers DG. (1989). Sensitivity of rat pancreatic A and B cells to somatostatin. *Diabetologia* **32**, 207-212.
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Seeley RJ & Baskin DG. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature* **404**, 661-671.
- Sekine N, Cirulli V, Regazzi R, Brown LJ, Gine E, Tamarit-Rodriguez J, Girotti M, Marie S, MacDonald MJ & Wollheim CB. (1994). Low lactate dehydrogenase and high mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase in pancreatic beta-cells. Potential role in nutrient sensing. *J Biol Chem* **269**, 4895-4902.

- Senaris R, Garcia-Caballero T, Casabiell X, Gallego R, Castro R, Considine RV, Dieguez C & Casanueva FF. (1997). Synthesis of Leptin in Human Placenta. *Endocrinology* **138**, 4501-4504.
- Seufert J. (2004). Leptin effects on pancreatic beta-cell gene expression and function. *Diabetes* **53 Suppl 1**, S152-158.
- Seufert J, Kieffer TJ & Habener JF. (1999a). Leptin inhibits insulin gene transcription and reverses hyperinsulinemia in leptin-deficient ob/ob mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 674-679.
- Seufert J, Kieffer TJ, Leech CA, Holz GG, Moritz W, Ricordi C & Habener JF. (1999b). Leptin suppression of insulin secretion and gene expression in human pancreatic islets: implications for the development of adipogenic diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* **84**, 670-676.
- Shah P, Basu A, Basu R & Rizza R. (1999). Impact of lack of suppression of glucagon on glucose tolerance in humans. *Am J Physiol* **277**, E283-290.
- Sinha MK, Ohannesian JP, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Magosin S, Marco C & Caro JF. (1996a). Nocturnal rise of leptin in lean, obese, and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects. *J Clin Invest* **97**, 1344-1347.
- Sinha MK, Opentanova I, Ohannesian JP, Kolaczynski JW, Heiman ML, Hale J, Becker GW, Bowsher RR, Stephens TW & Caro JF. (1996b). Evidence of free and bound leptin in human circulation. Studies in lean and obese subjects and during short-term fasting. *J Clin Invest* **98**, 1277-1282.
- Slavin BG, Ong JM & Kern PA. (1994). Hormonal regulation of hormone-sensitive lipase activity and mRNA levels in isolated rat adipocytes. *J Lipid Res* **35**, 1535-1541.

- Sloop KW, Cao JX, Siesky AM, Zhang HY, Bodenmiller DM, Cox AL, Jacobs SJ, Moyers JS, Owens RA, Showalter AD, Brenner MB, Raap A, Gromada J, Berridge BR, Monteith DK, Porksen N, McKay RA, Monia BP, Bhanot S, Watts LM & Michael MD. (2004). Hepatic and glucagon-like peptide-1-mediated reversal of diabetes by glucagon receptor antisense oligonucleotide inhibitors. *J Clin Invest* **113**, 1571-1581.
- Smith-Kirwin SM, O'Connor DM, Johnston J, de Lancy E, Hassink SG & Funanage VL. (1998). Leptin Expression in Human Mammary Epithelial Cells and Breast Milk. *J Clin Endocrinol Metab* **83**, 1810-.
- Sorensen H, Brand CL, Neschen S, Holst JJ, Fosgerau K, Nishimura E & Shulman GI. (2006). Immunoneutralization of endogenous glucagon reduces hepatic glucose output and improves long-term glycemic control in diabetic ob/ob mice. *Diabetes* **55**, 2843-2848.
- Spagnoli D, Dobrosielski-Vergona K & Widnell CC. (1983). Effects of hormones on the activity of glucose-6-phosphatase in primary cultures of rat hepatocytes. *Arch Biochem Biophys* **226**, 182-189.
- Spanswick D, Smith MA, Groppi VE, Logan SD & Ashford ML. (1997). Leptin inhibits hypothalamic neurons by activation of ATP-sensitive potassium channels. *Nature* **390**, 521-525.
- Striffler JS, Garfield SA, Cardell EL & Cardell RR. (1984). Effects of glucagon on hepatic microsomal glucose-6-phosphatase in vivo. *Diabete Metab* **10**, 91-97.
- Suckale J SM. (2008). Pancreas islets in metabolic signaling--focus on the beta-cell. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **1**, 7156-7171.
- Suzuki M, Fujikura K, Inagaki N, Seino S & Takata K. (1997). Localization of the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel subunit Kir6.2 in mouse pancreas. *Diabetes* **46**, 1440-1444.

- Tajima D, Masaki T, Hidaka S, Kakuma T, Sakata T & Yoshimatsu H. (2005). Acute Central Infusion of Leptin Modulates Fatty Acid Mobilization by Affecting Lipolysis and mRNA Expression for Uncoupling Proteins. *Experimental Biology and Medicine* **230**, 200-206.
- Takahashi E, Ito M, Miyamoto N, Nagasu T, Ino M & Tanaka I. (2005). Increased glucose tolerance in N-type Ca<sup>2+</sup> channel alpha(1B)-subunit gene-deficient mice. *Int J Mol Med* **15**, 937-944.
- Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA & Tepper RI. (1995). Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* **83**, 1263-1271.
- Tong Q, Ouedraogo R & Kirchgessner AL. (2002). Localization and function of group III metabotropic glutamate receptors in rat pancreatic islets. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282**, E1324-1333.
- Uehara S, Muroyama A, Echigo N, Morimoto R, Otsuka M, Yatsushiro S & Moriyama Y. (2004). Metabotropic glutamate receptor type 4 is involved in autoinhibitory cascade for glucagon secretion by alpha-cells of islet of Langerhans. *Diabetes* **53**, 998-1006.
- Unson CG. (2002). Molecular determinants of glucagon receptor signaling. *Biopolymers* **66**, 218-235.
- Valdeolmillos M, Nadal A, Soria B & 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.
- Valdeolmillos M, Santos RM, Contreras D, Soria B & Rosario LM. (1989). Glucose-induced oscillations of intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration resembling bursting electrical activity in single mouse islets of Langerhans. *FEBS Lett* **259**, 19-23.



- Vickers MH, Reddy S, Ikenasio BA & Breier BH. (2001). Dysregulation of the adipoinsular axis -- a mechanism for the pathogenesis of hyperleptinemia and adipogenic diabetes induced by fetal programming. *J Endocrinol* **170**, 323-332.
- Vieira E, Salehi A & Gylfe E. (2007). Glucose inhibits glucagon secretion by a direct effect on mouse pancreatic alpha cells. *Diabetologia* **50**, 370-379.
- Vignali S, Leiss V, Karl R, Hofmann F & Welling A. (2006). Characterization of voltage-dependent sodium and calcium channels in mouse pancreatic A- and B-cells. *J Physiol* **572**, 691-706.
- Vons C, Pegorier JP, Girard J, Kohl C, Ivanov MA & Franco D. (1991). Regulation of fatty-acid metabolism by pancreatic hormones in cultured human hepatocytes. *Hepatology* **13**, 1126-1130.
- Wang J, Liu R, Hawkins M, Barzilai N & Rossetti L. (1998). A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature* **393**, 684-688.
- Wendt A, Birnir B, Buschard K, Gromada J, Salehi A, Sewing S, Rorsman P & Braun M. (2004). Glucose inhibition of glucagon secretion from rat alpha-cells is mediated by GABA released from neighboring beta-cells. *Diabetes* **53**, 1038-1045.
- White DW & Tartaglia LA. (1999). Evidence for ligand-independent homo-oligomerization of leptin receptor (OB-R) isoforms: a proposed mechanism permitting productive long-form signaling in the presence of excess short-form expression. *J Cell Biochem* **73**, 278-288.
- Xu E, Kumar M, Zhang Y, Ju W, Obata T, Zhang N, Liu S, Wendt A, Deng S, Ebina Y, Wheeler MB, Braun M & Wang Q. (2006). Intra-islet insulin suppresses glucagon release via GABA-GABAA receptor system. *Cell Metabolism* **3**, 47-58.

- Yamada K & Noguchi T. (1999). Nutrient and hormonal regulation of pyruvate kinase gene expression. *Biochem J* **337** ( Pt 1), 1-11.
- Yoon JC, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z, Rhee J, Adelmant G, Stafford J, Kahn CR, Granner DK, Newgard CB & Spiegelman BM. (2001). Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature* **413**, 131-138.
- Yoshimoto Y, Fukuyama Y, Horio Y, Inanobe A, Gotoh M & Kurachi Y. (1999). Somatostatin induces hyperpolarization in pancreatic islet alpha cells by activating a G protein-gated K<sup>+</sup> channel. *FEBS Lett* **444**, 265-269.
- Yu X, Park B-H, Wang M-Y, Wang ZV & Unger RH. (2008). Making insulin-deficient type 1 diabetic rodents thrive without insulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 14070-14075.
- Zhang F, Basinski MB, Beals JM, Briggs SL, Churgay LM, Clawson DK, DiMarchi RD, Furman TC, Hale JE, Hsiung HM, Schoner BE, Smith DP, Zhang XY, Wery JP & Schevitz RW. (1997). Crystal structure of the obese protein leptin-E100. *Nature* **387**, 206-209.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L & Friedman JM. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**, 425-432.
- Zhang Y, Zhang N, Gyulkhandanyan A, Xu E, Gaisano H, Wheeler M & Wang Q. (2008). Presence of functional hyperpolarisation-activated cyclic nucleotide-gated channels in clonal alpha cell lines and rat islet alpha cells. *Diabetologia* **51**, 2290-2298.
- Zhao AZ, Bornfeldt KE & Beavo JA. (1998). Leptin inhibits insulin secretion by activation of phosphodiesterase 3B. *J Clin Invest* **102**, 869-873.
- Zhao AZ, Shinohara MM, Huang D, Shimizu M, Eldar-Finkelman H, Krebs EG, Beavo JA & Bornfeldt KE. (2000). Leptin induces insulin-like signaling that antagonizes cAMP elevation by glucagon in hepatocytes. *J Biol Chem* **275**, 11348-11354.

---

Zhao C, Wilson MC, Schuit F, Halestrap AP & Rutter GA. (2001). Expression and distribution of lactate/monocarboxylate transporter isoforms in pancreatic islets and the exocrine pancreas. *Diabetes* **50**, 361-366.







## **ANEXO I**



**Eva Tudurí, Eliane Filiputti, Everardo M. Carneiro and Ivan Quesada**

*Am J Physiol Endocrinol Metab* 294:952-960, 2008. First published Mar 18, 2008;

doi:10.1152/ajpendo.00641.2007

**You might find this additional information useful...**

---

Supplemental material for this article can be found at:

<http://ajpendo.physiology.org/cgi/content/full/00641.2007/DC1>

This article cites 50 articles, 22 of which you can access free at:

<http://ajpendo.physiology.org/cgi/content/full/294/5/E952#BIBL>

Updated information and services including high-resolution figures, can be found at:

<http://ajpendo.physiology.org/cgi/content/full/294/5/E952>

Additional material and information about *AJP - Endocrinology and Metabolism* can be found at:

<http://www.the-aps.org/publications/ajpendo>

---

This information is current as of September 21, 2008 .



## Inhibition of $\text{Ca}^{2+}$ signaling and glucagon secretion in mouse pancreatic $\alpha$ -cells by extracellular ATP and purinergic receptors

Eva Tudurí,<sup>1,2</sup> Eliane Filiputti,<sup>3</sup> Everardo M. Carneiro,<sup>3</sup> and Ivan Quesada<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Bioengineering, Miguel Hernandez University, Elche, Spain; <sup>2</sup>CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas, Instituto de Salud Carlos III, Spain; and <sup>3</sup>Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biology, Unicamp, Campinas São Paulo, São Paulo, Brazil

Submitted 3 October 2007; accepted in final form 14 March 2008

**Tudurí E, Filiputti E, Carneiro EM, Quesada I.** Inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$  signaling and glucagon secretion in mouse pancreatic  $\alpha$ -cells by extracellular ATP and purinergic receptors. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294: E952–E960, 2008. First published March 18, 2008; doi:10.1152/ajpendo.00641.2007.—Glucagon secreted from pancreatic  $\alpha$ -cells plays a critical role in glycemia, mainly by hepatic glucose mobilization. In diabetic patients, an impaired control of glucagon release can worsen glucose homeostasis. Despite its importance, the mechanisms that regulate its secretion are still poorly understood. Since  $\alpha$ -cells are particularly sensitive to neural and paracrine factors, in this report we studied the role of purinergic receptors and extracellular ATP, which can be released from nerve terminals and  $\beta$ -cell secretory granules. Using immunocytochemistry, we identified in  $\alpha$ -cells the P2 receptor subtype  $\text{P2Y}_1$ , as well as the P1 receptors  $\text{A}_1$  and  $\text{A}_{2A}$ . In contrast, only  $\text{P2Y}_1$  and  $\text{A}_1$  receptors were localized in  $\beta$ -cells. To analyze the role of purinergic receptors in  $\alpha$ -cell function, we studied their participation in  $\text{Ca}^{2+}$  signaling. At low glucose concentrations, mouse  $\alpha$ -cells exhibited the characteristic oscillatory  $\text{Ca}^{2+}$  signals that lead to secretion. Application of ATP (1–10  $\mu\text{M}$ ) abolished these oscillations or reduced their frequency in  $\alpha$ -cells within intact islets and isolated in culture. ATP $\gamma\text{S}$ , a nonhydrolyzable ATP derivative, indicated that the ATP effect was mainly direct rather than through ATP-hydrolytic products. Additionally, adenosine (1–10  $\mu\text{M}$ ) was also found to reduce  $\text{Ca}^{2+}$  signals. ATP-mediated inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$  signaling was accompanied by a decrease in glucagon release from intact islets in contrast to the adenosine effect. Using pharmacological agonists, we found that only  $\text{P2Y}_1$  and  $\text{A}_{2A}$  were likely involved in the inhibitory effect on  $\text{Ca}^{2+}$  signaling. All these findings indicate that extracellular ATP and purinergic stimulation are effective regulators of the  $\alpha$ -cell function.

confocal microscopy; islets; paracrine communication

THE HYPERGLYCEMIC HORMONE glucagon, produced and secreted by pancreatic  $\alpha$ -cells, plays a critical role in the maintenance of blood glucose homeostasis, mainly by enhancing glucose synthesis and mobilization in/from the liver (9, 10, 19). Glucagon counterbalances the insulin effect on glucose homeostasis and protects from hypoglycemia and its potential consequences (9, 10, 19). As a matter of fact, an impaired response in glucagon secretion can be a major problem in diabetic individuals treated with insulin. On the other hand, diabetic patients can present an uncontrolled glucagon release, which can aggravate the hyperglycemia derived from  $\beta$ -cell malfunction (9, 46). Since the lack of suppression of glucagon release can be a major contributor to hyperglycemia, it has been indicated that suppres-

sors of  $\alpha$ -cell secretion may be useful treating type 2 diabetic patients (10, 46).

Despite the importance of this hormone in controlling glycemia, many important gaps remain in the understanding of  $\alpha$ -cell physiology (19). Most of the data concerning  $\alpha$ -cells derive from pancreas and islet secretion studies, yet there is not much information at the cellular level. This is partly due to the scarcity of this cell type in the islet, the lack of identification patterns, and also the technical limitations of conventional methods. In recent years, novel technical approaches based on imaging and electrophysiology have allowed further studies (15, 33, 38, 45) of  $\alpha$ -cell function, especially within the intact islet, a study model the behavior of which is closer to the physiological scenario compared with isolated islet cells or cell lines. Electrical activity,  $\text{Ca}^{2+}$  signaling, and glucagon release are all stimulated with low glucose concentrations in the  $\alpha$ -cell within the islet. However, these cellular events are inhibited when glucose levels rise (15, 31, 33, 38). This inhibitory effect has been attributed to both a direct action of the sugar and to paracrine mechanisms (19, 21, 29, 31). In this regard, several paracrine factors from  $\beta$ -cells have been revealed as potent suppressors of glucagon secretion. Although with interspecies differences, insulin, zinc, and GABA affect  $\alpha$ -cells at different levels inhibiting glucagon release (13, 27, 42, 51).

In addition to the above-mentioned paracrine signaling molecules, other extracellular messengers could also regulate  $\alpha$ -cell secretion. ATP is highly accumulated in synaptic vesicles of nerve terminals within the islet (up to 10 mM) as well as in insulin secretory granules (up to 1 mM; Refs. 4, 12, 26, 30, 41). Once released, extracellular ATP can reach concentrations of tens of micromolar or higher on the islet cells surface (23). Additionally, ATP molecules can be converted by plasma membrane ectonucleotidases into ATP metabolites or adenosine, subsequently activating multiple purinergic receptors and inducing a plethora of effects (12). While ATP binds to plasma membrane P2 receptors, adenosine activates P1 receptors (12, 41). The role of these extracellular messengers in the islet of Langerhans has been emphasized by the presence of several purinergic receptors and the rich innervation within the islet (3, 7, 32). Additionally, it has been proposed that neural ATP release could be involved in the coordination of islet function and the pulsatility of insulin release (16, 24, 44). The regulatory effect of extracellular ATP on the electrical activity,  $\text{Ca}^{2+}$  signals, and insulin secretion has been proven in mouse, rat, and human  $\beta$ -cells (11, 24, 36, 44). In the case of the

Address for reprint requests and other correspondence: Ivan Quesada, Institute of Bioengineering, Miguel Hernandez Univ., Avenida de la Universidad, s/n, 03202 Elche, Spain (e-mail: ivanq@umh.es).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.



$\alpha$ -cell, secretion experiments with perfused rat pancreas indicated that, whereas ATP does not have a direct effect, adenosine can promote glucagon release (6, 35). However, the effect of purinergic stimulation on  $\alpha$ -cell function has not been analyzed at the cellular level. In the present study, we identify the presence of the ATP and adenosine purinergic receptors P2Y<sub>1</sub>, A<sub>1</sub>, and A<sub>2A</sub> in mouse  $\alpha$ -cells, as well as indicate their possible function. We demonstrate that extracellular ATP and adenosine are important inhibitors of Ca<sup>2+</sup> signaling in the  $\alpha$ -cell and also that, unlike adenosine, ATP produces a significant suppression of glucagon release. All these results reveal a complex purinergic signaling pathway in this islet cell type and indicate an important role in the regulation of glucagon secretion, which could be of therapeutic interest in diabetes management.

## MATERIALS AND METHODS

**Islet isolation and probe loading.** All protocols were approved by the Animal Care Committee of the Miguel Hernandez University in accordance with the Spanish regulations and laws for animal experimentation. Swiss albino OF1 mice (8- to 10-wk-old) were killed by cervical dislocation, and pancreatic islets were then isolated by collagenase digestion as described previously (33, 37, 40). As previously reported (33, 38), single islets were loaded with 5  $\mu$ M of the acetoxymethyl form of the Ca<sup>2+</sup> probe fluo 3 (Molecular Probes; Leiden, The Netherlands) for at least 1 h at room temperature in a medium containing (mM): 115 NaCl; 10 NaHCO<sub>3</sub>; 5 KCl; 1.1 MgCl<sub>2</sub>; 1.2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2.5 CaCl<sub>2</sub>; 25 HEPES; 1 % BSA; and 5 D-glucose, pH 7.4. All experiments were carried out at 37°C.

In some experiments, isolated islets were dispersed into single cells and clusters by enzymatic digestion in the presence of 0.05% trypsin and 0.02% EDTA for 2 min (37, 40). Isolated cells were plated onto poly-L-lysine-treated coverslips and cultured at 37°C in RPMI 1640 (Sigma, Madrid, Spain), supplemented with 10% FCS, 100 IU/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin, and 5.6 mM D-glucose (37, 40). After 24 h, cells were loaded with 4  $\mu$ M fluo 3 for 1 h at 37°C.

**Imaging Ca<sup>2+</sup> signals by confocal microscopy.** For imaging experiments, islets were placed on a perfusion chamber mounted on the microscope stage and attached onto poly-L-lysine-treated coverslips for 10 min before the experiments were commenced. Islets were then perfused at a rate of 1.5 ml/min with a modified Ringer solution containing (mM): 120 NaCl, 5 KCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 1.1 MgCl<sub>2</sub>, and 2.5 CaCl<sub>2</sub> pH 7.4, gassed with 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>. Ca<sup>2+</sup> signals were monitored in individual cells within the islets using a Zeiss LSM 510 laser confocal microscope equipped with a  $\times$ 40 oil immersion objective (numerical aperture = 1.3). The system configuration was set to excite the Ca<sup>2+</sup> probe at 488 nm and collect the emission with a bandpass filter at 505–530 nm from an optical section of 8  $\mu$ m. Images were collected at 2-s intervals. Temporal series were treated with a low pass filter and processed using the digital image software of the confocal microscope (33, 38, 39). Individual cells loaded with fluo 3 were easily identified at the periphery of the islet (see Fig. 2A). It has been previously reported (33, 38, 39) in islets as well as in other specimens that the fluorescent probes have difficulties penetrating the center of thick samples. However, this is not a problem since all the cell types are represented in the peripheral layers of the islet (5, 33, 39, 43). Pancreatic  $\alpha$ -cells were functionally identified by their characteristic oscillatory Ca<sup>2+</sup> signal at low glucose concentrations (2, 31, 33, 38, 39, 42, 47). In culture experiments, single  $\alpha$ -cells were further identified by their response to epinephrine (18, 29).

**Statistical analysis and data representation of Ca<sup>2+</sup> records.** Fluorescence records were represented as the percentage of  $\Delta F/F_0$ , where F<sub>0</sub> is the fluorescence signal at the beginning of a record and  $\Delta F$  is F–F<sub>0</sub>. Background fluorescence was subtracted from F<sub>0</sub>. The frequency of oscillatory Ca<sup>2+</sup> signals was calculated over a 5-min period of the Ca<sup>2+</sup> record, immediately before and 5 min after the application

of the stimulus. The effect of the stimulus on frequency was calculated 5 min after its application to allow its diffusion via the perfusion system and equilibration in the cell chamber. To analyze frequency, a Ca<sup>2+</sup> oscillation or spike was defined as a rapid increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration higher than twice the standard deviation of the background signal at the intervals between spikes (33, 40, 43). Some data were also expressed in percentages with respect to the frequency before the stimulus. Although in some cells purinergic stimulation also produced a decrease in the Ca<sup>2+</sup> signal amplitude, this parameter was not as consistent as the change in frequency. Additionally, Ca<sup>2+</sup> signal amplitude cannot be measured reliably with one-wavelength measurements due to potential artifacts such as probe photobleaching or dye leakage. Some data are shown as means  $\pm$  SE. Student's *t*-test was performed with commercial software (SigmaPlot, Jandel, San Rafael, CA).

**Glucagon secretion.** Batches of 15 islets were preincubated for 60 min at 37°C in 0.5 ml of Krebs-Ringer bicarbonate buffer supplemented with 15 mM HEPES, 0.5% BSA, and 5.6 mM glucose, pH 7.4 (25). Then, islets were incubated at 37°C for 60 min with Krebs-Ringer bicarbonate buffer supplemented with 0.5 mM glucose and additional reagents as indicated in RESULTS (see Figs. 3 and 4). At the end of the incubation, the medium was aspirated and assayed for glucagon using a commercial radioimmunoassay kit (GL-32K; Linco Research, St. Charles, MO). Glucagon release from intact islets was represented as described previously (25).

**Immunocytochemistry.** Isolated cells were plated onto poly-L-lysine-treated coverslips and cultured at 37°C for 4 h. Then, cells were washed with PBS and fixed with Bouin's solution for 5 min. After being washed with PBS, they were dehydrated for 3 min with 30, 50, and 70% ethanol. Then, cells were permeabilized with 0.5% Triton X-100 and washed again with PBS. To reduce nonspecific antibody binding, cells were first preincubated with a blocking buffer (5% rabbit and donkey serum in PBS) for 45 min at room temperature before application of primary antibodies in a buffer containing 1% rabbit and donkey serum. For the identification of  $\alpha$ - and  $\beta$ -cells, we used monoclonal antibodies anti-insulin or anti-glucagon (1:200 dilution; Sigma). For the identification of the different receptor subtypes, we used polyclonal goat antibodies anti-A<sub>1</sub>, anti-A<sub>2A</sub>, or anti-P2Y<sub>1</sub> (1:100 dilution; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). All these antibodies were applied overnight at 4°C. After being washed, secondary antibodies conjugated with Alexa fluor dyes (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) were applied for 2 h at room temperature in a buffer containing 1% rabbit and donkey serum. A rabbit anti-mouse antibody (1:500 dilution; Alexa fluor 546) was used for insulin or glucagon, and a donkey anti-goat antibody (1:500 dilution; Alexa fluor 488) was used for purinergic receptors. Images were acquired using the same confocal system with an optical section of 4  $\mu$ m. The omission of the first antibody led to the absence of staining in all the cases. To prove the specificity of antibodies against purinergic receptors, different blocking peptides were used in control experiments (Supplemental Fig. S1; supplemental data for this article is available online at the *Am J Physiol Endocrinol Metab* website.). The reference of these peptides according to the manufacturer was sc-15204 P, sc-7500 P, and sc-7504 P for the goat antibodies anti-P2Y<sub>1</sub>, A<sub>1</sub>, and A<sub>2A</sub>, respectively (Santa Cruz Biotechnology). Before the staining protocol, antibodies were preincubated alone (control) or with an excess of blocking peptides. The incubation was overnight at 4°C. After that, staining protocols were developed side-by-side with the control and blocked antibodies in cultures of isolated islet cells as mentioned above.

## RESULTS

**Multiple purinergic receptors coexist in the  $\alpha$ -cell.** Among the extensive group of purinergic receptor subtypes described so far (12, 41), there is evidence that P2Y<sub>1</sub>, A<sub>1</sub>, and A<sub>2A</sub> receptors may modulate islet function and/or glucagon release

(6, 17, 35, 36). However, the existence of these three receptors at the protein level and their cellular location have not been provided. To study the presence of these receptors in the  $\alpha$ -cell, we analyzed cultures of isolated islet cells by immunocytochemistry and confocal microscopy (Fig. 1). Identification of the P2 receptor subtype P2Y<sub>1</sub> and the P1 receptors A<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub> was all demonstrated in glucagon-containing cells (Fig. 1A). As for  $\beta$ -cells, only P2Y<sub>1</sub> and A<sub>1</sub> but not A<sub>2A</sub> receptors were identified (Fig. 1B) in agreement with previous pharmacological studies on  $\beta$ -cell function (1, 17, 35, 36). To prove the specificity of this staining, we performed a control experiment using blocking peptides for the antibodies against purinergic receptors (Supplemental Fig. S1). This procedure resulted in a marked decrease of the staining intensity, indicating that cell labeling was highly specific. Additionally, further experiments with different antibodies gave similar results about the presence of these purinergic receptor subtypes in the  $\alpha$ -cell (Supplemental Fig. S2).

**Extracellular ATP and adenosine inhibit Ca<sup>2+</sup> signaling in  $\alpha$ -cells.** To analyze the role of purinergic receptors in  $\alpha$ -cell function, we first studied their involvement in Ca<sup>2+</sup> signaling. Pancreatic  $\alpha$ -cells exhibit electrical activity at low glucose concentrations, which triggers oscillatory Ca<sup>2+</sup> signals that lead to glucagon secretion (15, 31, 33, 38). Actually, it has been reported in both isolated cells and mouse intact islets that  $\alpha$ -cells are the only islet cell population that exhibits Ca<sup>2+</sup> oscillations at low glucose levels (<1 mM; Refs. 2, 31, 33, 39, 42, 47). To monitor these Ca<sup>2+</sup> signals in individual  $\alpha$ -cells within intact islets, we used confocal microscopy. In Fig. 2A, we show an optical section (~8  $\mu$ m) of an islet loaded with the Ca<sup>2+</sup>-sensitive fluorescent probe fluo 3. As previously reported (5, 33, 38, 39), even though only the periphery of the islet was loaded, all the different cell types are represented in the outer cell layers of the mouse islet and, in particular, the  $\alpha$ -cell population. At 0.5 mM glucose, several cells displayed the characteristic  $\alpha$ -cell Ca<sup>2+</sup> pattern with a frequency of ~1 oscillation/min (33, 38, 43). Application of ATP (10  $\mu$ M), the

endogenous ligand for P2 purinergic receptors, rapidly reduced the frequency of oscillations or completely blocked the Ca<sup>2+</sup> signals in >95% of these cells (Fig. 2, B and E; Table 1). As observed in Fig. 2F, ATP reduced the average frequency of Ca<sup>2+</sup> signals at 0.5 mM glucose to  $40.5 \pm 10.1\%$ . This blocking effect ceased upon removal of ATP from the medium ( $n = 6$ ; Supplemental Fig. S3). At lower concentrations (1  $\mu$ M), ATP decreased the frequency to  $53.34 \pm 11.74\%$  (Fig. 2, C, E, and F). Given that extracellular ATP may be hydrolyzed by cell membrane ectonucleotidases into adenosine or other ATP metabolites, we used the nonhydrolyzable ATP derivative ATP $\gamma$ S (22) to test if ATP action on Ca<sup>2+</sup> signals was direct or mediated by ATP hydrolytic products. Application of 10  $\mu$ M ATP $\gamma$ S also produced an inhibitory action (Fig. 2E). Although the effect of ATP $\gamma$ S was moderately smaller than that of 10  $\mu$ M ATP (Fig. 2F), this difference was not found to be statistically significant. Thus, these results indicated that ATP action on Ca<sup>2+</sup> signaling was mainly direct. Additionally, ATP (10  $\mu$ M) failed to inhibit Ca<sup>2+</sup> signals in the presence of suramin (100  $\mu$ M), an antagonist of P2 receptors (14; Fig. 2E and F), further suggesting that ATP was principally acting through P2 receptors and not via adenosine-sensitive P1 receptors due to ATP hydrolysis. In any case, since A<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub> receptors were identified in the  $\alpha$ -cell (Fig. 1) and adenosine is a potent suppressor of  $\beta$ -cell secretion (1), we also analyzed the effect of this endogenous ligand of P1 receptors. As shown in Fig. 2D–F, the application of adenosine (10 and 1  $\mu$ M) also inhibited Ca<sup>2+</sup> signals. These experiments demonstrate that ATP and adenosine, the endogenous ligands of P2 and P1 receptors, respectively, can regulate Ca<sup>2+</sup> signaling in  $\alpha$ -cells at physiological concentrations (23).

**Effect of ATP and adenosine on glucagon secretion.** Given that  $\alpha$ -cell exocytosis is Ca<sup>2+</sup> dependent (18–21), the blocking action of ATP and adenosine on  $\alpha$ -cell Ca<sup>2+</sup> signals should be reflected in glucagon secretion. As expected, ATP (10  $\mu$ M), the natural agonist of P2 receptors, led to a reduction in glucagon release compared with 0.5 mM glucose (Fig. 3A).

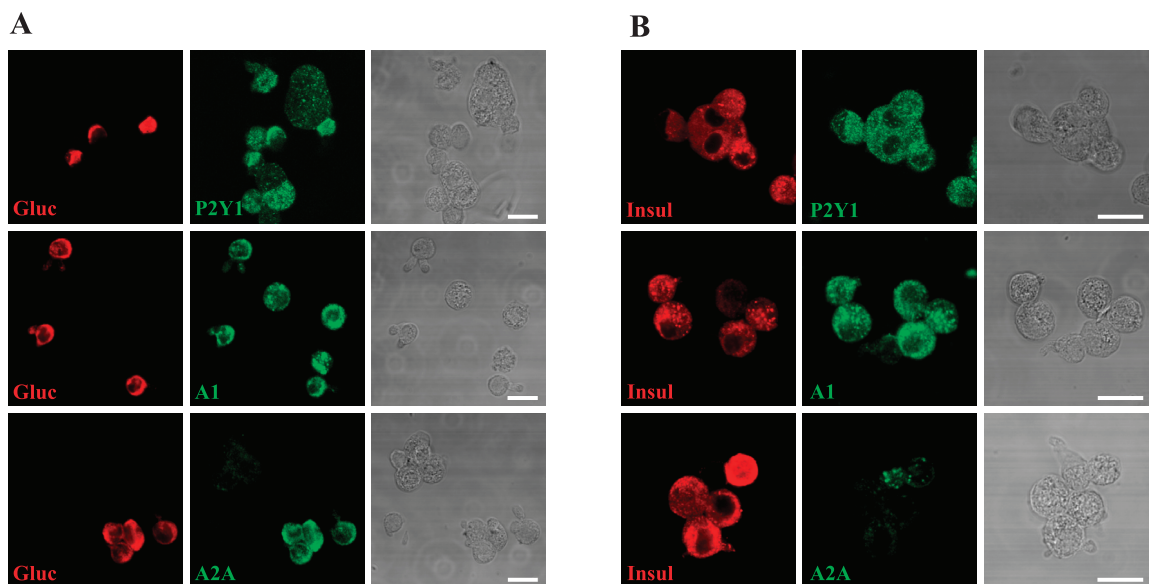


Fig. 1. Immunocytochemical analysis of purinergic receptors in isolated islet cells. Insulin (Insul) and glucagon (Gluc) staining is shown in red while labeling of the different receptors is shown in green. Corresponding transmitted-light image is also displayed at right. The 3 receptor subtypes were localized in glucagon-containing  $\alpha$ -cells (A) while only P2Y<sub>1</sub> and A<sub>1</sub> receptors were found in cells containing insulin (B). Scale bar = 10  $\mu$ m.

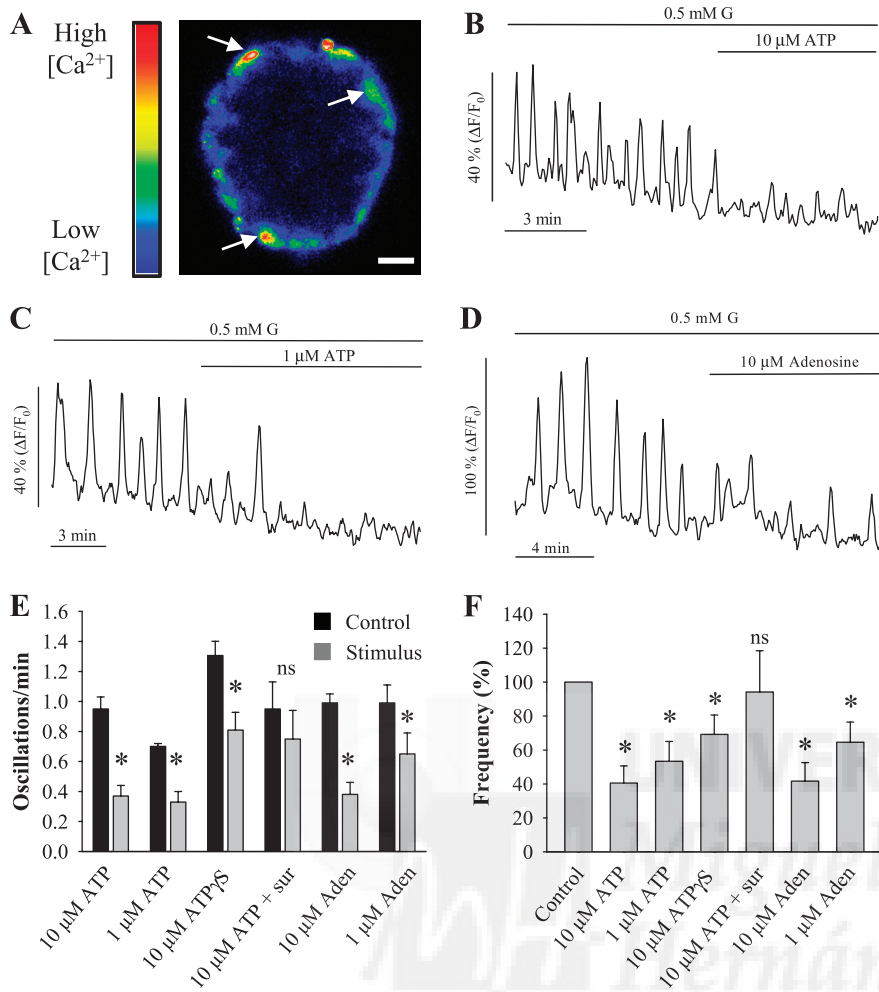


Fig. 2. Extracellular ATP and adenosine inhibit  $\text{Ca}^{2+}$  signals induced by low glucose concentrations in  $\alpha$ -cells. **A**: confocal image of an intact mouse islet loaded with the  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive fluorescent dye fluo 3. Images were acquired from an optical section (8  $\mu\text{m}$ ) close to the equatorial plane. Several individual cells were easily identified at the periphery of the islet (white arrows). Color scale: blue is low  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  and red is high  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Scale bar = 50  $\mu\text{m}$ . **B–D**: records of fluorescence intensity vs. time illustrate the effect of extracellular ATP (**B**, **C**) and adenosine (**D**) on the characteristic  $\alpha$ -cell oscillatory  $\text{Ca}^{2+}$  response at 0.5 mM glucose. ATP and adenosine markedly reduced the frequency of these oscillations or totally abolished the  $\text{Ca}^{2+}$  signal. **E**: mean frequency values of  $\text{Ca}^{2+}$  signals in control conditions (black column) and after stimuli application (gray column) for suramin experiments. Data in **E** and **F** are means  $\pm$  SE. \*Statistically significant ( $P < 0.05$ ) compared with controls. ns, Nonsignificant ( $P > 0.05$ ); G, glucose; Aden, adenosine; Sur, suramin;  $F_0$  fluorescence signal at beginning of a record;  $\Delta F$ ,  $F - F_0$ .

The effect of ATP was comparable with that produced by 10 and 20 mM glucose. The action of glucose at these concentrations is mainly mediated by inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in mouse  $\alpha$ -cells (21, 31). The effect of cobalt was also tested. This general blocker of voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels decreased glucagon release at levels similar to those previously reported in mouse islets (21). Surprisingly, glucagon levels in the presence of adenosine were in the range of 0.5 mM glucose or slightly higher (nonsignificant, Fig. 3, *A* and *B*). It has been reported (4, 6, 35) in rat that adenosine potentiates glucagon secretion through  $A_2$  receptors, which are coupled to adenylyl cyclase activation. Since  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent exocytosis in  $\alpha$ -cells is highly modulated by the cAMP/PKA pathway (18, 19), we tested the possibility that adenosine could affect glucagon secretion through this biochemical route. In agreement with this, glucagon levels in the presence of adenosine were reduced by the PKA inhibitor H-89 (Fig. 3*B*). H-89 does not affect glucagon release at 0.5 mM glucose (Supplemental Fig. S4).

The next experiments illustrated in Fig. 4 also pointed to a role of this pathway in the adenosine effect on secretion.

**Involvement of  $P2Y_1$ ,  $A_1$ , and  $A_{2A}$  receptors in  $\alpha$ -cell  $\text{Ca}^{2+}$  signaling.** In addition to the identification of  $P2Y_1$ ,  $A_1$ , and  $A_{2A}$  receptors in the pancreatic  $\alpha$ -cell, we investigated whether these receptors were functional and if they were involved in the effect of ATP and adenosine on  $\text{Ca}^{2+}$  signaling. Although pharmacological tools are not very selective with purinergic signaling (12, 41), we used some agonists with higher affinity for the receptors identified by immunocytochemistry. ADP $\beta$ S has been previously used in  $\beta$ -cells and other cell types to characterize the  $P2Y_1$  receptor due to its major affinity for this receptor with respect to other subtypes (12, 35, 49). 2-Chloro-N6-cyclopentyl adenosine (CCPA) and CGS-21680 are relatively selective agonists for  $A_1$  and  $A_{2A}$  receptors, respectively (12, 41). As shown in Fig. 4, *A* and *B*, both ADP $\beta$ S and CGS-21680 produced a reduction in the frequency of  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations. Although they were not as efficient as the endog-

Table 1. Number of recorded cells in  $\text{Ca}^{2+}$  signaling experiments

	ATP, 1 $\mu\text{M}$	ATP, 10 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$ ATP + Suramin	10 $\mu\text{M}$ ATP + Clonidine	Adenosine, 10 $\mu\text{M}$	Adenosine, 1 $\mu\text{M}$	ATP $\gamma$ S, 10 $\mu\text{M}$	ADP $\beta$ S, 10 $\mu\text{M}$	CCPA, 1 $\mu\text{M}$	CGS-21680, 1 $\mu\text{M}$
Cells	29	22	8	27	27	8	22	32	12	19

Four to nine islets were used in each experiment.

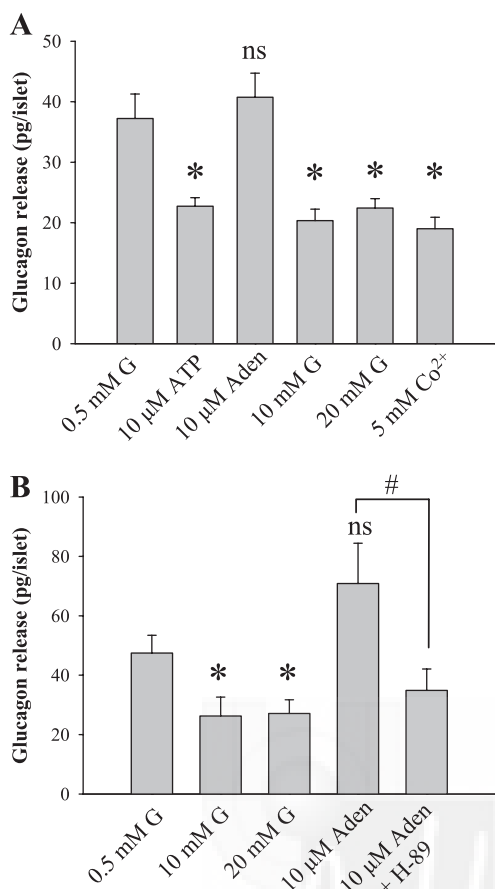


Fig. 3. Glucagon secretion from intact islets after 1 h of incubation with different test agents. *A*: glucagon release in the presence of ATP, adenosine,  $Co^{2+}$  (5 mM), and 10 and 20 mM glucose was compared with control 0.5 mM glucose ( $n = 20$ –28 for each condition). *B*: glucagon release in the presence of adenosine and adenosine plus H-89 (10  $\mu$ M;  $n = 5$ ). Effect of glucose is also shown. H-89 was present throughout the experiment. Data are means  $\pm$  SE. \*Statistically significant ( $P < 0.05$ ) compared with 0.5 mM glucose; ns, nonsignificant ( $P > 0.05$ ) compared with 0.5 mM glucose; #significant ( $P < 0.05$ ) compared with adenosine.

enous ligands ATP or adenosine, both pharmacological agonists mimicked the inhibitory effect (Fig. 4, *D* and *E*). On the contrary, CCPA had no significant effect on  $Ca^{2+}$  signals (Fig. 4, *C–E*). Therefore, we show that, unlike  $A_1$  receptors,  $P2Y_1$  and  $A_{2A}$  receptors may be functional in  $\alpha$ -cells and involved in the regulation of  $Ca^{2+}$  signaling. Since adenosine exhibited a different effect on  $Ca^{2+}$  signals and secretion, we also tested the effect of CGS-21680 on glucagon release. As shown in Fig. 4*F*, activation of  $A_{2A}$  receptors by CGS-21680 stimulated glucagon secretion at 0.5 mM glucose, which points to a dual action as well.

**Purinergic stimulation directly regulates  $\alpha$ -cells.** The presence of purinergic receptors in the  $\alpha$ -cell and their involvement in  $Ca^{2+}$  signaling (Figs. 1 and 4) supported the idea that ATP and adenosine act directly on  $\alpha$ -cells rather than through paracrine mechanisms. Additionally, it has been demonstrated that both extracellular ATP and adenosine inhibit  $\beta$ -cell secretion in mouse islets (1, 6, 22, 36). In the case of ATP, this effect results from a strong interaction with the exocytotic machinery and occurs independently of the generation of a  $Ca^{2+}$  transient (36). Thus, the ATP and adenosine actions on

$\alpha$ -cell  $Ca^{2+}$  signals should not be due to a  $\beta$ -cell paracrine mechanism. Regardless of this ATP blocking effect on the  $\beta$ -cell, we further inhibited its secretory response using clonidine. Although this adrenergic agonist prevents insulin secretion at different levels, particularly in the exocytotic process (8, 28, 34), it has no effect on mouse  $\alpha$ -cells (25, 50). In the presence of clonidine, ATP (10  $\mu$ M) reduced the frequency of  $Ca^{2+}$  oscillations to  $53.84 \pm 9.93\%$  in  $\alpha$ -cells, similar to the effect obtained by ATP alone (Fig. 5, *A*, *B*, and *C*; Table 1). Finally, to further prove the direct effect on  $\alpha$ -cells, we performed some experiments with cultures of single isolated cells at low densities that were perfused at high flow rates (5 ml/min). In these conditions, paracrine interactions are negligible (42). As shown in Fig. 5*D*, ATP (10  $\mu$ M) inhibited  $Ca^{2+}$  signals in single  $\alpha$ -cells as well ( $n = 5$ ). Similar results were also obtained with 100  $\mu$ M ATP ( $n = 5$ ; not shown).

## DISCUSSION

Control of glucose homeostasis depends on the coordinated action of glucagon and insulin secreted from pancreatic  $\alpha$ - and  $\beta$ -cells, respectively (19). An incorrect regulation of glucagon release in diabetic patients can either aggravate the hyperglycemia or can be a limitation in individuals treated with insulin (9, 10). Thus, glucagon secretion constitutes a potential target for diabetes treatment. Despite recent advances in understanding  $\alpha$ -cell physiology, there are important aspects of its regulation that are still unclear (19). At low glucose concentrations,  $\alpha$ -cells develop spontaneous electrical activity, which leads to oscillatory  $Ca^{2+}$  signals and glucagon secretion (15, 31, 33, 38). Elevation of extracellular glucose levels inhibits all of these events. However, in addition to glucose, several studies have emphasized the significant role of neural and paracrine factors in the suppression of glucagon release (13, 27, 42, 51). Here, we identify the presence and functional activity of  $P2Y_1$ ,  $A_1$  and  $A_{2A}$  purinergic receptors in  $\alpha$ -cells (Figs. 1 and 4). We prove that extracellular ATP and adenosine potently inhibit  $Ca^{2+}$  signals in  $\alpha$ -cells (Figs. 2 and 5). Additionally, in contrast to adenosine, ATP was found to inhibit glucagon secretion (Fig. 3). Thus, in addition to insulin,  $Zn^{2+}$ , and GABA (13, 27, 42, 51), ATP plays an important role in the inhibition of glucagon-releasing  $\alpha$ -cells.

There are nineteen purinergic receptor subtypes widely distributed in various tissues, the activation of which initiates a plethora of signaling cascades and effects (12, 41). Purinergic receptors for ATP (P2) involve ionotropic (P2X) and metabotropic (P2Y) receptors, whereas P1 receptors are adenosine specific. While ATP is released from nerve terminals and insulin-secretory granules, adenosine is mainly produced by ATP hydrolytic reactions in the extracellular space. Given that several purinergic receptor subtypes can coexist in the same cell and that current pharmacology is not selective for all these receptors, the study of purinergic signaling is complex (12). Here, we have shown that  $P2Y_1$ ,  $A_1$ , and  $A_{2A}$  are all present in the pancreatic  $\alpha$ -cell (Figs. 1 and 4). Although  $A_2$  and  $P2Y_1$  receptors could be involved in glucagon secretion (6, 17, 35), the expression and localization of both receptors in the  $\alpha$ -cell have not been shown previously. In any case, we do not discard the presence of other subtypes. Actually, genes encoding for  $P2Y_1$ ,  $P2Y_2$ ,  $P2Y_4$ , and  $P2Y_6$  have been detected in rat islets (2), while  $P2X_7$  receptors have been identified by immunohistochemistry in  $\alpha$ -cells from streptozotocin-diabetic rats (7).

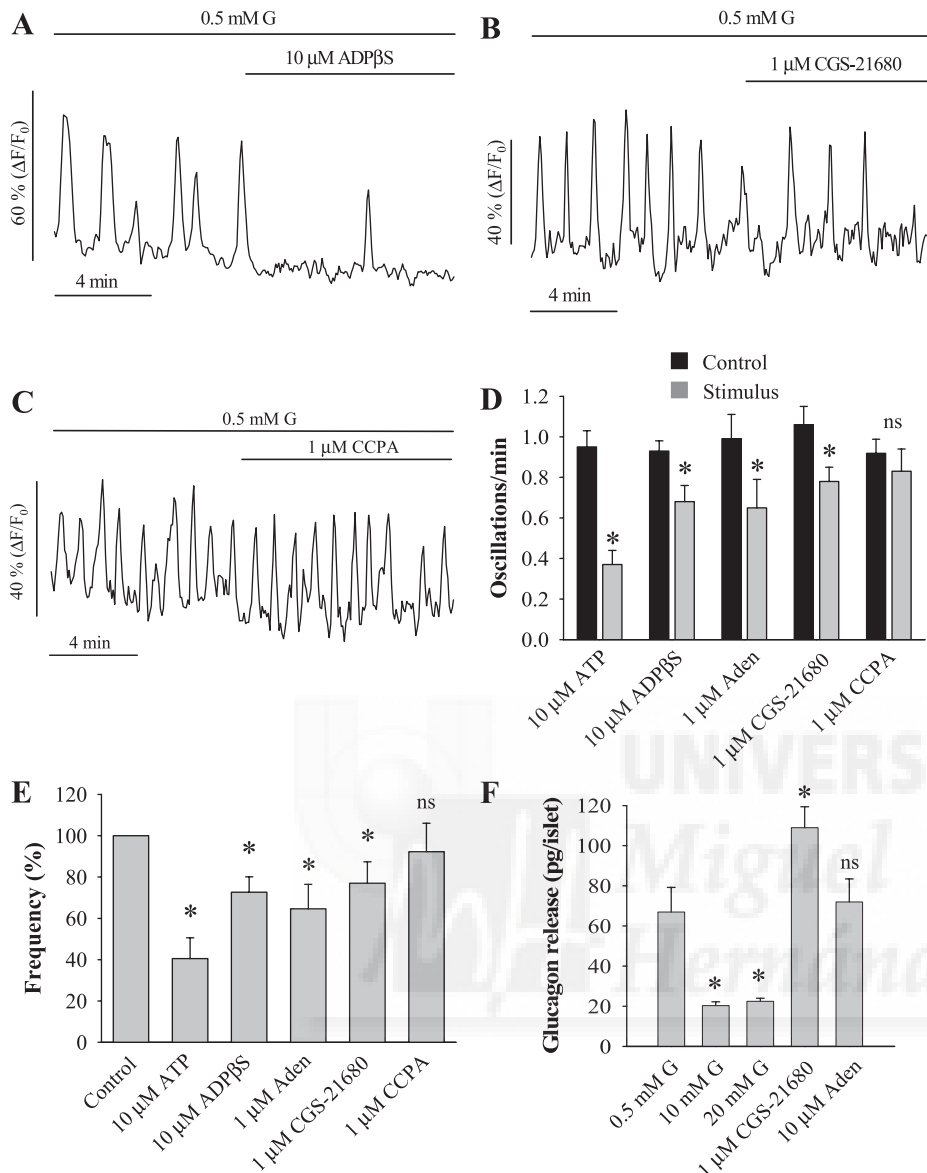


Fig. 4. Effect of ADP $\beta$ S (A), CGS-21680 (B), and 2-chloro-N6-cyclopentyl adenosine (CCPA; C) on  $\alpha$ -cell  $Ca^{2+}$  signals induced by low glucose levels. D: mean frequency values of  $Ca^{2+}$  signals in control conditions (black bars) and after stimuli application (gray bars). Effect of the endogenous ligands ATP and adenosine are also shown. E: frequency (%) of  $Ca^{2+}$  signals after stimuli compared with control conditions. F: glucagon release in the presence of 10 and 20 mM glucose, adenosine, and CGS-21680 was compared with secretion at 0.5 mM glucose. Controls in D–F were 0.5 mM glucose for all experiments. Data in D–F are means  $\pm$  SE. \*Statistically significant ( $P < 0.05$ ) compared with controls (ns;  $P > 0.05$ ).

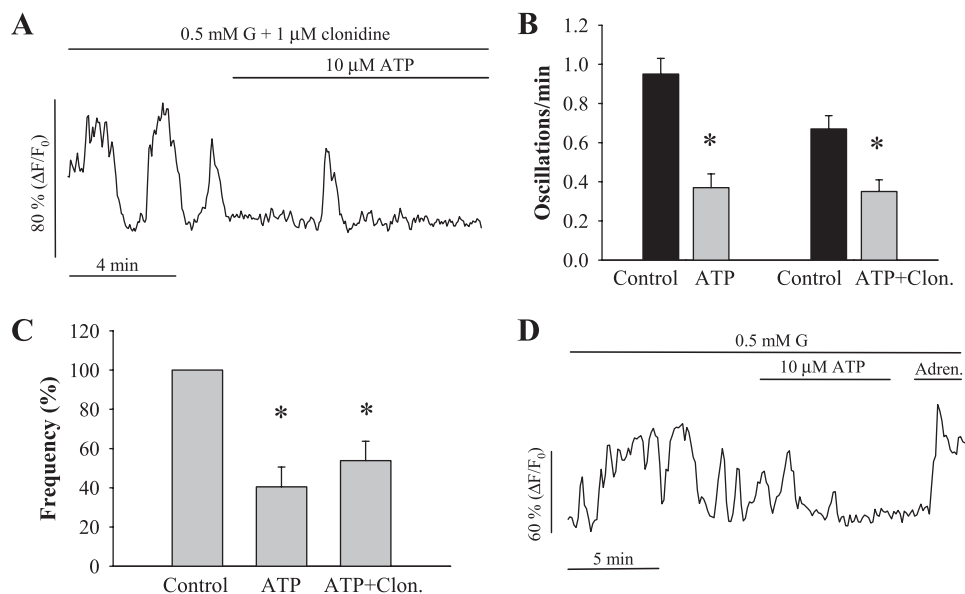
However, P2X<sub>7</sub> receptors are unlikely to mediate the  $Ca^{2+}$ -signaling blockade shown here, since activation of these ionotropic receptors is coupled to extracellular  $Ca^{2+}$  entry, which increases  $[Ca^{2+}]_i$  (7, 12). Activation of P2Y<sub>1</sub>, A<sub>1</sub>, and A<sub>2A</sub> receptors triggers multiple effects in addition to the classical signaling pathways involving adenylate cyclase and phospholipase C (41). Among other signal-transduction mechanisms, these three receptors participate in the regulation of K<sup>+</sup> and voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels, which could affect  $Ca^{2+}$  signals (1, 14, 36, 41). In the pancreatic  $\beta$ -cell, extracellular ATP leads to multiple actions, including effects on the exocytotic machinery or K<sub>ATP</sub> channels and activation of phospholipase A2 and serine/threonine protein phosphatase calcineurin pathways (36). Thus, since multiple receptors coexist in the  $\alpha$ -cell, a complex purinergic signaling system may take place.

Purinergic receptors have been associated with either the activation or inhibition of  $Ca^{2+}$  signals in multiple systems (41). In  $\beta$ -cells, ATP triggers a  $Ca^{2+}$  transient by release from intracellular stores (48) but at the same time induces a subse-

quent inhibitory effect on voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels in the plasma membrane, reducing  $Ca^{2+}$  currents and allowing a negative feedback loop (14, 44). Additionally, ATP decreases the activity of ATP-dependent K<sup>+</sup> (K<sub>ATP</sub>) channels, allowing a small depolarization in  $\beta$ -cells (36). It has also been documented that  $Ca^{2+}$  currents are reduced by adenosine in this cell type (1). Given that  $\alpha$ -cells exhibit  $Ca^{2+}$  oscillations at low glucose concentrations due to the activity of both K<sub>ATP</sub> and voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels (15, 21), it is reasonable to suggest that purinergic stimulation could inhibit  $\alpha$ -cell  $Ca^{2+}$  signals through interaction with similar targets as those reported in  $\beta$ -cells (1, 36). This inhibitory effect by ATP and adenosine indicates an important role of purinergic signaling in the regulation of  $Ca^{2+}$ -dependent functions in  $\alpha$ -cells.

Additionally, extracellular ATP was found to be an inhibitory messenger for mouse  $\alpha$ -cell secretion (Fig. 3). A different situation has been reported in rats (17). These discrepancies are probably due to interspecies differences, given that rat and mouse  $\alpha$ -cells possess several divergences in the stimulus-secretion cou-

Fig. 5. *A*: islets were preincubated for 10 min with clonidine (clon; 1  $\mu$ M), a potent inhibitor of insulin release without effect on mouse  $\alpha$ -cells, and then continuously perfused throughout the experiment with this  $\alpha_2$ -adrenoreceptor agonist. Under these conditions, ATP produced a very similar effect. *B*: mean frequency values of  $\text{Ca}^{2+}$  signals in control conditions (black bars) and after stimuli application (gray bars). Stimuli were ATP (10  $\mu$ M) and ATP (10  $\mu$ M) plus clonidine (1  $\mu$ M). *C*: frequency (%) of  $\text{Ca}^{2+}$  signals after stimuli compared with control conditions. *D*: ATP effect (10  $\mu$ M) on  $\text{Ca}^{2+}$  signals in isolated single  $\alpha$ -cells ( $n = 5$ ). The typical response of  $\alpha$ -cells to 5  $\mu$ M adrenaline is also shown (21, 50). Controls in *B* and *C* were 0.5 mM glucose or 0.5 mM glucose plus clonidine (1  $\mu$ M). Data in *B* and *C* are means  $\pm$  SE. In *C*, effects of ATP and ATP plus clonidine were not found different ( $P > 0.05$ ). \*Statistically significant ( $P < 0.05$ ) compared with controls.



pling and in the kind of channels involved (19). Since  $\alpha$ -cell exocytosis is a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent process, the inhibitory effect of ATP on  $\text{Ca}^{2+}$  signals (Fig. 2) should be accompanied by a decrease in glucagon secretion, as we observed with cobalt, a general  $\text{Ca}^{2+}$ -channel blocker, and with high glucose concentrations (Fig. 3; Ref. 21). In addition, ATP could also reduce glucagon release by a direct interaction with the exocytic process, as it has been shown in mouse  $\beta$ -cells (36).

Previous studies (6, 35) with perfused rat pancreas indicated that adenosine elevates glucagon secretion at low glucose levels through the activation of  $A_2$  receptors. In a recent study (17) with rat islets, adenosine was also found to favor glucagon release at low glucose concentrations although this effect changed at 20 mM. Our results in mice indicated that glucagon levels in the presence of adenosine were similar to those at 0.5 mM glucose (Fig. 3A) in spite of a decrease in  $\text{Ca}^{2+}$  signaling. This dual effect may be explained by the fact that  $A_{2A}$  receptors are coupled to adenylate cyclase activation (4, 6, 12). Since  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent exocytosis in  $\alpha$ -cells is highly sensitive to activation of the cAMP/PKA pathway (18), it is reasonable to expect that an increase in cAMP levels through  $A_{2A}$  receptor activation could compensate for the effect of a reduced  $\text{Ca}^{2+}$  signal on glucagon secretion. Actually, it has been reported in  $\alpha$ -cells that cAMP-elevating agents can stimulate glucagon secretion notably in conditions of reduced  $\text{Ca}^{2+}$  currents (18, 20). In agreement with this idea, glucagon secretion in the presence of adenosine was markedly decreased by the PKA inhibitor H-89 (Fig. 3B). Furthermore, activation of  $A_{2A}$  receptors by CGS-21680 also produced a dual effect on  $\text{Ca}^{2+}$  signaling and glucagon secretion (Fig. 4). In this case, CGS-21680 increased glucagon secretion at 0.5 mM glucose compared with the action of adenosine. This effect probably results from the higher affinity of CGS-21680 on  $A_{2A}$  receptors. Although we found  $A_1$  and  $A_{2A}$  receptors in the  $\alpha$ -cell, the experiments shown in Fig. 4 suggested that only  $A_{2A}$  receptors may be functional in agreement with previous studies (6, 35). Also, it has been indicated in other cell models that  $A_{2A}$  function may predominate over  $A_1$  receptors at the adenosine concentrations used in these experiments (12). We do not

discard, however, that adenosine may produce additional effects on other molecular targets.

Coexistence of P2 and P1 receptors in the same cell has been documented in multiple systems including the  $\beta$ -cell, although its functional significance is still under study (12, 35, 41). Integration of the responses from different receptors depends on many factors, including the local concentrations of ATP and adenosine, density and affinity of receptor subtypes, and activity of plasma membrane ectonucleotidases (12, 41). This integration can also change during pathological conditions. In our experiments, we observed that ATP affects  $\alpha$ -cell secretion in contrast to adenosine (12). In this case, the effect of ATP binding to P2 receptors may predominate over a potential action on P1 receptors induced by ATP conversion into adenosine. This idea was supported by the efficient inhibitory effect of the nonhydrolyzable ATP $\gamma$ S on  $\text{Ca}^{2+}$  signaling and the lack of ATP effect in the presence of suramin (Fig. 2, E and F). Additionally, it has been indicated that high concentrations of ATP could inhibit several ectonucleotidases, decreasing adenosine production and then reducing the ATP effect through P1 receptors (12). Given that ATP is highly concentrated in  $\beta$ -cell secretory granules (1–3 mM) and, especially, in synaptic vesicles of islet nerve terminals (up to 10 mM; Refs. 26, 41), its inhibitory effect on  $\alpha$ -cell secretion should take place in physiological conditions. Actually, neural ATP has been proposed as a key signal responsible for the coordination of  $\beta$ -cell function (17, 24, 44). On the other hand, the effect of adenosine binding to P1 receptors may have a role in pathological situations, since during energy-deficient states such as hypoxia, ischemia, and fasting, adenosine is released from tissues, increasing its plasma levels (35).

The mechanisms that regulate glucagon secretion are still poorly understood. Here we demonstrate that extracellular ATP is an important inhibitor of  $\alpha$ -cell function and glucagon secretion. Given that the control of the suppression of glucagon release could be important for the treatment of hyperglycemia in diabetic patients (9, 10, 46), purinergic signaling may also be a therapeutic target of clinical interest.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank F. Almagro and I. Piqueras for expert technical assistance and A. Nadal and A. B. Ropero for critical reading of the manuscript.

## GRANTS

This work was supported by grants from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (2004/14016-7 to E. M. Carneiro), Ministerio de Educación y Ciencia (BFU2004-07283; BFU2007-67607/BFI and PCI2005-A7-0131 to I. Quesada), and the Instituto de Salud Carlos III (RD06/0015/0010).

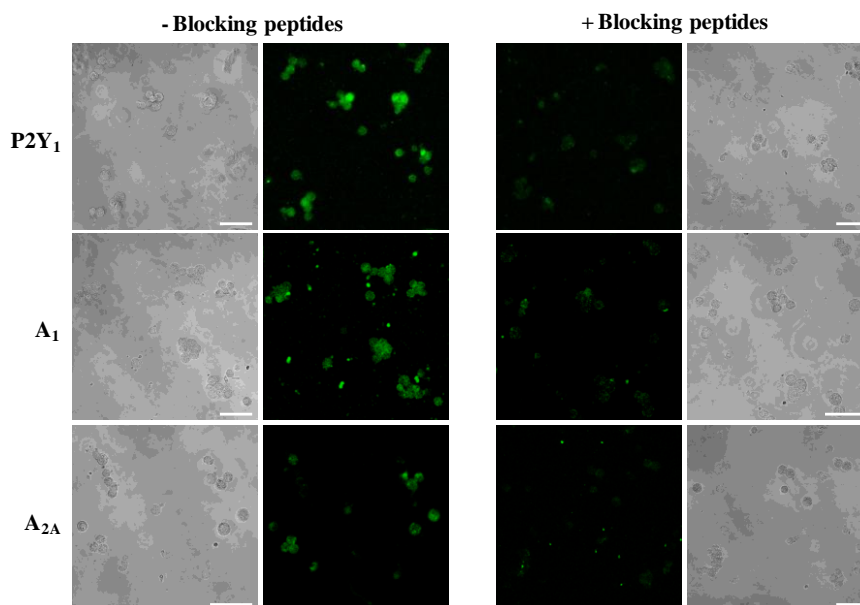
## REFERENCES

- Bertrand G, Petit P, Bozem M, Henquin JC. Membrane and intracellular effects of adenosine in mouse pancreatic  $\beta$ -cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 257: E473–E478, 1989.
- Berts A, Gylfe E, Hellman B.  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations in pancreatic islet cells secreting glucagon and somatostatin. *Biochem Biophys Res Commun* 208: 644–649, 1995.
- Bokvist K, Efanov A, Sandusky G, Sewing S, Treinies I, Gromada J. The P2Y4 pyrimidineric receptor is important for nucleotide stimulation of insulin secretion in rat pancreatic  $\beta$ -cells (Abstract). *Diabetes Metab* 29: 4S77–4S78, 2003.
- Burnstock G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev* 87: 659–797, 2007.
- Cabrera O, Berman DM, Kenyon NS, Ricordi C, Berggren PO, Caicedo A. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 2334–2339, 2006.
- Chapal J, Loubatieres-Mariani MM, Petit P, Roye M. Evidence for an A2-subtype adenosine receptor on pancreatic glucagon secreting cells. *Br J Pharmacol* 86: 565–569, 1985.
- Coutinho-Silva R, Parsons M, Robson T, Lincoln J, Burnstock G. P2X and P2Y purinoceptor expression in pancreas from streptozotocin-diabetic rats. *Mol Cell Endocrinol* 204: 141–154, 2003.
- da Silva Xavier G, Varadi A, Ainscow EK, Rutter GA. Regulation of gene expression by glucose in pancreatic beta-cells (MIN6) via insulin secretion and activation of phosphatidylinositol 3'-kinase. *J Biol Chem* 275: 36269–36277, 2000.
- Dinneen S, Alzaid A, Turk D, Rizza R. Failure of glucagon suppression contributes to postprandial hyperglycaemia in IDDM. *Diabetologia* 38: 337–343, 1995.
- Dunning BE, Gerich JE. The role of alpha-cell dysregulation in fasting and postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes and therapeutic implications. *Endocr Rev* 28: 253–283, 2007.
- Farret A, Vignaud M, Dietz S, Vignon J, Petit P, Gross R. P2Y purinergic potentiation of glucose-induced insulin secretion and pancreatic beta-cell metabolism. *Diabetes* 53: S63–S66, 2004.
- Fields RD, Burnstock G. Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nat Rev Neurosci* 7: 423–436, 2006.
- Franklin I, Gromada J, Gjinovci A, Theander S, Wollheim CB. Beta-cell secretory products activate alpha-cell ATP-dependent potassium channels to inhibit glucagon release. *Diabetes* 54: 1808–1815, 2005.
- Gong Q, Kakei M, Koriyama N, Nakazaki M, Morimitsu S, Yaekura K, Tei C. P2Y-purinoceptor mediated inhibition of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in rat pancreatic beta-cells. *Cell Struct Funct* 25: 279–289, 2000.
- Gopel SO, Kanno T, Barg S, Weng XG, Gromada J, Rorsman P. Regulation of glucagon release in mouse-cells by KATP channels and inactivation of TTX-sensitive  $\text{Na}^{+}$  channels. *J Physiol* 528: 509–520, 2000.
- Grapengiesser E, Dansk H, Hellman B. Pulses of external ATP aid to the synchronization of pancreatic beta-cells by generating premature  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations. *Biochem Pharmacol* 68: 667–674, 2004.
- Grapengiesser E, Salehi A, Qader SS, Hellman B. Glucose induces glucagon release pulses antisynchronous with insulin and sensitive to purinoceptor inhibition. *Endocrinology* 147: 3472–3477, 2006.
- Gromada J, Bokvist K, Ding WG, Barg S, Buschard K, Renstrom E, Rorsman P. Adrenaline stimulates glucagon secretion in pancreatic A-cells by increasing the  $\text{Ca}^{2+}$  current and the number of granules close to the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *J Gen Physiol* 110: 217–228, 1997.
- Gromada J, Franklin I, Wollheim CB. Alpha-cells of the endocrine pancreas: 35 years of research but the enigma remains. *Endocr Rev* 28: 84–116, 2007.
- Gromada J, Høy M, Buschard K, Salehi A, Rorsman P. Somatostatin inhibits exocytosis in rat pancreatic alpha-cells by G(i2)-dependent activation of calcineurin and depriving of secretory granules. *J Physiol* 535: 519–532, 2001.
- Gromada J, Ma X, Høy M, Bokvist K, Salehi A, Berggren PO, Rorsman P. ATP-sensitive  $\text{K}^{+}$  channel-dependent regulation of glucagon release and electrical activity by glucose in wild-type and SUR1-/- mouse alpha-cells. *Diabetes* 53: S181–S189, 2004.
- Hauge-Evans AC, Squires PE, Belin VD, Roderigo-Milne H, Ramracheya RD, Persaud SJ, Jones PM. Role of adenine nucleotides in insulin secretion from MIN6 pseudoislets. *Mol Cell Endocrinol* 191: 167–176, 2002.
- Hazama A, Hayashi S, Okada Y. Cell surface measurements of ATP release from single pancreatic beta cells using a novel biosensor technique. *Pflügers Arch* 437: 31–35, 1998.
- Hellman B, Dansk H, Grapengiesser E. Pancreatic  $\beta$ -cells communicate via intermittent release of ATP. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286: E759–E765, 2004.
- Høy M, Bokvist K, Xiao-Gang W, Hansen J, Juhl K, Berggren PO, Buschard K, Gromada J. Phentolamine inhibits exocytosis of glucagon by Gi2 protein-dependent activation of calcineurin in rat pancreatic alpha-cells. *J Biol Chem* 276: 924–930, 2001.
- Hutton JC, Penn EJ, Peshavaria M. Low-molecular-weight constituents of isolated insulin-secretory granules. Bivalent cations, adenine nucleotides and inorganic phosphate. *Biochem J* 210: 297–305, 1983.
- Ishihara H, Maechler P, Gjinovci A, Herrera PL, Wollheim CB. Islet beta-cell secretion determines glucagon release from neighbouring alpha-cells. *Nat Cell Biol* 5: 330–335, 2003.
- Jonas JC, Laybutt DR, Steil GM, Trivedi N, Pertusa JG, Van de CM, Weir GC, Henquin JC. High glucose stimulates early response gene c-Myc expression in rat pancreatic beta cells. *J Biol Chem* 276: 35375–35381, 2001.
- Liu YJ, Vieira E, Gylfe E. A store-operated mechanism determines the activity of the electrically excitable glucagon-secreting pancreatic alpha-cell. *Cell Calcium* 35: 357–365, 2004.
- MacDonald PE, Braun M, Galvanovskis J, Rorsman P. Release of small transmitters through kiss-and-run fusion pores in rat pancreatic beta cells. *Cell Metab* 4: 283–290, 2006.
- Macdonald PE, Marinis YZ, Ramracheya R, Salehi A, Ma X, Johnson PR, Cox R, Eliasson L, Rorsman P. A  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channel-dependent pathway within alpha cells regulates glucagon release from both rodent and human islets of Langerhans. *PLoS Biol* 5: e143, 2007.
- Miller RE. Pancreatic neuroendocrinology: peripheral neural mechanisms in the regulation of the islets of Langerhans. *Endocr Rev* 2: 471–494, 1981.
- Nadal A, Quesada I, Soria B. Homologous and heterologous asynchronicity between identified alpha-, beta- and delta-cells within intact islets of Langerhans in the mouse. *J Physiol* 517: 85–93, 1999.
- Nilsson T, Arkhammar P, Rorsman P, Berggren PO. Inhibition of glucose-stimulated insulin release by alpha 2-adrenoceptor activation is paralleled by both a repolarization and a reduction in cytoplasmic free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. *J Biol Chem* 263: 1855–1860, 1988.
- Petit P, Loubatières-Mariani MM, Keppens S, Sheehan MJ. Purinergic receptors and metabolic function. *Drug Dev Res* 39: 413–425, 1996.
- Poulsen CR, Bokvist K, Olsen HL, Høy M, Capito K, Gilon P, Gromada J. Multiple sites of purinergic control of insulin secretion in mouse pancreatic beta-cells. *Diabetes* 48: 2171–2181, 1999.
- Quesada I, Fuentes E, Andreu E, Meda P, Nadal A, Soria B. On-line analysis of gap junctions reveals more efficient electrical than dye coupling between islet cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284: E980–E987, 2003.
- Quesada I, Nadal A, Soria B. Different effects of tolbutamide and diazoxide in alpha, beta and delta cells within intact islets of Langerhans. *Diabetes* 48: 2390–2397, 1999.
- Quesada I, Todorova MG, Alonso-Magdalena P, Beltra M, Carneiro EM, Martin F, Nadal A, Soria B. Glucose induces opposite intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration oscillatory patterns in identified alpha- and beta-cells within intact human islets of Langerhans. *Diabetes* 55: 2463–2469, 2006.
- Quesada I, Todorova MG, Soria B. Different metabolic responses in alpha-, beta-, and delta-cells of the islet of Langerhans monitored by redox confocal microscopy. *Biophys J* 90: 2641–2650, 2006.
- Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50: 413–492, 1998.

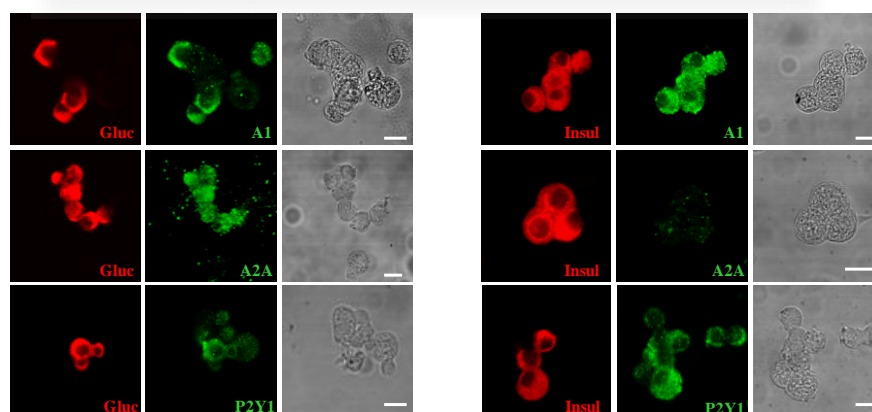
42. **Ravier MA, Rutter GA.** Glucose or insulin, but not zinc ions, inhibit glucagon secretion from mouse pancreatic alpha-cells. *Diabetes* 54: 1789–1797, 2005.
43. **Ropero AB, Soria B, Nadal A.** A nonclassical estrogen membrane receptor triggers rapid differential actions in the endocrine pancreas. *Mol Endocrinol* 16: 497–505, 2002.
44. **Salehi A, Qader SS, Grapengiesser E, Hellman B.** Inhibition of purinergic receptors amplifies glucose-stimulated insulin release with removal of its pulsatility. *Diabetes* 54: 2126–2131, 2005.
45. **Sanchez-Andres JV, Gomis A, Valdeolmillos M.** The electrical activity of mouse pancreatic beta-cells recorded in vivo shows glucose-dependent oscillations. *J Physiol* 486: 223–228, 1995.
46. **Shah P, Vella A, Basu A, Basu R, Schwenk WF, Rizza RA.** Lack of suppression of glucagon contributes to postprandial hyperglycemia in subjects with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 4053–4059, 2000.
47. **Shiota C, Rocheleau JV, Shiota M, Piston DW, Magnuson MA.** Impaired glucagon secretory responses in mice lacking the type 1 sulfonylurea receptor. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289: E570–E577, 2005.
48. **Squires PE, James RF, London NJ, Dunne MJ.** Characterization of purinergic receptor-evoked increases in intracellular  $Ca^{2+}$  transients in isolated human and rodent insulin-secreting cells. Purinergic receptor signalling and  $[Ca^{2+}]_i$  in human beta-cells. *Adv Exp Med Biol* 426: 173–179, 1997.
49. **Verspohl EJ, Johannwille B, Waheed A, Neye H.** Effect of purinergic agonists and antagonists on insulin secretion from INS-1 cells (insulinoma cell line) and rat pancreatic islets. *Can J Physiol Pharmacol* 80: 562–568, 2002.
50. **Vieira E, Liu YJ, Gylfe E.** Involvement of alpha 1 and beta-adrenoceptors in adrenaline stimulation of the glucagon-secreting mouse alpha-cell. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 369: 179–183, 2004.
51. **Wendt A, Birnir B, Buschard K, Gromada J, Salehi A, Sewing S, Rorsman P, Braun M.** Glucose inhibition of glucagon secretion from rat alpha-cells is mediated by GABA released from neighboring beta-cells. *Diabetes* 53: 1038–1045, 2004.



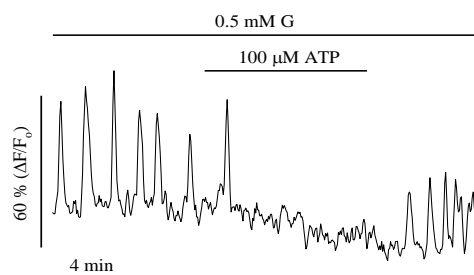




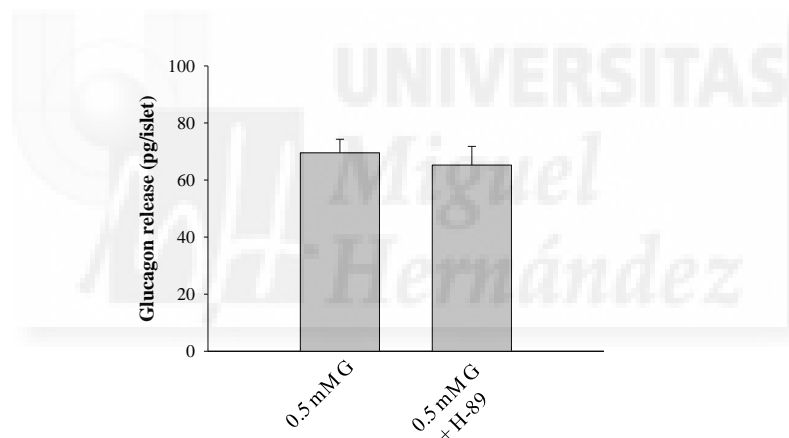
**Supplemental figure 1.** To prove the specificity of the antibodies shown in figure 1, we performed an experiment with specific blocking peptides. Before the staining protocol, antibodies were pre-incubated alone (control) or with an excess of blocking peptides. The incubation was overnight at 4° C. After that, staining protocols were developed side-by-side with the control and blocked antibodies in cultures of isolated islet-cells. Images were acquired under a confocal microscope with a 20x objective. An intense fluorescence staining was observed in the majority of cells labeled with P2Y<sub>1</sub> and A<sub>1</sub> receptor antibodies and in several cells labeled with A<sub>2A</sub> receptor antibodies (left panel). Treatment of these antibodies with blocking peptides resulted in a marked decrease of the staining (right panel), proving the specificity of the labeling. Scale bar is 50 μm.



**Supplemental figure 2.** Results in figure 1 were further confirmed by additional staining experiments using polyclonal rabbit antibodies anti-A<sub>1</sub>, anti-A<sub>2A</sub> or anti-P2Y<sub>1</sub> (1:100; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). A goat anti-rabbit antibody conjugated with Alexa Fluor 488 (1:500; Molecular Probes; Leiden, The Netherlands) was used as secondary antibody for the detection of purinergic receptors. Protocols were very similar as those described for the experiments of figure 1. Left and right panels show the staining of glucagon (gluc) and insulin (insul), respectively. Scale bar is 10 μm.



**Supplemental figure 3.** Removal of ATP from the medium reversed the  $\text{Ca}^{2+}$  signals induced at  $0.5\text{ mM}$  glucose ( $n=6$ ).



**Supplemental figure 4.** Glucagon release at  $0.5\text{ mM}$  glucose and  $0.5\text{ mM}$  glucose plus  $10\ \mu\text{M}$  H-89 ( $n=10$ ). H-89 did not affect secretion at low glucose concentrations. Data are shown as mean  $\pm$  SE. Ns: non-significant ( $p > 0.05$ ) compared with  $0.5\text{ mM}$  glucose. G: glucose.



## **ANEXO II**

**Tuduri Lopez, Eva**

**De:** Quesada Moll, Ivan **Enviado el:** vie 03/04/2009 12:57  
**Para:** Tuduri Lopez, Eva  
**CC:**  
**Asunto:** RV: DB08-1787.R1 - Acceptance Notification  
**Datos adjuntos:**

-----Mensaje original-----

De: onbehalfof@scholarone.com [<mailto:onbehalfof@scholarone.com>] En nombre de diabeteseic@mednet.ucla.edu

Enviado el: viernes, 03 de abril de 2009 8:12

Para: Quesada Moll, Ivan

Asunto: DB08-1787.R1 - Acceptance Notification

DB08-1787.R1 / Inhibitory effects of leptin on the pancreatic alpha-cell function.

Submitted 18-Jun-2007 and accepted 02-Apr-2009.

(Tables: 1 / Figures: 6, Color: Yes / Online Appendix: Yes / Clinical Trial #: ..... )

Dear Dr. Quesada:

We are pleased to inform you that your manuscript has been accepted for publication in Diabetes.

Diabetes publishes Original Articles and Brief Reports manuscripts online ahead of print. If you would prefer to not have your manuscript published online ahead of print, or if you think your institution might issue a press release on your article which would require adjusting the prepublication date for your article, please notify Production Manager Vanessa Gabler at [vgabler@diabetes.org](mailto:vgabler@diabetes.org).

Information regarding issue date, page proofs, and ordering reprints will be sent via e-mail to the corresponding author approximately 30-45 days prior to publishing. (Please note that only the corresponding author designated on the title page of the manuscript will receive notification of proof availability.)

Information related to post-prints, graphics, and page charges and reprints can be found below.

All articles accepted for publication in Diabetes will be deposited in PubMed Central, a repository of peer-reviewed research maintained by the National Institutes of Health. Articles will be accessible on PubMed Central 12 months after the date of final print/online publication in Diabetes.

We thank you for submitting your interesting work to Diabetes, and look forward to receiving additional manuscripts from you in the future. In addition, we hope that you will help us to maintain the high standards of Diabetes Journal by agreeing to serve as a reviewer if we should call upon you in the future

Sincerely,

Peter C. Butler, M.D.  
 Diabetes Journal Editor-In-Chief  
 David Geffen School of Medicine at UCLA  
 1033 Gayley Street, Suite 216  
 Los Angeles, CA 90024

For page proofs or to discuss the production process:

Inhibitory effects of leptin on the pancreatic  $\alpha$ -cell function.

**Running title: Leptin and  $\alpha$ -cell function**

Eva Tuduri<sup>1,2,a</sup>, Laura Marroquí<sup>1,2,a</sup>, Sergi Soriano<sup>1,2</sup>, Ana B. Ropero<sup>1,2</sup>, Thiago M. Batista<sup>3</sup>, Sandra Piquer<sup>2,4</sup>, Miguel A. López-Boado<sup>5</sup>, Everardo M. Carneiro<sup>3</sup>, Ramón Gomis<sup>2,4</sup>, Angel Nadal<sup>1,2</sup>, Ivan Quesada<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernandez, Elche, Spain.*

<sup>2</sup> *CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Spain.*

<sup>3</sup> *Instituto Nacional de Pesquisa em Obesidade e Diabetes, Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biology, Unicamp, Campinas SP, Brazil*

<sup>4</sup> *Endocrinology and Diabetes Unit, Laboratory of Diabetes and Obesity, IDIBAPS-Fundació Clínic, Hospital Clínic, Barcelona, Spain.*

<sup>5</sup> *Institut de Malalties Digestives i Metabòliques, Hospital Clínic, Barcelona, Spain*

<sup>a</sup>These authors contributed equally to this work.

Correspondence should be addressed to:

**Ivan Quesada, Ph.D.**

Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernandez,

Avenida de la Universidad, s/n

03202 Elche, Spain

Phone: (34) 96 522 2003

Fax: (34) 96 522 2033

Email: ivanq@umh.es

**Keywords: glucagon, alpha-cells, calcium signals, islets, obesity, diabetes.**

**Objective:** Leptin released from adipocytes plays a key role in the control of food intake, energy balance and glucose homeostasis. In addition to its central action, leptin directly affects pancreatic  $\beta$ -cells, inhibiting insulin secretion, and thus, modulating glucose homeostasis. However, despite the importance of glucagon secretion in glucose homeostasis, the role of leptin in the  $\alpha$ -cell function has not been studied in detail. In the present study, we have investigated this functional interaction.

**Research Design and Methods:** The presence of leptin receptors (ObR) was demonstrated by RT-PCR analysis, western blot and immunocytochemistry. Electrical activity was analyzed by patch-clamp and  $\text{Ca}^{2+}$  signals by confocal microscopy. Exocytosis and glucagon secretion were assessed using fluorescence methods and radioimmunoassay, respectively.

**Results:** The expression of several ObR isoforms (a-e) was detected in glucagon-secreting  $\alpha$ TC1-9 cells. ObRb, the main isoform involved in leptin signaling, was identified at the protein level in  $\alpha$ TC1-9 cells as well as in mouse and human  $\alpha$ -cells. The application of leptin (6.25 nM) hyperpolarized the  $\alpha$ -cell membrane potential, suppressing the electrical activity induced by 0.5 mM glucose. Additionally, leptin inhibited  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in  $\alpha$ TC1-9 cells and in mouse and human  $\alpha$ -cells within intact islets. A similar result occurred with 0.625 nM leptin. These effects were accompanied by a decrease in glucagon secretion from mouse islets and counteracted by the PI3-kinase inhibitor wortmannin, suggesting the involvement of this pathway in leptin action.

**Conclusions:** These results demonstrate that leptin inhibits  $\alpha$ -cell function and thus, these cells are involved in the adipoinsular communication.

## INTRODUCTION.

Among the different hormones released by adipocytes, leptin plays a fundamental role in the control of satiety and body weight by acting on the hypothalamus, and thus, regulating food intake and energy expenditure (1,2). Although several factors modulate the release of leptin from adipocytes, its plasma levels are frequently proportional to body fat mass (1). Its action is mediated by the activation of the leptin receptor (ObR), which is highly expressed in the hypothalamus and cerebellum as well as in other tissues involved in metabolism like the endocrine pancreas, the liver and the adipose tissue (3). The ObR gene produces several splicing variants, yet the long form of the receptor (ObRb) is the main isoform involved in the transduction of intracellular signals (3,4). The activation of ObR induces JAK/STAT signaling, which is implicated in transcriptional modulation (4). Additionally, leptin can induce rapid effects on membrane potential and secretion in endocrine cells and neurons by activating the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) signaling pathway (5-10).

Remarkably, leptin can inhibit insulin expression and secretion in pancreatic  $\beta$ -cells, regulating glucose homeostasis directly through its action on the endocrine pancreas in addition to its central effects (7,11-13). The inhibition of insulin release by leptin is mainly mediated by the hyperpolarization of the membrane potential and a subsequent decrease in  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in both human and rodent  $\beta$ -cells (8-13). These effects result from  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channel opening and involve the PI3K pathway (9-11). Since insulin also stimulates leptin release from adipocytes, there is a bidirectional feed-back loop between  $\beta$ -cells and the adipose tissue. It has been proposed that the dysregulation of this adipoinsular communication may play a role in the development of diabetes in obese individuals (14,15).

However, despite the importance of glucagon secretion in the regulation of glycemia, the effect of leptin on  $\alpha$ -cells has not been studied in detail. The hyperglycemic hormone glucagon increases blood glucose levels essentially by inducing glucose synthesis and mobilization in/from the liver (16,17). Glucagon secretion is the main line of defense against hypoglycemia and also, counterbalances the effects of insulin on glucose levels (18). In diabetes, glucagon secretion does not respond adequately to glucose changes, which leads to further problems in the control of glucose levels in diabetic patients besides those difficulties derived from  $\beta$ -cell malfunction (17,18). Leptin has been revealed as an important modulator of

glucose homeostasis by directly acting on  $\beta$ -cells. Therefore, given that glucagon is an essential player in the islet function and the regulation of glycemia, it is important to determine whether leptin can affect  $\alpha$ -cell function. Since defects in the adipoinsular axis may contribute to diabetes associated to obesity (14,15), a better understanding of the communication between the adipose tissue and the two main endocrine cells involved in glucose homeostasis is essential to design potential therapeutic strategies. Several evidences suggest that leptin could have a role in the  $\alpha$ -cell. It has been reported that mouse models with defects in leptin signaling can develop hyperglucagonemia (19-21). Additionally, it was recently shown that induction of hyperleptinemia decreases glucagon levels in diabetic mice with hyperglucagonemia (22). However, the direct regulation of glucagon secretion by leptin has not been described so far.

In the present study, we show a direct action of leptin on the  $\alpha$ -cell. The presence of ObR was identified in the glucagon-secreting cell line  $\alpha$ TC1-9 and in mouse and human  $\alpha$ -cells. We found that leptin hyperpolarizes the membrane potential in  $\alpha$ -cells, suppressing electrical activity. Additionally, leptin inhibited  $\text{Ca}^{2+}$  signaling and glucagon secretion induced by low glucose concentrations. All these findings indicate that the  $\alpha$ -cell function can be modulated by the adipose tissue through a leptin signaling pathway.

## **MATERIALS AND METHODS.**

**Islet isolation and cell culture.** All protocols were approved by our Animal Care Committee according to national regulations. Swiss albino OF1 mice (8-10 weeks old) were sacrificed by cervical dislocation and islets were then isolated by collagenase digestion (23,24). Isolated islets were dispersed into single cells by trypsin enzymatic digestion and then cultured overnight at 37°C in RPMI 1640 (Sigma, Madrid, Spain) supplemented with 10 % fetal calf serum, 100 IU/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin and 5.6 mM D-glucose (23,24). The glucagon-releasing  $\alpha$ TC1-9 cell line was purchased from the American Type Cultures Collection (ATCC CRL-2350; passage 5-15).  $\alpha$ TC1-9 cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle's medium (Invitrogen) containing (in mM): 4 L-glutamine, 16 glucose, 19  $\text{NaHCO}_3$ , 10% fetal bovine serum, 15 HEPES



and 0.1 non-essential amino acids. Human islets from healthy donors were obtained from the human islet isolation facility of the Clinic Hospital of Barcelona after approval of the Hospital Ethics Committee. Islets were cultured in RPMI-1640 at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Experiments were performed within 48 hours of isolation. Leptin (Calbiochem) was used at 6.25 nM (100 ng/ml) and 0.625 nM (10 ng/ml). Except when indicated, all experiments were carried out at 37° C.

**Ca<sup>2+</sup> signaling measurements by confocal microscopy.** For Ca<sup>2+</sup> experiments, cells were loaded for 1 hour at 37° C with the Ca<sup>2+</sup> probe Fluo-4 (2 μM) (Invitrogen). Islets were loaded with Fluo-4 (5 μM) for 1 hour at room temperature. Islets or cells were placed on a perfusion chamber mounted on the microscope stage (25). Then, they were perfused at a rate of 1.5 ml/min with a modified Ringer solution containing (in mM): 120 NaCl, 5 KCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 1.1 MgCl<sub>2</sub> and 2.5 CaCl<sub>2</sub>; pH= 7.4, gassed with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>. Ca<sup>2+</sup> signals were monitored in individual cells using a Zeiss LSM 510 laser confocal microscope equipped with a 40x oil immersion objective. The configuration of the system was set to excite the Ca<sup>2+</sup> probe at 488 nm and collect the emission with a band-pass filter at 505-530 nm from an optical section of 8 μm. Images were collected at 2 s intervals and treated with a low pass filter (26). As previously reported, individual cells loaded with Fluo-4 were easily identified at the periphery of the islet where α-cells usually are more abundant (26). Fluorescence records were represented as the percentage of  $\Delta F/F_0$  where  $F_0$  is the fluorescence signal at the beginning of a record and  $\Delta F$  is  $F-F_0$ . Background fluorescence was subtracted from  $F_0$ . The frequency of oscillatory Ca<sup>2+</sup> signals was calculated over a 5 min period of the Ca<sup>2+</sup> recording, immediately before and 5 min after the application of the stimulus as previously reported (23). To analyze frequency, a Ca<sup>2+</sup> oscillation or spike was defined as a rapid increase in the intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration higher than twice the standard deviation of the background signal at the intervals between spikes (23). Some data were expressed in percentages with respect to the frequency before the stimulus.

**Glucagon secretion.** Batches of 15 islets were preincubated for 60 min at 37° C in 0.5 ml of Krebs-Ringer bicarbonate buffer supplemented with 15 mM HEPES, 0.5% BSA and 5.6 mM glucose, pH=7.4 (23). Then, the islets were incubated at 37° C for 60 min with Krebs-Ringer

bicarbonate buffer supplemented with 0.5 mM glucose and additional reagents as indicated in the results. At the end of the incubation, the medium was aspirated and assayed for glucagon using a commercial radioimmunoassay kit (Linco Research).

**Analysis of exocytosis by fluorescence imaging.** The exocytotic response of  $\alpha$ TC1-9 cells was monitored at the single-cell level using the styryl dye FM1-43 (Invitrogen) as previously reported (27-29). The cells were incubated for 15 min with FM1-43 (2  $\mu$ M), allowing its incorporation into the cell membrane (27). The dye was maintained continuously throughout the experiment. This cell-impermeable probe is non-fluorescent in an aqueous solution but emits intense fluorescence after partitioning into the plasma membrane. Consequently, the incorporation of secretory granules into the plasma membrane during secretion increases the cell surface, augmenting FM1-43 fluorescence (27-29). The FM1-43 signal was monitored by exciting the cells at 488 nm and obtaining the emission with a 560 nm long-pass filter. The relative change in fluorescence ( $\Delta F$ ) was represented with respect to time for each analyzed cell. The average rate of fluorescence changes ( $\Delta F/\text{min}$ ) was also calculated for each experimental condition. Background signal was subtracted in all cases.

**Patch-clamp recordings.** As previously reported,  $\alpha$ -cells were identified by their size, membrane capacitance (<4 pF) and their characteristic electrical activity in the absence of glucose (30,31). Membrane potential and whole cell currents were recorded in the perforated patch whole-cell configuration using an Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments). Patch pipettes were pulled from borosilicate capillaries using a flaming/brown micropipette puller P-97 (Sutter Instruments Co.) with a resistance of 3-5M $\Omega$  when filled with the pipette solution (in mM): 76 K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 KCl, 10 NaCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 5 HEPES (pH=7.35). The extracellular solution consisted of (in mM): 138 NaCl, 5.6 KCl, 2.6 CaCl<sub>2</sub>, 1.2MgCl<sub>2</sub>, and 5 HEPES (pH=7.4) and supplemented with glucose as indicated (30,31).

**Immunocytochemistry.** This protocol was performed as previously reported (23). Briefly, islets or cells were fixed with Bouin's solution for 5 min and then dehydrated for 3 min with 30, 50,

and 70% ethanol. Triton X-100 (0.5%) was used for permeabilization. To reduce non-specific binding, cells were first pre-incubated with a blocking buffer (5% serum in PBS) for 45 min before applying primary antibodies in a buffer containing 1% serum. Glucagon-containing cells were identified with monoclonal anti-glucagon mouse antibodies (1:200; Sigma, Madrid, Spain). ObR receptors were detected with an anti-ObR goat antibody (1:100; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) or an anti-ObRb rabbit antibody (1:500; Alpha Diagnostic, San Antonio, TX). An anti-ObRb rabbit antibody specific for human was also used (1:100; Millipore). These antibodies were applied overnight at 4°C. After washing, appropriate combinations of secondary antibodies conjugated with Alexa Fluor dyes (1:500; Invitrogen) were applied for 2 hours at room temperature. The omission of the first antibody led to the absence of staining.

**RT-PCR.** Total RNA was isolated using RNeasy Mini Kit (Quiagen). Extracted RNA was quantified by OD260/280 measurement. Extracted RNA was used to generate cDNA using Expand Reverse Transcriptase (Roche, Mannheim, Germany), and 2 µL of each RT reaction were used as input for the PCR. Primers are detailed in table 1. PCR amplification was performed using *Taq*-DNA polymerase (Invitrogen, Barcelona) under the following conditions: 15 s at 94°C, 30 s at 55°C, and 1 min at 72°C. 18S was amplified as an internal control. PCR products were subjected to agarose-gel electrophoresis.

**Western-blot analysis.** Cell pellets were obtained by centrifugation at 1000×*g*×10 min and resuspended in 200 µl of Cell Lysis Buffer (Cell Signaling Technology, Danvers, MA). Cell extracts were subjected to sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis (12% gels). Pre-stained SDS-PAGE standards were included for molecular mass estimation. The transfer to PVDF membranes was performed at 125 mA for 90 min in a buffer with 2.5 mM Tris base, 9 mM glycine, 20% methanol. After membranes were blocked with 2% non-fat dry milk, they were incubated with the above-mentioned anti-ObR (1:100) or anti-ObRb (1:500) antibodies before being incubated with a peroxidase-conjugated donkey anti-goat (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) or goat anti-rabbit (GE Healthcare, Barcelona, Spain) antibodies, respectively. Protein bands were revealed by using the ECL Chemiluminescence Reagents kit (Amersham Biosciences, Barcelona, Spain).

**Statistical analysis.**

Some data is shown as mean  $\pm$  SE. Student's *t* test or one-way ANOVA were performed as appropriate with a level of significance  $p < 0.05$ .



## RESULTS.

### Identification of leptin receptors in $\alpha$ -cells.

Multiple isoforms have been described for the leptin receptor (ObR) (3,4). Although these variants have a common extracellular domain, the intracellular site varies for each isoform. ObRb is the long full-length isoform and it is considered the functional receptor in terms of intracellular signaling (4). To investigate the existence of ObR in glucagon-releasing cells, we first performed a PCR analysis in  $\alpha$ TC1-9 cells. As shown in figure 1A, these cells express mRNA for the majority of ObR isoforms (ObRa-e). The presence of these receptors was also studied at the protein level by western-blot in  $\alpha$ TC1-9 cells. We initially explored the existence of ObR using an antibody that recognizes the extracellular domain, which is common in all the ObR isoforms (Fig. 1B). Nonetheless, given the importance of ObRb for leptin signaling, its presence in these cells was also confirmed with a specific antibody against this isoform (Fig. 1B). Finally, the spatial localization of ObR and ObRb was studied using these antibodies and confocal microscopy. As shown in figure 1C and D, both  $\alpha$ TC1-9 cells and  $\alpha$ -cells within intact mouse islets contain these receptors. Remarkably, ObRb was also identified in human  $\alpha$ -cells. These results indicate that, in addition to  $\beta$ -cells, glucagon-containing cells are also equipped with ObR.

### Leptin hyperpolarizes $\alpha$ -cell membrane potential and suppresses electrical activity.

In the absence of glucose or at low concentrations,  $\alpha$ -cells produce a characteristic, regenerative electrical activity (30-36) that triggers  $\text{Ca}^{2+}$  signals and glucagon secretion. Thus, to study the functional role of leptin in  $\alpha$ -cells, we first recorded their electrical activity using the patch-clamp technique in the whole-cell configuration. In 0.5 mM of glucose, all the analyzed  $\alpha$ TC1-9 cells displayed a characteristic electrical activity with action potentials that originated from  $-39.9 \pm 0.2$  mV (Fig. 2A). The application of leptin (6.25 nM) hyperpolarized the membrane potential by  $-21.1 \pm 1.1$  mV and suppressed electrical activity. Although the effect of leptin persisted in some cells, its removal from the bath allowed for the depolarization of the membrane potential and the restoration of electrical activity (Fig. 2A, B). Similar effects were found in mouse  $\alpha$ -cells, since leptin hyperpolarized the membrane

potential from  $-37.3 \pm 0.6$  mV to  $-60.6 \pm 0.4$  mV, and decreased electrical activity as well (Fig. 2C, D). Thus, leptin is able to induce short-term effects that modulate electrical responses in  $\alpha$ -cells, in agreement with findings in other secretory cells (6,8-11).

### **Regulation of $\text{Ca}^{2+}$ signaling by leptin in $\alpha$ -cells.**

Since glucose-regulated  $\text{Ca}^{2+}$  signals in  $\alpha$ -cells are mainly sustained by their electrical activity (16,17,36), the effect of leptin on membrane potential should affect  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations. It has been reported that, among the different islet-cell types,  $\alpha$ -cells isolated in culture or within mouse islets are unique in displaying  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations at low glucose levels (23,25,37-41). As shown in figure 3,  $\alpha$ -cells exhibited this characteristic oscillatory  $\text{Ca}^{2+}$  pattern with 0.5 mM glucose. The application of leptin (6.25 nM) produced either a complete blockage or a decrease in the frequency of the  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations in both  $\alpha\text{TC1-9}$  cells and  $\alpha$ -cells within intact mouse islets (Fig. 3A-C). The average effect of leptin was a decrease of  $\sim 60\%$  and  $\sim 40\%$  in the  $\text{Ca}^{2+}$  signaling frequency in  $\alpha\text{TC1-9}$  cells and mouse  $\alpha$ -cells, respectively (Fig. 3E). A similar response was observed with 3 mM glucose (supplementary Figure S1). Removal of leptin from the bath allowed for the restoration of  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations (Supplementary Figure S2). After long periods of stimulation this reversibility was not complete during the recording time, since the leptin effect may be more persistent. The addition of 0.625 nM leptin also produced an inhibitory effect in  $\alpha\text{TC1-9}$  cells ( $\sim 45\%$  decrease; Fig. 3E). In contrast, although 0.625 nM leptin blocked  $\text{Ca}^{2+}$  signals in  $\sim 57\%$  of  $\alpha$ -cells (Fig. 3D), the average effect was not significant because of the heterogeneous response to this concentration (Fig. 3E). To avoid the potential contribution of islet paracrine interactions on the leptin action, some experiments were performed with isolated  $\alpha$ -cells (Fig. 3F). In these conditions, leptin produced a similar inhibitory response, proving its direct action on  $\alpha$ -cells. The absence of effect on  $\alpha$ -cells from db/db mice, which lack functional ObRb, gave further molecular evidence that this receptor is involved in the leptin-induced actions (Supplementary Figure S3). Finally, the response of  $\alpha$ -cells to this hormone was also evaluated in human islets (Fig. 4). Application of leptin at 6.25 and 0.625 nM decreased  $\text{Ca}^{2+}$  signals by  $\sim 58\%$  and  $\sim 32\%$ , respectively. This result indicates that ObR is also functional in human  $\alpha$ -cells.

It has been reported that the leptin effect on electrical activity and  $\text{Ca}^{2+}$  signals is mediated by the PI3K pathway in pancreatic  $\beta$ -cells and neurons (5,6,8-10). In order to determine whether this pathway is also involved in the  $\alpha$ -cell, some experiments were performed in the presence of the PI3K inhibitor wortmannin (20 nM) (Fig. 5). In these conditions, leptin failed to inhibit  $\text{Ca}^{2+}$  signals in  $\alpha\text{TC1-9}$  cells (Fig. 5B and C), as shown in other cell types (6,8). Thus, the PI3K pathway may be involved in the leptin effect. The following results further support these observations.

### **Reduced glucagon secretion in the presence of leptin.**

Glucagon secretion depends on  $\text{Ca}^{2+}$  signaling (16,17). Thus, all these changes induced by leptin may be associated to alterations in the secretory pattern. To test this possibility, we analyzed glucagon release from isolated mouse islets using radioimmunoassay (Fig. 6A). Glucagon secretion with 0.5 mM glucose is almost maximal in mice (42). Incubation with 10 mM glucose reduced glucagon release by ~55%, consistent with previous reports (42). In the presence of 6.25 nM leptin, glucagon secretion with 0.5 mM glucose decreased by ~33%. The inhibitory effect was not statistically significant with 0.625 nM leptin, which probably may result from the heterogeneous response observed in  $\text{Ca}^{2+}$  signaling with this concentration (Fig. 3E). In agreement with the previous finding with  $\text{Ca}^{2+}$  signals (Fig. 5), wortmannin counteracted the blocking action of 6.25 nM leptin on glucagon secretion (Fig. 6A), further indicating the involvement of the PI3K pathway. Finally, to further prove the influence of leptin on the secretory process, we analyzed exocytosis at the single-cell level by monitoring FM1-43 fluorescence in  $\alpha\text{TC1-9}$  cells, as previously reported in  $\beta$ -cells (27-29). FM1-43 emits fluorescence when it partitions into the plasma membrane. Thus, the incorporation of secretory granules into the plasma membrane increases the cell surface and also, the fluorescence of FM1-43 (27-29). As shown in Fig. 6B and C, the fluorescence augmented with 0.5 mM glucose (control), indicating an active secretory response. This increase was significantly reduced in the presence of leptin (6.25 nM). Again, the application of wortmannin counteracted this effect (Fig. 6C). Thus, all these observations indicate that leptin is working as an inhibitory regulator of  $\alpha$ -cell function.

## DISCUSSION

Glucose homeostasis is mainly regulated by the coordinated action of glucagon and insulin secreted from pancreatic  $\alpha$  and  $\beta$ -cells, respectively (17). These two islet populations respond reciprocally to blood glucose changes. Pancreatic  $\alpha$ -cells develop spontaneous electrical activity at low glucose concentrations, leading to  $\text{Ca}^{2+}$  signals and glucagon secretion, while these processes become inhibited with the elevation of glucose levels (25,26,31,33-35,38). Remarkably, this glucagon secretory response can be impaired in diabetic individuals, aggravating the difficulties in the control of glycemia (17-18). Glucose homeostasis can be further regulated by the adipocyte hormone leptin through its inhibitory action on  $\beta$ -cell secretion (7,11-13). It has been proposed that defects in this communication may be implicated in obesity-induced diabetes (12,14,15). The functional role of leptin in pancreatic  $\alpha$ -cells and its involvement in the adipoinsular communication, however, has not been investigated extensively.

In the present study, we have shown that leptin receptors are present in mouse and human glucagon-containing cells. We demonstrate that leptin produces significant changes in the membrane potential, electrical activity,  $\text{Ca}^{2+}$  signaling and glucagon secretion in mouse  $\alpha$ -cells as well as glucagon-secreting  $\alpha\text{TC1-9}$  cells. This cell line has been previously validated as a good model to study  $\alpha$ -cell function (38). Additionally, the blocking action of leptin on  $\text{Ca}^{2+}$  signaling was also demonstrated in human  $\alpha$ -cells. In a previous report, the function of leptin was not studied in  $\alpha$ -cells because of the lack of ObR expression in hamster glucagonoma INR1G-9 cells and a weak antibody staining in isolated rat  $\alpha$ -cells (11). Although methodological or interspecies differences may account for this discrepancy, our findings on the presence of ObR in  $\alpha$ -cells are further sustained by the demonstration of direct leptin actions at the single-cell level.

It has been reported that leptin induces membrane potential changes that can modulate electrical activity in neurons and in  $\beta$ -cells (5,6,8-11,43). In agreement with these findings, we have observed similar effects in the pancreatic  $\alpha$ -cell. In contrast to other islet-cell populations,  $\alpha$ -cells are electrically active in the absence or at low concentrations of glucose (30,33-35). In these conditions, spontaneous action potentials arise from a membrane potential that varies from -60 to -40 mV depending on experimental conditions (30,33-35). In  $\alpha\text{TC1-9}$



cells and mouse  $\alpha$ -cells, we observed this characteristic electrical activity with 0.5 mM glucose, where action potentials arose from a membrane potential of  $\sim -40$  mV. Consistent with the results obtained in other secretory cell types including  $\beta$ -cells (6,8-11,43), leptin hyperpolarized the membrane potential and decreased electrical activity (Fig. 2), which is voltage-dependent (33,34,40). Additionally, this hormone inhibited intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations and glucagon secretion (Fig. 3, 4 and 6). This effect could be anticipated in  $\alpha$ -cells since their electrical activity triggers  $\text{Ca}^{2+}$  signals, and exocytosis is  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent (16,17). In the case of the pancreatic  $\beta$ -cell, leptin effects on membrane potential are also reflected in  $\text{Ca}^{2+}$  signals and insulin release (11,12). Like leptin, other hormones such as insulin and somatostatin can inhibit glucagon secretion in  $\alpha$ -cells by mechanisms that involve membrane hyperpolarization and suppression of electrical activity, affecting  $\text{Ca}^{2+}$  signals (38,44,45). It has been proposed that the effects of leptin on  $\beta$ -cell membrane potential are mediated by the opening of  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channels (11). A similar process may occur in  $\alpha$ -cells, since their membrane potential is controlled by the  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channel and its activation causes the hyperpolarization of these cells (40). In any case, further experiments should be performed since other molecular targets may be involved in leptin actions (3,4).

Leptin can activate multiple signaling cascades (4). Among them, PI3K signaling has an important function in leptin short-term effects on membrane potential,  $\text{Ca}^{2+}$  signals and secretion in pancreatic  $\beta$ -cells and in neurons (5-10). In agreement with these findings, leptin failed to decrease  $\text{Ca}^{2+}$  signaling and secretion in  $\alpha$ -cells when PI3K was inhibited (Fig. 5 and 6). Therefore, this signaling pathway seems to be involved in the intracellular transduction of leptin short-term effects on the  $\alpha$ -cell.

Basal plasma leptin concentrations are in the order of 1-10 ng/ml ( $\sim 0.0625$ - $0.625$  nM) during fasting state (1-3, 46). These values can increase significantly every day by circadian mechanisms (46) and these fluctuations are higher in female (47). Factors like feeding behavior, gender, age and pregnancy, or elevation of hormones such as insulin, oestrogen or glucocorticoids can increase plasma leptin levels (1-3). Leptin concentrations can reach 30-100 ng/ml ( $\sim 1.87$ - $6.25$  nM) in obesity and are highly elevated in situations such as impaired renal function and inflammatory responses (1-3,46,47). The present study demonstrates a clear inhibitory effect at 6.25 nM. This response was more heterogeneous at 0.625 nM. At this concentration, leptin inhibited  $\text{Ca}^{2+}$  signals in  $\alpha\text{TC1-9}$  and human  $\alpha$ -cells (Fig. 3E and 4), yet

the average effect was not found significant in mouse  $\alpha$ -cells (Fig. 3E). Nevertheless, 0.625mM leptin had a blocking action in several cells (~57%; Fig. 3D). Thus, these results indicate that mouse  $\alpha$ -cells may be less sensitive to leptin than human. Additionally, these observations suggest that leptin effects may be more limited at basal plasma levels, but they should be more effective in those situations when this hormone increases above basal values or in pathological situations.

The present findings indicate that leptin can directly regulate  $\alpha$ -cell function. This suggests that the adipose tissue may modulate glucose homeostasis not only by inhibiting  $\beta$ -cells and insulin release but  $\alpha$ -cells and glucagon secretion as well. Thus, the effect of leptin on islet hormonal responses would be similar to that of somatostatin, which limits both insulin and glucagon release (16,17). Since leptin has been detected in  $\alpha$ -cells of some mice strains, this hormone may also play a local autoregulatory effect within the islet (48). Interestingly, hyperglucagonemia has been reported in mouse models that have defects in leptin and ObR, which impairs the signaling by this hormone (19-21). Moreover, a similar suppressive action by leptin has been recently observed in vivo in diabetic mice with hyperglucagonemia and hyperglycemia (22). In these rodents, hyperglucagonemia was reduced by adenoviral-induced hyperleptinemia, which normalized glucose levels. Our results indicate that, although several mechanisms could be involved, this effect may be the result of a direct action on  $\alpha$ -cells. It has been demonstrated that leptin regulates hepatic glucose fluxes and, remarkably, that this hormone antagonizes the effects of glucagon in the liver, the main target for  $\alpha$ -cell function (49,50). Our present observations suggest that leptin could antagonize glucagon action not only in the liver but also directly in the  $\alpha$ -cells. In diabetic individuals, an absolute or relative excess of glucagon along with insulin deficiency can generate an excessive hepatic glucose production (17,18). Since this can be a major problem in these patients, several approaches have been developed to limit glucagon secretion and/or action (17,18). In this regard, the direct inhibitory effect of leptin on the  $\alpha$ -cell reported in this study may be explored as a therapeutic strategy for the control of glucagon levels, as has been recently suggested for type I diabetes (22). The specific management of glucagon levels by leptin would be more complex if  $\beta$ -cells are functional, since leptin could also affect insulin release (10,11). Thus, further research will be necessary in this context to develop approaches to discriminate the secretory responses of  $\alpha$  and  $\beta$ -cells to this hormone. Leptin resistance has been reported in obese

---

individuals and several mechanisms have been proposed to explain this process at the central level (2-4). However, although it has been suggested that leptin resistance may occur directly in the  $\beta$ -cell, there is not information about the molecular determinants involved (12,14,15). It has been proposed that  $\beta$ -cell leptin resistance and dysregulation of the adipoinular communication may contribute to obesity-induced diabetes (12,14,15). Thus, it would be interesting to analyze whether  $\alpha$ -cells may develop leptin resistance in this context and the role that these cells may be playing in this situation.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS.**

The authors thank A.B. Rufete, M.L. Navarro and M. Julià for their expert technical assistance. This work was supported by grants from the Ministerio de Educacion y Ciencia (BFU2007-67607; PCI2005-A7-0131; BFU2008-01492; SAF2006-07382), Ministerio de Ciencia e Innovación (ISCIII- Acción Transversal de Terapias Avanzadas) and FAPESP (2008/53811-8). CIBERDEM is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III.

---

**REFERENCES**

1. Margetic S, Gazzola C, Pegg GG, Hill RA: Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26:1407-1433, 2002
2. Niswender KD, Schwartz MW: Insulin and leptin revisited: adiposity signals with overlapping physiological and intracellular signaling capabilities. *Front Neuroendocrinol* 24:1-10, 2003
3. Anubhuti, Arora S: Leptin and its metabolic interactions - an update. *Diabetes Obes Metab* 10:973-993, 2008
4. Frühbeck G. Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem J* 393:7-20. 2006
5. Shanley LJ, O'Malley D, Irving AJ, Ashford ML, Harvey J: Leptin inhibits epileptiform-like activity in rat hippocampal neurones via PI 3-kinase-driven activation of BK channels. *J Physiol* 545:933-44. 2002
6. Hill JW, Williams KW, Ye C, Luo J, Balthasar N, Coppari R, Cowley MA, Cantley LC, Lowell BB, Elmquist JK: Acute effects of leptin require PI3K signaling in hypothalamic proopiomelanocortin neurons in mice. *J Clin Invest* 118:1796-1805, 2008
7. Zhao AZ, Bornfeldt KE, Beavo JA: Leptin inhibits insulin secretion by activation of phosphodiesterase 3B. *J Clin Invest* 102:869-873, 1998
8. Ning K, Miller LC, Laidlaw HA, Burgess LA, Perera NM, Downes CP, Leslie NR, Ashford ML: A novel leptin signalling pathway via PTEN inhibition in hypothalamic cell lines and pancreatic beta-cells. *EMBO J* 25:2377-2387, 2006
9. Harvey J, McKay NG, Walker KS, Van der Kaay J, Downes CP, Ashford ML: Essential role of phosphoinositide 3-kinase in leptin-induced K(ATP) channel activation in the rat CRI-G1 insulinoma cell line. *J Biol Chem* 275:4660-4669, 2000
10. Harvey J, Hardy SC, Irving AJ, Ashford ML: Leptin activation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> (KATP) channels in rat CRI-G1 insulinoma cells involves disruption of the actin cytoskeleton. *J Physiol* 527:95-107, 2000
11. Kieffer TJ, Heller RS, Leech CA, Holz GG, Habener JF: Leptin suppression of insulin secretion by the activation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 46:1087-1093, 1997

12. Seufert J, Kieffer TJ, Leech CA, Holz GG, Moritz W, Ricordi C, Habener JF: Leptin suppression of insulin secretion and gene expression in human pancreatic islets: implications for the development of adipogenic diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 84:670-676, 1999
13. Seufert J, Kieffer TJ, Habener JF: Leptin inhibits insulin gene transcription and reverses hyperinsulinemia in leptin-deficient ob/ob mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:674-679, 1999
14. Morioka T, Asilmaz E, Hu J, Dishinger JF, Kurpad AJ, Elias CF, Li H, Elmquist JK, Kennedy RT, Kulkarni RN: Disruption of leptin receptor expression in the pancreas directly affects beta cell growth and function in mice. *J Clin Invest* 117:2860-2868, 2007
15. Covey SD, Wideman RD, McDonald C, Unniappan S, Huynh F, Asadi A, Speck M, Webber T, Chua SC, Kieffer TJ: The pancreatic beta cell is a key site for mediating the effects of leptin on glucose homeostasis. *Cell Metab* 4:291-302, 2006
16. Gromada J, Franklin I, Wollheim CB: Alpha-cells of the endocrine pancreas: 35 years of research but the enigma remains. *Endocr Rev* 28:84-116, 2007
17. Quesada I, Tuduri E, Ripoll C, Nadal A: Physiology of the pancreatic alpha-cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes. *J Endocrinol* 199:5-19, 2008
18. Dunning BE, Gerich JE: The Role of alpha-Cell Dysregulation in Fasting and Postprandial Hyperglycemia in Type 2 Diabetes and Therapeutic Implications. *Endocr Rev* 28:253-283, 2007
19. Strowski MZ, Cashen DE, Birzin ET, Yang L, Singh V, Jacks TM, Nowak KW, Rohrer SP, Patchett AA, Smith RG, Schaeffer JM: Antidiabetic activity of a highly potent and selective nonpeptide somatostatin receptor subtype-2 agonist. *Endocrinology* 147:4664-4673, 2006
20. Stearns SB, Benzo CA: Glucagon and insulin relationships in genetically diabetic (db/db) and in streptozotocin-induced diabetic mice. *Horm Metab Res* 10:20-23, 1978
21. Dunbar JC, Walsh MF: Glucagon and insulin secretion by islets of lean and obese (ob/ob) mice. *Horm Metab Res* 12:39-40, 1980
22. Yu X, Park BH, Wang MY, Wang ZV, Unger RH: Making insulin-deficient type 1 diabetic rodents thrive without insulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:14070-14075, 2008

23. Tudurí E, Filiputti E, Carneiro EM, Quesada I: Inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$  signaling and glucagon secretion in mouse pancreatic alpha-cells by extracellular ATP and purinergic receptors. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294:E952-E960, 2008
24. Quesada I, Todorova MG, Soria B: Different metabolic responses in alpha-, beta-, and delta-cells of the islet of Langerhans monitored by redox confocal microscopy. *Biophys J* 90:2641-2650, 2006
25. Nadal A, Quesada I, Soria B: Homologous and heterologous asynchronicity between identified alpha-, beta- and delta-cells within intact islets of Langerhans in the mouse. *J Physiol* 517:85-93, 1999
26. Quesada I, Nadal A, Soria B: Different effects of tolbutamide and diazoxide in alpha, beta and delta cells within intact islets of Langerhans. *Diabetes* 48:2390-2397, 1999
27. Smukler SR, Tang L, Wheeler MB, Salapatek AM: Exogenous nitric oxide and endogenous glucose-stimulated beta-cell nitric oxide augment insulin release. *Diabetes* 51:3450-3460, 2002
28. Takahashi N, Kishimoto T, Nemoto T, Kadowaki T, Kasai H: Fusion pore dynamics and insulin granule exocytosis in the pancreatic islet. *Science* 297:1349-1352, 2002
29. Leung YM, Sheu L, Kwan E, Wang G, Tsushima R, Gaisano H: Visualization of sequential exocytosis in rat pancreatic islet beta cells. *Biochem Biophys Res Commun* 292:980-986, 2002
30. Barg S, Galvanovskis J, Göpel SO, Rorsman P, Eliasson L: Tight coupling between electrical activity and exocytosis in mouse glucagon-secreting alpha-cells. *Diabetes* 49:1500-1510, 2000
31. Gromada J, Ma X, Hoy M, Bokvist K, Salehi A, Berggren PO, Rorsman P: ATP-sensitive  $\text{K}^+$  channel-dependent regulation of glucagon release and electrical activity by glucose in wild-type and SUR1<sup>-/-</sup> mouse alpha-cells. *Diabetes* 53:S181-S189, 2004
32. Gromada J, Bokvist K, Ding WG, Barg S, Buschard K, Renstrom E, Rorsman P: Adrenaline stimulates glucagon secretion in pancreatic A-cells by increasing the  $\text{Ca}^{2+}$  current and the number of granules close to the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *J Gen Physiol* 110:217-228, 1997
33. Göpel SO, Kanno T, Barg S, Rorsman P: Patch-clamp characterisation of somatostatin-secreting -cells in intact mouse pancreatic islets. *J Physiol* 528:497-507, 2000

34. Gopel SO, Kanno T, Barg S, Weng XG, Gromada J, Rorsman P: Regulation of glucagon release in mouse alpha-cells by  $K_{ATP}$  channels and inactivation of TTX-sensitive  $Na^+$  channels. *J Physiol* 528:509-520, 2000
35. Manning Fox JE, Gyulkhandanyan AV, Satin LS, Wheeler MB: Oscillatory membrane potential response to glucose in islet beta-cells: a comparison of islet-cell electrical activity in mouse and rat. *Endocrinology* 147:4655-4663, 2006
36. Quoix N, Cheng-Xue R, Mattart L, Zeinoun Z, Guiot Y, Beauvois MC, Henquin JC, Gilon P: Glucose and pharmacological modulators of ATP-sensitive  $K^+$  channels control  $[Ca^{2+}]_c$  by different mechanisms in isolated mouse alpha-cells. *Diabetes* 58:412-421, 2009
37. Quesada I, Todorova MG, Alonso-Magdalena P, Beltra M, Carneiro EM, Martin F, Nadal A, Soria B: Glucose induces opposite intracellular  $Ca^{2+}$  concentration oscillatory patterns in identified alpha- and beta-cells within intact human islets of Langerhans. *Diabetes* 55:2463-2469, 2006
38. Ravier MA, Rutter GA: Glucose or insulin, but not zinc ions, inhibit glucagon secretion from mouse pancreatic alpha-cells. *Diabetes* 54:1789-1797, 2005
39. Berts A, Gylfe E, Hellman B:  $Ca^{2+}$  oscillations in pancreatic islet cells secreting glucagon and somatostatin. *Biochem Biophys Res Commun* 208:644-649, 1995
40. Macdonald PE, Marinis YZ, Ramracheya R, Salehi A, Ma X, Johnson PR, Cox R, Eliasson L, Rorsman P: A  $K_{ATP}$  Channel-Dependent Pathway within alpha Cells Regulates Glucagon Release from Both Rodent and Human Islets of Langerhans. *PLoS Biol* 5:e143, 2007
41. Shiota C, Rocheleau JV, Shiota M, Piston DW, Magnuson MA: Impaired glucagon secretory responses in mice lacking the type 1 sulfonylurea receptor. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289:E570-577, 2005
42. Salehi A, Vieira E, Gylfe E. Paradoxical stimulation of glucagon secretion by high glucose concentrations. *Diabetes* 55:2318-2323, 2006
43. Ma X, Zubcevic L, Ashcroft FM: Glucose regulates the effects of leptin on hypothalamic POMC neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:9811-9816, 2008
44. Xu E, Kumar M, Zhang Y, Ju W, Obata T, Zhang N, Liu S, Wendt A, Deng S, Ebina Y: Intra-islet insulin suppresses glucagon release via GABA-GABAA receptor system. *Cell Metab* 3:47-58, 2006

45. Yoshimoto Y, Fukuyama Y, Horio Y, Inanobe A, Gotoh M, Kurachi Y: Somatostatin induces hyperpolarization in pancreatic islet [alpha] cells by activating a G protein-gated K<sup>+</sup> channel. *FEBS Lett* 444:265-269, 1999
46. Licinio J, Mantzoros C, Negrão AB, Cizza G, Wong ML, Bongiorno PB, Chrousos GP, Karp B, Allen C, Flier JS, Gold PW: Human leptin levels are pulsatile and inversely related to pituitary-adrenal function. *Nat Med* 3:575-579, 1997
47. Licinio J, Negrão AB, Mantzoros C, Kaklamani V, Wong ML, Bongiorno PB, Negro PP, Mulla A, Veldhuis JD, Cernal L, Flier JS, Gold PW: Sex differences in circulating human leptin pulse amplitude: clinical implications. *J Clin Endocrinol Metab* 83:4140-4147, 1998
48. Reddy S, Lau EM, Ross JM: Immunohistochemical demonstration of leptin in pancreatic islets of non-obese diabetic and CD-1 mice: co-localization in glucagon cells and its attenuation at the onset of diabetes. *J Mol Histol* 35:511-519, 2004
49. Aiston S, Agius L: Leptin enhances glycogen storage in hepatocytes by inhibition of phosphorylase and exerts an additive effect with insulin. *Diabetes* 48:15-20, 1999
50. Zhao AZ, Shinohara MM, Huang D, Shimizu M, Eldar-Finkelman H, Krebs EG, Beavo JA, Bornfeldt KE: Leptin induces insulin-like signaling that antagonizes cAMP elevation by glucagon in hepatocytes. *J Biol Chem* 275:11348-11354, 2000



**Table 1.** PCR primers for ObR isoforms and 18S.

NAME	Sense Primer (5'-3')	Antisense primer (5'-3')
<b>ObRa</b>	AGGGCTGTATGTCATTGTACCCAT	AGTTTAGGTTTGTTCCTCCATC
<b>ObRb</b>	ACAGTTCTGGCTGTCAATTCCC	AGGAGCTGCTAGAAAGACTG
<b>ObRc</b>	ACAGTTCTGGCTGTCAATTCCC	GAAAGGATGAACAGGCTTGAGAAC
<b>ObRd</b>	AGGGCTGTATGTCATTGTACCCAT	CTTCATGTAAAGATATATCCTTTTCC
<b>ObRe</b>	AGGGCTGTATGTCATTGTACCCAT	CCATGAAAAGTACAGTACACATACC
<b>18S</b>	GGGAGGTAGTGACGAAAAATAAC	AATCATGGCCTCAGTTCCGAAA

**FIGURE LEGENDS**

**Figure 1. Expression of leptin receptors in the pancreatic  $\alpha$ -cell.** A: PCR analysis of ObR transcripts shows that multiple isoforms are expressed in  $\alpha$ TC1-9 cells. The expression in the mouse hypothalamus (Hyp) and islets is also illustrated. B: The presence of ObRb was demonstrated in  $\alpha$ TC1-9 cells and in mouse islets by western blot as well. An antibody that recognizes the extracellular domain of all the isoforms was also tested (ObR). Two examples are shown for the  $\alpha$ TC1-9 cells. C and D: The spatial localization of ObRb in  $\alpha$ TC1-9 cells and in  $\alpha$ -cells within mouse and human islets (green) was assayed by immunofluorescence and confocal microscopy. Glucagon staining is shown in red. As in B, we also used an antibody that recognizes all the isoforms (ObR). These results are representative of at least 3 different experiments for each condition. Scale bar: 20  $\mu$ m.

**Figure 2. Leptin induces membrane hyperpolarization and inhibition of electrical activity.**

A: Recording of membrane potential in whole-cell configuration in  $\alpha$ TC1-9 cells. With 0.5 mM glucose, characteristic action potentials originated from a membrane potential of  $-39.9 \pm 0.2$  mV (n=8). The application of leptin (6.25 nM) induced hyperpolarization ( $21.1 \pm 1.1$  mV) and suppression of electrical activity. Removal of leptin allowed for a depolarization and recovery of electrical activity. B: Expanded records from panel A of different significant instants (indicated by numbers). C: With 0.5 mM glucose, an intense electrical activity was recorded in mouse  $\alpha$ -cells. Leptin (6.25 nM) hyperpolarized these cells from  $-37.3 \pm 0.6$  mV to  $-60.6 \pm 0.4$

mV (n=3), and decreased electrical activity. D: Expanded records from panel C of different significant instants (indicated by numbers). Lept: leptin

**Figure 3. Leptin inhibits Ca<sup>2+</sup> signals induced by low glucose concentrations in  $\alpha$ TC1-9 and mouse  $\alpha$ -cells.** Leptin (6.25 nM) blocks or reduces the frequency of Ca<sup>2+</sup> signals induced with 0.5 mM glucose in  $\alpha$ TC1-9 (A) and  $\alpha$ -cells (B) (n=13 and 16, respectively). Images show a culture of  $\alpha$ TC1-9 cells (A) and an intact mouse islet (B) loaded with the Ca<sup>2+</sup>-sensitive probe Fluo-4. Islet images were acquired by confocal microscopy from an optical section close to the equatorial plane. Several individual cells were easily identified at the periphery of the islet (white arrows). C: Average frequency of Ca<sup>2+</sup> oscillations with 0.5 mM glucose (control) and in the presence of leptin. D: Effect of 0.625 nM leptin in islet  $\alpha$ -cells (n=20; n= 52 for  $\alpha$ TC1-9 cells, not shown). E: Frequency (%) of Ca<sup>2+</sup> signals after stimuli compared with control conditions. F: Leptin inhibits Ca<sup>2+</sup> signaling in isolated islet  $\alpha$ -cells (n=11). The effect of adrenaline, which is characteristic of this islet-cell type (32), is also shown. Data in panel C and E are shown as mean  $\pm$  SE. \*, statistically significant (p < 0.05) compared with control. G: glucose; Lept: leptin; Adren: adrenaline. Scale bar: 20  $\mu$ m.

**Figure 4. Leptin decreases Ca<sup>2+</sup> signaling in human  $\alpha$ -cells.** The application of 6.25 nM leptin (A) or 0.625 nM (B, C) blocks or reduces the frequency of Ca<sup>2+</sup> signals induced with 0.5 mM glucose in human  $\alpha$ -cells. D: Average frequency of Ca<sup>2+</sup> oscillations in 0.5 mM glucose (control) and in the presence of leptin at 6.25 nM and 0.625 nM (n=12 and 45, respectively). Data are shown as mean  $\pm$  SE. Statistically significant: \*, p<0.05; \*\*, p<0.01, compared with controls. G: glucose; Lept: leptin.

**Figure 5. Leptin does not affect Ca<sup>2+</sup> signals in the presence of wortmannin.** A: In the presence of the PI3K inhibitor wortmannin (20 nM), leptin was unable to affect the intracellular Ca<sup>2+</sup> oscillations induced with 0.5 mM glucose in  $\alpha$ TC1-9 cells (n=8). B: Average frequency of Ca<sup>2+</sup> signals with 0.5 mM glucose (control) and leptin, both in the presence of wortmannin. Data in panel B and C are shown as mean  $\pm$  SE. Ns, non-significant. G: glucose; Lept: leptin.

**Figure 6. Effect of leptin on glucagon secretion.** A: Glucagon secretion from mouse islets with 10 mM glucose or with 0.5 mM glucose plus 0.625 nM or 6.25 nM leptin was compared

---

with the control (0.5 mM glucose). The effect of wortmannin (50 nM) on glucagon release with 0.5 mM glucose in the absence and presence of 6.25 nM leptin is also displayed. Data are shown as mean  $\pm$  SE (n=8-13). B: Changes in FM1-43 fluorescence ( $\Delta F$ ; arbitrary units) versus time in  $\alpha$ TC1-9 cells in control conditions (0.5 mM glucose) and in the presence of leptin (6.25 nM). Inset: images illustrating a group of cells in transmitted light (a) and loaded with FM1-43 at the beginning (b) and at the end of the record (c). Scale bar: 10  $\mu$ m. C: The average rate of fluorescence changes as a function of time ( $\Delta F/\text{min}$ ) indicates that leptin reduces the exocytotic response. This effect was counteracted by wortmannin (20 nM). Data are shown as mean  $\pm$  SE (n=32-45 for each condition). \*,  $p < 0.05$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  vs control. G: glucose; Lept: leptin.



Figure 1

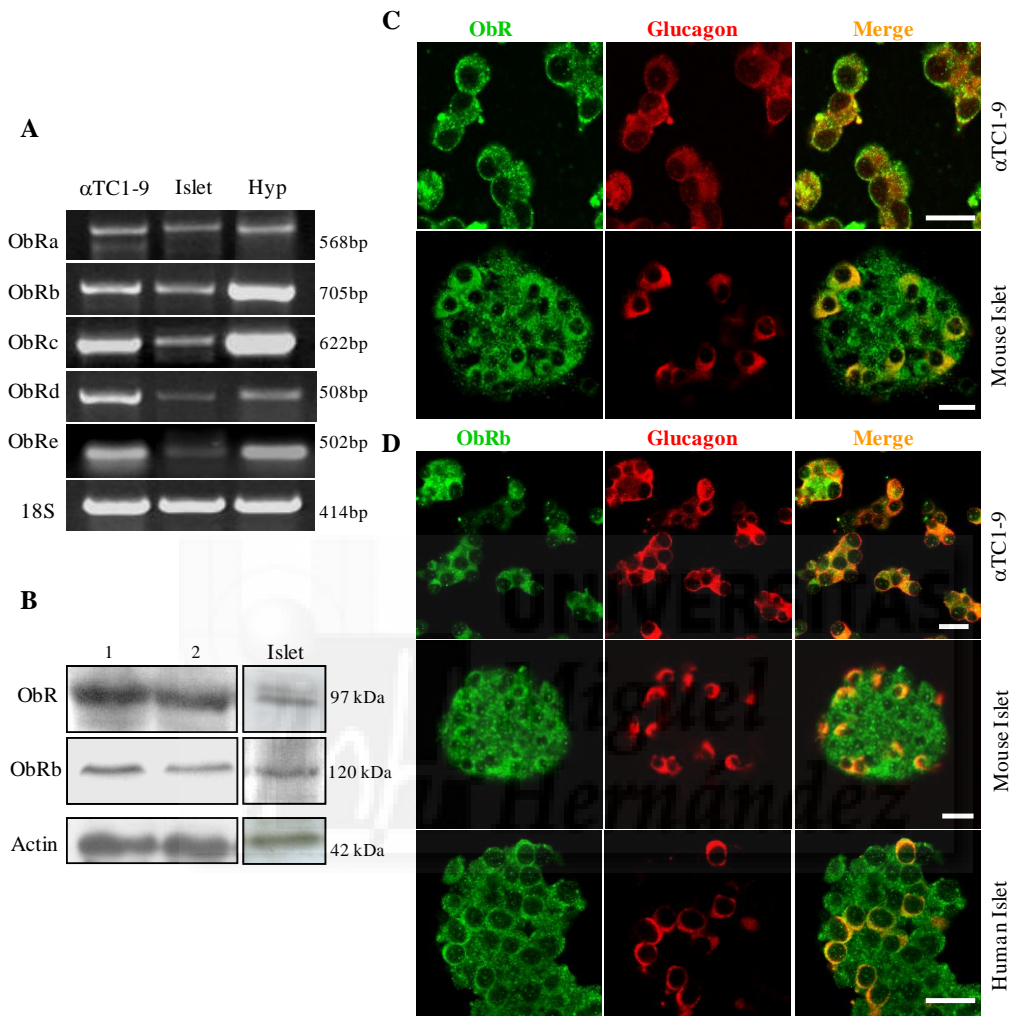


Figure 2

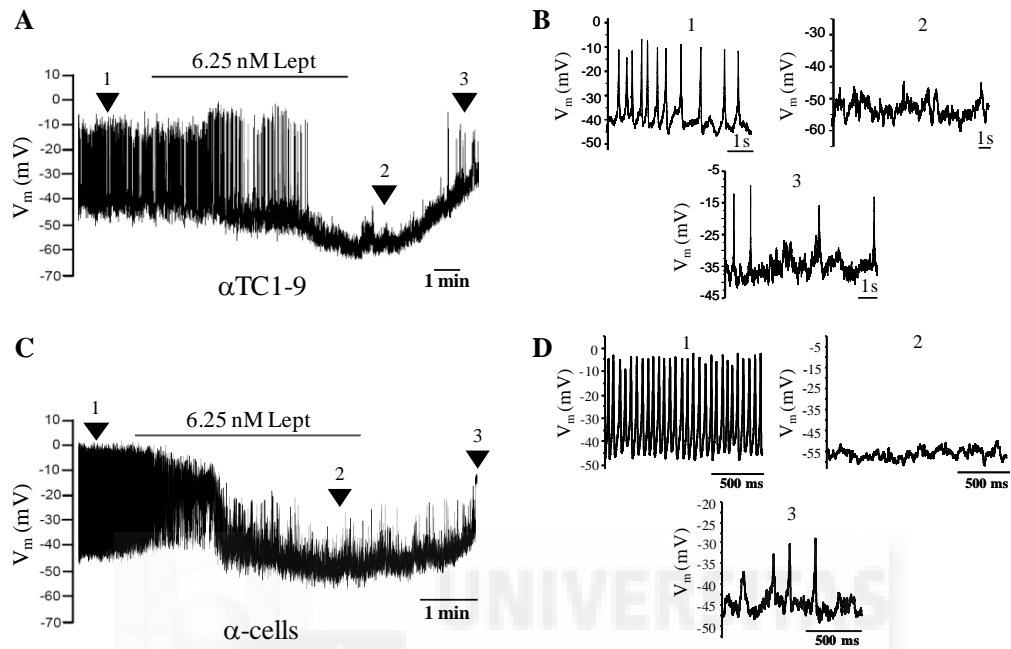


Figure 3

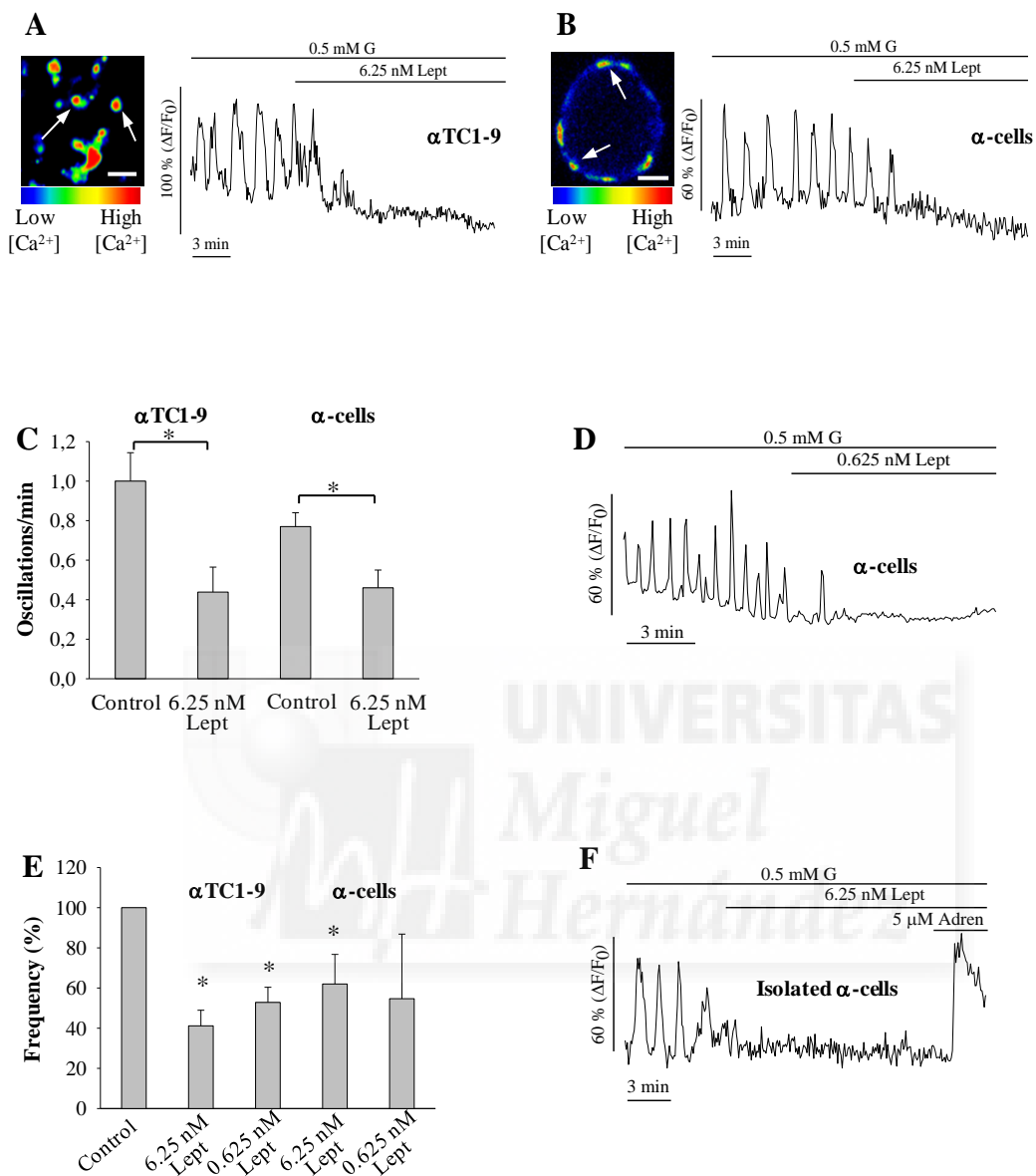


Figure 4

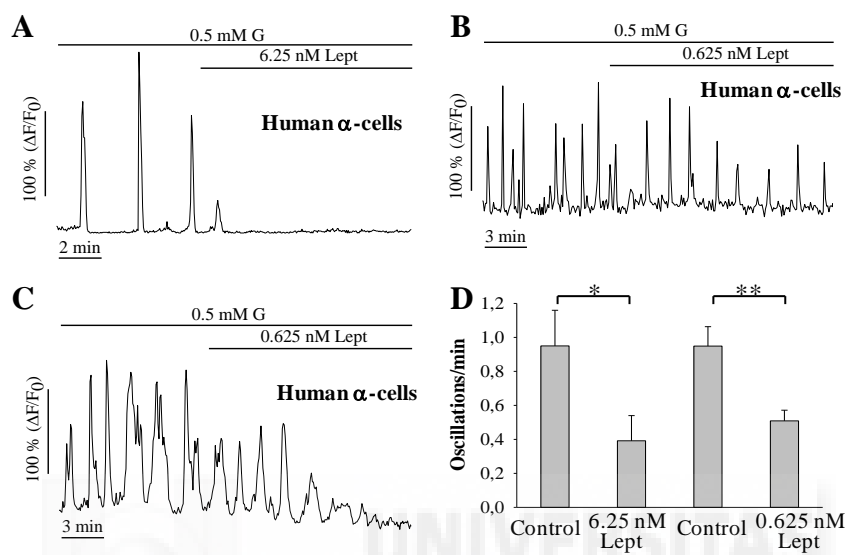


Figure 5

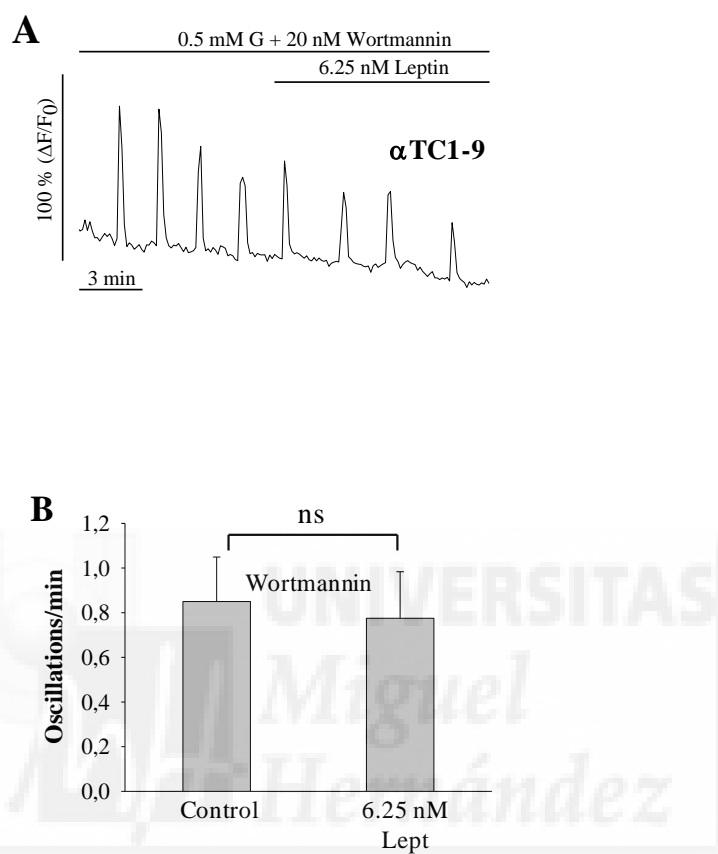
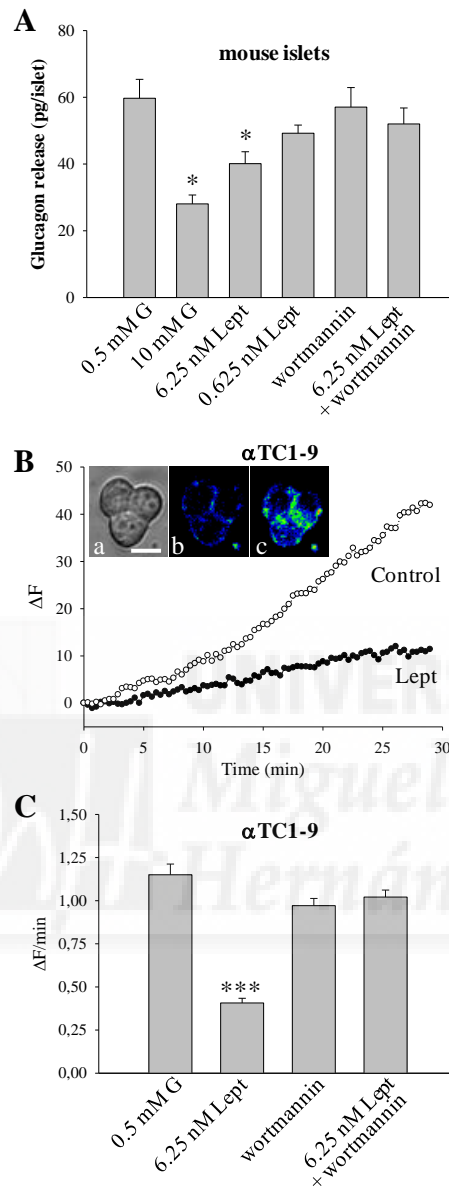
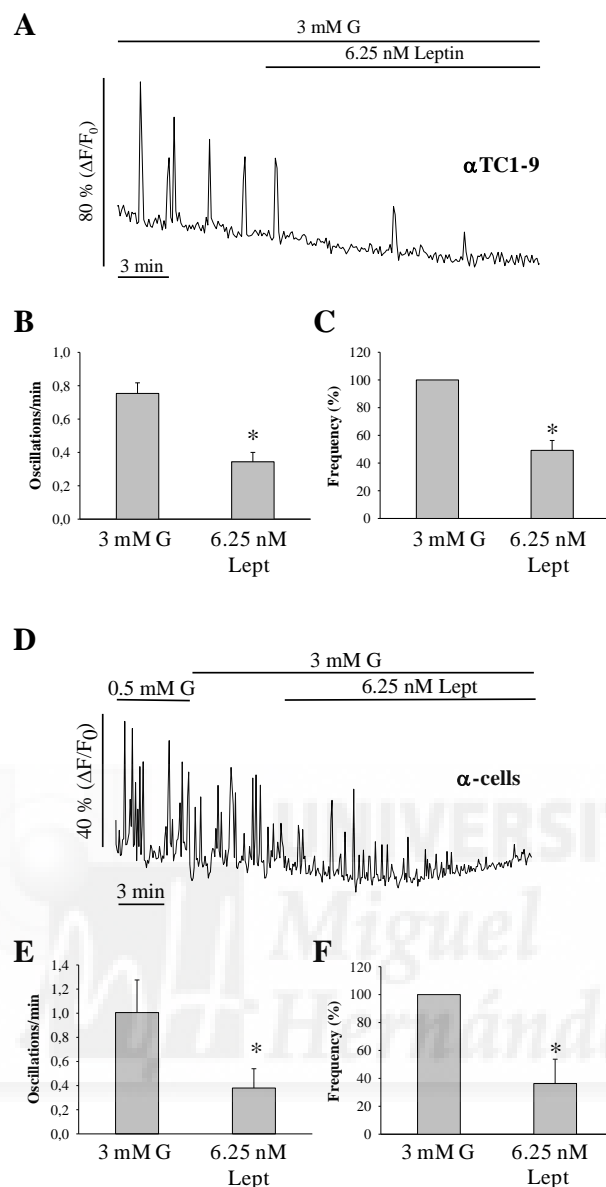


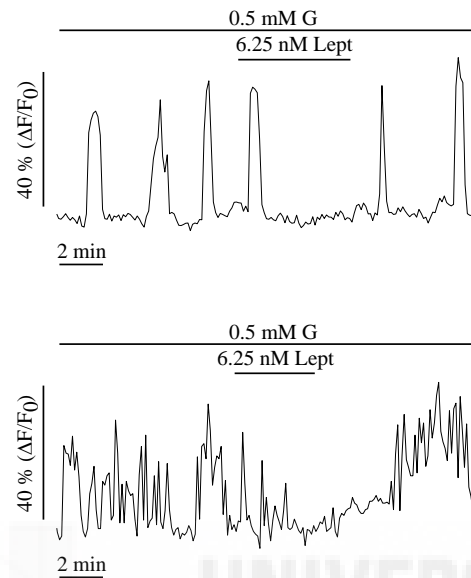


Figure 6

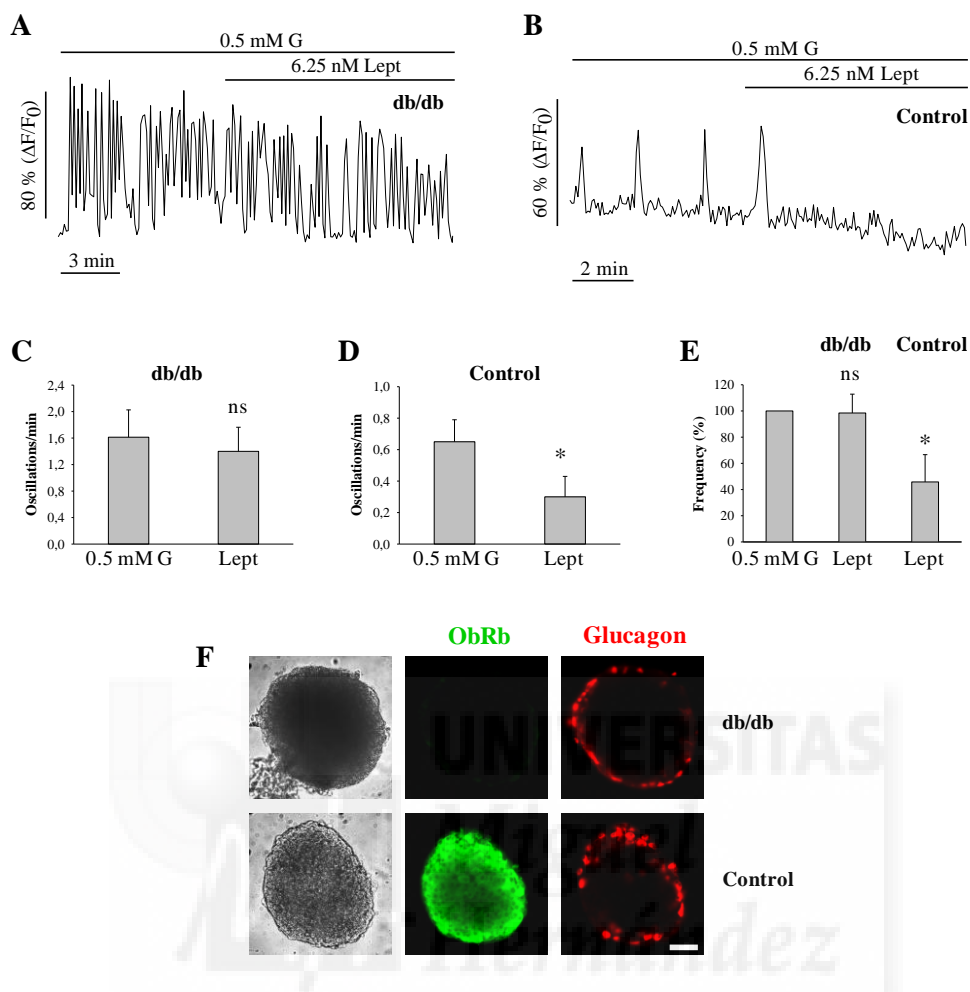




**Supplementary Figure S1. Leptin inhibits intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations induced at 3 mM glucose.** A: Effect of leptin (6.25 nM) on  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in  $\alpha$ TC1-9 cells ( $n = 39$ ). B, C: Frequency of  $\text{Ca}^{2+}$  signals in 3 mM glucose alone and in the presence of leptin were expressed in oscillations/min (B) or in percentage (C). D: Effect of leptin (6.25 nM) on  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in pancreatic  $\alpha$ -cells ( $n = 9$ ). E, F: Frequency of  $\text{Ca}^{2+}$  signals in 3 mM glucose alone and in the presence of leptin were expressed in oscillations/min (E) or in percentage (F). Data in panel B, C, E and F are shown as mean  $\pm$  SE. \*, statistically significant ( $p < 0.05$ ) compared with controls. G: glucose; Lept: leptin.



**Supplementary Figure S2.** Effect of leptin removal on intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations in  $\alpha\text{TC1-9}$  cells ( $n = 6$ ). The inhibitory action of leptin (6.25 nM) on  $\text{Ca}^{2+}$  signals ceased when the hormone was removed from the bath. This reversible effect was frequently observed when cells were exposed to leptin for short periods ( $<5$  min). However, the effect of leptin was more persistent when cells were exposed for longer times. Two different experiments are displayed. G: glucose; Lept: leptin.



**Supplementary Figure S3. Leptin does not affect  $Ca^{2+}$  responses in  $\alpha$ -cells from db/db mice, which lack functional ObRb.** A, B: Effect of leptin on  $\alpha$ -cells from obese and diabetic mice (C57BLKS/J-db/db) and control lean mice. These animals were purchased from Harlan Laboratories Models, Barcelona. C, D: Frequency of  $Ca^{2+}$  signals in 0.5 mM glucose alone and in the presence of leptin (db/db, n= 13; control, n= 15). Differences in frequency values are likely due to the obese and diabetic condition in db/db mice, which probably affects the  $\alpha$ -cell behavior. E: Frequency of  $Ca^{2+}$  signals (in %) after leptin application compared with control conditions. Data in panel C, D and E are shown as mean  $\pm$  SE. \*, statistically significant ( $p < 0.05$ ) compared with controls; ns, non-significant. G: glucose; Lept: 6.25 nM leptin.