

# EFECTO DE LA EXPOSICIÓN INTRA ÚTERO A BISFENOL-A EN LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA EN RATONES.

---

Memoria presentada por

**Marta García-Arévalo Provencio**

Para optar al grado de doctor

Dirigida por

Dr. Ángel Nadal Navajas y Dra. Paloma Alonso Magdalena

INSTITUTO DE BIOINGENIERÍA

Elche 2013







Instituto de Bioingeniería  
Universidad Miguel Hernández

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

HACE CONSTAR:

Que da su conformidad a la lectura de la tesis doctoral presentada por Marta García-Arévalo Provencio, titulada “**Efecto de la exposición intra útero a Bisfenol-A en la homeostasis de la glucosa en ratones**” que se desarrolló dentro del programa de doctorado de Bioingeniería de este instituto de investigación.

Lo firmo en Elche, a instancia de la interesada y a los efectos oportunos, 2013

EUGENIO VILANOVA GISBERT

Catedrático de Toxicología

Director del Instituto de Bioingeniería





Instituto de Bioingeniería  
Universidad Miguel Hernández

El Dr. **ÁNGEL NADAL NAVAJAS**, Catedrático de Fisiología en la Universidad Miguel Hernández de Elche y la Dra. **PALOMA ALONSO MAGDALENA**, Profesor Ayudante Doctor de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo de investigación titulado **“Efecto de la exposición intra útero a Bisfenol-A en la homeostasis de la glucosa en ratones”**, presentado por Marta García-Arévalo Provencio para optar al grado de doctor en Bioingeniería, ha sido realizado bajo nuestra dirección y supervisión en el Instituto de Bioingeniería, y que se encuentra en condiciones de ser defendido ante el tribunal correspondiente nombrado por esta universidad.

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

ÁNGEL NADAL NAVAJAS  
Catedrático de Fisiología  
Dpto. de Fisiología  
Universidad Miguel Hernández

PALOMA ALONSO MAGDALENA  
Profesor Ayudante Doctor  
Dpto. de Biología Aplicada  
Universidad Miguel Hernández





A MI FAMILIA





# CURRICULUM VITAE

## Marta García-Arévalo Provencio

Unidad de Fisiología Celular y Nutrición  
Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández  
Edificio Vinalopó, Avenida de la Universidad, s/n  
03202 Elche, España  
Tel: +34 965 22 20 11  
Fax: +34 96 522 2033  
mgarciaarevalo@hotmail.com

## CARGO ACTUAL

---

2009 Becaria del Plan Nacional de Investigación, beca de formación de personal de investigación (FPI). Estudiante de doctorado de la Universidad Miguel Hernández, Elche, España. Proyecto de tesis: "Efectos de la exposición temprana a disruptores endocrinos (BPA) en el futuro desarrollo de diabetes". Directores: Dr. Ángel Nadal Y Paloma Alonso Magdalena. Universidad Miguel Hernández (UMH). Elche, España.

## EDUCACIÓN

---

- 2009 Máster en Bioingeniería. Universidad Miguel Hernández (UMH), Elche, España.
- 2008 Máster en Reproducción Humana. Universidad Complutense de Madrid (UCM), España.
- 2007 Licenciada en CC Biológicas. Universidad Autónoma de Madrid (UAM), España.

## REVISIONES

---

1. Alonso-Magdalena P, Ropero AB, Soriano S, **García-Arévalo M**, Ripoll C, Fuentes E, Quesada I, Nadal A. Bisphenol-A acts as a potent estrogen via

non-classical estrogen triggered pathways. Mol Cell Endocrinol. 2012 May 22; 355 (2):201-7.

## PUBLICACIONES

---

1. **García-Arévalo M**, Alonso-Magdalena P, Santos Silva JC, Quesada I, Carneiro EM, Nadal A. Exposure to bisphenol-A during pregnancy imitates high-fat diet feeding in alteration of glucose homeostasis and gene regulation in adult mice offspring. Manuscrito en preparación
2. Alonso-Magdalena P., Ropero AB., **García-Arévalo M.**, Soriano S., Quesada I., Muhammed SJ., Salehi A., Gustafsson JA., Nadal A. Antidiabetic actions of an ER $\beta$  selective agonist. Diabetes. 2013 Jun 62(6):2015-25.
3. Soriano S., Alonso-Magdalena P, **García-Arévalo M.**, Novials A., Muhammed SJ, Salehi A, Gustafsson JA, Quesada I, Nadal A. Rapid insulinotropic action of low doses of bisphenol-A on mouse and human islets of Langerhans: Role of Estrogen Receptor  $\beta$ . PLoS One. 2012; 7 (2):e31109.
4. Terribas E, Bonache S, **García-Arévalo M**, Sánchez J, Franco E, Bassas L, Larriba S. Changes in the expression profile of the meiosis-involved mismatch repair genes in impaired human spermatogenesis. J Androl. 2010 Jul-Aug; 31 (4):346-57.
5. Cancelas J, Prieto PG, **García-Arévalo M**, Sancho V, Villanueva-Peñacarrillo ML, Malaisse WJ, Valverde I. Induction and reversibility of insulin resistance in rats exposed to exogenous D-fructose. Horm Metab Res. 2008 Jul; 40 (7):459-66.

## PARTICIPACIONES EN CONGRESOS

---

1. **García-Arévalo M**, Alonso-Magdalena P, Fuentes E, Quesada I, Nadal A. Alteration of the pancreatic Beta-cell function induced by Bisphenol-A in-utero exposition. Poster. The annual meeting of islet study group. ISG 2013 (EASD). Sitges (España). 27-29 Septiembre 2013.

2. Alonso-Magdalena P, **García-Arévalo M**, Quesada I, Nadal A. Poster. Exposure to endocrine disruptor chemicals during pregnancy: a possible mechanism involved in the premature ageing of maternal pancreatic  $\beta$ -cell. Poster. The annual meeting of islet study group. ISG 2013 (EASD).Sitges (España).27-29 Septiembre 2013.
3. Nadal A., Soriano S., **García-Arévalo M.**, Batista T., Fuentes E., Ripoll C., Carneiro E.M., Quesada I., Alonso-Magdalena P. Endocrine risruptors as risk factos for type-2 diabetes. Comunicación Oral. The annual meeting of islet study group. ISG 2013 (EASD).Sitges (España).27-29 Septiembre 2013.
4. Merino B, Lluesma M, Ñeco P, González A, Marroqui L, Alonso-Magdalena P, **García-Arévalo M**, Nadal A, Quesada I. Hypoglucagonemia associated with diet-induced obesity as a result of structural adaptation of pancreatic alpha-cells. Poster. The annual meeting of islet study group. ISG 2013 (EASD).Sitges (España).27-29 Septiembre 2013.
5. Alonso-Magdalena P., Ropero A.B., **García-Arévalo M.**, Soriano S., Quesada I., Muhammed S.J., Salehi A., Gustafsson J.A., Nadal A. Antidiabetic actions of an estrogen receptor beta selective agonist. Comunicación Oral. 6<sup>th</sup> CIBERDEM Annual Meeting. Barcelona (España). 22 Septiembre 2013.
6. Merino B, Lluesma M, Ñeco P, González A, Marroqui L, **García-Arévalo M**, Alonso-Magdalena P, Nadal A, Quesada I. Funtional and structural characterization of pancreatic alpha cells in a model of high fat diet induced obesity. Poster. International Early Career Symposiu (IUPS). Birmingham (Reino Unido) 19-21 Julio 2013.
7. **García-Arévalo M**, Alonso-Magdalena P, Quesada I, Carneiro EM, Nadal A. La alimentación rica en grasa afecta a la homeostasis de la glucosa de una manera similar a la exposición a Bisfenol-A durante el desarrollo embrionario. Comunicación Oral Corta. Congreso Nacional de Disrupción Endocrina (CONDE). Granada (España). 12-15 Junio 2013.
8. Alonso-Magdalena P, **García-Arévalo M**, Quesada I, Nadal A. Envejecimiento prematuro de la célula beta pancreática en ratonas expuestas a bisfenol-A durante la preñez. Comunicación Oral Corta.

Congreso Nacional de Disrupción Endocrina (CONDE). Granada (España). 12-15 Junio 2013.

9. **García-Arévalo M**, Alonso-Magdalena P, Ropero AB, González A, Ñeco P, Soriano S, Quesada I, Carneiro EM, Nadal A. Effect of high fat diet on glucose metabolism in mice exposure to bisphenol-A during embryonic development. Poster. The annual meeting of islet study group. ISG 2012 (EASD).Rostock (Alemania). 5-7 Octubre 2012.
10. P Alonso-Magdalena, AB Ropero, **M García-Arévalo**, S Soriano, I Quesada, S Muhaamed, A Salehi, JA Gustafsson and A Nadal. Estrogen receptor Beta: A new target for type 2 diabetes. Poster. Joint FEPS & Spanish Physiological Society Scientific Congress. Santiago de Compostela (España). 8-11 Septiembre 2012.
11. **Marta García-Arévalo**, Paloma Alonso-Magdalena, Ana Belén Ropero, Iván Quesada, Ángel Nadal. Alteraciones tempranas de la función de la célula beta pancreática inducida por la exposición a disruptores endocrinos durante el desarrollo embrionario. Comunicación Oral. Reunión Anual (2012) del Grupo de Trabajo de Islotes Pancreáticos (SED). Vigo (España). 19-21 Abril 2012.
12. **Marta García-Arévalo**, Paloma Alonso-Magdalena, Ana Belén Ropero, Alejandro González, Patricia Ñeco, Iván Quesada, Everardo M. Carneiro and Ángel Nadal. Effect of high fat diet on glucose metabolism in mice expose to bisphenol-A during embryonic development. Poster. 4<sup>th</sup> CIBERDEM Annual Meeting. Boí Taüll (España). 23-26 Octubre 2011.
13. Sergi Soriano, Paloma-Alonso-Magdalena, **Marta García-Arévalo**, Anna Novials, Albert Salehi, Jan-Ake Gustafsson, Iván Quesada and Ángel Nadal. Bisphenol-a regulation of  $\beta$ -cell function in mice and humans: role of ER $\beta$ . Poster. Responses to Steroid Hormones (RRSH) 7th International Meeting Creta (Grecia). 14-17 Septiembre 2011.
14. Paloma Alonso-Magdalena, Sergi Soriano, **Marta García- Arévalo**, Iván Quesada, Esther Fuentes, Jan Ake Gustafsson y Ángel Nadal. Role of estrogen receptor beta in pancreatic beta-cell function. Comunicación

Oral. 3<sup>o</sup> Joint Congress of FEPS and Turkish Society of physiological Sciences Istanbul (Turquía). 3-7 Septiembre 2011.

15. Paloma Alonso-Magdalena, **Marta García-Arévalo**, Elaine Vieira, Sergi Soriano, Lorena Menes, Deborah Burks, Ivan Quesada y Ángel Nadal. Bisphenol-a exposure during pregnancy disrupts glucose homeostasis in mothers and adult male offspring. Poster. The annual meeting of islet study group. ISG 2011 (EASD) Rio Grande do Norte (Brasil). 8-11 Mayo 2011.
16. Paloma Alonso-Magdalena, Sergi Soriano, **Marta García-Arévalo**, Ivan Quesada, Esther Fuentes, Jan-Ake Gustafsson y Ángel Nadal. Estrogen receptor beta (ER $\beta$ ) mediates rapid insulinotropic effects in pancreatic beta cells: possible implications for diabetes treatment. Poster. Estudio de Canales Iónicos (RECI) Tenerife (España). 2-4 Febrero 2011.
17. **M. García-Arévalo**, M. Caballero-Campo, P. Caballero-Campo, A. Guijarro, R. Núñez, P. Caballero Peregrín. Tendencias temporales en la calidad seminal en los voluntarios del programa de donación de semen en la Clínica Tambre. Poster. 27<sup>o</sup> Congreso de la Sociedad Española de Fertilidad (SEF). Oviedo (España). 28-30 Mayo 2008.
18. E. Olaya, P. Caballero-Campo, M. Caballero-Campo, **M. García-Arévalo**, A. Gabriel, M. Gago, R. Núñez, P. Caballero Peregrín. Análisis retrospectivo de los ciclos fallidos de IAD 2006-2007. Poster. 27<sup>o</sup> Congreso de la Sociedad Española de Fertilidad (SEF). Oviedo (España). 28-30 Mayo 2008.
19. P. Tornero-Esteban, L. Arnés, V. Sancho, P. Moreno, **M. García-Arévalo**, I. Valverde, M.L. Villanueva-Peñacarrillo. Efecto de la Exendina-4 sobre la expresión del GLUT-4 en el tejido adiposo, en estados normal y diabético. Poster. 19<sup>o</sup> Congreso de la Sociedad Española de Diabetes (SED) Sevilla (España). 16-19 Febrero 2008.
20. P. Tornero-Esteban, L. Arnés, V. Sancho, P. Moreno, **M. García-Arévalo**, I. Valverde, M.L. Villanueva-Peñacarrillo. Effect of Exendin-4 upon glucotransporter GLUT-4 expression in the adipose tissue of normal and type 2 diabetic states. Poster. 43<sup>o</sup> Annual Meeting of the European

Association for the Study of Diabetes (EASD). Amsterdam (Holanda). 17-21 Septiembre 2007.

## CURSOS

---

- 2010 Curso de Experimentación Animal Grupo B (Homologado por la Conselleria de Agricultura i Pesca de la Generalitat Valenciana). Universidad Miguel Hernández (España).
- 2008 Curso de Aptitudes Pedagógicas (CAP). Universidad Complutense de Madrid (España).

## ESTANCIAS EN INSTITUCIONES CIENTÍFICAS

---

- 2012-2013 Laboratorio de la Dra. Gema Medina-Gómez. Departamento de bioquímica, fisiología y biología molecular, Universidad Rey Juan Carlos. Madrid, España. Duración: 15 días. Proyecto: Estudio Epigenético del ADN genómico del Islote de Langerhans.
- 2012 Laboratorio del Catedrático Dr. Everardo M. Carneiro. Departamento estructural y biología funcional, Universidad Estadual de Campinas (UNICAMP), Sao Paulo, Brasil. Duración: 3 meses. Proyecto: El efecto del tratamiento de BPA en la fisiología del islote pancreático de ratones desnutridos (Parte II).
- 2011 Laboratorio del Catedrático Dr. Everardo M. Carneiro. Departamento estructural y biología funcional, Universidad Estadual de Campinas (UNICAMP), Sao Paulo, Brasil. Duración: 4 meses. Proyecto: El efecto del tratamiento de BPA en la fisiología del islote pancreático de ratones desnutridos.

## ACTIVIDADES CIENTÍFICAS Y PROFESIONALES

---

- 2009 Beca de Colaboración en el Departamento de Genética Molecular, en el Grupo de Infertilidad Masculina. Fundación IDIBELL,

L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona (España). Investigador Principal: Dra. Sara Larriba.

2006-2008 Colaborador Honorífico del Departamento de Metabolismo, Nutrición y Hormona. Fundación Jiménez Díaz, Madrid (España). Investigador Principal: Dra. María Luisa Villanueva-Peñacarrillo.

## MIEMBRO DE SOCIEDADES PROFESIONALES

---

European Society for the Study of Diabetes (EASD)

Sociedad Española de Diabetes (SED)

## TÉCNICAS

---

**Investigación Animal** - Técnicas de cirugía para el aislamiento de diferentes tejidos en roedores. Diversos ensayos bioquímicos en islotes de Langerhans aislados de roedores. Medida del contenido de glucógeno en hígado y músculo aislado. Ensayos de actividad Quinasa por ELISA. Medidas de insulina, glucagón, leptina, péptido-en plasma por ELISA.

**Técnicas in-vitro** - Cultivo celular primario y línea celular de modelos de ratón y humano. Técnicas de trasfección y silenciamiento genético. Técnicas de imagen y microscopía de confocal.

**Técnicas in-vivo** - IPGTT y OGTT, IPITT, Glucagon tolerance test (GlnTT).

**Técnicas ex-vivo** - Cuantificación de secreción de Insulina y glucagón por RIA y ELISA. Medida de la Señal de Calcio Intracelular en islote de Langerhans íntegro.

**Biología Molecular** - Western blot, Inmunoprecipitación, Inmunocitoquímica, Extracción de ARN y ADN, cuantificación mediante Real Time PCR, técnicas de epigenética.

**Histología** - Recolección y preparación de muestras parafinadas. Inmunohistología. Tinciones histológicas

## OTROS MÉRITOS

---

2012-2013 Personal Colaborador Docente Honorífico en Fisiología Animal y Humana, Grado de Biotecnología (1.2 créditos ECTS prácticos).





## AGRADECIMIENTOS

Aunque parecía que nunca iba a llegar, llegó el momento. Momento en el que se hace realidad el esfuerzo, el trabajo y el aprendizaje de tanto tiempo. El momento de agradecer a las personas que han hecho que este sueño se haga realidad.

A mis directores de tesis el Dr. Ángel Nadal y la Dra. Paloma Alonso. Gracias Ángel por darme la oportunidad de realizar este trabajo bajo tu supervisión, por la confianza depositada en mí y el crecimiento que este trabajo me ha portado tanto a nivel científico como personal. Gracias Palo por haberme aguantado hasta el final, esto ha sido un parto duro pero al final lo hemos conseguido, espero que esta experiencia nueva para ambas, te haya resultado tan gratificante como lo ha sido para mí. Gracias por enseñarme todos tus conocimientos y transmitirme tus criterios de buena praxis científica, sin ti esta tesis no se habría hecho real.

A los altos miembros del laboratorio al Dr. Iván Quesada, a la Dra. Esther Fuentes, por ayudar a mantener la cordura en esta máquina, a veces difícil de manejar; y sobre todo a la Dra. Cristina Ripoll, gracias por recibirme con una sonrisa todas las veces que he tocado a tu puerta pidiéndote ayuda, da gusto tener gente como tú alrededor.

A mis compañeros de laboratorio, con los que he reído, he cantado, he bailado, he llorado y hasta pagado mi frustración por los experimentos fallidos. Al Dr. Sergi Soriano, la alegría de la huerta, nos abandonaste a mitad de la carrera pero he tenido la sensación de que nunca te has ido, no cambies, allí donde vas llenas el ambiente de alegría. Al Dr. Pablo Juan, gracias por enseñarme tus conocimientos de calcio nada más llegar, contigo empezó a rodar toda esta maquinaria. A la Dra. Ana Belén Roperó, gracias por estar siempre ahí, hasta en los momentos más inesperados. A la Dra. Elaine Vieira, por ser más que una compañera de trabajo, una amiga a la que acudir. A los pequeños que ya crecieron Dr. Ernesto Caballero, Dra. Laura Marroquí y Dr. Alejandro González. Ernes gracias por aquel punto de caballero clásico en este mundo de locura y modernidad, Lau, que te voy a decir que no sepas, más que una amiga, una hermana, has pasado a formar parte de la familia que una se hace. Alex, eres un ejemplo de “autocreación”, menos mal que la “magia” está fuera de tus perspectivas de futuro, si no, nos dejabas sin trabajo. A Merinin, la autenticidad muchas veces se paga cara, pero da gusto encontrarse con gente como tú por la vida que no tenga miedo a ser de verdad. A Alba, con su estancia fugaz pero intensa.

A los técnico de laboratorio, sin los que este laboratorio no podría rodar del modo que lo hace, a Belén, Salomé, Diego, Manuel, Tania; y como no, a la increíble Luisi,

mil gracias por tu disposición a ayudar siempre, por todos los ratos que hemos pasado cazando islotes y por toda la cultura musical que me llevo, que no es poca.

Y a las nuevas adquisiciones del lab que no por ello son menos importantes Mónica, Sabrina, Eva y Melisa.

A los vecinos de arriba, Néstor, Encarna y Maribel, que nos animan las tardes asomándose al balcón.

A los habitantes de mi segunda casa, los que me alegran las mañanas y las tardes de experimentos locos en el animalario, a Ángel, Juana Mari, Irene, Alberto y Mónica.

Cómo no, al “Brazilian team” que me acogió como una más. Especialmente ao professor Dr. Everardo M. Carneiro, por me dar a possibilidade de desenvolver pesquisas em seu laboratório e continuar aprendendo. Ao professor Dr. Carlos Boschero, adorei conhecer você e adorei nossos tempinhos do café, onde trocamos ideais sobre tudo, aprendi muito com você. Ao Thiago, bom, agora, também Dr., muito obrigada. Trabalhar junto foi um prazer e sei que a gente forma uma equipe potente e temos uma amizade para sempre. Ao meu parceiro dos sucos esquisitos mais deliciosos, Zé Maria, muito obrigada por sua risada tão contagiosa e por ter sempre um sorriso na cara. Ao André, por aparecer na minha vida quando eu mais precisava, por me mostrar a olhar o mundo de um jeito diferente, nunca poderei agradecer tudo o que você fez e faz por mim. A minha irmã brasileira, Priscila, muito obrigada por me lembrar de que adoro a dança, tanto quanto respirar, e que nunca é tarde para voltar a fazer o que faz vibrar.

A las personas gracias a las cuales comencé este camino, a mi profesora de fisiología animal Elena Escudero, creo que puedo decir que es la mejor docente que ha pasado por mi vida educativa, y a la Dra. Marisa Villanueva-Peñacarillo. Gracias Marisa por ser un ejemplo a seguir, en el futuro me encantaría poder mirarme al espejo y ver en el reflejo a una persona como tú.

A mi pedacito de corazón catalán, Txell y Eva, doy mil gracias todos los días por haberos conocido, porque me diera aquel siroco y me fuera a Barcelona sin pensar. Por tener la suerte de poder decir que sois mis amigas y saber que estáis ahí aunque ahora nos separe la distancia.

A mis niñas, Helen, Lucía y Patri, la autenticidad nos unió y nosotras hemos ido trabajando el resto. No quiero perderos nunca y espero que siempre estéis ahí como habéis hecho hasta ahora, sois geniales.

A mis familias postizas, por estar ahí cuidándome y pendientes de mí, por darles calma a mis padres sabiendo que estáis ahí para lo que necesite.

Y muy especialmente a mi familia, a mis padres por estar ahí a cualquier hora, momento, lugar. Por ser los pilares que me sustentan en pie ante las dificultades, porque sé que he llegado hasta aquí por los valores que me habéis inculcado desde pequeña y ahora están floreciendo; siento orgullo de encontrarme aquellas cualidades que tanto os definen en mí. A mi hermana, que a pesar de la lejanía te siento siempre a mi lado, y aunque no creas en el funcionamiento de este sistema en el que me he metido, por sentirte orgullosa de mí y así hacérmelo sentir cada vez que puedes. Os quiero un montón.

Y a todas aquellas personas que de alguna manera han dejado un poquito de ellos en mí, porque ellas también han influido en la realización de este sueño.







Tenemos el deber de vivir la vida, de ser lo más que podemos en compañía de los demás, porque solos somos muy poca cosa.

-Saramago-



# TABLA DE CONTENIDOS

CURRICULUM VITAE.....	9
AGRADECIMIENTOS .....	17
TABLA DE CONTENIDOS .....	23
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	25
Índice de Figuras.....	25
Índice de Tablas.....	27
ABREVIATURAS .....	28
INTRODUCCIÓN.....	32
1. LA DIABETES MELLITUS.....	34
2. FISIOLÓGÍA DEL PÁNCREAS ENDOCRINO.....	36
3. CÉLULA BETA PANCREÁTICA.....	37
3.1. Acoplamiento estímulo-secreción.....	37
4. IMPLICACIÓN DEL AMBIENTE FETAL EN LA ETIOLOGÍA DE LA DIABETES.....	40
5. LOS DISRUPTORES ENDOCRINOS EN LA ETIOLOGÍA DE LA DMT2.....	44
5.1. Definición de disruptor endocrino.....	44
5.2. El bisfenol-A (BPA).....	46
5.3. El bisfenol-A y la diabetes.....	49
5.4. Vías de actuación de los estrógenos y el Bisfenol-A.....	50
OBJETIVOS	56
MATERIAL Y MÉTODOS.....	60
1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y PROTOCOLO DE OBTENCIÓN DEL MODELO ANIMAL DE ESTUDIO.....	62
1.1. Obtención del modelo animal.....	62
1.2. Protocolo de disección y extracción de islotes.....	63
2. TEST DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA INTRAPERITONEAL (ipGTT).....	64
3. TEST DE RESISTENCIA A LA INSULINA INTRAPERITONEAL (ipITT).....	65
4. SECRECIÓN DE INSULINA Y CUANTIFICACIÓN POR RADIOINMUNOENSAYO (RIA).....	65
4.1. Cuantificación de proteína mediante el método de Bradford.....	67
5. MEDIDAS DE BIOQUÍMICAS EN SUERO.....	67
5.1. ELISA de Insulina.....	68
5.2. ELISA de Péptido-C.....	68
5.3. ELISA de Leptina.....	69
5.4. Ensayo colorimétrico de Triglicéridos y Glicerol.....	70
6. EXTRACCIÓN DE ARN Y qPCR-RT.....	71
6.1. EXTRACCIÓN DE ARN.....	71
6.2. PCR DE RETROTRANSCRIPCIÓN.....	73
6.3. qPCR A TIEMPO REAL.....	74
7. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO Y ESTUDIO DE METILACIONES.....	77
8. INMUNOHISTOQUÍMICA EN CORTES PARAFINADOS DE PÁNCREAS ENTEROS DE RATÓN.....	77
8.1. INCLUSION Y OBTENCIÓN DE BLOQUES PARAFINADOS DE PÁNCREAS ENTEROS DE RATÓN.....	77
8.2. INMUNOHISTOQUÍMICA DE INSULINA EN TEJIDOS PARAFINADOS.....	78
8.3. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR.....	79

9.	REGISTRO DE LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR. ....	81
9.1.	MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.....	81
10.	SOLUCIONES.....	84
11.	REACTIVOS. ....	85
12.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS. ....	85
<b>RESULTADOS .....</b>		<b>86</b>
1.	EXPLICACIÓN DEL MODELO ANIMAL. ....	88
2.	CARACTERIZACIÓN DE LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA EN ANIMALES EXPUESTOS A BPA <i>IN UTERO</i> CON 17 SEMANAS DE VIDA Y TRATADOS DURANTE 13 SEMANAS CON DIETA RICA EN GRASA.....	89
3.	CARACTERIZACIÓN DE LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA EN ANIMALES EXPUESTOS A BPA <i>IN UTERO</i> CON 28 SEMANAS DE VIDA Y TRATADOS DURANTE 24 SEMANAS CON DIETA RICA EN GRASA.....	94
4.	EVOLUCIÓN DEL PESO CORPORAL DE LOS ANIMALES DE ESTUDIO DURANTE LAS 28 SEMANAS DE VIDA. ....	99
5.	ESTUDIO GENÉTICO DE GENES IMPLICADOS EN EL METABOLISMO DE LA GLUCOSA Y DE LÍPIDOS EN LOS TEJIDOS PERIFÉRICOS.....	101
5.1.	Estudio genético a las diecisiete semanas de vida. ....	101
<b>DISCUSIÓN 110</b>		
1.	EFFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A BPA DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO EN LA VIDA TEMPRANA DE LOS INDIVIDUOS (4 SEMANAS DE VIDA). ....	113
2.	EFFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A BPA DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO EN LA VIDA ADULTA DE LOS INDIVIDUOS. ....	118
2.1.	Individuos de 17 semanas de vida y 13 semanas de alimentación con dieta rica en grasa. ....	118
2.2.	Individuos de 28 semanas de vida y 24 semanas de alimentación con dieta rica en grasa. ....	120
2.3.	Efectos de la exposición a BPA intra-útero en la expresión de genes en los tejidos periféricos. ....	122
3.	EL PAPEL DE BISFENOL-A EN LA ETIOLOGÍA DE LA DIABETES.....	125
4.	EXPOSICIÓN EN HUMANOS.....	126
<b>CONCLUSIONES.....</b>		<b>130</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>		<b>134</b>



# ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. PREVALENCIA DE LA DIABETES EN EL AÑO 2010 Y PERSPECTIVAS DE EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD.....	35
FIGURA 2. IMAGEN FLUORESCENCIA DE ISLOTES DE LANGERHANS EN DIFERENTES MODELOS.....	37
FIGURA 3. ACOPLAMIENTO ESTÍMULO-SECRECIÓN EN CÉLULA BETA PANCREÁTICA.....	38
FIGURA 4. DIAGRAMA REPRESENTATIVO ORIGINAL DE LA HIPÓTESIS DEL FENOTIPO AHORRADOR.....	42
FIGURA 5 ESQUEMA CONCEPTUAL DEL ORIGEN DEL DESARROLLO DE LA DIABETES TIPO 2 COMO MÚLTIPLES DEFECTOS EN LOS ÓRGANOS.....	43
FIGURA 6 EL BISFENOL-A (BPA).....	46
FIGURA 7. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ESTRÓGENOS A TRAVÉS DE LOS RECEPTORES INTRACELULARES CLÁSICOS Y DE LOS PRESENTES EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA.....	52
FIGURA 8. MECANISMO DE ACCIÓN DEL ESTRADIOL/BPA A TRAVÉS DE LOS RECEPTORES INTRACELULARES CLÁSICOS Y DE LOS PRESENTES EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA EN LA CÉLULA BETA.....	54
FIGURA 9. PROTOCOLO DE REACCIÓN DE RETROTRANSCRIPCIÓN.....	73
FIGURA 10. FUNCIONAMIENTO DE LA Sonda SYBR GREEN.....	75
FIGURA 11. PROTOCOLO QRT- PCR UTILIZADO EN LOS EXPERIMENTOS DE EXPRESIÓN GÉNICA.....	76
FIGURA 12. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL FURA-2 EN SU FORMA AM Y EN SU FORMA LIBRE EN EL INTERIOR DEL CITOPLASMA.....	81
FIGURA 13. ESPECTRO DE EXCITACIÓN DEL FURA-2 EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO LIBRE.....	82
FIGURA 14. EMPLEO DE MEDIDAS RATIOMÉTRICAS PARA LA ELIMINACIÓN DE ARTEFACTOS COMO VARIACIONES EN LA CONCENTRACIÓN DEL INDICADOR, INTENSIDAD DE ILUMINACIÓN, SENSIBILIDAD DEL SISTEMA O MOVIMIENTOS DE LA MUESTRA OBTENIENDO UNA SEÑAL MÁS CLARA Y REAL.....	82
FIGURA 15. ESQUEMA EXPLICATIVO DEL MODELO EXPERIMENTAL.....	88
FIGURA 16. HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA PLASMÁTICA EN ANIMALES EXPUESTOS DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO A BPA Y POSTERIORMENTE ALIMENTADOS DURANTE 13 SEMANAS CON HFD.....	90

FIGURA 17. SECRECIÓN Y CONTENIDO DE INSULINA DE LOS ISLOTES DE LANGERHANS TRAS 13 SEMANAS DE DIETA RICA EN GRASA. ....	91
FIGURA 18. CONCENTRACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR EN RESPUESTA A CONCENTRACIONES CRECIENTES DE GLUCOSA.....	93
FIGURA 19. HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA PLASMÁTICA EN ANIMALES EXPUESTOS DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO A BPA Y POSTERIORMENTE ALIMENTADOS DURANTE 24 SEMANAS CON HFD. ....	95
FIGURA 20. SECRECIÓN Y CONTENIDO DE INSULINA DE LOS ISLOTES DE LANGERHANS TRAS 24 SEMANAS DE DIETA RICA EN GRASA. ....	97
FIGURA 21. CONCENTRACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR EN RESPUESTA A CONCENTRACIONES CRECIENTES DE GLUCOSA TRAS 24 SEMANAS CON HFD.....	98
FIGURA 22. EVOLUCIÓN DE LOS PESOS CORPORALES DE LOS ANIMALES DESDE EL INICIO DEL TRATAMIENTO CON HFD HASTA EL FINAL DEL ESTUDIO. ....	100
FIGURA 23. PESOS CORPORALES DE LOS ANIMALES A DIECISIETE Y VEINTIOCHO SEMANAS DE VIDA.....	100
FIGURA 24. ESQUEMA EXPLICATIVO DE LOS GENES IMPLICADOS EN EL METABOLISMO DE LÍPIDOS Y GLUCOSA. ....	102
FIGURA 25. IMAGEN REPRESENTATIVA DE LA CALIDAD DEL ARN UTILIZADO EN LOS EXPERIMENTOS DE EXPRESIÓN GÉNICA.....	102
FIGURA 26. EXPRESIÓN GÉNICA EN TEJIDO ADIPOSO DE LOS ANIMALES ALIMENTADOS DURANTE TRECE SEMANAS CON HFD Y CON DIECISIETE SEMANAS DE VIDA. ....	104
FIGURA 27. EXPRESIÓN GÉNICA EN HÍGADO DE LOS ANIMALES ALIMENTADOS DURANTE TRECE SEMANAS CON HFD Y CON DIECISIETE SEMANAS DE VIDA. ....	106
FIGURA 28. EXPRESIÓN GÉNICA EN MÚSCULO DE LOS ANIMALES ALIMENTADOS DURANTE TRECE SEMANAS CON HFD Y CON DIECISIETE SEMANAS DE VIDA. ....	108

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. MEZCLA DE REACTIVOS UTILIZADA PARA LA REACCIÓN DE RETROTRANSCRIPCIÓN. ....	73
TABLA 2. SECUENCIA DE CEBADORES UTILIZADOS EN LAS QRT-PCRS. ....	75
TABLA 3. MEZCLA DE REACTIVOS UTILIZADA EN LAS REACCIONES DE QRT-PCR.....	76
TABLA 4. VALORES PLASMÁTICOS DE HORMONAS Y METABOLITOS EN ANIMALES DE DIECISIETE SEMANAS Y ALIMENTADOS CON HFD DURANTE TRECE.....	94
TABLA 5. VALORES PLASMÁTICOS DE HORMONAS Y METABOLITOS EN ANIMALES DE VEINTIOCHO SEMANAS Y ALIMENTADOS CON HFD DURANTE VEINTICUATRO SEMANAS. ....	99



## ABREVIATURAS

$[Ca^{2+}]_i$	Concentración de calcio intracelular
AC	Adenilato Ciclasa
Acaca/Acc	<i>Acetil-CoA-carboxilasa <math>\alpha</math></i>
Acac $\beta$ /Acc	<i>Acetil-CoA-carboxilasa <math>\beta</math></i>
Acox1	<i>Acil-CoA-oxidasa1</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ADP	Adenosina Difosfato
AMPc	Adenosina Monofosfato cíclica
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATP	Adenosina Trifosfato
BPA	Bisfenol-A
BrdU	5-bromo-2-desoxiuridina
célula $\alpha$	Célula alfa
célula $\beta$	Célula beta
célula $\delta$	Célula delta
célula $\epsilon$	Célula épsilon
Cpt1 $\alpha$	<i>Carnitina palmitoiltransferasa1</i>
Cpt1 $\beta$	<i>Carnitina palmitoiltransferasa2</i>
DAG	Diacilglicerol
DDT	Dicloro Difenil Tricloroetano
DES	Dietilestilbestrol
DM	Diabetes Mellitus
DMT1	Diabetes Mellitus tipo 1

DMT2	Diabetes Mellitus tipo 2
DPN	Diarilpropionitrilo
E2	17- $\beta$ -Estradiol
ED	Disruptor Endocrino
EPA	Agencia de Protección Ambiental
ER	Receptor de Estrógenos
ER $\alpha$	Receptor de Estrógenos alfa
Er $\beta$	Receptor de Estrógenos beta
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
Fas	<i>Ácido graso sintasa</i>
Gapdh	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GC	Guanilato ciclasa
Gck	<i>Glucocuinasa</i>
GMPc	Guanidina Monofosfato cíclico
HFD	Dieta rica en grasa
Hnf4 $\alpha$	<i>Factor hepático nuclear 4 alfa</i>
Hxk	<i>Hexocuinasa</i>
INFOSAN	Red Internacioanl de Autoridades en Materias de Inocuidad de los Alimentos
Ins-II	Insulina
IP3	Inositol trifosfato
ipGTT	Test de tolerancia a la glucosa intraperitoneal
ipITT	Test de sensibilidad a la insulina intraperitoneal
K <sub>ATP</sub>	Canales de potasio sensibles a ATP
LOAEL	Nivel mínimo de efecto adverso observable
MODY	Maturity Onset Diabetes of the Young

NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
ND	Dieta control o normal
PBS	Tampón Fosfato Salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDEs	Fosfodiesterasas
Pdx-1	<i>Homeobox-1 pancreático duodenal</i>
Pepck 1	<i>Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa</i>
PKC	Proteína quinasa C
PKG	Proteína quinasa G
POPs	Contaminantes orgánicos persistentes
Ppara $\alpha$	<i>Receptor activador de la proliferación de peroxisomas <math>\alpha</math></i>
Ppary	<i>Receptor activador de la proliferación de peroxisomas <math>\gamma</math></i>
Ppi	Pirofosfato inorganico
PPT	Propil pirazol triol
Prkaa1	<i>Proteína quinasa activada por AMP-alfa1</i>
RIA	Radioinmunoensayo
Rplp0	<i>Proteína ribosomal larga P0</i>
Slc2a4	<i>Familia de transportadores de soluto 2 miembro 4</i>
Srebf1	<i>Elemento regulador del esteroil vinculado factor de transcripción 1</i>
Ucp2	<i>Proteína desacoplante 2</i>
Ucp3	<i>Proteína desacoplante 3</i>
WHO/OMS	Organización Mundial de la Salud



# INTRODUCCIÓN







## 1. LA DIABETES MELLITUS.

La Diabetes Mellitus (DM) se define como un desorden metabólico de causas múltiples caracterizado por la presencia de hiperglucemia crónica asociada a alteraciones en el metabolismo de los hidratos de carbono, proteínas y grasas. Además puede acompañarse de los síntomas de poliuria, polifagia, polidipsia y pérdida de peso en los individuos sin causa aparente (Vidal-Puig *et al.*, 2012). El principal causante de estos síntomas es una baja o nula producción de insulina junto con una resistencia a la insulina en sus tejidos diana. La consecuencia de este déficit en la secreción de insulina o en su actividad da lugar a una alteración en la homeostasis de la glucosa, produciendo un aumento de los niveles de glucosa en plasma, al no producirse captación de la glucosa por parte de los tejidos periféricos, fundamentalmente, el hígado, el músculo esquelético y el tejido adiposo.

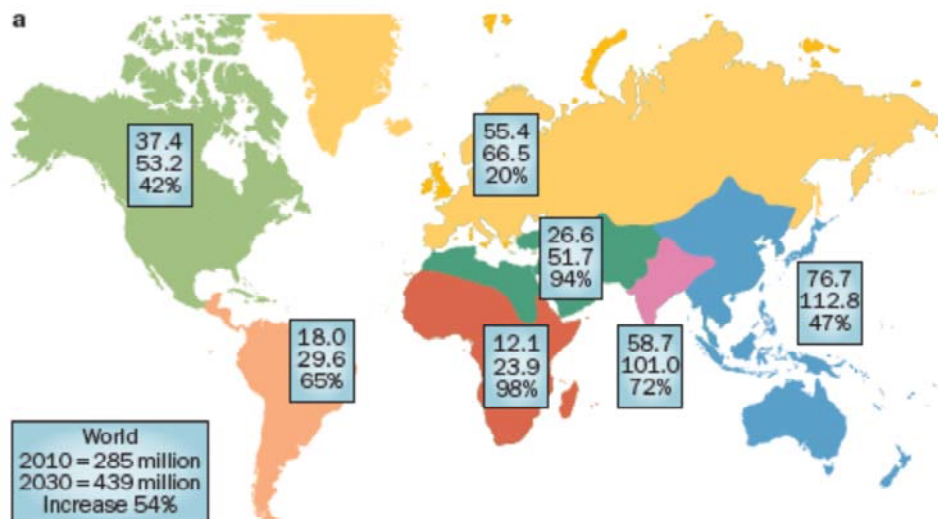
Se distinguen principalmente cuatro subtipos de DM conocidos como: Diabetes Mellitus tipo 1 (DMT1), tipo 2 (DMT2), diabetes gestacional y diabetes tipo MODY (del inglés Maturity Onset Diabetes of the Young), siendo las causas y los factores de riesgo diferentes para cada tipo.

La DMT1 y la DMT2 son las formas más frecuentes. La DMT1, también conocida como insulino dependiente, se caracteriza por una destrucción autoinmune de las células  $\beta$  productoras de insulina, del islote de Langerhans (Atkinson & Eisenbarth, 2001), lo que causa una deficiencia de insulina. Suele diagnosticarse a edades tempranas en los individuos, generalmente antes de los 30 años.

La DMT2 se caracteriza por una resistencia a la insulina por parte de los tejidos periféricos encargados de la homeostasis de la glucosa (hígado, músculo y tejido adiposo principalmente), acompañada por una disminución de la secreción de insulina por la célula  $\beta$ .

Los datos más recientes sobre la prevalencia de esta enfermedad (Chen *et al.*, 2011) indican que, en 2010, 285 millones de personas en el mundo padecían DM, dentro de los cuales el 90 % eran diabéticos tipo 2. Las perspectivas de evolución de dicha enfermedad apuntan a que el número de casos en 2030 será de 439

millones de personas, lo que representa el 7.7 % de la población adulta del mundo, incluida en un rango de edades de 20 a 79 años (Figura 1).



**Figura 1. Prevalencia de la diabetes en el año 2010 y perspectivas de evolución de la enfermedad.** Tomada de (Chen *et al.*, 2011).

En el caso concreto de la población española, un estudio reciente subvencionado por el Instituto de Salud Carlos III, muestra que casi el 30 % de la población estudiada presenta algún tipo de alteración en el metabolismo de los carbohidratos. La prevalencia de DM en la población española es de un 13.8 %, de los cuales un 6 % iniciaron el estudio sin tener conocimiento de que padecían la enfermedad. Además, los resultados mostrados por el estudio indican que la prevalencia de la diabetes y de alteraciones en la regulación de la glucosa aumenta con la edad y es más frecuente en hombres que en mujeres (Soriguer *et al.*, 2012).

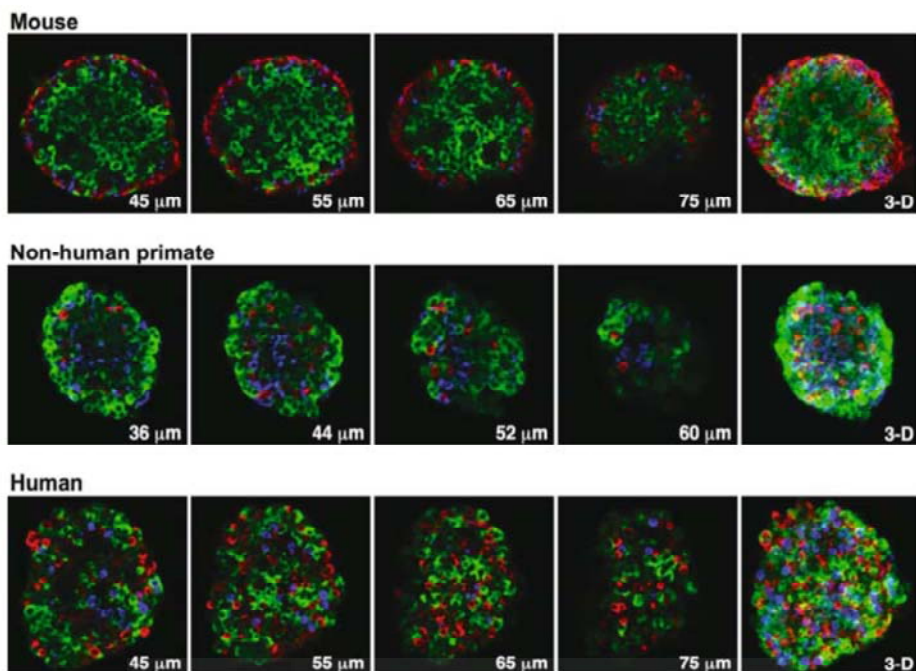
El elevado índice de prevalencia de la DMT2 pone de manifiesto la importancia de llevar a cabo futuros estudios para la mejor comprensión de la enfermedad, así como mejoras en su tratamiento y, sobre todo, cobran especial importancia los estudios para la prevención de la aparición de la diabetes tipo 2.

## 2. FISIOLÓGÍA DEL PÁNCREAS ENDOCRINO.

El páncreas es una glándula con función exocrina y endocrina. Posee un color blanco rosado y una consistencia firme, con una morfología característica de prisma alargado e irregular. El páncreas endocrino es el encargado de controlar el metabolismo de los hidratos de carbono, manteniendo la homeostasis de la glucosa en el organismo mediante la liberación al torrente sanguíneo de diferentes tipos de hormonas. Su unidad funcional son los islotes pancreáticos o de Langerhans y se encuentran embebidos dentro del páncreas exocrino de manera aleatoria. Los islotes pancreáticos son estructuras pluricelulares con una alta organización estructural y funcional. Esta estructura está constituida por cinco tipos celulares (Figura 2):

- Las células alfa ( $\alpha$ ) son las encargadas de la secreción de glucagón y representan el 10-15 % de la población celular del islote. En ratones se localizan principalmente en la periferia del islote.
- Las células beta ( $\beta$ ) forman la población mayoritaria, 65-90 %, y son las responsables de la secreción de insulina. En ratones se localizan formando el núcleo del islote.
- Las células delta ( $\delta$ ), son las productoras de somatostatina y constituyen entre un 3 y un 10 % del total celular del islote. Este tipo celular, al igual que las células  $\alpha$ , se distribuye preferentemente en la periferia del islote.
- Las células PP, fuente del polipéptido pancreático.
- Las células épsilon ( $\epsilon$ ) son las productoras de grelina y constituyen, junto con las PP, el 1 % restante.

Cómo se muestra en la Figura 2, la arquitectura del islote de Langerhans y la composición porcentual de los diferentes tipos celulares cambia dependiendo de la especie. La principal diferencia entre los islotes humanos y de ratón es el patrón de distribución heterogéneo de los diferentes tipos celulares, donde se encuentran las células  $\beta$  (54 %) entremezcladas con los demás tipos celulares, las células  $\alpha$  que representan un 35 % y las  $\delta$  un 11 % (Brissova *et al.*, 2005; Cabrera *et al.*, 2006).



**Figura 2. Imagen fluorescencia de islotes de Langerhans en diferentes modelos.** Células  $\beta$ : verde; células  $\alpha$ : azules; células  $\delta$ : rojas. Tomado de S. Seino y G.I. Bell (Seino & Bell, 2008).

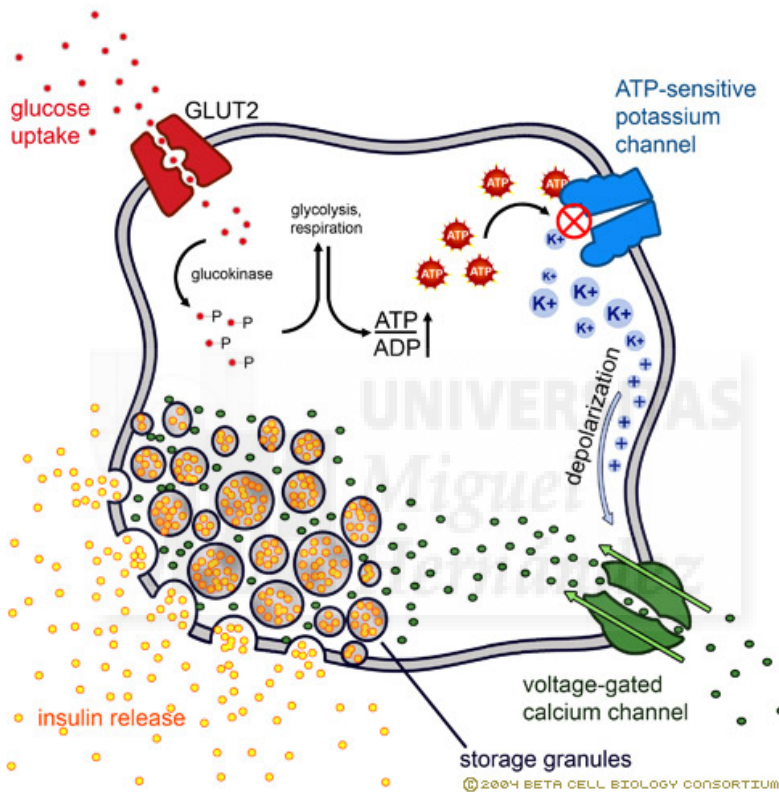
### 3. CÉLULA BETA PANCREÁTICA.

La célula beta es el componente mayoritario del islote de Langerhans y tiene como principal función la síntesis y secreción de insulina en respuesta a diversos nutrientes, hormonas y estímulos nerviosos, manteniendo de este modo los niveles de glucemia en un rango óptimo. Éste es un proceso complejo en el que participan distintos tipos de canales iónicos así como la maquinaria excitotóxica celular y en el que el metabolismo glucídico y la actividad eléctrica de la membrana juegan un papel muy importante.

#### 3.1. Acoplamiento estímulo-secreción.

La célula beta actúa como un sensor de glucosa, gracias a la presencia de un transportador específico de baja afinidad y alta capacidad denominado GLUT-2, el cual permite un rápido equilibrio entre las concentraciones de glucosa intra y extracelular (Johnson *et al.*, 1990).

Cuando la glucosa alcanza el espacio citosólico por la acción del transportador GLUT-2, ésta se incorpora a la vía glucolítica y se metaboliza a piruvato, que a su vez es catabolizado a nivel mitocondrial, dando lugar a ATP y NADPH. Este proceso metabólico conduce a un incremento de la razón de ATP/ADP (Adenosina Trifosfato/ Adenosina Difosfato), lo que conduce al cierre de los canales de potasio sensibles a ATP ( $K_{ATP}$ ) (figura 3).



**Figura 3. Acoplamiento estímulo-secreción en célula beta pancreática.** Imagen tomada de [www.betacell.org](http://www.betacell.org).

Cada célula presenta numerosos canales  $K_{ATP}$  y su actividad es la que determina el potencial de reposo de membrana de la célula  $\beta$  (Ashcroft *et al.*, 1984; Dunne & Petersen, 1986; Mislér *et al.*, 1986). En el ratón, cuando la concentración de glucosa se sitúa alrededor de 5-7 mM, el número de canales  $K_{ATP}$  cerrados es suficiente para alcanzar el umbral de despolarización de la membrana plasmática (Ashcroft *et al.*, 1984). Esta despolarización de la membrana provoca la actividad eléctrica oscilatoria que conlleva a la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje, incrementando los niveles de calcio intracelulares

siguiendo un patrón oscilatorio. Esto se traduce en la exocitosis de las vesículas de insulina (Valdeolmillos *et al.*, 1992; Aizawa *et al.*, 1998). Como resultado, se producirá la liberación de la insulina de la célula  $\beta$  al torrente sanguíneo, que posteriormente actuará sobre los tejidos diana como comunicador de la presencia de glucosa en sangre (Ashcroft & Rorsman, 1989).

Cuando se encuentran aisladas las células  $\beta$  presentan un patrón heterogéneo en la respuesta a glucosa. Sin embargo, esta heterogeneidad se convierte en un patrón homogéneo y único de respuesta cuando las células integran el islote. Dicho patrón es apreciable en la actividad eléctrica, en el calcio intracelular y en la liberación de insulina. Este fenómeno se debe a que las células  $\beta$ , en el islote de Langerhans, se encuentran eléctricamente acopladas mediante unos canales intercelulares dando lugar a una estructura de sincitio, que proporciona una continuidad citoplasmática respecto a los iones y a las moléculas pequeñas. Estos canales reciben el nombre de uniones de hendidura o gap-junctions y parecen jugar un papel importante en la sincronización del islote (Santos *et al.*, 1991; Valdeolmillos *et al.*, 1993).

Además del papel principal ejercido por el calcio intracelular, el proceso secretor está regulado por otros segundos mensajeros. Dos sistemas enzimáticos regulan la concentración intracelular de Adenosina Monofosfato cíclica (AMPC), la adenilato ciclasa (AC), cuya activación genera AMPC y pirofosfato inorgánico (PPi) a partir del ATP, y las fosfodiesterasas (PDEs), que metabolizan el AMPC. El incremento en los niveles de AMPC conduce a la activación de quinasas dependientes de AMPC, también denominadas PKA, que a su vez activan toda una cascada de señalización en la que se engloban fenómenos tales como la fosforilación de proteínas plasmáticas y vesiculares, el aumento en los niveles de calcio intracelular y la fosforilación de factores de transcripción, lo que se traduce, como último paso, en una potenciación en la secreción de insulina a largo plazo (Jones & Persaud, 1998). Además, el AMPC es capaz de promover la secreción de insulina a través de un efecto directo sobre la maquinaria secretora (Ammala *et al.*, 1993).

Además, la glucosa aumenta los niveles de Guanidina Monofosfato cíclico (GMPc). Un aumento en los niveles de GMPc conduce a la activación de la proteína quinasa G (PKG), que posteriormente producirá la fosforilación del canal

$K_{ATP}$ , lo que en último término se traduce en una potenciación de la secreción de insulina (Ropero *et al.*, 1999). Y por otro lado, la inhibición del enzima guanilato ciclasa (GC) soluble bloquea la secreción de insulina inducida por glucosa (Laychock *et al.*, 1991; Jones *et al.*, 1992; Green *et al.*, 1993)

Otra acción clave en el proceso secretor es la hidrólisis del fosfatidilinositol en respuesta a la activación del receptor muscarínico de acetilcolina. La activación de dichos receptores activa a una proteína G, que a su vez activa a la fosfolipasa C, la cual provoca la hidrólisis del fosfatidilinositol en inositol trifosfato ( $IP_3$ ) y diacilglicerol (DAG). El primero se encuentra implicado en la liberación de calcio intracelular y el segundo, en la activación de la proteína quinasa C (PKC), que se sabe que está implicada en la segunda fase de la secreción de insulina, como se ha demostrado utilizando inhibidores de la PKC, como staurosporina y Go 6976, ya que son capaces de bloquear esta segunda etapa secretora (Zawalich & Zawalich, 2001).

Existen otros enzimas relacionados con la liberación de la insulina, como las tirosinas quinasas o la vía de las MAPK (RAF/MEK/ERK), implicadas en la transcripción del gen de la insulina. La glucosa produce un incremento de la actividad de ERK1/2 en el núcleo de la célula  $\beta$ . El uso de inhibidores de MEK1/2 provoca la no activación de ERK1/2, que conlleva la supresión de la transcripción del gen de la insulina en respuesta a estímulos de glucosa (Khoo *et al.*, 2003).

#### **4. IMPLICACIÓN DEL AMBIENTE FETAL EN LA ETIOLOGÍA DE LA DIABETES.**

En la actualidad, existen numerosas evidencias, incluyendo estudios epidemiológicos, clínicos y experimentales, que indican que los sucesos durante los primeros estadios de nuestra vida juegan un papel importante en la posterior susceptibilidad al desarrollo de ciertas enfermedades crónicas. De este modo, la plasticidad en el desarrollo, definida como la habilidad de los organismos para desarrollarse mediante diferentes vías, dependiendo del ambiente particular, se convierte en un aspecto clave del desarrollo (Bateson *et al.*, 2004).

La plasticidad durante el desarrollo requiere la modulación de la expresión génica que está a su vez regulada por procesos epigenéticos (cambios en el material genético que no afectan a la secuencia de los genes, si no a su expresión).

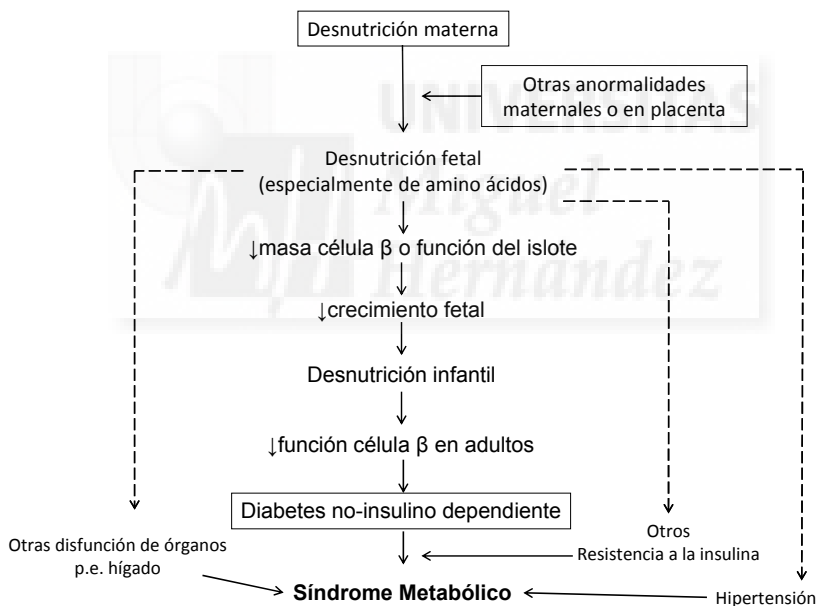


La interacción del genoma (información genética de un organismo) y del epigenoma (información epigenética global de un organismo) influye en la maduración del fenotipo y determinan la posterior sensibilización a factores ambientales y, en consecuencia, el riesgo de padecer enfermedades en la edad adulta.

La hipótesis del origen fetal de la enfermedad (en inglés llamada "*developmental-origins of disease hypothesis*") propone que un ambiente intrauterino adverso determina la aparición de respuestas adaptativas en el feto, que provocan cambios en la fisiología del individuo. Esos cambios persisten tras el nacimiento y pueden contribuir al desarrollo de enfermedades crónicas y complejas propias del adulto. La respuesta fetal o perinatal incluye cambios en el metabolismo, en la producción hormonal y en la sensibilidad a hormonas, afectando al desarrollo de diferentes órganos y dando lugar a alteraciones fisiológicas permanentes (Gluckman *et al.*, 2008). La relación entre el crecimiento fetal, el bajo peso al nacer y el posterior riesgo a desarrollar enfermedades puede interpretarse como el reflejo, a largo plazo, de las consecuencias de las respuestas adaptativas del feto. El bajo crecimiento fetal no es el causante de las consecuencias a largo plazo, sino que es un biomarcador que refleja una respuesta fetal a un ambiente intrauterino limitante. Este ambiente deficiente produce cambios en el desarrollo de los órganos y de los tejidos que no son evidentes en el nacimiento, pero que pueden producir respuestas inadecuadas de los mismos a largo plazo (Gluckman & Hanson, 2004). Por tanto, la modulación de la expresión génica dependiendo del ambiente *in utero* puede llegar a ser más importante que el riesgo genético (Gluckman *et al.*, 2008).

Actualmente, existen numerosos estudios en los que se asocia la aparición de enfermedades como la obesidad, la hipertensión o incluso la DMT2, como consecuencia de condiciones adversas durante la gestación y la lactancia. Ya en el año 1992, C.N. Hales y D.J. Barker (Hales & Barker, 1992), publicaron un trabajo pionero en el campo y postularon la hipótesis del fenotipo ahorrador, en inglés "*the thrifty phenotype hypothesis*", en la que proponían que no sólo la DMT2, sino también los principales componentes del síndrome metabólico, parecían tener parte de su origen en la vida temprana. Esta hipótesis se basó en los estudios realizados en la población de Hertfordshire (Reino Unido) concretamente en los hijos de las mujeres embarazadas durante la primera guerra mundial y la

postguerra, las cuales desarrollaron su embarazo bajo condiciones de desnutrición por la carencia de alimentos. En base a estos estudios, se concluyó que la DMT2 es el resultado de un estado ahorrativo nutricional del feto o del recién nacido. Este estado ahorrativo provoca una reducción del crecimiento de las células beta y del islote de Langerhans. Mientras que el individuo persista en una situación de desnutrición, no será necesario aumentar la producción de insulina, pero cuando se produzca una situación de normo o sobrenutrición, se genera un estado diabético debido a la reducción de la función de la célula beta (Hales & Barker, 2001). Por tanto, se demostró que la malnutrición en la época fetal y neonatal produce efectos perjudiciales para el desarrollo y función de la célula  $\beta$ , ocasionando, como consecuencia, defectos en la anatomía, vascularización e inervación del islote, y dando lugar a una predisposición para un posterior desarrollo de DMT2 (figura 4).

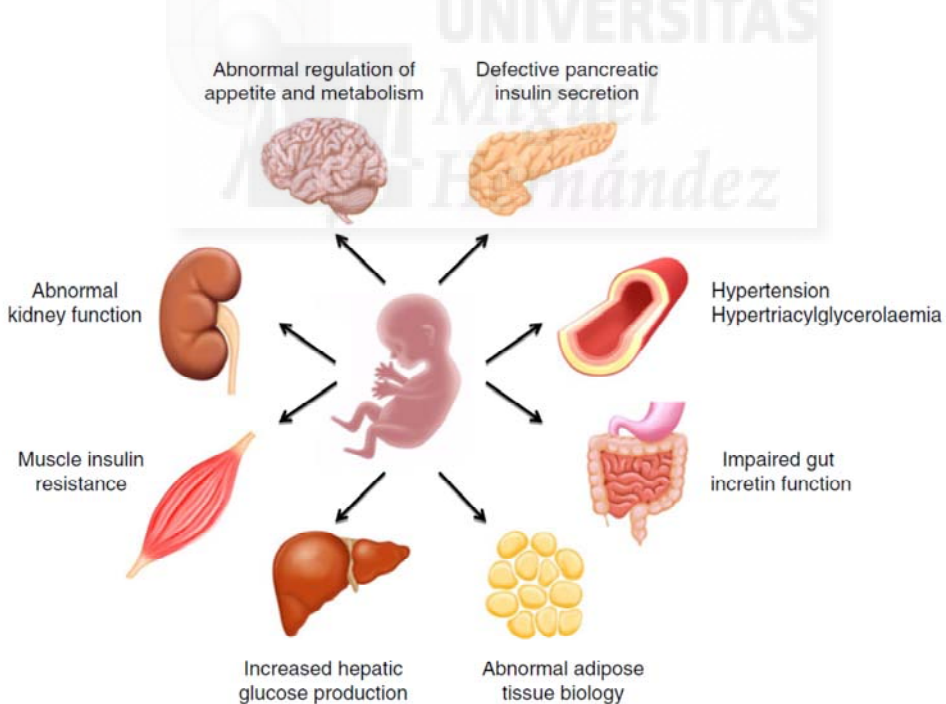


**Figura 4. Diagrama representativo original de la hipótesis del fenotipo ahorrador.** Imagen modificada tomada de C.N. Hales and D.J.P. Barker (Hales & Barker, 2001)

Además del modelo de desnutrición intra-útero o neonatal, existen otros estudios donde encontramos una relación entre la obesidad materna, la diabetes gestacional y la posterior aparición del síndrome metabólico. Los estudios de los

grupos de Boney et al y de Hillier et al (Boney *et al.*, 2005; Hillier *et al.*, 2007) muestran cómo una hiperglucemia materna puede llevar a una hiperinsulinemia fetal y a una acumulación de grasa, por lo que los hijos de madres obesas o con diabetes tienen un mayor riesgo a desarrollar desórdenes metabólicos. Por tanto, la relación entre la nutrición prenatal y el posible desarrollo de enfermedades metabólicas presenta una distribución en forma de U, donde ambos extremos de la curva de peso al nacer conllevan un aumento del riesgo de padecer enfermedades a largo plazo.

A día de hoy, existe una tendencia a considerar que la DMT2 es un conjunto heterogéneo de anomalías metabólicas que incluyen la disfunción de múltiples órganos. Estas anomalías están basadas en el concepto de la programación fetal y plasticidad de los órganos. Además, es necesario un marco conceptual amplio, como la programación durante el desarrollo embrionario, para comprender las múltiples disfunciones orgánicas en la DMT2 y las diferencias que se producen con el tiempo y edad entre los pacientes diabéticos (Figura 5) (Vaag *et al.*, 2012).



**Figura 5** Esquema conceptual del origen del desarrollo de la diabetes tipo 2 como múltiples defectos en los órganos. Imagen tomada de AA Vaag et al, 2012.

## 5. LOS DISRUPTORES ENDOCRINOS EN LA ETIOLOGÍA DE LA DMT2.

### 5.1. Definición de disruptor endocrino.

Según la definición de la Organización Mundial de la Salud (WHO) los disruptores endocrinos (ED) son agentes exógenos o mezcla de ellos que altera la función o funciones del sistema endocrino y consecuentemente causa efectos adversos en los organismos intactos, en su progenie o (sub)poblaciones (T Damstra, 2002).

Dentro de los compuestos químicos ambientales con actividad estrogénica encontramos:

- Insecticidas: DDT, metoxicloro, kepone, dialdrin, toxaphene, endosulfan, lindane.
- Antioxidantes: alquilfenoles, butil-hidroxi-anisole.
- Plastificantes y monómeros: phtalatos, bisfenol A (BPA).
- Desinfectantes: fenil-fenol.
- Otros químicos como los PCBs, protectores solares y retardantes de fuego.

Los ED ejercen su efecto mediante la imitación de las hormonas endógenas como los estrógenos o los andrógenos, la antagonización de las hormonas endógenas, la alteración de los patrones de síntesis y metabolismo de las hormonas y la modificación de los niveles de receptores hormonales (Markey *et al.*, 2002).

A pesar de que el efecto de los químicos ambientales es menos potente que el de las hormonas endógenas éstos son capaces de actuar produciendo un efecto aditivo al de la hormona; esto ocurre, por ejemplo, en el caso del estradiol. Este hecho explica cómo bajos niveles, aparentemente insignificantes, de xenoestrógenos, como el BPA, pueden tener un efecto cuando se añaden a los niveles hormonales endógenos (Silva *et al.*, 2002). Además cabe destacar que algunos disruptores, como el ya indicado BPA, pueden ser igual de potentes que las hormonas naturales (Alonso-Magdalena *et al.*, 2006). Esto es debido a que pueden actuar a través de vías alternativas no clásicas (Nadal *et al.*, 2001; Ropero *et al.*, 2006). Además, algunos disruptores siguen un patrón de curvas dosis-respuestas no monotónicas (Vandenberg *et al.*, 2012). Esto quiere decir que la

respuesta no es lineal y que dosis bajas producen un mayor efecto en los individuos que dosis altas. Este fenómeno, que ya era conocido en el mecanismo de acción las hormonas esteroideas, fue descrito por primera vez mediado por un disruptor endocrino en la próstata de los ratones. La exposición fetal a dosis bajas de estradiol, DES y BPA, produce un aumento en el tamaño de la próstata que persiste hasta la edad adulta (Nagel *et al.*, 1997; Markey *et al.*, 2002).

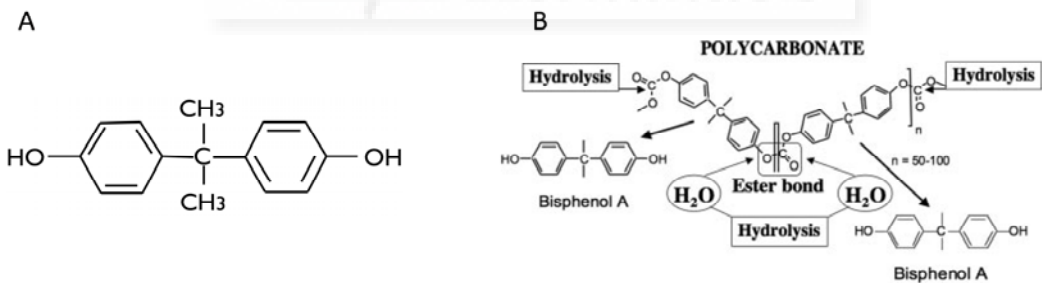
El efecto deletéreo de los disruptores varía dependiendo de la edad y del tipo de organismo que recibe la exposición, siendo el desarrollo embrionario un periodo crítico para la sensibilización a hormonas tanto endógenas como exógenas. Esta “peligrosidad” depende de en qué momento del desarrollo nos encontremos y del órgano, por lo que, para entender cuál es el impacto de la exposición a los disruptores endocrinos en los individuos, debemos considerar el contexto del desarrollo donde nos encontramos (H.A. Bern, 1992; Markey *et al.*, 2002).

Actualmente existe un debate abierto, propuesto en un documento de la Sociedad de Endocrinología de los EEUU (Zoeller *et al.*, 2012), en el cual se está discutiendo la definición de ED. Además, dentro de esta discusión se está enmarcando los principios endocrinólogos que hay que incorporar al diseño de estudios para identificar EDs y caracterizar el riesgo que presentan para las poblaciones. Este debate se debe a la existencia de diferentes definiciones de ED por los diferentes organismos implicados en el área de la salud. La agencia de Protección Medioambiental de los EEUU (EPA, acrónimo de sus siglas en inglés *Environmental Protection Agency*) define ED como agentes exógenos que interfieren con la síntesis, secreción, transporte, unión, acción o eliminación de las hormonas naturales del cuerpo que son responsables del mantenimiento de la homeostasis y la regulación de los procesos de desarrollo (Kavlock *et al.*, 1996). La Unión Europea acordada en el “*European workshop on the impact of endocrine disruptors on human health and wildlife. In: Environment and climate research programme DX*”, celebrado en Bruselas en 1996, que los disruptores endocrinos son sustancias exógenas que causan efectos adversos en la salud en organismos intactos o en su progenie y cambios en la función endocrina de manera secundaria (Commission, 1996). Estas dos definiciones se suman a la ya definida anteriormente por parte de la Organización Mundial de la Salud (T Damstra, 2002). La Sociedad de Endocrinología EEUU propone que la capacidad de un

químico para interferir con la acción de una hormona ya es, *per se*, un claro inductor de resultados adversos, pero además se debe tener en cuenta factores como la dosis, el tiempo de exposición y/o los periodos críticos de alta sensibilización el riesgo. La propuesta de definición de la Sociedad de Endocrinología EEUU es una modificación de la de la EPA, remarcando que las interferencias causadas por los ED no tienen por qué significar un riesgo.

## 5.2. El bisfenol-A (BPA).

El bisfenol-A (BPA) es una sustancia química utilizada fundamentalmente como monómero empleado en la fabricación de plásticos de policarbonato y resinas epoxi (Figura 6A). También es utilizado en la fabricación de resinas de poliéster, polisulfona y poliácido y de retardadores de llama. Además, es uno de los compuestos químicos con mayor volumen en el mercado. El policarbonato se utiliza en la fabricación de materiales en contacto con alimentos, botellas de agua, leche y otras bebidas, equipos de procesamiento y tuberías de agua. Las resinas epoxi se usan como revestimiento de protección de diversas latas de alimentos y bebidas, y como revestimiento de las tapas metálicas de jarras y botellas de vidrio, incluidos los envases de las preparaciones para lactantes. Estos usos provocan la exposición de los consumidores al BPA a través de la alimentación.



**Figura 6 El Bisfenol-A (BPA).** A) Estructura química del BPA. B) Modo de liberación del monómero de BPA a partir del policarbonato. Figura modificada de Welshons, W.V. y colaboradores (Welshons *et al.*, 2006) .

Ya en el año 1936 fue puesto de manifiesto la capacidad estrogénica del BPA por parte de Dodds y Lawson (Dodds & Lawson, 1936). En 1982 Feldman y colaboradores describieron que el BPA, que se liberaba como consecuencia del autoclavado de los flash de policarbonato, producía un efecto estrogénico (Feldman *et al.*, 1982).

La liberación del BPA o de sus derivados se produce por una polimerización incompleta en el proceso de fabricación o una despolimerización como consecuencia del tratamiento a altas temperaturas o con medios ácidos ó básicos (Figura 6B), de modo que podemos encontrar niveles del orden de 4-23  $\mu\text{g/lata}$  en lo que se refiere a alimentos (Brotons *et al.*, 1995) y 7-58  $\mu\text{g/g}$  de bebida (Biles, 1997).

La Red Internacional de Autoridades en Materia de Inocuidad de los Alimentos (INFOSAN), la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), emitieron un informe en el año 2009, en el que se calculaba que las ingesta alimentaria diaria en Europa, basadas en las concentraciones medidas en los alimentos, es de aproximadamente 0.2  $\mu\text{g/kg}$  de peso corporal en los lactantes amamantados, 2.3  $\mu\text{g/kg}$  de peso corporal en lactantes alimentados con sucedáneos de leche materna en biberones fabricados sin policarbonatos, 11  $\mu\text{g/kg}$  de peso corporal cuando se usaban biberones fabricados con policarbonatos y 1.5  $\mu\text{g/kg}$  de peso corporal en adultos (<http://www.who.int/>). La evaluación de la exposición humana diaria a BPA en el grueso de la población, medida mediante el control de la excreción urinaria de metabolitos de BPA varía enormemente, pero se calcula que en EEUU llega hasta los 0.16  $\mu\text{g/kg}$  de peso corporal y en Japón se encuentra entre 0.04-0.08  $\mu\text{g/kg}$  de peso corporal. Además, se ha llegado a medir niveles de BPA en el plasma de las gestantes (1.4-2.4  $\text{ng/ml}$ ) y de los fetos (2.2-2.9  $\text{ng/ml}$ ) y en las placentas (11.2  $\text{ng/g}$  de tejido) en humanos (Vandenberg *et al.*, 2007a), e incluso en la leche materna (0.61  $\text{ng/ml}$ ) (Sun *et al.*, 2004). Todo esto indica que se produce una exposición a este compuesto durante el desarrollo fetal y del neonato (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009).

En roedores se ha demostrado que el BPA es capaz de atravesar la barrera placentaria (Zalko *et al.*, 2003; Richter *et al.*, 2007) y unirse a la  $\alpha$ -fetoproteína (proteína de unión a estrógenos que previene que los estrógenos maternos entren en la circulación del feto) con una menor afinidad que la del estradiol. La presencia del BPA en los fetos de ratón y en el líquido amniótico es mayor que la concentración sanguínea de la madre durante la exposición materna (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009).

La dosis diaria establecida como segura por la EPA es de 50  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de peso corporal asumiendo que la principal forma de exposición es vía oral a través de la ingesta de alimentos (US Environmental Protection Agency Integrated Risk Information system (on line) <http://www.epa.gov/iris/subst/0356.htm> 2010). La EPA se basa en el LOAEL (del inglés lowest-observed-adverse-effect level) para establecer que la cantidad de BPA que genera efectos adversos en animales de laboratorio es de 50 mg/Kg peso corporal/día. Los métodos para establecer los niveles de exposición segura se basan en los criterios de la toxicología clásica, donde se asume que, si no se observan efectos a altas dosis no se espera que estos ocurran a bajas dosis. Asimismo, recientes estudios sugieren que la ingesta de alimentos no es la única fuente importante de exposición y que la vida media del BPA en humanos es mayor de lo esperado (Stahlhut *et al.*, 2009).

En el año 1997 se demostró por Vom Saal y colaboradores (vom Saal *et al.*, 1997), que pequeños cambios en la concentración de estrógenos (estradiol o dietilestilbestrol) durante el desarrollo fetal es capaz de aumentar de forma permanente el receptor de andrógenos prostático y el tamaño de la próstata. Actualmente ha crecido el número de publicaciones en el que se aborda la exposición a BPA vía fetal. En ratonas gestantes a las que se les administraron 25 y 250 ng/Kg peso corporal/día durante 14 días, empezando el día 8 de gestación, se muestran afectados ciertos aspectos del desarrollo de las descendientes hembras. A día 18 de gestación los fetos de las madres expuestas a la dosis más alta de BPA presentan modificados los parámetros de crecimiento de la glándula mamaria (Vandenberg *et al.*, 2007b). Por otro lado, ratonas vírgenes expuestas al BPA en el periodo perinatal, tras seis meses de edad muestran glándulas mamarias que se asemejan a las de las ratonas gestantes, mostrando un aumento del porcentaje de ductos, de los extremos terminales, de los conductos terminales y de las papilas alveolares (Munoz-de-Toro *et al.*, 2005). Además, a los tres meses de vida se observó hiperplasia intraductal, que es considerada una lesión preneoplásica (Vandenberg *et al.*, 2008).

La exposición intra útero desde el día 9 de gestación hasta el día 1 postnatal muestra que el 33 % de las ratas expuestas a 250  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  peso corporal/día desarrollaron carcinomas *in situ* en la glándula mamaria, mientras que los animales no expuestos no desarrollaron neoplasia (Murray *et al.*, 2007). Estos cánceres sólo se observaron cuando los animales llegaron a edad adulta. Por lo



que se concluye que la exposición intra útero a BPA incrementa de tres a cuatro veces el número de lesiones precancerosas (proliferación intraductal), observándose éstas sólo en la pubertad y durante la vida adulta de los animales.

### 5.3. El bisfenol-A y la diabetes.

Actualmente se sabe que las concentraciones ambientales de EDs son capaces de actuar en la célula beta pancreática. El dietilestilbestrol (DES), el BPA y el 17- $\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) son capaces de aumentar las señales de calcio inducidas por la glucosa en islotes de Langerhans (Nadal *et al.*, 2000), aumentar la fosforilación de CREB (Quesada *et al.*, 2002) y alterar la entrada de calcio en las células  $\alpha$  (Alonso-Magdalena *et al.*, 2005). Estudios *in vivo* muestran que la exposición a una única dosis de 10  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  BPA o de  $E_2$  disminuye la glucemia y aumenta los niveles de insulina en plasma (Alonso-Magdalena *et al.*, 2006). También se ha demostrado que ratones machos expuestos a 100  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  por día de BPA durante cuatro días, presentan intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina. Al estudiar las células beta de estos islotes, se observa un aumento de la secreción y contenido de insulina, lo que conlleva una hiperinsulinemia en plasma en estado de saciedad (Alonso-Magdalena *et al.*, 2006). Los efectos del  $E_2$  son idénticos a los encontrados con el BPA, por lo que el BPA imita a la hormona natural con la misma potencia (Alonso-Magdalena *et al.*, 2011).

La exposición directa de los islotes a  $E_2$  o BPA durante 48 horas provoca un aumento en la expresión del gen de la insulina que conlleva un aumento del contenido de ésta y una mayor liberación por parte del islote, afectando de manera directa ambos compuestos a la función de la célula beta (Alonso-Magdalena *et al.*, 2008). Por tanto, el BPA potencia de manera directa la secreción de insulina estimulada por la glucosa, favoreciendo una hiperinsulinemia postprandial y una resistencia a la insulina (Alonso-Magdalena *et al.*, 2006; Batista *et al.*, 2012).

Por otro lado, también se ha visto que el BPA es capaz de disminuir la liberación de adiponectina en muestras de adipocitos mamarios, subcutáneos o viscerales de humanos (Hugo *et al.*, 2008). Estos efectos se han visto a concentraciones bajas (de picomolar a nanomolar) de BPA, similares o inferiores a los valores encontrados en humanos. La disminución de la liberación de la

adiponectina favorece la resistencia a la insulina (Whitehead *et al.*, 2006), que puede desembocar en la aparición de DMT2 cuando es combinada con una predisposición genética o ante situaciones de estrés metabólico.

Algunos estudios muestran que los contaminantes orgánicos persistentes (POPs, de sus siglas en inglés Persistent Organic Pollutants) son capaces de producir resistencia a la insulina y alterar la homeostasis de la glucosa (Ruzzin *et al.*, 2010). Las células 3T3 de adipocitos de ratón, cuando son expuestas a POPs (a concentraciones nanomolares) muestran una disminución de la respuesta a la insulina y una bajada en la expresión de genes inducidos por la acción de la insulina y que están implicados en la homeostasis de lípidos. Estos experimentos muestran una relación causa-efecto directo de la exposición a POPs y la resistencia a la insulina (Ruzzin *et al.*, 2010).

#### **5.4. Vías de actuación de los estrógenos y el Bisfenol-A.**

Los estrógenos ejercen una gran variedad de efectos en diversos tipos celulares y se encuentran implicados en distintas vías metabólicas y celulares. Estos efectos pueden iniciarse tanto en el núcleo celular como en el citoplasma. Los efectos nucleares están asociados a los receptores de estrógenos alfa ( $ER\alpha$ ) y beta ( $ER\beta$ ) que actúan como factores de transcripción uniéndose al elemento de respuesta de estrógenos (ERE) (Beato & Klug, 2000). Además pueden modular la expresión génica gracias a la interferencia con otros factores de transcripción Sp-1 o AP-1 (Safe & Kim, 2008). Por otro lado, los estrógenos pueden actuar a través de vías extranucleares en las cuales el ligando se une al receptor de  $ER\alpha$  o  $ER\beta$  asociados a la membrana o en el citosol (Kelly & Levin, 2001; Pedram *et al.*, 2006). Esta iniciación rápida extranuclear de los efectos de los estrógenos se ha llamado clásicamente vía no genómica. Actualmente se denomina preferentemente efectos iniciados fuera del núcleo (Hammes & Levin, 2007), ya que esta activación rápida produce una cascada de señalización que muchas veces acaba como resultado final con la activación de factores de transcripción y la consiguiente regulación de la expresión de genes (Ropero *et al.*, 2006; Lange *et al.*, 2007).

En el año 1967, Hans Selye publicó un estudio en el que se analizó el efecto de distintas hormonas esteroideas, poniendo de manifiesto que no sólo existen

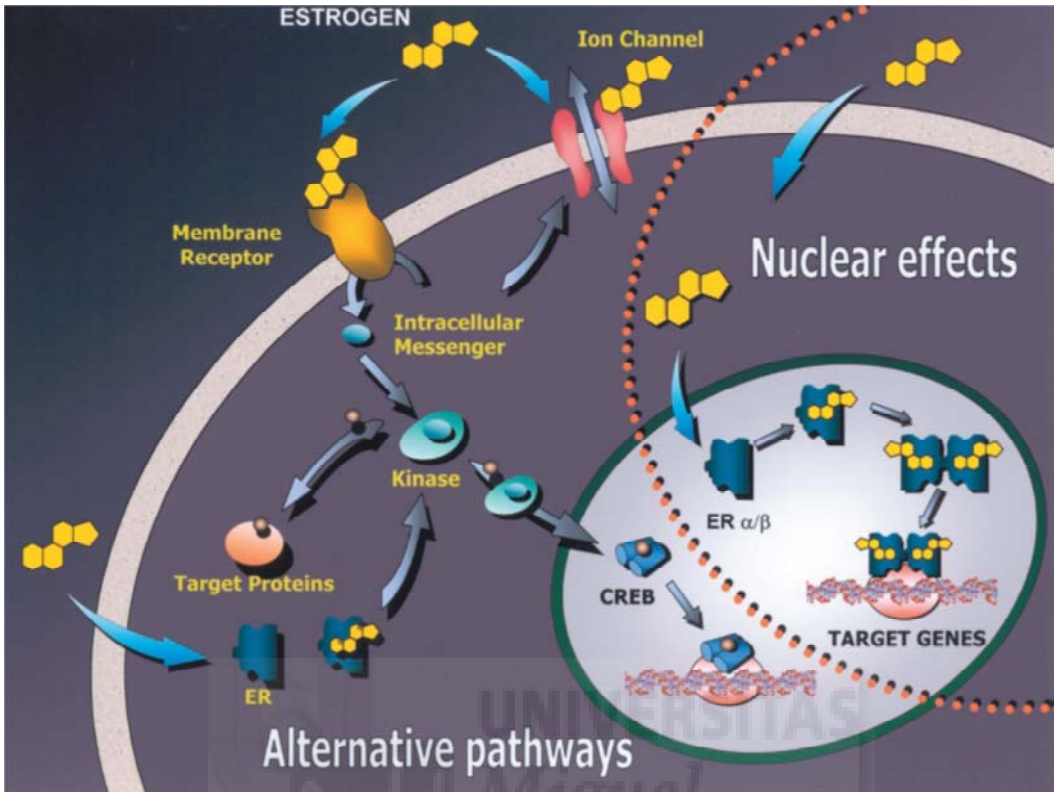
diferencias en la duración de sus efectos, sino que estos efectos implican gran variedad de receptores y de vías de señalización (Selye, 1967).

Actualmente se sabe que gran parte de estos efectos están mediados por los denominados receptores clásicos de estrógenos ER $\alpha$  y ER $\beta$ , que se localizan principalmente en el núcleo y el citoplasma.

Durante varias décadas se creyó en la existencia de un único receptor, pero estudios en los que se observó cómo ciertos compuestos se comportaban como agonistas o antagonistas dependiendo del tejido diana (Katzenellenbogen *et al.*, 1996) condujeron al clonaje de un segundo receptor (Kuiper *et al.*, 1996). Este hallazgo provocó un cambio en la nomenclatura, de modo que se denominó al primer receptor clonado como receptor ER $\alpha$  y al más recientemente clonado como ER $\beta$ .

Estructuralmente existe un 96 % de homología entre ambos receptores en la región de unión al ADN, mientras que la homología en la región de unión al ligando es del 53 %. Este hecho sugiere que ER $\alpha$  y ER $\beta$  reconocen y se unen a EREs similares mientras que cada receptor tiene un espectro distinto de ligandos (Paech *et al.*, 1997; Weihua *et al.*, 2000; Weihua *et al.*, 2003).

Los efectos estrogénicos clásicamente han sido asociados a mecanismos genómicos asociados a los receptores intracelulares descritos anteriormente. Actualmente esta visión ha ido cambiando y se sabe que no todos los efectos del E<sub>2</sub> cursan de este modo, sino que también actúan a través de otras rutas de señalización en las que participan proteínas citoplasmáticas, factores de crecimiento o respuestas iniciadas en la membrana plasmática (figura 7).



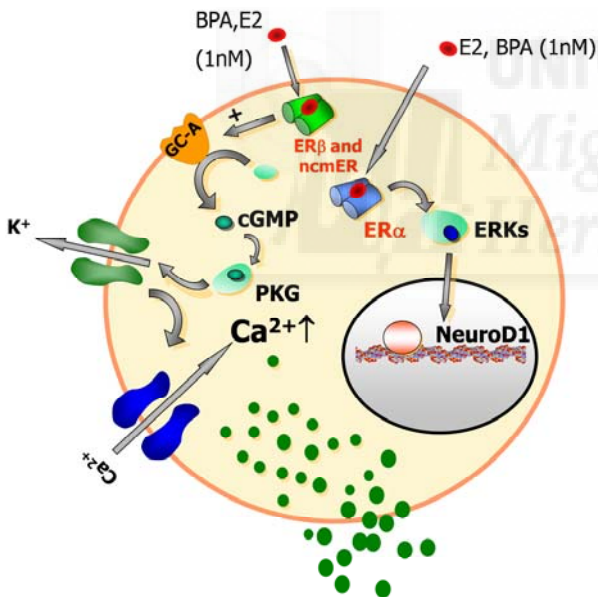
**Figura 7. Mecanismo de acción de los estrógenos a través de los receptores intracelulares clásicos y de los presentes en la membrana plasmática.** Esta figura muestra la complejidad de los mecanismos empleados por el estradiol para producir sus efectos: los efectos nucleares clásicos por una parte y, además, una serie de vías alternativas a través de un receptor en la membrana plasmática, que produce tanto efectos genómicos como no genómicos. Modificada de (Nadal *et al.*, 2009).

Cuando la acción estrogénica transcurre en el núcleo con la participación directa de los ERs como factores de transcripción sin que se requieran pasos previos de señalización, nos referimos al efecto nuclear o vía clásica. El resto de mecanismos han sido denominados vías de señalización no clásicas o alternativas (Bulayeva & Watson, 2004; Watson *et al.*, 2005; Wozniak *et al.*, 2005; Watson *et al.*, 2007). Éstas pueden ser iniciadas en la membrana, el citoplasma y posiblemente en la mitocondria, dando lugar a efectos locales directos, como la modulación de la actividad de canales iónicos o la regulación de la transcripción génica a través de la activación de distintas cascadas de señalización (Hammes & Levin, 2007).

Los ERs localizados en la membrana a veces activan receptores de factores de crecimiento, como en el caso del receptor del factor de crecimiento epidermal que produce la activación de la ERK o de la PI3K (Fosfatidil inositol 3 kinasa). En otros tipos de células, cuando el E<sub>2</sub> se une al ER provoca la activación de calcio, de la proteína quinasa C o de la quinasa Scr (Levin, 2009).

Con respecto a la fisiología del páncreas endocrino, se sabe que el E<sub>2</sub> es capaz de modular la función de la célula beta pancreática. Los primeros trabajos que demostraron que el E<sub>2</sub> era capaz de aumentar la liberación de insulina datan de los años 70 (Sutter-Dub *et al.*, 1978; Sutter-Dub, 1979, 2002). Estudios posteriores confirmaron el efecto insulínico del E<sub>2</sub> y describieron el mecanismo de acción que mediaba dicho fenómeno (Nadal *et al.*, 1998; Ropero *et al.*, 1999). Se demostró que el estradiol provoca la síntesis de GMPc y la activación de la proteína quinasa G (PKG), produciendo el cierre del canal K<sub>ATP</sub> mediante la PKG. Este cierre produce una despolarización de la membrana plasmática y un aumento en la concentración de calcio intracelular (Ropero *et al.*, 1999) que desencadenaba un aumento rápido en la liberación de insulina. Además se vio que antagonistas como el ICI182.780 no bloquea el efecto del E<sub>2</sub> anteriormente descrito, lo que hizo pensar que un receptor de estrógenos no clásico mediaba esta acción (Nadal *et al.*, 2000; Ropero *et al.*, 2002). Posteriormente nuevos resultados demostraron que el mecanismo era más complejo de lo inicialmente descrito, y que el receptor de estrógenos ERβ estaba involucrado en la regulación rápida del K<sub>ATP</sub> por el E<sub>2</sub> y en la consecuente secreción de insulina (Soriano *et al.*, 2009; Soriano *et al.*, 2012). Mediante el uso de agonistas de ERα y ERβ (PPT y DPN) así como de ratones ERβKO (-/-), se demostró que este rápido incremento de la secreción de insulina era mediado por el receptor ERβ. Curiosamente el BPA a la misma concentración que el E<sub>2</sub> (1nM) era capaz de provocar el mismo efecto. Los resultados del estudio mostraron que cuando el E<sub>2</sub> o BPA se unen a ERβ, se activa el receptor de la guanilato ciclasa A de membrana, por un mecanismo todavía desconocido. Como consecuencia, se produce la activación de la PKG, por el GMPc, produce el cierre del K<sub>ATP</sub> y el aumento de la secreción de insulina (Soriano *et al.*, 2009; Soriano *et al.*, 2012). En islotes humanos el BPA produce también un efecto insulínico (Soriano *et al.*, 2012).

También se ha demostrado que tanto el E<sub>2</sub> como el BPA, a las mismas dosis son capaces de regular la síntesis y contenido de insulina a largo plazo. En el año 2008 se demostró que la exposición de islotes de Langerhans durante 48 h en presencia de E<sub>2</sub> o BPA 1 nM desencadenaba un aumento en el contenido de insulina. Dicho aumento se asemejaba al producido por el agonista de ER $\alpha$  (PPT), mientras que el agonista de ER $\beta$  (DPN) no produce tal efecto, indicando que ER $\alpha$  media este efecto. Estos resultados fueron confirmados mediante la utilización de ratones knockout tanto para los ER $\alpha$  (Er $\alpha$ KO) como para ER $\beta$  (ER $\beta$ KO). Además se observó que el aumento en el contenido de insulina se producía como consecuencia de una sobreexpresión del gen de la insulina. Se comprobó además que la activación de la transcripción del gen de la insulina se producía vía ERK1/2 que a su vez activa al factor de transcripción NeuroD1 (Alonso-Magdalena *et al.*, 2006; Alonso-Magdalena *et al.*, 2008; Wong *et al.*, 2010) (Figura 8).



**Figura 8.** Mecanismo de acción del estradiol/BPA a través de los receptores intracelulares clásicos y de los presentes en la membrana plasmática en la célula beta. Esta figura muestra las diferentes vías de actuación del estradiol para producir sus efectos en la célula beta. Modificada de (Nadal *et al.*, 2009).



# OBJETIVOS







El Bisfenol-A (BPA) es uno de los compuestos englobados en la definición de disruptor endocrino por la EPA y ESFA. Dichos compuestos son capaces de alterar el equilibrio hormonal pudiendo provocar efectos adversos en la salud de los individuos expuestos y/o su descendencia.

Actualmente existen estudios epidemiológicos en los que se asocia la exposición a dicho compuesto en adultos, con un mayor riesgo de diabetes tipo 2 y enfermedades cardíacas.

El objetivo general de la presente Tesis es caracterizar los efectos del disruptor endocrino, Bisfenol-A, tras una exposición intra-útero, durante el desarrollo embrionario de ratones OF1, sobre la homeostasis de la glucosa y su posible influencia en el desarrollo de la diabetes tipo 2.

Dentro de este objetivo general nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterización fisiológica de los parámetros implicados en la homeostasis de la glucosa en la edad adulta de 4 y 7 meses de los individuos expuestos a BPA durante los días 9 a 16 de gestación.
2. Estudiar las modificaciones estructurales y funcionales que se producen en el páncreas endocrino de dicho modelo.
3. Estudiar las posibles complicaciones adicionales que pueda generar una alimentación rica en grasa en dicho modelo.
4. Caracterización fisiológica de los parámetros implicados en la homeostasis de la glucosa en individuos expuestos a BPA durante los días 9 a 16 de gestación en la vida temprana (1 mes de vida).



# MATERIAL Y MÉTODOS





## **1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y PROTOCOLO DE OBTENCIÓN DEL MODELO ANIMAL DE ESTUDIO.**

Los animales empleados en los experimentos presentados en esta tesis fueron ratones macho de uno, cuatro o siete meses de edad, de la cepa OF1 procedentes de ratones hembras gestantes proporcionados por Charles River (Barcelona, España). Todos los animales se encontraban en un ambiente óptimo para su crecimiento, con una temperatura de unos 22 °C, un ciclo de luz controlado de 12 horas y con acceso libre a comida y agua. Todos los procedimientos empleados para el desarrollo de los experimentos presentados en esta tesis fueron aprobados por el comité de ética y experimentación animal de la Universidad Miguel Hernández (IB-AN-001-11) y fueron realizados con el menor sufrimiento para el animal.

### **1.1. Obtención del modelo animal.**

Hembras preñadas proporcionadas por Charles River (Barcelona, España) fueron individualizadas a su llegada al animalario y mantenidas bajo las condiciones anteriormente especificadas. Las gestantes fueron alimentadas durante todo el tiempo de gestación y lactancia con la dieta de mantenimiento de roedores 2014 Teklad Global 14 % de proteína de Harlan Laboratories (Barcelona, España). La densidad energética de la dieta es 2.9 kcal/g (12.1 KJ/g); las calorías procedentes del aporte proteico es un 20 %, del aporte lipídico es 13 % y de los hidratos de carbono el 67 %.

El BPA fue disuelto en aceite de maíz libre de tocoferoles (Cat. no. 901415, MP Biomedicals, LLC, Illkirch, Francia) y administrado por vía subcutánea y monodosis desde el noveno al decimosexto día de gestación. La dosis suministrada a las gestantes fue de 10 µg de BPA por Kg de peso corporal en un volumen de 100 µL. A las gestantes controles se les suministró 100 µL de vehículo (aceite).

Tras el alumbramiento, se pesaron a los neonatos y se distribuyeron para que todas las gestantes tuvieran el mismo número de crías que alimentar y de esa manera poder disminuir los posibles efectos de una competitividad por el alimento durante la lactancia. A día 21 postalumbramiento se procedió al destete

y sexado de las crías y se distribuyeron un número de 6-7 animales machos por jaula provenientes de la misma gestante.

Los animales fueron alimentados con la misma dieta de mantenimiento que las gestantes, 2014 Teklad Global 14 % de proteína de Harlan Laboratories, a la que consideraremos dieta control o normal (ND). Al alcanzar la edad de un mes, la mitad de los animales, tanto los procedentes de las gestantes controles como de las tratadas con BPA, se les introdujo una dieta rica en grasa al 45 % (HFD), D12451, (Research Diets Inc., New Brunswick, NJ, USA.). La densidad energética de la dieta es de 4.7 Kcal/g (19.8 KJ/g); el aporte calórico de la dieta viene distribuido por un 20 % de las proteínas, un 45 % de las grasas y un 35 % de los hidratos de carbono. Esta dieta fue utilizada durante 6 meses para la realización del estudio de la presente tesis. Los tiempos marcados para la realización de experimentos fueron 13 semanas de HFD y 28 semanas.

### **1.2. Protocolo de disección y extracción de islotes.**

En todos los sacrificios, por decapitación, se obtienen muestras de sangre del animal para su posterior procesamiento y obtención de suero para las diferentes medidas de hormonas y metabolitos circulantes. Tras el sacrificio, se practica una laparotomía media completa. Con unas tijeras se hace un corte en la parte inferior del abdomen y se va cortando la piel hasta el tórax. Posteriormente se separa la piel del peritoneo; después se corta el peritoneo hasta el tórax dejando al descubierto toda la masa intestinal.

Una vez abierto el animal, se retiran los intestinos hacia abajo para una mejor manipulación y con una gasa estéril se abate el hígado hacia atrás para liberar el colédoco. Se localiza la ampolla de Water (donde se une el colédoco con el duodeno) y con unas pinzas curvas se pasa hilo de sutura por debajo y se anuda para evitar la pérdida de la solución de colagenasa hacia el intestino. A continuación en la parte superior del colédoco se repite el mismo proceso pero sin anudar. Superior a este punto con unas microtijeras se hace una incisión en el conducto biliar común y se introduce la cánula. Se anuda y se inyectan 8mL de medio de aislamiento con colagenasa a razón de 0.33-1 mg/mL dependiendo de la actividad de la colagenasa. Tras tener el páncreas perfundido se aísla tirando suavemente del intestino y del bazo.

Una vez aislado el páncreas, se introduce en un tubo cónico de 15 mL de capacidad, en un baño termostatzado P-Selecta a 37 °C (Selecta, Barcelona), con agitación suave y permanente durante un tiempo variable de 5 a 9 minutos dependiendo de la actividad de la colagenasa (previamente testado para ajustar la concentración empleada en función de la actividad del lote recibido), hasta observar que el páncreas se ha digerido por el cambio de la textura del medio y la separación de pequeños fragmentos de páncreas. Para finalizar la digestión y parar la actividad enzimática de la colagenasa se añade medio de aislamiento frío y se deja reposar 5 minutos en hielo. Este proceso se realiza dos veces para eliminar restos de tejido graso del páncreas. Una vez realizados los lavados se añade más medio de aislamiento y el contenido se vierte sobre una placa de Petri con fondo oscuro bajo una lupa estereoscópica (Zeiss stemi 2000, Jena, Alemania) para recolectar los islotes uno a uno, evitando recoger tejido exocrino con la pipeta.

Una vez aislados los islotes, se llevaran a cabo diferentes protocolos dependiendo del experimento que se vaya a realizar con ellos. Si se procede a la realización de experimentos *ex-vivo*, tales como secreción de insulina o mediciones de calcio intracelular, se dejan recuperar en una placa de 35 mm con 2 mL de medio de aislamiento en un incubador a 37 °C con una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub> durante al menos una hora. Si por el contrario, el fin de tales islotes es la elaboración de técnicas de biología molecular, se elimina el medio de aislamiento mediante un pulso de centrifuga a 4 °C (Eppendorf centrifuge 5415R, Eppendorf, Madrid, España) y se resuspenden los islotes en el medio definido por los kits para la posterior obtención de ADN genómico, ARN mensajero o proteínas. Las muestras son conservadas a -80 °C hasta su utilización.

## **2. TEST DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA INTRAPERITONEAL (ipGTT).**

Para la realización del Test de Tolerancia a la Glucosa se individualiza a los animales y se les deja durante un periodo de seis o doce horas en ayuno, tras el cual se procede a la aplicación de una carga de glucosa intraperitoneal de 1.5 ó 2 g/Kg de peso corporal dependiendo de la edad a la que se haya hecho el experimento.



Para la valoración de los niveles de azúcar en sangre, se practica un pequeño corte en la parte distal de la cola, de donde se obtendrá el volumen necesario de sangre de las venas caudales (aproximadamente unos 5  $\mu\text{L}$ ). Dicha valoración se lleva a cabo con un glucómetro (Accu-check compact plus, Roche, Madrid, España). Las muestras de sangre se toman a tiempo 0, 15, 30, 60 y 120 minutos, considerando tiempo 0 el momento anterior a la aplicación de la carga de glucosa.

### **3. TEST DE RESISTENCIA A LA INSULINA INTRAPERITONEAL (ipITT).**

En el Test de Resistencia a la Insulina se individualiza a los animales y se procede a la realización del protocolo con los animales alimentados. Se aplica una carga de insulina de 0.75 UI/Kg de peso corporal de manera intraperitoneal (Humalina Regular 100 UI/mL, Lilly, Madrid, España).

Para la medición de los niveles de glucosa sanguínea se practica el mismo procedimiento que en la GTT. En este tipo de prueba las mediciones se hacen a tiempo 0, 15, 45 y 60 minutos poscarga de insulina.

### **4. SECRECIÓN DE INSULINA Y CUANTIFICACIÓN POR RADIOINMUNOENSAYO (RIA).**

Una vez realizada la disección y aislados los islotes se hacen grupos de 5 islotes lo más homogéneos posibles entre sí y se dejan recuperar durante dos horas en una placa de 24 pocillos con el medio utilizado para el aislamiento. Pasadas las dos horas, se elimina el medio inicial y se añaden 400  $\mu\text{L}$  de medio de secreción sin BSA con los estímulos correspondientes. A continuación se guarda la placa con los islotes en el incubador durante una hora a 37 °C y 5 % de  $\text{CO}_2$ , tras esta hora se añaden 100  $\mu\text{L}$  con los mismos estímulos suplementados con 5 % de BSA. Se agita suavemente durante cinco minutos a temperatura ambiente mediante la utilización de un orbital y posteriormente se para la secreción introduciendo la placa en hielo durante quince minutos. Se recogen los islotes, en un volumen de 5  $\mu\text{L}$ , en tubos con 20  $\mu\text{L}$  de tampón de lisis, para posteriormente cuantificar la cantidad de proteína por el método de Bradford (Bradford, 1976). Por otro lado, el medio de secreción donde se encuentra la insulina liberada por los islotes se pasa a tubos de ensayo de vidrio y se congelan a  $-80$  °C hasta el día de la cuantificación.

Una vez recogidas todas las muestras necesarias para la cuantificación se procede al empleo del Kit de Insulina coat-a-count (Diagnostic Products Corp., Los Angeles, CA USA). Este kit contiene 100 tubos recubiertos de anticuerpos contra insulina, 1 set de calibradores para establecer una recta patrón, compuesto por 7 frascos (A-G) con concentraciones crecientes de insulina, y un vial de insulina radiactiva ( $I^{125}$ ).

La finalidad del radioinmunoensayo es la competición entre la insulina de las muestras y la insulina radiactiva por unirse a los sitios específicos de los anticuerpos inmovilizados en las paredes del tubo. El periodo de competición o incubación de las insulinas es de aproximadamente 24 horas, una vez transcurrido este tiempo se para esta reacción por decantación y se procede a la lectura de los tubos mediante un contador gamma localizado en la Unidad de Isótopos de la Universidad Miguel Hernández. Las cantidades reflejadas por el contador serán las de insulina radiactiva.

El procedimiento a seguir comienza con la realización de la recta de calibrado, empleando para ello los siete tubos de calibrado. Éstos contienen insulina humana en concentraciones crecientes (por lo tanto reflejarán en el contador concentraciones decrecientes de insulina radiactiva). Posteriormente, con los datos obtenidos se realiza una curva logarítmica que, tras una transformación, dará lugar a una recta con los patrones de insulina. Se continúa rellenando el resto de tubos con 200  $\mu$ L de nuestra muestra; en el caso de que sea necesario diluir la muestra se realizará añadiendo hasta los 200  $\mu$ L del medio de secreción que contiene 0 UI de insulina. Todos estos tubos, incluidos los necesarios para realizar la recta de calibrado, se hacen por duplicado. Una vez listos los tubos añadimos 1 mL de la insulina marcada. Se homogenizan todos los tubos y se dejan incubando a 4° C *overnight*. Se decantan todos los tubos, excepto los dos primeros, que únicamente contienen insulina radiactiva, y que se emplean para saber la radiactividad total (expresada como cuentas por minuto) de la que partimos para establecer las cuentas totales. Una vez que los tubos se secan, se colocan en el contador gamma y éste nos dará las cuentas de cada tubo, indicándonos la cantidad de insulina de nuestras muestras.

#### 4.1. Cuantificación de proteína mediante el método de Bradford.

La cuantificación de proteínas mediante el método de Bradford se emplea para normalizar los datos de la secreción de insulina, debido a posibles diferencias de secreción de los islotes de Langerhans en cuanto a su tamaño. Para ello, una vez acabado el tiempo de secreción, los islotes empleados fueron recogidos en un volumen de 5  $\mu\text{L}$  e introducidos en un tubo con 20  $\mu\text{L}$  de tampón de lisis para favorecer su ruptura.

Una vez recogidos son vigorosamente agitados y guardados durante un día a 4 °C con agitación; posteriormente se centrifugan durante 5 minutos a 5000 rpm a 4 °C, tras lo que se recoge el sobrenadante y se congelan a -20 °C hasta el momento de su utilización. Una vez recopiladas todas las muestras se emplea una placa de 96 pocillos para proceder a la lectura de proteína de la muestra. El procedimiento a seguir consiste en:

- 1) Preparar una curva patrón de 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mg/mL de albúmina empleando un volumen de 10  $\mu\text{L}$  de cada una de ellas en 200  $\mu\text{L}$  de solución Bradford.
- 2) De cada una de nuestras muestras coger una alícuota de 10  $\mu\text{L}$  y añadir 200  $\mu\text{L}$  de solución Bradford e incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tanto la curva patrón como las muestras se miden por duplicado.
- 3) Medir la absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro de luz visible modelo  $\mu\text{Quant}$  (Bio-Tek Instruments, INC). Los valores de la concentración de cada una de las muestras se calculan por la extrapolación de las absorbancias de las concentraciones conocidas de la curva patrón preparada previamente.

#### 5. MEDIDAS DE BIOQUÍMICAS EN SUERO.

Tras el sacrificio del animal por decapitación, se recolecta la sangre en un tubo eppendorf de 1.5 mL. Posteriormente se procede a la centrifugación de la misma a 1200 rpm durante 20 minutos a una temperatura de 4 °C para poder obtener un medio bifásico en el que la parte superior se encuentra una porción fluida, el suero, y en la inferior el coagulo de la sangre. Para las medidas de

bioquímica utilizamos el suero, que una vez recuperado, se alicuotará y congelará a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para su posterior utilización en los diferentes kits.

### 5.1. ELISA de Insulina.

Para la medición de los niveles de insulina circulante se usó el ELISA de insulina de Crystal Chem (cat. no. 90080, Downers Grove, IL, USA).

Este kit nos permite cuantificar insulina en muestras pequeñas de suero (5  $\mu\text{L}$ ) con una alta sensibilidad (100 pg/mL). Una vez recolectadas todas las muestras a analizar se procede a realizar el ensayo en una placa de 96 pocillos proporcionada en el kit donde se encuentran los anticuerpos para la insulina. Además, el kit consta de un stock de insulina con una concentración de 12.8 ng/mL a partir del cual se realizarán diluciones seriadas para poder obtener los valores de la curva patrón a partir del que se obtendrán los valores de cada muestra por extrapolación de absorbancias.

El procedimiento a seguir es, una vez atemperados los productos y descongeladas las muestras:

- 1) Pipetear las muestras y los estándares en sus correspondientes pocillos.
- 2) Incubar durante 2 horas a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  y con un poco de agitación para que la insulina de nuestra muestra se una al anticuerpo que se encuentra pegado en los pocillos.
- 3) Lavar la placa del ensayo e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente con la enzima conjugada anti-insulina.
- 4) Lavar la microplaca e incubar durante 40 minutos a temperatura ambiente y oscuridad con la solución sustrato.
- 5) Añadir la solución stop y medir la absorbancia a 450 y 630 nm en el espectrofotómetro de luz visible modelo  $\mu\text{Quant}$  (Bio-Tek Instruments, INC). Los valores de la concentración de cada una de las muestras se calculan por la extrapolación de las absorbancias de las concentraciones conocidas de la curva patrón preparada previamente.

### 5.2. ELISA de Péptido-C.

Para la medición de los niveles de péptido-C circulantes en sangre se utilizó el kit de Alpco Immunoassays (cat. no. 80-CPTMS-E01, Salem, NH, USA.).

Este kit nos permite cuantificar la concentración de péptido-C en muestras pequeñas de suero (10  $\mu$ L). Una vez recolectadas todas las muestras a analizar se procede a realizar el ensayo. El kit consta de una microplaca de 96 pocillos dividida en 12 módulos de 8 pocillos cada una, un conjunto de estándares de concentraciones crecientes de péptido-c (0; 250; 750; 1500 y 3000 pM) a partir de los cuales se realiza la curva patrón. Además el kit proporciona dos controles para el ensayo de baja y alta concentración del péptido.

Una vez recolectadas todas las muestras para realizar el ensayo, se procede a equilibrar los reactivos y la microplaca a temperatura ambiente y descongelar las muestras para la cuantificación. El protocolo a seguir es:

- 1) Pipetear las muestras y los estándares en sus correspondientes pocillos.
- 2) Incubar durante 2 horas a 4 °C, con agitación (700-900 rpm).
- 3) Lavar la placa del ensayo e incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente y con agitación (700-900 rpm) con el sustrato TMB.
- 4) Añadir la solución stop y medir la absorbancia a 450 y 620 nm en el espectrofotómetro de luz visible modelo  $\mu$ Quant (Bio-Tek Instruments, INC). Los valores de la concentración de cada una de las muestras se calculan por la extrapolación de la absorbancia de las concentraciones conocidas de la curva patrón preparada previamente.

### 5.3. ELISA de Leptina.

Para la medición de los niveles de leptina circulante se usó el ELISA de Leptina de Crystal Chem (cat. no. 90030, Downers Grove, IL, USA).

Este kit nos permite cuantificar leptina en muestras pequeñas de suero (5  $\mu$ L). Una vez recolectadas todas las muestras a analizar se procede a realizar el ensayo en una microplaca de 96 pocillos proporcionada en el kit. Además el kit consta de un stock de leptina con una concentración de 12.8 ng/mL a partir del que se realizaran diluciones seriadas para poder obtener los valores de la curva patrón a partir del cual se obtendrán los valores de cada muestra por extrapolación de absorbancias.

El procedimiento a seguir es, una vez atemperados los productos y descongeladas las muestras:

- 1) Lavar los pocillos con el medio de lavado.
- 2) Pipetear el diluyente, el suero de cobaya anti-leptina de ratón, las muestras y los estándares en sus correspondientes pocillos.
- 3) Incubar *overnight* (16-20 horas) a 4 °C.
- 4) Lavar la placa del ensayo e incubar durante 4 horas a 4 °C con la enzima conjugada anti-IgG de cobaya.
- 5) Lavar la microplaca e incubar durante 40 minutos a temperatura ambiente y oscuridad con la solución sustrato.
- 6) Añadir la solución stop y medir la absorbancia a 450 y 630 nm en el espectrofotómetro de luz visible modelo  $\mu$ Quant (Bio-Tek Instruments, INC). Los valores de la concentración de cada una de las muestras se calculan por la extrapolación de la absorbancia de las concentraciones conocidas de la curva patrón preparada previamente.

#### 5.4. Ensayo colorimétrico de Triglicéridos y Glicerol.

Para la cuantificación de los niveles de triglicéridos y glicerol en suero se utilizó el kit Serum Triglyceride Determination de Sigma (Cat. no. TR0100, Marid, España).

Una vez obtenidas las muestras se realizaron las dos medidas a partir de una muestra de 10  $\mu$ L de plasma siguiendo el protocolo A del manual de uso.

- 1) Resuspender los reactivos y atemperarlos a temperatura ambiente antes del uso.
- 2) Pipetear 0.8 mL de Free Glycerol Reagent en cada tubo.
- 3) Añadir 10  $\mu$ L de agua (blanco) o estándar de glicerol, cuya concentración de 10 mg/mL, o de muestra.
- 4) Mezclar los tubos por inmersión y dejar incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- 5) Leer la absorbancia de cada tubo en un espectrofotómetro a 540 nm (Bio-Rad, Smart Spec 3000, Barcelona, España). El valor obtenido se utilizará para el cálculo de la concentración de glicerol de las muestras.
- 6) Añadir 0.2 mL de Triglyceride Reagent a cada tubo e incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos.

- 7) Leer la absorbancia de cada tubo en un espectrofotómetro a 540 nm. El valor obtenido se utilizará para el cálculo de la concentración de triglicéridos totales de las muestras.
- 8) Con ambas lecturas se procede al cálculo de la concentración de glicerol y triglicéridos totales en base a las conversiones que indica el manual de uso del kit.

## **6. EXTRACCIÓN DE ARN Y qPCR-RT.**

Para la realización de los experimentos de expresión génica se utilizaron muestras de tejido periférico (músculo, hígado y tejido adiposo) e islotes de Langerhans aislados

### **6.1. EXTRACCIÓN DE ARN.**

Para la obtención de las muestras de tejidos periféricos se procedió a hacer una disección del animal tras la cual se extirparon el hígado completo, los dos paquetes de tejido adiposo perigonadal y los dos gastrocnemios de cada ratón. En éste último se realizó una limpieza para quitar las fibras musculares rojas procedentes del sóleo que quedan pegadas a nuestro tejido con el fin de disminuir la variabilidad introducida por estas fibras, ya que la expresión de algunos genes es diferente debido a la función de las mismas. Una vez extraídos los tejidos se limpiaron con PBS estéril y libre de RNasas y se procedió a su ultracongelación con nitrógeno líquido; posteriormente se guardaron a -80 °C hasta su utilización.

Tras la obtención de todas las muestras se realizó la extracción de ARN total de las muestras con el reactivo Tripure (cat. no. 11667165001, Roche, Madrid, España). La extracción se realizó a partir de 100mg de tejido. El protocolo que se realizó es el indicado por el manual:

- 1) Añadir 1 mL de Tripure a cada tubo y homogenizar con el politrón (Biogen series PRO200, Pro Scientific, Madrid, España) manteniendo la muestra siempre en hielo para evitar el calentamiento de esta.
- 2) Mezclar con el vortex para conseguir que el Tripure penetre bien en el tejido.
- 3) Incubar a temperatura ambiente durante 10-15 minutos.

- 4) Centrifugar a 12000 g durante 10 minutos a 4 °C. Recuperar el sobrenadante del tubo e introducirlo en un tubo nuevo libre de RNasas.
- 5) Añadir 200 µL de cloroformo y agitar durante 15 segundos con el vortex.
- 6) Dejar a temperatura ambiente durante 3-5 minutos.
- 7) Centrifugar a 12000 g durante 10 minutos a 4 °C.
- 8) Tras la centrifugación se observan dos fases de diferentes colores separadas por un velo blanco. Recuperar la fase acuosa y transferir a un tubo nuevo sin contaminarla con las otras fases.
- 9) Añadir 500 µL de isopropanol e invertir los tubos 30 veces para que precipite el ARN.
- 10) Incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- 11) Centrifugar a 12000 g durante 10 minutos a 4 °C y descartar el sobrenadante.
- 12) Limpiar el pellet formado con 1mL de etanol al 75 %.
- 13) Centrifugar durante 5 minutos a 4 °C y 7500 g.
- 14) Decantar el sobrenadante y dejar secar el pellet para eliminar los restos de etanol.
- 15) Resuspender el pellet con agua libre de RNasas o DEPC.
- 16) Cuantificar la concentración de ARN de nuestras muestras con el NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Madrid, España) y coger una alícuota de 300 ng/mL de ARN para comprobar la integridad del mismo con un gel de agarosa.
- 17) Guardar el ARN a -80°C hasta su utilización para la PCR de retrotranscripción.

Para la extracción de ARN de islotes de Langerhans aislados se utiliza el protocolo descrito en el apartado 3.3.2 de la presente tesis. Este protocolo lleva unas modificaciones específicas debido al tipo de material con el que se está trabajando. Las modificaciones que se tienen en cuenta son: el medio de aislamiento debe estar previamente filtrado y los islotes se encuentran en todo momento a 4 °C para evitar la activación de la expresión de genes debido a la concentración de glucosa que lleva el medio.

La obtención del ARN total de los islotes se realizó mediante la utilización del kit RNeasy Plus Mini de Qiagen (Madrid, España). El protocolo que se utilizó es



el descrito por la casa comercial para la purificación de ARN procedente de células. Los islotes son almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  con el Tampón RLT suplementado con  $\beta$ -mercaptoetanol hasta la obtención de todo el tamaño muestral. Todo el procedimiento se realiza a temperatura ambiente y la muestra final de ARN es recogida en  $12\mu\text{L}$ , los cuales se utilizarán para hacer la PCR de retrotranscripción y la cuantificación y calidad del ARN obtenido. Las muestras se almacenarán congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

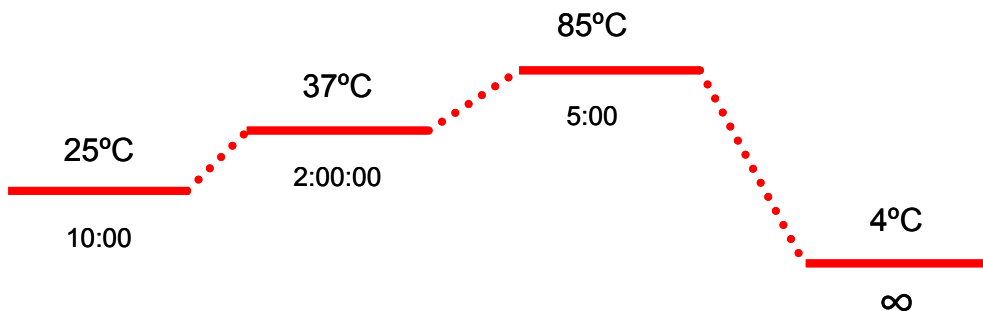
## 6.2. PCR DE RETROTRANSCRIPCIÓN.

Para la transformación del ARN mensajero (ARNm) a ADN complementario (ADNc) se realiza una PCR de retrotranscripción con el kit de Applied biosystems HighCapacity cDNA Reverse transcription (part. No. 4368813) y el termociclador GeneAmp PCR system 9700 de la misma marca. Para la retrotranscripción partimos de  $1\mu\text{g}$  de ARN por muestra a la que añadimos la siguiente mezcla de reactivos (Tabla 1):

PRODUCTO	VOLUMEN
Tampón para PCR (10x)	2 $\mu\text{L}$
dNTPs (25x)	0.8 $\mu\text{L}$
RT Random primers (10x)	2 $\mu\text{L}$
Inhibidor de RNasa *	0.5 $\mu\text{L}$
Agua (hasta completar volumen 20 $\mu\text{L}$ )	3.7 $\mu\text{L}$
ARN (1 $\mu\text{g}$ )	10 $\mu\text{L}$

**Tabla 1. Mezcla de reactivos utilizada para la reacción de retrotranscripción.** \*El inhibidor de la RNasa utilizado es Rnase out Recombinant (P/N 100000840, Invitrogen).

El protocolo a seguir por el termociclador es el abajo indicado (Figura 9):



**Figura 9. Protocolo de reacción de retrotranscripción.**

### 6.3. qPCR A TIEMPO REAL.

Tras la obtención del ADN complementario se procede al estudio de la expresión génica mediante la técnica de PCR a tiempo real.

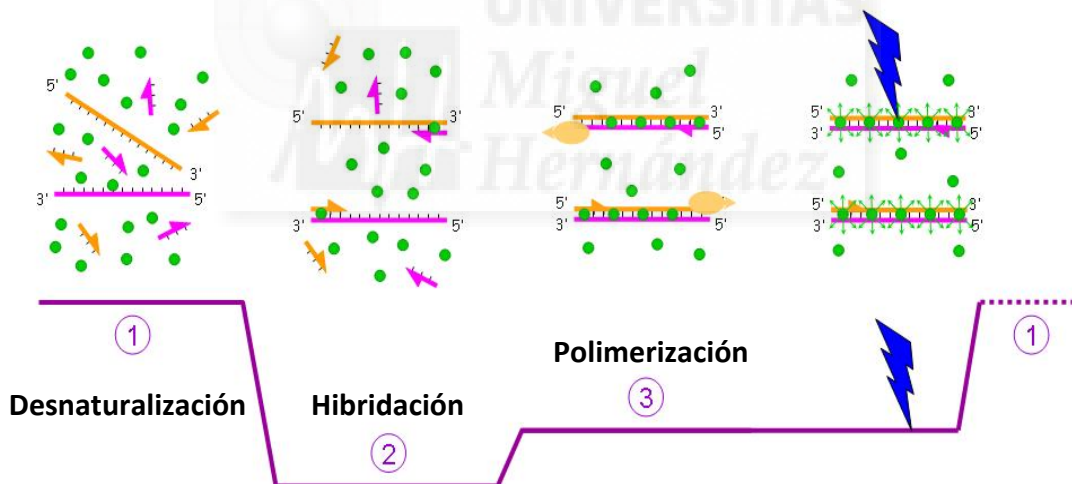
Para la realización de los experimentos se utilizaron parejas de cebadores específicos diseñados usando programas bioinformáticos como primer-Blast de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) o PCR primer stats ([http://www.bioinformatics.org/sms2/pcr\\_primer\\_stats.html](http://www.bioinformatics.org/sms2/pcr_primer_stats.html)). Los cebadores utilizados son los que indicamos en la tabla a continuación (Tabla2):

GEN	FORWARD (5'→3')	REVERSE (5'→3')	REFSEQ (NM)
<b>Rplp0</b>	GAGGAATCAGATGAGGATATGGGA	AAGCAGGCTGACTTGGTTGC	007475
<b>Gapdh</b>	CATCCACTGGTGCTGCCAAGGCTGT	ACAACCTGGTCCTCAGTGTAGCCCA	008084.2
<b>Ins-II</b>	TTATTGTTTCAACATGGCCC	CAAAGGTGCTGCTTGACAAA	1185083
<b>Pdx-1</b>	GGCCTGGAAGAGCCCAACCG	GGCCTGGAAGAGCCCAACCG	008814.3
<b>Hnf4α</b>	TCTGGATGACCAGGTGGCGCT	GGACACACGGCTCATCTCCGC	008261.2
<b>Pparaα</b>	GGTACCACTACGGAGTTCACG	CAGACAGGCACTTGTGAAAACG	1113418
<b>Pparγ</b>	TCCGTGATGGAAGACCACTC	CCCTTGCATCCTCACAAGC	1127330
<b>Sreb1f1</b>	CCACTAGAGGTCGGCATGGT	TCCCTTGAGGACCTTTGTCATT	11480
<b>Prkaa1</b>	GCAGGTGGATCCCATGAAGAGG	ATGAGGTGGTAGGCGACGGATA	1013367
<b>Gck</b>	TTCAGCTTCTGGCCTCCACAG	AAAACAGCCAGGTCTGGGCAGC	010292
<b>Hxk</b>	CGTAGCCGCCATTGAAACGGATAA	CCACTCCCAGGCGGGTCAAG	001146100.1
<b>Ucp2</b>	GCTGGTGGTGGTGGGAGATA	ACAGTTGACAATGGCATTACGG	011671.4
<b>Ucp3</b>	GCCTGTGGAAGGGACTTGG	GGAGCGTTCATGTATCGGGT	009464.3
<b>Acacα</b>	TTTGAGGAGGACCGCATTTATC	ACATGGGATGGCAGTAAGGT	133360.2
<b>Acacβ</b>	GGGCTCCCTGGATGACAAC	CAGACATGCTGGGCCTCATA	133904.2
<b>Cpt1α</b>	AAAGATCAATCGGACCCTAGACA	CAGCGAGTAGCGCATAGTCA	013495.2
<b>Cpt1β</b>	TGGCTACGGGGTCTCTTACA	GGGCGTTCGTCTCTGAACTT	009948.2

<b>Fasn</b>	TCTTCTGCCGAGTACAATGTC	GATGTGAGGGGAGATGAGAG	007988
<b>Pepck 1</b>	GGTGTGGTAGGAGCAGCCATGAG	CAATCGCCCGAACATCCACTC	11044
<b>Slc2a4</b>	CCGTTCCGTGGGTGTGGC	TCCCATCGTCAGAGCCGATCT	009204
<b>Cd36</b>	GGAGCAACTGGTGGATGGTT	CTACGTGGCCCGTTCTAAT	001159555.1
<b>Acox1</b>	AGTTGTCATCGCTTTGGTG	CAAGTTCTCGATTCTCGACG	015729.2

**Tabla 2. Secuencia de cebadores utilizados en las qRT-PCRs.**

En las PCRs a tiempo real se utilizó el fluoróforo iQSybr Green Supermix de Bio-Rad (Barcelona, España). El Sybr Green es una sonda inespecífica que se une a los nucleótidos del ADN. Cuando se encuentra libre en el medio o unido a cadenas simples de ADN no emite casi fluorescencia, pero cuando el Sybr Green se encuentra intercalado, en la doble hebra de ADN, la señal de fluorescencia aumenta (Figura 10), por lo que la fluorescencia de la sonda es proporcional a la cantidad de producto de PCR.



**Figura 10. Funcionamiento de la sonda Sybr Green.** En el esquema se muestran los pasos centrales en los que se basa una reacción en cadena de la polimerasa y que es lo que ocurre con las moléculas de Sybr Green en cada paso. En el paso 1 se produce la desnaturalización de la doble hebra de ADNc. En el paso 2 se produce la hibridación de los cebadores a las hebras monocatenarias de ADNc y comienza a integrarse las moléculas de Sybr Green en los fragmentos de ADN doble cadena formados por la hebra molde y el cebador. En el paso 3 se produce la polimerización de la hebra de ADN y la integración de las moléculas de Sybr Green, al finalizar este paso y antes de volver al paso 1 se hace una lectura de fluorescencia para poder cuantificar el aumento de fluorescencia ligado al aumento de copias de ADNc producidas por la Taq-polimerasa.

Para la realización del experimento se utilizó el termociclador de Bio-Rad CFX36 Real Time System (Barcelona, España). Para ello se empleó el protocolo estandar, al cual se modificó la temperatura de Melting para ajustarla a cada pareja de cebadores. El protocolo utilizado es el que se muestra a continuación:

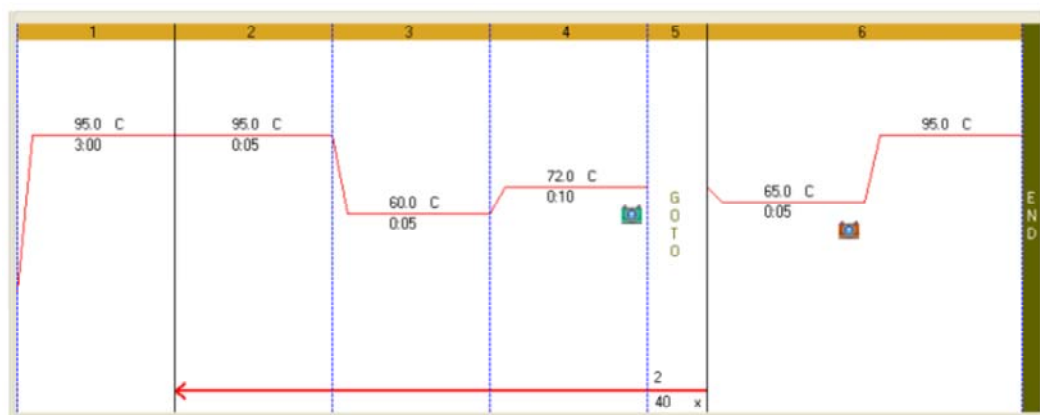


Figura 11. Protocolo qRT- PCR utilizado en los experimentos de expresión génica.

La master mix utilizada en las reacciones es de un volumen total de 10  $\mu$ L. Las proporciones de cebadores, muestra y reactivo de Syber son las que se muestran en la Tabla 3.

Una vez realizado el experimento, los datos obtenidos se expresaron como expresión relativa del gen en relación a un gen endógeno mediante el método establecido  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak & Schmittgen, 2001).

PRODUCTO	VOLUMEN
SyBr Green 10x	5 $\mu$ L
Primer Forward (10 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ L
Primer Reverse (10 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ L
cDNA	1 $\mu$ L
Agua (hasta completar volumen 10 $\mu$ L)	2.4 $\mu$ L

Tabla 3. Mezcla de reactivos utilizada en las reacciones de qRT-PCR.

## **7. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO Y ESTUDIO DE METILACIONES.**

Para la extracción del ADN genómico de islotes de Langerhans aislados se utiliza el protocolo descrito en el apartado 3.3.2 de la presente tesis.

La obtención del ADN genómico de los islotes se realizó mediante la utilización del kit DNeasy Blood&Tissue de Qiagen (Madrid, España). El protocolo que se utilizó es el descrito por la casa comercial para la purificación de ADN procedente de células. Los islotes son procesados en fresco. Todo el procedimiento se realiza a temperatura ambiente y la muestra final de ADN es recogida en 50µL de agua libre de RNasas y DNasas, que se utilizaran para hacer los estudios de metilaciones. Después de su aislamiento, el laboratorio de la Dra. Medina en la Universidad Rey Juan Carlos de Madrid realizaron los estudios de metilaciones en los genes de estudio. Para ello, siguieron los protocolos descritos por el Centro de Apoyo Tecnológico de la URJC (CAT) que se pueden encontrar en la dirección web <http://servicat.escet.urjc.es:8080/>

## **8. INMUNOHISTOQUÍMICA EN CORTES PARAFINADOS DE PÁNCREAS ENTEROS DE RATÓN.**

A todos los ratones, 6 horas antes del sacrificio, se les inyectó con 5-bromo-2-desoxiuridina, BrdU, (ref. 11594167, Fisher, Madrid, España) con una dosis de 100 µg/g de peso corporal y sacrificados en estado alimentado. Tras el sacrificio de los animales por dislocación cervical, se realizó una disección del ratón en la cual se extrajo el páncreas completo. Posteriormente se introducen los páncreas en los casetes histológicos previamente identificados y se introducen en paraformaldehído al 4 % (Sigma, Madrid, España) durante 24 horas a 4 °C. Tras la fijación con paraformaldehído se pasan los páncreas a PBS durante 24 horas a 4 °C. A continuación, se pesan los órganos y se procede a la realización de la inclusión de los páncreas en parafina.

### **8.1. INCLUSION Y OBTENCIÓN DE BLOQUES PARAFINADOS DE PÁNCREAS ENTEROS DE RATÓN.**

Una vez fijados los tejidos, se procede a realizar una secuencia de deshidratación del tejido siguiendo el protocolo descrito a continuación:

- 1) Introducir los casetes con los tejidos en etanol al 70 % durante una hora.
- 2) Cambiar los tejidos a etanol al 90 % durante una hora; repetir el paso 1 vez.
- 3) Introducir los páncreas en etanol al 100 % durante una hora; repetir el paso 2 veces.
- 4) Introducir los casetes en xileno puro durante 30 minutos; repetir el paso 1 vez.
- 5) Introducir los páncreas, bien identificados, en parafina líquida durante 2 horas.
- 6) Colocar los páncreas en parafina líquida nueva y dejar *overnight*.
- 7) Montar los bloques de parafina y guardar a 4 °C hasta su corte con el microtomo.

## 8.2. INMUNOHISTOQUÍMICA DE INSULINA EN TEJIDOS PARAFINADOS.

Una vez seleccionados los cortes para el estudio se procede al marcaje inmunohistoquímico de insulina para la posterior cuantificación de porcentaje de células  $\beta$  pancreáticas y de masa total de estas en el páncreas. Para ello se llevó a cabo el siguiente protocolo:

- 1) Desparafinar las secciones de tejido:
  - i. Introducir los portaobjetos con el tejido en una estufa a 65 °C durante 30 minutos.
  - ii. Sumergir los tejidos en xileno durante 10 minutos; repetir el paso 2 veces.
- 2) Rehidratación del tejido mediante una cadena de etanoles:
  - i. Etanol al 100 % durante 5 min; repetir el paso 1 vez.
  - ii. Etanol al 95 % durante 5 minutos; repetir el paso 1 vez.
  - iii. Etanol al 70 % durante 10 minutos.
  - iv. Agua destilada durante 2 minutos.
  - v. PBS durante 5 minutos.
- 3) Para desenmascarar el antígeno, sumergir los portaobjetos en tampón citrato hirviendo (10mM a pH6) durante 20 minutos.
- 4) Dejar enfriar a temperatura ambiente durante 1 hora.
- 5) Delimitar con pap-pen el tejido.

- 6) Lavar con PBS el portaobjetos durante 5 minutos; repetir el paso 1 vez.
- 7) Bloquear la peroxidasa endógena con  $H_2O_2$  al 3 % en metanol al 50 % durante 30 minutos.
- 8) Lavar con PBS el portaobjetos durante 5 minutos; repetir el paso 1 vez.
- 9) Incubar con el anticuerpo primario *overnight* a 4°C. En nuestro caso es Anti-insulin rabbit Santa Cruz (1:100) en 3 % BSA (SC-9168).
- 10) Lavar en PBS durante 40 minutos.
- 11) Marcar con el kit Vectastain ABC (PK-6100, Vector Laboratorios, Burlingame, USA) el tejido y dejar 1 hora a temperatura ambiente.
- 12) Lavar los portaobjetos con PBS durante 30 minutos.
- 13) Poner la solución de 3'-diaminobencidina (DAB) (code k3467, Dako, Gloustrup, Dinamarca) sobre el tejido y eliminar cuando se revele el anticuerpo primario metiendo el portaobjetos en PBS para parar la reacción.
- 14) Lavar con agua destilada durante 2 minutos.
- 15) Teñir con Hematoxilina el tejido y lavar con agua destilada.
- 16) Deshidratación del tejido con cadena de etanoles:
  - i. Etanol al 70 % durante 2 minutos.
  - ii. Etanol al 95 % durante 2 minutos.
  - iii. Etanol al 100 % durante 2 minutos; repetir el paso 1 vez.
- 17) Reparafinar con xileno durante 10 minutos; repetir el paso 1 vez.
- 18) Montar la preparación.

Una vez montadas las láminas histológicas se procede a fotografiarlas con una cámara, Kappa ACC1, integrada en un microscopio invertido Nikon Eclipse TE200 con el obtetivo de 20x para el mapeo de las células insulino-positivas y con un objetivo de 4x se realizan las fotos de toda la superficie pancreática. Las imágenes serán procesadas con el programa MetaMorph para la obtención del porcentaje de células  $\beta$  pancreáticas y la masa de éstas respecto al peso total del páncreas.

### 8.3. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR.

Para la realización del ensayo de proliferación celular se procesan los cortes histológicos de los animales previamente tratados con BrdU. En la cuantificación de este ensayo se aceptará como positivo las células doblemente

marcadas para insulina y BrdU. Para ello se realizan los pasos 1-5 del protocolo descrito en apartado 3.8.2. A continuación se describe el protocolo específico del ensayo:

- 1) Cubrir la superficie del tejido con HCl 2N durante 5 minutos.
- 2) Cubrir todo el tejido con Borato (0.1M; pH9.36) durante 10 minutos.
- 3) Lavar con PBS los portaobjetos durante 5 minutos; repetir este paso 2 veces.
- 4) Cubrir el tejido con tripsina (0.5mg/mL) durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- 5) Lavar con PBS los portaobjetos durante 5 minutos; repetir este paso 2 veces.
- 6) Bloquear la muestra con BSA al 3 % durante 1 hora a temperatura ambiente.
- 7) Incubar con los anticuerpos primarios *overnight* a 4°C. En nuestro caso son Anti-insulin rabbit Santa Cruz (1:100) en 3 % BSA (SC-9168) y anti-BrdU mouse Dako (1:100) en 3 %BSA (M0744).
- 8) Lavar con PBS los portaobjetos durante 5 minutos; repetir este paso 2 veces.
- 9) Incubar con los anticuerpos secundarios durante 1 hora a temperatura ambiente. En nuestro caso son Alex fluor Anti-mouse goat 543nm (1:500) en PBS y Alexa fluor Anti-mouse goat 488nm (1:500) en PBS (Invitrogen, Barcelona, España).
- 10) Lavar los portaobjetos con PBS.
- 11) Teñir los núcleos de la muestra con Hoechst 33342 (10 µg/mL) durante 15 minutos a temperatura ambiente (ref.H1399, Molecular Probes, Barcelona, España).
- 12) Lavar los portaobjetos con PBS.
- 13) Montar las láminas con ProLong Gold Antifade Reagent (P36930, Invitrogen, Barcelona, España) y guardar a -20°C hasta su cuantificación.



## 9. REGISTRO DE LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR.

### 9.1. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.

Después de su aislamiento, los islotes pancreáticos se dejaron recuperar en el incubador durante al menos una hora a 37° en medio de aislamiento y se cargan durante otra hora con la sonda sensible a  $\text{Ca}^{2+}$ , fura-2 AM (Molecular Probes, Leiden, Holanda) a una concentración de 5  $\mu\text{M}$ , partiendo de un stock de 2 mM disuelto en DMSO, siendo la concentración de DMSO final en el medio de aislamiento menor de 0.1 %. La sonda fura-2 es incubada a temperatura ambiente (para evitar su compartimentalización en organelas) y gaseada en una atmósfera de carbógeno en el mismo medio de aislamiento.

La sonda fura-2 se encuentra en la forma acetoximetilester (AM), este grupo AM permite a la sonda una mejor difusión a través de la membrana plasmática debido al carácter lipofílico que le confiere. Una vez en el citoplasma y mediante las esterasas citosólicas se separan el grupo AM de la sonda, evitando que el fura atraviese la membrana hacia el exterior (Figura 12). En el interior, el fura-2 en forma libre presenta cuatro grupos carboxilatos, los dos grupos amino y los dos grupos éster en este sitio de unión, que confieren a estos compuestos una selectividad de 10:1 en su unión con  $\text{Ca}^{2+}$  en relación con el  $\text{Mg}^{2+}$ . Esta selectividad es necesaria puesto que la concentración de  $\text{Mg}^{2+}$  libre citosólico (1 mM) es aproximadamente  $10^4$  veces mayor que la de  $\text{Ca}^{2+}$  (100 nM).

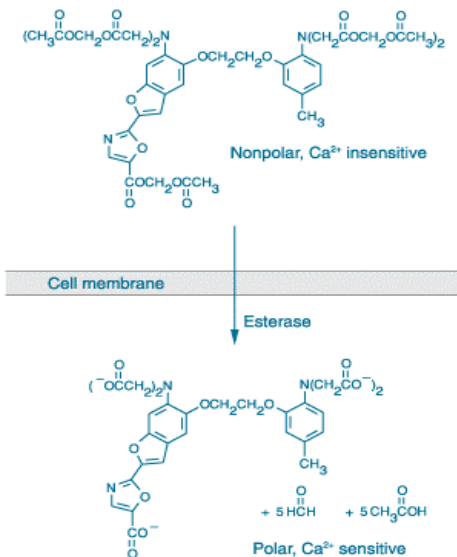


Figura 12. Estructura química del FURA-2 en su forma AM y en su forma libre en el interior del citoplasma. Imagen tomada de Invitrogen

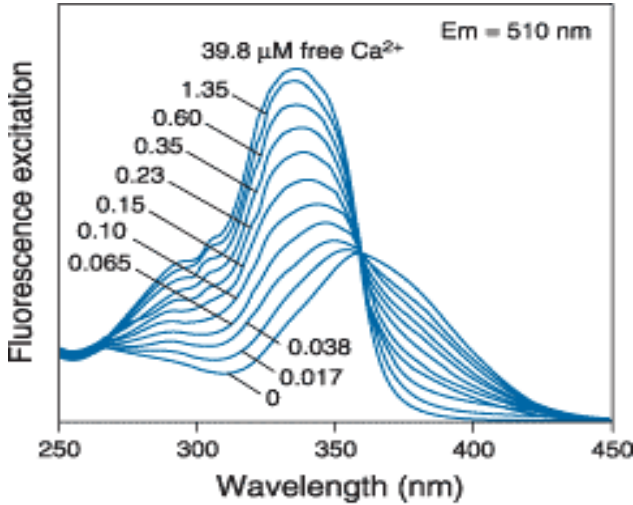


Figura 13. Espectro de excitación del fura-2 en función de la concentración de calcio libre. Imagen tomada de Invitrogen

El espectro de excitación del fura-2 cambia dependiendo de la  $[Ca^{2+}]_i$ . En una concentración citoplasmática baja de calcio presenta un máximo en el espectro de excitación en torno a 380 nm mientras que en condiciones de aumento en la  $[Ca^{2+}]_i$  el máximo se desplaza a 340 nm, teniendo en ambos casos una longitud de onda de emisión de 510 nm (Figura 13). En el primer caso hay una disminución de la fluorescencia a 340 nm y un aumento de la fluorescencia a 380 nm y en el segundo caso el aumento de la fluorescencia se produce a 340 nm y a 380 nm hay una disminución. La alteración del espectro de absorción dependiente de la concentración de  $Ca^{2+}$  en ambas longitudes de onda nos permite obtener un nuevo parámetro con el que podemos expresar de una manera más exacta los cambios en la concentración de  $Ca^{2+}$ , eliminando así pequeñas variaciones debidas a la sensibilidad de la sonda a otros iones como el  $Mg^{2+}$ , a movimientos del islote debidos a vibraciones de la perfusión, a pérdida de la sonda, etc (Figura 14).

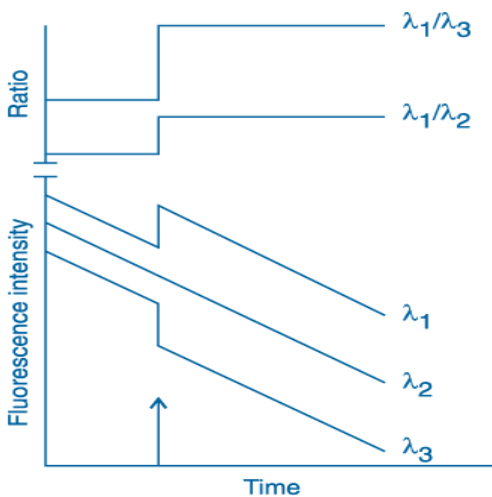


Figura 14. Empleo de medidas ratiométricas para la eliminación de artefactos como variaciones en la concentración del indicador, intensidad de iluminación, sensibilidad del sistema o movimientos de la muestra obteniendo una señal más clara y real. La flecha representada en la gráfica representa un aumento en la concentración de calcio. Imagen tomada de Invitrogen.

Para registrar los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  en islotes de Langerhans frescos se empleó un microscopio de epifluorescencia invertido (Zeiss, Axiovert 200) con un objetivo de 40x Zeiss Fluar con aceite de inmersión de apertura numérica (NA) 1.3. Como fuente iluminadora se emplea una lámpara de mercurio, esta atraviesa una rueda de filtros donde sólo pasa la luz con las longitudes de onda necesarias para excitar la muestra (340 y 380 nm) y un rango de filtros de densidad neutra. Esta luz encuentra en su paso un espejo dicroico que permite el paso de ciertas longitudes de onda y el resto se reflejarán, este es el responsable de la excitación de la muestra. La luz emitida por la sonda fluorescente es capaz de atravesar este espejo dicroico, pero se refleja en un segundo espejo que hará incidir la luz emitida sobre una cámara.

Las imágenes fueron recogidas cada 2 segundos empleando una cámara digital Hammamatsu C4742-95 (Hammamatsu Photonics, Barcelona) y una rueda de filtros (Sutter Instrument CO, CA, USA), equipada con filtros de 340 y 380 nm (340HT15 y 380HT15, set de filtros XF04, Omega optical, Madrid).

Los datos fueron obtenidos empleando el software Aquacosmos (Aquacosmos V2.51, Hammamatsu). Los cambios en la fluorescencia se expresan como la razón de la fluorescencia a 340nm y 380 nm ( $F_{340}/F_{380}$ ) con respecto al tiempo. Los resultados fueron representados mediante el programa de Sigma-Plot 9.0 (Sigmaplot, Jandel Scientific).

Una vez que los islotes se cargan con la sonda fluorescente fura-2, éstos se depositan en una cámara de perfusión en el microscopio sobre un cubre impregnado previamente con poli-L-lisina (0.01 %) y en contacto con el objetivo del microscopio. En esta cámara se forma un baño termostatzado a 37 °C con flujo continuo gracias a un sistema de perfusión generada con las diferentes soluciones controladas mediante un sistema de válvulas.

El análisis de los registros de  $[Ca^{2+}]_i$ , se realizó mediante el análisis del área bajo la curva (AUC, de sus siglas en inglés) en las distintas concentraciones de glucosa utilizadas para estimular a los islotes. El periodo de tiempo analizado son los 10 minutos posteriores a la aparición del transitorio de calcio en respuesta a la concentración de glucosa.

## 10. SOLUCIONES.

### MEDIO DE AISLAMIENTO Y LAVADO.

NaCl	115 mM
NaHCO <sub>3</sub>	10 mM
KCl	5 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,1 mM
HEPES	25 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 mM
CaCl <sub>2</sub>	2,5 mM

El pH ajustado a 7,35 suplementado con 5 mM glucosa y albúmina de suero bovino (BSA) fracción V (Sigma, Madrid) al 0.25 %. Para el medio de lavado retirar 100mL antes de añadir glucosa y albúmina.

### MEDIO DE PERFUSIÓN (MEDIO DE RINGER MODIFICADO).

NaCl	120 mM
NaHCO <sub>3</sub>	25 mM
KCl	5 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,1 mM
CaCl <sub>2</sub>	2,5 mM

Gaseado con carbógeno 95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub> para mantener el pH a 7,36

### MEDIO DE SECRECIÓN (MEDIO DE RINGER MODIFICADO).

NaCl	140 mM
KCl	4,5 mM
CaCl <sub>2</sub>	2,5 mM
MgCl <sub>2</sub>	1mM
HEPES	20 mM

Adicionada la correspondiente concentración de glucosa a probar y ajustado el pH final a 7.4

**REACTIVO DE BRADFORD.**

Azul Brillante de Coomassie G-250 (Bio-Rad)	0.01 % (P/V)
Etanol	4.75 % (V/V)
Ácido ortofosfórico	8.5 % (P/V)

Se disuelve primero el colorante en etanol y luego se añade el ácido ortofosfórico y el agua destilada y dejándose toda la noche en agitación, cuando el tinte está completamente disuelto, filtrar y conservar en oscuridad hasta su uso a 4°C.

**TAMPÓN DE LISIS.**

Etanol	75 % (V/V)
Agua destilada	24.6 % (V/V)
Ácido clorhídrico al 37 %	0.4 % (V/V)

**11. REACTIVOS.**

Los reactivos de laboratorio para la realización de los medios proceden de Scharlau Chemie (Barcelona, España) y de Mallinckrodt Baker (Deventer, Holanda).

La colagenasa (tipo V) aislada a partir de *Clostridium histolyticum* fue adquirida de Sigma (Madrid).

**12. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.**

Los resultados se han expresado como media  $\pm$  el error estándar de la media (EEM), junto con el número de observaciones (n). La significancia estadística ( $p < 0.05$ ) de los incrementos fue valorada por el test de la t de Student, para la comparación de los controles frente a una variable, o por análisis de varianza (ANOVA) de una o dos vías (indicado en el texto como *one way* or *two way*, del inglés), para la comparación entre distintas variables, mediante el programa SigmaStat.

# RESULTADOS

UNIVERSITAS

Óguel

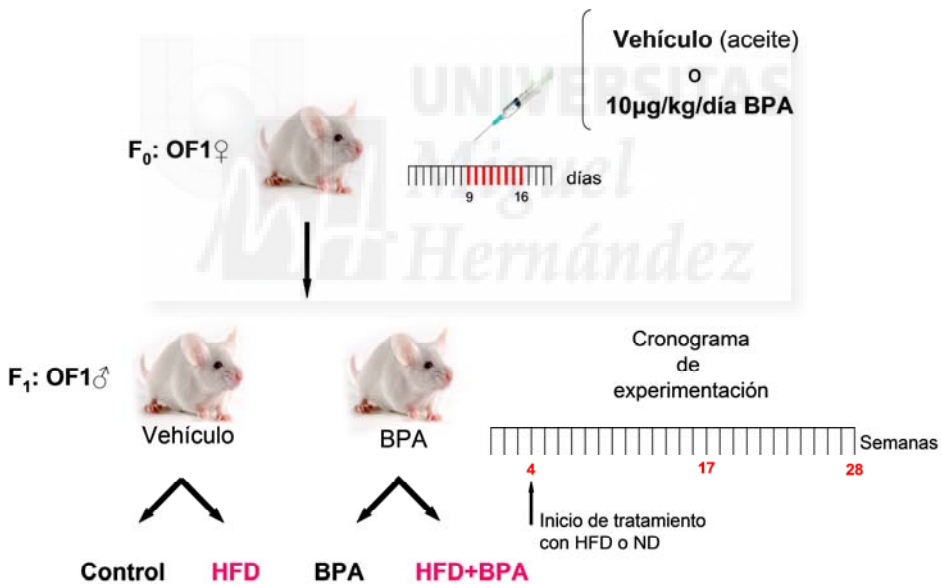
Hernández



## 1. EXPLICACIÓN DEL MODELO ANIMAL.

Los animales utilizados en la presente tesis son la primera generación filial de las ratonas gestantes a las que se les administró el BPA, desde los días noveno al decimosexto de gestación.

Nos referimos a animales BPA para hablar de las crías procedentes de las madres tratadas con 10  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  de BPA. Los animales controles son aquellos a los que a sus madres se les suministró vehículo (aceite). Estos dos grupos se dividieron dependiendo de la alimentación que se les suministró, dieta normal o rica en grasa (HFD, de su acrónimo en inglés High Fat Diet). De manera que, a partir de ahora llamaremos HFD a los animales procedentes de madres tratadas con vehículo y alimentados con dicha dieta, y HFD+BPA a los animales procedentes de madres tratadas con BPA y alimentados con dieta HFD (Figura 15).



**Figura 15. Esquema explicativo del modelo experimental.** F<sub>0</sub> representa a las ratonas gestantes a las que se les suministró del día 9 al 16 de gestación una dosis de 10  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  de BPA o el vehículo (aceite). F<sub>1</sub> es la primera generación filial de las madres tratadas, con lo que se realizaron los experimentos de la presente tesis. Los machos obtenidos tras el tratamiento de las gestantes, vehículo y BPA, se subdividieron a las cuatro semanas de vida dependiendo de la dieta que se les suministró dieta normal (ND) o dieta rica en grasa (HFD). Por lo tanto, a los animales procedentes de gestantes tratadas con vehículo y alimentados con dieta normal se les llama control y a los alimentados con dieta rica en grasa se les llama HFD. En el cronograma de experimentación se muestra en rojo las semanas a las que se realizaron los experimentos de la presente tesis.



## 2. CARACTERIZACIÓN DE LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA EN ANIMALES EXPUESTOS A BPA *IN UTERO* CON 17 SEMANAS DE VIDA Y TRATADOS DURANTE 13 SEMANAS CON DIETA RICA EN GRASA.

La exposición a BPA durante el desarrollo embrionario en los ratones modifica la tolerancia a la glucosa en los animales en edad adultas. El test de tolerancia a la glucosa (GTT) nos muestra que los animales BPA poseen una hiperglucemia basal tras seis horas de ayuno (figura 16A) comparando con los controles ( $9.0 \pm 0.7$  mmol/l y  $6.4 \pm 0.3$  mmol/l, respectivamente). Tras una carga intraperitoneal de 1.5 g de glucosa por Kg. de peso corporal observamos que el incremento de la glucemia en los animales a los 15 minutos después de la aplicación es mayor en los animales BPA que en los controles. Transcurridos 30 minutos observamos que las glucemias en plasma siguen siendo diferentes cuando comparamos los animales BPA con los animales control ( $11.0 \pm 0.5$  mmol/l y  $8.7 \pm 0.7$  mmol/l, respectivamente). Las medidas de glucemia tomadas a 60 y 120 minutos no muestran diferencias entre ambos grupos experimentales.

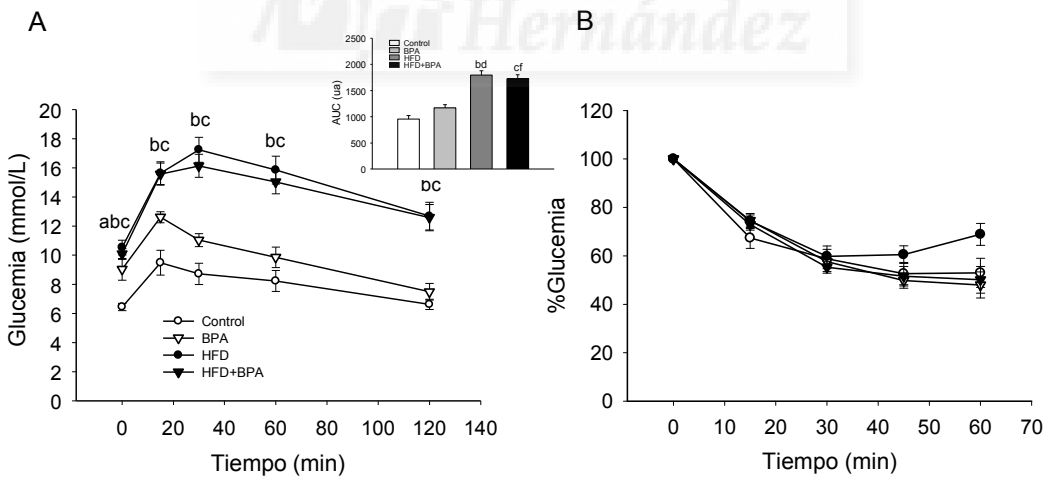
Cuando añadimos a la exposición de BPA una alimentación rica en grasa (HFD) durante trece semanas, observamos que los niveles de glucemia en respuesta a la carga de glucosa son similares en ambos grupos. No observamos diferencias en ninguno de los puntos de obtención de glucemia durante el test; las glucemias basales tras 6 horas de ayuno fueron de  $10.5 \pm 0.5$  mmol/l en los HFD y  $10.1 \pm 0.4$  mmol/l en los HFD+BPA, y las glucemias al finalizar el test fueron de  $12.7 \pm 1.0$  mmol/l en HFD y  $12.6 \pm 1.0$  mmol/l en HFD+BPA.

Al analizar en conjunto las curvas de glucosa descritas por los cuatro grupos de estudio, observamos una hiperglucemia basal en los animales BPA, HFD y HFD+BPA comparada con los controles. Cabe destacar la similitud de las glucemias de los animales BPA en comparación con las de los dos grupos de animales alimentados con HFD (BPA:  $9.0 \pm 0.7$  mmol/l; HFD:  $10.5 \pm 0.5$  mmol/l; HFD+BPA:  $10.1 \pm 0.4$  mmol/l). La dinámica de las curvas muestran que los animales HFD y HFD+BPA presentan una intolerancia a la glucosa comparado con los controles. Por otro lado, el grupo BPA muestra una tendencia de intolerancia a la glucosa respecto a los controles, mostrando un fenotipo intermedio entre los

efectos producidos en los animales por una alimentación con HFD y los animales controles alimentados con una dieta normal o estándar.

Al analizar el área bajo la curva observamos un aumento, no significativo, en los animales BPA del orden de un 18 % respecto al control ( $996 \pm 67$  ua control;  $1173 \pm 56$  ua BPA). La intolerancia a la glucosa en los animales HFD y HFD+BPA queda claramente reflejada en el estudio del área bajo la curva, ya que está representa un 73-80 % más en ambos grupos respecto al control (HFD:  $1795 \pm 83$  ua; HFD+BPA:  $1726 \pm 76$  ua).

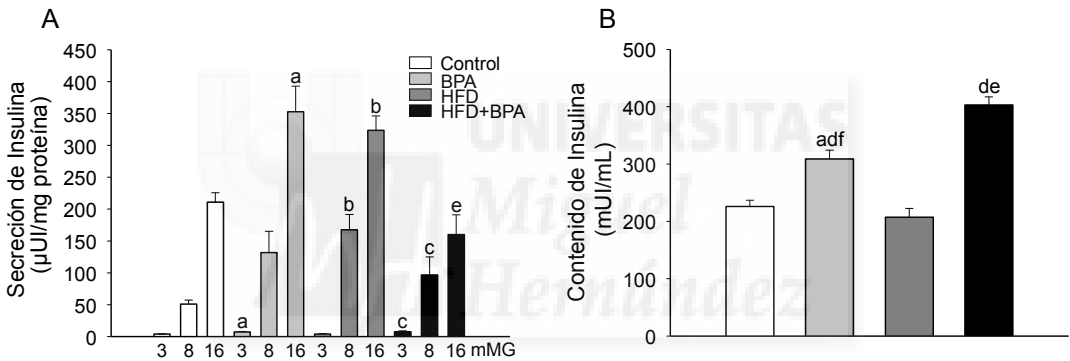
Para analizar la sensibilidad a la insulina realizamos un test de tolerancia a dicha hormona (ITT). Para ello aplicamos a los animales alimentados una carga de 0.75 UI de insulina por Kg de peso corporal y medimos las glucemias a diferentes tiempos después de la aplicación (Figura 16B). No observamos ninguna diferencia en los niveles de glucosa en repuesta a la carga de insulina entre los diferentes grupos experimentales. Concluimos por tanto, que no hay cambios en la sensibilidad periférica a la insulina. Por otro lado, observamos un aumento de la glucemia de los animales HFD a los sesenta minutos tras la aplicación de insulina, posiblemente debido a un aumento de la síntesis *de novo* del hígado.



**Figura 16. Homeostasis de la glucosa plasmática en animales expuestos durante el desarrollo embrionario a BPA y posteriormente alimentados durante 13 semanas con HFD.** A) IPGTT de los animales controles, círculo vacío, de los animales BPA, triángulo vacío, de los animales HFD, círculo lleno, y de los animales HFD+BPA, triángulo lleno. Los dos primeros grupos fueron alimentados con una dieta normal (ND). La gráfica insertada representa el área bajo la curva de las GTTs, en blanco se representa el área de los animales controles, en gris el de los animales BPA, en gris oscuro los

animales HFD y en negro los animales HFD+BPA. B) IPITT de los animales controles, BPA, HFD y HFD+BPA. Los datos están expresados como la media  $\pm$  EEM ( $n \geq 5$  animales por grupo), analizado con ANOVA one way. a;b;c;d;e;f p-valor  $< 0.05$  a, comparación control vs BPA; b, control vs HFD; c, control vs HFD+BPA; d, HFD vs BPA; e, HFD vs HFD+BPA; f, BPA vs HFD+BPA. En la gráfica insertada: b;c p-valor  $< 0.001$  vs control; d;f p-valor  $< 0.001$  vs BPA.

El análisis *ex vivo* del funcionamiento de los islotes de Langerhans en nuestros animales de estudio nos ofrece una aproximación más para poder abordar el estudio de la homeostasis de la glucosa en este modelo. Para ello se realizó una secreción de insulina en respuesta a concentraciones crecientes de glucosa (Figura 17A). El experimento nos muestra como la liberación de insulina es mayor por parte del islote a concentraciones crecientes de glucosa y cómo esta respuesta se ve aumentada casi al doble cuando comparamos los islotes procedentes de animales BPA respecto a los islotes de los animales controles.



**Figura 17. Secreción y contenido de insulina de los islotes de Langerhans tras 13 semanas de dieta rica en grasa.** A) Secreción de insulina en respuesta a diferentes estímulos de glucosa en animales controles, BPA, HFD y HFD+BPA ( $n \geq 9$  réplicas estímulo/grupo). Los datos han sido analizados con ANOVA one way, seguido por el método de Dunnett's, a, b, c y e p-valor  $< 0.05$ . B) Contenido de insulina de los islotes de Langerhans de los animales controles, BPA, HFD y HFD+BPA ( $n \geq 10$  por grupo). Los datos han sido comparados mediante ANOVA one way seguido del post-test de Tukey, a, d, e y f p-valor  $< 0.001$ . En blanco se representa a los animales controles, en gris a los animales BPA, en gris oscuro a los animales HFD y en negro a los animales HFD+BPA. Todos los datos son expresados como la media  $\pm$  EEM. a, comparación control vs BPA; b, control vs HFD; c, control vs HFD+BPA; d, HFD vs BPA; e, HFD vs HFD+BPA; f, BPA vs HFD+BPA.

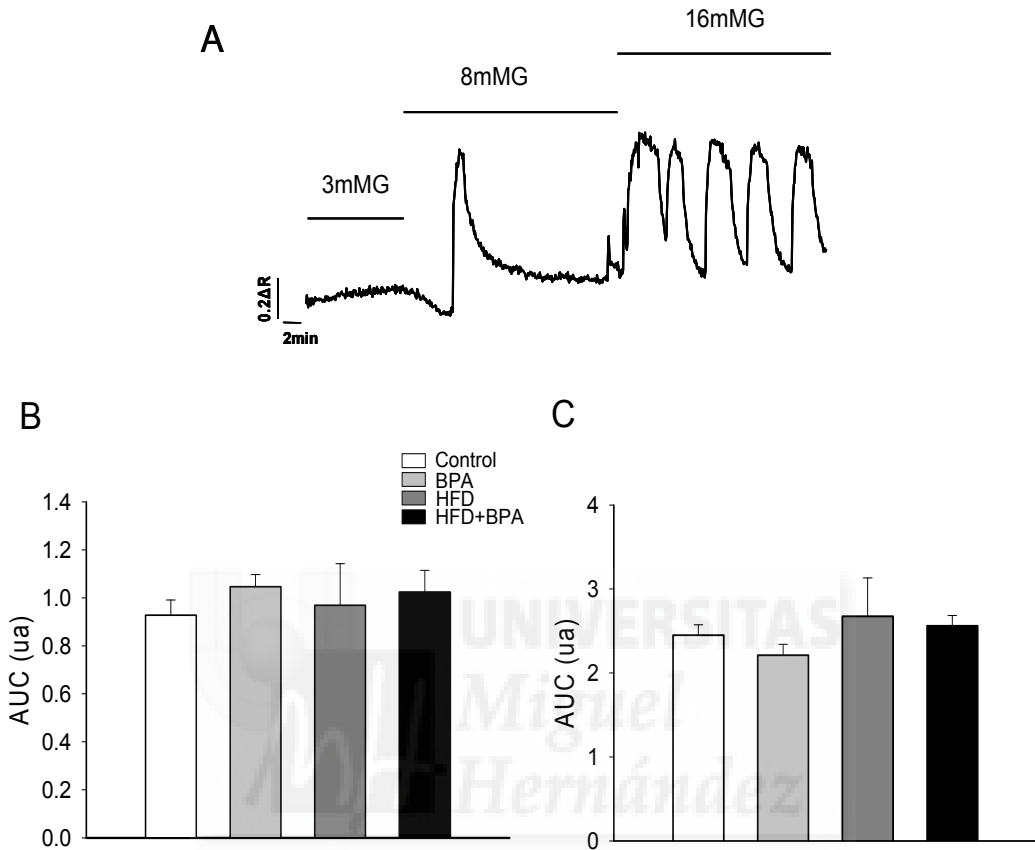
Observamos que el tratamiento con una dieta rica en grasa produce en los animales HFD un aumento de la secreción de insulina en respuesta a glucosa comparado con los controles. Este efecto es más agudo cuando los islotes están en presencia de una concentración de glucosa intermedia como es 8mM. Por otro lado, los animales HFD+BPA siguen manteniendo un aumento de la secreción a

estímulos bajos e intermedios de glucosa (3 y 8 mM respectivamente) comparado con el control, pero se observa una clara disminución del efecto de la glucosa cuando se compara HFD+BPA y HFD a estímulos intermedios o altos (8 y 16 mM, respectivamente). Cabe destacar que la exposición a BPA durante el desarrollo embrionario produce un efecto en la secreción de insulina similar al producido por el tratamiento con la dieta rica en grasa. Parece por tanto, que al menos en lo que se refiere a la liberación de insulina, el BPA mimetiza el efecto de la dieta HFD (a 8 mM glucosa: BPA:  $131.7 \pm 33.3 \mu\text{UI}$ ; HFD:  $167.4 \pm 24.1 \mu\text{UI}$  y a 16 mM glucosa: BPA:  $352.6 \pm 40.5 \mu\text{UI}$ ; HFD:  $323.5 \pm 22.5 \mu\text{UI}$ ).

El análisis del contenido de insulina en los islotes de Langerhans (Figura 17B) muestra un aumento significativo, en los animales expuesto a BPA, tanto en los animales alimentados con ND como en los HFD. Se observa aproximadamente un aumento del 40% en los islotes de los animales BPA respecto a los controles ( $402.6 \pm 14.3 \text{ mUI/ml}$  y  $207.1 \pm 15.4 \text{ mUI/ml}$ , respectivamente). Además, comprobamos que la adición del efecto de la HFD sobre el efecto de la exposición a BPA, provoca un aumento del contenido de insulina en los animales HFD+BPA ( $402.6 \pm 14.3 \text{ mUI/ml}$ ) respecto a los animales BPA ( $308.6 \pm 15.7 \text{ mUI/ml}$ ).

En la Figura 18 se representa el patrón de calcio descrito por los islotes cuando son estimulados a concentraciones crecientes de glucosa. Cuando se estimula un islote a concentraciones de 3 mM glucosa no se observa ningún aumento de los niveles de calcio intracelular. Al aumentar a concentraciones intermedias, como 8 mM glucosa, se genera un transitorio de calcio que posteriormente puede ir o no acompañado por más oscilaciones de calcio. La estimulación a altas concentraciones de glucosa produce un patrón similar en la entrada de calcio del islote, donde encontramos otro transitorio de calcio que va seguido por oscilaciones que normalmente aumentan su duración en el tiempo respecto a las oscilaciones que encontradas en concentraciones intermedias de glucosa (Figura 18A). El análisis del área bajo la curva a las diferentes concentraciones de glucosa durante diez minutos (Figura 18B y C) después de la aparición de los transitorios, no nos muestra que haya ningún cambio en la concentración de calcio en los animales control comparado con los expuestos a BPA, con los alimentados con HFD, o la combinación de ambos, HFD+BPA, a 8 mM glucosa. Esta ausencia de cambios en el área bajo la curva se sigue manteniendo

en todos los grupos de estudio cuando son estimulados con altas glucosas (16 mM glucosa) y por lo tanto concluimos que no se producen cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$ .



**Figura 18. Concentración de calcio intracelular en respuesta a concentraciones crecientes de glucosa.** A) Registro representativo de la concentración de calcio intracelular del islote de Langerhans en respuesta a estímulos crecientes de glucosa (3, 8 y 16 mM). B) Área bajo la curva 10 minutos post-transitorio a 8 mM glucosa. C) Área bajo la curva 10 minutos post-transitorio a 16 mM glucosa. En blanco se representa a los animales controles, en gris los animales BPA, en gris oscuro los animales HFD y en negro a los animales HFD+BPA. Los datos son expresados como la media  $\pm$  EEM (n = 4-8 islotes por grupo). Los datos han sido analizados con ANOVA one way.

Para completar el estudio de la homeostasis de la glucosa realizamos mediciones de los niveles de hormonales y de metabolitos circulantes en plasma. Dichos valores se muestran en la Tabla 4. No observamos cambios estadísticamente significativos en los niveles de insulina, ni de triglicéridos circulantes en estado de saciedad en ninguno de los grupos de estudio. Comienza a hacerse visible una tendencia a la hiperinsulinemia tanto en los animales BPA como en HFD y HFD+BPA respecto a los animales control. Observamos por tanto,

que al igual que ocurría en los experimentos de secreción de insulina in vitro, el BPA mimetiza el efecto de la dieta HFD. También apreciamos un aumento significativo de los niveles de glicerol en los animales HFD respecto a los controles. Asimismo encontramos una clara hiperglucemia en ayunas en todos los grupos de estudio comparados con los controles.

	Control	BPA	HFD	HFD+BPA
<b>Glucosa ayuno (mg/dl)</b>	121 ± 6	163 ± 13 a	190 ± 9 a	182 ± 7 a
<b>Glucosa (mg/dl)</b>	187 ± 8	209 ± 13	210 ± 14	218 ± 6
<b>Insulina (ng/ml)</b>	2.3 ± 0.3	3.7 ± 0.8	3.5 ± 0.6	3.2 ± 0.5
<b>Triglicéridos (mg/dl)</b>	0.98 ± 0.1	1.19 ± 0.3	1.12 ± 0.1	0.98 ± 0.1
<b>Glicerol (mg/dl)</b>	0.20 ± 0.04	0.23 ± 0.03	0.35 ± 0.04 a	0.28 ± 0.05

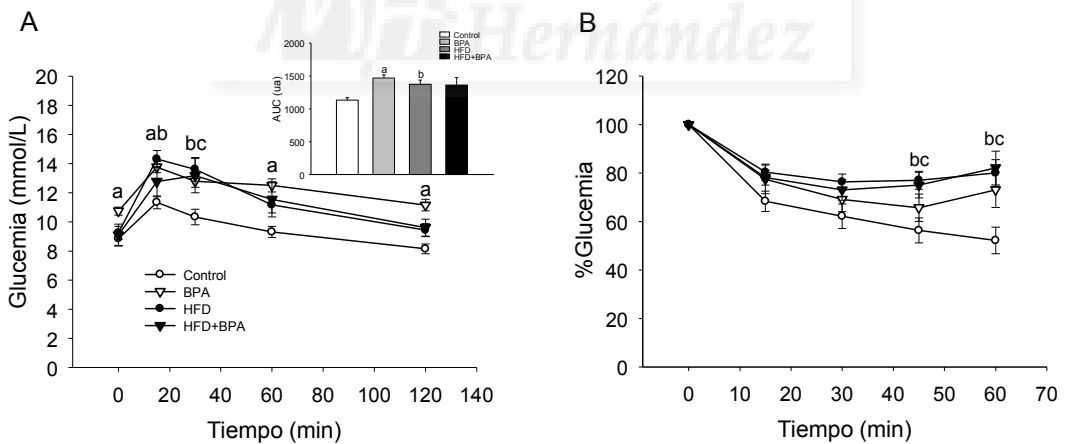
**Tabla 4. Valores plasmáticos de hormonas y metabolitos en animales de diecisiete semanas y alimentados con HFD durante trece.** Todos los valores son tomados en estado de saciedad. Cuando se indica ayuno es de seis horas. Los datos son expresados como la media ± EEM (n > 5 animales por grupo). Los datos han sido analizados con ANOVA one way, a p-valor < 0.05 comparado con el control.

### 3. CARACTERIZACIÓN DE LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA EN ANIMALES EXPUESTOS A BPA *IN UTERO* CON 28 SEMANAS DE VIDA Y TRATADOS DURANTE 24 SEMANAS CON DIETA RICA EN GRASA.

La evolución de los animales y las consecuencias que esta exposición temprana al BPA pueden tener en la homeostasis de la glucosa nos llevó a estudiar los parámetros implicados en este fenómeno tanto en los animales alimentados con ND como en los que estuvieron alimentados con HFD, durante 24 semanas, y a la edad de 28 semanas.

El estudio de la tolerancia a la glucosa en los animales (Figura 19A) nos muestra una evidente intolerancia a la glucosa por parte de los animales BPA. Estos animales presentan una clara hiperglucemia en ayuno de seis horas, comparado con los animales controles (10.7 ± 0.3 mmol/l y 8.9 ± 0.5 mmol/l, respectivamente). Curiosamente observamos que, transcurridas dos horas de la carga de glucosa, los niveles de glucemia en los animales BPA no retornan a niveles basales, lo cual constituye un claro síntoma de intolerancia a la glucosa (T<sub>120</sub> control: 8.2 ± 0.3 mmol/l; T<sub>120</sub> BPA: 11.2 ± 0.4 mmol/l). Por otro lado, el estudio de la GTT en los animales alimentados con HFD no muestra que haya

diferencias en la tolerancia a la glucosa en los animales HFD respecto a los HFD+BPA, ya que ambos parten de glucemias basales similares tras seis horas de ayuno y finalizan el experimento con valores de glucemias también similares (HFD:  $T_0$ :  $9.3 \pm 0.3$  mmol/l;  $T_{120}$ :  $9.4 \pm 0.4$  mmol/l; HFD+BPA:  $T_0$ :  $9.1 \pm 0.8$  mmol/l;  $T_{120}$ :  $9.6 \pm 0.6$  mmol/l). Al comparar la dinámica de las tres curvas de glucosa en los grupos estudiados respecto al control observamos que el único grupo que presenta hiperglucemia en ayunas es el grupo BPA. Quince minutos después de la recibir la carga de glucosa, observamos que los grupos BPA y HFD alcanzan unas glucemias similares, siendo ambos grupos estadísticamente diferentes respecto al control ( $13.8 \pm 0.4$  mol/l;  $14.3 \pm 0.6$  mmol/l;  $11.3 \pm 0.4$  mmol/l respectivamente). En el  $T_{30}$ , las glucemias de los animales HFD y HFD+BPA se siguen manteniendo significativamente elevadas comparadas con las obtenidas por los animales control ( $13.6 \pm 0.8$  mmol/l;  $13.2 \pm 1.2$  mmol/l,  $10.3 \pm 0.5$  mmol/l respectivamente). En el periodo final de la GTT ( $T_{60}$  y  $T_{120}$ ) se aprecia cómo sólo los animales BPA mantienen las glucemias elevadas mostrando diferencias estadísticas respecto a las de los animales controles; este hecho contrasta con la evolución de los animales alimentados con HFD, que muestran un fenotipo intermedio entre los animales control y los BPA.



**Figura 19. Homeostasis de la glucosa plasmática en animales expuestos durante el desarrollo embrionario a BPA y posteriormente alimentados durante 24 semanas con HFD. A) IPGTT de animales controles, círculo vacío, animales BPA, triángulo vacío, de animales HFD, círculo lleno, y animales HFD+BPA, triángulo lleno. Los dos primeros grupos fueron alimentados con una dieta normal (ND). La gráfica insertada representa el área bajo la curva de las IPGTTs, en blanco se representa el área de los animales controles, en gris los animales BPA, en gris oscuro los animales HFD y en negro los animales HFD+BPA; a y b p-valor<0.05 comparado con el control. B) IPITT de los animales**

controles, BPA, HFD y HFD+BPA. Los datos están expresados como la media  $\pm$  EEM ( $n \geq 12$  animales por grupo). a, b, c, p-valor  $< 0.05$ ; a, comparación control vs BPA; b, control vs HFD; c, control vs HFD+BPA (ANOVA one way).

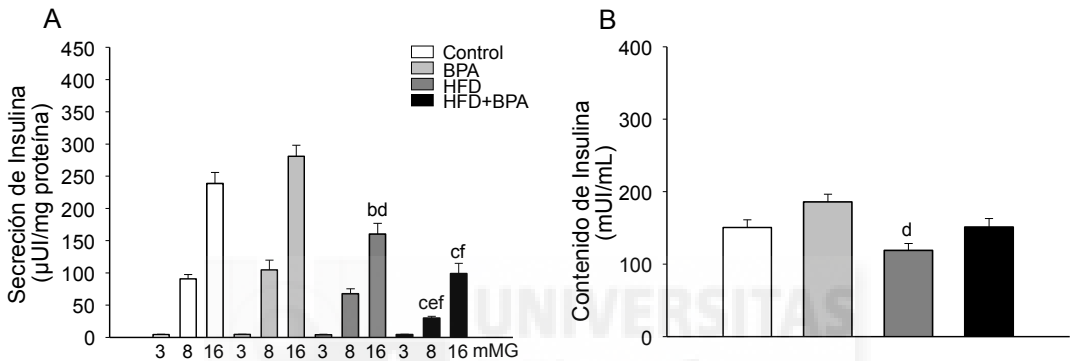
El análisis del área bajo la curva nos muestra un aumento del área en todos los grupos de estudio comparado con los controles, pero sólo encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los animales BPA y HFD ( $1473 \pm 44$  ua y  $1376 \pm 63$  ua respectivamente) respecto a los animales control ( $1133 \pm 39$  ua), indicándonos que estos dos grupos de estudio presentan una intolerancia a la glucosa.

El estudio de la sensibilidad a la insulina en los tejidos periféricos, nos muestra una incipiente resistencia a la insulina (Figura 19B) en los animales BPA, HFD y HFD+BPA respecto a los animales controles. Cabe destacar que los porcentajes de reducción de la glucosa en plasma por la acción de la insulina, son muy similares en los animales BPA (78.6 %) respecto a los dos grupos alimentados con HFD, tanto en HFD (77.6 %), como HFD+BPA (80.4 %) tras los quince minutos postaplicación de la carga de insulina. En la etapa final de la ITT ( $T_{45}$  y  $T_{60}$ ) observamos como los niveles de glucemia en los animales alimentados con HFD están significativamente elevados ( $T_{45}$ : HFD:  $77 \pm 4$  %; HFD+BPA:  $75 \pm 5$  %.  $T_{60}$ : HFD:  $80 \pm 6$  %; HFD+BPA:  $82 \pm 7$  %) comparados con los controles ( $T_{45}$ :  $56 \pm 5$  %;  $T_{60}$ :  $52 \pm 5$  %). Transcurrida una hora tras la inyección de insulina, observamos que ésta es capaz de disminuir la concentración de glucosa sanguínea entorno a un 47 % en los animales controles, y que en los animales BPA sólo llega a disminuirla un 26 % y en los HFD y HFD+BPA un 18 %.

El estudio *ex vivo* de los islotes de Langerhans de estos animales, nos muestra que la secreción de insulina en respuesta a concentraciones crecientes de glucosa (Figura 20A) no presenta diferencias entre los animales control y BPA. Tras las veintiocho semanas de alimentación con HFD, los islotes de los animales HFD pierden la hipersecreción de insulina que padecían a las trece semanas de alimentación con HFD, y además reducen la liberación de insulina en respuesta a 16 mM glucosa comparado con los animales controles (HFD:  $160.3 \pm 16.8$   $\mu$ UI/mg proteína; control:  $238,3 \pm 17,5$   $\mu$ UI/mg proteína; BPA:  $280.8 \pm 17.2$   $\mu$ UI/mg proteína). En los islotes de los animales HFD+BPA también se produce una disminución de la secreción de insulina por parte de estos en respuesta a



concentraciones intermedias y altas de glucosa (8 mM y 16 mM glucosa, respectivamente). Estas diferencias en la secreción de insulina son significativas cuando comparamos tanto con la secreción de los islotes procedentes de los animales HFD (8mM glucosa: HFD+BPA:  $29.7 \pm 2.8$   $\mu$ UI/mg proteína; HFD:  $67.5 \pm 7.9$   $\mu$ UI/mg proteína; 16 mM glucosa: HFD+BPA:  $98.6 \pm 16.0$   $\mu$ UI/mg proteína; HFD:  $160.3 \pm 16.8$   $\mu$ UI/mg proteína) como con la secreción de los islotes procedentes de los animales BPA (8mM glucosa:  $104.7 \pm 14.9$   $\mu$ UI/mg proteína; 16 mM glucosa:  $280.8 \pm 17.2$   $\mu$ UI/mg proteína).

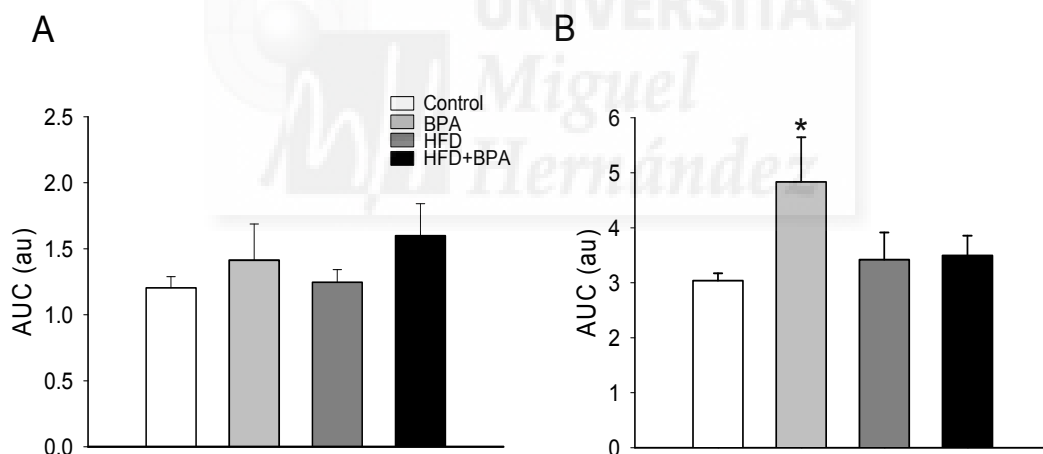


**Figura 20. Secreción y contenido de insulina de los islotes de Langerhans tras 24 semanas de dieta rica en grasa.** A) Secreción de insulina en respuesta a diferentes estímulos de glucosa en animales controles, BPA, HFD y HFD+BPA ( $n \geq 6$  réplicas por estímulo/grupo). B) Contenido de insulina de los islotes de Langerhans de los animales controles, BPA, HFD y HFD+BPA ( $n \geq 8$  por grupo). En blanco se representa a los animales controles, en gris los animales BPA, en gris oscuro los animales HFD y en negro a los animales HFD+BPA. Los datos son expresados como la media  $\pm$  EEM. Los datos han sido analizados con ANOVA one way, a, b, c, d, e, f p-valor  $< 0.05$ . a, comparación control vs BPA; b, control vs HFD; c, control vs HFD+BPA; d, HFD vs BPA; e, HFD vs HFD+BPA; f, BPA vs HFD+BPA.

El análisis del contenido de insulina de los islotes de estos animales (Figura 20B), nos muestra que tras veintiocho semanas de vida se produce una disminución del contenido de insulina respecto a los ratones de diecisiete semanas de vida. En los animales BPA se siguen manteniendo un ligero aumento, no significativo, del 23 % en el contenido de insulina de los islotes comparado con el contenido de los animales controles (BPA:  $185.9 \pm 10.6$  mUI/ml; control:  $150.5 \pm 10.5$  mUI/ml;). Existe una clara disminución del contenido de insulina en los islotes procedentes de los HFD ( $118.9 \pm 9.5$  mUI/ml) comparado con los BPA, y cabe destacar, que el contenido de los islotes de los animales HFD+BPA es muy similar al obtenido en los controles ( $151.2 \pm 9.5$  mUI/ml y  $150.5 \pm 10.5$  mUI/ml,

respectivamente). Al igual que acontece con el contenido de insulina de los islotes de los animales alimentados con ND, el contenido de los islotes procedentes de los animales alimentados con HFD muestra un aumento de un 27 % en los islotes de los HFD+BPA respecto a los HFD.

El estudio del área bajo la curva (Figura 21A) de los patrones descritos por la concentración de calcio intracelular nos muestra que, los islotes de los animales expuestos a BPA (tanto BPA como HFD+BPA) tienen una tendencia a aumentar la entrada de calcio a la concentración estimuladora de 8mM glucosa. El estudio a altas concentraciones de glucosa muestra que existe un aumento significativo de la concentración de calcio intracelular en los animales BPA respecto a los controles (Figura 21B), de aproximadamente de un 60 % ( $5 \pm 0.8$  ua y  $3 \pm 0.1$  ua, respectivamente), hecho que no ocurre en los animales alimentados con HFD, donde el área bajo la curva no muestra diferencias entre los HFD y HFD+BPA ( $3 \pm 0.5$  ua y  $3.5 \pm 0.5$  ua, respectivamente); tampoco se aprecian diferencias en estos dos grupos respecto a los controles.



**Figura 21. Concentración de calcio intracelular en respuesta a concentraciones crecientes de glucosa tras 24 semanas con HFD.** A) Área bajo la curva durante 10 minutos post-transitorio a 8mM glucosa. B) Área bajo la curva 10 minutos post-transitorio a 16 mM glucosa. En blanco se representa a los animales control, en gris los animales BPA, en gris oscuro los animales HFD y en negro a los animales HFD+BPA. Los datos son expresados como la media  $\pm$  EEM (n = 7-14 islotes por grupo). Los datos han sido analizados con ANOVA one way, \*p-valor < 0.05 comparado con el control.

Para concluir el estudio de la homeostasis de la glucosa estudiamos los niveles de hormonas y metabolitos circulantes en plasma. Dichos valores se

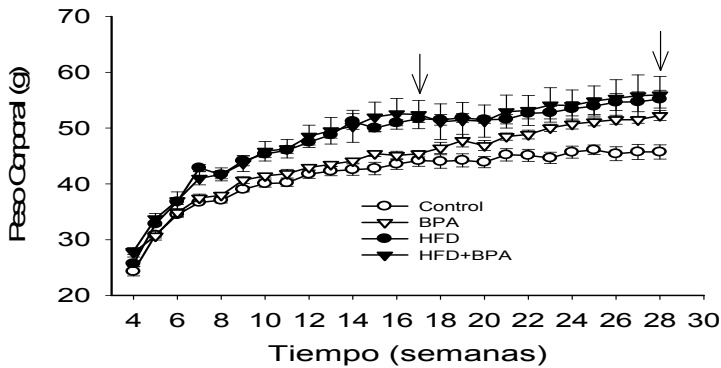
muestran en la Tabla 5. Observamos como todos los parámetros analizados a excepción de los niveles de triglicéridos y de glicerol, se encuentran aumentados en los animales BPA respecto al control, siendo significativa esta diferencia en la glucemia en ayuno. En los grupo HFD+BPA y HFD, no encontramos diferencias entre ellos, manteniendo valores muy similares en los parámetros estudiados. Llama la atención cómo a pesar de la alimentación con HFD, los animales HFD y HFD+BPA consiguen mantener sus parámetros metabólicos y hormonales en niveles muy similares a los que encontramos en los animales control.

	Control	BPA	HFD	HFD+BPA
Glucosa ayuno (mg/dl)	162 ± 7	193 ± 5 a	167 ± 8	155 ± 12 c
Glucosa (mg/dl)	187 ± 4	209 ± 7	180 ± 7 b	182 ± 12
Insulina (ng/ml)	2.6 ± 0.4	3.9 ± 1.3	2.5 ± 0.8	2.1 ± 0.7
Triglicéridos (mg/dl)	1.5 ± 0.02	1.93 ± 0.2	1.3 ± 0.2	1.01 ± 0.1
Glicerol (mg/dl)	0.36 ± 0.04	0.39 ± 0.03	0.38 ± 0.03	0.36 ± 0.05

**Tabla 5. Valores plasmáticos de hormonas y metabolitos en animales de veintiocho semanas y alimentados con HFD durante veinticuatro semanas.** Todos los valores son tomados en estado de saciedad. Cuando se indica ayuno es de seis horas. Los datos son expresados como la media ± EEM (n>5 animales por grupo). Los datos han sido analizados con ANOVA one way, a, b, c y d p-valor < 0.05. a comparación respecto al control; b comparación del grupo HFD vs BPA; c comparación de HFD+BPA respecto a BPA; d BPA comparado con todas las condiciones.

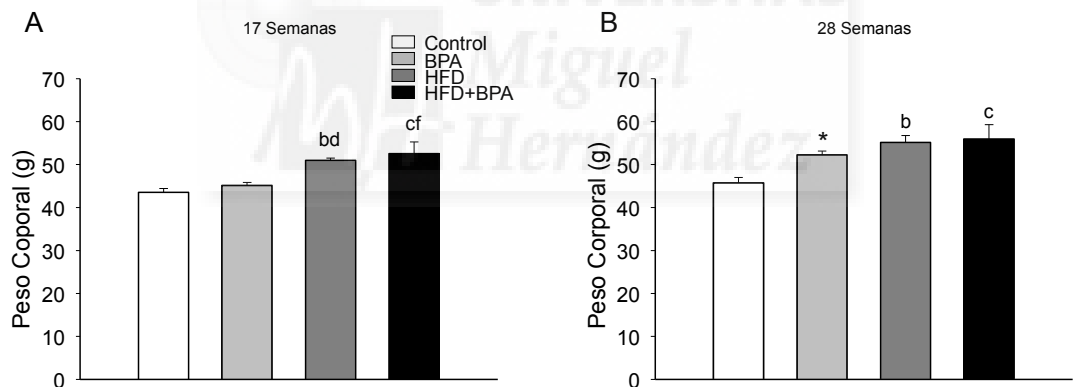
#### 4. EVOLUCIÓN DEL PESO CORPORAL DE LOS ANIMALES DE ESTUDIO DURANTE LAS 28 SEMANAS DE VIDA.

El estudio de los pesos semanales de los individuos (Figura 22) nos muestra que, tras un mes de vida, los animales comienzan el tratamiento con HFD con un peso similar que se encuentra en el rango de 25 a 28 g.



**Figura 22. Evolución de los pesos corporales de los animales desde el inicio del tratamiento con HFD hasta el final del estudio.** Datos expresados como la media  $\pm$  EEM (n= 5-9 jaulas por condición con 3-7 animales por jaula). Las flechas representan los pesos de los animales cuando se realizaron los experimentos

Los pesos de los individuos son similares hasta la semana octava de vida, donde los animales alimentados con HFD empiezan a incrementar su peso y a diferenciarse de los animales alimentados con ND. A las 17-18 semanas de vida, los animales BPA empiezan a incrementar su peso diferenciándose de los animales controles, siendo su fenotipo más parecido al de un animal alimentado con HFD (control:  $45.7 \pm 1.3$  g; BPA:  $52.3 \pm 0.9$  g; HFD:  $55.2 \pm 1.6$  g; HFD+BPA:  $55.9 \pm 3.3$  g).



**Figura 23. Pesos corporales de los animales a diecisiete y veintiocho semanas de vida.** A) Peso corporal de los animales a las dieciocho semanas de vida. Los datos han sido analizados con ANOVA one way, b, c, d, f p-valor < 0,001 B) Peso corporal de los animales a las veintiocho semanas de vida. Los datos han sido analizados con ANOVA one way, b y c p-valor < 0,05; \* p-valor < 0,01 mediante t-Student comparando control vs BPA.. En blanco se representa a los animales control, en gris los animales BPA, en gris oscuro los animales HFD y en negro a los animales HFD+BPA. Los datos son expresados como la media  $\pm$  EEM (n = 5-9 jaulas por condición con 3-7 animales por jaula). b, comparado control vs HFD; c, control vs HFD+BPA; d, HFD vs BPA; f, BPA vs HFD+BPA.

El estudio de los pesos en los días en los que se realizaron los experimentos (Figura 23) muestran que los grupos alimentados con HFD, tanto

HFD ( $60.0 \pm 0.5$  g) como HFD+BPA ( $52.6 \pm 2.8$  g), presentan diferencias significativas en el peso corporal a diecisiete semanas de vida comparado con los grupos alimentados con ND, control ( $43.6 \pm 0.9$  g) y BPA ( $45.1 \pm 0.7$  g) (Figura 23A). A las veintiocho semanas de vida (Figura 23B) observamos que las diferencias de peso se siguen manteniendo entre los grupos HFD (HFD:  $55.2 \pm 1.6$  g; HFD+BPA:  $55.9 \pm 3.3$  g) y el control ( $45.7 \pm 1.3$  g), pero no se mantienen con el grupo BPA ( $52.25 \pm 0.83$ g). Sí comparamos el grupo BPA con el control, utilizando t-Student, se produce un aumento significativo del peso de los animales BPA.

## 5. ESTUDIO GENÉTICO DE GENES IMPLICADOS EN EL METABOLISMO DE LA GLUCOSA Y DE LÍPIDOS EN LOS TEJIDOS PERIFÉRICOS.

### 5.1. Estudio genético a las diecisiete semanas de vida.

La homeostasis de la glucosa es un proceso complejo en el que no sólo está implicada la acción de la insulina en los tejidos periféricos, sino que también interviene el metabolismo lipídico, de glúcidos, los metabolitos que son liberados de estas reacciones y los valores hormonales circulantes de otras hormonas entre otros. Por ello, se estudiaron genes clave en el metabolismo de lípidos implicados tanto en la lipogénesis, como *Peroxisome proliferator activated receptor*  $\gamma$  (*Ppar $\gamma$* ), *Sterol regulatory element binding transcription factor1* (*Srebp1c*), *Fatty acid synthase* (*Fas*), *Acetyl-CoA-carboxilase  $\alpha$*  (*Acaca* o también llamada *Acc*); en la oxidación de ácidos grasos, como *Peroxisome proliferator activated receptor  $\alpha$*  (*Ppar $\alpha$* ), *Carnitine palmitoyltransferase1* (*Cpt1*), *Acyl-CoA-oxidase1* (*Acox1*), *Uncoupling protein2* (*Ucp2*), *Uncoupling protein3* (*Ucp3*), *Acetyl-CoA-carboxilase  $\beta$*  (*Acac $\beta$* ) y en la captación de los ácidos grasos por la célula desde el torrente sanguíneo como *Cd36*, también llamado *Fat*. Los genes clave estudiados en el metabolismo de glúcidos son aquellos que están implicados en la captación de la glucosa y en su posterior metabolismo intracelular, como *Solute carrier family 2 member4* (*Slc2a4*, cuya expresión da lugar a la proteína conocida como *Glut4*), *Hexokinase* (*Hk*) ó *Glucokinase* (*Gck*), *Phosphoenolpyruvate carboxikinase* (*Pck*). También fue estudiado el gen *Protein kinase AMP-activated alpha1* (*Prkaa1*), cuya expresión y traducción da lugar a la proteína *Ampk* implicada en toda regulación metabólica (Figura 24).

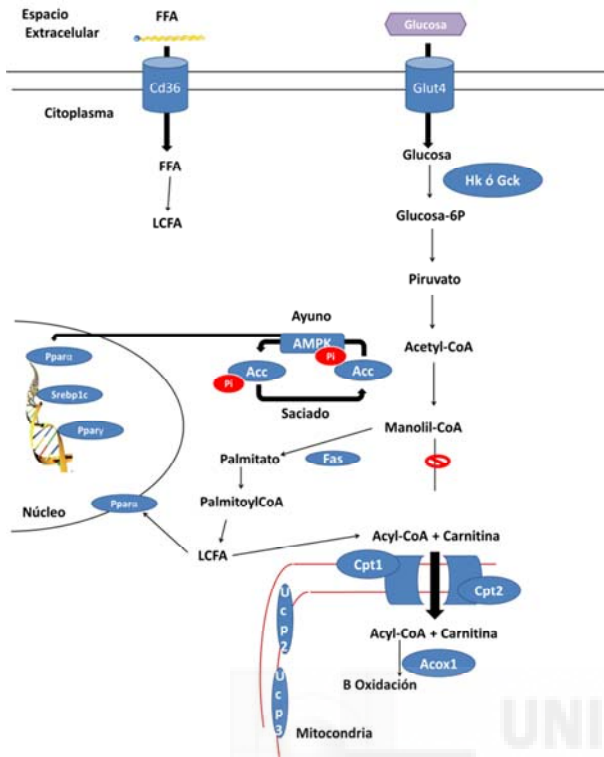


Figura 24. Esquema explicativo de los genes implicados en el metabolismo de lípidos y glucosa.

La Figura 25 muestra una imagen representativa de la calidad del ARN con la que se han realizado los estudios de expresión génica. Para ello se realizó una electroforesis del material en un gel de agarosa al 1 %.

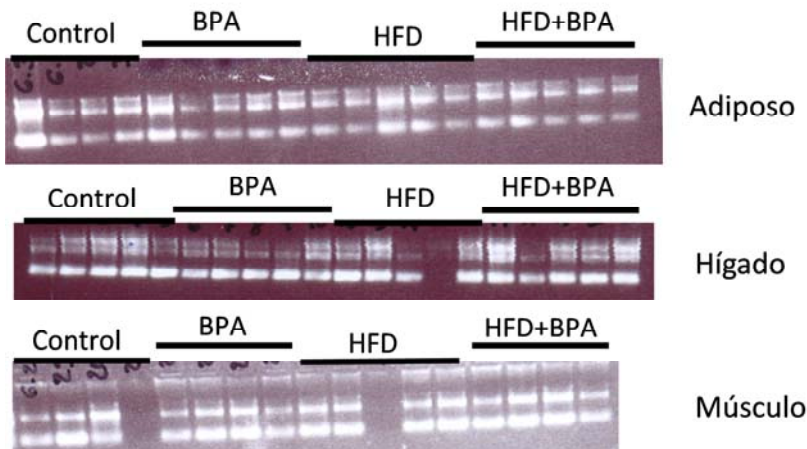


Figura 25. Imagen representativa de la calidad del ARN utilizado en los experimentos de expresión génica. Todas las muestras fueron cargadas con el mismo volumen (1µL).

Para facilitar el estudio de los genes en el tejido adiposo realizamos una subdivisión dependiendo del proceso fisiológico en el que están implicados (Figura 26). Cuando nos centramos en la síntesis de ácidos grasos *de novo* (Figura 26A), observamos dos patrones claros de expresión en los genes. Estos patrones son: 1) que no se produce ningún cambio en la expresión del gen, no habiendo diferencias en los animales que han estado expuesto a BPA ni en los animales alimentados con HFD comparados con los controles; 2) un cambio en el patrón de expresión de los genes en los animales BPA semejante al obtenido en los animales alimentados con HFD (grupos HFD y HFD+BPA). En el primer grupo de genes, observamos que no se produce cambio en la expresión de *Pparγ* en ninguna de nuestras condiciones al comparar con la expresión de los animales controles. Por el contrario, sí que se produce una disminución en la expresión tanto en los animales BPA, como en los dos grupos de animales alimentados con HFD, en los genes *Srebp1* y *Acaca*; en el primero la disminución de la expresión fue significativa tanto en los animales BPA ( $0.44 \pm 0.17$ ) como en los animales HFD (HFD:  $0.36 \pm 0.08$ ; HFD+BPA:  $0.51 \pm 0.04$ ) comparados con el grupo control. Por otro lado, no se produce ningún cambio en la expresión de Fas en el grupo BPA ( $1.66 \pm 0.82$ ) comparado con el control, pero sí que se aprecia una drástica disminución de la expresión del gen en los grupos HFD ( $0.06 \pm 0.02$ ) y HFD+BPA ( $0.08 \pm 0.02$ ).

En la Figura 26 B se observa una tendencia a la disminución de la expresión del gen *Cd36* (gen implicado en el paso de los ácidos grasos del torrente sanguíneo al interior de las células) tanto en los dos grupos alimentados con HFD (HFD:  $0.70 \pm 0.16$ ; HFD+BPA:  $0.87 \pm 0.12$ ) como en el grupo BPA ( $0.55 \pm 0.12$ ) respecto al control, siendo la tendencia más marcada en los animales BPA ( $p$ -valor= 0.09 comparado con el control). Estos datos van en la misma dirección que los resultados que obtenemos en el análisis de expresión de los genes implicados en la oxidación de ácidos grasos (Figura 26C), donde de manera global, se aprecia una disminución de la expresión de los genes comparado con el grupo control. Existe una disminución significativa en la expresión de *Ppara* en el grupo BPA ( $0.55 \pm 0.10$ ) comparado con el control. Cabe destacar que el grupo BPA muestra valores de expresión similares a los grupos HFD+BPA ( $0.54 \pm 0.12$ ) y grupo HFD ( $0.43 \pm 0.12$ ), valores que también son inferiores respecto al grupo control. Por otro lado, también se produce una disminución significativa en la expresión de

*Cpt1* en los animales BPA ( $0.29 \pm 0.09$ ) comparados con el control, llegando a superar la tendencia de menor expresión que produce la HFD tanto en los animales HFD ( $0.65 \pm 0.22$ ) como en los HFD+BPA ( $0.47 \pm 0.12$ ). No observamos cambios en la expresión de los genes *Acox1*, *Ucp2* y *Ucp3* en comparación con el grupo control; si bien observamos que en el caso de *Acox1* y *Ucp2* existe una tendencia a una menor expresión en los grupos BPA y HFD en el primer gen y solamente en el grupo BPA en *Ucp2*.

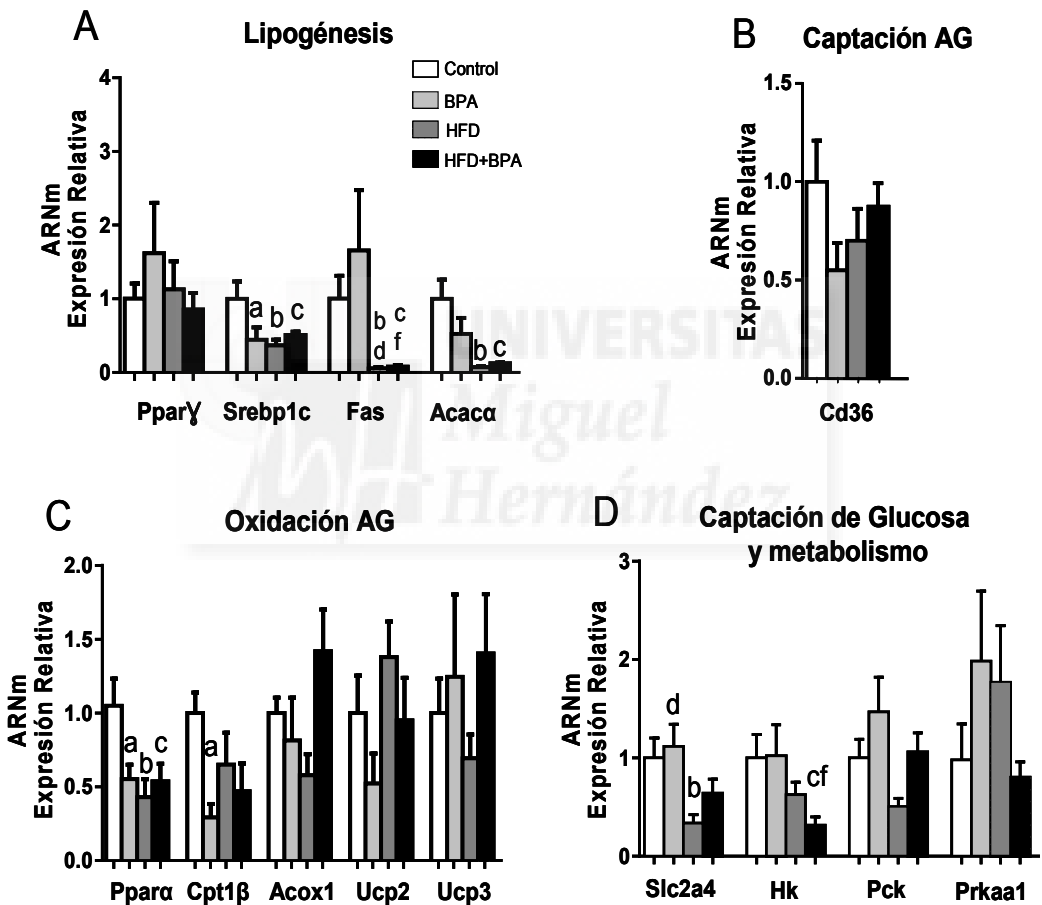


Figura 26. Expresión génica en tejido adiposo de los animales alimentados durante trece semanas con HFD y con diecisiete semanas de vida. A) Expresión relativa de los genes *Pparγ*, *Srebp1c*, *Fas* y *Acaca*, genes implicados en la lipogénesis. B) Expresión relativa del gen *Cd36* implicado en la captación de ácidos grasos del torrente sanguíneo al interior celular. C) Expresión relativa de los genes *Ppara*, *Cpt1β*, *Acox1*, *Ucp2* y *Ucp3*, genes implicados en la oxidación de ácidos grasos. D) Expresión relativa de los genes *Slc2a4* (cuya traducción da lugar a Glut4), *Hk*, *Pck*, y *Prkaa1* (cuya traducción da lugar a la proteína Ampk), genes implicados en la captación de la glucosa del torrente sanguíneo y su posterior metabolización. En blanco se representa a los



animales controles, en gris a los animales BPA, en gris oscuro los animales HFD y en negro los animales HFD+BPA. Los datos son expresados como la media  $\pm$  EEM (n = 5-8 animales/grupo). La expresión de los genes ha sido relativizada respecto a la expresión del grupo control. Se ha usado como gen endógeno Rplo (o también llamado 36B4). Los datos han sido analizados con ANOVA one way, a, b, c, d, e, f p-valor < 0.05. a, comparación control vs BPA; b, control vs HFD; c, control vs HFD+BPA; d, HFD vs BPA; e, HFD vs HFD+BPA; f, BPA vs HFD+BPA.

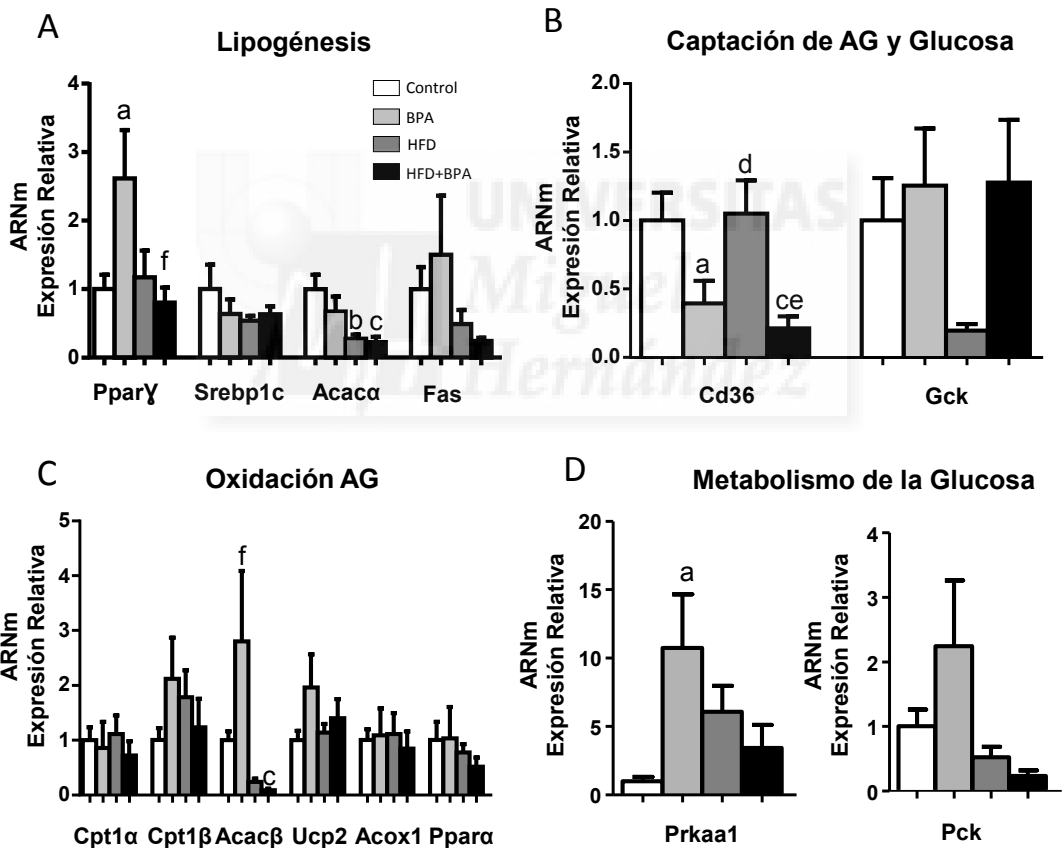
El estudio de los genes implicados en la captación de la glucosa y en su posterior metabolismo (Figura 26D), nos muestra que existe una menor expresión de *Slc2a4* en los animales alimentados con HFD, siendo sólo significativa la disminución en el grupo HFD respecto al control y al grupo BPA. El gen de *Hk* sigue manteniendo el patrón de expresión de *Slc2a4*, sólo que en este caso las diferencias significativas las encontramos en el grupo HFD+BPA respecto al grupo control y al BPA. En los genes *Pck* y *Prkaa1* no observamos cambio en el patrón de expresión, pero existe una tendencia al aumento de la expresión de *Prkaa1* en los grupos BPA y HFD respecto al control.

Para el estudio de la expresión génica en el hígado realizamos las mismas subdivisiones con el fin de facilitar la comprensión de los resultados obtenidos (Figura 27). El estudio de los genes implicados en la lipogénesis (Figura 27A), nos muestra que en este tejido se siguen manteniendo las tendencias que nos encontrábamos en el tejido adiposo. En el grupo BPA, en los genes *Srebp1c* y *Acaca* se observa una tendencia a disminuir la expresión de éstos, no llegando a ser significativa, y aproximándose a los valores obtenidos por el grupo HFD. Por otro lado, se observa un claro aumento significativo de la expresión de *Ppar $\gamma$*  en el grupo BPA comparado con el control y con su homólogo en HFD. En el caso de *Fas*, en los animales BPA no modifican su expresión. Por otro lado, existe una reducción de la expresión de los genes en los dos grupos de animales alimentados con HFD, como *Srebp1c*, *Fas* o *Acaca* manteniendo éste último una diferencia de expresión significativa respecto al control.

Cuando estudiamos el paso de los ácidos grasos al interior de los hepatocitos (Figura 27B), vemos que existe una disminución de más del 50 % de la expresión de *Cd36* en los grupos expuestos con BPA, tanto en los BPA ( $0.39 \pm 0.16$ ) como en los HFD+BPA ( $0.21 \pm 0.09$ ), respecto a los grupos control ( $1 \pm 0.02$ ) y HFD ( $1.05 \pm 0.34$ ). También observamos que en el gen *Gck*, implicado en la captación de la glucosa, no existen diferencias en los grupos BPA o HFD+BPA

respecto al control. Pero sí que se produce una disminución en la expresión, no siendo significativa, del grupo HFD respecto al control y los otros dos grupos.

El estudio de la oxidación de ácidos grasos por parte del hepatocito (Figura 27C) nos muestra que no existen cambios en el patrón de expresión de los genes respecto al control, hecho que ocurre en los genes *Cpt1α*, *Acox1*, *Ppara*, *Ucp2* y *Cpt1β*; produciéndose en este último una tendencia hacia una mayor expresión de los genes en todos los grupos y en *Ucp2* en el grupo BPA y, ligeramente, en BPA+HFD. Se produce una bajada significativa en la expresión de *Acacβ* en el grupo HFD+BPA respecto al grupo control y al grupo BPA.



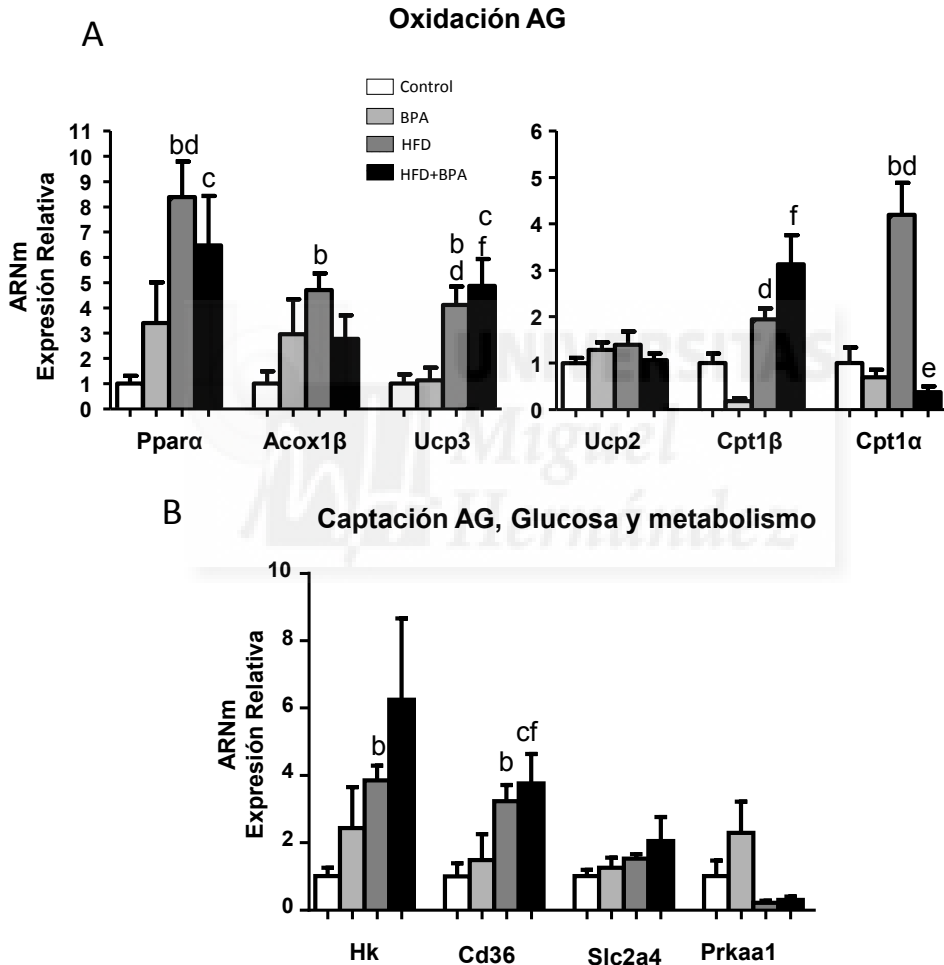
**Figura 27. Expresión génica en hígado de los animales alimentados durante trece semanas con HFD y con diecisiete semanas de vida.** A) Expresión relativa de los genes *Pparγ*, *Srebp1c*, *Acaca*, y *Fas* genes implicados en la lipogénesis. B) Expresión relativa del gen *Cd36* implicado en la captación de ácidos grasos del torrente sanguíneo al interior celular y *Gck*. C) Expresión relativa de los genes *Cpt1α*, *Cpt1β*, *Acacβ*, *Ucp2*, *Acox1* y *Ppara* genes implicados en la oxidación de ácidos

grasos. D) Expresión relativa de los genes *Prkaa1* (cuya traducción da lugar a la proteína Ampk) y *Pck*, genes implicados en la captación de la glucosa del torrente sanguíneo y su posterior metabolización. En blanco se representa a los animales control, en gris a los animales BPA, en gris oscuro los animales HFD y en negro animales HFD+BPA. Los datos son expresados como la media  $\pm$  EEM (n = 5-8 animales/grupo). La expresión de los genes ha sido relativizada respecto a la expresión del grupo control. Se ha usado como gen endógeno *Rp10* (o también llamado 36B4). Los datos han sido analizados con ANOVA one way, a, b, c, d, e, f p-valor < 0.05. a comparación control vs BPA; b control vs HFD; c control vs HFD+BPA; d HFD vs BPA; e HFD vs HFD+BPA; f BPA vs HFD+BPA.

Cuando estudiamos los genes implicados en la metabolización de la glucosa (Figura 27D) vemos que el regulador metabólico, *Prkaa1* (AMPK), presenta una sobreexpresión del gen en todos los grupos de estudio (BPA ( $10.7 \pm 3.93$ ), HFD ( $6.05 \pm 1.9$ ), HFD+BPA ( $3.43 \pm 1.7$ )) respecto al control; siendo sólo en el grupo BPA donde encontramos un aumento significativo.

El estudio de la expresión génica en el músculo se realizó dividiendo los genes en dos grandes grupos de estudio: genes implicados en la oxidación de ácidos grasos por un lado, y por otro, genes implicados en la captación de ácidos grasos como de la glucosa (Figura 28). En los genes implicados en la oxidación de ácidos grasos (Figura 28A), observamos que la expresión de *Ucp2* no se encuentra modificada en ninguno de los grupos de estudio. Los genes *Ppara*, *Acox1b*, *Ucp3*, *Cpt1b* y *Cpt1a* muestran un cambio en el patrón de expresión respecto al control. En *Ppara* observamos que en todos los grupos de estudio, se encuentra aumentada su expresión, hallando solamente diferencias significativas en el grupo HFD ( $8.38 \pm 1.40$ ) respecto al control y al BPA ( $3.93 \pm 1.61$ ) y en el grupo HFD+BPA ( $6.48 \pm 1.96$ ) sólo respecto al control. En *Acox1b* se aprecia un patrón similar al descrito en *Ppara*, sólo que en este caso, el aumento significativo de expresión se da en el grupo HFD ( $4.70 \pm 0.66$ ) respecto al control. En *Ucp3* y *Cpt1b* observamos un aumento de la expresión de los genes en los animales que han sido alimentados con HFD, por un lado el aumento de expresión en *Ucp3* en los animales alimentados con HFD muestra diferencias significativas tanto con el grupo control como con el grupo BPA; y por otro lado el aumento de la expresión de *Cpt1b* en los animales alimentados con HFD muestra estas diferencias con el grupo BPA. En la isoforma *Cpt1a* observamos que el aumento de expresión se produce en el grupo HFD, siendo esta diferencia de expresión significativa respecto al grupo control, BPA y HFD+BPA.

Cuando nos fijamos en la captación de ácidos grasos (Figura 28B) por parte de los miocitos, observamos que se produce un aumento de la expresión de *Cd36* en los grupos HFD ( $3.23 \pm 0.47$ ) y HFD+BPA ( $3.77 \pm 0.88$ ) respecto al grupo control. Por otro lado, no observamos cambios de expresión en el gen implicado en la captación de la glucosa, *Slc2a4*, ni en el gen *Prkaa1*, implicado en el metabolismo de ésta. Sí se observa un aumento de la expresión del gen *Hk* respecto al control, siendo sólo significativa esta diferencia en el caso de los animales HFD.



**Figura 28. Expresión génica en músculo de los animales alimentados durante trece semanas con HFD y con diecisiete semanas de vida.** A) Expresión relativa de los genes *Ppara*, *Acox1*, *Ucp2*, *Ucp3*, *Cpt1β* y *Cpt1α* genes implicados en la oxidación de ácidos grasos. B) Expresión relativa de los genes *Hk*, *Cd36*, *Slc2a4* y *Prkaa1* implicados en la captación de ácidos grasos y glucosa. En blanco se representa a los animales control, en gris los animales BPA, en gris oscuro los animales HFD y en negro los animales HFD+BPA. Los datos son expresados como la media  $\pm$  EEM ( $n = 5-8$  animales/grupo). La expresión de los genes ha sido relativizada respecto a la expresión del grupo

control. Se ha usado como gen endógeno Rplo (o también llamado 36B4). Los datos han sido analizados con ANOVA one way, a, b, c, d, e, f p-valor < 0.05. a, comparación control vs BPA; b, control vs HFD; c, control vs HFD+BPA; d, HFD vs BPA; e, HFD vs HFD+BPA; f, BPA vs HFD+BPA.





# DISCUSIÓN



El BPA es un compuesto utilizado de forma rutinaria en la industria y se encuentra presente en la mayoría de envases dedicados a la alimentación. Aunque su utilización está muy extendida, existen más de siete mil estudios que muestran los efectos adversos del BPA en los individuos que han estado expuestos a él, pero sólo el 1.5% de los estudios describen los efectos de este disruptor endocrino en la homeostasis de la glucosa. Los primeros estudios en los que se demostró que la exposición a BPA en ratones adultos produce cambios en la homeostasis de la glucosa se publicaron en el año 2006 (Alonso-Magdalena *et al.*, 2006). En ellos se muestra que tras la aplicación de una única dosis diaria de BPA se produce un rápido descenso de la glucemia, acompañado de un aumento de los niveles de insulina y que estos cambios evolucionaban a una hiperinsulinemia crónica acompañada de intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina cuando el tratamiento se prolongaba durante cuatro días. Posteriormente, gracias a diversos estudios epidemiológicos así como de modelos animales, se ha profundizado en el conocimiento del riesgo potencial que representa el BPA para la aparición de desórdenes metabólicos (Lang *et al.*, 2008; Ben-Jonathan *et al.*, 2009; Wei, 2009; Alonso-Magdalena *et al.*, 2011; Shankar & Teppala, 2011; Silver *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012; Angle *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2013).

El avance de los estudios en modelos animales ha llevado a intentar comprender qué es lo que ocurre cuando la exposición a este disruptor endocrino se producen en etapas tempranas del desarrollo, durante la embriogénesis, o/y en las posteriores etapas de desarrollo final de los órganos de los individuos. Dentro de esta ventana de exposición encontramos una amplia heterogeneidad de trabajos realizados en los que se utilizan diferentes modelos animales (incluyendo diferentes cepas animales y diferentes dosis) así como distintas vías de exposición, incluyendo la ingesta mediante pellets o bebida, sonda oral o inyección subcutánea (Alonso-Magdalena *et al.*, 2010; Ryan *et al.*, 2010; Wei *et al.*, 2011; Anderson *et al.*, 2013).

Los resultados mostrados en la presente tesis describen los efectos de la exposición temprana de los individuos a dosis bajas (10  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ ), respecto a la dosis considerada como dosis segura o dosis tolerable diaria (50  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  por la EPA y la ESFA; basado en el LOAEL de 50  $\text{mg}/\text{kg}/\text{día}$  (Wetherill *et al.*, 2007)(<http://www.epa.gov/iris/subst/0356.htm>). Se demuestra, junto con estudios previos (Alonso-Magdalena *et al.*, 2010; Wei *et al.*, 2011), que la exposición a



dosis bajas durante el desarrollo fetal altera la homeostasis de la glucosa en los individuos machos. Estas alteraciones se aprecian a un mes de vida, donde la exposición al disruptor produce un aumento de la masa de célula  $\beta$  y un aumento de la insulina en plasma en el estado de saciedad. Además, a los cuatro meses de edad el BPA modifica la expresión de los genes implicados en el metabolismo de la glucosa y de los lípidos, en los tejidos periféricos sobre todo en tejido adiposo e hígado, de una manera similar a una alimentación con dieta rica en grasa.

### **1. EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A BPA DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO EN LA VIDA TEMPRANA DE LOS INDIVIDUOS (4 SEMANAS DE VIDA).**

El bajo peso al nacer es un biomarcador establecido en las pruebas neonatales como un reflejo de una situación adversa en el ambiente uterino. Existen múltiples evidencias en las que se muestra que individuos que presentan esta característica están más predispuestos al desarrollo de enfermedades metabólicas durante el desarrollo de su vida adulta (Hales & Barker, 1992, 2001; Berends & Ozanne, 2012).

En nuestro estudio analizamos el peso de las crías y observamos que en las camadas que tuvieron el mismo número de crías en el alumbramiento, aquellas procedentes de madres a las que se les aplicó el BPA tuvieron un menor peso al nacer. En este sentido, se ha descrito que una exposición a una dosis de 20  $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{día}$  vía inyección subcutánea en ratones ICR/Jcl, utilizando el aceite de sésamo como vehículo, provoca que las crías procedentes de estas madres presentan un menor peso al nacer que los controles (Honma *et al.*, 2002). Por otro lado si la exposición es oral (a una dosis de 2.4  $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{día}$ ) en ratones CF-1 se observa un aumento en el peso de las crías de las madres expuestas al BPA (Howdeshell *et al.*, 1999). Al utilizar dosis inyectada de 10 o 100  $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{día}$  con aceite de maíz en ratones OF1, se observa un aumento de peso en las crías de las madres expuestas a menor dosis de BPA, y una disminución con la mayor dosis (Alonso-Magdalená *et al.*, 2010), fenómeno que se mantiene en el modelo experimental C57BL6 con una dosis de 100  $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{día}$  inyectada (Liu *et al.*, 2013).

Esta variabilidad de efectos en el peso de las crías expuestas intra-útero a BPA, se sigue produciendo cuando cambiamos de modelo animal a rata Wistar,

siendo los efectos dosis dependiente. Las crías procedente de madres tratadas con altas dosis (250 o 1250  $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{día}$ ) tienen un porcentaje de peso menor respecto al control mientras que las crías de madres tratadas con dosis más bajas (50  $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{día}$ ) presentan un porcentaje de peso mayor respecto al control (Wei *et al.*, 2011).

Las diferencias de pesos existentes entre los grupos durante la lactancia desaparecen en el momento en el que las crías son destetadas de las madres y se alimentan con dieta ND. Esto sugiere que las diferencias de peso durante la lactancia podrían ser debidas a que las madres expuestas a BPA pudieran seguir exponiendo a las crías a BPA mediante la leche materna. Estudios en humanos han demostrado la existencia de trazas de BPA en la leche materna (Vandenberg *et al.*, 2007a), así como la acumulación de BPA en el tejido adiposo mamario (Fernandez *et al.*, 2007).

En situación de saciedad los animales BPA presentan una hiperinsulinemia que no encontramos en los animales controles; pero cuando las glucemias son más bajas, como en situación de ayuno moderado (6 horas) o agudo (12 horas), los niveles de insulina son similares en ambos grupos. Esta respuesta tan marcada en la liberación de insulina en respuesta a cambios de la concentración de glucosa circulante, se ve reflejada en la secreción de insulina *in vivo*. Para mantener unos valores normo glucémicos en condición de ayuno agudo los dos grupos de estudio, control y BPA, presentan valores similares de insulina circulante. Sin embargo, tras la administración de una carga de glucosa observamos niveles de insulina circulantes muy superiores en los animales BPA en comparación con los controles. Este aumento de la liberación de insulina para conseguir normo glucemias en los animales expuesto a BPA ya fue descrito en el año 2010 (Alonso-Magdalena *et al.*, 2010). Además, Ruzzin y colaboradores obtuvieron los mismos efectos con exposición a Pops (acrónimo del inglés de Persistent Organics Pollutants) en ratas (Ruzzin *et al.*, 2010). Esta potenciación de la secreción de insulina a altas concentraciones de glucosa también han sido observadas en el modelo de ratones obesos (Reimer & Ahren, 2002; Sone & Kagawa, 2005).

A pesar de los altos niveles circulantes de insulina que encontramos en los animales expuestos intra-utero al BPA, éstos no presentan una modificación de la sensibilidad a la insulina en los tejidos periféricos, como ocurre en otros modelos

de exposición a BPA (Alonso-Magdalena *et al.*, 2006; Alonso-Magdalena *et al.*, 2010; Batista *et al.*, 2012), lo que podría deberse a mecanismos de compensación en la cascada de señalización de la insulina. Un ejemplo de adaptación fisiológica a cambios en los niveles de insulina lo podemos encontrar en el modelo de desnutrición proteica, donde los animales sometidos a esta condición nutricional presentan como adaptación metabólica una menor secreción de insulina por parte del islote de Langerhans en respuesta a estímulos de glucosa, pero una mayor sensibilidad periférica a la insulina (Carneiro *et al.*, 1995; Zoppi *et al.*, 2010; de Oliveira *et al.*, 2011).

Los estudios funcionales del islote de Langerhans *ex vivo*, nos muestra que los islotes de los animales BPA presentan una menor secreción y contenido de insulina respecto a los controles cuando la secreción de insulina se expresa en relación a la proteína total de los islotes utilizados para el ensayo. Los resultados obtenidos no concuerdan con los niveles de insulina circulantes *in vivo*. Sin embargo, cuando medimos la cantidad de insulina secretada por los islotes en respuesta a glucosa con respecto al contenido de dicha hormona, observamos que, a cualquier concentración de glucosa testada los islotes de los animales BPA liberaban la misma cantidad de insulina al medio. Así concluimos, que la capacidad secretora de las células  $\beta$  del islote no se encuentra afectada, que el aumento de insulina que observamos en plasma podría ser debido, al menos en parte, a un aumento de masa de célula  $\beta$ . Mediante estudios de morfología corroboramos que, efectivamente se producía un aumento de masa en los animales expuestos a BPA durante el desarrollo embrionario.

Por otro lado, el estudio de los niveles de hormonas circulantes nos muestra que los animales expuestos a BPA presentan cambios en todos los parámetros analizados respecto a los animales control. Los niveles de péptido-c se encuentran elevados en los animales BPA respecto a los controles en situación de saciedad. Este hecho se correlaciona con la hiperinsulinemia en saciedad, ya que insulina y péptido c son secretados por el islote de Langerhans en proporciones equimolares. Al fijarnos en el incremento de ambos en los animales BPA respecto al control, observamos que la insulina se encuentra 2.6 veces aumentada, pero que el péptido-c sólo aumenta 1.6 veces. Este hecho nos sugiere que el aumento de la insulina en plasma puede ser debido en parte a un mal funcionamiento del aclaramiento de ésta por parte del hígado en los animales BPA, dado que en

condiciones normales, el aclaramiento del péptido-c tiene una cinética más lenta que el de la insulina (Samnegard & Brundin, 2001). El fenómeno descrito ocurre en animales tratados con GLP1 (Glucagon like peptide 1). Cuando se les aplica una carga de glucosa combinada con 10 nmol/kg de GLP-1 se produce un aumento de la liberación de la insulina endógena, debido al carácter insulino-trópico del GLP-1, comparado con los animales control que sólo se les inyectó glucosa. Además se observa una reducción del 46% del aclaramiento de la insulina por parte del hígado. Provocando una mayor persistencia de los niveles de insulina en plasma (Ahren *et al.*, 2005).

El principal órgano del aclaramiento del péptido-c es el riñón (Henriksen *et al.*, 1987; Samnegard & Brundin, 2001; Chowta *et al.*, 2010). Por lo que sí el ratio de péptido-c circulante está disminuido respecto al de insulina en los animales BPA pero no respecto al control, puede ser debido a que el aclaramiento de éste esté aumentado a nivel renal. Recientemente, se ha publicado que la exposición directa a BPA produce degeneración tubular en los riñones (Yildiz & Barlas, 2013), por lo que la funcionalidad del riñón podría estar comprometida. Este hecho podría ser el causante del aumento del aclaramiento del péptido-c.

La exposición intra-útero a BPA provoca en los animales de 4 semanas de edad un aumento de la masa de célula  $\beta$  por parte de los islotes. Este aumento se asocia a un aumento de la expresión de los genes que están implicados en el desarrollo del páncreas *Pdx1* y *Hnf4 $\alpha$*  (Ahlgren *et al.*, 1998; Odom *et al.*, 2004). El fenómeno contrario, la disminución del tamaño del islote y la menor secreción de insulina ocurre en los modelos de desnutrición (Rafacho *et al.*, 2009; Sandovici *et al.*, 2011) donde se produce una disminución de la expresión del gen *Hnf4 $\alpha$*  debido a metilaciones en la región de los potenciadores en la cromatina, que impiden la correcta descondensación del gen para poder dar acceso a la maquinaria de transcripción (Ozanne *et al.*, 2011). Además, el estudio de la expresión del gen de la insulina en los islotes, nos muestra que la hipersecreción que encontramos en nuestros animales en estado de saciedad no es debido a un aumento de la expresión de dicho gen por la acción del BPA, como ocurre en modelos de exposición directa (Alonso-Magdalena *et al.*, 2006) (Alonso-Magdalena *et al.*, 2008), sino que es debido al aumento de masa de la célula  $\beta$ .

Estudios recientes, muestran que el BPA es capaz de producir cambios epigenéticos en el hígado en animales expuestos intra-utero durante el desarrollo embrionario (Ma *et al.*, 2013).

El promotor implicado principalmente en la expresión de *Hnf4α* en el páncreas es el promotor 2. En nuestro análisis, vemos que la exposición a BPA durante el desarrollo embrionario no produce cambios en la activación de los promotores del gen *Hnf4α*. El porcentaje de 5-metil-citosina en las diferentes regiones estudiadas, nos muestra que la región más activa, implicada en la expresión de nuestro gen es la del promotor 2, debido a que el porcentaje de 5-metil-citosina es de un 20 %. Esto nos indica que esta región está hipometilada comparada con las demás regiones estudiadas, que tienen un 40 %, promotor 1, o 60 %, la región del exón 1.

Estudios sobre la estructura de la cromatina y de las metilaciones asociadas a las histonas para mantener compacta la cromatina, podrían explicar los cambios en la expresión génica. Así un aumento de las metilaciones en las histonas, no dejando de esta manera acceso a la maquinaria de transcripción, ocurre en la expresión del gen *Hnf4α* en ratas desnutridas (Ozanne *et al.*, 2011; Sandovici *et al.*, 2011). También es posible que tenga lugar una hipometilación de las histonas, provocando una relajación de la estructura de los nucleosomas facilitando la descompactación de la cromatina. De esta manera se permitiría un mayor acceso a la maquinaria de transcripción. Dando lugar a la unión de dos o más taq-polimerasas, pudiendo de este modo aumentar el rendimiento de la expresión de los genes y en consecuencia aumentar el número de copias de ARNm. Este hecho podría explicar el aumento de expresión que encontramos en estos dos genes estudiados (*Pdx1* y *Hnf4α*).

También existe la posibilidad de que las modificaciones que vemos en la expresión génica de estos genes, sean debidas a una regulación postranscripcional por parte de micro ARN (miARN). Estos pequeños ARNs, de aproximadamente unos 20 nucleótidos, interactúan con los ARNm induciendo el complejo de silenciamiento y uniéndose a la región 3' no traducida de estos ARNm (Ambros, 2004; Bartel, 2004). En el año 2007, Lynn y colaboradores demostraron que los miARN se expresan durante el desarrollo del páncreas y que estos son necesarios

para el desarrollo normal de las células  $\beta$ , además de estar implicados en la regulación de genes para el desarrollo de una morfología normal del páncreas, como es el caso de mmu-miR-375 (Lynn *et al.*, 2007). Además, estudios en líneas celulares de cáncer de mama, como es la MCF-7, muestran que la exposición a BPA provoca cambios en la expresión de miARN, al igual que otros DEs (Tilghman *et al.*, 2012).

## **2. EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A BPA DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO EN LA VIDA ADULTA DE LOS INDIVIDUOS.**

### **2.1. Individuos de 17 semanas de vida y 13 semanas de alimentación con dieta rica en grasa.**

Como resultado de nuestro estudio concluimos que es posible que una exposición a BPA intra-uterino conlleve cambios metabólicos a lo largo de la vida adulta de los individuos expuestos a este ED. Los animales BPA a las 17 semanas de vida, presentan una hiperglucemia a 6 horas de ayuno que indicaría que la célula beta podría no liberar la insulina suficiente para poder conseguir llegar a los valores normales de glucemia. Estos valores de glucemias son muy próximos a los obtenidos por los individuos que han sido alimentados con HFD, hayan sido expuestos a BPA o no. Por otro lado, observamos que se comienza a no poder reestablecer los valores normales de glucemia en plasma tras una carga de glucosa en los animales BPA. La combinación de exposición a BPA y alimentación con HFD no conlleva a una potenciación de la intolerancia a la glucosa de estos ratones, sino que el sumatorio de los dos factores no supera el efecto producido por la HFD *per se*. Esto nos indica que a los cuatro meses de edad, los ratones expuestos a BPA tienen un comportamiento a nivel de regulación de los niveles de glucosa en sangre más parecido a los animales que han sido alimentados con HFD que a los animales controles.

El hecho de no observar diferencias en la respuesta de los tejidos periféricos a la insulina, nos lleva a pensar que todavía estos tejidos no están dañados por la concentración de insulina circulante. La ausencia de cambios en la sensibilidad a la insulina en ratas expuestas a BPA con 15 semanas de vida ya fue descrito en 2011 por Wei y colaboradores (Wei *et al.*, 2011). Cabe destacar que tampoco observamos diferencias en la sensibilidad a la insulina en los animales

alimentados con HFD. La discrepancia entre la GTT y la ITT puede ser debida a que en estos animales haya una compensación por parte de los tejidos periféricos y por tanto no se observen cambios en la sensibilidad a la insulina. Esta compensación puede ser mediada por un aumento en la cantidad de la proteína Irs-1, pudiendo de esta manera amplificar la cascada de señalización de la insulina en músculo (Batista *et al.*, 2012). Además, es posible que las alteraciones observadas en la GTT se relacionen con un fallo de la respuesta hepática en respuesta a la glucosa, lo que se traduciría en una disminución en la síntesis de glucógeno. En este sentido, un estudio publicado recientemente demuestra que una exposición indirecta a BPA vía materna, durante la gestación y la lactancia de las crías, produce en la descendencia a las 21 semanas de edad una disminución de los depósitos de glucógeno en hígado (Ma *et al.*, 2013).

Los experimentos *ex vivo* nos muestran un aumento del contenido de insulina de los islotes de los animales expuestos a BPA respecto a los controles, efecto también observado previamente en animales adultos expuestos a BPA durante 4 días a dosis de 100 µg/kg/día (Alonso-Magdalena *et al.*, 2006). En la secreción de insulina en respuesta a glucosa observamos un aumento en la respuesta de los tres grupos de estudio comparado con el control. El aumento de la secreción de insulina en animales alimentados con HFD ya ha sido descrito desde hace tiempo por diferentes grupos (Reimer & Ahren, 2002; Sone & Kagawa, 2005; González *et al.*, 2013). Sin embargo cabe destacar que los efectos producidos por una exposición temprana a bajas dosis de BPA conduce a un aumento de la secreción de insulina *ex vivo*, muy similar o incluso superior en respuesta a algunas concentraciones de glucosas a la que presentan los animales HFD. Este efecto potenciador de la secreción de insulina por parte del BPA ya se demostró en animales expuestos a dosis más elevadas que las nuestras (100 µg/kg/día) durante 8 días (Batista *et al.*, 2012). La ausencia de cambios en la concentración de calcio intracelular en todos los grupos, nos indica que la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje de la membrana plasmática no se ven afectados ni por la exposición intra-útero ni por la alimentación con HFD (Collins *et al.*, 2010).

Dos de los principales parámetros que determinan un estado prediabético son: hiperglucemia en ayunas e intolerancia a la glucosa. Cabe destacar que ambos fenómenos se manifiestan en nuestros modelos experimentales de

estudio, tanto en el grupo BPA, HFD como en el HFD+BPA, si bien, los efectos son más marcados en presencia de la dieta HFD.

## **2.2. Individuos de 28 semanas de vida y 24 semanas de alimentación con dieta rica en grasa.**

A las 28 semanas de vida y tras 24 semanas de alimentación con HFD, se sigue manteniendo la hiperglucemia en plasma a las 6h de ayuno en los animales BPA comparado con los grupos control, HFD y HFD+BPA. Además existe una clara intolerancia a la glucosa en todo el trazado descrito por la curva de la GTT no consiguiendo volver a los valores basales. Se trata de una intolerancia mucho más marcada que la descrita a las 17 semanas de vida, lo que nos indica que estos animales BPA muestran un estado pre-diabético más avanzado.

El hecho de que no se observen diferencias claras entre HFD y HFD+BPA respecto a los controles puede ser debido a que los controles son animales viejos y que, por la edad, comience a estar comprometida la homeostasis de la glucosa en estos animales. Este empeoramiento de la homeostasis de la glucosa se ve reflejado cuando comparamos las curvas de glucosa de los animales controles en las dos diferentes edades de estudio. En éstas observamos que los animales controles de 28 semanas de vida presentan niveles más elevados de insulina en ayuno, además de las glucemias aumentadas respecto a los controles de 17 semanas en la curva de la GTT. No obstante, no encontramos resistencia a la insulina en nuestro modelo.

La resistencia a la insulina se caracteriza por una fuerte reducción de la capacidad de la insulina para activar la vía del sustrato del receptor de la insulina (IRS-1)/ fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K), y como consecuencia una disminución de la captación de la glucosa y la utilización de ésta en los tejidos diana de la insulina. La aparición de dos mecanismos diferentes, pero complementarios, son necesarios para que se produzca la resistencia a la insulina. El primer mecanismo es el aumento en la fosforilación de IRS-1 en el residuo de serina, disminuyendo de esta manera la afinidad de IRS-1 a la PI3K y minimizando la activación de ésta última. Y el segundo mecanismo es el incremento de la expresión de la subunidad p85 $\alpha$  de la PI3K (Draznin, 2006). La PI3K es una enzima formada por dos subunidades, una subunidad reguladora (p85) y una subunidad catalítica (p110)



que está asociada a la subunidad reguladora. La estequiometría normal de las subunidades es un exceso de la reguladora respecto a la subunidad catalítica, por lo que existe un reservorio de monómero de p85 que no está asociado a p110. El complejo p85-p110, es el encargado de unirse a PI3K y activar la actividad quinasa de ésta por lo que existe un balance entre el monómero p85 y el dímero p85-p110. Cuando se produce un desplazamiento del balance hay una competencia entre p85 y p85-p110 por los mismos sitios de unión al IRS-1 fosforilado en tirosina, aumentando o disminuyendo la actividad de la PI3K (Terauchi *et al.*, 1999; Ueki *et al.*, 2000; Mauvais-Jarvis *et al.*, 2002; Ueki *et al.*, 2003). Puede ser, que el hecho de no encontrar en nuestro modelo resistencia a la insulina, como se observan en otros estudios realizados en ratones (Alonso-Magdalena *et al.*, 2010) o en otros modelos animales y dosis (Wei *et al.*, 2011), pueda deberse a que en nuestro modelo todavía no se haya producido el desequilibrio entre las subunidades de la PI3K, manteniendo de ésta manera la actividad de la misma, fosforilando a Akt y activando la translocación a la membrana del receptor Glut4. También puede estar ocurriendo que la fosforilación de IRS-1 en serina no sea tan abundante y no se esté inhibiendo la cascada de señalización o incluso que todavía no se esté produciendo la combinación adecuada de ambas para inducir la resistencia a la insulina en los animales.

Por otro lado, un estudio reciente de B.M. Angle y colaboradores (Angle *et al.*, 2013) muestran que la resistencia a la insulina en animales expuestos a BPA durante el desarrollo embrionario es dosis dependiente, ya que a dosis de 5 ó 5000  $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{día}$  se producen diferencias en la sensibilidad a la insulina, pero que a dosis intermedias (de 50 ó 500  $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{día}$ ) no existen diferencias respecto a los controles. Estos resultados apoyan los datos obtenidos en el año 2010 por Alonso-Magdalena y colaboradores en los que las crías de madres expuestas a dosis altas (100  $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{día}$ ), no presentan resistencia a la insulina, sin embargo, las crías de madres expuestas a dosis bajas (10  $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{día}$ ) sí que presentan una resistencia a la insulina.

El estudio de la secreción de insulina *ex vivo* nos muestra que la intolerancia a la glucosa tan marcada en los animales BPA comparado con los controles puede ser debida a la pérdida de respuesta a la glucosa por parte de los islotes. Observamos que los animales BPA, vuelven a tener valores próximos a los obtenidos en los controles, perdiendo esa marcada hipersecreción que se veía a

las 17 semanas de vida. Por otro lado, los animales HFD y HFD+BPA muestran disminuida la respuesta a glucosa, liberando menos insulina que los islotes procedentes de los animales control. La disminución de secreción de insulina en el grupo HFD+BPA comparado con el grupo HFD, nos indica que el BPA agrava los efectos producidos por la dieta HFD en las células  $\beta$  de los islotes. Estas respuestas a la glucosa van acompañadas con una disminución del contenido de insulina a 28 semanas de vida de los islotes comparado con el del obtenido a las 17 semanas de vida. Las reducciones del contenido más drásticas se dan en los animales HFD y HFD+BPA; llegando a ser esta reducción significativa con respecto a los animales controles.

Además del efecto del BPA sobre la función de la célula beta pancreática y por tanto sobre la homeostasis glucémica, recientemente se ha planteado que el BPA podría ser un compuesto obesógeno (Grun & Blumberg, 2007; Sharpe & Drake, 2013). En este sentido nuestros datos muestran que la exposición a BPA intra-útero produce un aumento de peso que se hace visible a partir de las 18 semanas de vida, si bien dicho aumento es inferior al producido por una alimentación rica en grasa.

### **2.3. Efectos de la exposición a BPA intra-útero en la expresión de genes en los tejidos periféricos.**

En el estudio genético observamos que los cambios más relevantes se producen en el tejido adiposo de los animales expuestos a BPA, siendo estos cambios muy similares a los producidos por una alimentación rica en grasas. Estos cambios son más marcados en los genes implicados en la lipogénesis y en la oxidación de ácidos grasos. Los cambios se ven claramente reflejados, en la lipogénesis, en el gen *Srebp1c*, en los tres grupos de estudio, y en los genes *Fas* y *Acaca*, para los dos grupos de animales alimentados con HFD, además de la disminución de la expresión en *Ppara* y *Cpt1b* en la oxidación de ácidos grasos. El estudio individualizado de los efectos de una menor expresión de estos genes es muy complicado, ya que todos ellos se encuentran formando parte de una compleja red de comunicación celular. De toda ésta compleja interacción cabe destacar la disminución de la expresión de *Srebp1c* ya que juega un papel muy importante en la regulación de los genes que codifican para las enzimas

lipogénicas (Toth et al 2004 mol cell biol), siendo *Acac* y *Fas* los principales. *Acac*  $\alpha$  está implicado en el paso del metabolito Acetil-CoA a Manoilil-CoA. Este último metabolito es dual, pues está implicado en la oxidación de ácidos grasos ya que es el regulador del sistema de transporte para que puedan entrar los ácidos grasos en la mitocondria y comenzar el ciclo de la beta oxidación (McGarry et al., 1977). Asimismo, se encuentra implicado en la síntesis de ácidos grasos por medio de *Fas* actuando como donante de grupos metil (Abu-Elheiga et al., 2001). Por tanto, la expresión de *Acac*  $\alpha$  y *Fas* se encuentran relacionadas.

En la bibliografía se ha descrito que son genes cuya expresión indica que dependen de la dieta, ya que las dietas libres en grasa inducen la síntesis de *Acac*  $\alpha$  y su actividad, mientras que las dietas ricas en grasa producen una disminución de la expresión *Acac*  $\alpha$  y de su actividad (Abu-Elheiga et al., 2001)

En otros modelos de investigación se ha probado que la exposición a dietas ricas en grasa produce una disminución de la expresión del gen *Fas* tras un tratamiento de 4 ó 16 semanas con dietas de diferente porcentaje calórico (Jiang et al., 2009). La razón de no encontrar una disminución de *Fas* en los animales BPA, manteniendo de esta manera el patrón de comportamiento mostrado por los animales alimentados con HFD, tanto animales HFD como HFD+BPA, puede ser debido a que la activación de este gen se vea aumentada de forma basal como se ha demostrado que ocurre en línea celular tumoral de mama, MCF-7, tras una exposición a diferentes EDs con actividad estrogénica (Tilghman et al., 2012).

Además, la disminución de la expresión de *Srebp1c*, en los animales alimentados con HFD, puede estar ligada a la disminución de la expresión de *Fas*. A su vez, todos estos genes pueden estar influidos por la tendencia al aumento del gen *Prkaa1* (AMPK), ya que la transcripción de *Srebp1c* se inhibe por dicha proteína (Zhou et al., 2001) al igual que la expresión de *Fas* se ve disminuida por una prolongada activación de la AMPK (Foretz et al., 1998). Todo esto puede llevar a una desregulación del metabolismo de los lípidos en nuestros animales de estudio mostrando un patrón similar en los animales BPA y en los animales alimentados con HFD.

La interacción entre el proceso de lipogénesis y de oxidación de ácidos grasos se basa por un lado en *Ppara* (Fernandez-Alvarez et al., 2011), ya que este

es capaz de regular la expresión de *Srebp1c*, y por otro lado en el papel dual del Malonil-CoA que ya hemos discutido anteriormente.

La disminución que encontramos en la expresión de *Ppara* puede estar también, implicada en la bajada de la expresión de *Srebp1c*, ya que Fernandez-Alvarez y colaboradores demostraron que la expresión de *Srebp1c* se aumenta en la presencia de agonistas de *Ppara* y que la combinación de agonistas con insulina incrementa unas 7 veces el efecto. La disminución tan drástica que observamos en la expresión de *Cpt1b* en los animales BPA puede estar ligada al aumento de insulina circulante en plasma (Awan & Saggerson, 1993; Gamble & Lopaschuk, 1997), por lo que la hiperinsulinemia y la hiperglucemia que encontramos en plasma pueden estar afectando a la expresión de *Cpt1* que a su vez podría estar causando la disminución de la expresión del transportador de ácidos grasos libres, *Cd36/Fat*, tal como se ha demostrado en músculo esquelético y cardiaco (McGarry *et al.*, 1983; Rasmussen *et al.*, 2002).

También cabe destacar que la intolerancia a la glucosa que encontramos en los animales HFD como en los HFD+BPA, podría estar causada por la disminución de la expresión del gen *Slc2a4* en estos dos grupos, gen que codifica el transportador de glucosa *Glut4*, implicado en la captación de la glucosa por parte de los tejidos periféricos. Por otro lado, el hecho de no encontrar esta intolerancia tan marcada en los animales BPA podría estar vinculado a que la expresión de este gen no se encuentra disminuida.

Los cambios de expresión génica que encontramos en hígado siguen un patrón parecido al descrito en el estudio del tejido adiposo, pero cabe destacar el gran aumento de la expresión del gen *Pparγ* en hígado. La esteatosis hepática o hígado graso se caracteriza por un aumento de la expresión de este gen (Vidal-Puig *et al.*, 1996; Memon *et al.*, 2000; Bedoucha *et al.*, 2001). Se ha comprobado que la administración prolongada de TZD (tiazolidinedionas), agonista de PPAR $\gamma$ , en animales obesos KKA<sup>Y</sup>, provoca una esteatosis severa lo que indica que la administración de este análogo en animales con una alteración de la expresión de *Pparγ* en hígado puede acabar afectando el metabolismo lipídico en el hígado conduciendo a la aparición de esteatosis (Bedoucha *et al.*, 2001). Una sobreexpresión prolongada de *Pparγ* en los animales BPA, puede producir la generación a largo plazo una esteatosis hepática en los individuos.

El aumento de TG y glicerol en plasma puede estar relacionado con la disminución de la oxidación de ácidos grasos explicada por la disminución de la expresión de los genes implicados en ésta, que anteriormente hemos descrito en el apartado 5 de resultados.

### **3. EL PAPEL DE BISFENOL-A EN LA ETIOLOGÍA DE LA DIABETES.**

La etiología clásica de la DMT2 se define como la presencia de una resistencia a la insulina en los tejidos periféricos que provoca de forma compensatoria una sobreproducción de insulina por parte de las células  $\beta$  para mantener unos niveles de glucemia adecuados (Kahn *et al.*, 2006). Cuando esta adaptación fisiológica se mantiene en el tiempo se produce un estrés en las células  $\beta$  que acaba desembocando en la pérdida de la función y la muerte celular de las mismas (Kahn *et al.*, 2007). Durante la evolución de los animales expuesto intra-útero a BPA no observamos en ningún momento una resistencia clara en los tejidos periféricos a la insulina, pero por el contrario, sí que observamos elevados niveles de insulina en plasma a las 4 semanas de vida que se mantiene hasta las 28 semanas de vida. La presencia de este aumento de insulina circulante en los animales BPA, puede ser debido al menos en parte, al aumento de masa de célula  $\beta$  observado.

El hecho de mantener niveles elevados de insulina plasmática sin una necesidad fisiológica aparente podría generar en el individuo una constante activación de las cascadas de señalización en las que está implicada la insulina, pudiendo provocar los cambios fenotípicos y genotípicos que observamos en la vida adulta de los individuos como ocurre en nuestros animales a las 17 y 28 semanas de vida. En ellos observamos que la tolerancia a la glucosa está alterada en ambas edades, además de cambios en el patrón de expresión génica en los tejidos periféricos a las 17 semanas de vida.

En animales a los que se les transfecta copias extras del gen humano de la insulina, los niveles basales de insulina están elevados de 2 a 4 veces más comparados con los controles. (Shanik *et al.*, 2008). Estos animales transfectados tienen normopeso y presentan niveles de glucemia normales en el ayuno, pero muestran una liberación de insulina excedida a los estímulos de glucosa posprandial. Ésta hiperinsulinemia posprandial puede conducir a la aparición de una resistencia a la insulina asociada a una disminución de la sensibilidad del

receptor de insulina y a una hipertriglicemia correlacionada con el grado de hiperinsulinemia (Shanik *et al.*, 2008). Además el estudio de Meharan y colaboradores, muestra la relación entre hiperinsulinemia y el desarrollo de obesidad (Mehran *et al.*, 2012).

En base a los resultados obtenidos en el 2010 en nuestro laboratorio (Alonso-Magdalena *et al.*, 2010) nos planteamos si una dieta rica en grasa agravaría o aceleraría los efectos producidos por una exposición a BPA durante el desarrollo embrionario. Ante los datos obtenidos no vemos que una alimentación con HFD (45 %) en animales expuestos a BPA intra-utero potencie los efectos producidos únicamente por una alimentación rica en grasa. El hecho de no encontrar cambios en la combinación de HFD y BPA puede ser debido a que la dosis de exposición sea baja o el tiempo de exposición insuficiente, ya que en ratas expuestas a 50  $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{día}$ , sí que se produce un empeoramiento de la homeostasis de la glucosa cuando se produce la sinergia de exposición a BPA durante el periodo perinatal y la alimentación con HFD (28.5 %) (Wei *et al.*, 2011). Incluso puede ser el caso que sea necesario una dieta con un porcentaje más alto en grasas, ya que en ratones CD1 expuestos a EDs durante el periodo perinatal, y alimentados con una dieta rica en grasa al 40 %, no se llegan a producir cambios en la tolerancia a la glucosa a las 15 semanas de vida (Ryan *et al.*, 2010).

#### 4. EXPOSICIÓN EN HUMANOS.

Desde la aparición de los primeros estudios en los que se demostraron los efectos de la exposición a BPA en individuos, existe una controversia respecto a este tipo de compuestos y en particular hacia el BPA.

En el año 2007, en el marco la reunión de expertos “Bisphenol A: An Examination of the Relevance of Ecological, In vitro and Laboratory Animal Studies for Assessing Risks to Human Health”, Chapel Hill, Carolina del Norte, se estableció una declaración consenso. En esta declaración se abarcan los tópicos de la exposición en humanos al BPA, los mecanismos moleculares in vitro del BPA, el efecto in vivo del BPA en animales de laboratorio, la evaluación de las evidencias de la actividad carcinogénica del BPA y la evaluación ecológica del BPA mediante las evidencias de la biología comparativa. Como resultado se estableció una declaración consenso en la que se indica que los estudios de toxicidad aguda y de

toxicidad clásica que implican el uso de dosis altas de BPA no reflejan la situación de exposición de los seres humanos. Se concluyó que los estudios epidemiológicos y ecológicos se podrían basar en las evidencias de estudios en animales de laboratorio, dado que se sabe que los mecanismos que pueden mediar en la respuesta son comunes en los animales de laboratorio y de vida silvestre (vom Saal *et al.*, 2007).

A pesar de la creación de este y otros paneles de expertos, donde se ha discutido los efectos producidos por la exposición a bajas dosis de BPA, las agencias de salud alimentaria, tanto la americana (US EPA) como la europea (ESFA), siguen declarando al BPA como un compuesto seguro.

La controversia entre las dosis y el modo de exposición se sigue manteniendo y es un motivo de debate en los foros científicos, que todavía se mantiene activo (vom Saal & Myers, 2010). Además de la publicación en las revistas científicas del campo, también existen informes para la utilización de estudios biomonitorizados por las agencias reguladoras para evaluar los niveles de exposición y seguridad del BPA (Vandenberg *et al.*, 2010).

Existen cada vez más estudios epidemiológicos que ponen de manifiesto que la población se encuentra en constante contacto con altas concentraciones de BPA. La agencia nacional de salud y nutrición de los EEUU (NHANES, US-National Health and Nutritional Examination Survey) ha realizado análisis de BPA en orina en la población americana del 2003-2006, donde Melzer y colaboradores, describieron una correlación entre la alta concentración de BPA y el diagnóstico de DMT2 y enfermedades cardiovasculares (Melzer *et al.*, 2011). Este estudio se basa en dos estudios previos donde se estudia la población del 2003-2004 (Lang *et al.*, 2008) y 2005-2006 de los datos de NHANES. En el primer estudio se encontró una correlación positiva entre diagnóstico de diabetes y enfermedades cardiovasculares con altas concentraciones de BPA en orina, manteniéndose sólo ésta correlación en el segundo estudio con las enfermedades cardiovasculares. Al aumentar la población de estudio, añadiendo a estos estudios anteriores los individuos del año 2007-2008, ésta correlación entre alta concentración de BPA y diagnóstico de diabetes se sigue manteniendo (Silver *et al.*, 2011).

Estudios recientes en la población asiática muestran como el BPA se asocia a un aumento de la obesidad y en particular de la obesidad abdominal, además de

mostrar una asociación entre el BPA y la resistencia a la insulina modulada por el IMC (índice de masa corporal), ya que la relación entre el IMC y el HOMA-IR (modelo homeostático de evaluación de la resistencia a la insulina) es más acusada en individuos de alto IMC que en los de menor (Wang *et al.*, 2012). Cuando los estudios se realizaron analizando los niveles de BPA en suero, en la población estadounidense, se sigue manteniendo la correlación positiva entre niveles de BPA y diabetes, manteniéndose la asociación tanto en personas con normopeso como en personas con sobrepeso y obesas (Shankar & Teppala, 2011). Además, se ha demostrado que existe una asociación positiva entre altos niveles de BPA en orina y prediabetes en individuos no diabéticos (Sabanayagam *et al.*, 2013).

Actualmente la dosis establecida como segura por la EPA y EFSA es de 50  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de peso corporal/día. Estas agencias, se basan en el LOAEL de 50  $\text{mg}/\text{Kg}$  peso corporal/día para establecer el límite inferior a partir del cual se generan efectos adversos en los animales de laboratorio (Wetherill *et al.*, 2007). Cabe destacar que los resultados expuesto en la presente tesis, han sido realizados con dosis cinco veces más bajas (10  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de peso corporal/día) que la establecida por las diversas agencias de seguridad y salud. Lo que nos está indicando la necesidad de generar nueva legislación para poder frenar los problemas de salud pública que pueda generar la exposición a este ED. Dado que cada vez más número de trabajos muestran, junto con nuestros resultados, que la exposición a bajas dosis de BPA es capaz de modificar la fisiología normal de los individuos expuestos a él, se puede considerar que una exposición a BPA durante el desarrollo potencia la aparición de desórdenes en la vida adulta de los individuos. Por tanto, son necesarios, la realización de estudios exhaustivos de los efectos a largo plazo de una exposición a BPA, así como una regulación estricta para su utilización.





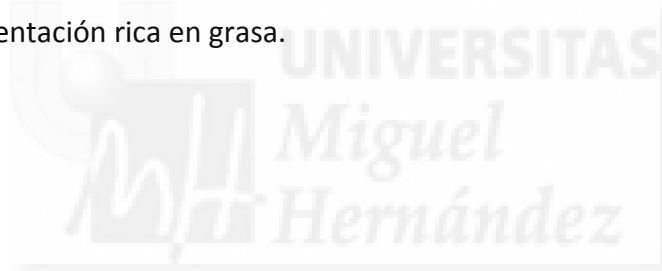


# CONCLUSIONES



Los resultados aportados en el presente trabajo demuestran que, una exposición a Bisfenol-A durante el desarrollo embrionario provoca:

1. Un aumento en la masa de célula beta.
2. Un aumento de los niveles de insulina circulantes en animales que no precisan de esta adaptación fisiológica.
3. Desregulación de la homeostasis de la glucosa en los individuos en edad adulta.
4. Cambios en los patrones de expresión génica en los tejidos periféricos, siendo éstos más importantes en el tejido adiposo.
5. La exposición a Bisfenol-A se asemeja a los efectos producidos por una alimentación rica en grasa.







# BIBLIOGRAFÍA



- Abu-Elheiga L, Matzuk MM, Abo-Hashema KA & Wakil SJ. (2001). Continuous fatty acid oxidation and reduced fat storage in mice lacking acetyl-CoA carboxylase 2. *Science* **291**, 2613-2616.
- Ahlgren U, Jonsson J, Jonsson L, Simu K & Edlund H. (1998). beta-cell-specific inactivation of the mouse *Ipf1/Pdx1* gene results in loss of the beta-cell phenotype and maturity onset diabetes. *Genes Dev* **12**, 1763-1768.
- Ahren B, Thomaseth K & Pacini G. (2005). Reduced insulin clearance contributes to the increased insulin levels after administration of glucagon-like peptide 1 in mice. *Diabetologia* **48**, 2140-2146.
- Aizawa T, Komatsu M, Asanuma N, Sato Y & Sharp GW. (1998). Glucose action 'beyond ionic events' in the pancreatic beta cell. *Trends Pharmacol Sci* **19**, 496-499.
- Alonso-Magdalena P, Laribi O, Ropero AB, Fuentes E, Ripoll C, Soria B & Nadal A. (2005). Low doses of bisphenol A and diethylstilbestrol impair Ca<sup>2+</sup> signals in pancreatic alpha-cells through a nonclassical membrane estrogen receptor within intact islets of Langerhans. *Environ Health Perspect* **113**, 969-977.
- Alonso-Magdalena P, Morimoto S, Ripoll C, Fuentes E & Nadal A. (2006). The estrogenic effect of bisphenol A disrupts pancreatic beta-cell function in vivo and induces insulin resistance. *Environ Health Perspect* **114**, 106-112.
- Alonso-Magdalena P, Quesada I & Nadal A. (2011). Endocrine disruptors in the etiology of type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* **7**, 346-353.
- Alonso-Magdalena P, Ropero AB, Carrera MP, Cederroth CR, Baquie M, Gauthier BR, Nef S, Stefani E & Nadal A. (2008). Pancreatic insulin content regulation by the estrogen receptor ER alpha. *PLoS One* **3**, e2069.
- Alonso-Magdalena P, Vieira E, Soriano S, Menes L, Burks D, Quesada I & Nadal A. (2010). Bisphenol A exposure during pregnancy disrupts glucose homeostasis in mothers and adult male offspring. *Environ Health Perspect* **118**, 1243-1250.
- Ambros V. (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature* **431**, 350-355.
- Ammala C, Ashcroft FM & Rorsman P. (1993). Calcium-independent potentiation of insulin release by cyclic AMP in single beta-cells. *Nature* **363**, 356-358.
- Anderson OS, Peterson KE, Sanchez BN, Zhang Z, Mancuso P & Dolinoy DC. (2013). Perinatal bisphenol A exposure promotes hyperactivity, lean body composition, and hormonal responses across the murine life course. *Faseb J* **27**, 1784-1792.



- Andrikopoulos S, Blair AR, Deluca N, Fam BC & Proietto J. (2008). Evaluating the glucose tolerance test in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **295**, E1323-1332.
- Angle BM, Do RP, Ponzi D, Stahlhut RW, Drury BE, Nagel SC, Welshons WV, Besch-Williford CL, Palanza P, Parmigiani S, Vom Saal FS & Taylor JA. (2013). Metabolic disruption in male mice due to fetal exposure to low but not high doses of bisphenol A (BPA): Evidence for effects on body weight, food intake, adipocytes, leptin, adiponectin, insulin and glucose regulation. *Reprod Toxicol*.
- Ashcroft FM, Harrison DE & Ashcroft SJ. (1984). Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells. *Nature* **312**, 446-448.
- Ashcroft FM & Rorsman P. (1989). Electrophysiology of the pancreatic beta-cell. *Prog Biophys Mol Biol* **54**, 87-143.
- Atkinson MA & Eisenbarth GS. (2001). Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet* **358**, 221-229.
- Awan MM & Saggerson ED. (1993). Malonyl-CoA metabolism in cardiac myocytes and its relevance to the control of fatty acid oxidation. *Biochem J* **295 ( Pt 1)**, 61-66.
- Bartel DP. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**, 281-297.
- Bateson P, Barker D, Clutton-Brock T, Deb D, D'Udine B, Foley RA, Gluckman P, Godfrey K, Kirkwood T, Lahr MM, McNamara J, Metcalfe NB, Monaghan P, Spencer HG & Sultan SE. (2004). Developmental plasticity and human health. *Nature* **430**, 419-421.
- Batista TM, Alonso-Magdalena P, Vieira E, Amaral ME, Cederroth CR, Nef S, Quesada I, Carneiro EM & Nadal A. (2012). Short-term treatment with bisphenol-A leads to metabolic abnormalities in adult male mice. *PLoS One* **7**, e33814.
- Beato M & Klug J. (2000). Steroid hormone receptors: an update. *Hum Reprod Update* **6**, 225-236.
- Bedoucha M, Atzpodien E & Boelsterli UA. (2001). Diabetic KKAY mice exhibit increased hepatic PPARgamma1 gene expression and develop hepatic steatosis upon chronic treatment with antidiabetic thiazolidinediones. *J Hepatol* **35**, 17-23.
- Ben-Jonathan N, Hugo ER & Brandebourg TD. (2009). Effects of bisphenol A on adipokine release from human adipose tissue: Implications for the metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol* **304**, 49-54.

- Berends LM & Ozanne SE. (2012). Early determinants of type-2 diabetes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **26**, 569-580.
- Biles JE, McNeal, T.P., Begley, T.H., & Hollifield, H.C. . (1997). Determination of Bisphenol-A in Reusable Polycarbonate Food-Contact Plastics and Migration to Food-Simulating Liquids. *J Agric Food Chem* **45**, 3541-3544.
- Boney CM, Verma A, Tucker R & Vohr BR. (2005). Metabolic syndrome in childhood: association with birth weight, maternal obesity, and gestational diabetes mellitus. *Pediatrics* **115**, e290-296.
- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Brissova M, Fowler MJ, Nicholson WE, Chu A, Hirshberg B, Harlan DM & Powers AC. (2005). Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *J Histochem Cytochem* **53**, 1087-1097.
- Brotons JA, Olea-Serrano MF, Villalobos M, Pedraza V & Olea N. (1995). Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. *Environ Health Perspect* **103**, 608-612.
- Bulayeva NN & Watson CS. (2004). Xenoestrogen-induced ERK-1 and ERK-2 activation via multiple membrane-initiated signaling pathways. *Environ Health Perspect* **112**, 1481-1487.
- 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.
- Carneiro EM, Mello MAR, Gobatto CA & Boschero AC. (1995). Low protein diet impairs glucose-induced insulin secretion from and <sup>45</sup>Ca uptake by pancreatic rat islets. *Nutritional Biochemistry* **6**, 314-318.
- Collins SC, Hoppa MB, Walker JN, Amisten S, Abdulkader F, Bengtsson M, Fearnside J, Ramracheya R, Toyee AA, Zhang Q, Clark A, Gauguier D & Rorsman P. (2010). Progression of diet-induced diabetes in C57BL6J mice involves functional dissociation of Ca<sup>2+</sup> channels from secretory vesicles. *Diabetes* **59**, 1192-1201.
- Commission E. (1996). European workshop on the impact of endocrine disruptors on human health and wildlife. In: Environment and climate research programme DX. Brussels: European Commission.

- Chen L, Magliano DJ & Zimmet PZ. (2011). The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus--present and future perspectives. *Nat Rev Endocrinol* **8**, 228-236.
- Chowta MN, Adhikari PM, Chowta NK, Shenoy AK & D'Souza S. (2010). Serum C peptide level and renal function in diabetes mellitus. *Indian J Nephrol* **20**, 25-28.
- de Oliveira CA, Latorraca MQ, de Mello MA & Carneiro EM. (2011). Mechanisms of insulin secretion in malnutrition: modulation by amino acids in rodent models. *Amino Acids* **40**, 1027-1034.
- Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, Zoeller RT & Gore AC. (2009). Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev* **30**, 293-342.
- Dodds EC & Lawson W. (1936). Synthetic estrogenic agents without the phenanthrene nucleus. *Nature* **137**, 996-999.
- Draznin B. (2006). Molecular mechanisms of insulin resistance: serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and increased expression of p85alpha: the two sides of a coin. *Diabetes* **55**, 2392-2397.
- Dunne MJ & Petersen OH. (1986). Intracellular ADP activates K<sup>+</sup> channels that are inhibited by ATP in an insulin-secreting cell line. *FEBS Lett* **208**, 59-62.
- Feldman D, Do Y, Burshell A, Stathis P & Loose DS. (1982). An estrogen-binding protein and endogenous ligand in *Saccharomyces cerevisiae*: possible hormone receptor system. *Science* **218**, 297-298.
- Fernandez-Alvarez A, Alvarez MS, Gonzalez R, Cucarella C, Muntane J & Casado M. (2011). Human SREBP1c expression in liver is directly regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha). *J Biol Chem* **286**, 21466-21477.
- Fernandez MF, Arrebola JP, Taoufiki J, Navalon A, Ballesteros O, Pulgar R, Vilchez JL & Olea N. (2007). Bisphenol-A and chlorinated derivatives in adipose tissue of women. *Reprod Toxicol* **24**, 259-264.
- Foretz M, Carling D, Guichard C, Ferre P & Foufelle F. (1998). AMP-activated protein kinase inhibits the glucose-activated expression of fatty acid synthase gene in rat hepatocytes. *J Biol Chem* **273**, 14767-14771.
- Gamble J & Lopaschuk GD. (1997). Insulin inhibition of 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase in the heart results in activation of acetyl coenzyme A carboxylase and inhibition of fatty acid oxidation. *Metabolism* **46**, 1270-1274.

- Gluckman PD & Hanson MA. (2004). Developmental origins of disease paradigm: a mechanistic and evolutionary perspective. *Pediatr Res* **56**, 311-317.
- Gluckman PD, Hanson MA, Cooper C & Thornburg KL. (2008). Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. *N Engl J Med* **359**, 61-73.
- González A, Merino B, Marroquí L, Ñeco P, Alonso-Magdalena P, Caballero-Garrodo E, Vieira E, Soriano S, Gomis R, Nadal A & Quesada I. (2013). Insulin hypersecretion in islets from diet-induced hyperinsulinemic obese female mice is associated to several functional adaptations in individual beta-cells. *Endocrinology* **En prensa**.
- Green IC, Delaney CA, Cunningham JM, Karmiris V & Southern C. (1993). Interleukin-1 beta effects on cyclic GMP and cyclic AMP in cultured rat islets of Langerhans-arginine-dependence and relationship to insulin secretion. *Diabetologia* **36**, 9-16.
- Grun F & Blumberg B. (2007). Perturbed nuclear receptor signaling by environmental obesogens as emerging factors in the obesity crisis. *Rev Endocr Metab Disord* **8**, 161-171.
- H.A. Bern Tff, in: T. Colburn, C. Clement (Eds). (1992). Chemically-Induced Alterations in Sexual and Functional Development: The Wildlife/Human Connection. 9-15.
- Hales CN & Barker DJ. (1992). Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* **35**, 595-601.
- Hales CN & Barker DJ. (2001). The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull* **60**, 5-20.
- Hammes SR & Levin ER. (2007). Extranuclear steroid receptors: nature and actions. *Endocr Rev* **28**, 726-741.
- Henriksen JH, Tronier B & Bulow JB. (1987). Kinetics of circulating endogenous insulin, C-peptide, and proinsulin in fasting nondiabetic man. *Metabolism* **36**, 463-468.
- Hillier TA, Pedula KL, Schmidt MM, Mullen JA, Charles MA & Pettitt DJ. (2007). Childhood obesity and metabolic imprinting: the ongoing effects of maternal hyperglycemia. *Diabetes Care* **30**, 2287-2292.
- Honma S, Suzuki A, Buchanan DL, Katsu Y, Watanabe H & Iguchi T. (2002). Low dose effect of in utero exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on female mouse reproduction. *Reprod Toxicol* **16**, 117-122.
- Howdeshell KL, Hotchkiss AK, Thayer KA, Vandenberg JG & vom Saal FS. (1999). Exposure to bisphenol A advances puberty. *Nature* **401**, 763-764.

- Hugo ER, Brandebourg TD, Woo JG, Loftus J, Alexander JW & Ben-Jonathan N. (2008). Bisphenol A at environmentally relevant doses inhibits adiponectin release from human adipose tissue explants and adipocytes. *Environ Health Perspect* **116**, 1642-1647.
- Jiang L, Wang Q, Yu Y, Zhao F, Huang P, Zeng R, Qi RZ, Li W & Liu Y. (2009). Leptin contributes to the adaptive responses of mice to high-fat diet intake through suppressing the lipogenic pathway. *PLoS One* **4**, e6884.
- Johnson JH, Crider BP, McCorkle K, Alford M & Unger RH. (1990). Inhibition of glucose transport into rat islet cells by immunoglobulins from patients with new-onset insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* **322**, 653-659.
- Jones PM & Persaud SJ. (1998). Protein kinases, protein phosphorylation, and the regulation of insulin secretion from pancreatic beta-cells. *Endocr Rev* **19**, 429-461.
- Jones PM, Persaud SJ, Bjaaland T, Pearson JD & Howell SL. (1992). Nitric oxide is not involved in the initiation of insulin secretion from rat islets of Langerhans. *Diabetologia* **35**, 1020-1027.
- Kahn SE, Hull RL & Utzschneider KM. (2006). Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* **444**, 840-846.
- Kanhn CR, Weir GC, King G, Jacobson AM, Moses AC & R.J. S. (2007). *Joslin's Diabetes Mellitus, 14th edition*.
- Katzenellenbogen JA, O'Malley BW & Katzenellenbogen BS. (1996). Tripartite steroid hormone receptor pharmacology: interaction with multiple effector sites as a basis for the cell- and promoter-specific action of these hormones. *Mol Endocrinol* **10**, 119-131.
- Kavlock RJ, Daston GP, DeRosa C, Fenner-Crisp P, Gray LE, Kaattari S, Lucier G, Luster M, Mac MJ, Maczka C, Miller R, Moore J, Rolland R, Scott G, Sheehan DM, Sinks T & Tilson HA. (1996). Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ Health Perspect* **104 Suppl 4**, 715-740.
- Kelly MJ & Levin ER. (2001). Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol Metab* **12**, 152-156.
- Khoo S, Griffen SC, Xia Y, Baer RJ, German MS & Cobb MH. (2003). Regulation of insulin gene transcription by ERK1 and ERK2 in pancreatic beta cells. *J Biol Chem* **278**, 32969-32977.

- Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S & Gustafsson JA. (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 5925-5930.
- Lang IA, Galloway TS, Scarlett A, Henley WE, Depledge M, Wallace RB & Melzer D. (2008). Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *JAMA* **300**, 1303-1310.
- Lange CA, Gioeli D, Hammes SR & Marker PC. (2007). Integration of rapid signaling events with steroid hormone receptor action in breast and prostate cancer. *Annu Rev Physiol* **69**, 171-199.
- Laychock SG, Modica ME & Cavanaugh CT. (1991). L-arginine stimulates cyclic guanosine 3',5'-monophosphate formation in rat islets of Langerhans and RINm5F insulinoma cells: evidence for L-arginine:nitric oxide synthase. *Endocrinology* **129**, 3043-3052.
- Levin ER. (2009). Plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol Metab* **20**, 477-482.
- Liu J, Yu P, Qian W, Li Y, Zhao J, Huan F, Wang J & Xiao H. (2013). Perinatal bisphenol A exposure and adult glucose homeostasis: identifying critical windows of exposure. *PLoS One* **8**, e64143.
- Livak KJ & Schmittgen TD. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods* **25**, 402-408.
- Lynn FC, Skewes-Cox P, Kosaka Y, McManus MT, Harfe BD & German MS. (2007). MicroRNA expression is required for pancreatic islet cell genesis in the mouse. *Diabetes* **56**, 2938-2945.
- Ma Y, Xia W, Wang DQ, Wan YJ, Xu B, Chen X, Li YY & Xu SQ. (2013). Hepatic DNA methylation modifications in early development of rats resulting from perinatal BPA exposure contribute to insulin resistance in adulthood. *Diabetologia*.
- Markey CM, Rubin BS, Soto AM & Sonnenschein C. (2002). Endocrine disruptors: from Wingspread to environmental developmental biology. *J Steroid Biochem Mol Biol* **83**, 235-244.
- Mauvais-Jarvis F, Ueki K, Fruman DA, Hirshman MF, Sakamoto K, Goodyear LJ, Iannacone M, Accili D, Cantley LC & Kahn CR. (2002). Reduced expression of the murine p85alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase improves insulin signaling and ameliorates diabetes. *J Clin Invest* **109**, 141-149.

- McGarry JD, Mannaerts GP & Foster DW. (1977). A possible role for malonyl-CoA in the regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis. *J Clin Invest* **60**, 265-270.
- McGarry JD, Mills SE, Long CS & Foster DW. (1983). Observations on the affinity for carnitine, and malonyl-CoA sensitivity, of carnitine palmitoyltransferase I in animal and human tissues. Demonstration of the presence of malonyl-CoA in non-hepatic tissues of the rat. *Biochem J* **214**, 21-28.
- McGuinness OP, Ayala JE, Laughlin MR & Wasserman DH. (2009). NIH experiment in centralized mouse phenotyping: the Vanderbilt experience and recommendations for evaluating glucose homeostasis in the mouse. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **297**, E849-855.
- Mehran AE, Templeman NM, Brigidi GS, Lim GE, Chu KY, Hu X, Botzelli JD, Asadi A, Hoffman BG, Kieffer TJ, Bamji SX, Clee SM & Johnson JD. (2012). Hyperinsulinemia drives diet-induced obesity independently of brain insulin production. *Cell Metab* **16**, 723-737.
- Melzer D, Rice NE, Lewis C, Henley WE & Galloway TS. (2011). Association of urinary bisphenol a concentration with heart disease: evidence from NHANES 2003/06. *PLoS One* **5**, e8673.
- Memon RA, Tecott LH, Nonogaki K, Beigneux A, Moser AH, Grunfeld C & Feingold KR. (2000). Up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR-alpha) and PPAR-gamma messenger ribonucleic acid expression in the liver in murine obesity: troglitazone induces expression of PPAR-gamma-responsive adipose tissue-specific genes in the liver of obese diabetic mice. *Endocrinology* **141**, 4021-4031.
- Misler S, Falke LC, Gillis K & McDaniel ML. (1986). A metabolite-regulated potassium channel in rat pancreatic B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 7119-7123.
- Munoz-de-Toro M, Markey CM, Wadia PR, Luque EH, Rubin BS, Sonnenschein C & Soto AM. (2005). Perinatal exposure to bisphenol-A alters peripubertal mammary gland development in mice. *Endocrinology* **146**, 4138-4147.
- Murray TJ, Maffini MV, Ucci AA, Sonnenschein C & Soto AM. (2007). Induction of mammary gland ductal hyperplasias and carcinoma in situ following fetal bisphenol A exposure. *Reprod Toxicol* **23**, 383-390.
- Nadal A, Alonso-Magdalena P, Soriano S, Quesada I & Ropero AB. (2009). The pancreatic beta-cell as a target of estrogens and xenoestrogens: Implications for blood glucose homeostasis and diabetes. *Mol Cell Endocrinol* **304**, 63-68.

- Nadal A, Diaz M & Valverde MA. (2001). The estrogen trinity: membrane, cytosolic, and nuclear effects. *News Physiol Sci* **16**, 251-255.
- Nadal A, Ropero AB, Laribi O, Maillet M, Fuentes E & Soria B. (2000). Nongenomic actions of estrogens and xenoestrogens by binding at a plasma membrane receptor unrelated to estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11603-11608.
- Nadal A, Rovira JM, Laribi O, Leon-quinto T, Andreu E, Ripoll C & Soria B. (1998). Rapid insulinotropic effect of 17beta-estradiol via a plasma membrane receptor. *Faseb J* **12**, 1341-1348.
- Nagel SC, vom Saal FS, Thayer KA, Dhar MG, Boechler M & Welshons WV. (1997). Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative in vivo bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol. *Environ Health Perspect* **105**, 70-76.
- Odom DT, Zizlsperger N, Gordon DB, Bell GW, Rinaldi NJ, Murray HL, Volkert TL, Schreiber J, Rolfe PA, Gifford DK, Fraenkel E, Bell GI & Young RA. (2004). Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science* **303**, 1378-1381.
- Ozanne SE, Sandovici I & Constanica M. (2011). Maternal diet, aging and diabetes meet at a chromatin loop. *Aging (Albany NY)* **3**, 548-554.
- Paech K, Webb P, Kuiper GG, Nilsson S, Gustafsson J, Kushner PJ & Scanlan TS. (1997). Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science* **277**, 1508-1510.
- Pedram A, Razandi M & Levin ER. (2006). Nature of functional estrogen receptors at the plasma membrane. *Mol Endocrinol* **20**, 1996-2009.
- Quesada I, Fuentes E, Viso-Leon MC, Soria B, Ripoll C & Nadal A. (2002). Low doses of the endocrine disruptor bisphenol-A and the native hormone 17beta-estradiol rapidly activate transcription factor CREB. *FASEB J* **16**, 1671-1673.
- Rafacho A, Giozzet VA, Boschero AC, Abrantes JL, Cestari TM, Carneiro EM & Bosqueiro JR. (2009). Reduced pancreatic beta-cell mass is associated with decreased FoxO1 and Erk1/2 protein phosphorylation in low-protein malnourished rats. *Braz J Med Biol Res* **42**, 935-941.
- Rasmussen BB, Holmback UC, Volpi E, Morio-Liondore B, Paddon-Jones D & Wolfe RR. (2002). Malonyl coenzyme A and the regulation of functional carnitine



palmitoyltransferase-1 activity and fat oxidation in human skeletal muscle. *J Clin Invest* **110**, 1687-1693.

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

Richter CA, Birnbaum LS, Farabollini F, Newbold RR, Rubin BS, Talsness CE, Vandenberg JG, Walser-Kuntz DR & vom Saal FS. (2007). In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reprod Toxicol* **24**, 199-224.

Ropero AB, Alonso-Magdalena P, Ripoll C, Fuentes E & Nadal A. (2006). Rapid endocrine disruption: environmental estrogen actions triggered outside the nucleus. *J Steroid Biochem Mol Biol* **102**, 163-169.

Ropero AB, Fuentes E, Rovira JM, Ripoll C, Soria B & Nadal A. (1999). Non-genomic actions of 17beta-oestradiol in mouse pancreatic beta-cells are mediated by a cGMP-dependent protein kinase. *J Physiol* **521 Pt 2**, 397-407.

Ropero AB, Soria B & Nadal A. (2002). A nonclassical estrogen membrane receptor triggers rapid differential actions in the endocrine pancreas. *Mol Endocrinol* **16**, 497-505.

Ruzzin J, Petersen R, Meugnier E, Madsen L, Lock EJ, Lillefosse H, Ma T, Pesenti S, Sonne SB, Marstrand TT, Malde MK, Du ZY, Chavey C, Fajas L, Lundbye AK, Brand CL, Vidal H, Kristiansen K & Froyland L. (2010). Persistent organic pollutant exposure leads to insulin resistance syndrome. *Environ Health Perspect* **118**, 465-471.

Ryan KK, Haller AM, Sorrell JE, Woods SC, Jandacek RJ & Seeley RJ. (2010). Perinatal exposure to bisphenol-a and the development of metabolic syndrome in CD-1 mice. *Endocrinology* **151**, 2603-2612.

Sabanayagam C, Teppala S & Shankar A. (2013). Relationship between urinary bisphenol A levels and prediabetes among subjects free of diabetes. *Acta Diabetol* **50**, 625-631.

Safe S & Kim K. (2008). Non-classical genomic estrogen receptor (ER)/specificity protein and ER/activating protein-1 signaling pathways. *J Mol Endocrinol* **41**, 263-275.

Samnegard B & Brundin T. (2001). Renal extraction of insulin and C-peptide in man before and after a glucose meal. *Clin Physiol* **21**, 164-171.

Sandovici I, Smith NH, Nitert MD, Ackers-Johnson M, Uribe-Lewis S, Ito Y, Jones RH, Marquez VE, Cairns W, Tadayyon M, O'Neill LP, Murrell A, Ling C, Constanica M &

- Ozanne SE. (2011). Maternal diet and aging alter the epigenetic control of a promoter-enhancer interaction at the *Hnf4a* gene in rat pancreatic islets. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 5449-5454.
- Santos RM, Rosario LM, Nadal A, Garcia-Sancho J, Soria B & Valdeolmillos M. (1991). Widespread synchronous  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations due to bursting electrical activity in single pancreatic islets. *Pflugers Arch* **418**, 417-422.
- Seino S & Bell GI. (2008). Pancreatic Beta Cell in Health and Diseases.
- Selye H. (1967). [30 years of research on stress]. *Landarzt* **43**, 437-444.
- Shanik MH, Xu Y, Skrha J, Dankner R, Zick Y & Roth J. (2008). Insulin resistance and hyperinsulinemia: is hyperinsulinemia the cart or the horse? *Diabetes Care* **31 Suppl 2**, S262-268.
- Shankar A & Teppala S. (2011). Relationship between urinary bisphenol A levels and diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* **96**, 3822-3826.
- Sharpe RM & Drake AJ. (2013). Obesogens and obesity - an alternative view? *Obesity (Silver Spring)*.
- Silva E, Rajapakse N & Kortenkamp A. (2002). Something from "nothing"--eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. *Environ Sci Technol* **36**, 1751-1756.
- Silver MK, O'Neill MS, Sowers MR & Park SK. (2011). Urinary bisphenol A and type-2 diabetes in U.S. adults: data from NHANES 2003-2008. *PLoS One* **6**, e26868.
- Sone H & Kagawa Y. (2005). Pancreatic beta cell senescence contributes to the pathogenesis of type 2 diabetes in high-fat diet-induced diabetic mice. *Diabetologia* **48**, 58-67.
- Soriano S, Alonso-Magdalena P, Garcia-Arevalo M, Novials A, Muhammed SJ, Salehi A, Gustafsson JA, Quesada I & Nadal A. (2012). Rapid insulinotropic action of low doses of bisphenol-A on mouse and human islets of Langerhans: role of estrogen receptor beta. *PLoS One* **7**, e31109.
- Soriano S, Ropero AB, Alonso-Magdalena P, Ripoll C, Quesada I, Gassner B, Kuhn M, Gustafsson JA & Nadal A. (2009). Rapid regulation of K(ATP) channel activity by 17{beta}-estradiol in pancreatic {beta}-cells involves the estrogen receptor {beta} and the atrial natriuretic peptide receptor. *Mol Endocrinol* **23**, 1973-1982.

- Soriguer F, Goday A, Bosch-Comas A, Bordiu E, Calle-Pascual A, Carmena R, Casamitjana R, Castano L, Castell C, Catala M, Delgado E, Franch J, Gaztambide S, Girbes J, Gomis R, Gutierrez G, Lopez-Alba A, Martinez-Larrad MT, Menendez E, Mora-Peces I, Ortega E, Pascual-Manich G, Rojo-Martinez G, Serrano-Rios M, Valdes S, Vazquez JA & Vendrell J. (2012). Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: the Di@bet.es Study. *Diabetologia* **55**, 88-93.
- Stahlhut RW, Welshons WV & Swan SH. (2009). Bisphenol A data in NHANES suggest longer than expected half-life, substantial nonfood exposure, or both. *Environ Health Perspect* **117**, 784-789.
- Sun Y, Irie M, Kishikawa N, Wada M, Kuroda N & Nakashima K. (2004). Determination of bisphenol A in human breast milk by HPLC with column-switching and fluorescence detection. *Biomed Chromatogr* **18**, 501-507.
- Sutter-Dub MT. (1979). Effects of pregnancy and progesterone and/or oestradiol on the insulin secretion and pancreatic insulin content in the perfused rat pancreas. *Diabete Metab* **5**, 47-56.
- Sutter-Dub MT. (2002). Rapid non-genomic and genomic responses to progestogens, estrogens, and glucocorticoids in the endocrine pancreatic B cell, the adipocyte and other cell types. *Steroids* **67**, 77-93.
- Sutter-Dub MT, Faure A, Aerts L & Van Assche FA. (1978). Effects of progesterone and 17-beta-oestradiol treatments on the pancreatic B cell castrated female rats. Biochemical variations. *J Physiol (Paris)* **74**, 725-730.
- T Damstra SB, A Bergman, RJ Kavlock, van der Kraak Geds. (2002). 2002 Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. Genova: World Health Organization.
- Terauchi Y, Tsuji Y, Satoh S, Minoura H, Murakami K, Okuno A, Inukai K, Asano T, Kaburagi Y, Ueki K, Nakajima H, Hanafusa T, Matsuzawa Y, Sekihara H, Yin Y, Barrett JC, Oda H, Ishikawa T, Akanuma Y, Komuro I, Suzuki M, Yamamura K, Kodama T, Suzuki H, Koyasu S, Aizawa S, Tobe K, Fukui Y, Yazaki Y & Kadowaki T. (1999). Increased insulin sensitivity and hypoglycaemia in mice lacking the p85 alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Nat Genet* **21**, 230-235.
- Tilghman SL, Bratton MR, Segar HC, Martin EC, Rhodes LV, Li M, McLachlan JA, Wiese TE, Nephew KP & Burow ME. (2012). Endocrine disruptor regulation of microRNA expression in breast carcinoma cells. *PLoS One* **7**, e32754.
- Ueki K, Algenstaedt P, Mauvais-Jarvis F & Kahn CR. (2000). Positive and negative regulation of phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling pathways by three

different gene products of the p85alpha regulatory subunit. *Mol Cell Biol* **20**, 8035-8046.

Ueki K, Fruman DA, Yballe CM, Fasshauer M, Klein J, Asano T, Cantley LC & Kahn CR. (2003). Positive and negative roles of p85 alpha and p85 beta regulatory subunits of phosphoinositide 3-kinase in insulin signaling. *J Biol Chem* **278**, 48453-48466.

Vaag AA, Grunnet LG, Arora GP & Brons C. (2012). The thrifty phenotype hypothesis revisited. *Diabetologia* **55**, 2085-2088.

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

Valdeolmillos M, Nadal A, Soria B & 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.

Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR, Jr., Lee DH, Shioda T, Soto AM, vom Saal FS, Welshons WV, Zoeller RT & Myers JP. (2012). Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr Rev* **33**, 378-455.

Vandenberg LN, Chahoud I, Padmanabhan V, Paumgartten FJ & Schoenfelder G. (2010). Biomonitoring studies should be used by regulatory agencies to assess human exposure levels and safety of bisphenol A. *Environ Health Perspect* **118**, 1051-1054.

Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N & Welshons WV. (2007a). Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod Toxicol* **24**, 139-177.

Vandenberg LN, Maffini MV, Schaeberle CM, Ucci AA, Sonnenschein C, Rubin BS & Soto AM. (2008). Perinatal exposure to the xenoestrogen bisphenol-A induces mammary intraductal hyperplasias in adult CD-1 mice. *Reprod Toxicol* **26**, 210-219.

Vandenberg LN, Maffini MV, Wadia PR, Sonnenschein C, Rubin BS & Soto AM. (2007b). Exposure to environmentally relevant doses of the xenoestrogen bisphenol-A alters development of the fetal mouse mammary gland. *Endocrinology* **148**, 116-127.

Vidal-Puig A, Figuerola Pino D, Reynals de Blasis E, Ruiz M & Ruiz Morosini ML. (2012). Diabetes Mellitus. In *Medicina Interna*, ed. Elsevier, pp. 1759-1791.

- Vidal-Puig A, Jimenez-Linan M, Lowell BB, Hamann A, Hu E, Spiegelman B, Flier JS & Moller DE. (1996). Regulation of PPAR gamma gene expression by nutrition and obesity in rodents. *J Clin Invest* **97**, 2553-2561.
- vom Saal FS, Akingbemi BT, Belcher SM, Birnbaum LS, Crain DA, Eriksen M, Farabollini F, Guillette LJ, Jr., Hauser R, Heindel JJ, Ho SM, Hunt PA, Iguchi T, Jobling S, Kanno J, Keri RA, Knudsen KE, Laufer H, LeBlanc GA, Marcus M, McLachlan JA, Myers JP, Nadal A, Newbold RR, Olea N, Prins GS, Richter CA, Rubin BS, Sonnenschein C, Soto AM, Talsness CE, Vandenberg JG, Vandenberg LN, Walser-Kuntz DR, Watson CS, Welshons WV, Wetherill Y & Zoeller RT. (2007). Chapel Hill bisphenol A expert panel consensus statement: integration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current levels of exposure. *Reprod Toxicol* **24**, 131-138.
- vom Saal FS & Myers JP. (2010). Good laboratory practices are not synonymous with good scientific practices, accurate reporting, or valid data. *Environ Health Perspect* **118**, A60; author reply A61.
- vom Saal FS, Timms BG, Montano MM, Palanza P, Thayer KA, Nagel SC, Dhar MD, Ganjam VK, Parmigiani S & Welshons WV. (1997). Prostate enlargement in mice due to fetal exposure to low doses of estradiol or diethylstilbestrol and opposite effects at high doses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 2056-2061.
- Wang T, Li M, Chen B, Xu M, Xu Y, Huang Y, Lu J, Chen Y, Wang W, Li X, Liu Y, Bi Y, Lai S & Ning G. (2012). Urinary bisphenol A (BPA) concentration associates with obesity and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* **97**, E223-227.
- Watson CS, Bulayeva NN, Wozniak AL & Alyea RA. (2007). Xenoestrogens are potent activators of nongenomic estrogenic responses. *Steroids* **72**, 124-134.
- Watson CS, Bulayeva NN, Wozniak AL & Finnerty CC. (2005). Signaling from the membrane via membrane estrogen receptor-alpha: estrogens, xenoestrogens, and phytoestrogens. *Steroids* **70**, 364-371.
- Wei J, Lin Y, Li Y, Ying C, Chen J, Song L, Zhou Z, Lv Z, Xia W, Chen X & Xu S. (2011). Perinatal exposure to bisphenol A at reference dose predisposes offspring to metabolic syndrome in adult rats on a high-fat diet. *Endocrinology* **152**, 3049-3061.
- Wei M. (2009). Association of bisphenol A with diabetes and other abnormalities. *Jama* **301**, 720; author reply 721-722.
- Weihua Z, Andersson S, Cheng G, Simpson ER, Warner M & Gustafsson JA. (2003). Update on estrogen signaling. *FEBS Lett* **546**, 17-24.

- Weihua Z, Saji S, Makinen S, Cheng G, Jensen EV, Warner M & Gustafsson JA. (2000). Estrogen receptor (ER) beta, a modulator of ERalpha in the uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 5936-5941.
- Welshons WV, Nagel SC & vom Saal FS. (2006). Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology* **147**, S56-69.
- Wetherill YB, Akingbemi BT, Kanno J, McLachlan JA, Nadal A, Sonnenschein C, Watson CS, Zoeller RT & Belcher SM. (2007). In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reprod Toxicol* **24**, 178-198.
- Whitehead JP, Richards AA, Hickman IJ, Macdonald GA & Prins JB. (2006). Adiponectin--a key adipokine in the metabolic syndrome. *Diabetes Obes Metab* **8**, 264-280.
- Wong WP, Tiano JP, Liu S, Hewitt SC, Le May C, Dalle S, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS, Korach KS & Mauvais-Jarvis F. (2010). Extranuclear estrogen receptor-alpha stimulates NeuroD1 binding to the insulin promoter and favors insulin synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 13057-13062.
- Wozniak AL, Bulayeva NN & Watson CS. (2005). Xenoestrogens at picomolar to nanomolar concentrations trigger membrane estrogen receptor-alpha-mediated Ca<sup>2+</sup> fluxes and prolactin release in GH3/B6 pituitary tumor cells. *Environ Health Perspect* **113**, 431-439.
- Yildiz N & Barlas N. (2013). Hepatic and renal functions in growing male rats after bisphenol A and octylphenol exposure. *Hum Exp Toxicol* **32**, 675-686.
- Zalko D, Soto AM, Dolo L, Dorio C, Rathahao E, Debrauwer L, Faure R & Cravedi JP. (2003). Biotransformations of bisphenol A in a mammalian model: answers and new questions raised by low-dose metabolic fate studies in pregnant CD1 mice. *Environ Health Perspect* **111**, 309-319.
- Zawalich WS & Zawalich KC. (2001). Effects of protein kinase C inhibitors on insulin secretory responses from rodent pancreatic islets. *Mol Cell Endocrinol* **177**, 95-105.
- Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ & Moller DE. (2001). Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* **108**, 1167-1174.
- Zoeller RT, Brown TR, Doan LL, Gore AC, Skakkebaek NE, Soto AM, Woodruff TJ & Vom Saal FS. (2012). Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: a

statement of principles from The Endocrine Society. *Endocrinology* **153**, 4097-4110.

Zoppi CC, Silveira LR, Oliveira CA, Boschero AC, Curi R & Carneiro EM. (2010). Insulin release, peripheral insulin resistance and muscle function in protein malnutrition: a role of tricarboxylic acid cycle anaplerosis. *Br J Nutr* **103**, 1237-1250.

<http://www.betacell.org>

[http://www.who.int/foodsafety/fs\\_management/No\\_05\\_Bisphenol\\_A\\_Nov09\\_sp.pdf](http://www.who.int/foodsafety/fs_management/No_05_Bisphenol_A_Nov09_sp.pdf)

<http://www.epa.gov/iris/subst/0356.htm>

<http://servicat.escet.urjc.es:8080/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

[http://www.bioinformatics.org/sms2/pcr\\_primer\\_stats.html](http://www.bioinformatics.org/sms2/pcr_primer_stats.html)







