



DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA APLICADA
INSTITUTO DE BIOINGENIERÍA

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

**Memoria presentada por
Beatriz Merino Antolín
Para optar al grado de doctor**

Dirigida por Dr. Ivan Quesada Moll

ELCHE, 2015



Instituto de Bioingeniería
Universidad Miguel Hernández

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
Beatriz Merino Antolín, titulada “**Adaptaciones funcionales y
estructurales de la célula alfa pancreática en un modelo de
obesidad inducida por dieta rica en grasa**”, que se desarrolló
dentro del programa de doctorado de Bioingeniería de este instituto de
investigación.

Lo firmo, a instancias del interesado y a los efectos oportunos, en
Elche a de de 2015

EUGENIO VILANOVA GISBERT
Catedrático de Toxicología
Director del Instituto de Bioingeniería



Instituto de Bioingeniería
Universidad Miguel Hernández

Dr. **IVÁN QUESADA MOLL**, Profesor Titular en la Universidad Miguel Hernández,

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de investigación titulado “**Adaptaciones funcionales y estructurales de la célula alfa pancreática en un modelo de obesidad inducida por dieta rica en grasa**”, presentado por Beatriz Merino Antolín para optar al grado de doctor en Bioingeniería, ha sido realizado bajo su 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, firma el presente certificado,

en Elche a

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

A mi padre,

Ha sido un placer aprender a caminar contigo.



Beatriz Merino Antolín

Unidad de Fisiología Celular y Nutrición.

Instituto de Bioingeniería. Universidad Miguel Hernández.

Edificio Vinalopó. Avda. de la Universidad s/n

03202. Elche (Alicante), España.

bmerino@umh.es

+34 965 22 20 12

Experiencia en Investigación:

[Septiembre 2011- Actualidad] **INSTITUTO BIOINGENIERÍA. UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE.** Elche.

Beca de Formación de Personal de Investigación (FPI) BES2011-047012 con duración de 48 meses. ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN DE LA LEPTINA Y LA RESISTENCIA DE LA LEPTINA EN LAS CÉLULAS ALPHA Y BETA DEL ISLOTE DE LANGERHANS. BFU2010-21773.

[Abril-Julio 2015] **INSTITUTO DE BIOLOGÍA Y GENÉTICA MOLECULAR (IBGM). UNIVERSIDAD DE VALLADOLID Y CSIC.** Valladolid.

Estancia breve de colaboración en proyecto común con la Universidad Miguel Hernández (Elche). (Monitorización de calcio intracelular en islote pancreático aislado).

[Septiembre – Diciembre 2014] **LABORATOIRE DE MÉDECINE EXPÉRIMENTALE [LABORATORY OF EXPERIMENTAL MEDICINE]. UNIVERSITÉ LIBRE DE BRUXELLES.** Bruselas (Bélgica).

Beca de estancia breve en el extranjero dentro del programa FPI 2011, 3 meses. (Evaluación de apoptosis celular por inmunomarcaje en tejido de páncreas, perfeccionamiento de técnicas de inmunohistoquímica).

[Septiembre – Diciembre 2013] **LABORATOIRE DE MÉDECINE EXPÉRIMENTALE [LABORATORY OF EXPERIMENTAL MEDICINE]. UNIVERSITÉ LIBRE DE BRUXELLES.** Bruselas (Bélgica).

Beca de estancia breve en el extranjero dentro del programa FPI 2011, 3 meses. (Técnicas de cultivo celular, extracción de ARN, DNAc, detección y evaluación de NO, transfección celular).

[Octubre 2009- Julio 2010] **INSTITUTO BIOMEDICINA DE LEÓN. INBIOMED.** León.

Trabajo de investigación tutelado: ESTUDIO DE MECANISMOS MOLECULARES Y CELULARES IMPLICADOS EN EL DESARROLLO Y LA EVOLUCIÓN DE LA ESTEATOSIS EN PATOLOGÍAS HEPÁTICAS. Efecto de terapias alternativas. (Mantenimiento de cultivos celulares, técnicas de citometría de flujo, PCR, cuantificación de expresión génica por Western blot).

[Julio y Agosto 2008] **COMPLEJO ASISTENCIAL DE PALENCIA. HOSPITAL RÍO CARRIÓN.** Palencia

Prácticas propias de la titulación (Ldo. En Biología) dentro del Convenio para desarrollo de un programa de Cooperación Educativa (R.D. 1497/81 y 1845/94) Prácticas en inmunohematología.

[Julio y Agosto 2007] **COMPLEJO ASISTENCIAL DE PALENCIA. HOSPITAL RÍO CARRIÓN.** Palencia

Prácticas propias de la titulación (Ldo. En Biología) dentro del Convenio para desarrollo de un programa de Cooperación Educativa (R.D. 1497/81 y 1845/94) Prácticas en preanalítica, hemograma, inmunohematología.

Educación:

- **2010. MÁSTER UNIVERSITARIO EN METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN EN BIOLOGÍA FUNDAMENTAL Y BIOMEDICINA.** (Incluye curso de Experimentación Animal, categoría C homologado por Generalitat Valenciana). Universidad de León.
- **2010. TRABAJO DE INVESTIGACIÓN TUTELADO (DEA). IBIOMED:** “ESTUDIO DE LOS MECANISMOS MOLECULARES Y CELULARES IMPLICADOS EN EL DESARROLLO Y EVOLUCIÓN DE LA ESTEATOSIS EN PATOLOGÍAS HEPÁTICAS”. Universidad de León.
- **2008. LICENCIADA EN BIOLOGÍA** (Especialidad Fundamental). Universidad de León.

Publicaciones:

1. *Role of the clock gene Rev-erb alpha in metabolism and in the endocrine pancreas.*

Vieira E., **Merino B.**, Quesada I. Diab Obes Metab. (En revisión)

2. *Pancreatic alpha-cells undergo morphofunctional changes during the compensatory adaptations of the endocrine pancreas to diet-induced obesity.*

Merino B., Lluesma M, Ñeco P, Gonzalez A, Marroquí L, García-Arévalo M, AlonsoMagdalena P, Nadal A, Quesada I. Scientific Reports (En revisión)

3. *Glucagon increases beating rate but not contractility in rat right atrium. Comparison with isoproterenol.*

Merino B., Quesada I, Hernandez-Cascales J. Plos One. (En revisión)

4. *The bile acid TUDCA increases glucose-induced insulin secretion via the cAMP/PKA pathway in the pancreatic beta cell.*

Jean Vettorazzi, Rosane A Ribeiro, Patricia C Borck, Renato Chaves S Branco, Sergi Soriano, **Beatriz Merino**, Antonio C Boschero, Angel Nadal, Ivan Quesada, Everardo M Carneiro. *Metabolism* (En revisión).

5. *Pancreatic α Cells are resistant to metabolic stress-induced apoptosis in Type 2 Diabetes.*

Laura Marroquí, Matilde Masini, **Beatriz Merino**, Fabio A. Grieco, Isabelle Millard, Christine Dubois, Ivan Quesada, Piero Marchetti, Miriam Cnop, Decio L. Eizirik. *EBioMedicine* 03/2015; 62. DOI: 10.1016/j.ebiom.2015.03.012.

6. *Nutrient regulation of glucagon secretion: involvement in metabolism and diabetes.*

Laura Marroquí; Paloma Alonso-Magdalena; **Beatriz Merino**; Esther Fuentes; Ángel Nadal; Iván Quesada. *Nutrition Research Reviews/ Nutrition Society. Nutr Res Rev.* 2014 Jun;27(1):48-62. doi: 10.1017/S0954422414000031. Epub 2014 Apr 10. Review.

7. *Pancreatic alpha-cell dysfunction contributes to the disruption of glucose homeostasis and compensatory insulin hypersecretion in glucocorticoid-treated rats.*

Rafacho A, Gonçalves-Neto L, Santos-Silva JC, Alonso-Magdalena P, **Merino B**, Taboga SR, Carneiro EM, Boschero AC, Nadal A, Quesada I. *Plos One.* PLoS One. 2014 Apr 4;9(4):e93531. doi: 10.1371/journal.pone.0093531. eCollection 2014.

8. *Involvement of the clock gene Rev-erb alpha in the regulation of glucagon secretion in pancreatic alpha-cells.*

Vieira E, Marroquí L, Figueroa AL, **Merino B**, Fernandez-Ruiz R, Nadal A, Burris TP, Gomis R, Quesada I. *PLoS One.* 2013 Jul 25;8(7):e69939. doi: 10.1371/journal.pone.0069939. Print 2013.

9. *Insulin hypersecretion in islets from diet-induced hyperinsulinemic obese female mice is associated to several functional adaptations in individual beta-cells.*

González A, **Merino B**, Marroquí L, Ñeco P, Alonso-Magdalena P, Caballero-Garrido E, Soriano S, Nadal A, Quesada I. Endocrinology. 2013 Oct;154(10):3515-24. doi: 10.1210/en.2013-1424. Epub 2013 Jul 18.3

Comunicaciones a congresos:

1. XXVII CONGRESO DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS. Granada (España). Septiembre 2014. Oral. "Pancreatic alpha cells adaptations associated with high fat diet induced obesity".

Merino B, Lluesma M, Ñeco P, González A, Marroquí L, Alonso-Magdalena P, García-Arévalo M, Nadal A, Quesada I.

2. ISG2014 / ANNUAL MEETING OF THE EASD ISLET STUDY GROUP. : Lausanne, Switzerland. Póster "Enhanced beta-cell function allows adaptation to insulin resistance in mice submitted to high fat diet."

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

3. 49TH ANNUAL MEETING OF THE EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF DIABETES. Barcelona (España). Septiembre 2013. Póster "The clock gene rev-erb-alpha regulates glucagon secretion in mouse pancreatic alpha-cells".

Vieira E, Marroqui L, Figueroa AC, **Merino B**, Fernandez Ruiz R, Nadal A, Burris TP, Gomis R, Quesada I.

4. ISG2013 / ANNUAL MEETING OF THE EASD ISLET STUDY GROUP. Sitges (España). Septiembre 2013. Póster. "Hyperglucagonemia associated with diet-induced obesity as a result of structural adaptation of pancreatic alpha-cells."

Merino B, Lluesma M, Ñeco P, González A, Marroquí L, Alonso-Magdalena P, García-Arévalo M, Nadal A, Quesada I

5. INTERNATIONAL EARLY CAREER SYMPOSIUM. IUPS 2013. Birmingham (Reino Unido). Julio 2013. Póster “Functional and structural characterization of pancreatic alpha cells in a model of high fat diet induced obesity”.

Merino B, Lluesma M, Ñeco P, González A, Marroquí L, Alonso-Magdalena P, García-Arévalo M, Nadal A, Quesada I.

6. ION CHANNELS IN THE VALLEY. A Journey through a ions and living systems. Montegrande (Chile). Abril 2013. Oral “Insulin hypersecretion in islets from diet-induced hyperinsulinemic obese mice is associated to several functional adaptations in individual beta-cells”. González A, **Merino B**, Alonso-Magdalena P, Ñeco P, Marroquí L, Caballero-Garrido E, Soriano S, Nadal A, Quesada I.

7. ANNUAL MEETING OF THE EASD ISLET STUDY GROUP. Rostock (Alemania). Octubre 2012. Póster “Role of pancreatic alpha-cells in protein malnutrition”.

Merino B, Marroquí L, Batista T, González A, Vieira E, Rafacho A, Colleta Taboga S, Bosquero A, Nadal A, Carneiro E, Quesada I.

Póster “Enhanced beta-cell function allows adaptation to insulin resistance in mice submitted to high fat diet”

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

8. CIBERDEM Annual Meeting. Barcelona (España). Octubre 2012. Póster: “Pancreatic beta cell adaptations during diet-induced obesity” Ñeco P, González A, **Merino B**, Alonso-Magdalena P, Marroquí L, Caballero-Garrido E, Sorino S, Nadal A, Quesada I.

9. FEPS & Spanish Physiological Society Scientific Science Congress. Santiago de Compostela (España). Septiembre 2012. Póster “Funtional and Structural beta-cell adaptations during diet-induced obesity”

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

Póster “Protein malnutrition in mice leads to funcional and structural adaptations in the pancreatic alpha-cells and alterations in glucagon signaling”

Merino B, Marroquí L, Batista T, González A, Vieira E, Rafacho A, Colleta Taboga S, Bosquero A, Nadal A, Carneiro E, Quesada I.



AGRADECIMIENTOS

En este momento en el que toca echar la vista atrás para hacer balance de los apoyos y aprendizajes recibidos durante este importante periodo, creo que debo comenzar los agradecimientos mencionando a mi director de tesis, el Dr. Iván Quesada. Gracias por la confianza que depositaste en mí desde el principio y por la oportunidad de realizar esta tesis en tu grupo de investigación y bajo tu dirección. Al Dr. Ángel Nadal Navajas, por llevar el barco siempre a puerto y confiar siempre en nosotros. A las Dras. Esther Fuentes Marhuenda y Cristina Ripoll Orts por el apoyo y los consejos. Gracias a las entidades financiadoras que han hecho posible el desarrollo de este proyecto.

Gracias a la Dra. Paloma Alonso-Magdalena y al Dr. Sergi Soriano Úbeda, por el apoyo científico y sobre todo por la incondicionalidad personal, sin vosotros este camino habría sido mucho más difícil. A mis hermanos científicos especialmente, el Dr. Alejandro González Álvarez, sin duda uno de los mejores científicos que he conocido y una de las personas de las que más he aprendido en esta etapa, tanto en lo personal cómo en lo profesional y La Dra. Marta García-Arévalo, por ser mi amiga, mi compañera, darme ánimos cuando no había de donde sacarlos, la familia se hace por el camino y vosotros sois una buena muestra de ello. A los compañeros de andanzas en los primeros pasos del camino, las Dras. Laura Marroquí Esclapez y Elaine Viera. A la Dra. Ana Belén Roperó, gran compañera, siempre alegre el día encontrarte por los pasillos.

Gracias a los compañeros de bancada de todos estos años, tanto en el labo como en las estancias fuera de él. Sabrina Villar, porque yo también quería ser vedette, fuiste un gran descubrimiento en nuestra estancia, nunca pierdas esa esencia, Eva Bru mantén esa

fuerza y alegría hasta el final, harás grandes cosas, tienes una materia prima sin igual. Gracias a Luisi y Salomé, por ayudarnos siempre y por las canciones y las risas en la sala de aislamiento. Gracias a Jean Vettorazzi, por su eterna sonrisa y las cenas en casita. A Olatz Villate, me demostraste más en tres meses de estancia que mucha gente en toda una vida, y a todo el grupo de investigación de Labomedex por acogerme en la estancia como a una más, Fabio, Loriana, Mika, Baroj, Flora, Kassem, Tarlizza... Sois todos increíbles. Y por supuesto a los "crápulas de la ciencia", Juan y Armando, por los increíbles congresos.

Gracias a los compañeros del animalario, Irene, Ángel, Alberto y Juana Mari, por ayudarnos siempre en todo lo posible y sacarnos una sonrisa entre ratón y ratón. A los compañeros de la planta de Encarna por estar siempre dispuestos a echar una manita. Y las camareras de la Universidad Miguel Hernández, por su eterna paciencia y sus sonrisas mañaneras.

Gracias a los compañeros de Valladolid: Macarena, Miriam y Jonathan y Paloma, por acogerme cómo a una más y hacerme sentir cómo en casa, y a los jefes de grupo Javier y Maite por darme la oportunidad de trabajar y aprender con ellos.

A mis palentinos del alma, por estar siempre ahí, y cuando digo siempre, comienzo a recordar el parvulario: David, Cova, María, Ade, Celia, Miguel, Bego, y a las incorporaciones posteriores Pepi, Juan, Plaza, Rodri, vuestro apoyo personal y las quedadas anuales siempre me dan un aporte de oxígeno para continuar. Y después de Palencia, subimos a León, cómo olvidar a mi Negra, compañera de andanzas desde el comienzo de la licenciatura, y aunque ahora en la distancia, pequeña chilena, siempre habrá un gracias para ti, por los momentos irrepetibles que vivimos en nuestra ciudad universitaria. Gracias a

todos los compañeros de facultad, máster y cursos de doctorado; al laboratorio de Biomedicina de León, que me dio la oportunidad de iniciarme en la investigación y a los Asturianos, que me iniciaron en aquello del conocimiento de “INEF”, un mundo sin igual, gracias a Dani y a Lidia en especial. Gracias a Meibe y Lauris por las aventuras de piso de estudiantes.

A Gabriel, gracias por aparecer cuando más lo necesitaba, por hacerme sentir especial cada día, por quererme y hacerme feliz. Gracias por ayudarme a levantarme, darme siempre ánimos y hacerme sonreír. Para siempre me parece poco tiempo para estar a tu lado.

A mi familia, a los tatos, porque son el mejor regalo que me dieron mis padres y aunque esté lejos siempre los tengo cerca. Gracias a mis dos enanos por hacerme sentir orgullosa de ser hermana mayor. A mi madre, una mujer que me ha demostrado que se pueden sacar fuerzas de dónde crees que no las hay, una incondicional en el apoyo a sus hijos y un ejemplo de lucha diaria. Estoy muy orgullosa de formar parte de esta familia.

Y con el permiso de todos, un gran GRACIAS, el mayor de todos, a mi padre: La persona a la que más he admirado en esta vida, mi guía y mi ejemplo de integridad, lucha y honestidad. Nunca pensé que no iba a compartir este momento contigo, sé que dónde estés estarás tan orgulloso de mi como siempre me demostraste. Sólo puedo decir que siempre te querré, y que fue un inmenso placer aprender a caminar contigo.

Va por ti papá.

ÍNDICE

ABREVIATURAS:.....	25
RESUMEN:.....	29
ABSTRACT:	33
I. INTRODUCCIÓN	35
1. PÁNCREAS ENDOCRINO: EL ISLOTE DE LANTHERGANS.	37
2. HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA.	40
3. LA CÉLULA ALFA:.....	42
ACOPLAMIENTO ESTÍMULO SECRECIÓN.....	42
<i>PAPEL DEL K_{ATP} EN LA CÉLULA ALFA:</i>	42
<i>CANALES IÓNICOS IMPLICADOS EN EL ACOPLAMIENTO ESTÍMULO-SECRECIÓN:</i>	46
4. GLUCAGÓN:	49
FUNCIONES PRINCIPALES DEL GLUCAGÓN:.....	50
REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DEL GLUCAGÓN: ..	54
RECEPTOR DEL GLUCAGÓN:	55
REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE GLUCAGÓN.	56
1. Control Autocrino:	57
2. Control Paracrino:	57
3. Regulación por glucosa:	58
5. DIABETES MELLITUS:.....	60
DIAGNÓSTICO:	62
PREVALENCIA:	63
CLASIFICACIÓN ETIOLÓGICA DE LA DIABETES:.....	65
7. IMPLICACIONES DE LA CÉLULA ALFA EN DIABETES.....	69
II. OBJETIVOS	73
III. MATERIAL Y MÉTODOS	77
1. MODELO DE OBESIDAD:	79
2. AISLAMIENTO DE LOS ISLOTES DE LANGERHANS.....	80
3. CULTIVO DE CÉLULAS PANCREÁTICAS:.....	82

4. TEST DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA INTRAPERITONEAL (ipGTT).....	83
5. TEST INTRAPERITONEAL DE RESISTENCIA A LA INSULINA (ipITT).....	83
6. EVALUACIÓN DE VALORES SANGUÍNEOS.....	84
7. ENSAYO ELISA.....	85
7.1 ELISA DE INSULINA.	85
7.2. ELISA DE GLUCAGÓN.	87
7.3. ELISA DE SOMATOSTATINA.	88
7.4. ELISA DE GLP-1.	89
8. SECRECIÓN Y CONTENIDO DE GLUCAGÓN.....	90
9. MICROSCOPIA CONFOCAL.....	92
9.1. REGISTROS DE SEÑALIZACIÓN DE CALCIO EN CÉLULA ALFA DE ISLOTE INTACTO.....	94
10. ELECTROFISIOLOGÍA.....	96
10.1. REGISTROS DE CAPACITANCIA EN CÉLULA ALFA.	97
11. ESTUDIO HISTOLÓGICO:	99
11.1. PREPARACIÓN DE BLOQUES DE PARAFINA.	99
11.2 INMUNOHISTOQUÍMICA DE GLUCAGÓN EN TEJIDOS PARAFINADOS.....	100
11.3 INMUNOFLUORESCENCIA DE INSULINA Y GLUCAGÓN. DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO CELULAR.....	103
11.4. PROLIFERACIÓN.....	105
11.5. APOPTOSIS.	107
12. ESTADÍSTICA:	110
IV. RESULTADOS	111
0. CARACTERIZACIÓN DEL MODELO DE OBESIDAD:	113
1. COMPARACIÓN DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE GLUCOSA Y GLUCAGÓN ENTRE LOS RATONES ALIMENTADOS CON DIETA HFD Y LOS RATONES ALIMENTADOS CON DIETA ND.	117

2. LA ALIMENTACIÓN CON DIETA RICA EN GRASA PRODUCE ALTERACIONES EN EL CONTENIDO Y SECRECIÓN DE GLUCAGÓN EN EL ISLOTE DE LANGERHANS.	122
3. LOS PATRONES DE LA SEÑAL INTRACELULAR DE CALCIO Y DE LA CAPACITANCIA CELULAR NO VARÍAN EN LA CÉLULA ALFA ENTRE RATONES ND Y HFD.....	125
4. LOS RATONES HFD MUESTRAN UN DESCENSO EN LA MASA DE CÉLULA ALFA, ASÍ CÓMO EN EL TAMAÑO CELULAR Y LA PROLIFERACIÓN.	129
5. CARACTERIZACIÓN DEL MODELO DE OBESIDAD TRAS 6 MESES DE ADMINISTRACIÓN DE DIETA ALTA EN GRASA.	133
6. LOS RATONES ALIMENTADOS CON DIETA HFD DURANTE 6 MESES TIENEN LOS MISMOS NIVELES DE GLUCAGÓN CIRCULANTE.....	135
7. LA SECRECIÓN DE GLUCAGÓN TRAS 6 MESES DE TRATAMIENTO CONTINÚA ALTERADA, PERO DESAPARECEN LAS DIFERENCIAS EN EL CONTENIDO DE GLUCAGÓN.....	136
8. EN LOS RATONES OBESOS, TRAS 24 SEMANAS DE DIETA, LA MASA DE CÉLULA ALFA NO MUESTRA DIFERENCIAS CON EL CONTROL Y EL TAMAÑO CELULAR AUMENTA.....	138
V. DISCUSIÓN	141
ALTERACIONES PLASMÁTICAS:	147
Efecto de la dieta sobre los niveles circulantes de glucagón en plasma:	147
Efecto de la dieta sobre los niveles hormonales circulantes en plasma:	150
ALTERACIONES FUNCIONALES EN LAS CÉLULAS ALFA PANCREÁTICAS.....	152
Evaluación de secreción y contenido <i>in vitro</i> :.....	152
Evaluación del patrón oscilatorio de calcio y la dinámica de exocitosis celular:	155
ALTERACIONES ESTRUCTURALES:	156
Efecto de la dieta rica en grasa sobre la masa total de célula alfa pancreática.....	156

Efecto de la dieta alta en grasa sobre proliferación y apoptosis:	158
.....	158
VI. CONCLUSIONES	163
VII. BIBLIOGRAFÍA	169



ABREVIATURAS:

4-AP: *4-aminopiridine*. A-aminopiridina.

ABC: *Avidin/biotine complex*.

AC: *Adenylate Cyclase*. Adenilato Ciclasa

ADP: *Adenosine diphosphate*. Adenosín Difosfato.

Adr: Adrenalina

AMPA: *α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*.

AMPc: *Adenosin Monophosphate ciclic*. Adenosín Monofosfato Cíclico

AMPK: *AMP-activated protein kinase*. Proteín quinasa activada por AMP.

ATP: *Adenosine Triphosphate*. Adenosín Trifosfato

BrdU: *5- Bromo-2- Deoxyuridine*. Bromodesoxiuridina.

BSA: *Bovine Serum Albumin*. Albumina de suero bovino.

Ca²⁺: Ión Calcio

CREB: *C-AMPc response-element binding*. Elemento de respuesta acoplado a AMPc.

dL: decilitros

DMSO. *Dimethyl sulfoxide*. Dimetilsulfóxido.

DMT2: Diabetes Mellitus tipo 2.

DPP-4: *Dipeptidyl peptidase 4*. DipeptidilPeptidasa-4.

EDTA: *Ethylenediaminetetraacetic acid*. Ácido etildiaminotetracético.

ELISA: *EnzymLinked Immunoabsorbent Assay*.

F: Fructosa

G-1-P: *Glucose-1-Phosphate*. Glucosa-1-Fosfato

GAA: Glucosa Alterada en Ayunas.

GABA: *Gamma-aminobutyric acid*. Ácido gamma-aminobutírico.

GBA: Glucemia Basal Alterada.

GDP: *Guanosine diphosphate*. Guanosín Difosfato

GHB: *Gamma-hidroxybutirate*. Gamma-hodrixibutirato.

GIP: *Gastric Inhibitor Polypeptide*. Polipéptido Inhibir Gástrico

GLP-1: *Glucagon Like Peptide 1*. Péptido 1 similar al glucagón

GLP-2: *Glucagon Like Peptide 2*. Péptido 2 similar al glucagón

GLUT-1: *Glucose Transporter 1*. Transportador de glucosa 1.

GLUT-2: *Glucose Transporter 2*. Transportador de glucosa 2.

GRPP: *Glicentin-Related Pancreatic Polypeptide*. Polipéptido pancreático relacionado con glicentina.

GTP: *Guanosin Triphosphate*. Guanosín Trifosfato

GTT: *Glucose Tolerance Test*. Test de tolerancia a la glucosa.

HbA1-c: *Glycosylated Hemoglobin*. Hemoglobina Glicosilada

HEPES: *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*.

HFD: *High Fat Diet*. Dieta alta en grasa.

HOMA: *Homeostasis Model Assessment*.

Hz: Hercio.

IP-1: *Intervening Peptide 1*. Péptido intervector-1.

IP-2: *Intervening Peptide 2*. Péptido intervector-2.

IP₃: *Inositol Triphosphate*. Inositol Trifosfato

ipGTT: *Intraperitoneal glucose tolerance test*. Test de Tolerancia intraperitoneal a la Glucosa.

ITG: Intolerancia a la Glucosa.

JNK: *c-Jun N-terminal kinases*.

K⁺: Ión Potasio

K_{ATP}: *ATP-sensitive potassium channel*. Canal de potasio dependiente de ATP

kDa: kiloDaltons

KIR 6.2: *ATP-sensitive inward rectifier potassium channel*. Canal de potasio rectificador de entrada sensible a ATP.

MAPK: *Mitogen-activated protein kinases*. Proteín quinasa activada por mitógeno.

mg: miligramos

Mg²⁺: Ión Magnesio

ml: mililitros

mM: Milimolar

mMG: miliMolar Glucosa.

mmol: milimolar.

MPGF: *Major proglucagon Fragment.* Fragmento mayor del proglucagón.

mV: Milivoltio

mW: miliwatio.

Na⁺: Ión Sodio

ND: *Normal Diet.* Dieta normal.

ng: nanogramos.

nm: nanómetro.

OAA: *Oxaloacetate.* Oxalacetato

OMS: Organización Mundial de la salud.

OPD: *Ophenylenediamine.*

PAS: *Protein Quinasa per-arnt-sim.*

PBS: *Phodphate buffered saline.* Tampón Fosfato Salino.

PC-2: *Proprotein convertase-2.* Proconvertasa-2

PC-3: *Proprotein convertase-3.* Proconvertasa-3.

Pdx1: *Pancreatic and duodenal homeobox-1.*

PEP: *Phosphoenolpyruvate.* Fosfoenolpiruvato Carboxilasa

PGC-1 α : *Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator.*

PKA: *Protein kinase A.* Proteína Quinasa A

PLC: *Phospholipase C.* Fosfolipasa C

PP: *Pancreatic Polipeptide.* Polipéptido pancreático

Pyr: *Pyruvate.* Piruvato

ROS: *Reactive oxygen species.* Radicales libres de oxígeno.

rpm: revoluciones por minuto.

RPMI: Medio Roswell Park Memorial Institute.

SA-HRP: *Streptavidin.* Estreptavidina.

SEA: Servicio de Experimentación Animal.

SOG: Sobrecarga Oral de Glucosa.

SUR-1: *Sulfonylurea Receptor*. Receptor sulfonilurea

TAG: Tolerancia Alterada a la Glucosa.

TEA: *Tetraethylammonium*. Tetraetilamonio.

TTOG: Test de Tolerancia Oral a la Glucosa.

TUNEL: *TdT-mediated dUTP Nick End Labeling*.

Zn²⁺: Ión zinc.

μg: microgramos.

μM: micromolar.



RESUMEN:

Existen numerosos estudios a nivel clínico y epimedológico que asocian de manera clara la obesidad con el riesgo de padecer Diabetes Mellitus de Tipo 2 (DMT2). La obesidad está frecuentemente asociada a un cuadro de resistencia a la insulina, la principal hormona hipoglucemiante del organismo. Para compensar esta situación y mantener los niveles de glucosa plasmática dentro del rango de valores fisiológicos, la célula beta pancreática sufre una serie de adaptaciones morfofuncionales, encaminadas a aumentar los niveles de secreción de insulina.

Existen diversos estudios que evalúan el alcance de la capacidad de modulación de esta adaptación en células beta pancreáticas en estadios prediabéticos asociados a obesidad. Sin embargo, poco se sabe de lo que ocurre con la segunda población celular mayoritaria del islote pancreático, la célula alfa, secretora de la hormona contrareguladora de la insulina, el glucagón.

En el presente estudio, hemos establecido un modelo de obesidad en ratones hembra, inducida o la ingesta de dieta rica en grasa durante 12 semanas. En relación a la homeostasis de la glucosa, nuestro modelo de obesidad se caracteriza por presentar altos niveles de insulina plasmática para mantener una situación de normoglucemia. En estas condiciones, hemos caracterizado a nivel morfológico y funcional las adaptaciones que sufren las células alfa pancreáticas comparadas con sus respectivos controles.

Para llevar a cabo este estudio, hemos utilizado técnicas *in vivo* para la evaluación de la homeostasis de la glucosa y los niveles de las distintas hormonas implicadas en el mantenimiento de la misma, así como técnicas de inmunocitoquímica e inmunohistoquímica para la determinación de modificaciones estructurales. Además, hemos aplicado técnicas de ELISA, para la evaluación de la secreción hormonal *in vitro*, microscopía de fluorescencia con sondas sensibles a calcio para evaluar la funcionalidad y técnicas de monitorización de variaciones en la capacitancia para determinar posibles cambios en la dinámica exocitótica.

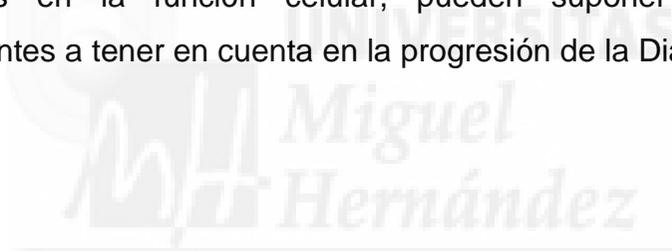
Los ratones obesos presentan una clara hipoglucagonemia. En cuanto a su respuesta secretora *in vivo*, si bien se conserva sin alteraciones en condiciones de hipoglucemia, la supresión de la secreción hormonal en condiciones de hiperglucemia se encontraba alterada.

El estudio *in vitro* mostró que la liberación de glucagón a niveles bajos de glucosa y el contenido de la hormona en los islotes pancreáticos se encontraban disminuidos. Además encontramos que esta alteración no estaba relacionada con cambios en la exocitosis.

Al estudiar los parámetros morfológicos, observamos que los ratones obesos presentaban hipotrofia de las células alfa, así como una reducción del área pancreática ocupada por células alfa. También observamos una disminución en la proliferación, acompañada de un aumento en la apoptosis.

Continuando con el estudio, 24 semanas después del tratamiento con la dieta rica en grasa, observamos un deterioro de la función de las células beta y la homeostasis de la glucosa. Es importante destacar que, en estas condiciones, la mayoría de los cambios que encontramos a 12 semanas de tratamiento, volvieron a valores comparables a los controles, en la célula alfa pancreática.

Nuestros resultados indican que, al igual que se ha descrito para la célula beta pancreática, existe una adaptación compensatoria también en célula alfa durante los estadios prediabéticos asociados a obesidad. Además, algunos de estos cambios en la función celular, pueden suponer factores importantes a tener en cuenta en la progresión de la Diabetes de tipo 2.



ABSTRACT:

There are numerous clinical studies that clearly associate obesity with an increased risk of developing Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM). Insulin resistance is commonly present in obesity. To compensate this situation and to maintain plasma glucose levels within physiological values, the pancreatic beta cells undergo different morphological and functional adaptations in order to increase plasma insulin levels.

Although there are many studies showing this situation in prediabetic stages associated with obesity, no information exists about the second most important cell population in the pancreatic islets, the alpha-cells, which secrete the insulin counterregulatory hormone, glucagon.

In the present study, we established a model of high fat diet (HFD) induced obesity in female mice fed for 12 weeks. In these conditions, HFD obese mice presented hyperinsulinemia and normoglycemia compared with controls. In the present thesis, we have characterized the morphological and functional adaptations of pancreatic alpha cells in this HFD-induced obesity model.

To perform the study, we used *in vivo* techniques to evaluate plasma glucose levels as well as plasma concentrations of different hormones involved in glucose homeostasis. Additionally, we utilized immunocytochemistry and immunohistochemistry techniques, to determine structural modifications. Furthermore, we applied ELISA techniques to

evaluate *in vitro* hormonal secretion; fluorescence microscopy to measure calcium signalling and electrophysiology to measure exocytosis.

After HFD feeding for 12 weeks, our mice showed hypoglucagonemia. While the *in vivo* response of glucagon to hypoglycemic conditions was preserved in obese mice, glucagon suppression in hyperglycemic conditions was impaired.

In *in vitro* conditions, we observed that glucagon release at low glucose levels and glucagon content in pancreatic islets was decreased. Furthermore, we found that this condition was not related with changes in exocytosis.

In the case of the morphological parameters, we observed that the obese mice presented hypotrophy in alpha cells, as well as a reduction of the total area and proliferation, together with an increase in apoptosis.

Twenty four weeks after treatment with the high fat diet induce obesity; we observed an impaired beta cell function and deteriorated glucose homeostasis. Importantly, in these conditions, most of the changes found at 12 weeks HFD, returned to values comparable to control.

Our results indicate compensatory pancreatic adaptations of pancreatic alpha cells during the prediabetic stages associated with obesity. Furthermore, some of the alpha-cell changes may be involved in the progression to type 2 diabetes.



I. INTRODUCCIÓN

1. PÁNCREAS ENDOCRINO: EL ISLOTE DE LANHERGANS.

El islote de Langerhans fue descubierto en 1869 por el anatómico y patólogo Paul Langhergans. Se trata de una estructura multicelular cuyo tamaño varía desde 50 a 500 micras, y está compuesto por 1000-2000 células. Constituye la porción endocrina del páncreas, responsable del mantenimiento de la homeostasis de la glucosa.

Existen aproximadamente un millón de islotes repartidos a lo largo del páncreas endocrino en un humano adulto, formando en conjunto el 1-2% del volumen total del órgano ¹.

El islote pancreático incluye en su estructura diferentes tipos celulares, cada uno de ellos responsable de la liberación de una hormona específica. La acción coordinada de todas ellas garantiza un correcto mantenimiento de la homeostasis de la glucosa plasmática. Estos tipos celulares son:

- Células beta (β): Secretoras de insulina, son las más numerosas, conforman cerca del 60% del islote en humanos y hasta el 80% en roedores.
- Células alfa (α): Secretoras de glucagón, representan el segundo tipo celular más abundante, en torno al 20% en roedores, pudiendo llegar a alcanzar el 45% en humanos. Estos datos sugieren una mayor relevancia de este tipo celular en el islote humano.
- Células delta (δ): Secretoras de somatostatina, suponen un 3-10% del total de células.

- Células PP: Secretoras de Polipéptido Pancreático (3-5%).
- Células Epsilon (ϵ): Secretoras de grelina. Son el grupo menos numeroso, menos del 1%. Están presentes de manera destacable durante el desarrollo fetal, aunque su número desciende de forma drástica después del nacimiento ^{2,3}.

Los islotes de Langerhans poseen una gran inervación nerviosa, procedente tanto del sistema simpático como parasimpático, siendo la rama parasimpática la principal implicada en el proceso de control de la secreción hormonal ⁴. El componente nervioso es determinante en la respuesta secretora rápida del islote, como por ejemplo en respuesta a bajas concentraciones de glucosa ^{5,6}.

Los islotes son estructuras altamente vascularizadas; reciben unas 20 veces más flujo sanguíneo que la porción exocrina pancreática ⁷. El orden de perfusión de los distintos tipos celulares presentes en el islote no es aleatorio. La circulación de la sangre se mueve en sentido $\beta \rightarrow \alpha \rightarrow \delta$ ⁸, finalizando en las células periinsulares ⁹.

La citoarquitectura del islote cambia dependiendo de la especie. Mientras en roedores los tipos celulares minoritarios se encuentran en la periferia y la célula beta conforma el cuerpo central del islote, en otras especies, como en humano, no parece existir un orden determinado y los distintos tipos celulares se disponen de forma aleatoria ¹ (Fig.1).

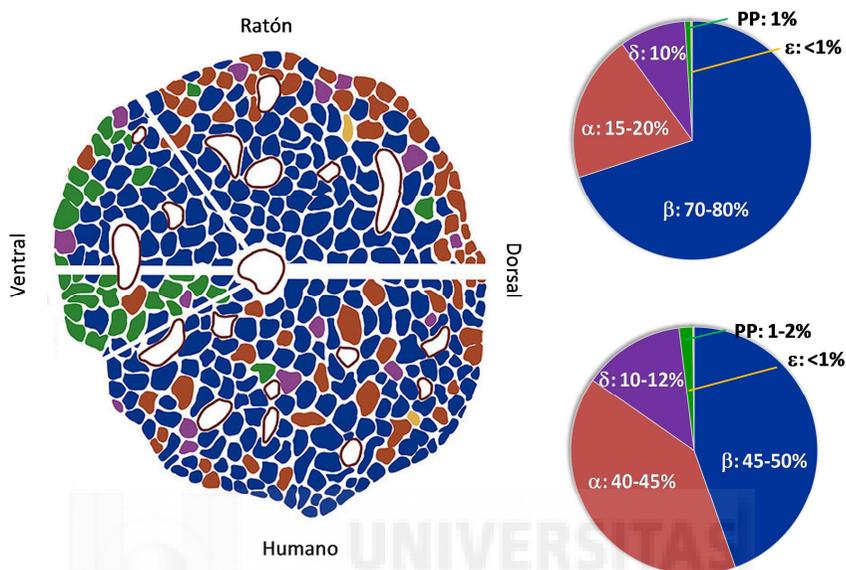


Fig 1. Citoarquitectura diferencial del islote de Langerhans en humano y ratón. (Modificada de Suckale, 2008).

Las células beta se encuentran comunicadas entre sí, mediante “*gap junctions*” (uniones en hendidura), lo que les permite responder a los estímulos de forma sincronizada. Por su parte las células alfa mantienen un funcionamiento individual y aparentemente carecen de acoplamiento intercelular^{10,11}. La estructura del islote y los estudios realizados sobre microcirculación sanguínea sugieren una importante comunicación paracrina intercelular entre beta y alfa^{12,13}.

2. HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA.

La capacidad del organismo para mantener los niveles de glucosa plasmática estable depende principalmente de las dos hormonas secretadas de forma mayoritaria por el páncreas endocrino: la insulina y el glucagón. Estas dos hormonas constituyen un sistema de control autoregulado por retroalimentación negativa (Fig. 2).

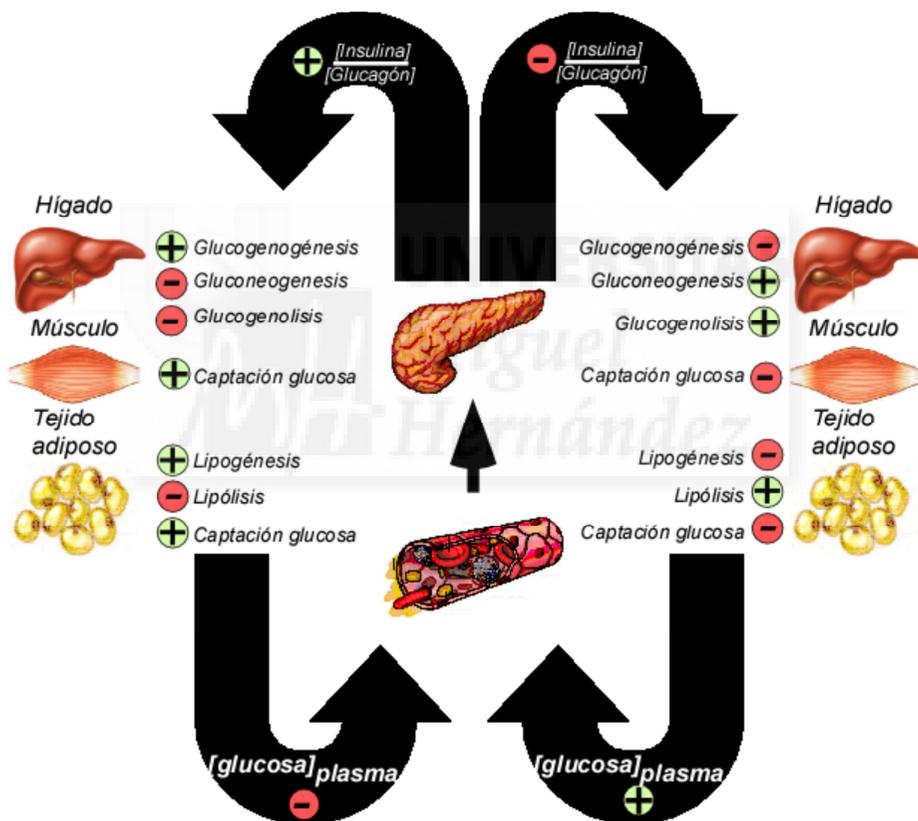


Fig 2. Mecanismo de homeostasis de la glucosa. En este esquema se señalan los efectos que el ratio hormonal pancreático tiene sobre el metabolismo de sus distintos órganos diana, regulando de esta forma la glucemia.

La insulina, es secretada por la células beta pancreáticas en respuesta a una elevación de los niveles de glucosa en sangre. Esta hormona actúa fundamentalmente sobre el metabolismo lipídico promoviendo la captura de glucosa plasmática en músculo, hígado y tejido adiposo, así como otros procesos metabólicos de tipo anabólico. En la otra parte de la balanza se encuentra el glucagón, contra-hormona de la insulina, cuyo principal estímulo de liberación es la bajada de los niveles de glucosa en sangre. En condiciones de hipoglucemia es secretado por las células alfa pancreáticas, aumentando la glucogenolisis y la gluconeogénesis hepática, provocando la liberación de glucosa al torrente sanguíneo y restableciendo la normoglucemia. Igualmente promueve la lipólisis en el tejido adiposo.

Aparte de estas dos hormonas existen más elementos que intervienen en la regulación de la homeostasis de la glucosa. Otras hormonas como la somatostatina producida por las células delta constituyen un sistema de control inhibitorio para que no se produzca una secreción excesiva de insulina y glucagón, lo que podría llevar a la descompensación del equilibrio homeostático ¹⁴.

Dentro de este complejo mecanismo de regulación, también participan las incretinas. Son hormonas secretadas por el sistema gastrointestinal en respuesta a la ingesta de alimentos, las dos más importantes son el polipéptido inhibidor gástrico (GIP) y el péptido 1 similar al glucagón (GLP-1). Ambas, producen un aumento de la liberación de insulina y una

disminución de la secreción de glucagón, influyendo de esta manera en la homeostasis de la glucosa ¹⁵.

Además, como ya hemos citado anteriormente, existen múltiples estímulos procedentes del sistema nervioso que regulan en parte la secreción hormonal del islote de Langerhans ¹⁶

3. LA CÉLULA ALFA:

ACOPLAMIENTO ESTÍMULO SECRECIÓN.

Aunque sigue existiendo cierta controversia sobre el modelo de acoplamiento estímulo secreción de la célula alfa, el mecanismo más aceptado hasta el momento es el propuesto por el grupo de Patrick Rorsman en 2004 y publicado en la revista científica Diabetes, recientemente revisado por el mismo grupo en Cell Metabolism en 2013.

Según este modelo, la principal entidad molecular responsable del acoplamiento entre la variación de los niveles de glucosa plasmáticos y la secreción de glucagón estaría representado por el canal de potasio dependiente de ATP (K_{ATP}). Al igual que ocurre en la célula beta, su cierre tras un incremento de los niveles intracelulares de ATP lleva a una despolarización de la membrana plasmática, sin embargo, el efecto sobre la secreción es contrario en ambos tipos celulares.

PAPEL DEL K_{ATP} EN LA CÉLULA ALFA:

Se trata de un canal compuesto por cuatro subunidades reguladoras: receptores de sulfonilurea (SUR1) y 4 subunidades

formadoras de poro que se unen a ATP (KIR 6.2). La célula alfa posee un canal K_{ATP} homólogo al presente en la célula beta pancreática, sin embargo la función produce un resultado celular completamente opuesto en célula alfa. Esta discrepancia se ha conseguido explicar en parte por el hecho de que el K_{ATP} presente en las células secretoras de glucagón ha resultado ser mucho más sensible al bloqueo por ATP intracelular que el canal que se encuentra en las células secretoras de insulina ¹⁷. Además, los niveles del ratio ATP/ADP alcanzados en la célula alfa son mucho mayores que en la célula beta ¹⁸ a las mismas concentraciones de glucosa y la densidad de canales K_{ATP} mucho menor. Estas características permiten que pequeños incrementos en la ratio ATP/ADP provoquen grandes disminuciones en la conductancia del K_{ATP} en la célula alfa

En la mayoría de los tipos celulares, el K_{ATP} modula la excitabilidad celular mediante hiperpolarización de la membrana. En el caso de la célula beta, esto no ocurre: el cierre del K_{ATP} provoca la despolarización de la membrana, actividad eléctrica y secreción de insulina. Llama la atención que en célula alfa, el cierre del K_{ATP} también provoca despolarización de la membrana celular, pero paradójicamente, el resultado es la inhibición de la secreción de glucagón ¹⁹.

En el caso de la célula beta, la conductancia del K_{ATP} es mucho mayor a 1 mM glucosa, lo que mantiene el potencial de membrana hiperpolarizado y la célula silenciada eléctricamente, evitando la secreción de insulina. Cuando la concentración de glucosa circulante es baja la conductancia de los canales K_{ATP}

en célula alfa es un 0.5-1.5%, si lo comparamos con la misma situación medida en célula beta.^{20,21}. El resultado es que, a baja glucosa las células alfa tienen un potencial de membrana levemente despolarizado, en el que son eléctricamente activas, generando potenciales de acción dependientes de iones Na^+ y Ca^{2+} en su fase de despolarización rápida (Fig. 3 y 4), encontrándose por tanto estimulada la secreción de glucagón. El aumento del nivel de concentración de glucosa extracelular produce un incremento de los niveles ATP/ADP a través de metabolización intracelular del azúcar. El efecto neto de estos eventos es la reducción del potencial máximo que alcanza el potencial de acción en su fase de despolarización, lo que imposibilita que se alcancen potenciales asociados con la apertura de canales de calcio, clave para el proceso de secreción de vesículas y por tanto para que se produzca la secreción de glucagón¹⁹.

Existen otros canales iónicos en la membrana celular que acompañan al K_{ATP} , que dan lugar a los efectos celulares antagónicos que encontramos en la célula alfa en comparación con la célula beta, dando como resultado efectos secretores diferentes¹⁹.

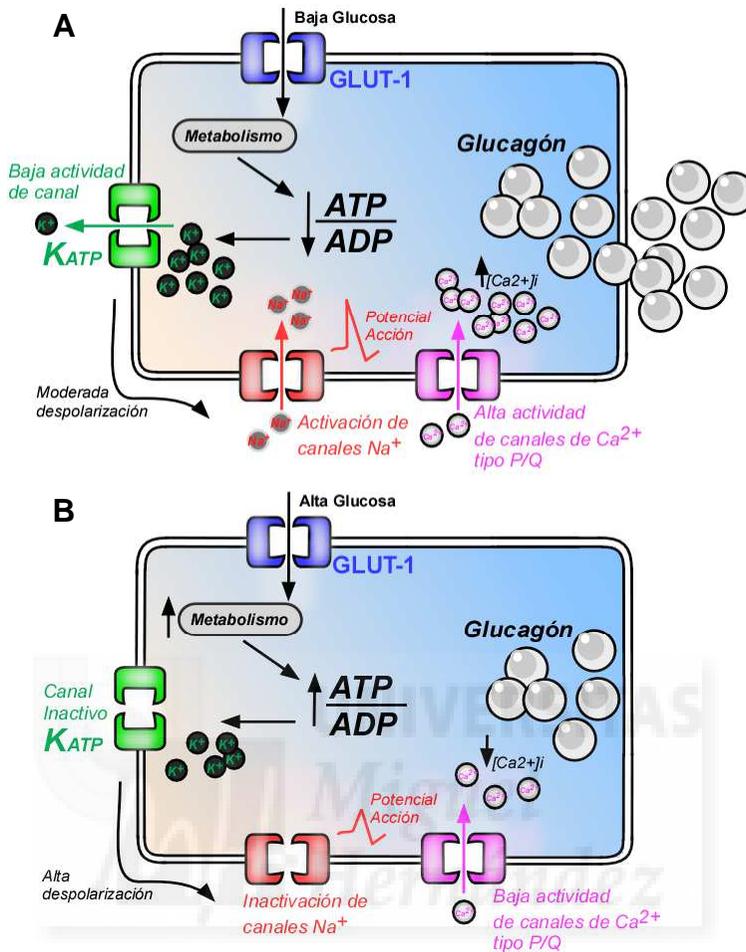


Fig 3. Funcionamiento de la célula alfa a baja y alta concentración de glucosa. (Figura modificada de Zhang Q. et al, 2013). **A:** Efecto de baja concentración de glucosa en el medio extracelular. El metabolismo intracelular de bajas concentraciones de glucosa es suficiente para producir un nivel de ATP/ADP que bloquea la mayor parte del K_{ATP}^{22} , lo que conlleva una moderada despolarización de la membrana, suficiente para activar los canales de sodio, y los canales de calcio, especialmente tipo P/Q, y con ello llevará a la activación de la secreción de glucagón. **B:** Efecto de alta concentración de glucosa en la célula alfa pancreática. el aumento del ratio ATP/ADP supone el cierre completo del K_{ATP} , provocando una alta despolarización de la membrana, que lleva a un potencial de membrana en el que se inactivan los canales de Na^+ , reduciendo los potenciales de acción y la activación de los canales de Ca^{2+} . En consecuencia disminuye la exocitosis.

CANALES IÓNICOS IMPLICADOS EN EL ACOPLAMIENTO ESTÍMULO-SECRECIÓN:

Junto al K_{ATP} , existen una serie de canales iónicos en la membrana plasmática de la célula alfa pancreática cuya actividad coordinada es responsable de su respuesta secretora. Estos canales incluyen diferentes canales de Ca^{2+} tipo T, P, Q, L y N, de Na^+ así como K^+ , de tipo A y K_{DR} (Fig.4).

Entre los canales importantes implicados en el acoplamiento estímulo secreción de la célula alfa están los canales de Ca^{2+} dependiente de voltaje. Se ha descrito la presencia de distintos tipos en célula alfa, como son, el canal de calcio tipo T, que actúa como marcapasos celular y tiene un umbral de activación en torno a los -65 mV, siendo potenciales de membrana más negativos que los que encontramos en otros tipos celulares ^{20,23,24}.

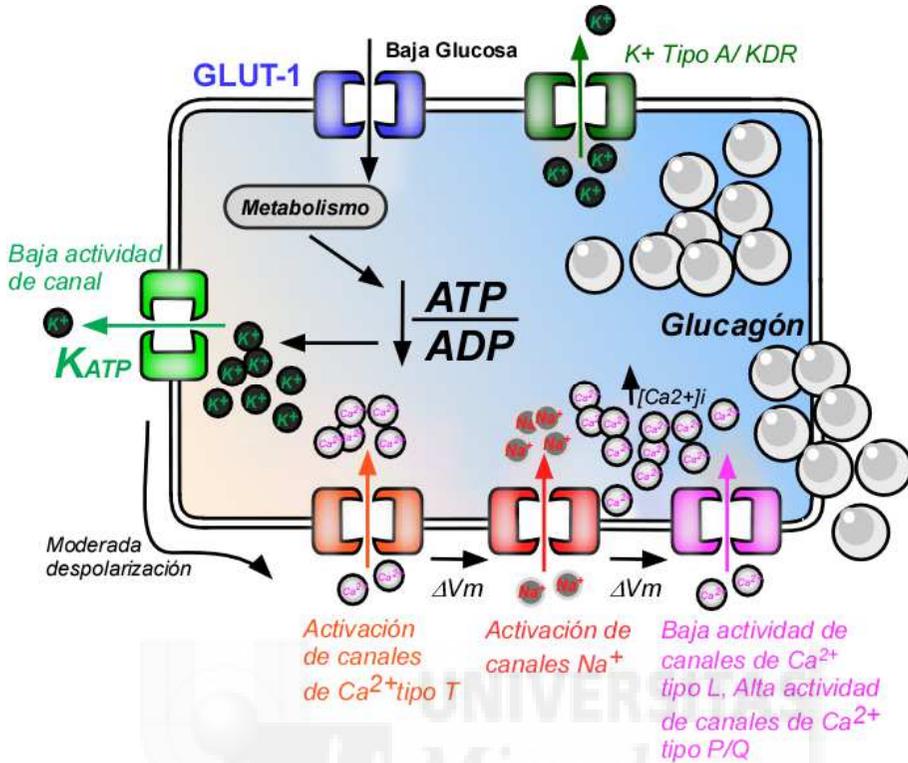


Fig 4. Acoplamiento estímulo-secreción. A bajas concentraciones extracelulares de glucosa, se genera un nivel suficiente de ATP/ADP que bloquea la mayor parte de canales K_{ATP} . Esto lleva a un potencial de membrana en el que se activan canales T, despolarizando la membrana activando los canales de Na^+ y canales de Ca^{2+} , fundamentalmente P y Q. La concentración de calcio intracelular aumenta, provocando la activación de la maquinaria exocitótica, secretando al exterior el glucagón almacenado en las vesículas que se encuentran más próximas a la membrana celular. (Adaptación de Quesada 2008 y Rorsman 2013). La apertura de canales de K^+ tipo A y los K_{DR} permite la repolarización de los potenciales de acción.

Los canales de Ca^{2+} tipo N, comienzan su activación en torno a -20 mV, teniendo su activación máxima a $+10$ mV y parece que tienen un papel clave en las señales de Ca^{2+} reguladas por glucosa^{25,26}. Los canales de calcio tipo L, se

activan a potenciales de +20 mV y parecen estar implicados principalmente en respuestas que llevan asociado un aumento del adenosín monofosfato cíclico (AMPC), como es la respuesta a adrenalina, específica de este tipo celular^{19,25,26}. Se ha observado que este tipo de canal permanece abierto a concentraciones de glucosa en las que la célula alfa mantiene la secreción inhibida, por lo que aunque es el responsable de la mayoría de la corriente de calcio que se da en célula alfa ante un pulso despolarizante, no es suficiente para activar el proceso de exocitosis¹⁹. Por último los canales de Ca²⁺ tipo P/Q parecen ser los principales responsables de la secreción regulada por glucosa, activando la maquinaria excitotónica de las vesículas que se encuentran íntimamente ligadas a la membrana celular¹⁹.

Al contrario de lo que ocurre en célula beta donde el perfil de inactivación de los canales de Na⁺ imposibilita su participación en la fase de despolarización del potencial de acción, los canales de Na⁺ en célula alfa están inequívocamente asociados a este proceso. Estos canales se activan a potenciales cercanos a los -30 mV y su bloqueo farmacológico suprime la generación de potenciales de acción, provocando un efecto supresor equivalente sobre la activación de los canales de calcio voltaje dependientes y la secreción de glucagón²⁰. Este resultado proporciona una evidencia añadida que refuerza el modelo de regulación presentado en los párrafos anteriores,

Los canales de K⁺ dependientes de voltaje están implicados en el proceso de repolarización del potencial de acción, existen dos subtipos: Tipo A y K_{DR}, que difieren en el

umbral de voltaje de activación y la cinética de desactivación²⁰ (Fig.4). La corriente de K⁺ voltaje tipo A es resistente a TEA (compuesto que produce una reducción del componente de salida de hasta un 90%) y sensible a 4-AP. Los canales K_{DR} (Canal de rectificación tardía) son sensibles a TEA e insensible a 4-AP²³.

4. GLUCAGÓN:

En 1923, los bioquímicos C.P. Kimball y J.R Murlin, que realizaban estudios de extractos pancreáticos, describen una sustancia con efectos contrarios a la insulina sobre la concentración de glucosa en sangre. Debido a estos efectos, otorgan a dicha sustancia el nombre de glucagón ²⁷.

El glucagón fue localizado por primera vez por técnicas inmunohistoquímicas por Baum et al. en 1962. Se trata de un péptido de 29 aminoácidos con acción hiperglucémica ²⁷, derivado de la escisión proteolítica del proglucagón, con una secuencia inicial de 180 aminoácidos, junto con otros productos metabólicos como GLP-1, GLP-2 y glicentina ^{28,29}. Su secuencia de aminoácidos está 100% conservada en muchas especies de mamíferos, entre las que se incluyen humano, rata y ratón ³⁰. Se encuentra almacenado en el interior de la célula alfa, en forma de gránulos electrodensos, con un manto periférico característico ³¹ y su peso molecular es de 3,5 kDa. Además existen estudios que describen la presencia de la hormona en células L-intestinales, aunque su proporción de síntesis en ellas es mínima ³²⁻³⁴.

En condiciones fisiológicas los principales estímulos para la secreción de glucagón son los descensos en los niveles de glucemia, el incremento en los niveles de aminoácidos y la estimulación β -adrenérgica ³⁵.

FUNCIONES PRINCIPALES DEL GLUCAGÓN:

El glucagón es la hormona contrareguladora de la insulina, que junto a esta se encarga del mantenimiento del equilibrio homeostático de la glucosa ^{11,36}. Aunque actúa sobre múltiples tejidos, su principal diana metabólica es el hígado, donde estimula la glucogenolisis y la gluconeogénesis, e inhibe a su vez la glucolisis y glucogenogénesis (Fig. 5). De esta manera el glucagón favorece la movilización y producción hepática de glucosa, inhibiendo el almacenamiento de la misma. Además, existen estudios realizados en ratón que demuestran que el glucagón inhibe la síntesis y secreción de triglicéridos y favorece la lipólisis ³⁷⁻³⁹.

Una vez unido a su receptor, que se encuentra acoplado a dos tipos de proteínas G (α y q), se produce la disociación de estas proteínas, en un proceso dependiente de GTP y Mg^{2+} . Por un lado, las subunidades β y γ de la parte citosólica del receptor acoplado a proteína G, se disocian provocando la activación de la Adenilato Ciclasa (AC), que hace que aumenten los niveles de AMPc activando la proteína quinasa A (PKA), que a su vez estimula la liberación de glucosa al torrente sanguíneo desde el hepatocito. Al mismo tiempo, la disociación de la subunidad q de la proteína G acoplada al receptor de glucagón, provoca la

activación de la fosfolipasa C, que aumenta los niveles intracelulares de inositol trifosfato (IP₃), liberando los depósitos de calcio intracelulares que promueven también la producción y liberación de glucosa hepática^{40,41} (Fig.6).

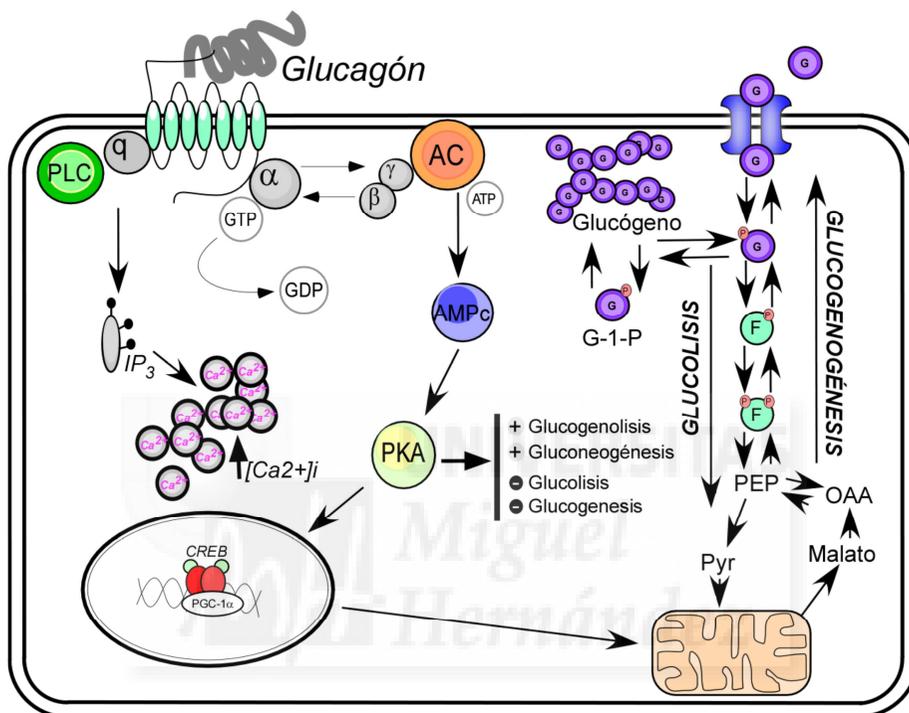


Fig 5. Principales efectos del glucagón sobre el hepatocito. Figura modificada de Quesada et al. 2008.

Cómo ya hemos señalado, el hígado no es el único órgano diana del glucagón (Fig.6). Se ha comprobado en diversos estudios realizados en rata y humano, tanto en individuos sanos cómo diabéticos, que en el tejido adiposo promueve la lipólisis^{38,39}. Hay que señalar que el efecto en humanos presenta controversia, ya que no se han observado efectos a nivel de grasa abdominal en individuos sanos sometidos a microdiálisis^{42,43}.

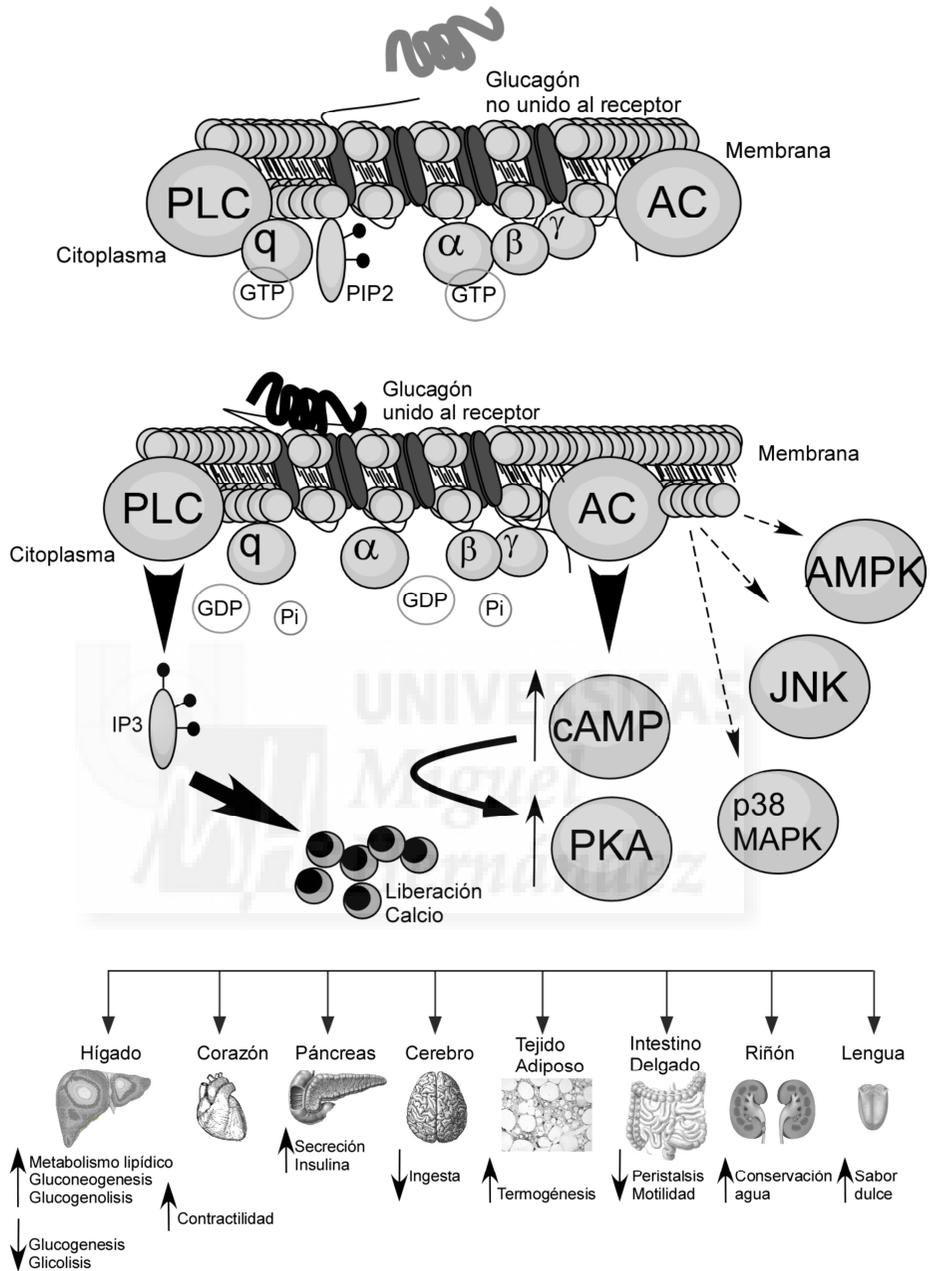


Fig 6. Mecanismo de acción del glucagón sobre sus tejidos diana y principales efectos desencadenados (Figura modificada de Marroquí et al. Nutr Res Rev. 2014)

Existen estudios que demuestran la presencia del receptor del glucagón a nivel hipotalámico ⁴⁴. La administración intraventricular de glucagón lleva a la liberación de glucosa hepática, aumentando la glucemia. Este aumento de la glucemia, constituye una señal que desencadena en la disminución de la ingesta. Esta disminución de la ingesta es menos potente cuando el glucagón se administra de forma periférica ^{45,46}. Recientemente se ha confirmado a través de otros estudios, que el glucagón induce la pérdida de peso y masa grasa acompañado por un descenso en los niveles de colesterol plasmáticos ⁴⁷⁻⁴⁹. Además se ha observado que la administración crónica de la hormona en ratas aumenta la masa del tejido adiposo marrón, así como su capacidad termogénica y la liberación de ácidos grasos ⁵⁰.

A nivel cardiaco, el glucagón presenta efectos ionotrópicos, inhibe la bomba de Na^+ -ATPasa en el músculo cardiaco, lo que provoca una menor salida de sodio durante la diástole y un aumento de la contracción intracelular. Produce un menor intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, lo que va acompañado de un aumento de la disponibilidad de calcio en la unión actina miosina y secundariamente de la fuerza contráctil. También presenta efectos cronotrópicos, en parte por la estimulación de la formación de corrientes de calcio vía AMPc e inhibición de fosfodiesterasas. Este efecto lleva a un aumento de la contractilidad muscular ^{51,52}.

El riñón es también un órgano diana de la hormona. La infusión intravenosa del glucagón está relacionada con cambios

en la síntesis y excreción de urea, así como en la conservación de agua ⁵³.

También se ha descrito que el glucagón aumenta la sensibilidad al sabor dulce por acción directa sobre el epitelio gustativo ⁵⁴.

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DEL GLUCAGÓN:

El gen del proglucagón se expresa en células alfa pancreáticas, células L intestinales, en neuronas del hipotálamo y en la médula oblongata ⁵⁵. En humanos, se encuentra codificado en la sección 36 del brazo largo del cromosoma 2. El gen se denomina GCC y su producto es el proglucagón. En un proceso específico de tejido, en las células alfa el proglucagón se escinde para dar lugar a cuatro productos: glucagón, GRPP (Glicentin Related Pancreatic Peptide), IP-1 (Intervening Peptide 1) y MPGF (Major Proglucagon Fragment) ⁵⁶⁻⁵⁸. En el caso de las células L intestinales, el procesamiento post-traducciona del gen da lugar a otros productos como glicentina, GLP-1 (Glucagon Like Peptide 1), IP-2 (Intervening Peptide 2) y GLP-2 (Glucagon Like Peptide 2) ^{59,60}.

Estas diferencias en la síntesis proteica derivada del mismo gen, se deben a la expresión de diferentes convertasas específicas de tejido. En el caso de las células alfa la expresión de los niveles de proconvertasa 2 (PC2) es elevada y los niveles de proconvertasa 3 (PC3) son mínimos ⁶¹⁻⁶³, mientras que las células L expresan PC3 pero carecen por completo de PC2 ⁶⁴.

Las mencionadas diferencias en el procesamiento del proglucagón darán lugar a distintos productos finales (Fig 7).

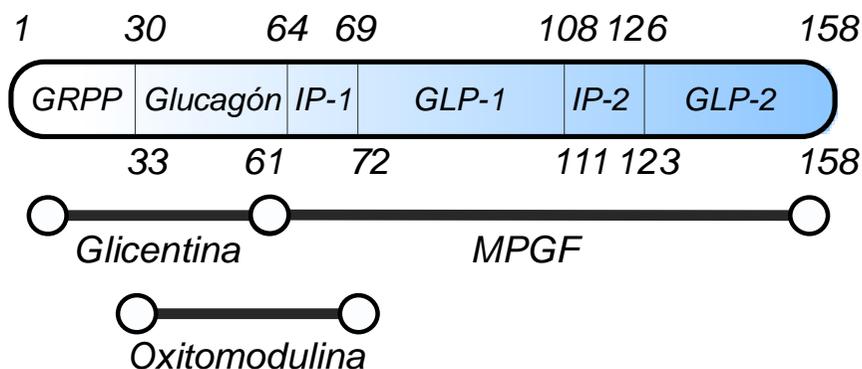


Fig 7. Estructura del gen del proglucagón y derivados peptídicos del mismo (Figura modificada de Drucker, 2005).

RECEPTOR DEL GLUCAGÓN:

Fue descrito por Rodbell y colaboradores en 1971, como una entidad de unión a glucagón presente en la membrana de los hepatocitos funcionalmente unida a Adenilato Ciclasa (AC).⁶⁵

Se trata de una proteína perteneciente a la superfamilia de los receptores acoplados a proteínas G, con un peso molecular de 63 kDa. Posee 7 dominios transmembrana que se encuentran conectados por *loops* extra e intracelulares de forma alternativa, comenzando por el extremo amino terminal y terminando por el dominio carboxilo terminal (Fig. 8)⁶⁶.

Está presente principalmente en hígado, ya que se trata del tejido diana más importante del glucagón, aunque no es el único, ha sido identificado en otros tejidos como: tejido adiposo,

riñones, corazón, bazo, páncreas endocrino, ovarios y timo de forma abundante ⁴⁰. Se encuentra también, aunque en mucha menor proporción, en músculo esquelético, estómago, glándulas adrenales, intestino y en cortex cerebral ^{40,66}.

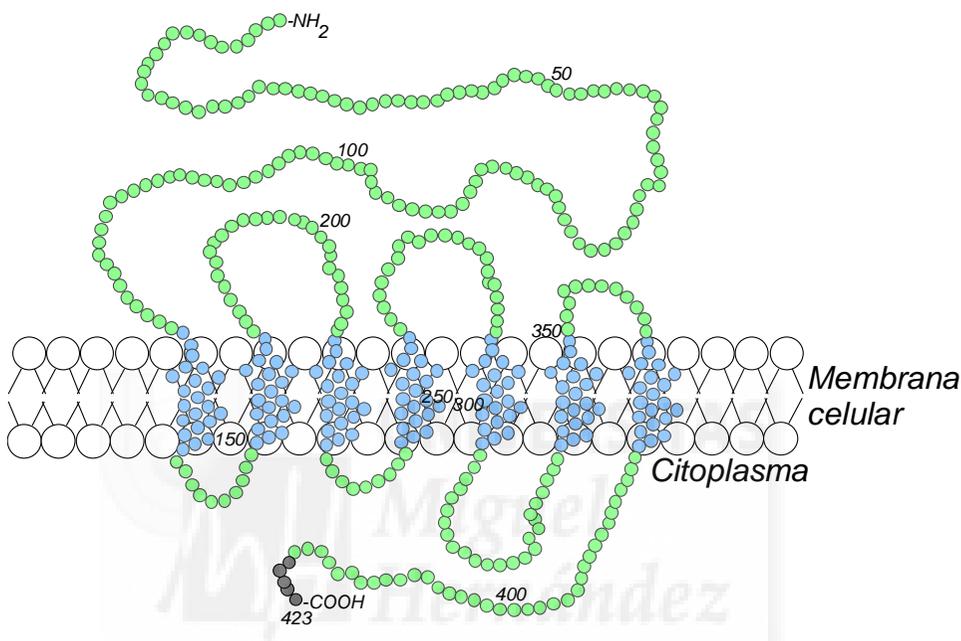


Fig 8. Estructura del receptor de glucagón (Adaptación de Mayo et al. 2003).

La sobreexpresión del receptor en célula beta provoca un aumento de la secreción de insulina estimulada por glucosa por la acción del glucagón, y aumenta la masa de célula beta mejorando además la tolerancia a la glucosa ⁶⁷.

REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE GLUCAGÓN.

El glucagón secretado por las células alfa pancreáticas es la hormona con mayor poder hiperglucemiante del organismo, corrigiendo los valores de glucosa en situaciones de hipoglucemia.

En el control de la secreción de la hormona están implicados diferentes mecanismos:

1. Control Autocrino:

El glucagón es capaz de amplificar su propia secreción por aumento de AMPc en la célula alfa ¹⁶.

Además se ha comprobado que el glutamato, cosecretado con el glucagón actúa sobre los receptores AMPA de la célula alfa, elevando el Ca^{2+} citoplasmático intracelular y potenciando la secreción de la hormona ⁶⁸.

2. Control Paracrino:

El mecanismo paracrino más importante sobre la regulación de la secreción de la célula alfa es el control inhibitorio que ejercen las secreciones de insulina y somatostatina, liberadas por las células vecinas en el islote. Tanto la insulina, secretada por la célula beta, como la somatostatina, secretada por la célula delta, suponen estímulos de regulación negativa sobre la actividad de la célula alfa.

La inhibición de la secreción de glucagón por insulina es una consecuencia secundaria a la activación de la secreción de la célula beta estimulada por alta glucosa. Existen estudios que apuntan a que esta inhibición se ve favorecida por el Zn^{2+} cosecretado junto a la insulina ⁶⁹, así como el GABA ⁷⁰ y su metabolito GHB ⁷¹.

En roedores, dónde la célula beta se encuentra localizada en el centro del islote, y la masa de célula alfa se encuentra concentrada en la periferia, el flujo sanguíneo facilita el control paracrino que ejerce la insulina sobre la secreción de glucagón¹.

3. Regulación por glucosa:

Cómo ya hemos señalado anteriormente, el principal estimulador de la secreción de glucagón es la concentración extracelular de glucosa. De esta manera, en condiciones de hipoglucemia, la célula alfa se encuentra metabólicamente activa, secretando glucagón al medio extracelular, mientras que cuando la concentración de glucosa se eleva, la secreción se inhibe de manera dosis dependiente. La inhibición máxima de la secreción hormonal se produce en 7-8 mM, rango en el que las dos hormonas inhibitorias principales, secretadas por las células beta y delta del islote se encuentran aumentadas (Fig. 9).

La gran mayoría de los estudios realizados para caracterizar la homeostasis de la glucosa coinciden en señalar que el inhibidor de la secreción de glucagón más potente es la glucosa y que la sensibilidad de la célula alfa a diferentes niveles de azúcar es mayor que la de la célula beta^{35,72}.

Cómo se muestra en la figura 9, que correlaciona la secreción de las principales hormonas del islote de Langerhans con la concentración de glucosa, la secreción de glucagón es máxima entre niveles de ausencia de glucosa y 2 mM. A concentraciones mayores la inhibición de la secreción comienza a aumentar, haciéndose máxima entre los 7-8 mM. Por encima

de 20 mM (concentración de glucosa muy por encima de niveles fisiológicos) la secreción se activa de nuevo, superando incluso los valores iniciales en los que la secreción era elevada ⁷³. Esta última observación, no obstante, es aún controvertida.

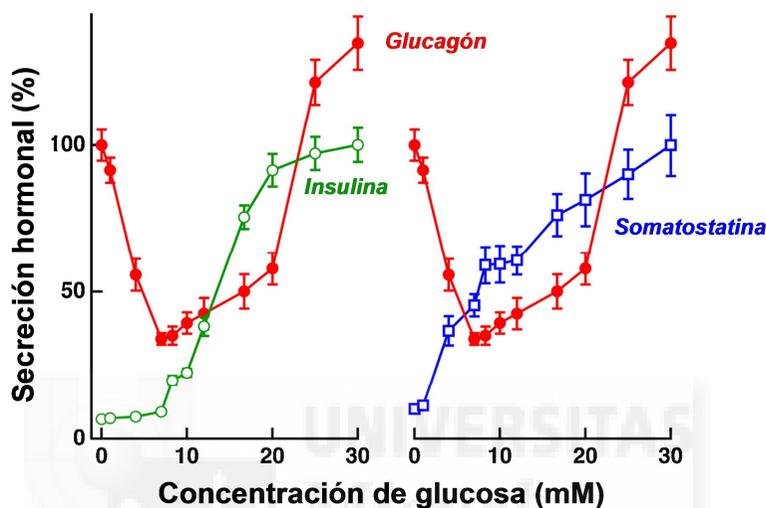


Fig 9. Relación dosis respuesta de la secreción de glucagón respecto a la concentración de glucosa, comparada con los niveles de los dos principales factores paracrinós inhibitorios de la secreción, insulina y somatostatina. (Figura modificada de Gylfe y Gilon, Diabetes Res Clin Pract 2013)

El transportador específico de glucosa que se expresa en célula alfa es el GLUT-1 de elevada afinidad. Este transportador difiere principalmente en su tasa de transporte si lo comparamos con el GLUT-2 que se expresa en célula β . GLUT-2 tiene mayor actividad de transporte pero menor afinidad por la glucosa. La actividad de la glucoquinasa en célula alfa es comparable a la de célula beta, por la que su función metabólica es similar, sin embargo, la K_m de la hexoquinasa es menor en alfa que en beta ^{74,75}.

Además, las células alfa expresan menor cantidad de piruvato carboxilasa que las células beta, mucha más cantidad de lactato deshidrogenasa y menor actividad de glicerol fosfato deshidrogenasa ^{75,76}. Todo este conjunto de diferencias a nivel enzimático podría explicar la baja activación del metabolismo aeróbico mitocondrial y la escasa variación del ratio ATP/ADP que se produce en la célula alfa al aumentar los niveles de glucosa extracelular ^{18,72}.

Como hemos mencionado anteriormente, las células alfa presentan una elevada sensibilidad de los canales K_{ATP} al ATP ¹⁷ y responden a glucosa mediante el cierre de los canales K_{ATP} modulando su actividad y la secreción de glucagón ¹⁹. Gracias a esto, una ligera variación en el ratio ATP/ADP en respuesta a una subida de la glucemia puede ser suficiente para bloquear los canales K_{ATP} y despolarizar la membrana a niveles en los que los canales de calcio y sodio, no son capaces de generar potenciales de acción, explicando de esta forma la inhibición de la secreción de glucagón en situaciones de hiperglucemia.

Alteraciones que supongan un aumento en la actividad del K_{ATP} podría explicar los defectos de secreción hormonal que se producen en la diabetes tipo 2: Fallo en la secreción de insulina inducida por glucosa, regulación invertida de la secreción de glucagón y contrarregulación defectuosa ¹⁹.

5. DIABETES MELLITUS:

Cuando los sistemas que mantienen los niveles de glucemia dentro de unos valores adecuados para el buen

funcionamiento del organismo fallan, se desarrollan trastornos con importantes consecuencias para la salud. Una de las enfermedades más comunes que derivan de un mal funcionamiento de la regulación de la homeostasis de la glucosa es la Diabetes Mellitus ⁷⁷.

La Diabetes Mellitus ⁷⁷ es un desorden metabólico que se caracteriza por una situación de hiperglucemia crónica que lleva asociadas alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, proteínas y grasas, que aparece cuando el sistema de mantenimiento de la glucemia falla. En la diabetes, el páncreas no produce la insulina suficiente o existe resistencia a la insulina o ambas cosas al mismo tiempo (Organización Mundial de la Salud: OMS). Además la secreción de glucagón se mantiene activa a altas concentraciones de glucosa, o es inadecuada en condiciones de hipoglucemia ^{78,79}. También se ha descrito que la razón glucagón/insulina está incrementada en el plasma de individuos diabéticos.

La diabetes no controlada lleva a una situación de hiperglucemia crónica que produce glucotoxicidad, glicosilaciones y aumento de radicales libres de oxígeno (ROS). A largo plazo, puede llegar a producir lesiones y/o disfunciones en diferentes órganos, tales como retinopatías con pérdida de visión, fallo renal parcial o completo, afectando especialmente al sistema nervioso y cardíaco. Las complicaciones más graves son las alteraciones de la osmolaridad sérica por aumento de glucemia, como es el coma hiperosmolar no-cetósico, pudiendo llegar a provocar la entrada en coma y muerte del paciente.

Igualmente se pueden producir otras alteraciones como la cetoacidosis por acumulación de cuerpos cetónicos.

DIAGNÓSTICO:

Los criterios de diagnóstico de la enfermedad se muestran en la siguiente figura:

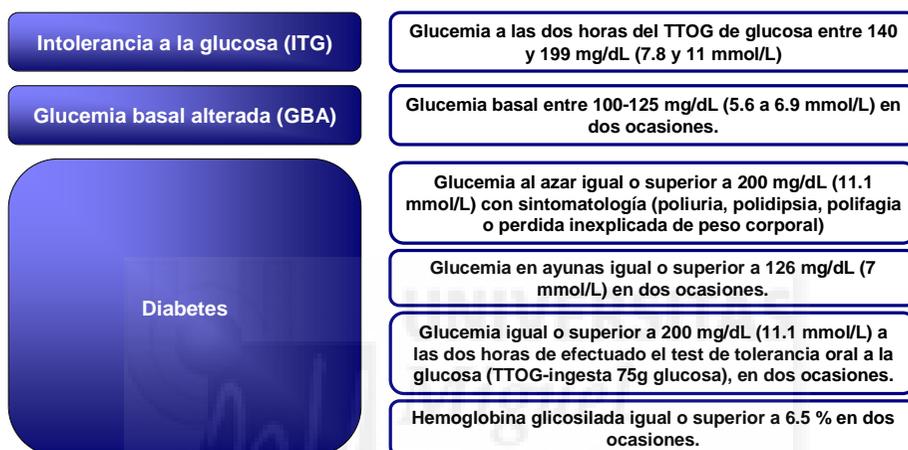


Fig 10. Criterios de diagnóstico de la enfermedad fijados por ADA (American Diabetes Association) en 2012. TTOG: Test de Tolerancia Oral a la Glucosa.

Los síntomas característicos de la Diabetes Mellitus son sed constante (polidipsia), excreción excesiva de orina (poliuria) y hambre constante (polifagia), acompañado de una pérdida de peso, aunque no son completamente generales por lo que pueden no estar presentes. El origen patogénico de la enfermedad difiere dependiendo del tipo de desorden. Puede producirse por una alteración del sistema inmune, que reconoce la célula beta pancreática como un agente extraño, atacándola y destruyéndola (diabetes tipo 1), o también por una resistencia

periférica a la acción de la insulina (diabetes tipo 2). En cualquier caso, la base del desorden es la deficiencia de insulina o de su acción sobre sus órganos diana, lo que lleva a una situación de hiperglucemia.

PREVALENCIA:

En el mundo existen más de 347 millones de personas que padecen diabetes, según la Organización Mundial de la Salud (<http://www.who.int/diabetes/facts/es/>). Se calcula que en 2004, 3.4 millones de personas fallecieron por consecuencias derivadas de una situación de hiperglucemia crónica. La OMS tiene la previsión de que las muertes por esta patología se multipliquen por dos al llegar a 2030.

Centrándonos en España, uno de los estudios más recientes realizado en 2011 por el Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (Di@bet.es), concluye que el 30% de la población estudiada presenta algún tipo de alteración en el metabolismo de carbohidratos. La prevalencia global de Diabetes Mellitus se sitúa en el 13,8%. Cabe destacar que la mitad de la población sujeto de estudio desconocía el padecimiento de la enfermedad antes de la realización del mismo (http://www.ciberdem.org/estudio_diabetes.php).

Las tasas de prevalencia de la glucosa alterada en ayunas, tolerancia alterada a la glucosa y la combinación de ambas ajustadas por edad y sexo fueron de 3,4%, 9,2% y 2,2%, respectivamente. La prevalencia de la diabetes y las

alteraciones de la regulación de la glucosa aumentan de manera significativa con la edad, siendo mayor en hombres que en mujeres⁸⁰.

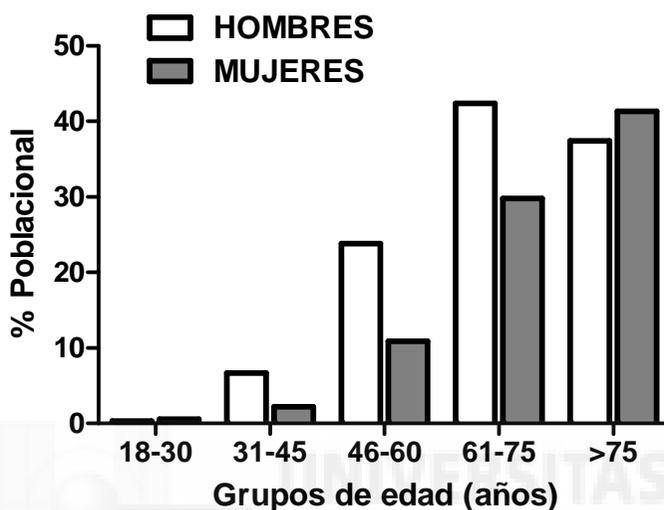


Fig 11. Prevalencia de diabetes tipo 2 distribuida por edad y sexo, en la población española. Estudio Di@bet.es

En 2015, según datos de la Federación Internacional de Diabetes, la prevalencia de diabetes será del 9,8% en Europa.

Más del 90% de los pacientes diabéticos padecen Diabetes Mellitus tipo 2 (DMT2). La DMT2 es una de las principales causas de morbilidad prematura en países desarrollados por su capacidad de desencadenar complicaciones microvasculares (retinopatía, nefropatía y neuropatía) y macrovasculares (cardiopatía isquémica, accidente cerebrovascular e isquemia arterial periférica).

Una dieta saludable, actividad física regular y el mantenimiento del peso corporal normal, evitando además el

consumo de alcohol y tabaco, pueden prevenir la aparición de diabetes o retrasarla.

CLASIFICACIÓN ETIOLÓGICA DE LA DIABETES:

DIABETES TIPO 1:

Constituye un 5-10% de las formas de diabetes conocidas en el mundo occidental (Fig. 12). Se caracteriza por una deficiencia de la producción de insulina, ocasionada por la destrucción autoinmune de las células beta pancreáticas. Se caracteriza por un inicio general brusco, normalmente antes de los 30 años de edad, tendencia a cetosis, y en ocasiones aparece asociada a otras enfermedades autoinmunitarias como son la enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Addison, vitíligo, hepatitis autoinmunitaria, miastenia grave y anemia perniciosa.

Los pacientes que desarrollan diabetes con los mismos síntomas pero de etiología desconocida, se clasifican como Diabéticos tipo 1 idiopáticos. En ellos no existe evidencia autoinmunitaria. En su mayoría son de origen asiático o africano y la prevalencia de complicaciones secundarias al desorden es menor que en los pacientes diabéticos tipo 1 autoinmunes.

DIABETES TIPO 2:

Es la forma más prevalente, alrededor del 90% de los casos (Fig.12). Es el resultado de la asociación de insulinoresistencia y una secreción compensatoria de insulina deficiente ⁸¹. Se desarrolla de forma progresiva, normalmente

después de los 40 años de edad y el riesgo de padecerla aumenta con factores de riesgo como la edad, obesidad y el sedentarismo. Normalmente no presenta casos de cetoacidosis asociada.

Debida a su lenta aparición, muchos pacientes permanecen sin diagnóstico y tratamiento durante años, lo que puede ocasionar que el paciente tenga complicaciones crónicas en el momento en el que se le diagnostica la enfermedad.

DIABETES GESTACIONAL:

Se trata de una alteración en el metabolismo de los hidratos de carbono, derivada e identificada por primera vez durante la gestación. Por norma general, revierte después del parto y su prevalencia es del 7% de todos los embarazos. Es extremadamente importante un diagnóstico temprano e inequívoco de este desorden, ya que la ausencia de tratamiento en estos casos podría desembocar en la muerte fetal, en el 60% de los casos las madres desarrollarán diabetes durante los siguientes 25 años posteriores al parto.

OTROS TIPOS ESPECÍFICOS:

Se trata de un conjunto de desórdenes que comparten su asociación con defectos monogénicos en la función de la célula beta. Tiene su comienzo normalmente a edades tempranas, antes de los 25 años. El tipo más importante dentro de esta clasificación es el tipo MODY (maturity onset diabetes of the young), caracterizada por un defecto en la secreción de insulina

glucosa; GAA: Glucemia de ayuno alterada; SOG: Sobrecarga oral de glucosa; HbA1c: Hemoglobina glicosilada.

6. OBESIDAD Y DIABETES.

Tomando como fuente la Organización Mundial de la Salud, el número de personas obesas se ha duplicado desde el año 1980. En 2008, 1400 millones de personas en el mundo padecían sobrepeso (IMC>25), de los cuales 200 millones de hombres y 300 millones de mujeres eran obesos. En 2010, aproximadamente 40 millones de niños menores de 5 años padecían sobrepeso. Esta patología lleva asociado el desarrollo de múltiples complicaciones para la salud, entre ellas y una de las más importantes es la Diabetes mellitas de tipo 2. (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>)

La obesidad se define como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud. Para caracterizarla se utiliza el índice de masa corporal (IMC): el peso de una persona en kilogramos dividido por el cuadrado de la estatura en metros ⁸². Cuando este índice se encuentra por encima de 30, se considera que la persona padece obesidad (OMS).

La obesidad supone el principal factor de riesgo para el desarrollo de diabetes tipo 2. En el 85% de los casos de DMT2 el paciente padece sobrepeso y en los casos en los que el individuo no es obeso, normalmente va asociado a un acúmulo excesivo de tejido adiposo en la zona abdominal ^{83,84}.

La insulinoresistencia aparece cuando los adipocitos alcanzan un tamaño crítico y el almacenamiento de lípidos comienza a verse comprometido. Además el cuadro inflamatorio que se desarrolla en el individuo obeso ocasiona infiltración de células del sistema inmune en el tejido adiposo, lo que también contribuye a la aparición de resistencia a la insulina. El aumento de triglicéridos y ácidos grasos circulantes provoca la aparición de resistencia a la insulina en otros órganos como el hígado y el músculo. La lipotoxicidad y glucotoxicidad afectan a la célula beta de forma directa, comprometiendo su actividad fisiológica⁸⁵.

El aumento de la resistencia a insulina de los tejidos periféricos provoca una modulación de la respuesta secretora de las células beta con la finalidad de mantener la normoglicemia. Estas se adaptan morfológica y funcionalmente dando lugar a una hiperinsulinemia compensatoria. Si la adaptación es adecuada, lo cual ocurre en el 75-80% de los casos, el individuo obeso no evolucionará hacia un cuadro diabético. Por el contrario, si esta adaptación no es satisfactoria y la célula beta no es capaz de responder a la demanda de insulina de los tejidos periféricos, llevará a una situación de hiperglucemia crónica y al desarrollo de DMT2⁸⁶.

7. IMPLICACIONES DE LA CÉLULA ALFA EN DIABETES.

Generalmente se ha aceptado como causa de hiperglucemia únicamente la falta o inapropiada secreción de insulina, pero a medida que los estudios evolucionan, más

autores sostienen la teoría de Unger y Cherrington que recientemente argumentaban que *“El exceso de glucagón y la falta de insulina son condición sine qua non para el desarrollo de diabetes”* (Unger y Cherrington 2012).

Existen muchas evidencias que demuestran que el glucagón está envuelto en este desorden metabólico. Con frecuencia se encuentran cuadros de hiperglucagonemia en personas diabéticas durante el ayuno o periodos postprandiales ⁸⁷⁻⁸⁹. La hiperglucagonemia enmarcada dentro de un contexto con secreción insuficiente de insulina y/o resistencia de los tejidos periféricos a la misma, contribuye a mantener la hiperglucemia de las personas diabéticas. El glucagón aumenta la salida de glucosa hepática al torrente sanguíneo, contribuyendo al mantenimiento de elevados niveles de glucosa en sangre de forma crónica en pacientes diabéticos ^{49,90}.

Existen estudios que demuestran que la función de la célula alfa en respuesta a cambios de glucosa se encuentra alterada en diabetes ⁹¹, además de que la hiperglucemia de los pacientes no es capaz de suprimir la secreción de glucagón, lo que aumenta la glucemia durante periodos postprandiales ^{92,93}.

El mecanismo por el que la hiperglucemia no es capaz de inhibir la secreción de glucagón por parte del páncreas no está claramente demostrado. Algunos autores apuntan a que la célula alfa podría ser insensible a la señal paracrina de insulina o resistente a los altos niveles de glucosa ^{11,78}.

Además se ha observado que la célula alfa de pacientes con Diabetes Mellitus, en muchos casos no es capaz de responder ante una situación de hipoglucemia, lo cual es una complicación muy importante en pacientes tratados con insulina, ya que esta falta de respuesta supone un aumento de la morbilidad y mortalidad de los mismos ^{94,95}.

Una situación de elevados niveles de glucagón crónicos puede suponer disfunciones hepáticas importantes así como afectar a otros sistemas como sistema cardíaco, ya que como hemos apuntado anteriormente, el glucagón parece estar relacionado con la contractilidad del corazón, cerebro, tejido adiposo y sistema renal, debido a que todos estos tejidos son diana de la acción del glucagón.

Todas las evidencias apuntan a que la Diabetes Tipo 2 se caracteriza a nivel de célula alfa, por una desregulación de la secreción de glucagón, que responde adecuadamente a concentraciones bajas de glucosa, y cuya inhibición falla a concentraciones de glucosa elevadas, en las que fisiológicamente la célula alfa debería encontrarse silenciada.



II. OBJETIVOS

Como ya hemos visto, la obesidad representa uno de los mayores factores de riesgo para el desarrollo de desórdenes metabólicos como la diabetes tipo 2. Multitud de estudios demuestran que la obesidad es una patología de prevalencia muy alta y que va en aumento, promoviendo de forma paralela el desarrollo y el aumento de la prevalencia de la diabetes.

En estudios anteriores de nuestro grupo de investigación, hemos demostrado que la célula beta pancreática se adapta tanto estructural como funcionalmente al entorno derivado del desarrollo de un cuadro obeso, para satisfacer los mayores requerimientos de insulina que se producen en este contexto de insulinoresistencia. Si la adaptación y la compensación son adecuadas, se mantiene la normoglucemia. Sin embargo, si la adaptación no consigue compensar la resistencia a insulina se desarrollará hiperglicemia y DMT2.

Si bien se conocen las adaptaciones en la célula beta, que permiten mantener la normoglucemia, no se sabe qué papel juegan la célula alfa pancreática ni el glucagón. Por tanto, el objetivo general que planteamos en esta tesis es la caracterización de las alteraciones que sufre la célula alfa en su posible adaptación al cuadro pre-diabético asociado a obesidad, en el que todavía se mantiene normoglucemia. El estudio de las modificaciones que se producen en estadios tempranos nos ayudará a comprender mejor el funcionamiento de este tipo celular y de este modo plantear posibles nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento o prevención de la enfermedad.

Los objetivos específicos son:

1. Estudiar las modificaciones funcionales que se producen en la célula alfa pancreática *in vivo* y *ex vivo*, en un modelo de ratón que desarrolla un cuadro pre-diabético normoglucémico asociado a obesidad.
2. Estudiar las modificaciones estructurales que se producen en la célula alfa pancreática *in vivo* y *ex vivo*, en un modelo de ratón que desarrolla un cuadro pre-diabético normoglucémico asociado a obesidad.





III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. MODELO DE OBESIDAD:

En la presente tesis se han utilizado ratones hembra de la cepa C57BL/6J pertenecientes a la colonia del servicio de experimentación animal (SEA) de la Universidad Miguel Hernández. Inmediatamente después del destete de los animales (21 días), se realiza una distribución de forma aleatoria en dos grupos. Al primer grupo se le asigna una alimentación control o *Normal diet* (ND: 10% de grasa) y al segundo una alimentación alta en grasa o *High fat diet* (HFD: 60% de grasa). Ambas dietas fueron obtenidas en la casa comercial *Research Diets* (New Brunswick, New Jersey) y se siguieron las recomendaciones del fabricante para el establecimiento de modelos prediabéticos (Tabla 1). Esta dieta nos asegura una composición estable durante todo el tratamiento, evitando las posibles variaciones o alteraciones que pudiese sufrir debido a la preparación.

Los animales fueron estabulados en grupos de 3 individuos, con suministro de agua y una dieta en forma de pellet *ad libitum*. La temperatura de la sala de estabulación se mantuvo a 22° C y con ciclos de luz de 12 horas (8.00 - 20.00 h). Todos los procedimientos llevados a cabo con los animales de experimentación fueron aprobados por el comité ético de la UMH de acuerdo con las normativas nacionales e institucionales vigentes.

PRODUCTO	ND		HFD	
	g (%)	Kcal (%)	g (%)	Kcal (%)
PROTEÍNA	19,2	20	26,2	20
CARBOHIDRATO	67,3	60	26,3	20
GRASA	4,3	10	34,6	60
Total		100		100
Kcal/g	3,85		5,24	

INGREDIENTE	g	Kcal	g	Kcal
CASEÍNA	200	800	200	800
L-CISTEÍNA	3	12	3	12
ALMIDÓN DE MAÍZ	315	1260	0	0
MALTODEXTRINA 10	35	140	125	500
SACAROSA	350	1400	68,8	275,2
CELULOSA, BW20	50	0	50	0
ACEITE DE SOJA	25	225	25	225
MANTECA DE CERDO	20	180	245	2205
MIX DE MINERALES, S10026	10	0	10	0
FOSFATO DICÁLCICO	13	0	13	0
CARBONATO CÁLCICO	5,5	0	5,5	0
CITRATO DE POTASIO, 1 H2O	16,5	0	16,5	0
MIX DE VITAMINAS, V10001	10	40	10	40
BITARTRATO DE COLINA	2	0	2	0
TOTAL	1055	4057	773,8	4057,2

Tabla 1. Composición detallada de las dietas utilizadas durante el estudio.

2. AISLAMIENTO DE LOS ISLOTES DE LANGERHANS.

Para la extracción de los islotes pancreáticos, los animales se sacrificaron mediante dislocación cervical, tras lo cual se realiza una laparotomía media completa que deja al descubierto la cavidad abdominal. Tras la localización del colédoco o conducto biliar común, se realiza una sutura a la altura de su unión con el intestino delgado y se practica una incisión en la parte proximal, por la cual se introduce una cánula

posteriormente fijada con una nueva sutura. Previamente se prepara una solución de colagenasa tipo V (Sigma, España) en 10 ml de medio de aislamiento, con la siguiente composición en mM: 115 NaCl, 5 KCl, 10 NaHCO₃, 1.1 MgCl₂, 1.2 NaH₂CO₄, 2.5 CaCl₂, 25 HEPES, 1%BSA y 5 Glucosa, ajustado a pH 7.4. Dicha solución se inyecta a través de la cánula hasta hinchar por completo el páncreas.

Después de la infusión de la colagenasa en el páncreas, se procede a la separación del mismo y se transfiere a un tubo tipo falcon de 15 ml. En él se añade el resto de la solución de colagenasa en medio de aislamiento. El tubo se mantiene durante 10 min a 37 ° C para facilitar la digestión enzimática del tejido exocrino (el tiempo de digestión puede variar dependiendo del lote de colagenasa, por lo que es recomendable reajustarlo cuando este cambia). Transcurrido el tiempo de digestión, se para la reacción con medio de aislamiento frío.

La preparación obtenida se mantiene en hielo durante aproximadamente 10 minutos, para facilitar el precipitado de los fragmentos de páncreas. Tras estos 10 minutos se retira el sobrenadante con ayuda de una pipeta Pasteur y se añade de nuevo medio de aislamiento frío al tubo (aproximadamente 10 ml), proceso que se repite 3 veces.

Los tres sobrenadantes obtenidos se transfirieron a placas Petri con el fondo negro para su inspección con una lupa binocular (Zeiss, Alemania). Los islotes encontrados se transfirieron a su vez a una placa Petri con medio de aislamiento

limpio mediante succión con micropipeta y se mantienen, en dicho medio, en el incubador a 37°C y atmósfera húmeda hasta su uso para los experimentos. Los islotes se utilizaron frescos o incubados, y en algunos casos se disgregaron las células para su cultivo.

3. CULTIVO DE CÉLULAS PANCREÁTICAS:

Transcurrida al menos 1 hora de recuperación de los islotes de Langerhans en el incubador a 37°C y atmósfera húmeda, aislados mediante el procedimiento que indicamos en el apartado anterior, dichos islotes se transfieren a un tubo tipo falcon de 15 ml. Se centrifugan a 1000 rpm durante 10 minutos y se elimina el sobrenadante, procediendo después a la digestión enzimática con tripsina. La solución de tripsina utilizada es: 0.05% Tripsina (Sigma, Madrid) + 0.02% EDTA (Sigma, Madrid) y se aplica durante 3 minutos a 37 ° C. La reacción enzimática se para añadiendo 3 ml de medio de cultivo (RPMI 1640 sin rojo fenol suplementado con 10% de FBS, 0.1 mg/ml de Estreptomicina, 100 UI/ml Penicilina y 11 mM Glucosa). Se centrifuga de nuevo el tubo a 1000 rpm durante 10 minutos para coleccionar las células disgregadas en el fondo. Tras la eliminación de sobrenadante se resuspenden las células en el volumen de medio de cultivo adecuado para sembrar 20 µl en cubres de 12 mm. Los cubres fueron tratados previamente con poli-L-lisina (Sigma, Madrid) durante 1 hora y lavados 3 veces con agua estéril. Una vez sembradas las células, se mantienen 2 horas en el incubador, tras las cuales se añade 1 ml de medio de cultivo y

se vuelven a depositar en el incubador para su posterior utilización.

4. TEST DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA INTRAPERITONEAL (ipGTT).

Para la valoración de la tolerancia a la glucosa de nuestros grupos de estudio, se individualizó a los animales y se les sometió a un ayuno de 12 horas. Tras dicho periodo de tiempo, se aplicó una inyección intraperitoneal con una carga de glucosa de 2g/kg de peso. Para la evaluación de los niveles de glucosa plasmáticos, se realizó una incisión en la parte distal de la cola del animal, para la obtención de una gota de sangre procedente de las venas caudales, la cual se aplica sobre una tira reactiva acoplada a un glucómetro (Accu-Check compact plus, Roche, España). Se toman muestras de sangre a diferentes tiempos: 0, 15, 30, 60 y 120 min. En el caso de evaluaciones parciales, los tiempos utilizados son 0 y 30 minutos.

5. TEST INTRAPERITONEAL DE RESISTENCIA A LA INSULINA (ipITT).

De igual modo que en el test de tolerancia a glucosa, los animales fueron individualizados antes del experimento. En este caso, la realización del experimento se lleva a cabo con los animales en condiciones de saciedad. Se aplica una carga intraperitoneal de insulina a razón de 0.75 UI/kg de peso (Humalina regular 100 UI/ml, Lilly, España). La medición de los

niveles de glucosa se obtiene de la parte distal de la cola, siguiendo el mismo procedimiento indicado en la ipGTT, valorando los tiempos 0 y 30 minutos.

6. EVALUACIÓN DE VALORES SANGUÍNEOS.

Dependiendo del experimento, la obtención de muestras sanguíneas se realiza aplicando diferentes protocolos. En el caso de pequeños volúmenes (5-10 μ l) se realiza un corte en la parte distal de la cola del ratón. Sobre el corte se aplica un capilar hematocrito heparinizado, el volumen recogido se vierte en un tubo eppendorf. Tras una centrifugación a 1200 rpm durante 20 minutos a 4^o C se recoge el suero de la parte superior y se guarda a -80^o C hasta su medida. En el caso de volúmenes mayores, se procede al sacrificio del animal en cámara de CO₂ y a la posterior decapitación, recogiendo la sangre en un tubo eppendorf de 1.5 ml. Al igual que en el caso anterior, las muestras se centrifugan a 1200 rpm durante 20 minutos, recogiendo después el suero sobrenadante.

Las muestras utilizadas para mediciones de glucagón y somatostatina se suplementan con aprotinina (20 mg/L) (Sigma, España) que protege a las hormonas de la proteólisis. Las muestras usadas para mediciones de GLP-1 fueron suplementadas con aprotinina (20 mg/L) (Sigma, España) e inhibidor de Dipeptidil Peptidasa 4 (DPP-4) (DPP4-010 Merck, Madrid, Spain), según las recomendaciones del fabricante.

Las muestras fueron medidas mediante ELISA, adecuados a la detección de cada hormona específica.

7. ENSAYO ELISA.

El ELISA se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tienen actividad inmunológica y enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmunoabsorbente), la reacción antígeno-anticuerpo queda inmovilizada y, de este modo, es fácilmente revelada mediante la adición de un sustrato específico. La actuación de la enzima producirá una reacción colorimétrica cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro.

7.1 ELISA DE INSULINA.

Para la medición de niveles de insulina circulantes en nuestros animales, utilizamos el kit de ELISA de la casa comercial CRYTAL CHEM (Downers Grove, USA). Este kit nos permite evaluar los niveles hormonales con una alta sensibilidad (0.05 ng/mL) y una baja cantidad de muestra (5µl).

Una vez atemperados los productos y descongeladas las muestras, se realiza el ensayo en la placa de 96 pocillos proporcionada por la casa comercial. Dicha placa contiene los anticuerpos específicos que permitirán la detección por competitividad con la muestra. El kit consta de un stock de insulina con una concentración de 12.8 ng/mL, a partir del cual construiremos la curva patrón que nos permitirá extrapolar la concentración de nuestras muestras objeto de estudio.

La realización del ensayo consta de los siguientes pasos:

1. Se pipetea los estándares correspondientes a la curva patrón, resultantes de distintas diluciones seriadas, conseguidos a partir del stock de 12.8 ng/mL y las muestras en la placa de 96 pocillos (5 μ l).
2. Se realiza una incubación de 2 horas a 4 ° C con agitación ligera. Con esta incubación conseguiremos que la insulina presente en la muestra se una al anticuerpo contra insulina presente en los pocillos de la placa.
3. Se lava la placa en repetidas ocasiones y posteriormente se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente con la enzima conjugada anti-insulina.
4. Se lava la placa y se incuba con la solución substrato durante 40 minutos, a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad.
5. Finalmente se añade la solución "stop" que para la reacción colorimétrica y se mide la absorbancia del contenido de los pocillos a 450 y 630 nm en el lector de microplacas IMark Reader (Biorad Laboratories Inc, España).
6. Al valor obtenido de la lectura a 450 nm se le resta el correspondiente a 630 nm. Los valores resultantes se extrapolan en la curva patrón, de concentraciones conocidas, obteniendo de este modo las concentraciones de nuestras muestras.

7.2. ELISA DE GLUCAGÓN.

Para la detección de glucagón, se utilizó el ELISA Glucagon EIA Kit #YK090 (Gentaur, Bélgica). Se trata de un kit de detección específica de glucagón pancreático, ya que su anticuerpo se une al extremo terminal C- terminal 19-29. Existen otros kits en el mercado, de unión al extremo N-terminal 1-19, que detectan glucagón total (la suma del glucagón procedente de páncreas e intestino). En nuestro caso elegimos este kit debido a su especificidad y alta sensibilidad.

Al igual que en el caso del ELISA de insulina, el ensayo se realiza en la placa proporcionada por el kit, que contiene los anticuerpos específicos para la detección de producto final, una vez atemperados los reactivos y descongeladas las muestras. La curva patrón sobre la que se extrapolarán las concentraciones de las muestras, se realiza a partir de un stock de 10000 ng/mL contenido en el kit.

Se siguió el procedimiento específico para muestras de 100 μ l de volumen, que consta de los siguientes pasos:

1. Se pipetea 100 μ l de los estándares y las muestras en la microplaca.
2. Se pipetea 50 μ l por pocillo del antígeno marcado y se incuba durante 18-24 horas a 4^o C con agitación leve.
3. Tras la incubación se lavan los pocillos 3 veces. Una vez lavados se pipetea 100 μ l por pocillo de la solución estreptoavidina marcada (SA-HRP).

4. Se incuba la placa durante una hora con agitación leve a temperatura ambiente.
5. Preparar la solución o-Phenylenediamine dihydrochloride (OPD) que dará lugar a la reacción colorimétrica.
6. Lavar la placa de nuevo en tres ocasiones y pipetear 100 μ l de la solución OPD. Incubar la placa durante 20 minutos a temperatura ambiente y protegida de la luz.
7. Se añade la solución “stop” que parará la reacción colorimétrica y se mide la absorbancia de los pocillos a 490 nm en el lector de microplacas iMark reader (Bio-rad Laboratories Inc., España). Los valores resultantes se extrapolan en la curva patrón de concentraciones conocidas, para obtener la concentración final de la muestra.

7.3. ELISA DE SOMATOSTATINA.

En el caso de la detección de la hormona somatostatina se utilizó el kit específico de detección por ELISA EK-060-03 EIA kit (Phoenix Pharmaceuticals Inc, Alemania).

Al igual que los casos anteriores, la microplaca proporcionada en el kit contiene los anticuerpos específicos para llevar a cabo la detección hormonal. Además se proporciona un stock de somatostatina a partir del cual se construirá la curva patrón con estándares de concentración conocida.

El procedimiento a seguir en este caso, es el siguiente:

1. Pipetear 50 μl por pocillo de los estándares, muestras o controles positivos y negativos. Añadir a cada pocillo 25 μl del péptido biotinizado.
2. Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente.
3. Lavar la microplaca 4 veces y añadir a cada pocillo 100 μl de la solución SA-HRP.
4. Incubar la placa durante 1 hora a temperatura ambiente.
5. Lavar la placa y añadir 100 μl de la solución substrato TMB. Incubar 1 hora a temperatura ambiente.
6. Para parar la reacción añadir 100 μl de 2N HCl a cada pocillo. Una vez parada la reacción leemos la absorbancia de la placa en el lector de placas IMark reader (Bio-rad Laboratories Inc, España) a 450 nm.
7. Finalmente calculamos la concentración final de nuestras muestras extrapolando las absorbancias obtenidas en nuestras muestras en la curva patrón de concentraciones conocidas.

7.4. ELISA DE GLP-1.

Para la determinación de los valores plasmáticos de GLP-1 se utilizó el kit de ELISA GLP-1 (active 7-36) (ALPCO, USA).

Una vez atemperados los reactivos se reconstituyen los estándares y los controles contenidos en el kit mediante la adición de 1 ml de agua destilada por cada vial y se dejan estabilizar durante 10 minutos.

El protocolo se lleva a cabo en placa de 96 pocillos contenida en el kit:

1. Se dispensan 100 μl de los estándares, controles o muestras por pocillo y 100 μl de la mezcla de anticuerpos preparada de la forma indicada por la casa comercial.
2. Se incuba durante 24 horas a 4° C en condiciones estáticas.
3. Se lava la placa en tres ocasiones con el tampón de lavado específico del kit.
4. Una vez lavados se pipetea 200 μl por pocillo de la solución SA-HRP.
5. Se incuba la placa a temperatura ambiente durante 20 minutos, en condiciones de oscuridad (se tapa la placa con papel de aluminio).
6. Se para la reacción añadiendo 50 μl de la solución *Stop* por pocillo.
7. Una vez parada la reacción se lee la absorbancia a 450 nm y se resta la absorbancia correspondiente a 650 nm de cada pocillo. Los resultados finales se obtienen por extrapolación de los valores obtenidos para las muestras de interés en la recta patrón contraída a partir de los estándares del kit, de los cuales conocemos la concentración final.

8. SECRECIÓN Y CONTENIDO DE GLUCAGÓN.

Una vez aislados y recuperados los islotes en el incubador, durante al menos 1 hora, se realizan grupos homogéneos de 20 islotes que se colocan en placas de 24 pocillos que contienen medio de aislamiento. Posteriormente se

dejan recuperar los islotes durante al menos una hora más en el incubador.

Tras esta segunda recuperación se transfieren los grupos a una nueva placa de 24 pocillos con 500 μ l de medio de secreción a 0.5 mM glucosa. Se realiza una incubación de 1 hora a 37° C. Los grupos se vuelven a transferir a otra placa con 300 μ l por pocillo de medio de secreción con los estímulos correspondientes. Se realiza una nueva incubación de 1 hora a 37° C, transcurrida la cual, se para la secreción, poniendo las placas en hielo durante 15 minutos. Se recogen los islotes en 5 μ l de volumen total del medio de secreción y se transfieren a un eppendorf con 20 μ l de tampón de lisis y aprotinina (20 mg/L) (Sigma, España). El medio donde se encuentra el glucagón secretado por los islotes se transfiere un tubo de cristal con aprotinina (Sigma, España) en la misma proporción y se guardan a -80° C hasta su medición. Los tubos eppendorf con los islotes y el tampón de lisis se mantienen durante 12-18 horas en agitación a 4° C para facilitar la lisis de los mismos. Después del lisado se guarda a -20° C hasta su medición.

La composición del medio utilizado para la secreción es la siguiente, en mM: 140 NaCl; 4.5 KCl; 1 MgCl₂; 25 HEPES; 2.5 CaCl₂; 0.1% BSA La composición de la solución utilizada para la lisis de los islotes es, en %: 75 etanol; 0.4 HCl al 30%; 24.6 H₂O destilada.

La cantidad de proteína total, para la normalización de las muestras se estimó mediante el método Bradford ⁹⁶.

Una vez obtenidas todas las muestras, la cantidad de glucagón secretada por los distintos grupos de islotes se mide a partir del medio de secreción recuperado en los tubos de vidrio. Estas muestras se miden con el kit de ELISA de la casa Gentaur que indicamos en el apartado 7.2. De la misma manera y con el mismo kit, el contenido de glucagón se mide a partir de una dilución adecuada de las muestras lisadas (1:100).

9. MICROSCOPIA CONFOCAL.

Para la medición de las señales intracelulares de calcio en las células alfa, se utiliza un sistema de microscopía confocal. En este sistema se sustituye la fuente iluminadora de mercurio, presente en el sistema de microscopía de fluorescencia convencional, por un láser de argón. Como se trata de una fuente de eliminación puntual, nos permite estudiar zonas concretas de la muestra, ya sean puntos o planos. El láser realiza sucesivos escaneos de la muestra. Además, el microscopio confocal emplea un sistema de diafragma o *pinhole* que permiten discriminar la luz proveniente de planos focales diferentes al plano de interés (Fig 13).

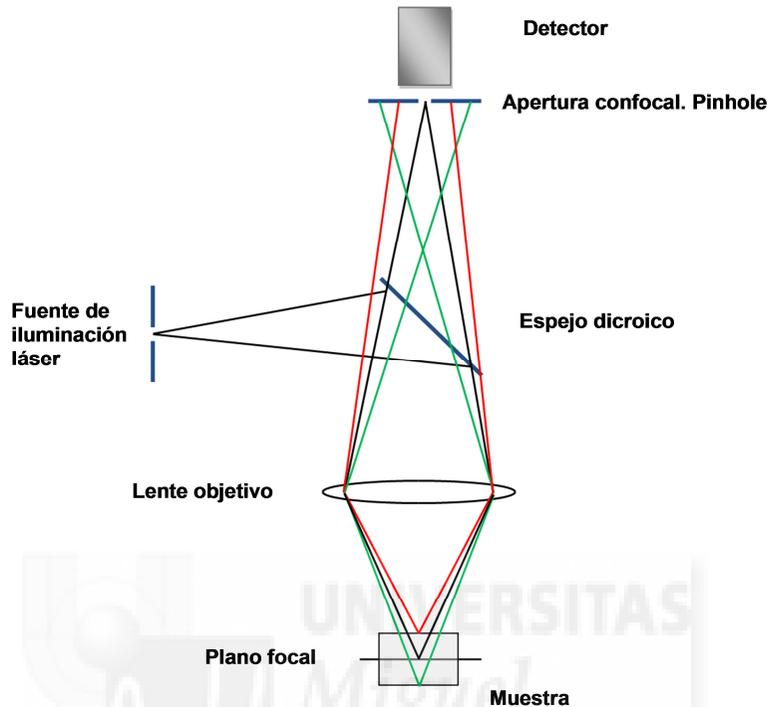


Fig 13. Diagrama del funcionamiento de un microscopio confocal (Modificada de Nadal.A. 2000).

Mediante la regulación de la apertura confocal podemos regular el grosor de la sección óptica recibida de la muestra, llegando incluso a resoluciones de $0.5 \mu\text{m}$. La mayor ventaja de este sistema es la obtención de mayor resolución, contraste y selección del plano de interés comparado con un sistema de fluorescencia convencional.

9.1. REGISTROS DE SEÑALIZACIÓN DE CALCIO EN CÉLULA ALFA DE ISLOTE INTACTO.

Una vez realizada la extracción de los islotes, se dejan recuperar durante al menos una hora en incubador a 37° C en 1 ml de medio de aislamiento (composición indicada en el apartado 2). A este medio se le añaden 2 µl de la sonda de Ca²⁺ fluorescente Fluo-4-AM (Molecular Probes, Holanda) procedente de una solución stock de 2 mM en DMSO (Sigma, España). De este modo obtenemos una concentración final de la sonda de 4 µM (0.2% de DMSO final). Los islotes se incubaron durante al menos una hora en presencia de la sonda, a temperatura ambiente, en atmósfera húmeda y gaseados de forma constante con carbógeno (mezcla de 95% O₂ y 5% CO₂). Durante este tiempo de incubación, la forma esterificada lipofílica de la sonda penetra a través de las membranas celulares y es retenida en el citosol gracias a la hidrólisis de los grupos AM que realizan las esterasas. Este procesamiento le dota de carga negativa, impidiendo que vuelva a difundir hacia el exterior celular. Una vez cargados los islotes, se transfieren de uno en uno a una cámara de registro termostatzada a 37°C cuyo fondo está formado por un cobre de 24 mm pretratado con poli-L-lisina, de la misma forma que indicamos en el apartado 3. Durante los experimentos los islotes fueron perfundidos con una solución compuesta por (en mM): 120 NaCl, 5 KCl, 1.8 NaHCO₃, 1.1 MgCl₂, 2.5 CaCl₂, 20 HEPES. La perfusión de la solución se realiza con bomba peristáltica en la que se ajusta el flujo a razón de 1ml/min.

Tanto la cámara cómo el sistema de perfusión se montan en un microscopio láser confocal modelo Zeiss LSM 510 (Carl Zeiss, Alemania). Dicho microscopio permite obtener secciones ópticas de entre 0.5 y 12.4 μm mediante la manipulación del colimador de orificio delimitante o *pinhole*. La fuente de radiación electromagnética es un láser de Argón que emite una única longitud de onda a 488 nm, cuya potencia se mantiene siempre por debajo de 15 mW; para minimizar la fototoxicidad sobre la muestra. La monitorización se realizó con un objetivo de 40 aumentos PlanNeo Fluor de inmersión en aceite y apertura numérica 1.3. Los filtros de excitación y emisión se seleccionan para una longitud de onda de 488 y 526 nm respectivamente. Con este sistema se realiza la monitorización individual de las células alfa en secciones ópticas de 8 μm . Las imágenes se toman con una frecuencia de adquisición de 2 imágenes por segundo. Para el control de los parámetros y la monitorización de la señal de calcio se utiliza el interfaz del software del microscopio confocal LSM Pascal 5 (Carl Zeiss, Alemania).

Los registros obtenidos se representan como la fluorescencia recogida a 526 nm en unidades arbitrarias de fluorescencia.

Las células cargadas con la sonda son fácilmente identificables en la periferia mediante la monitorización de la señal. Aunque esta sonda presenta dificultades para penetrar en capas celulares internas del islote, esto no supone un problema ya que todos los tipos celulares del islote se encuentran presentes en la periferia ^{10,72,97}. Las células alfa fueron

identificadas funcionalmente mediante su señal oscilatoria característica a baja glucosa (Fig 14), y confirmada mediante su respuesta a epinefrina⁹⁸.

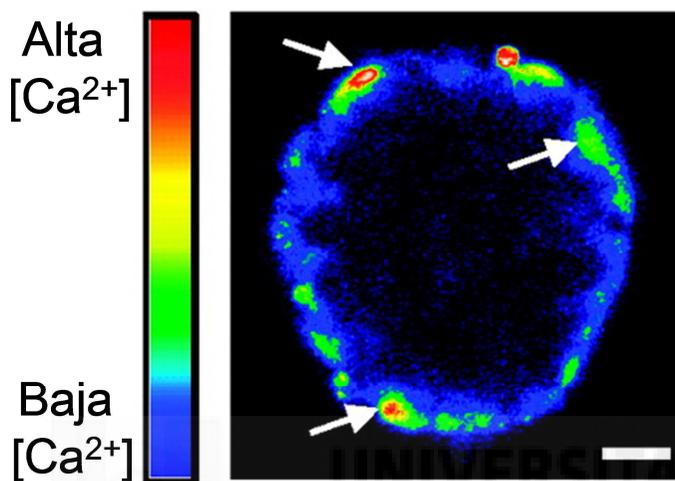


Fig 14. Imagen representativa de un islote monitorizado en un microscopio confocal, cargado con la sonda Fluo-4-AM, en el que se pueden apreciar (señalado con flechas) las células alfa activas mientras son perfundidas con una solución a baja glucosa. (Imagen modificada de Tudurí E. et al, 2008).

10. ELECTROFISIOLOGÍA.

Los registros de electrofisiología se realizaron usando un sistema compuesto por un amplificador HEKA ECP-10 USB con una interfaz LIH 8+8 AD/DA integrada (HEKA Elektronik, Alemania). Este sistema permite un control digital a través del software Patchmaster (HEKA Elektronik, Alemania). El contacto con la célula se consigue mediante un *headstage* equipado con un sistema de soporte de pipetas que se controla mediante un micromanipulador motorizado modelo MP-285 (Sutter Instruments CO, USA). El soporte circunda un electrodo de plata

clorurada que conecta con el amplificador mediante un cable coaxial con un conector BNC. Cuando se coloca la micropipeta el electrodo queda inmerso en la solución interna permitiendo el paso de corriente hacia el amplificador. Las células cultivadas sobre cubres de 12 mm se introdujeron en una cámara de registro modelo RC-26GLP (Warner Instruments, USA) dotada de un sistema de perfusión por gravedad controlado por válvulas. La temperatura de perfusión se mantuvo a 32-35 °C durante los registros. Para esto se usa un controlador de temperatura bipolar modelo CL-100 (Warner Instruments, USA). Las micropipetas se fabricaron a partir de capilares de borosilicato (Sutter Instruments CO, USA) de 10 cm de longitud con un diámetro interno de 0.69 mm y uno externo de 1.2 mm, utilizando un estirador de micropipetas horizontal modelo P-97 (Sutter Instruments CO, USA). La punta de las micropipetas se pulió posteriormente con una microforja modelo MF-830 (Narishige, Japón). Para realizar los registros de capacitancia se cubre la superficie externa de la punta de las micropipetas con el elastómero *sylgard* 184 (Dow Corning Europe SA, Bélgica). La señal de corriente se filtró a 2.9 kHz mediante un filtro de pasa bajas tipo *bessel* de 4 polos implementado en el amplificador.

10.1. REGISTROS DE CAPACITANCIA EN CÉLULA ALFA.

Para la medida de las variaciones de capacitancia (C_m) en las células alfa del islote intacto se utilizó una técnica de fijación de voltaje con electrodo único en la configuración de *whole-cell* estándar. La monitorización de las variaciones de C_m

se realizó a través del modo sine+DC de la extensión LockIn implementada en el software del amplificador. Los protocolos fueron modificados para incluir un estímulo sinusoidal de voltaje de 20 mV de amplitud y 1 kHz de frecuencia que oscila sobre un voltaje de -70 mV, lo que proporciona al amplificador la información necesaria para calcular la C_m a partir de la corriente sinusoidal resultante. Los tramos sinusoidales se interrumpieron para aplicar 10 pulsos cuadrados de 500ms aplicados a una frecuencia de 1Hz. Para estos experimentos se utilizó una solución de perfusión con la siguiente composición (en mM): 118 NaCl, 5.6 KCl, 20 TEA-Cl, 1.2 MgCl₂, 5 CaCl₂, 5 HEPES y 5 D-Glucosa (pH 7.4). Las micropipetas se rellenan con una solución interna compuesta por (en mM): 140 CsCl, 10 NaCl, 1MgCl₂, 0.05 EGTA, 3 Mg-ATP, 0.1 cAMP y 5 HEPES (pH 7.2).

El procesamiento y análisis de los datos se lleva a cabo con los programas Fit Master (HEKA Elektronik, Alemania) Y Origin v7.0552 (OriginLab Corp, USA).

La identificación de las células alfa es realizada por un método doble: En primer lugar, la inactivación característica de la corriente de Na⁺ se evaluó por un protocolo en dos pasos en el que la célula se mantiene a -70 mV y se realizan pulsos entre -150 mV y 0 mV²⁰. Los valores del pico de corriente durante el segundo pulso se representaron frente al voltaje del pulso condicionante y la curva resultante se ajustó satisfactoriamente a una función de Boltzman que arrojó valores característicos de V_{1/2} en torno a -45mV en el caso de las células alfa, permitiendo diferenciarlas de los demás tipos celulares

presentes en el islote de Langerhans que presentan valores de $V_{1/2}$ diferentes. Tras esto se utilizó la misma configuración de registro junto con un protocolo de pulsos cuadrados a voltajes entre -70 y -10 mV y la aplicación de fármacos que bloquean específicamente diferentes tipos de corrientes de potasio presentes en las células pancreáticas con el fin de evaluar la presencia de una corriente potasio de tipo A (resistente a TEA y sensible a 4-AP) característica de las células alfa. Además, las células monitorizadas fueron marcadas con biocitina (0.5 mg/mL) y se comprobó que todas las células registradas y positivas para el protocolo de inactivación de corriente de Na^+ lo fueron también para inmunocitoquímica contra glucagón.

11. ESTUDIO HISTOLÓGICO:

Los páncreas procedentes de los ratones se extraen mediante cirugía y son transferidos a una solución de 4% de paraformaldehído (Sigma, España) preparada en PBS frío. Estos páncreas se mantienen durante un periodo de 20 horas a 4° C, tras el cual se transfieren a PBS. Los tejidos se mantienen en PBS un máximo de una semana, haciendo cambios regulares de la solución cada 2 días. Previamente a la deshidratación de los tejidos, los páncreas fueron pesados en una balanza de precisión.

11.1. PREPARACIÓN DE BLOQUES DE PARAFINA.

Una vez pesados los páncreas, se procede a la deshidratación mediante inmersión en etanol de graduación creciente, mediante el siguiente procedimiento:

1. Inmersión de los tejidos en etanol 70% durante 1 hora.
2. Inmersión de los tejidos en etanol 90% durante 1 hora.
Repetimos este paso una vez.
3. Inmersión de los tejidos en etanol 100% o absoluto durante una hora. Repetimos este paso 3 veces.

Tras la deshidratación se realizan dos inmersiones de 30 minutos en xileno y finalmente se transfieren a cubetas con parafina licuada a 65°C durante 2 horas, transcurridas las cuales permanecen durante una noche en otra cubeta con parafina licuada nueva. Tras el periodo de embeber la parafina por el tejido, se procede a la realización de los bloques de parafina para su posterior corte y procesamiento.

Los bloques se cortan en secciones de 5 µm de grosor en un micrótopo modelo RM2245 (Leica, Alemania) que son recogidas en portaobjetos previamente tratados con tespa, para asegurar la buena adhesión del tejido al cristal. Las secciones se dejan secar durante una noche en estufa a 37° C.

11.2 INMUNOHISTOQUÍMICA DE GLUCAGÓN EN TEJIDOS PARAFINADOS.

Para la evaluación de la masa de célula alfa seleccionamos los cortes de interés, escogemos al menos dos cortes procedentes de los mismos páncreas, separados un mínimo de 200 µm entre sí, para asegurarnos de que estamos examinando dos regiones representativas del tejido diferentes.

Una vez seleccionadas las muestras se lleva a cabo el siguiente protocolo:

1. Desparafinado: se introducen las secciones en una estufa a 65° C durante 30 minutos. Posteriormente se sumergen en xileno durante 10 minutos y se repite este paso una vez.
2. Rehidratación de las secciones: los portaobjetos se sumergen en una batería de alcoholes en orden decreciente de graduación:
 - Etanol 100% durante 5 minutos, repetimos el paso una vez
 - Etanol 90% durante 5 minutos, repetimos el paso una vez más.
 - Etanol 70% durante 10 minutos.
 - Agua destilada durante 2 minutos
 - PBS durante 5 minutos.
3. Desenmascaramiento del antígeno: Se sumergen las muestras en tampón citrato (10mM pH6) hirviendo durante 20 minutos. El tampón citrato está compuesto por dos soluciones con la siguiente composición: 8.2% de trisodio citrato dihidratado (100mM) y 1.8% de Citrato ácido (100mM) en agua destilada.

Tras el desenmascaramiento dejamos enfriar las secciones a temperatura ambiente durante una hora y procedemos a la delimitación de la zona del tejido con pap-pen (líquido bloqueante).

Posteriormente lavamos los tejidos con PBS durante 5 minutos dos veces.

4. Bloqueo de la peroxidasa endógena: Se sumergen las muestras en una solución de H₂O₂ al 3% en metanol al 50% durante 30 minutos. Se lavan con PBS durante 5 minutos dos veces.
5. Anticuerpo primario: Incubamos las muestras con el anticuerpo primario anti-glucagón 1:100 en 3% BSA (Monosan, SC-9168), *over night* a 4° C. Tras la incubación se lavan los portaobjetos con PBS durante 40 minutos.
6. Marcado ABC: Marcar con el kit ABC Vectastain (Vector laboratorios, USA) y mantener durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavan de nuevo las muestras con PBS durante 30 minutos.
7. Revelado del antígeno: Se cubren los tejidos con una solución 3'-diaminobencidina (DAB) (Dako, Dinamarca) y se retira una vez revelado el antígeno. Se vuelven a lavar los tejidos, esta vez con agua destilada.
8. Tinción con Hematoxilina: se cubren los portaobjetos con agua destilada y se lavan de nuevo con agua destilada.
9. Deshidratación: Los portaobjetos se sumergen en una batería de alcoholes en orden creciente de graduación:
 - Etanol 70% durante 2 minutos
 - Etanol 95% durante 2 minutos.
 - Etanol 100% durante 2 minutos, se repite este paso una vez.

10. Por último se sumergen las secciones en xileno durante 10 minutos, dos veces y se procede al montaje de los cubres con ProLong® (Molecular Probes, Holanda).

Una vez montadas las secciones histológicas se pasa a fotografiar el tejido con una cámara Kappa ACC1, integrada en un microscopio Nikon Eclipse TE200. En primer lugar se realiza el barrido del tejido con un objetivo 4X fotografiando todo el tejido pancreático. Finalmente con el objetivo 20X se realizan las fotos de los islotes para el escrutinio de las células glucagón positivas. Tras el fotografiado las imágenes son procesadas con el programa MetaMorph® para la obtención del porcentaje de células alfa y la masa de estas respecto al total del peso del páncreas.

11.3 INMUNOFLORESCENCIA DE INSULINA Y GLUCAGÓN. DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO CELULAR.

Para la determinación del tamaño celular se disgregan y cultivan las células procedentes de los islotes en cubres de 12 mm, de la forma indicada en el apartado 3.

Los cultivos obtenidos se tratan de la siguiente manera:

1. Fijación: Las células se fijan por inmersión en paraformaldehído (Sigma, España) al 4% preparado en PBS durante 12 horas, posteriormente se lavan con PBS.
2. Deshidratación: una vez fijadas, se sustituye el agua por alcohol mediante la inmersión de las muestras en una

cadena de etanoles de graduación creciente (30%, 50% y 70%) durante 3 minutos. Se lavan una vez más con PBS.

3. Permeabilización: las muestras se permeabilizan con tritón x100 al 0.5% durante 30 segundos, tras lo cual se lavan nuevamente.
4. Bloqueo: Para evitar posibles uniones inespecíficas del anticuerpo se incuban las células con BSA 3% en PBS durante una hora a temperatura ambiente.
5. Anticuerpos primarios: Las muestras se incuban con una solución con un 1% de suero de cabra y anticuerpo anti-glucagón de ratón (Sigma, España) en proporción 1:500 y anticuerpo anti-insulina de conejo 1:200 (Santa Cruz, USA) en PBS, a 4° C durante una noche.
6. Anticuerpos secundarios: Tras lavar los cubres, se incuban con una solución preparada en PBS, con un 1% de suero de cabra, anticuerpo anti-ratón de cabra conjugado con fluorocromo Alexa-Fluor® de longitud de onda de excitación máxima 546 nm en proporción 1:500 y anticuerpo anti-conejo de cabra conjugado con fluorocromo Alexa-Fluor® de longitud de onda de excitación máxima 488 nm en proporción 1:500 (Invitrogen, España).
7. Montaje: Se lavan las secciones nuevamente, se dejan secar y se montan en portaobjetos con ProLong® (Molecular Probes, Holanda) para su almacenamiento en oscuridad y a 4° C, hasta su utilización.

Las imágenes de los portaobjetos se realizan con el sistema de microscopía confocal indicado en el apartado 9. Para la comprobación de la especificidad del marcaje se realizó el mismo protocolo en paralelo con placas en las que se omitió el paso del anticuerpo primario. La ausencia de señal en estas placas sirve como control negativo del experimento.

El cálculo del tamaño celular se realizó mediante medida del diámetro de las células glucagón positivas con el sistema de software MetaMorph®, usado anteriormente para el análisis de la masa.

11.4. PROLIFERACIÓN.

Para realizar el ensayo de proliferación celular los animales de los que proceden los páncreas son previamente tratados con inyecciones intraperitoneales de bromodesoxiuridina (BrdU) durante 3 días cada 12 horas. Se trata de un nucleótido sintético análogo a la timidina, que tiene incorporado un grupo bromuro en el quinto carbono de la cadena (halogenado). Está formado por una base pirimidínica y el monosacárido ribosa, cuya analogía con la timidina permite una substitución casi total de los nucleótidos de timidina en las células en fase de síntesis. De esta manera, consideramos que una célula alfa proliferante tiene que ser doble positiva para el marcaje con BrdU y glucagón.

1. Se realiza el siguiente protocolo:
2. Se cubre la superficie de los tejidos con HCl 2N durante 5 minutos.

3. Se cubren los tejidos con Borato (0.1M; pH 9.36) durante 10 minutos,
4. Se lavan los portaobjetos en 3 ocasiones con PBS, durante 5 minutos.
5. Se cubren los tejidos con tripsina (0.5mg/mL) durante 5 minutos a temperatura ambiente.
6. Se lavan los portaobjetos en tres ocasiones con PBS, durante 5 minutos.
7. Se bloquean los posibles sitios de unión inespecífica al anticuerpo con BSA al 3% durante 1 hora a temperatura ambiente.
8. Se incuba con los anticuerpos primarios correspondientes: Anti-glucagón de conejo (Monosan) en proporción 1:100 en 3% BSA y anti-BrdU de ratón (Dako) en proporción 1:100 en 3% BSA, a 4° C durante una noche.
9. Se lavan las muestras con PBS durante 5 minutos en 3 ocasiones.
10. Se incuban las secciones durante 1 hora con los anticuerpos secundarios correspondientes: anticuerpo anti-ratón de cabra conjugado con fluorocromo Alexa-Fluor® de longitud de onda de excitación máxima 546 nm en proporción 1:500 y anticuerpo anti-conejo de cabra conjugado con fluorocromo Alexa-Fluor® de

longitud de onda de excitación máxima 488 nm en proporción 1:500 (Invitrogen, España) en PBS.

11. Se lavan los portaobjetos con PBS durante 5 minutos en 3 ocasiones.
12. Se tiñen los núcleos con Hoechst 33342 (10 µg/mL) durante 15 minutos a temperatura ambiente (Molecular Probes, España).
13. Se lavan los portaobjetos y se montan los cubreobjetos con ProLong® Gold Antifade Reagent (Invitrogen, España). Las muestras se guardan a -20° C protegidas de la luz hasta su cuantificación.

Las muestras fueron examinadas y fotografiadas mediante un microscopio de epifluorescencia invertido modelo Axiovert 200 (Zeiss, Alemania). Se cuantificaron las células doble positivas para glucagón y BrdU y se relativizó el resultado a número total de células positivas para glucagón.

11.5. APOPTOSIS.

Para la cuantificación de la apoptosis en tejido parafinado, se seleccionaron las muestras siguiendo el mismo criterio establecido en el apartado 11.2. y se realiza el siguiente protocolo:

1. Desparafinado: Se introducen las secciones en una estufa a 65° C durante 30 minutos. Posteriormente se sumergen en xileno durante 10 minutos y se repite este paso una vez.

2. Rehidratación de las secciones: Los portaobjetos se sumergen en una batería de alcoholes en orden decreciente de graduación:
 - Etanol 100% durante 5 minutos, repetimos el paso una vez
 - Etanol 90% durante 5 minutos, repetimos el paso una vez.
 - Etanol 70% durante 10 minutos.
 - Agua destilada durante 2 minutos.
 - PBS durante 5 minutos.
3. Desenmascaramiento del antígeno: Se sumergen las muestras en tampón citrato (10mM pH 6) hirviendo durante 20 minutos. El tampón citrato está compuesto por dos soluciones con la siguiente composición: 8.2 % de tampón A: 100 mM Trisodio citrato dihidratado y 1.8 % de tampón B: 100 mM Citrato ácido, en agua.
4. Tras el desenmascaramiento dejamos enfriar las secciones a temperatura ambiente durante una hora y procedemos a la delimitación de la zona del tejido con pap-pen.
5. Posteriormente lavamos los tejidos con PBS durante 5 minutos dos veces.
6. Permeabilización: Se tratan los tejidos con Tris HCl 0.1 M durante 20 minutos. En paralelo se trata un tejido cómo control positivo de la técnica cubriéndolo con 250

μl de Tris HCl 0.5M y 10 μl DNasa I recombinante. Después se lavan las secciones con PBS 3 veces.

7. Marcaje de células apoptóticas: Se cubren las muestras con la mezcla del kit TUNEL (Roche Diagnostics, USA) específico para el marcaje de células apoptóticas, según las instrucciones del fabricante. Se incuban las muestras con esta solución durante una hora a 37° C en oscuridad y atmósfera húmeda. Una vez incubadas se lavan nuevamente con PBS 3 veces.
8. Bloqueo de uniones inespecíficas: Se incuban las muestras con BSA al 3% durante 1 hora a temperatura ambiente para evitar las posibles uniones inespecíficas del anticuerpo primario. Se lavan las muestras 3 veces con PBS.
9. Anticuerpo primario: Se incuban las muestras a 4° C durante toda la noche con el anticuerpo primario anti-glucagón de conejo (Monosan, Holanda) en proporción 1:100 en BSA al 3% en PBS. Al final de la incubación se lavan las muestras con PBS 3 veces.
10. Anticuerpo secundario: Se incuban las muestras durante una hora con anticuerpo anti-conejo de cabra conjugado con fluorocromo Alexa-Fluor® (Invitrogen, España) de longitud de onda de excitación máxima 546 nm en proporción 1:500, a temperatura ambiente. Se lavan las muestras 3 veces con PBS.

11. Marcaje de los núcleos: Los núcleos celulares se marcan con Hoechst 33342 (10 $\mu\text{u}/\text{mL}$) durante 15 minutos a temperatura ambiente (Molecular Probes, España). Se lavan las muestras con PBS durante 30 minutos.
12. Montaje: se montan los cubreobjetos con ProLong® Gold Antifade Reagent (Invitrogen, España). Las muestras se guardan a -20°C protegidas de la luz hasta su cuantificación.

12. ESTADÍSTICA:

En todos los casos los datos se representan cómo la media +/- el error estándar del número de experimentos que se indica en cada caso. Se consideran diferencias estadísticamente significativas cuando se obtiene un valor $p < 0.05$ al realizar una prueba t de student o 2 way ANOVA con corrección de Bonferroni, cuando proceda en cada caso.



IV. RESULTADOS

0. CARACTERIZACIÓN DEL MODELO DE OBESIDAD:

Tras 12 semanas de tratamiento con dieta rica en grasa (HFD), los ratones C57BL/6J presentaron un aumento de peso significativamente superior al de los controles: 20.85 ± 0.13 g para los ratones alimentados con dieta control (ND) y 28.01 ± 0.23 g para los ratones alimentados con HFD (Tabla 2).

Los niveles de glucemia encontrados en condiciones en que los animales se encuentran saciados (*fed state*) son prácticamente iguales en los dos tratamientos, encontrándose en valores de 165 ± 5.45 mg/dL en el caso de ratones ND y 172 ± 3.74 mg/dL para el grupo HFD. Asociados a estos niveles de glucosa en sangre, los niveles de insulina plasmáticos, para los ratones saciados, se encuentran elevados en los HFD, siendo de 0.83 ± 0.15 ng/mL para los ratones control y de 1.44 ± 0.15 para los ratones HFD.

En condiciones de ayuno prolongado durante 12 horas (*fasted state*), los ratones presentan unos niveles de glucosa en sangre similares, 104.83 ± 10.03 mg/dL tras 12 semanas de ND y 113.55 ± 4.97 mg/dL tras 12 semanas de dieta HFD. Los niveles de insulina plasmática asociados a estas glucemias fueron 0.75 ± 0.08 ng/ mL en el caso del grupo control, frente a los 1.24 ± 0.01 ng/ mL del grupo obeso (Tabla 2).

El cálculo del índice HOMA relaciona los niveles de glucosa e insulina plasmáticos en ayunas. Este parámetro nos indica que los animales obesos son resistentes a la insulina

comparados con los animales alimentados con dieta normal. El valor de este índice fue de 1.08 ± 0.21 para ND y 1.85 ± 0.05 para HFD.

	DIETA NORMAL	DIETA RICA EN GRASA
PESO FINAL (g)	20,85 \pm 0,13	28,01 \pm 0,23***
GLUCEMIA (SACIEDAD) (mg/dL)	165 \pm 5,45	172 \pm 3,74
INSULINA PLASMÁTICA (SACIEDAD) (ng/mL)	0,83 \pm 0,15	1,44 \pm 0,15**
GLUCEMIA EN AYUNAS (mg/dL)	104,83 \pm 10,03	113,55 \pm 4,97
INSULINA PLASMÁTICA EN AYUNAS (ng/mL)	0,75 \pm 0,08	1,24 \pm 0,01**
HOMA IR	1,08 \pm 0,21	1,85 \pm 0,05*

Tabla 2. Peso final y parámetros plasmáticos en condiciones de saciedad y ayuno de 12 horas para animales alimentados con dieta control y animales alimentados con dieta rica en grasa (ND, n=13; HFD n=11). *p<0.05;**p<0.01;***p<0.001.

Para tener una visión más dinámica de la capacidad de regulación de la homeostasis de la glucosa del modelo, y confirmar que nos encontramos ante un incremento compensatorio de los niveles de insulina circulantes, realizamos una prueba en ayunas consistente en tomar los valores plasmáticos de glucosa e insulina de los animales ND y HFD a tiempo 0. Una vez obtenidas estas muestras se le administra a cada ratón una dosis de glucosa 2 g/kg mediante inyección intraperitoneal y se vuelven a tomar los valores tras 30 minutos. En la figura 15 podemos apreciar que partimos de valores de glucemia similares para los dos grupos de estudio: 107.6 ± 11.8 mg/dL en ND y 118.2 ± 6.8 mg/dL en HFD. Para estos niveles de glucemia los niveles de insulina plasmáticos fueron mayores en HFD: 0.324 ± 0.05 ng/mL para ND y 0.487 ± 0.025 ng/mL para HFD. Transcurridos 30 minutos desde la administración intraperitoneal de la carga de glucosa, los ratones obesos muestran una elevación de la glucemia (ND: 163.2 ± 17.03

mg/dL; HFD: 243.2 ± 12.8 mg/dL) acompañada de una elevación de la insulina en plasma (ND: 0.443 ± 0.05 ng/mL; HFD: 0.658 ± 0.052 ng/mL).

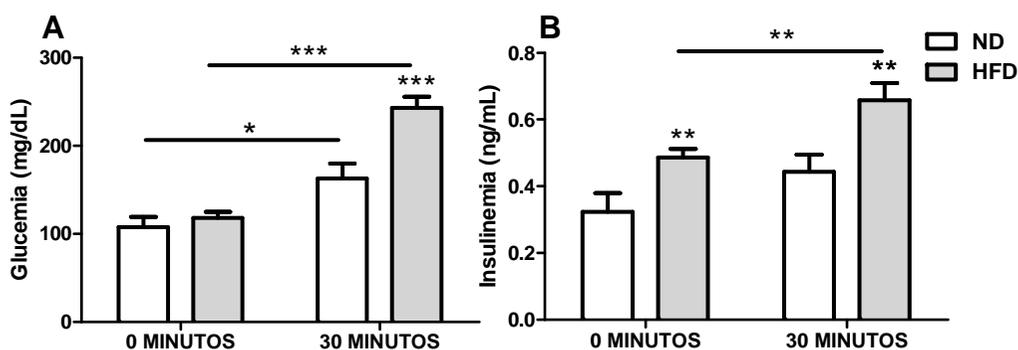


Fig 15. Relación entre los niveles plasmáticos de glucosa e insulina durante una GTT parcial (ND, n = 5; HFD, n = 5). A: Comparación de los valores de glucemia de los ratones ND y HFD en ayunas (12h) a tiempo 0 y tras administrarles una carga de glucosa (30 minutos). B: Comparación de los valores de insulina en plasma durante el mismo experimento, valores asociados a las glucemias mostradas en A. *p<0.05**p<0.01; ***p<0.001.

Siguiendo con la caracterización de nuestro modelo de obesidad, realizamos un Test de tolerancia a la glucosa (GTT) (Fig. 16). Partiendo de condiciones de ayuno, medimos las glucemias correspondientes a los minutos 0, 15, 30, 60 y 120 minutos tras una inyección intraperitoneal de glucosa (2g/kg peso). Esta prueba mostró un aumento significativo del área bajo la curva en el tratamiento HFD que nos indica una presencia de intolerancia a la glucosa en el modelo, aunque partimos y volvemos a niveles similares de glucemia. Todos estos resultados indican que el grupo de ratones HFD se ajustan a un modelo de hiperinsulinemia y normoglucemia, donde se

mantiene concentraciones de glucosa normales a expensas de un incremento compensatorio de los niveles de insulina.

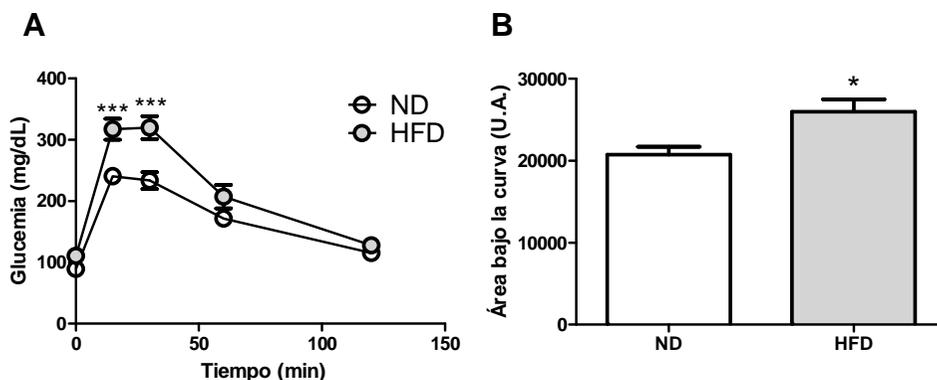


Fig 16. Caracterización de la tolerancia a la glucosa de los ratones obesos tras 12 semanas de dieta alta en grasa. A: Test de tolerancia a la glucosa intraperitoneal representativo de un grupo de ratones HFD comparado con un grupo de ratones control (n= 8 ratones por condición), B: Área bajo la curva correspondiente al test de tolerancia a la glucosa anterior. *p<0.05. ***P<0.001.

A continuación realizamos la medición en plasma de somatostatina y GLP-1, dos hormonas importantes por su interacción tanto en la homeostasis de la glucosa como en la regulación de los niveles de glucagón y la actividad de la célula alfa (Fig. 17). En el primer caso, los niveles de somatostatina circulantes en los plasmas de los animales obesos no presentan diferencias con respecto al grupo control. En el caso del GLP-1, encontramos un aumento de la hormona medida en plasma que supone aproximadamente el doble de los valores observados en el grupo ND.

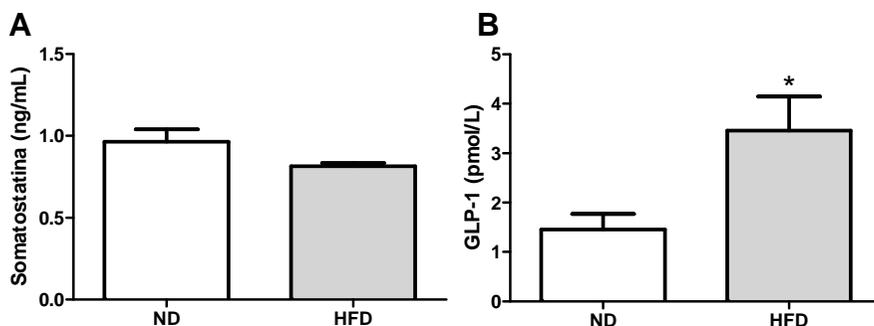


Fig 17. Niveles de somatostatina y GLP-1 circulantes en plasma sanguíneo. A: Somatostatina en plasma medida en condiciones de acceso libre a la comida (n= 4 ratones por condición). B: GLP-1 en plasma medido en condiciones de acceso libre a la comida (ND n=6; HFD n=8). *p<0.05.

1. COMPARACIÓN DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE GLUCOSA Y GLUCAGÓN ENTRE LOS RATONES ALIMENTADOS CON DIETA HFD Y LOS RATONES ALIMENTADOS CON DIETA ND.

Tras comprobar que 12 semanas después del tratamiento de los ratones con una dieta rica en grasa, presentan un perfil metabólico caracterizado por unos valores de glucosa normales, a expensas de una sobresecreción de insulina al torrente sanguíneo, decidimos explorar lo que ocurre en la misma situación con los niveles circulantes de glucagón.

Para ello, evaluamos en primer lugar las posibles diferencias en situación de saciedad y ayuno. Los animales alimentados con HFD presentan valores plasmáticos de glucagón circulantes disminuidos, en comparación con los animales alimentados con dieta ND. Así, los niveles para ND son de 154.72 ± 18.07 pg/mL en *fed state* frente a los 86.63 ± 12.26 pg/mL para HFD (Fig. 18). A 6 horas de ayuno, momento

en el que la célula alfa se encuentra en proceso activo de secreción, encontramos unos niveles de 375.48 ± 53.69 pg/mL para ND y 120.21 ± 49.81 pg/mL para HFD, lo que supone una disminución de los niveles circulantes de glucagón en plasma del 68 %, respecto al control.

Posteriormente realizamos un ayuno más prolongado (12 h) y volvimos a medir los niveles circulantes de glucagón. Los ratones HFD muestran nuevamente unos niveles más bajos, 97.40 ± 28.65 pg/mL, frente a los 277.07 ± 53.4 pg/mL encontrados en los ratones ND, mostrando una disminución del 64.85 %.

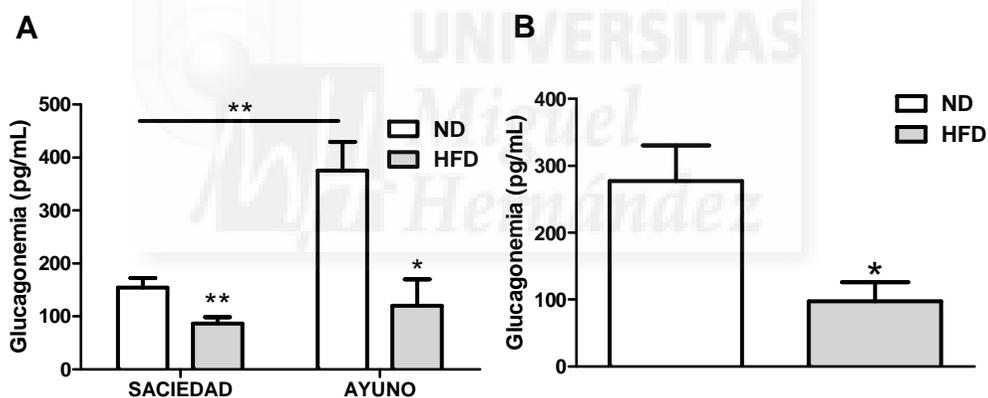


Fig 18. Niveles de glucagón en plasma in vivo en ratones tratados con dieta HFD, comparados con sus controles. A: Glucagonemia en situación de acceso libre a dieta (saciedad) y en ayunas (6h) (n = 12 para la condición saciedad; n=5 para la condición ayuno). B Glucagonemia medida en un periodo de ayuno de 12 horas (n = 6 por condición). *p<0.05; **p<0.01.

Para completar el estudio, realizamos un test de tolerancia a la glucosa, en el que tomamos valores asociados de glucosa y glucagón en plasma, al igual que lo hicimos

anteriormente para la evaluación de la hiperinsulinemia en la caracterización del modelo.

Para la prueba (Fig. 19), mantenemos a los ratones en ayunas durante un periodo de 12 horas, tras el cual medimos los niveles circulantes de glucosa y glucagón. Posteriormente, administramos una carga intraperitoneal de glucosa de 2g/kg a cada uno de los individuos y tomamos de nuevo los valores de glucemia tras un periodo de 30 minutos. Ambos grupos de estudio presentan de nuevo niveles similares de glucemia en ayunas, mostrando una ligera diferencia al alza, en el caso de los ratones HFD, que no llega a ser estadísticamente significativa. Los niveles de glucemia se mantienen en valores de 84 ± 2.73 mg/dL para ND y 96.12 ± 4.65 mg/dL para HFD. Tras la sobrecarga de glucosa, la glucemia aumenta, alcanzando niveles de 198.16 ± 7.37 mg/dL en ND y 269.8 ± 17.41 mg/dL, mostrando de nuevo a los 30 minutos postcarga, que los ratones HFD son ligeramente intolerantes a la glucosa. En paralelo observamos que a tiempo 0, se vuelve a producir la disminución de glucagonemia descrita en la anterior figura en situación de ayuno, con 321.78 ± 31.86 pg/mL para ND y 152.04 ± 47.57 pg/mL para HFD. Tras la sobrecarga de glucosa, los niveles de glucagón disminuyen en los individuos control, lo que supone una situación lógica, ante los altos niveles de glucosa. Los ratones HFD por su parte, presentan una alteración de la respuesta alcanzando niveles de glucagonemia significativamente elevados y no se produjo ninguna inhibición. Los ratones ND pasan a tener valores plasmáticos de glucagón de 275.21 ± 49.98 pg/mL, mientras que los HFD presentan

valores de 435.6 ± 50.82 pg/mL. Por tanto parece que la respuesta *in vivo* de glucagón a hiperglicemia está alterada en los HFD.

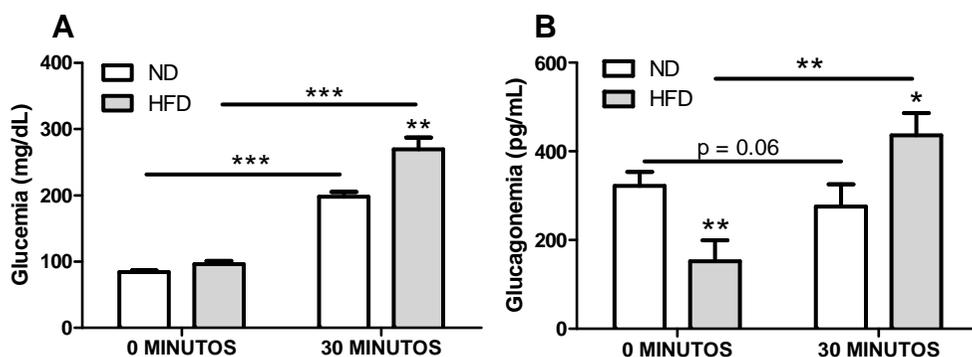


Fig 19. Relación entre los niveles plasmáticos de glucosa y glucagón durante una GTT. A: Comparación de los valores de glucemia de los ratones ND y HFD en ayunas (12h) a tiempo 0 y tras administrarles una carga de glucosa (30 min). B: Comparación de los valores de glucagón en plasma durante el mismo experimento, valores asociados a las glucemias mostradas en A. (n = 6 ratones por condición) ***p< 0.05 **p<0.01; ***p<0.001.

El siguiente paso del estudio consistió en someter a ambos grupos de estudio a un test de tolerancia a la insulina (a 0 y 30 minutos), consistente en tomar los valores tanto de glucosa en plasma cómo de glucagón a tiempo 0, sin ayuno previo (Fig. 20). Una vez tomadas estas medidas se procede a la inyección de una carga intraperitoneal de 0.75 U/kg de insulina a cada ratón. Treinta minutos después, medimos nuevamente los valores de glucemia y glucagonemia.

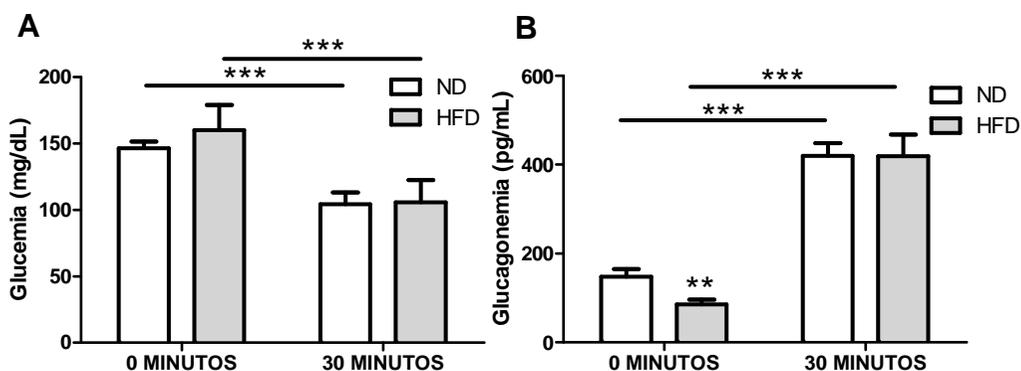


Fig 20. Relación entre los niveles plasmáticos de glucosa y glucagón durante una ITT. A: Comparación de los valores de glucemia de los ratones ND y HFD en saciedad y tras administrarles una carga de insulina (30 min). B: Comparación de los valores de glucagón en plasma durante el mismo experimento, valores asociados a las glucemias mostradas en A. (n = 6 ratones por condición). **p<0.01; ***p<0.001.

A tiempo 0, la glucosa basal es prácticamente la misma en ambos grupos, lo que confirma de nuevo que nos encontramos ante un sistema de compensación de la homeostasis de la glucosa. Los ratones ND parten de valores de glucemia de 147.6 ± 4.92 mg/dL y los ratones HFD de valores de 160.1 ± 18.85 mg/dL. Transcurridos 30 minutos a la administración de la sobrecarga de insulina, los niveles de glucemia descienden, hasta los 104.4 ± 8.7 mg/dL en el caso de ND y 105.8 ± 16.75 mg/dL en el caso de HFD a tiempo 30. Al mismo tiempo los ratones ND presentan niveles promedio de glucagón en plasma con valores de 147.20 ± 17.20 pg/mL frente a los 85.23 ± 10.82 pg/mL que encontramos en el grupo HFD. De nuevo observamos el descenso en los niveles circulantes de la hormona que describíamos al principio. Tras la sobrecarga de insulina, relacionado con el descenso de glucosa plasmática,

observamos una elevación de la concentración de glucagón en plasma, 419.55 ± 28.95 pg/ mL para el grupo control y 418.97 ± 48.67 pg/mL para el grupo HFD. Por tanto, aunque partimos de niveles de glucagón disminuidos, el sistema es capaz de alcanzar niveles similares a los del grupo control tras el estímulo de insulina. Este resultado indica que la respuesta in vivo del glucagón a hipoglicemia está correctamente preservada en los animales obesos.

2. LA ALIMENTACIÓN CON DIETA RICA EN GRASA PRODUCE ALTERACIONES EN EL CONTENIDO Y SECRECIÓN DE GLUCAGÓN EN EL ISLOTE DE LANGERHANS.

En base a los resultados mostrados en el apartado anterior, en los que observamos que la respuesta por parte de la secreción de glucagón ante estímulos como glucosa está alterada en ratones alimentados de forma crónica con dieta rica en grasa (Fig. 21), quisimos explorar la capacidad secretora *in vitro* de las células alfa, así como el contenido de glucagón de los islotes.

Para la evaluación del contenido de glucagón realizamos experimentos en saciedad y en ayunas, encontrando en ambos casos una clara disminución del contenido de la hormona en los islotes de los ratones tratados con dieta alta en grasa. En ND el contenido medio de glucagón en el islote en condiciones de saciedad, normalizado por cantidad de proteína total, se encuentra en 506.65 ± 28.86 pg/ μ g proteína mientras que en HFD el contenido medio disminuye hasta los 421.28 ± 32.01

pg/ μ g proteína, lo que supone una reducción del 16%. De la misma forma, observamos un descenso en el contenido total de glucagón de los islotes medido tras un ayuno prolongado de 12 horas.

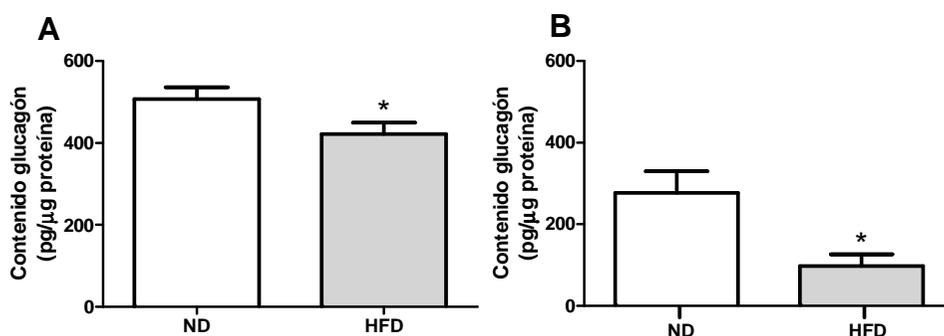


Fig 21. Los ratones alimentados con dieta alta en grasa presentan una disminución del contenido de glucagón. A: Contenido de glucagón medido en condiciones de saciedad, en ND y HFD (n=6 ND; n = 9HFD; 140 islotes por tratamiento) B: Contenido de glucagón medido tras un ayuno de 12 h, en ND y HFD (n=10 ND; n=12 HFD; 140 islotes por tratamiento) *p<0.05

La secreción estática de glucagón a 0.5 y 11.2 mM glucosa, presentó el esperado patrón de inhibición presentando un patrón típico de inhibición de la célula alfa a altas concentraciones de glucosa, en el caso de los ND, (Fig.22).

En el caso de HFD encontramos un patrón modificado, ya que la secreción de célula alfa tendría que estar activa a bajas concentraciones de glucosa (0.5 mM). En los animales alimentados con dieta rica en grasa, la secreción se encuentra inhibida de forma significativa (ND = 0.45 ± 0.078 pg/ μ g proteína; HFD = 0.17 ± 0.065 pg/ μ g proteína)

Posteriormente decidimos analizar la eficiencia secretora de los islotes de Langerhans mediante la normalización de la secreción por contenido total de glucagón. Nuestro grupo de investigación ha descrito anteriormente en este modelo ⁹⁹ una tendencia de aumento de masa de célula beta en el islote, así como la existencia de hiperplasia en este grupo celular. Con la finalidad de comprobar que las diferencias observadas no están sesgadas por el hecho de tener un aumento de proteína total en el islote, analizamos la secreción de glucagón normalizándola respecto a su contenido.

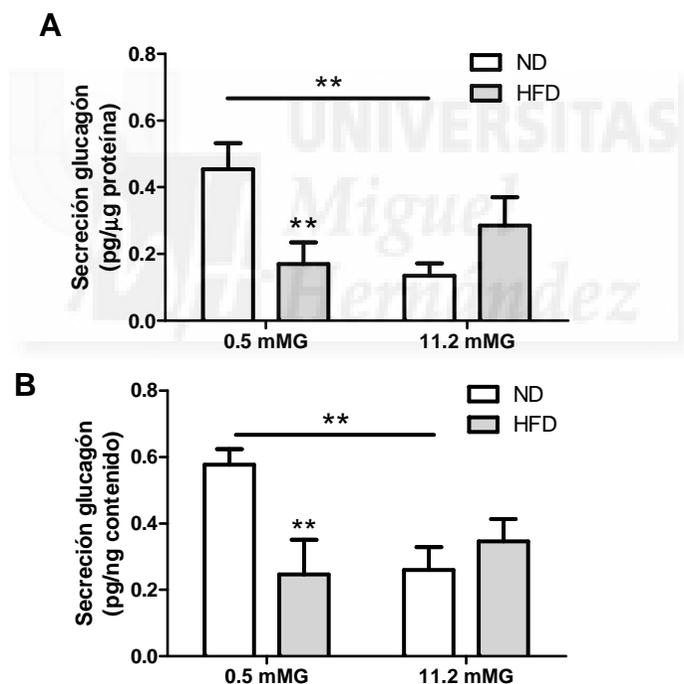


Fig 22. Alteraciones en la secreción de glucagón de los animales alimentados de forma crónica con dieta rica en grasa: A: Secreción estática de glucagón a diferentes concentraciones de glucosa, normalizado por proteína total. B: Secreción estática de glucagón a diferentes concentraciones de glucosa,

normalizada por contenido de glucagón (n=12 ratones por condición).**p<0.01.

El resultado vuelve a mostrar un comportamiento funcional normal en el grupo control y la misma alteración que observábamos al normalizar por proteína en el grupo HFD (ND = 0.577 ± 0.0475 pg/ng contenido; HFD = 0.2472 ± 0.1041 pg/ng contenido de glucagón)

3. LOS PATRONES DE LA SEÑAL INTRACELULAR DE CALCIO Y DE LA CAPACITANCIA CELULAR NO VARÍAN EN LA CÉLULA ALFA ENTRE RATONES ND Y HFD.

El ión calcio es el segundo mensajer intracelular que se encuentra implicado en multitud de procesos celulares. Entre los que cabe destacar el proceso de exocitosis de los gránulos que acumulan diferentes hormonas en el islote. Variaciones de glucosa en el medio extracelular llevan a la activación o inhibición de la actividad eléctrica de la célula alfa y por tanto de la secreción de glucagón. Ligado a este proceso, se producen variaciones en la concentración intracelular de este ión.

En vista de que nuestros ratones sujetos de estudio, muestran modificaciones tanto *in vivo* como *ex vivo* en la secreción de glucagón, decidimos realizar un estudio de la señalización intracelular del ion Calcio (Ca^{2+}), para dilucidar su posible implicación en los eventos observados.

Para la evaluación del efecto de la glucosa sobre la señalización de calcio intracelular realizamos experimentos de

microfluorimetría con la sonda Fluo-4 en islote intacto mediante microscopía confocal. Posteriormente analizamos la frecuencia oscilatoria del calcio intracelular de las células alfa, a 0.5 mM de glucosa (mMG) y 11 mMG. Para la identificación de las mismas, tomamos como control positivo, las oscilaciones a 0.5 mMG, así como la respuesta a adrenalina añadida al final del registro, ya que estas respuestas son específicas de este tipo celular (Fig 23).

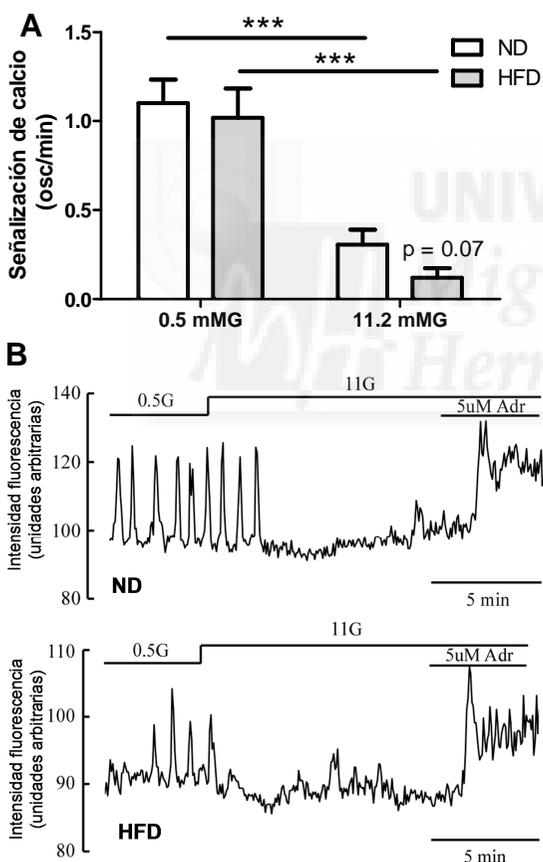


Fig 23. Cuantificación de la frecuencia oscilatoria de las señales de calcio de las células alfa, mediante microscopía confocal. A: Frecuencia expresada en oscilaciones por minuto de los animales tratados de forma crónica con ND o HFD a baja y alta glucosa. B: Registros representativos de respuesta de calcio intracelular a distintas concentraciones de glucosa y en presencia final de adrenalina, en células individuales en islote intacto (n=16 ND; n=10 HFD). ***p<0.001

A 0.5 mMG el patrón oscilatorio no presenta diferencias significativas entre los ratones ND y HFD. A alta glucosa (11

mMG), dónde encontramos la inhibición esperada de la señal de calcio intracelular de las células alfa, observamos una tendencia hacia una mayor inhibición ($p=0.07$) en el caso de los ratones HFD, aunque no estadísticamente significativa. Así, a 0.5 mMG la frecuencia oscilatoria de las células de ND fue de 1.1 ± 0.13 oscilaciones por minuto y la de los HFD de 1.02 ± 0.16 oscilaciones por minuto. A 11 mM la frecuencia oscilatoria disminuye, llegando a valores de 0.306 ± 0.082 oscilaciones por minuto para ND y 0.12 ± 0.053 oscilaciones por minuto para HFD. Por tanto, parece que la señal de Ca^{2+} regulada por glucosa en las células alfa no está modificada por la dieta alta en grasa (Fig.23)

Otra cuestión importante que se nos planteó fue investigar si las modificaciones encontradas en la secreción hormonal de nuestros ratones de estudio estaban relacionadas con modificaciones en la exocitosis de las células. Para esto llevamos a cabo registros de capacitancia (C_m) de alta resolución en células aisladas en islotes intactos de ambos grupos de estudio (Fig. 24).

Llevamos a cabo experimentos en los que medimos el incremento de la capacitancia evocado por un tren de 10 pulsos de 500 ms (aplicados a una frecuencia de 1Hz), para despolarizar las células desde -70 mV a 0 mV, activando así canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. Mediante esta estimulación, provocamos un aumento de la concentración intracelular de calcio suficiente para reclutar gránulos de glucagón cercanos a la membrana plasmática, así como

posiciones más retrasadas en el citosol en relación a estas ¹⁰⁰. Tras el análisis de los datos observamos que el incremento de capacitancia acumulado al final de la estimulación, no presenta diferencias significativas entre ND y HFD. Por tanto parece que tampoco existen diferencias a nivel de la excitotoxicidad en las células alfa de los animales obesos.

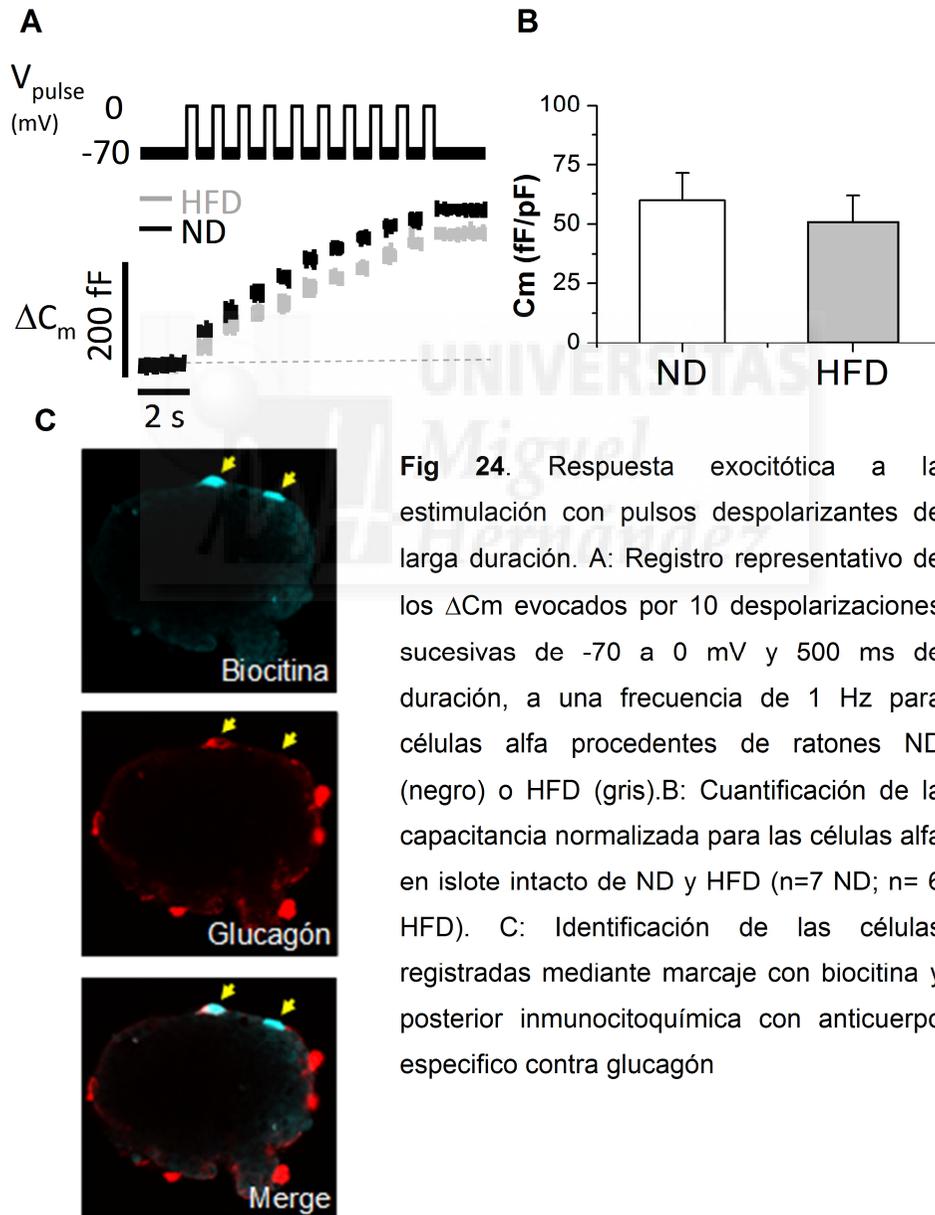


Fig 24. Respuesta excitotóxica a la estimulación con pulsos despolarizantes de larga duración. A: Registro representativo de los ΔC_m evocados por 10 despolarizaciones sucesivas de -70 a 0 mV y 500 ms de duración, a una frecuencia de 1 Hz para células alfa procedentes de ratones ND (negro) o HFD (gris). B: Cuantificación de la capacitancia normalizada para las células alfa en islote intacto de ND y HFD (n=7 ND; n= 6 HFD). C: Identificación de las células registradas mediante marcaje con biocitina y posterior inmunocitoquímica con anticuerpo específico contra glucagón

4. LOS RATONES HFD MUESTRAN UN DESCENSO EN LA MASA DE CÉLULA ALFA, ASÍ CÓMO EN EL TAMAÑO CELULAR Y LA PROLIFERACIÓN.

En base a los resultados obtenidos decidimos explorar la existencia de cambios estructurales en el islote que pudiesen explicar la disminución de los niveles circulantes de glucagón en los individuos obesos (Fig. 25).

Para ello, en primer lugar analizamos el peso de los páncreas de los ratones, encontrando que el peso del páncreas fue significativamente mayor en el caso del grupo HFD. En los ratones alimentados con dieta normal el peso pancreático total fue de 240.8 ± 7.32 mg, mientras que en los ratones alimentados con dieta rica en grasa la media se encuentra en 286.94 ± 4.74 mg. A partir de los cortes histológicos de estos páncreas, analizamos el porcentaje de masa pancreática ocupado por célula alfa. Los resultados indican una disminución significativa del porcentaje de área pancreática (41%) ocupado por célula alfa en los ratones HFD, en los que el valor medio resultó ser de 0.0937 ± 0.008 %, frente al 0.159 ± 0.018 % encontrado en los ratones ND. La masa absoluta de célula alfa resultante de multiplicar la masa relativa por el páncreas, mostró una diferencia de 25.18% pero no fue estadísticamente significativa ($p=0.075$).

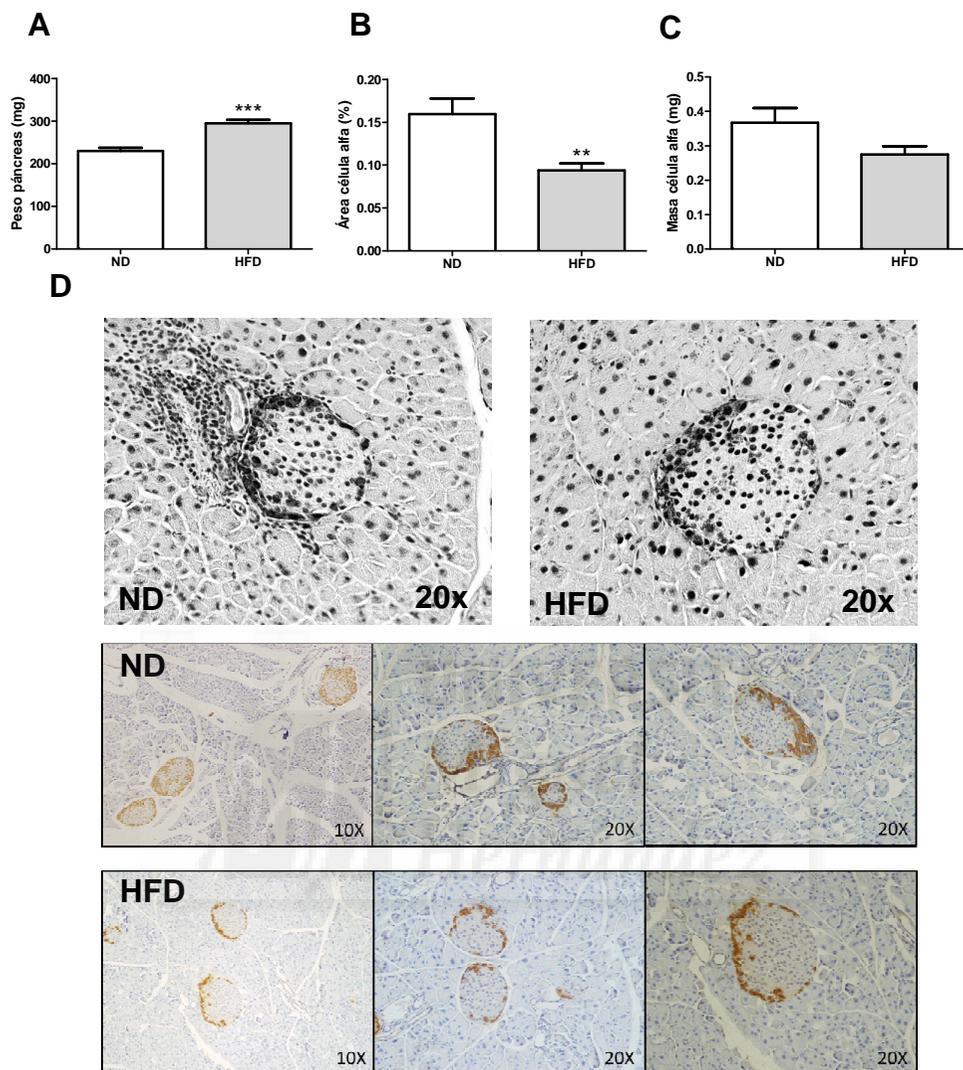


Fig 25. Caracterización de la masa de célula alfa. A: Peso medio de los páncreas de ratones ND y HFD extraídos al final del tratamiento de 12 semanas. B: Área expresada en % con respecto a páncreas total, ocupado por célula alfa. C: Masa de célula alfa expresada en mg. D: Imágenes representativas de cortes histológicos de páncreas de ratones ND y HFD, con marcaje glucagón positivo tomadas a 10 y 20 aumentos. (n= 12 ratones por condición). **p<0.01, ***p<0.001.

Con la finalidad de saber si la disminución de la población celular se debía a un proceso de disminución de proliferación celular o de descenso de tamaño por atrofia. También estudiamos si existían diferencias en el tamaño (Fig.26). Para esto, realizamos dos experimentos en los que calculamos el tamaño de las células. En primer lugar, en los cortes histológicos en los que analizamos la masa celular, y en segundo lugar en células aisladas de cultivo primario, con un marcaje previo anti-glucagón. En ambos casos encontramos un resultado similar: un descenso significativo del tamaño de las células en el grupo alimentado con dieta rica en grasa. Para completar la caracterización de la masa de célula alfa y averiguar si además de una disminución de tamaño la masa podría mostrar una modificación de células en división o muerte, realizamos un experimento de análisis de proliferación celular y otro de apoptosis celular. Los resultados muestran una disminución de la proliferación de las células alfa de los animales obesos y un aumento de la apoptosis (Fig. 26).

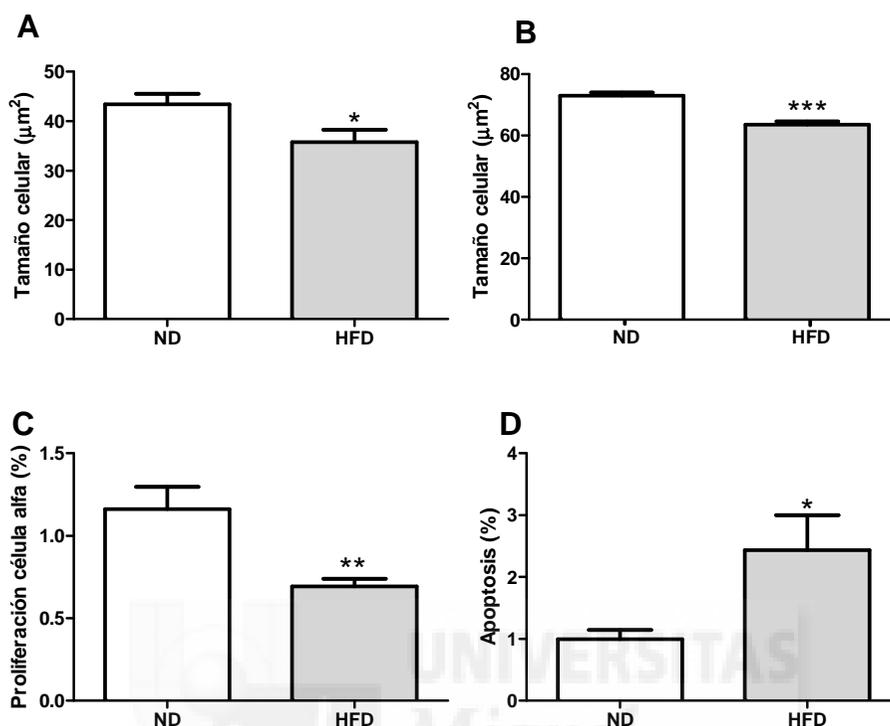


Fig 26. Tamaño celular, proliferación y apoptosis de célula alfa. A: Tamaño celular medio de las células alfa pancreáticas medidas en cortes de tejido pancreático parafinado, marcadas positivamente para glucagón (ND n= 2196 células; HFD n= 3601 células pertenecientes a 5 ratones por condición). B: Tamaño celular de alfa medido en cultivo primario de ratones obesos (ND n=201 células; HFD n=191 células pertenecientes a 7 y 8 ratones respectivamente) C: Proliferación de la población de célula alfa para ND y HFD (ND n= 5323 células; HFD n= 7488 células pertenecientes a 12 ratones por condición) D: Apoptosis de las células alfa expresada en porcentaje (ND n=2421 células; HFD n= 3851 células pertenecientes a 5 ratones por condición). *p<0.05; **p<0.01, ***P<0.001.

5. CARACTERIZACIÓN DEL MODELO DE OBESIDAD TRAS 6 MESES DE ADMINISTRACIÓN DE DIETA ALTA EN GRASA.

Para comprobar si las adaptaciones observadas con tres meses de dieta, se mantienen con una prolongación del tiempo de administración de dieta, repetimos algunos de los experimentos anteriores, con grupos de ratones alimentados con dieta HFD y ND durante 24 semanas. Las medidas de diferentes parámetros metabólicos tras la dieta HFD durante 24 semanas se resume en la tabla 3.

	DIETA NORMAL	DIETA RICA EN GRASA
PESO FINAL (g)	22,73 ± 0,59	43,67 ± 1,06***
GLUCEMIA (SACIEDAD) (mg/dL)	155,8 ± 7,51	170,33 ± 2,93*
INSULINA PLASMÁTICA (SACIEDAD) (ng/mL)	1,46 ± 0,23	2,64 ± 0,31*
GLUCEMIA EN AYUNAS (mg/dL)	108,8 ± 2,55	175,17 ± 10,59***
INSULINA PLASMÁTICA EN AYUNAS (ng/mL)	0,21 ± 0,13	3,32 ± 0,96*
HOMA IR	1,43 ± 0,87	33,36 ± 8,9***

Tabla 3. Peso final y parámetros plasmáticos en condiciones de saciedad y ayuno de 12 horas para animales alimentados con dieta control y animales alimentados con dieta rica en grasa durante 24 semanas (n = 6 ND; n = 9 HFD). *p<0.05;**p<0.01;***p<0.001.

Tras completar las 24 semanas de tratamiento con dieta rica en grasa o dieta normal, la glucemia de los ratones HFD en condiciones de saciedad, se encuentra elevada de forma significativa por encima de los niveles de los ratones control. Las diferencias en los niveles circulantes de insulina en sangre se hacen más patentes, duplicándose en los HFD en *fed state*. En condiciones de ayunas, los animales obesos presentaron una hiperglucemia acentuada y los valores de insulina asociados a estas glucemias fueron otra vez elevados.

Antes de analizar lo que ocurre con nuestra hormona diana de estudio, comprobamos previamente si con el paso del tiempo de alimentación con dieta rica en grasa, se producía el esperado aumento de la intolerancia a la glucosa y los niveles de insulina en sangre aumentan, como cabría esperar. Para esto realizamos un Test de Tolerancia a la Glucosa (GTT), con los animales inicialmente en ayunas (12h), medimos las glucemias correspondientes a los minutos 0, 15, 30, 60 y 120 tras una inyección intraperitoneal de glucosa (2g/ kg peso). El resultado nos muestra una clara intolerancia a la glucosa, que ha aumentado si la comparamos con la misma prueba realizada a las 12 semanas de tratamiento (Fig. 27).

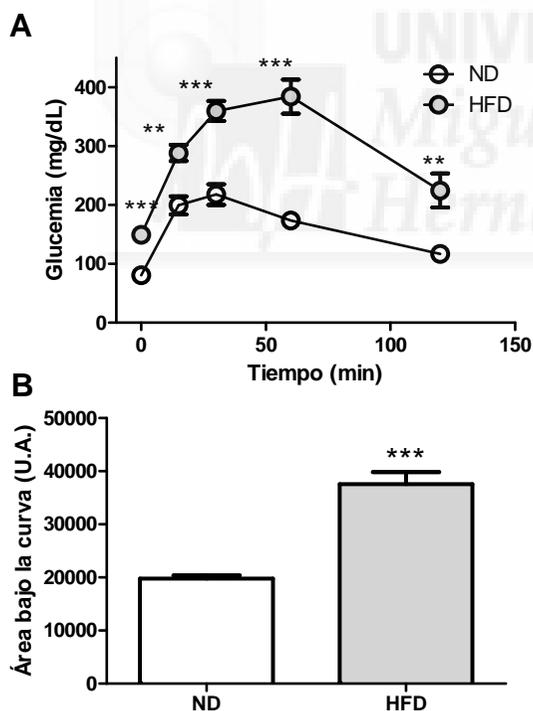


Fig 27. Caracterización de la tolerancia a la glucosa de los ratones obesos. A: Test de tolerancia a la glucosa representativo de un grupo de ratones HFD comparado con un grupo de ratones control, tras 24 semanas de dieta (n= 5 ratones por condición). B: Área bajo la curva correspondiente al test de tolerancia a glucosa anterior. **p<0.01, ***p<0.001.

Con toda esta información podemos decir que nuestros animales alimentados durante 6 meses con dieta rica en grasa, presentan una marcada intolerancia a la glucosa, así como una

acentuada hiperinsulinemia. Por lo tanto la homeostasis de la glucosa empeoró tras 6 meses de alimentación HFD, dando lugar a una situación de hiperinsulinemia e hiperglicemia, donde se evidencia que la compensación por parte de la célula beta sería insuficiente.

6. LOS RATONES ALIMENTADOS CON DIETA HFD DURANTE 6 MESES TIENEN LOS MISMOS NIVELES DE GLUCAGÓN CIRCULANTE.

En este contexto de hiperinsulinemia, hiperglucemia, intolerancia a la glucosa y marcada resistencia a la insulina tras los 6 meses de tratamiento con dieta rica en grasa, decidimos analizar los niveles de glucagón.

Tras el análisis mediante ELISA específico para glucagón, vimos que los niveles plasmáticos a los 6 meses de tratamiento HFD se ven modificados, respecto a lo que observábamos a 3 meses de dieta. Así, los animales HFD en este punto aumentan los niveles de glucagonemia, encontrándose en valores equiparables a los animales control, alimentados durante 6 meses con dieta normal. Los animales alimentados con dieta control presentan valores de 56.40 ± 6.69 pg/mL en condiciones de saciedad y 101.91 ± 17.55 ng/mL en condiciones de ayuno; en el grupo alimentado con dieta rica en grasa los valores fueron de 46.94 ± 4.96 ng/mL y 96.32 ± 19.40 pg/mL respectivamente (Fig. 28).

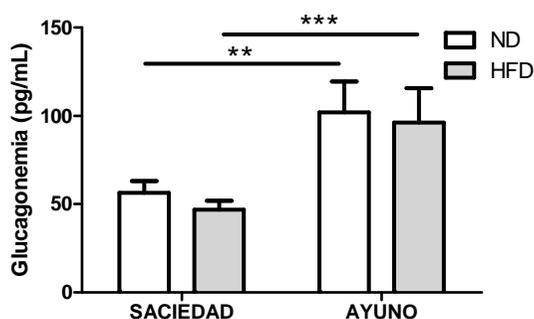


Fig 28. Valores de glucagón en plasma en ratones con 6 meses de tratamiento. (n=11-20 ratones por condición). ** p<0.01;***p<0.001.

7. LA SECRECIÓN DE GLUCAGÓN TRAS 6 MESES DE TRATAMIENTO CONTINÚA ALTERADA, PERO DESAPARECEN LAS DIFERENCIAS EN EL CONTENIDO DE GLUCAGÓN.

Tras evaluar la secreción de glucagón *ex vivo*, tras un tratamiento HFD de 6 meses, comprobamos que dicha secreción continúa alterada en las mismas concentraciones de glucosa que en el caso del tratamiento con 12 semanas de dieta (fig.29).

Cuando normalizamos la secreción de glucagón por proteína total del islote, seguimos observando una diferencia muy significativa a concentraciones de glucosa 0.5 mM, siendo para los ratones ND de 0.2627 ± 0.028 pg/ μ g proteína mientras que para los ratones HFD los valores descienden hasta alcanzar una media de 0.0403 ± 0.0159 pg/ μ g proteína. Al aumentar la concentración de glucosa, observamos un descenso lógico de la secreción en el grupo control; el grupo HFD paralelamente, mantiene la secreción en valores más bajos, sin suponer diferencias significativas (Fig. 29).

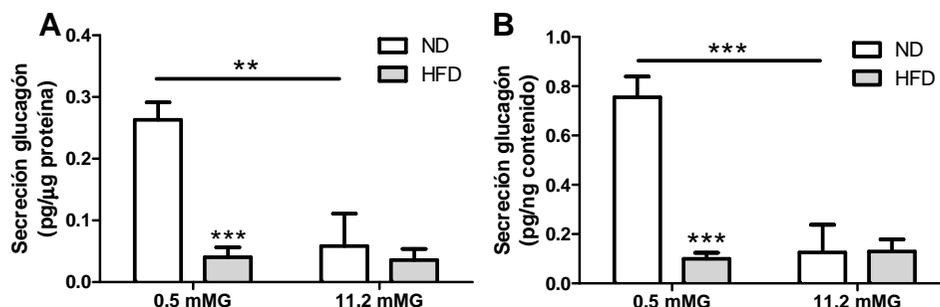


Fig 29. Secreción estática de glucagón a concentraciones crecientes de glucosa. A: Secreción de glucagón de los islotes pertenecientes a ratones alimentados con dieta control durante 24 semanas, comparados con islotes pertenecientes al grupo obeso, normalizado por proteína total. B: Secreción de glucagón de los islotes extraídos del grupo control en comparación con el grupo alimentado con dieta rica en grasa, normalizado por contenido de glucagón total almacenado en el islote. (n = 12 ratones por condición). **p<0.01, ***p<0.001.

Al normalizar por el contenido total de glucagón almacenado en los islotes, como evaluación de la eficiencia de secreción, los animales control mantienen la esperada secreción de glucagón elevada a 0.5 mM glucosa (0.7547 ± 0.0838 pg/ng contenido), mientras que para los animales obesos desciende de forma muy significativa (0.0993 ± 0.0250 pg/ng contenido).

Al igual que hicimos a las 12 semanas de tratamiento, tras 24 semanas, medimos el contenido total de la hormona almacenado en los islotes de los grupos de estudio. Observamos que tras el aumento de la dieta en el tiempo, el contenido total de los islotes de ambos grupos no presenta diferencias siendo de 324.36 ± 19.36 pg/μg proteína para el grupo control y de 310.30 ± 21.88 pg/μg proteína para el grupo HFD (Fig. 30).

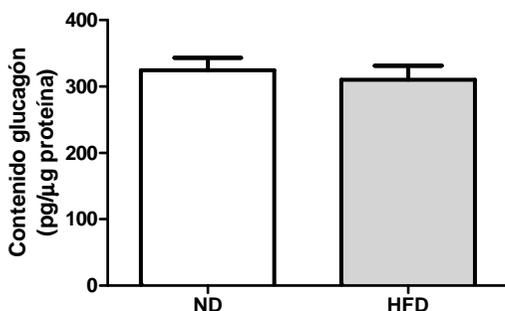


Fig 30. Contenido total de los islotes aislados de los páncreas pertenecientes a ratones alimentados con dieta control y dieta rica en grasa tras 24 semanas. (n= 12 ratones por condición).

8. EN LOS RATONES OBESOS, TRAS 24 SEMANAS DE DIETA, LA MASA DE CÉLULA ALFA NO MUESTRA DIFERENCIAS CON EL CONTROL Y EL TAMAÑO CELULAR AUMENTA.

Al igual que en la primera parte del estudio en la que caracterizamos estructuralmente lo que ocurría en los páncreas de los animales tras 12 semanas de dieta hiperlipídica, realizamos el análisis inmunohistoquímico de la masa de célula alfa, siguiendo el mismo protocolo en los animales tratados durante 6 meses.

En primer lugar, medimos de nuevo el peso de los páncreas, y observamos que tras 6 meses de dieta el páncreas sigue presentando hipertrofia (ND: 295.1 ± 7.14 mg; HFD: 348.8 ± 14.5 mg) (Fig. 31).

RESULTADOS

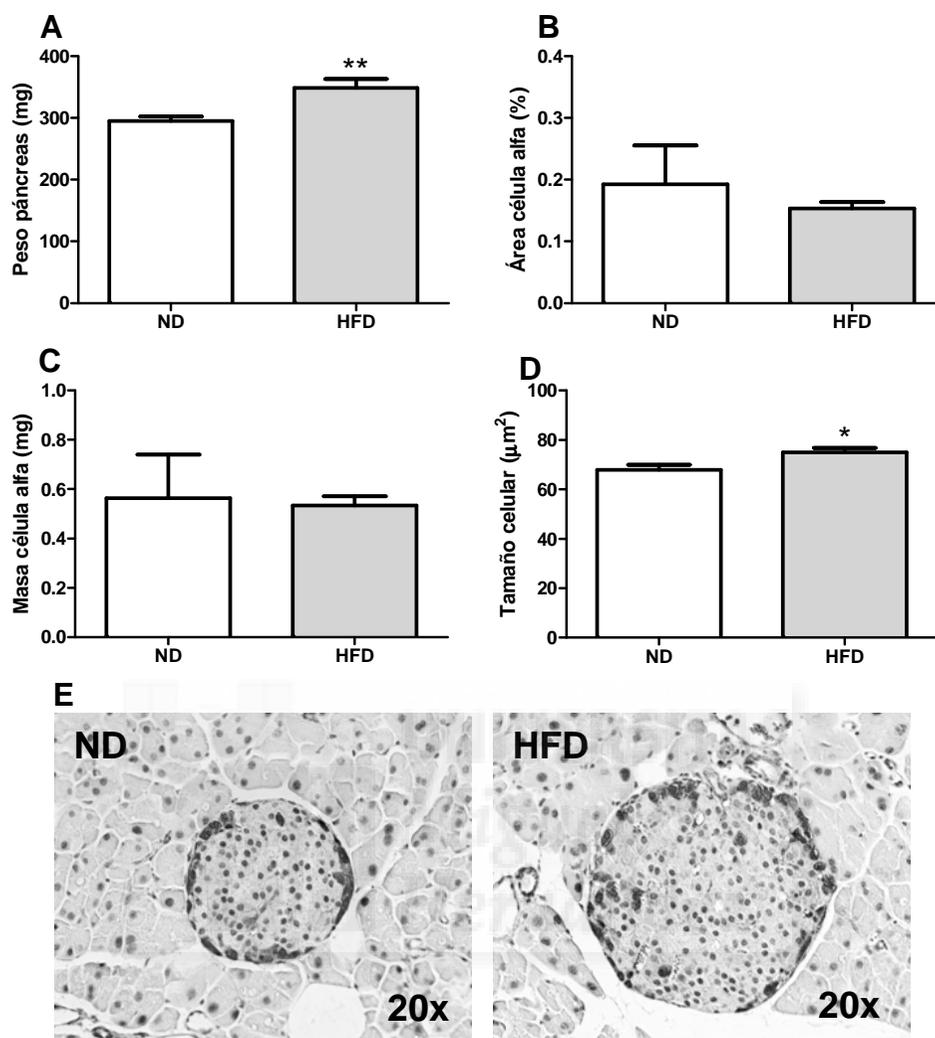


Fig 31. Análisis morfológico de los páncreas de los ratones alimentados con dieta ND y HFD durante 24 semanas. A: Peso total de los páncreas al final del tratamiento de 6 meses, del grupo HFD comparado con sus controles (n= 6 ratones por condición). B: Área pancreática de célula alfa, expresada en % por área de páncreas, de los grupos de estudio. (n = 6 ratones por condición). C. Masa total de célula alfa expresada en mg. (n = 6 ratones por condición).D: Tamaño celular de alfa en islotes disgregados en cultivo primario (n = 50 células ND; n = 112 células HFD). E: Imágenes representativas de los islotes analizados en los cortes histológicos, marcados contra glucagón, de los animales pertenecientes al grupo ND (primera imagen) y HFD (segunda imagen) * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Una vez realizado el análisis, comprobamos que los valores del grupo control se mantienen iguales que los que encontramos a los 3 meses: el área pancreática de célula alfa, era del 0.195 ± 0.0394 % a las 12 semanas y a las 24 semanas era de 0.192 ± 0.045 %. En el caso de los ratones obesos, el porcentaje de célula alfa aumenta pasando del 0.1 ± 0.015 % al 0.15 ± 0.027 %. Al comparar la masa relativa de alfa de los grupos ND y HFD a los 6 meses no observamos diferencias (Fig. 31).

Cuando analizamos la masa de la célula alfa (peso de páncreas x área de alfa), no encontramos diferencias entre los grupos de estudio. Los ratones ND presentaban una media de 0.46 ± 0.08 mg de masa de célula alfa a los tres meses, que pasan a ser 0.563 ± 0.13 mg a los 6 meses. Los ratones HFD a su vez, pasan de 0.3 ± 0.047 mg a 0.534 ± 0.092 mg. Al igual que en el caso anterior, no encontramos diferencias entre los grupos, tras los 6 meses de tratamiento.

Para finalizar el estudio comparativo, medimos de nuevo el tamaño celular mediante disgregación de las células de páncreas y tinción de por inmunofluorescencia contra glucagón. A los 3 meses observábamos que se producía una atrofia de la célula alfa en el grupo HFD. Nuestros datos a 6 meses apuntan a que esta atrofia evoluciona a una hipertrofia, pasando a ser, las células alfa de los animales alimentados crónicamente con dieta rica en grasa de mayor superficie comparadas con sus controles.



V. DISCUSIÓN

La obesidad es una patología que actualmente alcanza proporciones epidémicas en nuestra sociedad. Según datos del año 2011 proporcionados por el departamento de nutrición de la Universidad Complutense de Madrid, la prevalencia de sobrepeso de la sociedad española ronda el 34% siendo mayor en hombres (44%) que en mujeres (26%) y la obesidad afecta al 13.6% de la población adulta, sin existir diferencias entre sexos¹⁰¹.

Esta patología está asociada al desarrollo de múltiples enfermedades y descompensaciones metabólicas, como es la aparición de resistencia a insulina e intolerancia a la glucosa que podría evolucionar a Diabetes tipo 2. En el individuo obeso, la sensibilidad de los tejidos periféricos a la insulina disminuye, produciéndose una mayor demanda de la hormona para mantener niveles de normogluceemia en el organismo. En respuesta a esta situación de mayor requerimiento de insulina, las células beta pancreáticas se adaptan, tanto estructural cómo funcionalmente con la finalidad de aumentar los niveles de esta hormona y mantener la homeostasis de la glucosa^{99,102}. La respuesta compensatoria que se produce en las células beta pancreáticas como resultado de esta patología, ha sido muy bien estudiada por diversos grupos que han establecido que en la etapa de compensación de la célula beta, existe un aumento generalizado de la secreción de insulina¹⁰³ y un aumento agudo de la hormona en respuesta a glucosa, para mantener la normogluceemia en el organismo¹⁰⁴. Esta compensación ocurre tanto a nivel estructural (aumento de la masa de célula beta) como a nivel funcional (aumento de la secreción de insulina).

Este estado compensatorio se ha constatado tanto en modelos de roedores como en necropsias de páncreas humanos^{99,105,106}. En este último caso caracterizado principalmente por un aumento de la masa de célula beta pancreática¹⁰⁷⁻¹⁰⁹. Aunque como hemos apuntado existen numerosos estudios que demuestran la adaptación de las células beta pancreáticas durante la progresión de la obesidad, no existe información acerca de las adaptaciones que pueden darse durante este estadio en las células alfa pancreáticas. En la presente tesis, utilizando un modelo de ratón obeso inducido por dieta rica en grasa, que previamente hemos caracterizado y utilizado para el estudio de las adaptaciones estructurales y funcionales de las células beta pancreáticas⁹⁹, hemos realizado un estudio morfofuncional de las células alfa durante la progresión de la obesidad, de una situación de normoglucemia a hiperglicemia.

MODELO DE OBESIDAD:

Hemos caracterizado un modelo murino de obesidad inducida por dieta rica en grasa para estudiar la adaptación de la célula alfa durante la fase de compensación en la obesidad. Los ratones fueron alimentados con dieta rica en grasa durante 12 semanas. De acuerdo con resultados previos de diversos grupos incluido el nuestro, se trata de un modelo hiperinsulinémico, levemente intolerante a la glucosa, pero que mantiene niveles normales de glucemia tanto en ayunas como en situación de saciedad (Tabla 2). Tras realizar diversos test de tolerancia a la glucosa intraperitoneal junto con los datos de insulinemia y glucemia, los resultados obtenidos nos indican que nuestro

modelo es compatible con una situación pre-diabética de resistencia a la insulina, hiperinsulinemia y normoglucemia asociada a obesidad. Además, en estudios previos hemos observado que en el presente modelo existe un aumento de masa y función de las células beta pancreáticas⁹⁹. Como apuntábamos al principio, esta situación es característica del estado de compensación inicial previo a una posible evolución hacia un cuadro diabético de tipo 2.

Hemos desarrollado este modelo de obesidad, en ratones hembra de la cepa C57bl/6. La elección del género está basada en el hecho de que las hembras presentan protección frente a la obesidad, resistencia a la insulina y progresión hacia Diabetes tipo 2. Diferentes estudios demuestran que, utilizando protocolos de tratamiento con dietas similares, el deterioro de la tolerancia a la glucosa durante la obesidad inducida por dieta rica en grasa es más lento en el caso de las hembras comparadas con los machos. En los machos se observa un deterioro más marcado y rápido de la función de las células beta, así como una marcada hiperglucemia^{110,111}. Debido a estas características, consideramos que las hembras son un modelo más adecuado para el estudio de las adaptaciones pancreáticas que se producen durante la obesidad, ya que permanecen más tiempo en estado prediabético manteniendo la normoglucemia^{99,112}.

Para la elección del tiempo idóneo de dieta, se ha seguido la evolución de la glucemia e insulinemia de los animales obesos, estableciendo que tras 12 semanas de dieta, los ratones C57bl6 hembra obesas, son normoglucémicas y

resistentes a insulina. En repetidas ocasiones hemos podido comprobar que nuestro modelo mantiene niveles de glucosa en sangre comparables a los del grupo control, y que para conseguirlo necesita aumentar los niveles de insulina. En este punto del tratamiento, hemos descrito previamente que las células beta pancreáticas aumentan en tamaño y número, y son capaces de secretar más insulina, razón por la cual pueden suplir la resistencia de los tejidos periféricos a la hormona y mantener la glucemia en valores normales⁹⁹.

Con el fin de evaluar lo que ocurre con la célula alfa durante la evolución de la obesidad, también realizamos parte del presente estudio en ratones hembra c57bl6 alimentadas con dieta rica en grasa durante 24 semanas. Al prolongar el tiempo de dieta, observamos un esperable deterioro en la homeostasis de la glucosa. El modelo caracterizado tras 24 semanas de tratamiento con dieta alta en grasa, muestra una marcada intolerancia a la glucosa (Fig 27), así como niveles de glucemia elevados, tanto en ayunas como en condiciones de saciedad, y una marcada hiperinsulinemia, también encontrada en ambas condiciones. En este caso nos encontramos en un estadio pre-diabético en el que la célula beta pancreática no es capaz de suplir el aumento de las exigencias de los tejidos diana para mantener la normoglucemia en el organismo.

ALTERACIONES PLASMÁTICAS:

Efecto de la dieta sobre los niveles circulantes de glucagón en plasma:

En este estado compensatorio observamos una marcada hipoglucagonemia cuando medimos los niveles circulantes de glucagón en plasma, tanto en condiciones de ayuno como en saciedad (Fig 18). Existen pocos estudios que caracterizan este parámetro en ratones obesos. En la bibliografía podemos encontrar tanto estudios que describen niveles normales de glucagón¹¹³⁻¹¹⁵, como otros que describen hiperglucagonemia¹¹⁶, o hipoglucagonemia¹¹⁷. Todas estas discrepancias podrían estar asociadas a la variabilidad que existe entre los diferentes modelos de estudio, sobre todo en el tiempo y composición de la dieta. Del mismo modo existen estudios realizados en humanos que apuntan a que la función de las células alfa pancreáticas y los niveles de glucagón en plasma pueden estar tanto aumentados, disminuidos o ser normales, cuando comparamos sujetos obesos con individuos control, aunque en la mayor parte de dichos estudios están realizados en pacientes con diabetes tipo 2 en los que la homeostasis de la glucosa se encuentra muy alterada^{88,118-121}. Parece por tanto, que la célula alfa estaría implicada en el deterioro la homeostasis de la glucosa durante la obesidad, adaptándose o modificándose, de algún modo, a las nuevas condiciones o exigencias del organismo. La adaptación y modificación sufrida podría ser diferente dependiendo del estado metabólico y punto en el desarrollo de la patología en el que nos encontremos en el momento del estudio.

En cualquier caso, no existen estudios que aborden la adaptación que sufren las células alfa en un estadio temprano de adaptación durante la obesidad. En la presente tesis realizamos este estudio con la finalidad de entender mejor el proceso de evolución y modificación del páncreas endocrino durante la obesidad y su posible evolución a diabetes tipo 2, ya que el conocimiento del comportamiento de los diferentes tipos celulares del islote de Langerhans es clave en la regulación de la homeostasis de la glucosa, y podría aportar información interesante para el establecimiento de nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento de Diabetes tipo 2, o incluso para su prevención.

Existen estudios realizados por otros autores en los que se describe que la ausencia de señalización de glucagón, observada en ratones *knockout* específicos para receptor de glucagón, desencadena un aumento de la sensibilidad a insulina a nivel periférico¹²², así como una protección contra el desarrollo de Diabetes tipo 1 y 2.^{123,124} En ambos casos, la hiperglucemia se evitó principalmente por la reducción de la producción hepática de glucosa mediada por el glucagón. Por tanto el mantenimiento de bajos niveles basales de glucagón en sangre (Fig 18), podría ser un sistema de control de la glucemia en el estado compensatorio, previo al fallo de las células beta pancreáticas y al desarrollo de Diabetes tipo 2.

En este sentido, uno de los primeros experimentos planteados en esta tesis fue el análisis de la respuesta *in vivo* a hipoglucemia e hiperglucemia en los animales obesos (Fig 20).

Al evaluar los niveles plasmáticos de glucosa y glucagón, antes y después de la administración de una inyección intraperitoneal de insulina, observamos que la respuesta de los animales alimentados con dieta rica en grasa está bien conservada frente a hipoglucemia. Partiendo de unos niveles de glucagón más bajos en los individuos obesos, asociados a glucemias normales, nuestros animales son capaces de alcanzar niveles hormonales circulantes semejantes a los del grupo control como respuesta a la administración de insulina, que lleva al descenso de la glucemia en el organismo y, en consecuencia, activa la secreción de glucagón. Aparentemente las células alfa presentan una respuesta normal a una situación de hipoglucemia.

Del mismo modo, evaluamos la respuesta metabólica a una sobrecarga de glucosa administrada intraperitonealmente. Observamos de nuevo la situación de hipoglucagonemia basal, pero en cambio, una sobresecreción de glucagón en respuesta a la carga administrada (Fig 19). En este caso, la supresión de la secreción de glucagón a alta glucosa se encuentra alterada. En concordancia con nuestros resultados, se ha descrito previamente que existe una pérdida de la inhibición de la secreción de glucagón a alta glucosa tanto en animales tratados con dieta rica en grasa de forma crónica¹¹⁴, como en humanos obesos¹²⁵. También existen estudios que describen alteraciones de las células alfa tanto en situación de hiperglucemia como a bajos niveles de glucosa sanguíneos³⁶.

Los datos indican por tanto que los niveles de glucagón también varían durante la obesidad. En el momento en el que nos encontramos, existe una adaptación de la célula alfa a la baja, para facilitar el mantenimiento de la normoglucemia. Esto también permitiría una mayor eficiencia de las células beta, que se adaptan al alza para mantener los niveles de glucosa en una situación de mayor exigencia metabólica.

Siguiendo la evolución del modelo, realizamos las mismas mediciones plasmáticas en condiciones de ayuno y saciedad, pero esta vez tras 24 semanas de dieta. En este caso no encontramos diferencias significativas en los niveles plasmáticos de glucagón (Fig 28). Este cambio, supone una elevación de la glucagonemia, si lo comparamos con el tratamiento de 12 semanas, coincidiendo con un deterioro de la función de la célula beta pancreática, y de la homeostasis de la glucosa (tabla 3). En este punto, las células alfa perderían la capacidad compensatoria que les permitía mantener una situación de normoglucemia, con niveles de glucagón más bajos de lo normal.

Efecto de la dieta sobre los niveles hormonales circulantes en plasma:

Cómo comentábamos con anterioridad, nuestro modelo tras 12 semanas de dieta, se encuentra en un estadio pre-diabético en el que es capaz de mantener la glucemia en valores normales, aunque encontramos valores alterados cuando medimos diferentes parámetros hormonales. Los niveles de insulina en sangre están aumentados debido a la adaptación

sufrida por las células beta (resultados presentes y en González et al, 2013⁹⁹).

Tras medir los niveles de somatostatina en sangre, observamos una tendencia a la baja no significativa estadísticamente de los valores en los individuos tratados con dieta rica en grasa (fig 17A). Aunque los individuos obesos podrían desarrollar alteraciones y adaptaciones a nivel de las células delta del islote, no se ha abordado este tipo celular de manera específica en esta tesis. Además, el islote de Langerhans no es el único lugar de síntesis de esta hormona en el organismo, pudiéndose sintetizar también en el hipotálamo, otras zonas del sistema nervioso central y en la mucosa gastrointestinal.

El GLP-1 circulante se encuentra aumentado de forma significativa en nuestro modelo (Fig 17B). Estos resultados son similares a los encontrados en otros modelos de obesidad inducida por dieta rica en grasa^{126,127}. Esta hormona, derivada de la transcripción de gen de proglucagón y sintetizada en las células L del intestino, se secreta a la luz del intestino delgado estimulada por la presencia de carbohidratos, proteínas y lípidos. La elevación de los niveles circulantes de GLP-1 puede contribuir al aumento de los niveles de insulinemia y al descenso de la glucagonemia. Esta hormona, estimula la secreción de insulina e inhibe la de glucagón, está involucrada en el aumento de masa beta pancreática y en la sobreexpresión del gen de la insulina¹⁵, así como en la disminución de la masa de célula alfa¹²⁸. Existen estudios realizados en modelos de animales con

señalización defectiva de glucagón, cómo son los ratones deficientes en prohormona convertasa 2 (pcsk2 -/-) que presentan bajos niveles de glucagón plasmáticos y un incremento de la producción de GLP-1¹¹⁷. La deficiencia de glucagón circulante observada en nuestro modelo así como la disminución de la masa de célula alfa, podría ser por tanto debida a la elevación de los niveles de GLP-1 circulantes, que a su vez, también influirán en las alteraciones de la secreción de insulina observadas por nuestro grupo en este mismo modelo⁹⁹. Además, otras investigaciones sugieren que el GLP-1 suprime de forma directa la producción de glucosa hepática^{129,130}. De este modo los elevados niveles de GLP-1 circulantes contribuirían al mantenimiento de bajos niveles de glucosa en sangre, ayudando a conservar la homeostasis de la glucosa en los animales obesos.

ALTERACIONES FUNCIONALES EN LAS CÉLULAS ALFA PANCREÁTICAS.

Evaluación de secreción y contenido *in vitro*:

Al igual que ocurría con los valores plasmáticos, tras evaluar el contenido total de glucagón de nuestros dos grupos de estudio, encontramos una disminución significativa del mismo, para los ratones obesos. Este hallazgo, va en concordancia con el resto de nuestras observaciones y podría explicar en parte la hipoglucagonemia presente en el modelo.

El siguiente paso que llevamos a cabo fue examinar la secreción de glucagón en condiciones *in vitro*, tras aislar los

islotos de Langerhans procedentes de los dos grupos de estudio (Fig 22). En este caso podemos observar diversas alteraciones. En primer lugar, un defecto en la secreción de glucagón a baja glucosa (0.5 mM). Esta concentración de glucosa, aunque no es fisiológica, nos permite evaluar la respuesta secretora máxima de las células alfa en islotes aislados⁷³. El defecto en la secreción de glucagón persiste si medimos el mismo parámetro a las 24 semanas de dieta rica en grasa (fig 14). Por tanto, existe una disrupción en la secreción de glucagón en condiciones de hipoglucemia, que podría deberse a varios factores, como defectos en la sensibilidad de las células alfa a glucosa¹³¹, o a alteraciones en el acoplamiento estímulo secreción^{11,132}. Esto último es más improbable puesto que no vimos alteraciones en la señal de calcio en la célula alfa (Fig.23).

Se ha demostrado que las proteínas quinasas (per-arnt-sim; PAS) actúan como sensores de nutrientes y están implicadas en el mantenimiento del correcto balance energético celular. Estas quinasas están involucradas en la regulación de la expresión de preproinsulina inducida por glucosa y en la expresión génica de *Pdx1*, en las células beta. Además recientemente se ha descrito que dichas quinasas están involucradas en la regulación de genes lipogénicos¹³³. Existen estudios que demuestran que se encuentran altamente expresadas tanto en célula beta como en célula alfa pancreática, y que su silenciamiento inhibe la secreción de glucagón en condiciones de hipoglucemia¹³¹. La delección de este gen en ratones desencadena una protección casi completa sobre los

efectos de la dieta rica en grasa, previniendo la obesidad y el desarrollo de resistencia a insulina¹³⁴. Cabría la posibilidad de que la expresión de esta proteína, que tiene que ver tanto con la sensibilidad a glucosa cómo con la expresión de genes lipogénicos, estuviese alterada en los ratones obesos, debido a la dieta y podría estar implicada en las alteraciones de secreción de glucagón que hemos descrito. Esta posibilidad debería explorarse en el futuro.

La discordancia entre las alteraciones encontradas en el modelo *in vivo* e *in vitro*, pueden deberse a las diferentes propiedades y factores implicados en la secreción *in vivo* o *in vitro* de glucagón. Una baja glucosa de 0.5 mM no es posible en un sistema fisiológico, pero nos sirve para evaluar si los cambios que se producen son sólo debidos a cambios en las células alfa pancreáticas, ya que sabemos que a esta concentración de glucosa, el único grupo celular activo secretor del páncreas es la mencionada célula alfa. Además está descrito que *in vivo*, la secreción de glucagón ligada a una situación de hipoglucagonemia y los cambios que se producen en esta, asociados a variaciones de glucosa, están altamente regulados a nivel neuronal y adrenérgico^{95,135,136}. Posiblemente la regulación que ocurre *in vivo* está asociada al control nervioso y adrenérgico, que estaría permitiendo la regulación de los niveles de glucagón en plasma a pesar de los defectos observados *in vitro* en la secreción de glucagón.

Evaluación del patrón oscilatorio de calcio y la dinámica de exocitosis celular:

Tras medir las variaciones de calcio intracelular que se producen en las células alfa en islote aislados, cuando son sometidas a alta y baja glucosa, no encontramos cambios significativos en el patrón oscilatorio, ni en condiciones de baja glucosa, cuando la actividad de la célula alfa es máxima, ni en condiciones de alta glucosa, cuando se produce la inhibición de la célula alfa.

Cabría esperar que el descenso en la secreción a baja concentración de glucosa, estuviese correlacionado con un cambio en el patrón oscilatorio de la señalización intracelular de calcio¹¹. Sin embargo, la secreción está claramente alterada en los individuos obesos a pesar de no existir cambios en la señal de calcio. Aunque la exocitosis es Ca^{2+} dependiente en la célula alfa, estudios recientes indican que estos dos procesos pueden disociarse en algunas situaciones¹³⁷. Teniendo en cuenta este dato, y añadiendo el hecho de que al analizar la capacitancia celular de las células alfa, tampoco encontramos diferencias significativas en la capacidad exocitótica en respuesta a despolarizaciones (Fig. 24), el descenso observado en la secreción de la hormona en bajas concentraciones de glucosa, podría deberse a cambios a nivel ultraestructural, además de las posibles alteraciones a nivel de proteína quinasas citadas en el apartado anterior. Existen modelos de estudio de diabetes en los que se ha observado que los gránulos de glucagón presentan mayor contenido, o se mantiene mayor cantidad de gránulos

anclados a la membrana, listos para ser excitados¹³⁸, demostrando que existe plasticidad en el tráfico vesicular presente en estas células. Una de las adaptaciones que se podrían estar dando en nuestro modelo de estudio sería la existencia de menor cantidad de glucagón por vesícula, traduciéndose en una menor capacidad secretora del islote. En este mismo sentido, existen estudios que demuestran un aumento en el número de vesículas secretoras de insulina por célula beta, en animales tratados crónicamente con dieta alta en grasa¹³⁹. Así como otros que observan que en tratamientos crónicos con dieta rica en grasa, la alteración de la secreción de insulina presente, no va ligada a cambios en la actividad eléctrica celular o la concentración intracelular de calcio, tratándose de un problema de movilización vesicular¹⁴⁰. Para dilucidar este aspecto habría que analizar mediante microscopía electrónica la disposición de las vesículas secretoras presentes en las células alfa.

ALTERACIONES ESTRUCTURALES:

Efecto de la dieta rica en grasa sobre la masa total de célula alfa pancreática.

El efecto de la dieta, produce un aumento en la masa total pancreática de los animales obesos. Tras extraer el páncreas de los dos grupos de estudio y pesarlos, encontramos un aumento significativo en el peso final (Fig. 25A). Posteriormente, evaluamos el área de célula alfa referida al área total de páncreas, observando una disminución significativa de la misma en los ratones obesos (Fig. 25B y C). La reducción de masa

podría explicar en parte, la hipoglucagonemia presente y descrita anteriormente, en los ratones obesos.

Además tras la medición del tamaño de las células individuales, pudimos apreciar que existe un descenso en el mismo. Nuestro modelo de obesidad presenta una hipoplasia significativa (Fig. 26A y B), que puede explicar también en parte, tanto la disminución de la masa, como el descenso de glucagón plasmático.

Siguiendo la evolución del modelo de obesidad, medimos de nuevo estos parámetros tras 24 semanas de dieta, viendo que, cómo apuntábamos antes, los niveles de glucagón circulantes se igualan a los del grupo control. Este fenómeno podría explicarse por el hecho de que tras 6 meses de dieta, las células alfa presentan una masa total y relativa similar a la que encontramos en el grupo control (Fig. 31B y C). Así mismo, pasamos de la situación de hipoplasia que observábamos tras 12 semanas de tratamiento, a un aumento del tamaño celular (Fig 31D). Por tanto, las células alfa muestran una gran plasticidad, al igual que ocurre y se ha descrito en célula beta⁹⁹. Existen estudios que demuestran que en estados avanzados de diabetes tipo 2 en los que existe una clara disfunción de la célula beta y una situación de hiperglucemia marcada, tanto la masa como la función de la población de células alfa pancreáticas están aumentadas, contribuyendo empeorar la hiperglucemia^{36,141,142}.

Teniendo en cuenta nuestras observaciones, y las realizadas por otros grupos de investigación podríamos determinar que existe una adaptación o cambios de la población de células alfa del mismo modo que ocurre en la población de célula beta en una situación de obesidad.

Efecto de la dieta alta en grasa sobre proliferación y apoptosis:

Dado que la masa de célula alfa pancreática se encuentra disminuida en nuestro modelo, el siguiente paso que dimos en el estudio fue el análisis de la proliferación y apoptosis celular. Tras analizar estos dos parámetros observamos que existen diferencias a ambos niveles.

Los ratones alimentados con dieta rica en grasa durante 12 semanas, presentan una tasa de proliferación menor que los alimentados con dieta normal. Así mismo, la apoptosis se encuentra aumentada de forma significativa en el grupo obeso (Fig. 26D).

Por tanto, la disminución de la masa alfa pancreática se podría explicar por el conjunto de disminución del tamaño celular individual, disminución de la tasa de proliferación celular y aumento de la tasa de apoptosis. De la misma manera, los bajos niveles circulantes de glucagón observados tanto en ayunas como en saciedad, podrían ser consecuencia, al menos en parte, de todas estas adaptaciones morfológicas y estructurales. Dado que tanto la insulina como el glucagón parecen incrementar el proceso proliferativo¹⁴², la disminución de la

proliferación celular observada en nuestro modelo podría ir asociada a los bajos niveles de glucagón circulantes en los ratones obesos, así como a una posible resistencia a insulina que se desarrolla en las células alfa como se ha descrito durante la progresión a diabetes tipo 2¹⁴³.

Cómo hemos visto en uno de los apartados anteriores, los niveles circulantes de la hormona GLP-1 se encuentran aumentados de forma significativa en los ratones obesos. Debido a que el GLP-1 inhibe la secreción de glucagón¹⁴⁴ y disminuye la masa de célula alfa¹²⁸, el aumento de esta hormona podría estar también involucrado en las observaciones estructurales de los islotes de Langerhans de nuestro modelo de estudio.

Existen estudios previos en los que se observan modificaciones en la masa total de célula alfa pancreática en distintos modelos como ratones alimentados durante 18 semanas con dieta rica en grasa, en los que se describe un aumento de la masa asociada a niveles circulantes normales de glucagón¹¹⁴. Otros realizados en babuinos observan que existe un aumento de masa asociado a obesidad severa¹⁴⁵. Además diversos estudios en humanos, tanto obesos como no obesos, muestran un aumento absoluto o relativo, tanto de la masa de célula alfa como de la masa de célula beta en diabetes tipo 2^{11,36,146}. Aunque todos estos estudios apuntan en sentido contrario a las observaciones en nuestro modelo de obesidad, es muy importante destacar que éste es el primer estudio realizado en el que se analiza específicamente lo que ocurre

durante la adaptación temprana a la obesidad (Fig. 32), mientras que el resto de estudios se realizan en etapas prediabéticas o diabéticas en las que la homeostasis de la glucosa ya está gravemente dañada.

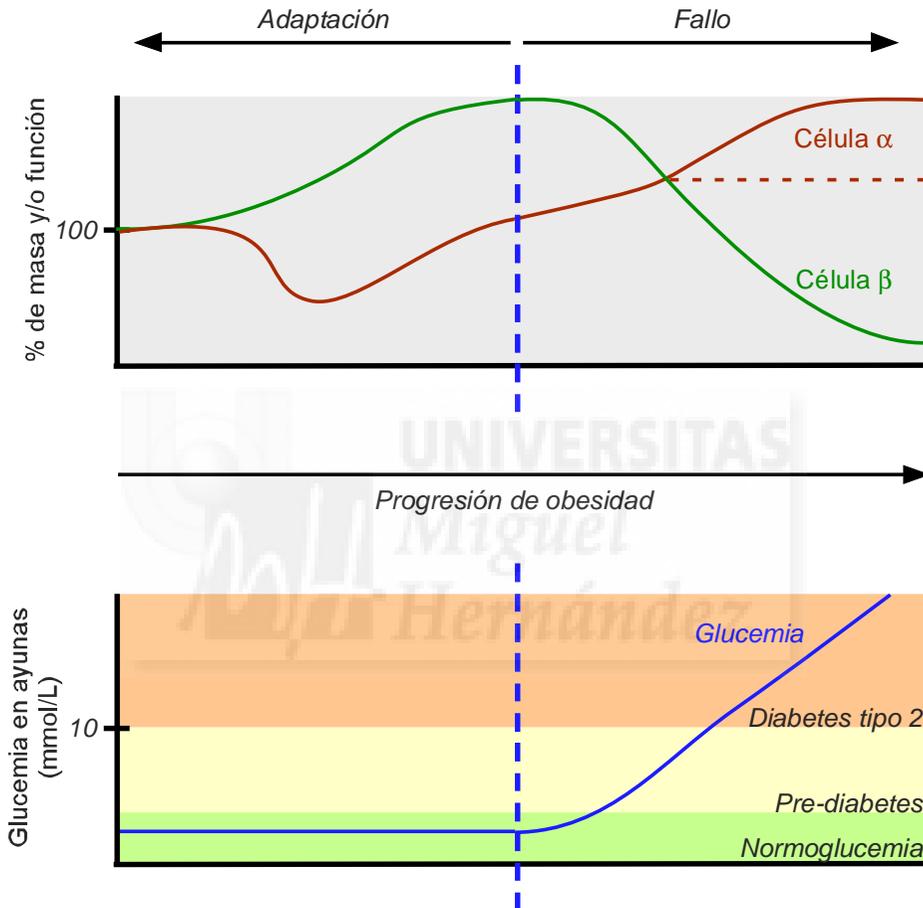


Fig 32. Evolución de la masa y función de células alfa y beta a lo largo del tiempo asociado a obesidad. Evolución paralela de las glucemias asociadas a obesidad. En el panel superior, la línea discontinua indica que la célula alfa no experimentaría cambios en términos absolutos; en este caso se vería afectada la razón alfa/beta.

Curiosamente, cuando alargamos el periodo de dieta hasta las 24 semanas, al igual que ocurre con los niveles de glucagón circulantes, la mayoría de los parámetros morfológicos estudiados se encuentran en valores similares a los del grupo control, alimentado con dieta normal (Fig. 31). Estos cambios adaptativos coinciden con una situación metabólica en la que se observa un deterioro en la homeostasis de la glucosa y la función de la célula beta (tabla 3).

Tras todas estas observaciones podemos concluir, que las células alfa pancreáticas presentan una gran plasticidad, comparable a la descrita en numerosos estudios ya citados en las células beta, durante el desarrollo de la obesidad.

Nuestros resultados apuntan a que durante la etapa de adaptación, existiría un aumento de función de la célula beta y una disminución transitoria de la célula alfa, lo cual promovería la mantención de unos niveles normales de glucosa. A medida que progresa la obesidad y la insulinoresistencia, empezaría a disminuir la adaptación de la célula beta, así como los cambios en célula alfa. Finalmente la hiperglucemia y DT2 se deberían conjuntamente a la disminución de la masa y función de la célula beta, así como un aumento absoluto de la masa y/o función de las células alfa, o un aumento relativo respecto a la célula beta (alfa/beta).



VI. CONCLUSIONES

1. Los ratones C57bl6 hembra alimentados con dieta rica en grasa durante 12 semanas son un modelo de obesidad compatible con una situación pre-diabética de resistencia a insulina, hiperinsulinemia y normoglucesmia, idóneo para el estudio de adaptaciones pancreáticas en este estadio.
2. Los ratones C57bl6 hembra alimentados con dieta rica en grasa durante 12 semanas presentan una marcada hipoglucesmia. Esta alteración podría ser una adaptación del páncreas endocrino durante la etapa compensatoria para mantener la glucemia, conjuntamente con la hiperinsulinemia.
3. Los ratones C57bl6 hembra alimentados con dieta rica en grasa durante 24 semanas, no presentan diferencias significativas en los niveles de glucagón circulantes en plasma. Esta normalización de la glucagonemia coincide con un deterioro de las células beta pancreáticas y la homeostasis de la glucosa a las 24 semanas.
4. Los animales alimentados con dieta rica en grasa durante 12 semanas presentan una respuesta en los niveles de glucagón frente a hipoglucesmia bien conservada; sin embargo se observan alteraciones en la respuesta de glucagón a hiperglucesmia.
5. El contenido total de glucagón en los islotes de Langerhans se encuentra disminuido tras 12 semanas de dieta rica en grasa en los ratones c57bl6 hembra obesos. Estas diferencias no se observan tras 24 semanas de dieta rica en grasa.

6. Los ratones C57bl6 hembra, tras 12 semanas de dieta rica en grasa, presentan un defecto en la secreción de glucagón *in vitro* en condiciones de baja concentración de glucosa. Este defecto se mantiene tras 24 semanas de tratamiento.
7. Los ratones C57bl6 hembra tras 12 semanas de dieta rica en grasa no presentan alteraciones en la señal de calcio de las células alfa, ni en la exocitosis.
8. Existe una reducción del área de célula alfa relativa al área total del páncreas tras 12 semanas de dieta rica en grasa, así como hipotrofia de las células alfa. Los ratones alimentados con dieta rica en grasa durante 12 semanas presentan una proliferación menor y una apoptosis mayor de las células alfa pancreáticas.
9. Tras 24 semanas de tratamiento con dieta alta en grasa, los grupos control y obeso presentan una área relativa y una masa de célula alfa similar. Además, en esta etapa observamos una situación de hipertrofia celular.
10. El modelo de obesidad tras 12 semanas de dieta refleja una compensación de las células beta pancreáticas dando lugar a hiperinsulinemia pero manteniendo una situación de normoglucemia. En estas condiciones. Los datos obtenidos indican que las células alfa también experimentan alteraciones funcionales y estructurales. Estas alteraciones llevan a una hipoglucagonemia transitoria que también favorecería la normoglucemia en esta etapa prediabética.

CONCLUSIONS

1. C57BL6 female mice fed a high-fat diet for 12 weeks is a model of obesity compatible with a pre-diabetic state of insulin resistance, hyperinsulinemia and normoglicemia, suitable for the study of pancreatic adaptations at this stage.
2. C57BL6 female mice fed a high-fat diet for 12 weeks show a marked hipoglucagonemia. This alteration, along with the hyperinsulinemia, could be an adaptation of the endocrine pancreas during the compensatory stage to maintain blood glucose.
3. C57BL6 female mice fed a high-fat diet for 24 weeks have no significant differences in glucagon plasma levels. This normal glucagonemia after 24 weeks of dietary treatment coincides with a deterioration in the pancreatic beta cell function and glucose homeostasis.
4. The animals fed a high-fat diet for 12 weeks present a well preserved response against hypoglycemia in terms of plasma glucagon levels; however, they show alterations in response to hyperglycemia.
5. Total glucagon content in the islets of Langerghans is decreased after 12 weeks of high-fat diet in obese C57BL6 female mice. These differences are not observed after 24 weeks of high-fat diet.

6. C57BL6 female mice after 12 weeks of high-fat diet exhibit a defect in glucagon secretion in vitro at low glucose concentrations. This defect is maintained after 24 weeks of diet treatment.
7. C57BL6 female mice after 12 weeks of high-fat diet did not show alterations in the alpha cell calcium signalling, or in the exocytotic process.
8. After 12 weeks of high-fat diet, there is a reduction in the alpha cell area of the pancreas as well as hypotrophy in alpha cells, which could partly explain the hypoglucagonemia present in the model. Additionally, obese mice exhibit decreased proliferation and increased apoptosis in pancreatic alpha cells.
9. After 24 weeks of high-fat diet treatment, obese and control groups show similar values of relative area and total alpha cell mass. Furthermore, at this stage we observe alpha cell hypertrofia.
10. The model of obesity after 12 weeks of diet reflects compensation of pancreatic beta cells, resulting in hyperinsulinemia but maintaining a situation of normoglycemia. Under these conditions, the data obtained indicate that alpha cells also undergo functional and structural alterations. These alterations lead to a transient hypoglucagonemia that also favours normoglycemia in this prediabetic stage.



VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Cabrera, O. et al. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2334-9 (2006).
2. Wierup, N., Svensson, H., Mulder, H. & Sundler, F. The ghrelin cell: a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. *Regul Pept* **107**, 63-9 (2002).
3. Elayat, A.A., el-Naggar, M.M. & Tahir, M. An immunocytochemical and morphometric study of the rat pancreatic islets. *J Anat* **186 (Pt 3)**, 629-37 (1995).
4. Rossi, J., Santamaki, P., Airaksinen, M.S. & Herzig, K.H. Parasympathetic innervation and function of endocrine pancreas requires the glial cell line-derived factor family receptor alpha2 (GFRalpha2). *Diabetes* **54**, 1324-30 (2005).
5. Taborsky, G.J., Jr. & Munding, T.O. Minireview: The role of the autonomic nervous system in mediating the glucagon response to hypoglycemia. *Endocrinology* **153**, 1055-62 (2010).
6. Ahren, B. Autonomic regulation of islet hormone secretion--implications for health and disease. *Diabetologia* **43**, 393-410 (2000).
7. Lifson, N., Lassa, C.V. & Dixit, P.K. Relation between blood flow and morphology in islet organ of rat pancreas. *Am J Physiol* **249**, E43-8 (1985).
8. Samols, E. & Stagner, J.I. Intra-islet regulation. *Am J Med* **85**, 31-5 (1988).
9. Papaccio, G. Insulitis and islet microvasculature in type 1 diabetes. *Histol Histopathol* **8**, 751-9 (1993).
10. Nadal, A., Quesada, I. & Soria, B. Homologous and heterologous asynchronicity between identified alpha-, beta- and delta-cells within intact islets of Langerhans in the mouse. *J Physiol* **517 (Pt 1)**, 85-93 (1999).
11. Quesada, I., Tuduri, E., Ripoll, C. & Nadal, A. Physiology of the pancreatic alpha-cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes. *J Endocrinol* **199**, 5-19 (2008).
12. Bonner-Weir, S., Deery, D., Leahy, J.L. & Weir, G.C. Compensatory growth of pancreatic beta-cells in adult rats after short-term glucose infusion. *Diabetes* **38**, 49-53 (1989).
13. Unger, R.H. & Orci, L. Paracrinology of islets and the paracrinopathy of diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 16009-12 (2010).
14. Singh, V. et al. Characterization of somatostatin receptor subtype-specific regulation of insulin and glucagon secretion: an in vitro study on isolated human pancreatic islets. *J Clin Endocrinol Metab* **92**, 673-80 (2007).

15. Deacon, C.F. Dipeptidyl peptidase 4 inhibition with sitagliptin: a new therapy for type 2 diabetes. *Expert Opin Investig Drugs* **16**, 533-45 (2007).
16. Ma, X. et al. Glucagon stimulates exocytosis in mouse and rat pancreatic alpha-cells by binding to glucagon receptors. *Mol Endocrinol* **19**, 198-212 (2005).
17. Leung, Y.M. et al. Electrophysiological characterization of pancreatic islet cells in the mouse insulin promoter-green fluorescent protein mouse. *Endocrinology* **146**, 4766-75 (2005).
18. Detimary, P. et al. The changes in adenine nucleotides measured in glucose-stimulated rodent islets occur in beta cells but not in alpha cells and are also observed in human islets. *J Biol Chem* **273**, 33905-8 (1998).
19. Zhang, Q. et al. Role of KATP channels in glucose-regulated glucagon secretion and impaired counterregulation in type 2 diabetes. *Cell Metab* **18**, 871-82 (2013).
20. Gopel, S.O. et al. Regulation of glucagon release in mouse α -cells by KATP channels and inactivation of TTX-sensitive Na⁺ channels. *J Physiol* **528**, 509-20 (2000).
21. Zhang, Q. et al. Cell coupling in mouse pancreatic beta-cells measured in intact islets of Langerhans. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci* **366**, 3503-23 (2008).
22. Perea, A., Clemente, F., Martinell, J., Villanueva-Penacarrillo, M.L. & Valverde, I. Physiological effect of glucagon in human isolated adipocytes. *Horm Metab Res* **27**, 372-5 (1995).
23. Barg, S., Galvanovskis, J., Gopel, S.O., Rorsman, P. & Eliasson, L. Tight coupling between electrical activity and exocytosis in mouse glucagon-secreting alpha-cells. *Diabetes* **49**, 1500-10 (2000).
24. Huang, Y.C. et al. In situ electrophysiological examination of pancreatic alpha cells in the streptozotocin-induced diabetes model, revealing the cellular basis of glucagon hypersecretion. *Diabetes* **62**, 519-30 (2013).
25. Pereverzev, A. et al. The ablation of the Ca(v)2.3/E-type voltage-gated Ca²⁺ channel causes a mild phenotype despite an altered glucose induced glucagon response in isolated islets of Langerhans. *Eur J Pharmacol* **511**, 65-72 (2005).
26. Rorsman, P., Salehi, S.A., Abdulkader, F., Braun, M. & MacDonald, P.E. K(ATP)-channels and glucose-regulated glucagon secretion. *Trends Endocrinol Metab* **19**, 277-84 (2008).
27. Murlin JR, C.H., Gibbs CB, Stokes AM. . Aqueous extracts of pancreas. I. Influence on the carbohydrate metabolism of depancreatized animals. Vol. 53 253 (J Biol Chem, 1923).

28. Bell, G.I., Santerre, R.F. & Mullenbach, G.T. Hamster preproglucagon contains the sequence of glucagon and two related peptides. *Nature* **302**, 716-8 (1983).
29. Vaillant, C.R. & Lund, P.K. Distribution of glucagon-like peptide I in canine and feline pancreas and gastrointestinal tract. *J Histochem Cytochem* **34**, 1117-21 (1986).
30. Kieffer, T.J. & Habener, J.F. The glucagon-like peptides. *Endocr Rev* **20**, 876-913 (1999).
31. Deconinck, J.F., Potvliege, P.R. & Gepts, W. The ultrastructure of the human pancreatic islets. I. The islets of adults. *Diabetologia* **7**, 266-82 (1971).
32. Mashiter, K. et al. Persistent pancreatic glucagon but not insulin response to arginine in pancreatectomized dogs. *Endocrinology* **96**, 678-93 (1975).
33. Matsuyama, T. & Foa, P.P. Plasma glucose, insulin, pancreatic, and enteroglucagon levels in normal and depancreatized dogs. *Proc Soc Exp Biol Med* **147**, 97-102 (1974).
34. Vranic, M., Pek, S. & Kawamori, R. Increased "glucagon immunoreactivity" in plasma of totally depancreatized dogs. *Diabetes* **23**, 905-12 (1974).
35. Gromada, J., Franklin, I. & Wollheim, C.B. Alpha-cells of the endocrine pancreas: 35 years of research but the enigma remains. *Endocr Rev* **28**, 84-116 (2007).
36. Dunning, B.E. & Gerich, J.E. The role of alpha-cell dysregulation in fasting and postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes and therapeutic implications. *Endocr Rev* **28**, 253-83 (2007).
37. Longuet, C. et al. The glucagon receptor is required for the adaptive metabolic response to fasting. *Cell Metab* **8**, 359-71 (2008).
38. Arafat, A.M. et al. Glucagon increases circulating fibroblast growth factor 21 independently of endogenous insulin levels: a novel mechanism of glucagon-stimulated lipolysis? *Diabetologia* **56**, 588-97 (2013).
39. Slavin, B.G., Ong, J.M. & Kern, P.A. Hormonal regulation of hormone-sensitive lipase activity and mRNA levels in isolated rat adipocytes. *J Lipid Res* **35**, 1535-41 (1994).
40. Burcelin, R., Katz, E.B. & Charron, M.J. Molecular and cellular aspects of the glucagon receptor: role in diabetes and metabolism. *Diabetes Metab* **22**, 373-96 (1996).
41. Christophe, J. Glucagon receptors: from genetic structure and expression to effector coupling and biological responses. *Biochim Biophys Acta* **1241**, 45-57 (1995).
42. Gravholt, C.H., Moller, N., Jensen, M.D., Christiansen, J.S. & Schmitz, O. Physiological levels of glucagon do not influence lipolysis in

- abdominal adipose tissue as assessed by microdialysis. *J Clin Endocrinol Metab* **86**, 2085-9 (2001).
43. Jensen, M.D., Heiling, V.J. & Miles, J.M. Effects of glucagon on free fatty acid metabolism in humans. *J Clin Endocrinol Metab* **72**, 308-15 (1991).
 44. Hoosein, N.M. & Gurd, R.S. Identification of glucagon receptors in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 4368-72 (1984).
 45. Amir, S. Central glucagon-induced hyperglycemia is mediated by combined activation of the adrenal medulla and sympathetic nerve endings. *Physiol Behav* **37**, 563-6 (1986).
 46. Inokuchi, A., Oomura, Y. & Nishimura, H. Effect of intracerebroventricularly infused glucagon on feeding behavior. *Physiol Behav* **33**, 397-400 (1984).
 47. Billington, C.J., Briggs, J.E., Link, J.G. & Levine, A.S. Glucagon in physiological concentrations stimulates brown fat thermogenesis in vivo. *Am J Physiol* **261**, R501-7 (1991).
 48. Habegger, K.M. et al. Fibroblast growth factor 21 mediates specific glucagon actions. *Diabetes* **62**, 1453-63 (2013).
 49. Schulman, J.L., Carleton, J.L., Whitney, G. & Whitehorn, J.C. Effect of glucagon on food intake and body weight in man. *J Appl Physiol* **11**, 419-21 (1957).
 50. Billington, C.J., Bartness, T.J., Briggs, J., Levine, A.S. & Morley, J.E. Glucagon stimulation of brown adipose tissue growth and thermogenesis. *Am J Physiol* **252**, R160-5 (1987).
 51. Gonzalez-Munoz, C., Nieto-Ceron, S., Cabezas-Herrera, J. & Hernandez-Cascales, J. Glucagon increases contractility in ventricle but not in atrium of the rat heart. *Eur J Pharmacol* **587**, 243-7 (2008).
 52. Mery, P.F., Brechler, V., Pavoine, C., Pecker, F. & Fischmeister, R. Glucagon stimulates the cardiac Ca²⁺ current by activation of adenylyl cyclase and inhibition of phosphodiesterase. *Nature* **345**, 158-61 (1990).
 53. Ahloulay, M. et al. Effects of glucagon on glomerular filtration rate and urea and water excretion. *Am J Physiol* **263**, F24-36 (1992).
 54. Amanda, B., Manuela, M., Antonia, M., Claudio, M. & Gregorio, B. Posturography measures and efficacy of different physical treatments in somatic tinnitus. *Int Tinnitus J* **16**, 44-50 (2010).
 55. Philippe, J. Glucagon gene transcription is negatively regulated by insulin in a hamster islet cell line. *J Clin Invest* **84**, 672-7 (1989).
 56. Holst, J.J. Glucagonlike peptide 1: a newly discovered gastrointestinal hormone. *Gastroenterology* **107**, 1848-55 (1994).
 57. Patzelt, C. & Schiltz, E. Conversion of proglucagon in pancreatic alpha cells: the major endproducts are glucagon and a single peptide, the

- major proglucagon fragment, that contains two glucagon-like sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 5007-11 (1984).
58. Patzelt, C., Tager, H.S., Carroll, R.J. & Steiner, D.F. Identification and processing of proglucagon in pancreatic islets. *Nature* **282**, 260-6 (1979).
 59. George, S.K., Uttenthal, L.O., Ghiglione, M. & Bloom, S.R. Molecular forms of glucagon-like peptides in man. *FEBS Lett* **192**, 275-8 (1985).
 60. Orskov, C. et al. Glucagon-like peptides GLP-1 and GLP-2, predicted products of the glucagon gene, are secreted separately from pig small intestine but not pancreas. *Endocrinology* **119**, 1467-75 (1986).
 61. Marcinkiewicz, M., Ramla, D., Seidah, N.G. & Chretien, M. Developmental expression of the prohormone convertases PC1 and PC2 in mouse pancreatic islets. *Endocrinology* **135**, 1651-60 (1994).
 62. Neerman-Arbez, M., Cirulli, V. & Halban, P.A. Levels of the conversion endoproteases PC1 (PC3) and PC2 distinguish between insulin-producing pancreatic islet beta cells and non-beta cells. *Biochem J* **300 (Pt 1)**, 57-61 (1994).
 63. Rouille, Y., Westermark, G., Martin, S.K. & Steiner, D.F. Proglucagon is processed to glucagon by prohormone convertase PC2 in alpha TC1-6 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 3242-6 (1994).
 64. Scopsi, L., Gullo, M., Rilke, F., Martin, S. & Steiner, D.F. Proprotein convertases (PC1/PC3 and PC2) in normal and neoplastic human tissues: their use as markers of neuroendocrine differentiation. *J Clin Endocrinol Metab* **80**, 294-301 (1995).
 65. Rodbell, M., Birnbaumer, L. & Pohl, S.L. Characteristics of glucagon action on the hepatic adenylate cyclase system. *Biochem J* **125**, 58P-59P (1971).
 66. Unson, C.G. Molecular determinants of glucagon receptor signaling. *Biopolymers* **66**, 218-35 (2002).
 67. Gelling, R.W. et al. Pancreatic beta-cell overexpression of the glucagon receptor gene results in enhanced beta-cell function and mass. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **297**, E695-707 (2009).
 68. Cabrera, O. et al. Glutamate is a positive autocrine signal for glucagon release. *Cell Metab* **7**, 545-54 (2008).
 69. Ishihara, H., Maechler, P., Gjinovci, A., Herrera, P.L. & Wollheim, C.B. Islet beta-cell secretion determines glucagon release from neighbouring alpha-cells. *Nat Cell Biol* **5**, 330-5 (2003).
 70. Rorsman, P. et al. Glucose-inhibition of glucagon secretion involves activation of GABAA-receptor chloride channels. *Nature* **341**, 233-6 (1989).
 71. Li, C. et al. Regulation of glucagon secretion in normal and diabetic human islets by gamma-hydroxybutyrate and glycine. *J Biol Chem* **288**, 3938-51.

72. Quesada, I., Todorova, M.G. & Soria, B. Different metabolic responses in alpha-, beta-, and delta-cells of the islet of Langerhans monitored by redox confocal microscopy. *Biophys J* **90**, 2641-50 (2006).
73. Vieira, E., Salehi, A. & Gylfe, E. Glucose inhibits glucagon secretion by a direct effect on mouse pancreatic alpha cells. *Diabetologia* **50**, 370-9 (2007).
74. Heimberg, H., De Vos, A., Pipeleers, D., Thorens, B. & Schuit, F. Differences in glucose transporter gene expression between rat pancreatic alpha- and beta-cells are correlated to differences in glucose transport but not in glucose utilization. *J Biol Chem* **270**, 8971-5 (1995).
75. Schuit, F. et al. Metabolic fate of glucose in purified islet cells. Glucose-regulated anaplerosis in beta cells. *J Biol Chem* **272**, 18572-9 (1997).
76. Sekine, S., Ito, Y., Hashimoto, M., Tanaka, H. & Watanabe, T. Characterization of monoclonal antibodies to chitinase A1 and enhancement of chitinase A1 activity by monoclonal antibodies. *Biochem Biophys Res Commun* **204**, 7-16 (1994).
77. McGirr, R. et al. Glucose dependence of the regulated secretory pathway in alphaTC1-6 cells. *Endocrinology* **146**, 4514-23 (2005).
78. Cryer, P.E. Minireview: Glucagon in the pathogenesis of hypoglycemia and hyperglycemia in diabetes. *Endocrinology* **153**, 1039-48 (2002).
79. Unger, R.H. & Cherrington, A.D. Glucagonocentric restructuring of diabetes: a pathophysiologic and therapeutic makeover. *J Clin Invest* **122**, 4-12 (2002).
80. Soriguer F, G.A., Bosch-Comas A, Bordiú E, Calle-Pascual A, Carmena R, Casamitjana R, Castaño L, Castell C, Catalá M, Delgado E, Franch J, Gaztambide S, Girbés J, Gomis R, Gutiérrez G, López-Alba A, Martínez-Larrad MT, Menéndez E, Mora-Peces I, Ortega E, Pascual-Manich G, Rojo-Martínez G, Serrano-Rios M, Valdés S, Vázquez JA, Vendrell J. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: the Di@bet.es Study. *Diabetologia* **55**, 88-93 (2012).
81. Kahn, B.B. Type 2 diabetes: when insulin secretion fails to compensate for insulin resistance. *Cell* **92**, 593-6 (1998).
82. Gray, D.S. & Fujioka, K. Use of relative weight and Body Mass Index for the determination of adiposity. *J Clin Epidemiol* **44**, 545-50 (1991).
83. Hanefeld, M., Koehler, C., Gallo, S., Benke, I. & Ott, P. Impact of the individual components of the metabolic syndrome and their different combinations on the prevalence of atherosclerotic vascular

- disease in type 2 diabetes: the Diabetes in Germany (DIG) study. *Cardiovasc Diabetol* **6**, 13 (2007).
84. Tseng, C.H., Chong, C.K., Tseng, C.P., Shau, W.Y. & Tai, T.Y. Hypertension is the most important component of metabolic syndrome in the association with ischemic heart disease in Taiwanese type 2 diabetic patients. *Circ J* **72**, 1419-24 (2008).
 85. Diamond, J. The double puzzle of diabetes. *Nature* **423**, 599-602 (2003).
 86. Kahn, S.E., Hull, R.L. & Utzschneider, K.M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* **444**, 840-6 (2006).
 87. Larsson, H. & Ahren, B. Islet dysfunction in insulin resistance involves impaired insulin secretion and increased glucagon secretion in postmenopausal women with impaired glucose tolerance. *Diabetes Care* **23**, 650-7 (2000).
 88. Reaven, G.M., Chen, Y.D., Golay, A., Swislocki, A.L. & Jaspan, J.B. Documentation of hyperglucagonemia throughout the day in nonobese and obese patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* **64**, 106-10 (1987).
 89. Sherwin, R., Wahren, J. & Felig, P. Evanescent effects of hypo- and hyperglucagonemia on blood glucose homeostasis. *Metabolism* **25**, 1381-3 (1976).
 90. Li, X.C., Liao, T.D. & Zhuo, J.L. Long-term hyperglucagonaemia induces early metabolic and renal phenotypes of Type 2 diabetes in mice. *Clin Sci (Lond)* **114**, 591-601 (2008).
 91. Siafarikas, A. et al. Early loss of the glucagon response to hypoglycemia in adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes Care* **35**, 1757-62 (2012).
 92. Dinneen, S., Alzaid, A., Turk, D. & Rizza, R. Failure of glucagon suppression contributes to postprandial hyperglycaemia in IDDM. *Diabetologia* **38**, 337-43 (1995).
 93. Shah, P. et al. Lack of suppression of glucagon contributes to postprandial hyperglycemia in subjects with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* **85**, 4053-9 (2000).
 94. Taborsky, G.J., Jr., Ahren, B. & Havel, P.J. Autonomic mediation of glucagon secretion during hypoglycemia: implications for impaired alpha-cell responses in type 1 diabetes. *Diabetes* **47**, 995-1005 (1998).
 95. Taborsky, G.J., Jr. & Mundinger, T.O. Minireview: The role of the autonomic nervous system in mediating the glucagon response to hypoglycemia. *Endocrinology* **153**, 1055-62 (2012).

96. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54 (1976).
97. Quesada, I., Nadal, A. & Soria, B. Different effects of tolbutamide and diazoxide in alpha, beta-, and delta-cells within intact islets of Langerhans. *Diabetes* **48**, 2390-7 (1999).
98. Gromada, J. et al. Adrenaline stimulates glucagon secretion in pancreatic A-cells by increasing the Ca²⁺ current and the number of granules close to the L-type Ca²⁺ channels. *J Gen Physiol* **110**, 217-28 (1997).
99. Gonzalez, A. et al. Insulin hypersecretion in islets from diet-induced hyperinsulinemic obese female mice is associated with several functional adaptations in individual beta-cells. *Endocrinology* **154**, 3515-24 (2013).
100. Hoppa, M.B. et al. Chronic palmitate exposure inhibits insulin secretion by dissociation of Ca(2+) channels from secretory granules. *Cell Metab* **10**, 455-65 (2009).
101. Rodríguez-Rodríguez, E., López-Plaza, B., López-obaler, A. & Ortega, R. Overweight and obesity among Spanish adults. *Nutr Hosp* **26**, 355-63 (2011).
102. Prentki, M. & Nolan, C.J. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest* **116**, 1802-12 (2006).
103. Polonsky, K.S. et al. Quantitative study of insulin secretion and clearance in normal and obese subjects. *J Clin Invest* **81**, 435-41 (1988).
104. Karam, J.H., Grodsky, G.M. & Forsham, P.H. Excessive insulin response to glucose in obese subjects as measured by immunochemical assay. *Diabetes* **12**, 197-204 (1963).
105. Butler, A.E. et al. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* **52**, 102-10 (2003).
106. Weir, G.C. & Bonner-Weir, S. Five stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes. *Diabetes* **53 Suppl 3**, S16-21 (2004).
107. Kloppel, G., Lohr, M., Habich, K., Oberholzer, M. & Heitz, P.U. Islet pathology and the pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes mellitus revisited. *Surv Synth Pathol Res* **4**, 110-25 (1985).
108. Maclean, N. & Ogilvie, R.F. Quantitative estimation of the pancreatic islet tissue in diabetic subjects. *Diabetes* **4**, 367-76 (1955).
109. Yoon, K.H. et al. Selective beta-cell loss and alpha-cell expansion in patients with type 2 diabetes mellitus in Korea. *J Clin Endocrinol Metab* **88**, 2300-8 (2003).

110. Riant, E. et al. Estrogens protect against high-fat diet-induced insulin resistance and glucose intolerance in mice. *Endocrinology* **150**, 2109-17 (2009).
111. Tiano, J.P. & Mauvais-Jarvis, F. Importance of oestrogen receptors to preserve functional beta-cell mass in diabetes. *Nat Rev Endocrinol* **8**, 342-51 (2012).
112. Fex, M. et al. Enhanced mitochondrial metabolism may account for the adaptation to insulin resistance in islets from C57BL/6J mice fed a high-fat diet. *Diabetologia* **50**, 74-83 (2007).
113. Ahren, B. et al. Dissociated insulinotropic sensitivity to glucose and carbachol in high-fat diet-induced insulin resistance in C57BL/6J mice. *Metabolism* **46**, 97-106 (1997).
114. Ellingsgaard, H. et al. Interleukin-6 regulates pancreatic alpha-cell mass expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 13163-8 (2008).
115. Mu, J. et al. Chronic treatment with a glucagon receptor antagonist lowers glucose and moderately raises circulating glucagon and glucagon-like peptide 1 without severe alpha cell hypertrophy in diet-induced obese mice. *Diabetologia* **54**, 2381-91 (2011).
116. Winzell, M.S. et al. Glucagon receptor antagonism improves islet function in mice with insulin resistance induced by a high-fat diet. *Diabetologia* **50**, 1453-62 (2007).
117. Conarello, S.L. et al. Glucagon receptor knockout mice are resistant to diet-induced obesity and streptozotocin-mediated beta cell loss and hyperglycaemia. *Diabetologia* **50**, 142-50 (2007).
118. Calanna, S. et al. Beta and alpha cell function in metabolically healthy but obese subjects: relationship with entero-insular axis. *Obesity (Silver Spring)* **21**, 320-5 (2013).
119. Starke, A.A., Erhardt, G., Berger, M. & Zimmermann, H. Elevated pancreatic glucagon in obesity. *Diabetes* **33**, 277-80 (1984).
120. Weiss, R., D'Adamo, E., Santoro, N., Hershkop, K. & Caprio, S. Basal alpha-cell up-regulation in obese insulin-resistant adolescents. *J Clin Endocrinol Metab* **96**, 91-7.
121. Wise, J.K., Hendler, R. & Felig, P. Obesity: evidence of decreased secretion of glucagon. *Science* **178**, 513-4 (1972).
122. Gelling, R.W. et al. Lower blood glucose, hyperglucagonemia, and pancreatic alpha cell hyperplasia in glucagon receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 1438-43 (2003).
123. Lee, Y., Wang, M.Y., Du, X.Q., Charron, M.J. & Unger, R.H. Glucagon receptor knockout prevents insulin-deficient type 1 diabetes in mice. *Diabetes* **60**, 391-7.
124. Sorensen, H. et al. Glucagon receptor knockout mice display increased insulin sensitivity and impaired beta-cell function. *Diabetes* **55**, 3463-9 (2006).

125. Bonora E, M.P., Cacciatori V, Zenere M, Tosi F, Travia D, Zoppini G, Perobelli L, Muggeo M. Plasma concentrations of glucagon during hyperglycemic clamp with or without somatostatin infusion in obese subjects. *Acta Diabetol. Lat.* **27**, 309-314 (1990).
126. Ahlqvist, L., Brown, K. & Ahren, B. Upregulated insulin secretion in insulin-resistant mice: evidence of increased islet GLP1 receptor levels and GPR119-activated GLP1 secretion. *Endocr Connect* **2**, 69-78 (2013).
127. van Citters, G.W. et al. Elevated glucagon-like peptide-1-(7-36)-amide, but not glucose, associated with hyperinsulinemic compensation for fat feeding. *J Clin Endocrinol Metab* **87**, 5191-8 (2002).
128. Ellenbroek, J.H. et al. Glucagon-like peptide-1 receptor agonist treatment reduces beta cell mass in normoglycaemic mice. *Diabetologia* **56**, 1980-6 (2013).
129. Ayala, J.E. et al. Glucagon-like peptide-1 receptor knockout mice are protected from high-fat diet-induced insulin resistance. *Endocrinology* **151**, 4678-87 (2010).
130. Gupta, N.A. et al. Glucagon-like peptide-1 receptor is present on human hepatocytes and has a direct role in decreasing hepatic steatosis in vitro by modulating elements of the insulin signaling pathway. *Hepatology* **51**, 1584-92 (2010).
131. da Silva Xavier, G. et al. Per-arnt-sim (PAS) domain-containing protein kinase is downregulated in human islets in type 2 diabetes and regulates glucagon secretion. *Diabetologia* **54**, 819-27 (2007).
132. Ashcroft, F.M. & Rorsman, P. K(ATP) channels and islet hormone secretion: new insights and controversies. *Nat Rev Endocrinol* **9**, 660-9 (2013).
133. DeMille, D. & Grose, J.H. PAS kinase: a nutrient sensing regulator of glucose homeostasis. *IUBMB Life* **65**, 921-9 (2013).
134. Hao, H.X. et al. PAS kinase is required for normal cellular energy balance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 15466-71 (2007).
135. Marroqui, L. et al. Nutrient regulation of glucagon secretion: involvement in metabolism and diabetes. *Nutr Res Rev* **27**, 48-62 (2014).
136. Thorens, B. Brain glucose sensing and neural regulation of insulin and glucagon secretion. *Diabetes Obes Metab* **13 Suppl 1**, 82-8 (2011).
137. Le Marchand, S.J. & Piston, D.W. Glucose decouples intracellular Ca²⁺ activity from glucagon secretion in mouse pancreatic islet alpha-cells. *PLoS One* **7**, e47084 (2012).
138. Rafacho, A. et al. Pancreatic alpha-cell dysfunction contributes to the disruption of glucose homeostasis and compensatory insulin

- hypersecretion in glucocorticoid-treated rats. *PLoS One* **9**, e93531 (2014).
139. Souza-Mello, V. et al. Pancreatic ultrastructural enhancement due to telmisartan plus sitagliptin treatment in diet-induced obese C57BL/6 mice. *Pancreas* **40**, 715-22 (2011).
140. Collins, S.C. et al. Progression of diet-induced diabetes in C57BL6J mice involves functional dissociation of Ca²⁺(+) channels from secretory vesicles. *Diabetes* **59**, 1192-201 (2010).
141. Guardado-Mendoza, R. et al. Pancreatic islet amyloidosis, beta-cell apoptosis, and alpha-cell proliferation are determinants of islet remodeling in type-2 diabetic baboons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 13992-7 (2009).
142. Liu, Z. et al. Insulin and glucagon regulate pancreatic alpha-cell proliferation. *PLoS One* **6**, e16096 (2011).
143. Tsuchiyama, N. et al. Possible role of alpha-cell insulin resistance in exaggerated glucagon responses to arginine in type 2 diabetes. *Diabetes Care* **30**, 2583-7 (2007).
144. De Marinis, Y.Z. et al. GLP-1 inhibits and adrenaline stimulates glucagon release by differential modulation of N- and L-type Ca²⁺ channel-dependent exocytosis. *Cell Metab* **11**, 543-53 (2010).
145. Guardado-Mendoza, R. et al. Impact of obesity severity and duration on pancreatic beta- and alpha-cell dynamics in normoglycemic non-human primates. *Int J Obes (Lond)* **37**, 1071-8 (2013).
146. Henquin, J.C. & Rahier, J. Pancreatic alpha cell mass in European subjects with type 2 diabetes. *Diabetologia* **54**, 1720-5 (2011).