



UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

Facultad de Ciencias Experimentales

Unidad de Fisiología celular y nutrición

Trabajo de Fin de Grado

2015/2016

**ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA TOLBUTAMIDA Y EL
DIAZÓXIDO SOBRE LA SEÑAL DE CALCIO CITOSÓLICA
EN LA CÉLULA β PANCREÁTICA**

Autor:

ISAAC BENITO GONZÁLEZ

Titulación:

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Tutor:

IVÁN QUESADA MOLL

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	4
RESUMEN	5
1. INTRODUCCIÓN	6
1.1. El páncreas. El islote de Langerhans	6
1.2. Homeostasis de la glucosa sanguínea. Diabetes Mellitus.....	7
1.3. La célula beta: acoplamiento estímulo-secreción.....	10
1.4. Los canales K_{ATP} en célula β -pancreática.....	13
1.5. Tolbutamida y diazóxido	14
2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
3.1. Animales.....	16
3.2. Aislamiento de los islotes de Langerhans	16
3.3. Registros de señalización de calcio intracelular con sondas fluorescentes. Registro ratiométrico de calcio intracelular en célula β en islote completo	17
3.4. Estadística	21
4. RESULTADOS.....	21
4.1. La Tolbutamida aumenta la señalización de Ca^{2+} intracelular en célula β pancreática.....	21
4.2. El Diazóxido disminuye la señalización de Ca^{2+} intracelular en célula β pancreática	27
5. DISCUSIÓN	28
6. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA	31
7. BIBLIOGRAFÍA.....	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de los tipos celulares y de sus principales interacciones hormonales en el islote de Langerhans.....	6
Figura 2. Representación de los islotes de Langerhans en humano (A) y en ratones (B).	7
Figura 3. Esquema del control de los niveles de glucemia por parte de la insulina y el glucagón.	8
Figura 4. Registro de la actividad eléctrica oscilatoria de las células β en islotes intactos..	11
Figura 5. Acoplamiento estímulo-secreción en la célula β	12
Figura 6. Organización estructural del K_{ATP}	13
Figura 7. Estructuras de la tolbutamida (izquierda) y diazóxido (derecha).	14
Figura 8. Ratón en posición decúbito supino para la extracción del páncreas.	17
Figura 9. A, Esquema del equipo de imagen de fluorescencia. B, Espectro de excitación del Fura-2 a diferentes concentraciones de Ca^{2+} libre.....	18
Figura 10. Registro control representativo.	22
Figura 11. Registro representativo del tipo 2.....	23
Figura 12. Análisis comparativo del AUC de los últimos 5 minutos de la perfusión de 11 mM Glucosa en los registros control o tipo 1 (1) y de los últimos 5 minutos del tipo 2.	23
Figura 13. Registro representativo del tipo 3.....	24
Figura 14. Análisis del AUC de los registros del tipo 3.....	25
Figura 15. Análisis comparativo del AUC de los registros del tipo 2 y 3..	25
Figura 16. Análisis de la amplitud de los picos en los diferentes medios de perfusión indicados	26
Figura 17. Registro representativo del tipo 4.....	27
Figura 18. Análisis del AUC de los registros del tipo 4.....	27

ABREVIATURAS

ADP: *Adenosine DiPhosphate* (Adenosina Difosfato)

ATP: *Adenosine TriPhosphate* (Adenosina Trifosfato)

Ca_v: canales de calcio dependientes de voltaje

DIAZ: Diazóxido

DM: Diabetes Mellitus

FADH₂ : dinucleótido de flavina-adenina

FID: Federación Internacional de Diabetes

GLUT-1: *Glucose Transporter 1*

GLUT-2: *Glucose Transporter 2*

K_{ATP} : canales de potasio dependientes de ATP

K_v : canales de potasio dependientes de voltaje

NADH: dinucleótido de nicotinamida y adenina

PP: polipéptido pancreático

T2DM: *Type 2 Diabetes Mellitus* (Diabetes Mellitus tipo 2)

TMD: dominio transmembrana

TOL: Tolbutamida

V_{mb} : potencial de membrana o potencial transmembrana

Resumen

Ante la cada vez mayor prevalencia mundial de la diabetes mellitus (DM) y su relevancia en la sociedad occidental, numerosos estudios se han centrado en buscar diferentes estrategias terapéuticas con la finalidad de estabilizar los niveles de glucosa en sangre. La tolbutamida (TOL) y el diazóxido (DIAZ) son dos compuestos utilizados en diabetes así como en otras alteraciones como la hiperinsulinemia. Actúan a nivel del K_{ATP} provocando el cierre o apertura del mismo respectivamente. Por tanto, el presente trabajo aborda el estudio del efecto de la TOL y el DIAZ en las células β pancreáticas y cómo su unión a este canal modifica la concentración de Ca^{2+} intracelular. Mediante experimentos de microscopía de fluorescencia en islote intacto se observó que la TOL aumenta la señalización de Ca^{2+} intracelular mientras que el DIAZ la disminuye (ambas en célula β). Estos resultados definen la actuación de la TOL y el DIAZ a través de los K_{ATP} y confirma estos canales como una diana terapéutica para el tratamiento de la diabetes, hiperinsulinemias o hipoglucemias.

Palabras Clave: Tolbutamida, Diazóxido, Diabetes, K_{ATP} , islotes de Langerhans.

Summary

Due to the increasing prevalence of Diabetes Mellitus (DM) specially in western societies, scientific efforts in discovering how to maintain glucose levels have increased too. Tolbutamide (TOL) and Diazoxide (DIAZ) are two pharmacological compounds largely used in the treatment of many diseases such as diabetes or hyperinsulinemia. They both bind to the ATP-modulated potassium channels modifying its status, respectively increasing or decreasing cytosolic calcium concentration. Experiments using fluorescence microscopy in intact islets reveal that TOL increases the non glucose-induced intracellular Ca^{2+} signaling in β pancreatic cells. On the other hand, DIAZ has been shown to decrease intracellular Ca^{2+} signaling in the same type of cells. These results define TOL and DIAZ mechanism of action, confirming its linkage to K_{ATP} channels as a promising region where new therapeutic compounds can be researched in order to treat different diseases as the ones already mentioned.

Keywords: Tolbutamide, Diazoxide, Diabetes, K_{ATP} , Islets of Langerhans.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El páncreas. El islote de Langerhans

El páncreas es un órgano situado en la zona interior del abdomen formado tanto por tejido exocrino como endocrino. El primero constituye el 99% de la masa total del órgano mientras que el segundo apenas constituye un 1% del total, y se agrupa en poblaciones de 1000-3000 células que son las que forman los islotes de Langerhans. En ellos se producen y segregan las hormonas que serán las encargadas de mantener los niveles óptimos de glucosa en sangre (normoglucemia). Cada tipo de célula produce un tipo de hormona donde existen regulaciones tanto negativas como positivas (**Fig. 1**). El tipo celular predominante es la célula β , encargada de producir la insulina. A continuación la célula α , donde se produce el glucagón y cuyo estudio está cobrando especial relevancia en la actualidad (Quesada *et al.*, 2008). Finalmente y en menor proporción, las células δ , PP y ϵ encargadas de producir somatostatina (SST), polipéptido pancreático y ghrelina respectivamente. Esta última parece que adquiere especial relevancia en los periodos gestacional y fetal de humanos y ratones, aunque su número decrece drásticamente tras el nacimiento (Wierup *et al.*, 2002).

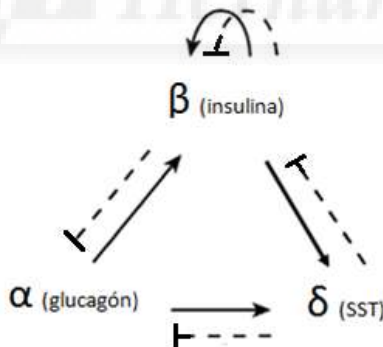


Figura 1. Representación esquemática de los tipos celulares y de sus principales interacciones hormonales en el islote de Langerhans.

Las interacciones entre hormonas han sido ampliamente descritas, demostrando que existe una regulación autocrina y paracrina dentro del islote (**Fig.1**). Cabe destacar el efecto

inhibitorio de la insulina sobre la secreción de glucagón en la célula α (Maruyama *et al.*, 1984), y la regulación negativa que la propia insulina realiza sobre la célula β (Khan *et al.*, 2001).

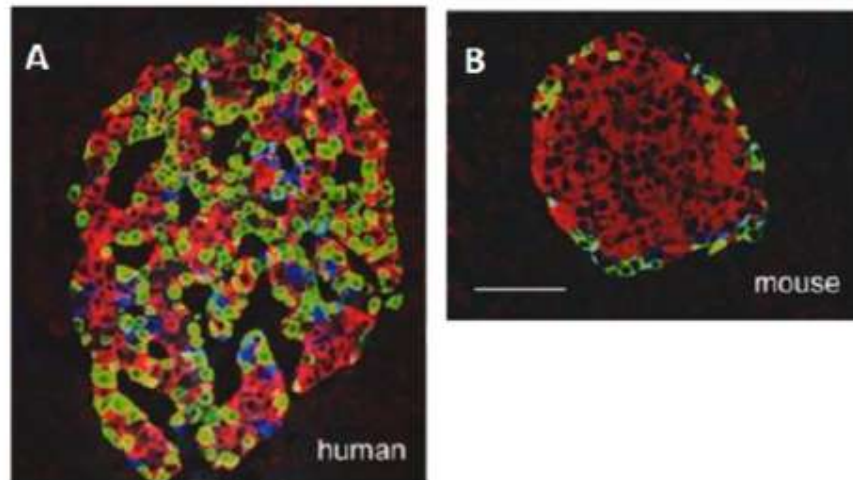


Figura 2. Representación de los islotes de Langerhans en humano (A) y en ratones (B). Secciones tomadas con microscopía confocal de una preparación inmunohistoquímica con un triple marcaje anti-insulina (rojo), anti-glucagón (verde) y anti-somatostatina (azul). Modificado de Cabrera *et al.*, 2006.

Es importante mencionar que la abundancia relativa de cada tipo celular en el islote varía con la especie. En humanos se encuentran bastante entremezclados a lo largo del núcleo del islote, siendo la célula β la mayoritaria (54%) seguido de la célula α (36%) y célula δ (10%). Sin embargo, los islotes de ratón se distribuyen de forma diferente; un núcleo muy extenso de células β (75%) colindado en superficie por células no- β (α -19% ; δ -6%). (Cabrera *et al.*, 2006) (**Fig. 2**).

1.2. Homeostasis de la glucosa sanguínea. Diabetes Mellitus.

La glucosa es, para la gran mayoría de los organismos, la fuente principal de energía con la que realizan los procesos metabólicos y un intermediario fundamental en ellos. Por ello es vital que sus niveles se encuentren perfectamente regulados. Un circuito de retroalimentación negativa entre la insulina (células β) y el glucagón (células α) es la principal vía de control cuando nos encontramos en condiciones fisiológicas normales.

Cuando la glucemia se encuentra a niveles más altos de los habituales (hiperglucemia, p.ej. momentos posteriores a la ingestión de alimentos) se libera la insulina. Esta hormona es capaz de

disminuir los niveles de glucosa hasta la normogluemia mediante su movilización y transformación a grasas (lipogénesis) y carbohidratos (glucogénesis) en el tejido adiposo, muscular e hígado principalmente. Se obtiene además una gran cantidad de energía ya que la insulina aumenta la captación y posterior oxidación de la glucosa en la glucólisis. Sin embargo, en condiciones de glucosa sanguínea baja (hipogluemia, p.ej. en condiciones de ayuno) son las células alfa del páncreas las que actúan liberando glucagón. Esto provoca que aumenten los niveles de glucosa plasmática mediante la producción hepática de glucosa, fundamentalmente a través de la gluconeogénesis y la glucogenolisis (Quesada *et al.*, 2008). Por tanto, un cambio significativo en la concentración de glucosa plasmática no solo induce a la liberación de la hormona correspondiente sino también a la inhibición de su opuesta (**Fig. 3**).

Parece evidente, por tanto, que la función principal del islote de Langerhans es la regulación de la homeostasis de la glucosa en sangre. Por ello, los islotes están altamente vascularizados recibiendo así unas 20 veces más flujo sanguíneo que la parte exocrina, facilitando el intercambio de hormonas entre la sangre y los tejidos circundantes (Lifson *et al.*, 1985; Cao e Wang, 2014). Los sistemas simpático, parasimpático y sensorial también inervan altamente a los islotes. Por ellos se ve afectada su función y su fisiología (Ahren, 2000).

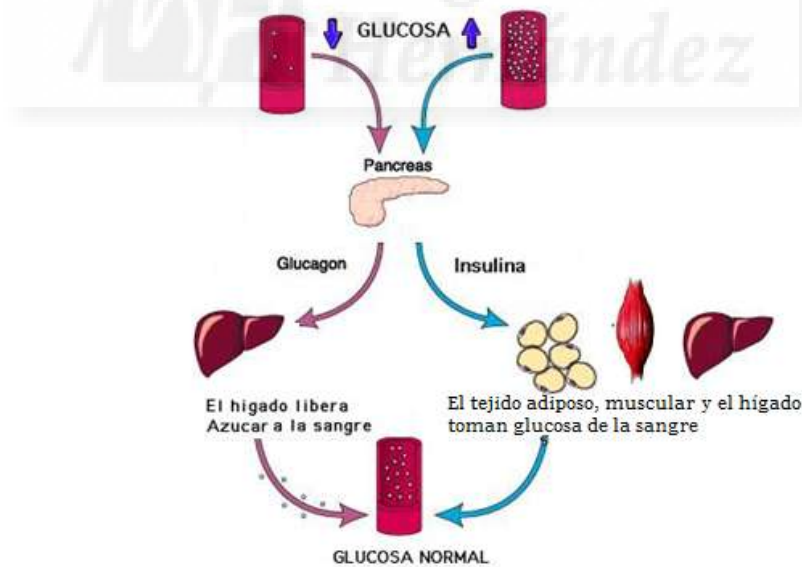


Figura 3. Esquema del control de los niveles de glucemia por parte de la insulina y el glucagón.

Imagen tomada de <http://163.178.103.176/CasosBerne/7gRenal/Caso38-1/HTML/CasosB2/Poli/Poli1.htm>

Las variaciones y alteraciones de esta homeostasis puede conducir al desarrollo de diferentes enfermedades, siendo la más común la diabetes mellitus (DM) (Dunning *et al.*, 2005).

Esta se define como un síndrome metabólico crónico de origen multifactorial caracterizado por unos niveles de glucemia elevados (hiperglucemia) con alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos, grasas y proteínas por déficit de insulina o una acción ineficaz de esta en sus tejidos diana, o incluso ambos. Esto induce una mala utilización de la glucosa cuyas consecuencias son principalmente la tríada clásica de poliuria, polidipsia y polifagia además de pérdida de peso y visión borrosa.

La DM se clasifica principalmente en dos categorías: tipo I y tipo II. En la primera se produce una destrucción de las células β que conlleva a un déficit casi absoluto de insulina, siendo esta destrucción mayoritariamente autoinmune aunque también puede ser idiopático. El tipo II se caracteriza por una secreción deficiente de la hormona, habitualmente asociada a una resistencia a la insulina por parte de los tejidos diana. Existen además otros tipos de DM como la diabetes gestacional, provocada por una resistencia a la insulina producida durante el embarazo y otras específicas causadas por defectos genéticos o inducidas por fármacos o productos químicos.

La incidencia de la DM aumenta cada año, y el número de afectados ronda actualmente el 9% de la población adulta, y se prevé que alcance el 10% de aquí al año 2040 (datos de la federación internacional de la diabetes, 2016). Esto ha repercutido sobre todo en los países con ingresos bajos o medios, favorecido por la mayor prevalencia de la obesidad así como de la inactividad física, que son factores asociados a un mayor riesgo de padecer ciertas patologías graves como es en este caso la DM del tipo II (Haslam e James, 2005).

1.3. La célula beta: acoplamiento estímulo-secreción.

Aunque aún existen ciertas controversias puntuales, hay suficiente información como para poder construir un modelo preciso de cómo se genera y modula la actividad eléctrica en la célula β del islote de Langerhans en respuesta a los diferentes estímulos, principalmente la glucosa plasmática. Existe un acoplamiento eléctrico entre las células β que componen el islote, lo que hace que las variaciones de $[Ca^{2+}]_i$ provocadas por los disparos en los potenciales de acción se sincronicen a nivel de islote completo y por tanto la secreción de insulina se vea aumentada y favorecida (Bergsten, 1995), primando así una respuesta global sobre las individuales (Santos *et al.*, 1991). Aunque existen algunas pequeñas diferencias entre el modelo humano y los ratones, los puntos básicos del modelo para el acoplamiento estímulo-secreción establecen el comienzo de la

fase activa a través del disparo de los potenciales de acción. Esto es consecuencia del cierre del K_{ATP} tras la metabolización de glucosa (Rorsman e Braun, 2013) y un incremento asociado de la $[Ca^{2+}]_i$ debido a la apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Quesada *et al.*, 2006); que desencadenaría el proceso de exocitosis hormonal. Esto recogería los principales y más importantes pasos del proceso que son comunes además a ambos modelos.

El proceso en sí sigue una serie de pasos que siempre ocurren en el mismo orden: en primer lugar la glucosa sanguínea llega a los islotes a través de los capilares sanguíneos que los irrigan, y entra en el citoplasma de estas a través de los transportadores específicos de glucosa, GLUT2. Ya en su interior, esta es fosforilada por la hexoquinasa IV y posteriormente metabolizada a piruvato a través de la glucólisis. Posteriormente se produce la entrada a la mitocondria del piruvato activando el Ciclo de Krebs. Esto genera los nucleótidos NADH y $FADH_2$, que actúan como fuente de transferencia de electrones en la fosforilación oxidativa y en la síntesis de ATP (Quesada *et al.*, 2006). Cuando la razón ATP/ADP se incrementa, los canales de K^+ dependientes de ATP (K_{ATP}), que son los responsables de mantener el potencial de reposo de la célula, se cierran, acumulando así el potasio intracelular (Huypens *et al.*, 2012). Una vez generada la actividad eléctrica esta siempre sigue un patrón bifásico: una fase activa correspondiente a la despolarización y una fase silente de unos pocos segundos producida por la repolarización de la membrana (**Fig. 4**).

En la fase activa, la despolarización de la membrana llega a un potencial umbral en el que se disparan los potenciales de acción por apertura de canales de Ca^{2+} . Como resultado de la despolarización durante el potencial de acción se produce una entrada de Ca^{2+} a la célula aumentando la $[Ca^{2+}]_i$ al abrirse los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Ca_v 1.2/L-Type).

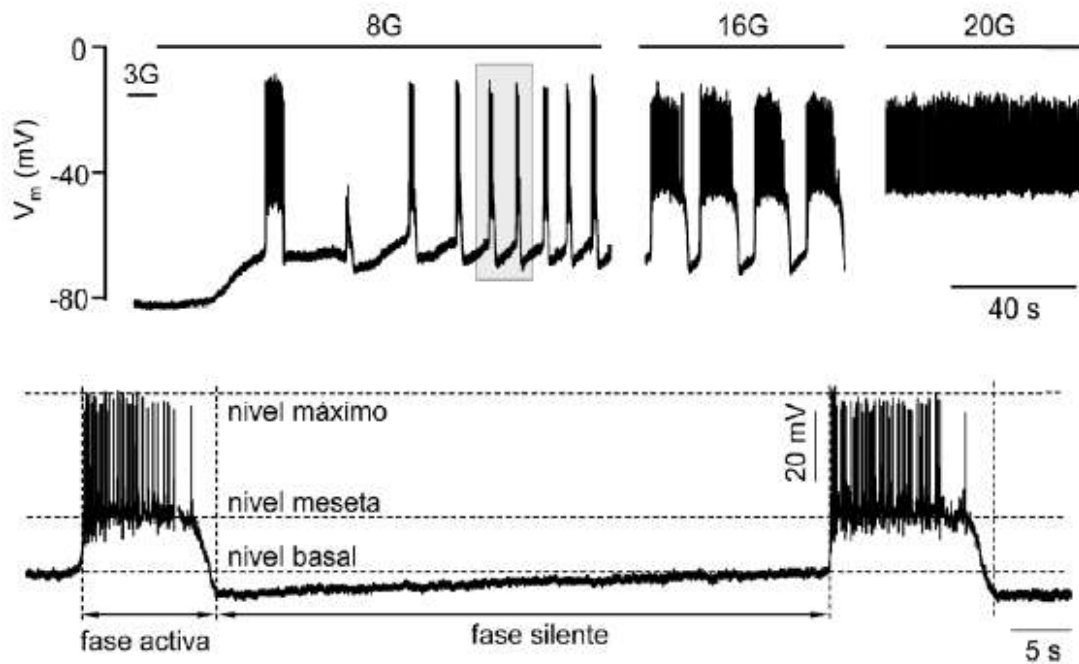


Figura 4. Registro de la actividad eléctrica oscilatoria de las células β en islotes intactos. En él se puede apreciar tanto la respuesta oscilatoria como las duraciones de las diferentes fases a una [glucosa] ext de 8, 16 y 20 mM. El registro inferior es una muestra ampliada del fragmento sombreado del superior donde se señalan las fases que caracterizan la respuesta oscilatoria. Figura obtenida de la Tesis doctoral Alejandro González Álvarez, 2013.

Esto provoca la liberación rápida de la insulina almacenada, principalmente en aquellos gránulos de secreción maduros unidos o cercanos a la membrana plasmática correspondiente a lo que sería la primera fase de liberación de hormona y que tiene lugar durante los primeros 3-5 minutos. Si el metabolismo de la glucosa se mantiene, se moviliza la insulina sintetizada de nuevo desde el interior de la célula debido al calcio que entra a través de otro grupo de canales de Ca^{2+} conocidos como $\text{Ca}_v2.3$ (R-Type) (**Fig. 5**) (Nitert *et al.*, 2008).

Así se produce la segunda fase de secreción de insulina. De esta manera, un estímulo >8 mM glucosa genera una señal de Ca^{2+} oscilatoria acompañada de la liberación pulsátil de insulina.

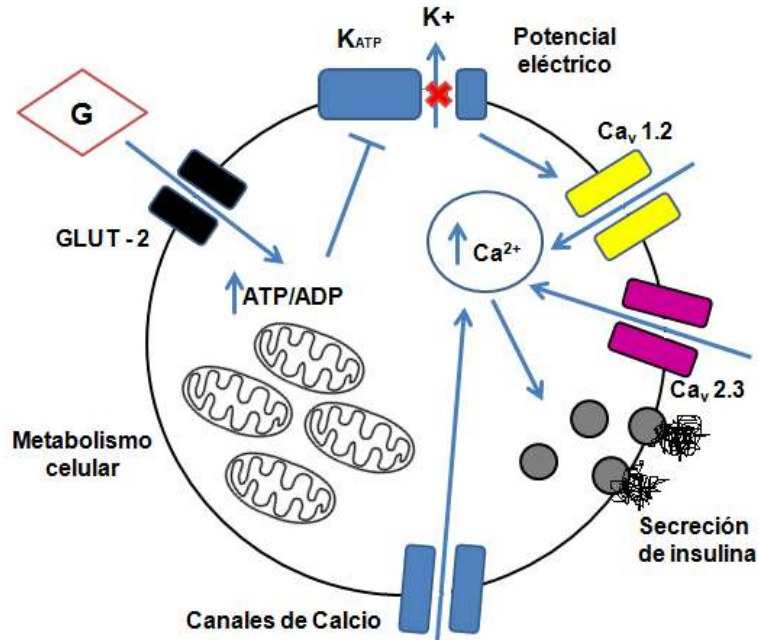


Figura 5. Acoplamiento estímulo-secreción en la célula β . En condiciones basales, los K_{ATP} permanecen abiertos y mantienen el potencial de membrana de la célula β en reposo. Al aumentar la glucosa, el ATP que produce su metabolización cierra los K_{ATP} permitiendo la despolarización de la membrana. La despolarización de la membrana abre canales dependientes de voltaje que introducen calcio en la célula. El incremento de calcio provoca la liberación de insulina en dos fases, una primaria mediada por los canales $C_v1.2$ y una secundaria por $C_v2.3$.

Cabe destacar también que la respuesta oscilatoria no es privativa de la glucosa y se puede apreciar también en presencia de otros compuestos como pueden ser concentraciones bajas de tolbutamida, algo que se verá a lo largo de este trabajo.

1.4. Los canales K_{ATP} en célula β -pancreática.

Los K_{ATP} tienen un papel fundamental actuando como unión entre el metabolismo y la excitabilidad de la célula. El desarrollo de nuevas técnicas como la cristalización o las estructuras 3D han permitido proponer un modelo estructural que concuerda altamente con los resultados obtenidos experimentalmente mediante mutagénesis dirigida (Antcliff *et al.*, 2005). Respecto a su estructura molecular, el K_{ATP} es un complejo hetero-octamérico (4:4) (Shyng e Nichols, 1997),

cuyos 2 tipos de proteínas son la $K_{ir}6.x$ y SUR, con 2 genes descritos de cada una ($K_{ir}6.1$ y $K_{ir}6.2$, y SUR1 y SUR2). Concretamente $K_{ir}6.2$ y SUR1 son los correspondientes en célula β (Fig 6).

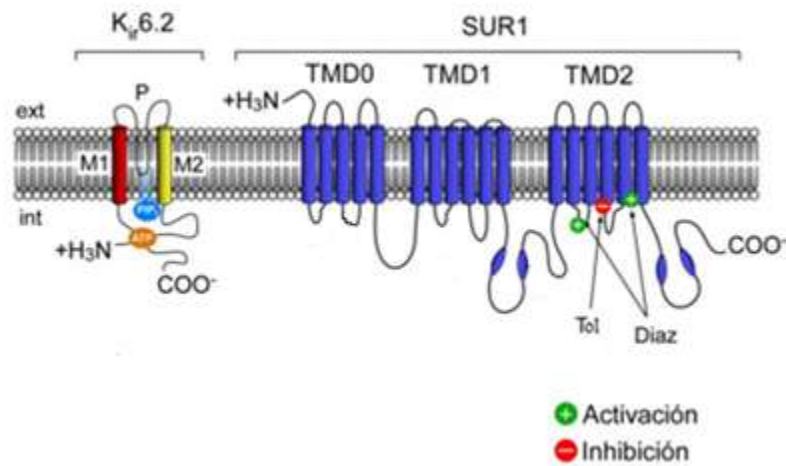


Figura 6. Organización estructural del K_{ATP} . Topología de las subunidades fisiológicas que conforman el K_{ATP} . Aparecen las uniones a los principales agentes fisiológicos así como las regiones de unión a los fármacos de interés (tolbutamida y diazóxido) en las subunidades SUR1 y $K_{ir}6.2$. Diaz = Diazóxido, Tol = Tolbutamida. Modificado de la tesis doctoral de Alejandro González Álvarez (2013).

De entre las dos subunidades proteicas destaca sobre todo SUR1. Es básicamente considerada la diana de unión de fármacos secretagogos que inhiben la actividad del canal (tolbutamida) u otros fármacos activadores (diazóxido), y se caracteriza por poseer múltiples dominios transmembrana y 2 dominios intracelulares de unión a nucleótidos (Higgins, 1995). Sin embargo $K_{ir}6.2$ es un miembro de la subfamilia de los rectificadores internos de la familia de los canales de potasio (Inagaki *et al.*, 1995; Sakura *et al.*, 1995). Esta característica hace referencia a la capacidad de introducir mayor cantidad de corriente de entrada que de salida a valores similares de voltaje incluso cuando la concentración de potasio intracelular es igual a la extracelular. Cuando el ratio ATP/ADP aumenta, este ATP interacciona con él y como consecuencia se produce el cierre del canal (Tanabe *et al.*, 1999)

1.5. Tolbutamida y diazóxido

Los efectos tanto de la tolbutamida como del diazóxido están ampliamente definidos en las células β . La tolbutamida pertenece a la familia de fármacos de las sulfonilureas. Las

sulfonilureas (SU) son fármacos insulinosectores que, administrados por vía oral, actúan en receptores específicos de la célula β -pancreática. La relación de estas SU con la diabetes radica en el descubrimiento de que se produce un descenso en la permeabilidad a potasio por parte de la membrana (uniéndose a los K_{ATP} y se despolarizando la célula β , produciendo secreción de insulina) (Sturgess *et al.*, 1985). Al parecer, la tolbutamida posee dos sitios de unión al K_{ATP} (**Fig. 7**). Uno de alta afinidad correspondiente al receptor de la sulfonilurea (SUR1) (Aguilar-Bryan *et al.*, 1995) y otro de baja afinidad en $K_{ir6.2}$. La unión de la tolbutamida a SUR1 bloquea los K_{ATP} produciendo una despolarización de la membrana (Trube *et al.*, 1986). Esto conlleva un incremento en la duración de las oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$ y un aumento en la secreción de insulina (Mariot *et al.*, 1998). Se ha visto además que la especificidad de la tolbutamida por su sitio de unión de alta afinidad (SUR1) es muy elevada ya que se une a él y cierra el canal en células β -pancreáticas pero no en cardíacas (SUR2A) aunque sí que mantiene su unión de baja afinidad. Esto pone de manifiesto la importancia y dificultad a la hora de seleccionar los fármacos para combatir la diabetes, que han de ser específicos de las subunidades del K_{ATP} de célula β (Ashcroft e Gribble, 1999).

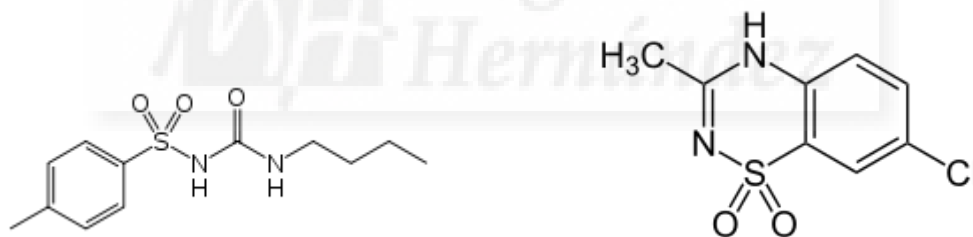


Figura 7. Estructuras de la tolbutamida (izquierda) y diazóxido (derecha). Imágenes tomadas de www.sigmaaldrich.com

El diazóxido, por el contrario, se utiliza para el tratamiento clínico de hiperinsulinemias (Fatehi *et al.*, 2015), insulinomas e hipoglucemias causadas por sobretreatmento con sulfonilureas (SU) (Ferner e Neil, 1988). El diazóxido revierte la inhibición del K_{ATP} que se produce mediante la ocupación de nucleótidos citosólicos en el sitio de unión del canal. Para conseguir este efecto el diazóxido requiere la hidrólisis del ATP citosólico, incluso parece que si no hay suficiente cantidad de este, los efectos del diazóxido sobre el K_{ATP} se ven muy reducidos. (Schwanstecher *et al.*, 1992; Harding *et al.*, 1993). Por tanto, este compuesto abre los K_{ATP} e hiperpolariza las células β

pancreáticas. Esto provoca un descenso en la $[Ca^{2+}]_i$ y una fuerte inhibición en la secreción de insulina (Samols e Marks, 1966; Dunne *et al.*, 1987; Kozlowski *et al.*, 1989). **(Fig. 7).**

2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Aunque la etiología de la DM de tipo II está aún por clarificar totalmente, es conocido que las deficiencias en la secreción de insulina por parte de las células β son un factor clave. Una posible razón para la pérdida de la sensibilidad a la glucosa por parte de estas células podría estar asociado a los canales K_{ATP} , bien por un defecto en el propio canal o en su regulación. Durante los últimos años se ha producido un progreso muy rápido acerca de la relación entre la estructura y la función de los canales K_{ATP} . Pese a que el mecanismo de modulación de estos sigue siendo incierto, se sabe que ciertas deficiencias en los K_{ATP} pueden conducir a desórdenes metabólicos (Ashcroft e Gribble, 1999). Por tanto, es esencial conocer en profundidad todas sus vías de regulación. El cierre de estos provoca la despolarización de la membrana plasmática (Huypens *et al.*, 2012) que genera la apertura de los canales dependientes de voltaje, llevando a la entrada de Ca^{2+} , lo que produce una liberación de la insulina. Es interesante por tanto conocer vías que, en última estancia, conduzcan a la liberación de la insulina sobre todo para posibles tratamientos de la DM tipo II. Existen ciertos agentes farmacológicos como la tolbutamida, que bloquean el canal de K_{ATP} mientras que otros como el diazóxido favorecen su apertura.

El objetivo general del presente estudio es determinar el efecto de la tolbutamida y el diazóxido sobre la señal de calcio citosólica en las células β , debido a su estrecha conexión con la apertura-cierre de los K_{ATP} . Para ello se fijaron los siguientes objetivos específicos:

1. Analizar la señal de calcio intracelular de las células β en presencia de tolbutamida, en concentraciones tanto estimuladoras como no estimuladoras de glucosa.
2. Analizar la señal de calcio intracelular de las células β en presencia de diazóxido en concentraciones estimuladoras de glucosa.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Animales

En el presente trabajo se han utilizado ratones macho adultos C57BL/6J de 12- 14 semanas de edad procedentes del Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la UMH. Los ratones C57BL/6J son consanguíneos y su cepa está ampliamente caracterizada. Ha sido utilizada en una gran variedad de áreas de investigación, desde la biología cardiovascular a la investigación neurosensorial, pasando por la biología del desarrollo, la diabetes y obesidad, genética, inmunología y neurobiología. Todos los procedimientos llevados a cabo con animales de experimentación fueron aprobados por el Comité Ético de la UMH de acuerdo a las normativas nacionales e institucionales.

3.2. Aislamiento de los islotes de Langerhans

Para la obtención y aislamiento de islotes, se sacrifica al ratón por dislocación cervical y se coloca en posición decúbito supino (**Fig. 8**). Se realiza una incisión ventral con línea media vertical que permite la inspección de los órganos abdominales. Se separa el hígado hacia la zona superior manteniéndolo apartado para poder localizar el conducto biliar o colédoco más fácilmente. Una vez localizado, es necesario suturarlo a la altura de su unión con el intestino delgado, de forma que impida el paso de flujo hacia él, pues posteriormente se perfundirá una solución de 0.5 mg/ml de colagenasa (Sigma, España) en medio de aislamiento (composición en mM: 115 NaCl, 10 NaHCO₃, 5 KCl, 1.2 NaH₂CO₄, 1.1 MgCl₂ ·6 H₂O, 25 HEPES, 2.5 CaCl₂, 0.25% BSA y 5 Glucosa) ajustado a pH 7.4 hasta alcanzar el volumen de páncreas máximo adecuado. Esto se puede conseguir mediante la inserción de una cánula que será fijada mediante una nueva sutura a nivel proximal, o mediante introducción directa y manual de la jeringa a través de una pequeña incisión realizada previamente a la misma altura. Una vez el páncreas ha alcanzado el nivel máximo (tras 3-4 mL de perfusión) se extrae y se transfiere a un tubo falcon con medio de aislamiento con colagenasa, que se incuba en un baño a 37°C durante 10 minutos, para la disgregación del tejido exocrino por digestión enzimática. Una vez transcurrido este tiempo, se agita tras una pequeña comprobación visual. Para inhibir la enzima, se añade medio frío (sin colagenasa) que permite parar la reacción. Finalmente se separan los islotes utilizando una micropipeta y bajo inspección

por lupa y se incuban en placa Petri con medio de aislamiento limpio a 37° C y 5% de CO₂, durante 2 horas para su recuperación y posterior utilización. Este procedimiento es un protocolo estandarizado ya descrito por otros autores (Nadal *et al.*, 1999; Quesada *et al.*, 2003).



Figura 8. Ratón en posición decúbiteo supino para la extracción del páncreas en el momento de la inyección de la colagenasa a través de la cánula para que el órgano alcance el volumen idóneo.

3.3. Registros de señalización de calcio intracelular con sondas fluorescentes. Registro ratiométrico de calcio intracelular en célula β en islote completo

La $[Ca^{2+}]_i$ (concentración intracelular de calcio) se midió utilizando Fura-2, un fluoróforo derivado de EGTA sensible a este catión que contiene un sitio selectivo de unión a Ca^{2+} , pero especialmente mucho más selectivo para este que con respecto al Mg^{2+} , algo crucial ya que la concentración intracelular del Mg es mucho mayor que la del Ca^{2+} . En el espectro de excitación del fluoróforo se pueden observar dos máximos; uno a 340 nm que es el correspondiente al de la sonda unida al catión, y otro a 380 nm perteneciente a la sonda exclusivamente (en su forma libre) (**Fig. 9B**). De esta forma se pueden emplear registros ratiométricos donde se reduzcan sensiblemente o directamente se anulen las interferencias, confirmando así que los datos de fluorescencia obtenidos se deben exclusivamente a las variaciones en las $[Ca^{+2}]_i$. Por lo tanto, lo más habitual en la representación de los datos obtenidos con fura-2 es hacerlo como la razón de

fluorescencia de 510 nm recogida tras excitar la muestra a 340 y 380 nm (F340/F380) para lo que se lanza ráfagas de excitación alternativamente de cada una de ellas. Como además esta sonda presenta un punto isobéptico a 360 nm, también se usa el ratio (F360/380), que ha sido además el utilizado en estos experimentos tal y como se observa en los registros.

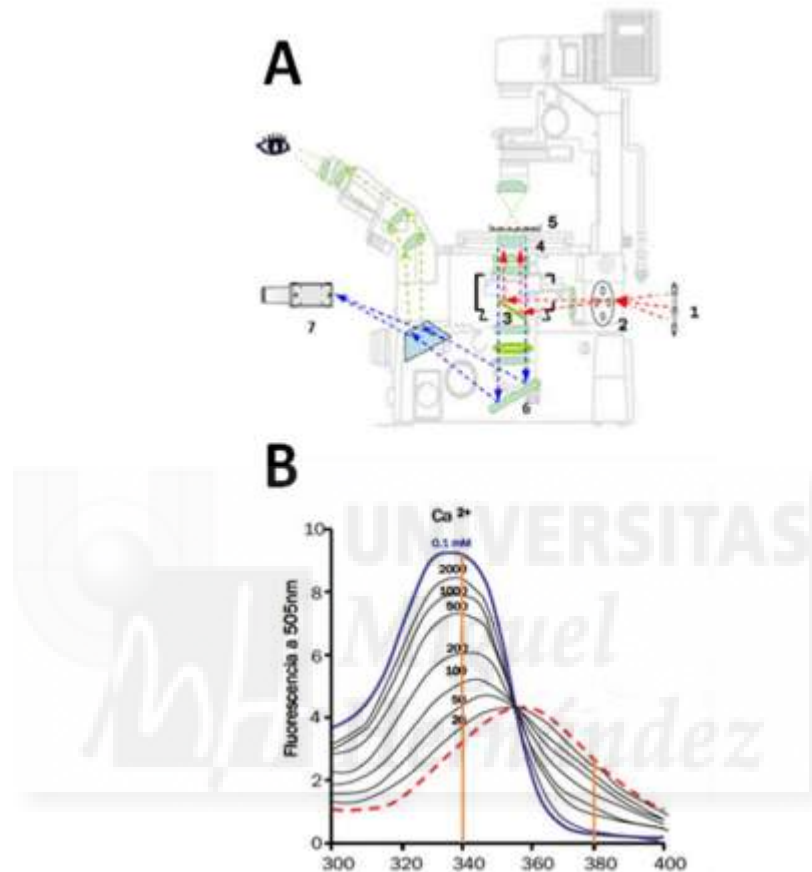


Figura 9. A, Esquema del equipo de imagen de fluorescencia. 1. Lámpara, 2. Rueda de filtros monocromados de excitación, 3. Espejo dicroico, 4. Objetivo, 5. Cámara portadora de células, 6. Filtro de emisión, 7. Cámara. B, Espectro de excitación del Fura-2 a diferentes concentraciones de Ca^{2+} libre. Las líneas naranjas corresponden a los dos máximos, el de la sonda unida al catión y el de la sonda libre respectivamente. (Villalobos *et al.*, 2009)

Para realizar la medida de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, los islotes se cargaron con $4 \mu\text{M}$ ($2 \mu\text{L}$ por cada mL de medio de incubación de los islotes) de fura-2-AM (Invitrogen, Madrid). Para que la sonda penetrara correctamente, es necesario mantener la incubación durante al menos 1 hora, a temperatura ambiente, en atmósfera húmeda y gaseados con carbógeno (mezcla de 95% O_2 y 5%

CO₂). Una vez cargados, estos son transferidos de uno en uno a una cámara de registro, donde quedarán fijados gracias al pretratamiento del cubre donde se colocan con poli-L-lisina. Por ello es conveniente una perfusión de los estímulos a baja velocidad y constante, ya que hay un alto riesgo de que el islote no quede correctamente fijado y desaparezca del plano focal, impidiendo elaborar los registros. Es importante mantener una temperatura constante de 37°C durante todo el proceso. La cámara y el sistema de perfusión se encuentran acoplados a un microscopio invertido de epifluorescencia cuyo modelo es Axiovert 200 (Carl Zeiss, Alemania). El islote (o más bien la cámara que lo contiene) es iluminada mediante una lámpara halógena a 360 y 380nm, excitando alternativamente al fluorocromo. Tras ser excitado, este emite otra luz que ha de atravesar inicialmente el espejo dicróico para que, a continuación, tras atravesar un segundo filtro de 510 nm (Omega Optics, Madrid), la cámara de alta resolución modelo ORCA C4742-95 (Hamamatsu Photonics, Barcelona) recoja esta señal y la amplifique (**Fig. 9A**). Se tomaba 1 imagen cada 3 segundos. Tanto los parámetros asociados a los diferentes componentes del sistema y la monitorización de la señal de calcio se controlaron mediante la interfaz del software Aquacosmos 2.0 (Hamamatsu Photonics, Barcelona).

Durante los experimentos, la perfusión contenía (en mM): 115 NaCl, 5 KCl, 10 NaHCO₃, 1.1 MgCl₂ ·6 H₂O, 1.2 Na₂HPO₄, 2.5 CaCl₂, 25 HEPES, suplementada con diferentes estímulos (3 mM Glucosa, 11 mM Glucosa, 3 mM Glucosa + 40 μM Tolbutamida, 11 mM Glucosa + 40 μM Tolbutamida y 11 mM Glucosa + 100 μM Diazóxido). La velocidad de la perfusión se ajusta a 1.67 ml/min (óptima para los registros en islotes completos). La duración de cada registro ratiométrico de calcio intracelular es variable en función de los registros. El tiempo de perfusión de cada tratamiento se establece para obtener un cambio estable en la respuesta así como para permitir un análisis más exhaustivo de los resultados:

- Registro 1 o control: Este primer registro se realiza para identificar la respuesta característica de la célula β. Este tipo celular en un ratón se encuentra ampliamente distribuido (77% de la masa del islote). Para ello se perfunde durante los primeros 10 minutos una solución con concentración de glucosa no estimuladora (3 mM) y así obtener la señal basal de calcio intracelular. Durante los siguientes 20 minutos se perfunde una solución con concentración de glucosa

estimuladora (11 mM) que genera un aumento en la señal de calcio debido a su entrada al interior celular.

- Registro 2: En este segundo registro, de nuevo se perfunde inicialmente con una concentración de glucosa no estimuladora (3 mM) para obtener la señal basal de calcio intracelular, aunque esta vez únicamente 5 minutos. Durante los siguientes 8 minutos se perfunde la misma concentración de glucosa (3 mM) a la que se le añade tolbutamida a una concentración de 40 μ M.
- Registro 3: Durante los primeros 3 minutos de este registro se perfunde de nuevo glucosa a una concentración no estimuladora (3 mM). Posteriormente se perfunde una concentración de glucosa estimuladora (11 mM) durante los 10 minutos posteriores, y finalmente se perfunde esta misma concentración de glucosa estimuladora (11 mM) suplementada con tolbutamida a una concentración de 40 μ M durante los últimos 7 minutos.
- Registro 4: En este último registro, se perfunde inicialmente 5 minutos de una concentración no estimuladora de glucosa (3 mM), los siguientes 10 minutos a una concentración estimuladora de glucosa (11 mM), y los últimos 10 minutos se mantiene la concentración de glucosa pero suplementada con diazóxido 100 μ M.

Para el análisis de los registros se calcula el área bajo la curva (AUC) en los últimos 5 minutos de cada estímulo con el software Origin v7.0552 ya que es una forma de poder medir la cantidad de Ca^{2+} intracelular (Rafacho *et al.*, 2010; Gonzalez *et al.*, 2013). Asumimos que la señal detectada corresponde a la proveniente de las células β puesto que el microscopio de epifluorescencia permite recoger la señal de varios planos focales a diferentes distancias del plano ecuatorial del islote y que, dada la arquitectura característica de los islotes de ratón, el núcleo central de este está formado mayoritariamente por este tipo de células, asumimos que la señal obtenida en los registros de islote completo pertenece a las células β . (Cabrera *et al.*, 2006). En algunos casos se midió también la amplitud de la señal de calcio sustrayendo el valor basal de F360/380 en ausencia de estímulo (3 mM glucosa) al valor de F360/380 correspondiente al punto

máximo de la señal tras el estímulo (glucosa 11 mM o glucosa suplementada con tolbutamida 40 μ M).

3.4. Estadística

Todos los datos se representan como la media \pm el error estándar del número de experimentos (n). Se consideran diferencias estadísticamente significativas cuando al realizar la prueba t de Student el valor de $p \leq 0.05$ (*: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$; ***: $p \leq 0.001$). Se empleó indistintamente el “paired t test” o “unpaired t test” en función de cada caso (datos correspondientes al mismo islote o a distintos, respectivamente). En caso de comparar más de 2 datos, se analizó mediante ANOVA one way, seguido de un post-test de Tukey.

4. RESULTADOS

4.1. La Tolbutamida aumenta la señalización de Ca^{2+} intracelular en célula β pancreática

A nivel citosólico, el Ca^{2+} está implicado en gran cantidad de procesos celulares. En las células β pancreáticas (estudiadas en este trabajo a nivel de islote completo), un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$, generalmente producido por una $[glucosa]_{ext}$ elevada (11 mM) activa la secreción de insulina en última estancia, lo que explica la gran relevancia del ión. Las variaciones de $[Ca^{2+}]_i$ al aplicar los diferentes tratamientos (TOL y DIAZ suplementados con glucosa) en células β pancreáticas se midieron utilizando la sonda Fura-2 (excitable al Ca^{2+}). Para llevar a cabo la identificación de las células β pancreáticas de estudio dentro de los islotes completos, se perfundió una concentración inicial de glucosa no estimuladora (3 mM) seguida de otra estimuladora (11 mM). Cuando los islotes fueron estimulados por concentraciones de glucosa bajas, no había respuesta apreciable y la línea de fluorescencia se mantuvo a un nivel tomado como basal. Sin embargo, al aumentarse la concentración de glucosa exterior hasta 11 mM los registros presentaron un patrón de incremento de $[Ca^{2+}]_i$ bifásico típico de la respuesta del islote intacto. Este se caracteriza por presentar un incremento inicial elevado y puntual, seguido de un descenso pronunciado pero nunca inferior a los niveles basales, para finalmente aumentar la frecuencia oscilatoria de forma sostenida. Por otro lado se midió también el área bajo la curva (AUC, del inglés *area under the curve*) de los registros ratiométricos de variación de $[Ca^{2+}]_i$ de

célula β confirmándose que a una concentración de glucosa exterior elevada (11 mM) el AUC era significativamente mayor que a glucosas bajas, pero sobre todo para que sirviera como punto de partida en las comparaciones del AUC obtenidas al utilizar el resto de compuestos. Además se producían las oscilaciones anteriormente mencionadas tras el pico transitorio inicial (unas 5 oscilaciones/minuto en los registros control) (**Fig. 10**). Se midió también la amplitud de los picos de fluorescencia alcanzados al perfundir glucosa a una concentración estimuladora, obteniéndose una amplitud media de $0,31 \pm 0,05$ unidades arbitrarias (u.a.) (n=6).

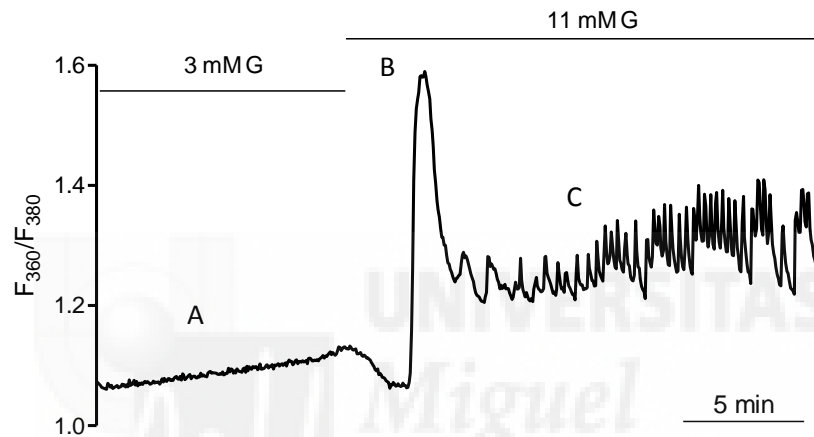


Figura 10. Registro control representativo. En una primera fase (Glucosa no estimuladora) se aprecia la fluorescencia asociada a la $[Ca^{2+}]_i$ basal (A). Al perfundir glucosa a una concentración estimuladora (11 mM) se produce un pico (B) correspondiente al incremento de $[Ca^{2+}]_i$ para finalmente descender de nuevo aunque por encima de nivel basal inicial y oscilar (C). G = Glucosa.

Sin embargo, al perfundir una concentración de glucosa no estimuladora (3 mM) con tolbutamida $40 \mu\text{M}$ se produjo también un incremento significativo en la $[Ca^{2+}]_i$ similar al producido anteriormente por una concentración estimuladora de glucosa (11 mM) (**Fig. 11**). Posteriormente se analizaron los resultados calculando el AUC de los últimos 5 minutos del registro para cuantificar así el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ producido por la tolbutamida y comparándolo con otro registro estimulador (últimos 5 minutos de los registros control, con glucosa a 11 mM) En este caso la amplitud media de los picos máximos alcanzados fue de $0,42 \pm 0,03$ u.a. (n=6) (**Fig. 12**).

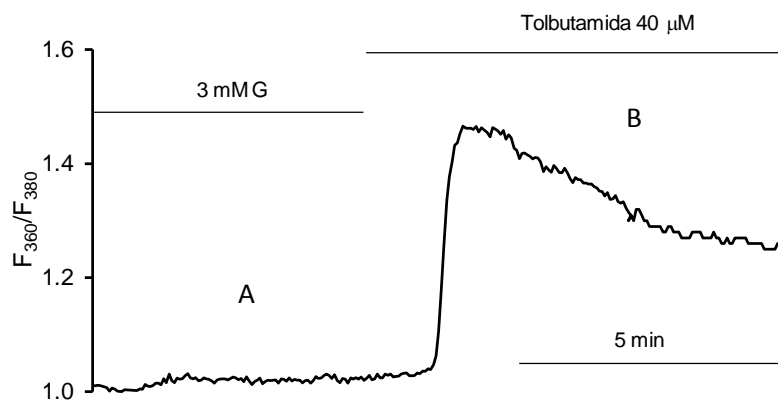


Figura 11. Registro representativo del tipo 2. En él se aprecia de nuevo una línea basal correspondiente a una concentración no estimuladora de glucosa (A) seguido de un pico similar al producido por una concentración estimuladora de glucosa, aunque causado en este caso por la tolbutamida (B). G = Glucosa.

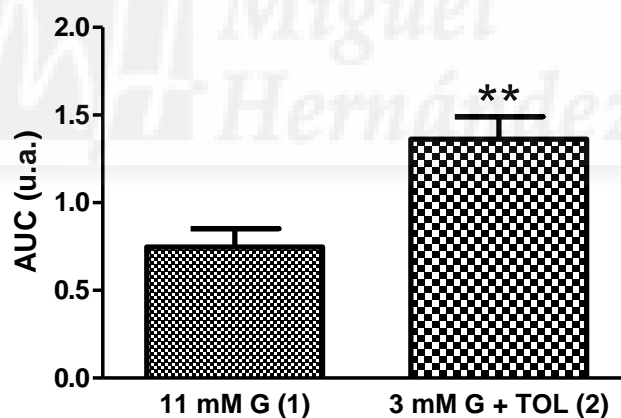


Figura 12. Análisis comparativo del AUC de los últimos 5 minutos de la perfusión de 11 mM Glucosa en los registros control o tipo 1 (1) y de los últimos 5 minutos del tipo 2 concretamente de la región perfundida con glucosa 3 mM + tolbutamida (2). En ambos casos el número total de registros de cada tipo es 6 (n=6) **:p<0.01.

De forma paralela a este experimento, se realizó otro similar donde se añadía la tolbutamida a la misma concentración (40 μ M) pero después de estimular el islote con una concentración de glucosa de 11 mM, y manteniendo esta al añadir la tolbutamida (**Fig. 13**). El

incremento producido en la $[Ca^{2+}]_i$ por esta es altamente similar al producido por la misma concentración de tolbutamida pero en un medio de glucosa no estimuladorio (3 mM) como ocurría en los registros del tipo 2. Esto se pudo comprobar midiendo el AUC de los últimos 5 minutos del registro, siendo significativamente mayor que la de los últimos 5 minutos con perfusión de únicamente glucosa 11 mM pero prácticamente igual a la región de 3 mM Glucosa + tolbutamida 40 μ M medida anteriormente (**Fig. 14**). La amplitud máxima media fue de $0,35 \pm 0,04$ u.a. a 11 mM G + TOL (n=6).

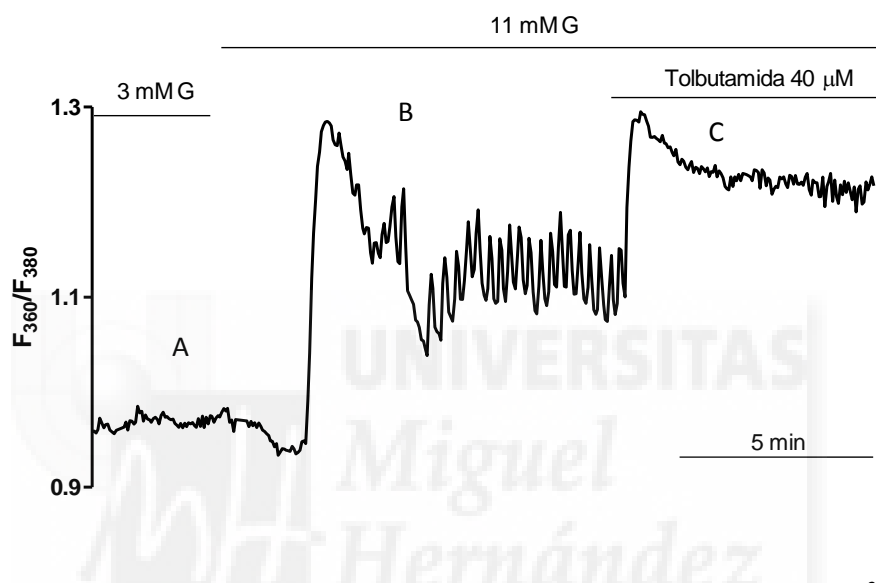


Figura 13. Registro representativo del tipo 3. Tras una concentración de $[Ca^{2+}]_i$ basal (A), la glucosa a 11 mM produce un pico de fluorescencia (B) muy similar al producido por la misma concentración suplementada con tolbutamida 40 μ M (C). G = Glucosa.

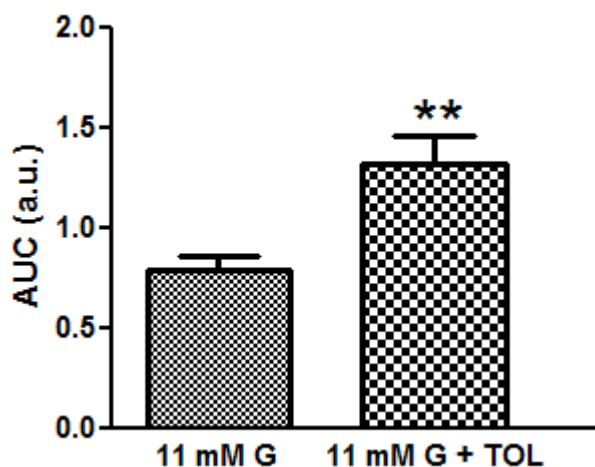


Figura 14. Análisis del AUC de los registros del tipo 3. El área de 11 mM G corresponde a los últimos 5 minutos de la perfusión de 11 mM G de los registros de este tipo, mientras que la de 11 mM G + TOL corresponde a los últimos 5 minutos de esta condición (n=6) **:p<0.01.

Se comparó además el AUC obtenida en los últimos 5 minutos del registro de 3 mM G + TOL con los últimos 5 minutos del registro de 11 mM G + TOL para comprobar si había diferencias significativas entre ellos (**Fig. 15**).

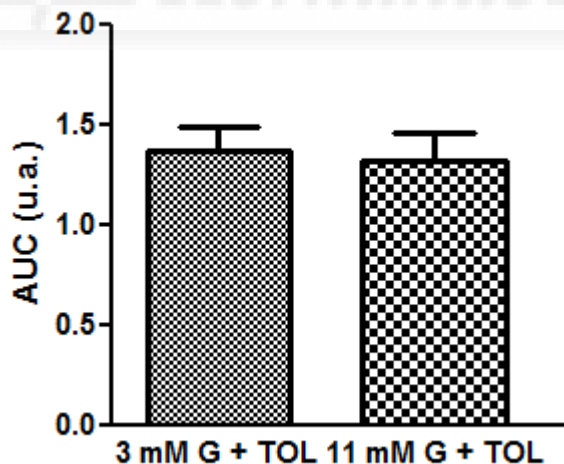


Figura 15. Análisis comparativo del AUC de los registros del tipo 2 y 3. El área de 3 mM G + TOL corresponde a los últimos 5 minutos de la perfusión de los registros tipo 2, mientras que la de 11 mM G + TOL corresponde a los últimos 5 minutos de esta condición de los registros tipo 3 (n=6). No se observan diferencias estadísticamente significativas entre ambas.

De forma adicional se comparó la amplitud de los picos de fluorescencia alcanzada en cada registro, sin obtenerse diferencias significativas entre ellos, aunque siendo ligeramente mayores aquellos en los que la glucosa estaba suplementada con tolbutamida, independientemente de si la concentración era de 3 o de 11 mM (**Fig. 16**).

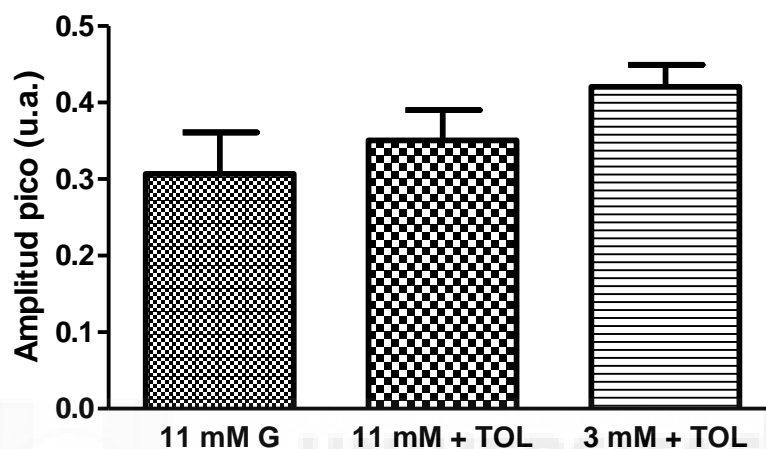


Figura 16. Análisis de la amplitud de los picos en los diferentes medios de perfusión indicados, sin obtenerse diferencias significativas entre ellos (n=6).

4.2. El Diazóxido disminuye la señalización de Ca^{2+} intracelular en célula β pancreática

De igual modo que lo anterior, se realizaron unos registros en los que se incluía el diazóxido para observar su efecto. En este caso, la parte A y B del registro era similar a la de los registros del tipo 3 con una perfusión de glucosa inicial no estimuladora (3 mM) y una posterior de glucosa estimuladora (11 mM) a la que finalmente se le suplementaba Diazóxido 100 μM . Como en los anteriores registros, la perfusión de glucosa estimuladora (11 mM) generó un transiente de calcio seguido de oscilaciones. Sin embargo, al perfundir posteriormente este mismo medio suplementado con diazóxido, la concentración de Ca^{2+} disminuyó drásticamente hasta casi alcanzar la línea basal inicial obtenida a 3 mM (**Fig. 17**). Finalmente, para un análisis más exhaustivo de los datos, se calculó el AUC de los últimos 5 minutos de las últimas dos condiciones (tanto a 11 mM glucosa como a 11 mM G + Diazóxido 100 μM) obteniéndose una disminución

significativa de esta en el medio con diazóxido (**Fig. 18**). La amplitud máxima media de los picos en este tipo de registros fue de $0,34 \pm 0,03$ ($n=6$).

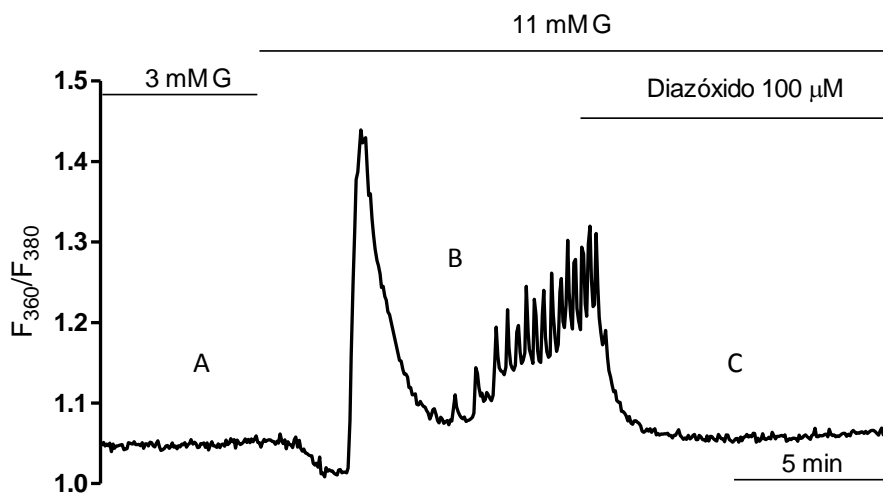


Figura 17. Registro representativo del tipo 4. En él se puede observar la línea de fluorescencia basal con glucosa 3 mM (A), seguido del transitorio y posteriores oscilaciones producidas por la perfusión de una concentración estimuladora de glucosa (11 mM) (B) y finalmente descenso de la fluorescencia hasta niveles casi basales al perfundir glucosa 11 mM suplementada con diazóxido 100 μ M (C). G = Glucosa.

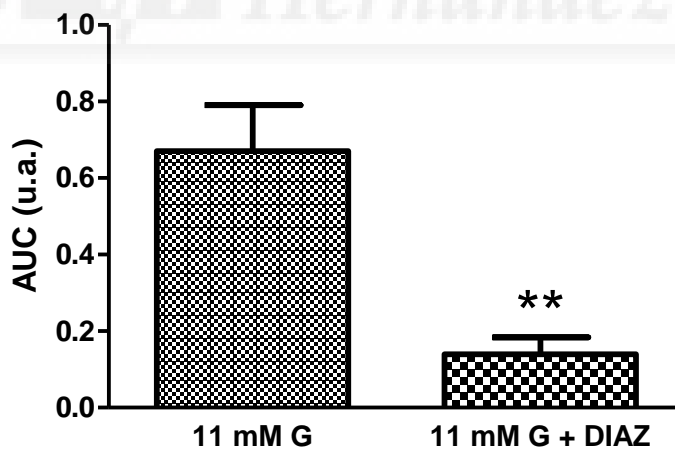


Figura 18. Análisis del AUC de los registros del tipo 4. El área de 11 mM G corresponde a los últimos 5 minutos de la perfusión de 11 mM G de los registros de este tipo, mientras que la de 11 mM G + DIAZ corresponde a los últimos 5 minutos de esta condición. El número total de registros realizados fue de 6 ($n=6$)
 **: $p \leq 0.01$.

5. DISCUSIÓN

Como ya se ha comentado a lo largo de este trabajo, una regulación eficaz de los nutrientes y la energía es vital, y es aquí donde la secreción de hormonas juega un papel fundamental. Una deficiente actuación o secreción de estas puede conllevar a desórdenes metabólicos graves tales como la obesidad o la diabetes tipo II. Es especialmente interesante la investigación sobre los K_{ATP} y su relación con el metabolismo celular. En el caso de la célula β pancreática, el cierre de estos conduce a una despolarización celular y entrada de Ca^{2+} , generando este aumento de la $[Ca^{2+}]$ su correspondiente secreción de insulina. De esta forma se podrían tratar casos de DM tipo II y normalizar situaciones tanto de secreción deficitaria de insulina por una insensibilidad a la glucosa por parte de los K_{ATP} como una hiperestimulación de estos causada por irregularidades en el metabolismo celular.

En el presente trabajo se ha indagado en el efecto que tienen dos fármacos conocidos, la tolbutamida y el diazóxido sobre las células β pancreáticas. Respecto a la TOL, basándonos en los resultados, se ve aumentada la señalización de calcio intracelular de los islotes de Langerhans pertenecientes a ratones C57BL/6J. Esta afirmación se basa en el aumento del AUC de los registros de calcio intracelular pertenecientes a la célula β a una concentración de $40\mu M$ de TOL, perfundida tanto con glucosa estimuladora (11 mM) como no estimuladora (3 mM). Es importante destacar este hecho ya que en cualquier célula β , tal y como hemos podido comprobar en los controles (**Fig. 10**) una concentración de 3 mM G nunca podrá generar un potencial de acción, algo que sí se consigue con 11 mM G. Sin embargo, vemos que no hay diferencias significativas ni entre la amplitud de picos (**Fig. 16**) ni entre el AUC (**Fig. 15**) como cabría esperar por el empleo de las diferentes concentraciones de glucosa, pero sí respecto al control 11 mM G (**Figs. 12 y 14**). Este aumento similar en la señal podría explicarse en base al siguiente acontecimiento:

- En condiciones normales de hiperglucemia, la glucosa entra a la célula por el transportador específico GLUT2. Su metabolización aumenta el ratio ATP/ADP y este ATP se une al $K_{ir6.2}$ del K_{ATP} cerrando parcialmente los canales. Sin embargo, una concentración de TOL de $40\mu M$ es suficiente para que el número de canales K_{ATP} cerrados sea superior al que ocurriría con la vía de la glucosa, al unirse la TOL a la subunidad SUR1. Por tanto, la TOL, al bloquear una mayor población de canales K_{ATP} , llevaría a una despolarización

mayor de la membrana. De esta manera se reclutarían más canales de calcio dependientes de voltaje, lo cual llevaría a una mayor señal de Ca^{2+} .

Esta explicación estaría apoyada por estudios anteriores (Gribble *et al.*, 1998), que afirman que la TOL se une principalmente al receptor SUR1 cerrando los canales muy específicamente.

La confirmación de la actividad estimuladora de la TOL sobre la señalización de calcio intracelular en las células β sugiere una acción estimuladora del fármaco sobre la secreción de insulina, puesto que el Ca^{2+} es el segundo mensajero responsable de la liberación de estas hormonas (Nadal *et al.*, 1999; Quesada *et al.*, 1999). En base a los resultados de la modulación que ejerce la TOL sobre la señal de calcio intracelular y, por ende, sobre la secreción de insulina (como se podría ver reflejado en los resultados obtenidos en otros experimentos (Fatehi *et al.*, 2015), comprobamos que los sitios de unión de la TOL son importantes dianas sobre las que se podría investigar acerca del desarrollo de drogas más específicas para el tratamiento de la hiperglucemia, característica de enfermedades como la Diabetes Mellitus tipo 2 (T2DM). Por ello, el conocimiento de los receptores por los cuales la tolbutamida media su acción en las células pancreáticas puede ser de gran utilidad, especialmente en este caso donde existen pequeñas diferencias con respecto a las subunidades que componen el K_{ATP} en otro tipo de células (como las cardíacas) pero suficientemente grandes como para modificar la especificidad del fármaco (Ashcroft e Gribble, 1999).

Por otra parte, si observamos los resultados del DIAZ, se ve disminuida la señalización de calcio intracelular de los islotes de Langerhans pertenecientes a ratones del mismo tipo. Esta afirmación se basa en la disminución del AUC de los registros de calcio intracelular pertenecientes a la célula β a una concentración de $100\mu\text{M}$ de DIAZ, junto con glucosa estimuladora (11 mM), respecto a la respuesta obtenida en los mismos islotes con una perfusión de 11 mM G sin DIAZ (**Fig. 18**). Este caso se explica también de forma similar al de la TOL, ya que pese a existir un estímulo (glucosa 11mM) el AUC es similar a la que se obtendría con una concentración no estimuladora de glucosa (3mM) lo que se explicaría así:

- En condiciones de hiperglucemia, la relación ATP/ADP se incrementa uniéndose el ATP a los K_{ATP} cerrándolos y despolarizando la célula β , provocando la apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y aumentando la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ liberándose así insulina. En presencia

de diazóxido, (DIAZ 100 μM) éste se une al dominio SUR1 del K_{ATP} , abriendo el canal y permitiendo la salida de iones K^+ que repolarizarán la célula β y disminuirán tanto la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ como la secreción de insulina. En este caso es por tanto mayor el efecto activador del canal por parte del fármaco que el efecto bloqueante de la glucosa.

Estos resultados se ven apoyados por otros experimentos anteriores (Sturgess *et al.*, 1985; Schwanstecher *et al.*, 1992), que afirman que el DIAZ hiperpolariza la célula β vía canal K_{ATP} . El hecho de que esta hiperpolarización persista incluso cuando se encuentra suplementado con concentraciones de glucosa estimuladoras (11 mM) indica que el DIAZ se une al K_{ATP} a través de uniones muy específicas (dominio SUR1). La confirmación de la actividad inhibitoria del DIAZ sobre la señalización de calcio intracelular en las células β sugiere una acción inhibitoria del fármaco sobre la secreción de insulina (segundo mensajero responsable de la liberación de estas hormonas) (Fatehi *et al.*, 2015). Como consecuencia de la modulación que ejerce el DIAZ sobre la señal de calcio intracelular y, por ende, suponemos que sobre la secreción de insulina, los sitios de unión del DIAZ podrían estudiarse como dianas más específicas en las que se podría centrar la industria farmacéutica para el diseño específico de drogas para el tratamiento de hiperinsulinemias, insulinomas e hipoglucemias.

6. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

Las conclusiones de este Trabajo de Fin de Grado son las siguientes:

1. A nivel de islote completo, con concentraciones estimuladoras de glucosa se produce la señal de calcio intracelular característica de la célula β , compuesta por un incremento transitorio de Ca^{2+} seguido de un descenso de este aunque sin llegar al nivel basal, y seguido de oscilaciones.
2. La TOL, agente bloqueante del K_{ATP} , aumenta el AUC de los registros de Ca^{2+} en célula β . Por tanto, este fármaco aumenta la señalización de este segundo mensajero.
3. El DIAZ, agente que favorece la apertura del K_{ATP} , disminuye el AUC de los registros de Ca^{2+} en célula β . Este fármaco por el contrario disminuye la señalización de este segundo mensajero.

4. Tanto la TOL como el DIAZ, que actúan a nivel del K_{ATP} , uniéndose a la subunidad SUR1, son capaces de modular la señal de Ca^{2+} en la célula beta, lo cual implica que también afectarían a la secreción de insulina.

Por tanto, los resultados aportados en el presente trabajo demuestran que la TOL y el DIAZ tienen efectos opuestos en las células β pancreáticas a nivel de señalización de Ca^{2+} intracelular.

En base a estos resultados, sería interesante de cara al futuro desarrollar los siguientes experimentos:

1. Investigar la posible reversibilidad de la unión de los fármacos TOL y DIAZ a la región de alta especificidad del K_{ATP} . Para ello se podría perfundir una solución de únicamente glucosa (no estimuladora en caso de los experimentos con TOL y estimuladora para los de DIAZ) a continuación de las perfusiones con estos compuestos. Con ello podríamos comprobar si la célula β pancreática es repolarizable o si conserva la capacidad de disparar un potencial de acción respectivamente.
2. Comprobar que la secreción de insulina está efectivamente correlacionada a las variaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ de la célula β pancreática producidas por la TOL y el DIAZ. Esto completaría las afirmaciones propuestas en las conclusiones 1 y 2.
3. Medir cómo afectaría a la $[Ca^{2+}]_i$ la unión por parte de la TOL al receptor menos específico del K_{ATP} ($K_{ir6.2}$) mediante anulación del sitio de unión SUR1 por mutagénesis dirigida, valorando así el resultado sobre el cierre del canal. Esto se llevaría a cabo suplementando tanto a concentraciones estimuladoras de glucosa como no estimuladoras, pudiéndose analizar así si la TOL entraría en competencia directa por el sitio de unión junto con el ATP o no.

Estos resultados son de gran interés, puesto que el K_{ATP} en general y sus subunidades ($K_{ir6.2}$ y SUR1) en particular (en célula β pancreática) son una posible diana terapéutica para enfermedades como la DM, presentando así una gran oportunidad para el desarrollo de medicamentos más específicos por parte de las industrias farmacológicas.

7. BIBLIOGRAFÍA

AGUILAR-BRYAN, L. et al. Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. **Science**, v. 268, n. 5209, p. 423-6, Apr 21 1995. ISSN 0036-8075 (Print)0036-8075. Disponible em: < <http://dx.doi.org/> >.

AHREN, B. Autonomic regulation of islet hormone secretion--implications for health and disease. **Diabetologia**, v. 43, n. 4, p. 393-410, Apr 2000. ISSN 0012-186X (Print)0012-186x. Disponible em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s001250051322> >.

ANTCLIFF, J. F. et al. Functional analysis of a structural model of the ATP-binding site of the KATP channel Kir6.2 subunit. **Embo j**, v. 24, n. 2, p. 229-39, Jan 26 2005. ISSN 0261-4189 (Print)0261-4189. Disponible em: < <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7600487> >.

ASHCROFT, F. M.; GRIBBLE, F. M. ATP-sensitive K⁺ channels and insulin secretion: their role in health and disease. **Diabetologia**, v. 42, n. 8, p. 903-19, Aug 1999. ISSN 0012-186X (Print)0012-186x. Disponible em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s001250051247> >.

BERGSTEN, P. Slow and fast oscillations of cytoplasmic Ca²⁺ in pancreatic islets correspond to pulsatile insulin release. **Am J Physiol**, v. 268, n. 2 Pt 1, p. E282-7, Feb 1995. ISSN 0002-9513 (Print)0002-9513. Disponible em: < <http://dx.doi.org/> >.

CABRERA, O. et al. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 7, p. 2334-9, Feb 14 2006. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424. Disponible em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0510790103> >.

CAO, Z.; WANG, X. The endocrine role between beta cells and intra-islet endothelial cells. **Endocr J**, v. 61, n. 7, p. 647-54, 2014. ISSN 0918-8959. Disponible em: < <http://dx.doi.org/> >.

DUNNE, M. J.; ILLOT, M. C.; PETERSON, O. H. Interaction of diazoxide, tolbutamide and ATP⁴⁻ on nucleotide-dependent K⁺ channels in an insulin-secreting cell line. **J Membr Biol**, v. 99, n. 3, p. 215-24, 1987. ISSN 0022-2631 (Print)0022-2631. Disponible em: < <http://dx.doi.org/> >.

DUNNING, B. E.; FOLEY, J. E.; AHREN, B. Alpha cell function in health and disease: influence of glucagon-like peptide-1. **Diabetologia**, v. 48, n. 9, p. 1700-13, Sep 2005. ISSN 0012-186X (Print)0012-186x. Disponible em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-005-1878-0> >.

FATEHI, M. et al. Molecular determinants of ATP-sensitive potassium channel MgATPase activity: diabetes risk variants and diazoxide sensitivity. In: (Ed.). **Biosci Rep**, v.35, 2015. ISBN 0144-8463 (Print)1573-4935 (Electronic).

FERNER, R. E.; NEIL, H. A. Sulphonylureas and hypoglycaemia. **Br Med J (Clin Res Ed)**, v. 296, n. 6627, p. 949-50, Apr 2 1988. ISSN 0267-0623 (Print)0267-0623. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

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**, v. 154, n. 10, p. 3515-24, Oct 2013. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1210/en.2013-1424> >.

GRIBBLE, F. M. et al. Tissue specificity of sulfonylureas: studies on cloned cardiac and beta-cell K(ATP) channels. **Diabetes**, v. 47, n. 9, p. 1412-8, Sep 1998. ISSN 0012-1797 (Print)0012-1797. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

HARDING, E. A. et al. Properties of diazoxide and cromakalim-induced activation of potassium channels in cultured rat and RINm5F insulin-secreting cells; effects of GTP. **Exp Physiol**, v. 78, n. 1, p. 25-34, Jan 1993. ISSN 0958-0670 (Print)0958-0670. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

HASLAM, D. W.; JAMES, W. P. Obesity. **Lancet**, v. 366, n. 9492, p. 1197-209, Oct 1 2005. ISSN 0140-6736. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(05\)67483-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(05)67483-1) >.

HIGGINS, C. F. The ABC of channel regulation. **Cell**, v. 82, n. 5, p. 693-6, Sep 8 1995. ISSN 0092-8674 (Print)0092-8674. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

HUYPENS, P. R.; HUANG, M.; JOSEPH, J. W. Overcoming the spatial barriers of the stimulus secretion cascade in pancreatic beta-cells. **Islets**, v. 4, n. 1, p. 1-116, Jan-Feb 2012. ISSN 1938-2014. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.4161/isl.18338> >.

INAGAKI, N. et al. Reconstitution of IKATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. **Science**, v. 270, n. 5239, p. 1166-70, Nov 17 1995. ISSN 0036-8075 (Print)0036-8075. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

KHAN, F. A. et al. Insulin activates ATP-sensitive K(+) channels in pancreatic beta-cells through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. **Diabetes**, v. 50, n. 10, p. 2192-8, Oct 2001. ISSN 0012-1797 (Print)0012-1797. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

KOZLOWSKI, R. Z.; HALES, C. N.; ASHFORD, M. L. Dual effects of diazoxide on ATP-K+ currents recorded from an insulin-secreting cell line. **Br J Pharmacol**, v. 97, n. 4, p. 1039-50, Aug 1989. ISSN 0007-1188 (Print)0007-1188. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

LIFSON, N.; LASSA, C. V.; DIXIT, P. K. Relation between blood flow and morphology in islet organ of rat pancreas. **Am J Physiol**, v. 249, n. 1 Pt 1, p. E43-8, Jul 1985. ISSN 0002-9513 (Print)0002-9513. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MARIOT, P. et al. Tolbutamide and diazoxide influence insulin secretion by changing the concentration but not the action of cytoplasmic Ca²⁺ in beta-cells. **Diabetes**, v. 47, n. 3, p. 365-73, Mar 1998. ISSN 0012-1797 (Print)0012-1797. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MARUYAMA, H. et al. Insulin within islets is a physiologic glucagon release inhibitor. **J Clin Invest**, v. 74, n. 6, p. 2296-9, Dec 1984. ISSN 0021-9738 (Print)0021-9738. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1172/jci111658> >.

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**, v. 517 (Pt 1), p. 85-93, May 15 1999. ISSN 0022-3751 (Print)0022-3751. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

NITERT, M. D. et al. CaV1.2 rather than CaV1.3 is coupled to glucose-stimulated insulin secretion in INS-1 832/13 cells. **J Mol Endocrinol**, v. 41, n. 1, p. 1-11, Jul 2008. ISSN 0952-5041. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1677/jme-07-0133> >.

QUESADA, I.; CHIN, W. C.; VERDUGO, P. ATP-independent luminal oscillations and release of Ca²⁺ and H⁺ from mast cell secretory granules: implications for signal transduction. **Biophys J**, v. 85, n. 2, p. 963-70, Aug 2003. ISSN 0006-3495 (Print)0006-3495. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/s0006-3495\(03\)74535-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0006-3495(03)74535-4) >.

QUESADA, I.; NADAL, A.; SORIA, B. Different effects of tolbutamide and diazoxide in alpha, beta-, and delta-cells within intact islets of Langerhans. **Diabetes**, v. 48, n. 12, p. 2390-7, Dec 1999. ISSN 0012-1797 (Print)0012-1797. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

QUESADA, I. et al. Glucose induces opposite intracellular Ca²⁺ concentration oscillatory patterns in identified alpha- and beta-cells within intact human islets of Langerhans. **Diabetes**, v. 55, n. 9, p. 2463-9, Sep 2006. ISSN 0012-1797 (Print)0012-1797. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.2337/db06-0272> >.

QUESADA, I. et al. Physiology of the pancreatic alpha-cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes. **J Endocrinol**, v. 199, n. 1, p. 5-19, Oct 2008. ISSN 0022-0795. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1677/joe-08-0290> >.

RAFACHO, A. et al. Glucocorticoids in vivo induce both insulin hypersecretion and enhanced glucose sensitivity of stimulus-secretion coupling in isolated rat islets. **Endocrinology**, v. 151, n. 1, p. 85-95, Jan 2010. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1210/en.2009-0704> >.

RORSMAN, P.; BRAUN, M. Regulation of insulin secretion in human pancreatic islets. **Annu Rev Physiol**, v. 75, p. 155-79, 2013. ISSN 0066-4278. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183754> >.

SAKURA, H. et al. Cloning and functional expression of the cDNA encoding a novel ATP-sensitive potassium channel subunit expressed in pancreatic beta-cells, brain, heart and skeletal muscle. **FEBS Lett**, v. 377, n. 3, p. 338-44, Dec 27 1995. ISSN 0014-5793 (Print)0014-5793. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)01369-5](http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(95)01369-5) >.

SAMOLS, E.; MARKS, V. The treatment of hypoglycaemia with diazoxide. **Proc R Soc Med**, v. 59, n. 9, p. 811-4, Sep 1966. ISSN 0035-9157 (Print). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SANTOS, R. M. et al. Widespread synchronous $[Ca^{2+}]_i$ oscillations due to bursting electrical activity in single pancreatic islets. **Pflugers Arch**, v. 418, n. 4, p. 417-22, May 1991. ISSN 0031-6768 (Print)0031-6768. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SCHWANSTECHEER, C. et al. Diazoxide-sensitivity of the adenosine 5'-triphosphate-dependent K⁺ channel in mouse pancreatic beta-cells. **Br J Pharmacol**, v. 107, n. 1, p. 87-94, Sep 1992. ISSN 0007-1188 (Print). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SHYNG, S.; NICHOLS, C. G. Octameric stoichiometry of the KATP channel complex. **J Gen Physiol**, v. 110, n. 6, p. 655-64, Dec 1997. ISSN 0022-1295 (Print)0022-1295. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

STURGESS, N. C. et al. The sulphonylurea receptor may be an ATP-sensitive potassium channel. **Lancet**, v. 2, n. 8453, p. 474-5, Aug 31 1985. ISSN 0140-6736 (Print)0140-6736. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

TANABE, K. et al. Direct photoaffinity labeling of the Kir6.2 subunit of the ATP-sensitive K⁺ channel by 8-azido-ATP. **J Biol Chem**, v. 274, n. 7, p. 3931-3, Feb 12 1999. ISSN 0021-9258 (Print)0021-9258. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

TRUBE, G.; RORSMAN, P.; OHNO-SHOSAKU, T. Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on the ATP-dependent K⁺ channel in mouse pancreatic beta-cells. **Pflugers Arch**, v. 407, n. 5, p. 493-9, Nov 1986. ISSN 0031-6768 (Print)0031-6768. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

VILLALOBOS, C.; ALONSO, M. T.; GARCIA-SANCHO, J. Bioluminescence imaging of calcium oscillations inside intracellular organelles. **Methods Mol Biol**, v. 574, p. 203-14, 2009. ISSN 1064-3745. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60327-321-3_17 >.

WIERUP, N. et al. The ghrelin cell: a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. **Regul Pept**, v. 107, n. 1-3, p. 63-9, Jul 15 2002. ISSN 0167-0115 (Print)0167-0115. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

