



Instituto de Bioingeniería
Universidad Miguel Hernández

TESIS DOCTORAL

**ALTERACIONES FUNCIONALES EN LA
CÉLULA β PANCREÁTICA DEBIDAS A LA
EXPOSICIÓN PERSISTENTE A DOSIS
MEDIOAMBIENTALMENTE RELEVANTES DE
BISFENOL-A**

Memoria presentada por

Sabrina Villar Pazos

Para optar al grado de doctor

Dirigida por

Dr. Ángel Nadal Navajas

Instituto de Bioingeniería

Universidad Miguel Hernández de Elche

ELCHE 2017



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 Sabrina Villar Pazos, titulada **“Alteraciones funcionales en la célula β pancreática debidas a la exposición persistente a dosis mediambientalmente relevantes de Bisfenol-A”**, 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 2017. .

EUGENIO VILANOVA GISBERT

Catedrático de Toxicología

Director del Instituto de Bioingeniería



Instituto de Bioingeniería
Universidad Miguel Hernández

Dr. **ANGEL NADAL NAVAJAS**, Catedrático de Fisiología de la Universidad Miguel Hernández,

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de investigación titulado “**Alteraciones funcionales en la célula β pancreática debidas a la exposición persistente a dosis medioambientalmente relevantes de Bisfenol-A**”, presentado por Sabrina Villar Pazos para optar al grado de doctor, 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, firmo el presente certificado, en Elche a ___ de _____ de 2017.

ÁNGEL NADAL NAVAJAS

Catedrático de Fisiología

Dpto. de Fisiología

Universidad Miguel Hernández de Elche

***A Maggie Fitzgerald, Ellen Ripley, Éowyn de Rohan,
Lisbeth Salander, Kivrin Engle, Aliena de Shiring
Jo March y otras muchas mujeres inspiradoras***



Sabrina Villar Pazos

Unidad de Fisiología Celular y Nutrición

Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández de Elche

Edificio Vinalopó, Avenida de la Universidad s/n.

03202 Elche (Alicante), España.

+34 965 222 007

svillar@umh.es

EXPERIENCIA EN INVESTIGACIÓN

Enero 2013 – presente

Beca de Formación de Personal de Investigación (FPI, BES-2012-058938) dentro del proyecto “Efectos del Bisfenol-A en la homeostasis de la glucosa, la función del islote de Langerhans y la señalización de insulina en el ratón” (BFU2011-28358).

Investigadora predoctoral en la Unidad de Fisiología Celular y Nutrición (Instituto de Bioingeniería, UMH, Elche). Estudiante de doctorado dentro del programa de Bioingeniería.

Enero 2011 – octubre 2012

Investigadora en el laboratorio de “Neuroendocrinología, homeostasis energética, metabolismo y cáncer” (CIMUS, Center for Research in Molecular Medicine and Chronic Diseases. Santiago de Compostela), desarrollando el

trabajo fin de máster que lleva por título “Regulación de la homeostasis energética en ratones knockout para miostatina”, dirigido por la Dra. Rosa Señarís y el Dr. Víctor Arce.

FORMACIÓN ACADÉMICA

- 2013 **Doctorado en Bioingeniería** (RD 1393/2007).
Universidad Miguel Hernández de Elche.
- 2012 **Máster en Neurociencias**. 120 créditos.
Universidad de Santiago de Compostela
(USC).
- 2010 **Licenciatura en Biología**. Especialidad
Fundamental y Sanitaria. Universidad de
Vigo (UVIGO).

PUBLICACIONES

1. **S. Villar-Pazos**, J. Martínez-Pinna, M. Castellano-Muñoz, P. Alonso-Magdalena, L. Marroquí, I. Quesada, J.A. Gustafsson, A. Nadal. *The non-monotonic effect of Bisphenol-A on Ca²⁺ entry is the outcome of two different signaling pathways involving ERβ and ERα*. Manuscrito en preparación.
2. S. Soriano, A. Rafacho, M. Castellano-Muñoz, P. Alonso-Magdalena, A. Ruiz-Pino, E. Bru-Tarí, B. Merino, E. Irlles, M. Bello-Pérez, P. Iborra, **S.**

- Villar-Pazos**, JF, Vettorazzi, E, Montanya, R, Luque, A, Nadal, I, Quesada. *Cortistatin regulates glucose-induced electrical activity and insulin secretion in mouse pancreatic beta-cells*. Sci. Rep. Under review.
3. A. Nadal, E. Fuentes, C. Ripoll, **S. Villar-Pazos**, M. Castellano-Muñoz, S. Soriano, J. Martínez-Pinna, I. Quesada, P. Alonso-Magdalena. *Extranuclear-initiated estrogenic actions of endocrine disrupting chemicals: Is there toxicology beyond Paracelsus?* J Steroid Biochem Mol Biol. 2017 Jan 31.
 4. M. García-Arévalo, P. Alonso-Magdalena, JM Servitja, T. Boronat-Belda, B. Merino, **S. Villar-Pazos**, G. Medina-Gómez, A. Novials, I. Quesada, A. Nadal. *Maternal exposure to Bisphenol-A during pregnancy increases pancreatic β -cell growth during early life in male mice offspring*. Endocrinology 2016 Nov; 157 (11): 4158-4171.
 5. E. Irlés, P. Ñeco, M. Lluesma, **S. Villar-Pazos**, JC Santos-Silva, JF Vettorazzi, P. Alonso-Magdalena, EM Carneiro, AC Boschero, A. Nadal, I. Quesada. *Enhanced glucose-induced intracellular signaling promotes insulin hypersecretion: pancreatic beta-cell functional adaptations in a model of genetic obesity and prediabetes*. Mol Cell Endocrinol 2015 Mar 15; 404:46-55.

COMUNICACIONES A CONGRESOS / SIMPOSIOS

1. **S. Villar-Pazos**, J. Martínez-Pinna, M. Castellano-Muñoz, P. Alonso-Magdalena, E. Fuentes, I. Quesada, A. Nadal*. *La exposición a dosis mediambientalmente relevantes de Bisfenol-A reduce la corriente tipo-R vía el receptor de estrógenos β en células β pancreáticas*. Comunicación oral.

- XXXVIII Congreso de la Sociedad Española de Diabetes (SED). Abril 2017. Barcelona (España).
2. **S. Villar-Pazos**, J. Martínez-Pinna, M. Castellano-Muñoz, P. Alonso-Magdalena, I. Quesada, A. Nadal. *Environmentally relevant doses of xenoestrogens modulate mouse pancreatic β -cell function*. Póster. XXXVIII Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas (SECF). Septiembre 2016. Zaragoza (España).
 3. S. Soriano*, A. Rafacho, P. Alonso-Magdalena, M. Castellano-Muñoz, E. Bru-Tarí, B. Merino, A. Ruiz, E. Irlés, M. Bello, P. Iborra, **S. Villar-Pazos**, JF. Vettorazzi, M. Nacher, E. Montanya, RM. Luque, Á. Nadal, I. Quesada. *Cortistatin inhibits insulin secretion via somatostatin receptor 5 in mouse pancreatic beta cells*. Comunicación oral. XXXVIII Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas (SECF). Septiembre 2016. Zaragoza (España).
 4. J. Martínez-Pinna, **S. Villar-Pazos**, M. Castellano-Muñoz, S. Soriano, P. Alonso-Magdalena, I. Quesada, A. Nadal. *Low doses of the endocrine disruptor Bisphenol-A reduce voltage-gated Ca^{2+} channels in pancreatic beta-cells*. Póster. 10th FENS, Forum of Neuroscience. Julio 2016. Copenhague (Dinamarca).
 5. **S. Villar-Pazos**, J. Martínez-Pinna, M. Castellano-Muñoz, P. Alonso-Magdalena, S. Soriano, I. Quesada, JA. Gustafsson, A. Nadal. *Low doses of Bisphenol-A decrease R-type calcium currents via estrogen receptor beta in pancreatic beta cells*. Póster. Gordon Research Conference. Environmental Endocrine Disruptors. Junio 2016. Newry (Maine, USA).
 6. **S. Villar-Pazos**, J. Martínez-Pinna, M. Castellano-Muñoz, P. Alonso-Magdalena, S. Soriano, I. Quesada, A. Nadal. *Long-term exposure to low doses of Bisphenol A alters calcium handling in pancreatic β -cells by ER β -mediated reduction of R-type calcium currents*. Póster. CIBERDEM Annual Meeting. Mayo 2016. Cerdanyola del Vallès (Barcelona, España).

7. J. Martínez-Pinna, M. Castellano-Muñoz, **S. Villar-Pazos**, S. Soriano P. Alonso-Magdalena, I. Quesada, A. Nadal. *Low doses of Bisphenol-A inhibits voltage-gated Ca^{2+} and K^+ ion channels in pancreatic β -cells*. Póster. V RECI Congress. Present and future in ion channel research. Octubre 2015. Barcelona (España).
8. E. Irlles, M. Lluesma, P. Ñeco, **S. Villar-Pazos**, J.C. Santos-Silva, P. Alonso-Magdalena, E.M. Carneiro, A.C. Boschero, A. Nadal. I. Quesada. *Functional up-regulation of beta-cells allows for the compensatory adaptations to insulin resistance in a model of genetic obesity*. Póster. XXXVII Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas (SECF). Septiembre 2014. Granada (España).
9. **S. Villar-Pazos**, E. Irlles, J.C. Santos-Silva, M. García-Arévalo, I. Quesada, P. Alonso-Magdalena. *Effect of in vitro over-exposure to 17β -estradiol on calcium homeostasis of pancreatic beta cell*. Póster. Doing Biology with Light. A workshop on cellular and molecular imaging. Octubre 2013. Puerto de la Cruz (Tenerife, España).
10. M. Murtuzayeva, **S. Villar-Pazos**, S. Fernández-Nocelo, O. Martín-Carril, R. Señarís, V.M. Arce. *Fertility is preserved in myostatin knockout mice*. Póster. XXV Congreso de la Sociedad Gallega de Endocrinología, Nutrición y Metabolismo. Noviembre 2012. Santiago de Compostela (España).
11. **S. Villar-Pazos**, M. Murtuzayeva, S. Fernández-Nocelo, O. Martín-Carril, R. Señarís, V.M. Arce. *Regulation of energy homeostasis and reproductive function in myostatin deficient mice*. Póster. Federation of European Physiological Societies (FEPS) Congress. Septiembre 2012. Santiago de Compostela (España).
12. **S. Villar-Pazos**, S. Fernández-Nocelo, R. Señarís, V.M. Arce. *Regulación de la homeostasis energética en ratones knockout para miostatina*. Comunicación oral. VIII Jornadas para Jóvenes Investigadores en Neurociencia. Julio 2012. Vigo (España).

13. M. Murtuzayeva, **S. Villar-Pazos**, S. Fernández-Nocelo, R. Señarís, VM. Arce. *Puberty and reproductive function in myostatin-deficient mice*. Póster. VIII Jornadas para Jóvenes Investigadores en Neurociencia. Julio 2012. Vigo (España).

ESTANCIAS EN INSTITUCIONES CIENTÍFICAS

Agosto – ULB Center for Diabetes Research. Laboratory of
Noviembre 2014 Experimental Medicine. Université Libre de Bruxelles.
Bruselas (Bélgica).

Realizando el proyecto: “Estrogen receptors agonist protect insulin-producing INS-1E cells from lipoapoptosis” bajo la supervisión de la Dra. Miriam Cnop y el Dr. Décio L. Eizirik.

Ayuda a la movilidad predoctoral para la realización de estancias breves en centros de I+D. Subprograma FP

ASISTENCIA A CURSOS, WORKSHOPS Y SIMPOSIOS

Octubre 2016. “Bienestar del animal de laboratorio. Un enfoque práctico para el investigador”. Universidad Miguel Hernández. Elche (España).

Mayo 2016. Curso “Técnicas de reproducción asistida, criopreservación y transgénesis en el ratón. Aplicaciones y utilidad en investigación”. Universidad Miguel Hernández. Elche (España).

Marzo 2016. Curso “Cambios en experimentación animal a raíz de las nuevas normativas”. Universidad Miguel Hernández. Elche (España).

Noviembre 2015. “Workshop on Mechanism of Chronic Pain”. Instituto de Biología Molecular y Celular, Universidad Miguel Hernández. Elche (Alicante, España).

Mayo 2015. Jornada “Patofisiología molecular de la diabetes y la obesidad”. Organizada por la Societat Catalana de Biologia. Barcelona (España).

Junio 2014. Consecución del título de “Experimentador Animal” (categoría C). Universidad Miguel Hernández. Elche (España).

Noviembre 2013. III Jornada Internacional PROMETEO. “STOP DIABETES. Molecular basis for the prevention and treatment of the Diabetes Mellitus”. Universidad Miguel Hernández. Sant Joan d’Alacant (Alicante).

Noviembre 2012. Curso “Bioestadística básica con R”. Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela (España).

Octubre 2012. II Simposio “In vitro models and translational research in Biomedicine”. Instituto de Investigación Sanitaria (IDIS). Santiago de Compostela (España).

Octubre 2012. “Training course on radiation protection for research staff”. Servicio de Protección Radiológica. Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela (España).

Octubre 2011. I Simposio “In vitro models and translational research in Biomedicine”. Instituto de Investigación Sanitaria (IDIS). Santiago de Compostela (España).

Abril 2009. “Curso de actualidad en cáncer y en técnicas de reproducción asistida”. Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI). Vigo (España).

Noviembre 2008. “II Jornada teórico-práctica sobre el factor masculino, evaluación y tratamientos en reproducción asistida”. Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI). Vigo (España).



Han pasado más de cuatro años desde que comenzamos a trabajar en el contenido de este libro. Cuando comencé, descontaba los meses que faltaban para llegar a este momento; ahora me cuesta imaginarme haciendo ciencia y vida en cualquier lugar que no sea aquí, con vosotros.

Posiblemente, sólo hay dos personas que sepan con certeza cuánto trabajo y esfuerzo ha costado llegar hasta aquí. Yo misma, aquí presente, y mi director de tesis, el Dr. Ángel Nadal. Muchísimas gracias Ángel por tu presencia constante e incansable durante estos años, por encontrar siempre un momento para sentarte y hablarme de ciencia, de hipótesis de trabajo, de los experimentos que han de llevar a los siguientes, del funcionamiento de la célula β y de tantas otras cosas. Gracias por compartir tu experiencia y por enseñarme tanto. Ha sido un honor y un privilegio. La electrofisiología me ha fascinado desde mi segundo año de licenciatura. Aquí he tenido la oportunidad de comenzar a practicarla gracias a tres grandes electrofisiólogos, los doctores Manolo Castellano, Sergi Soriano y Juan Pinna. Gracias por vuestra paciencia y disponibilidad para responder a mis incontables preguntas electrofisiológicas, es un placer encontrarse con investigadores tan dispuestos a ayudar a los que comenzamos. He aprendido un montón simplemente observando como trabajáis. Muchas gracias por todo. Gracias a la Dra. Paloma Alonso-Magdalena, por atender siempre con infinita amabilidad y simpatía mis mil dudas experimentales. Gracias también al Dr. Iván Quesada, la Dra. Esther Fuentes y la Dra. Cristina Ripoll. Quisiera agradecer su apoyo a las entidades que con su financiación han hecho posible la realización de este proyecto.

Les debo uno de los agradecimientos más especiales y merecidos de este libro a Salomé y Luisi. Sin su trabajo no habría sido posible. Sois las mejores. Salomé, mil gracias por tu sensatez, tu prudencia, tu paciencia y tu sabiduría. Gracias por ser nuestra hermana mayor, mis oídos siempre están atentos a tus consejos (¡aunque no te lo creas!). Luisi, gracias por darle vida a nuestra rutina, y muchísimas gracias por hacer que la experimentación también sea “indie” y “cool”. Lo he pasado genial con vosotras, dentro y fuera del laboratorio. Cuando llegué, Espe y Junia (ambas doctoras ahora), me acogieron, me cuidaron y me pasearon como la doctoranda expatriada y desarraigada que yo era. Sé que es complicado abrirse a los recién llegados, gracias por hacerme sentir que estar lejos de casa no es estar sola. Mil gracias también Mónica, por tu alegría y tu entusiasmo, por estar entonces y seguir estando ahora. ¿Con quién voy a bailar yo ahora? ¿Ah? ¿A quién le voy a robar cosas de su mesa? Evadar,

gracias por todo este tiempo, por estar siempre dispuesta a bailar conmigo nuestros pasos de “hacer calcio”, de “pichar”, de “tengo asteriscos”, o de “tengo que moverme para no caer desplomada de cansancio”. Gracias por tu ayuda y tu apoyo durante todo el camino. Dra. Merino, nosotras sabemos que la ciencia necesita vedettes, un poco de farándula nortea en este mundo tan gris de pipetas y chismecicladores. Nos encontramos tarde, en una ciudad sucia, insegura y encantadora, mi bienquerida Bruselas. Gracias por todo. Jean, nuestro hermano de acogida, venido desde las tierras exóticas “alén do mar”. Obrigada por contagiarnos tu felicidad y tu sonrisa. Gracias también a Toñi, mi idea de familia “científica” no estaría completa sin ti. Cuando las compañeras que estaban cuando yo llegué comenzaron a marcharse, pensé que el tiempo que me quedaba en el laboratorio iba a ser más solitario y monótono. Me equivocaba. Boro (a la que los gentiles llaman Talía, también conocida como Borito o Boronato), gracias por tu espontaneidad y por esa energía nerviosa cuando estás muy cansada hacia el final de la semana. Gracias por jugar conmigo a cosas de críos (seguiré intentando asustarte desde la lejanía), y por encaramarte al mobiliario el día de mi cumpleaños. Muchísimas gracias joven jedi, ojalá pudiese quedarme hasta el final de tu camino, la Fuerza es muy poderosa en ti. Cristina, puede que en vez de darte las gracias, deba pedirte perdón (sé que te he desquiciado por momentos, ¡pero hasta Frodo sacó de quicio a Samsagaz!). Tú has sido la punta de mi pipeta, el cebador de mi hebra, el ion al que era selectivo mi canal, ya sabes, compatibilidades extrañas que se cruzaron fugazmente sin querer y sin poder evitarlo. Gracias por los momentos, por todos, por los comunes y, especialmente, por los que fueron extraordinarios, a años luz de lo convencional.

No sabría decir por qué, pero mi estancia en Bruselas cambió el rumbo de mi doctorado. Irme en ese preciso momento, me transformó de alguna manera. Gracias al Dr. Eizirik y la Dra. Cnop, por darme la posibilidad de formar parte de su equipo de investigación. Allí conocí a investigadores geniales a los que hoy puedo llamar amigos, y que hicieron de mi estancia la mejor de las experiencias. Gracias Olatz, la Dra. Villate, por todo tu cariño y ese algo que rompía lo cotidiano. Gracias Laura, la Dra. Marroquí, por ser admirable y ser esa investigadora accesible a la que poder recurrir siempre. Obrigada, muito obrigada Reinaldo, el Dr. dos Santos, encontrarme con “você” ha sido de lo mejor de mi paso por Bruselas.

Nunca lo hubiese imaginado, habiendo llegado ya talluda aquí, que Elche me permitiese conocer a algunas de las que hoy son mis personas favoritas del mundo. He tenido tanta suerte en mi vida ilicitana fuera del laboratorio, que no hay espacio ni palabras para tanto agradecimiento. Esperanza, mi Dra. Irlés, he decidido dirigirme a vuesa merced aquí. ¡Con

pocos humanos he compartido más cosas que contigo! Hemos sido compañeras de bancada, compañeras de piso, hemos cruzado penínsulas y nos hemos encontrado en capitales de otros reinos. Amiga mía, hemos superado dos tesis e infinidad de crisis existenciales. Eres invencible, y yo siempre estaré para recordártelo. Gracias por todo. El “Hogar Cebolla” es donde he habitado todo este tiempo, lo considero mi hogar por con quien lo he compartido. Carmen, ¡qué habría hecho yo sin ti! Gracias por aguantarme y cuidarme, por tanta alegría y por muchas otras cosas. Y sobre todo gracias por ser mi salvavidas, y lo digo literalmente (¡maldito peñón!). Loli, gracias por hacer de nuestra convivencia algo tan fácil. Ha sido realmente reconfortante encontrarte al llegar a casa. Muchas gracias por darle paz al “Hogar Cebolla”. Juane, mi hermano postizo y gran tramoyista ilicitano, mil gracias por los cientos de “mundos paralelos” a los que nos llevas. Antonio, Tony, Tonetti, mi galán de película clásica, un espécimen XY de los que pocos quedan. Puedo decir, sin miedo a equivocarme, que llegar hasta aquí habría sido infinitamente más difícil sin tenerte a mi lado. Tú eres mi más mejor amigo, el mejor Godfather del universo, y tantas otras cosas que son buenas que no podría ni enumerarlas. Gracias por ser tan elocuente y saber conocer mis silencios. Gracias también a Ale, Guadalupe, Ana, Raúl... me llevo grandes momentos ilicitanos con vosotros.

Un gracias grandioso a la Neurogente compostelana, juniños y revueltos comenzamos nuestro caminar por el mundo de la investigación. Graciñas Ali, Nuria, Marcos “Borreguillo”, Álex y, especialmente, a Rocío “Big Mami” Martínez (the Godmother), que ha sido la principal promotora y cómplice de todas las fechorías llevadas a cabo por esta promoción de científicos. Gracias también a Gabriel, por muchos eones y glaciaciones que nos sobrevengan, tú siempre serás la otra mitad de mi moneda, como la cruz que no puede ver su cara pero la siente muy cerca. Y, finalmente, gracias a los amigos que lo han sido desde la infancia, a los que no olvido aunque a veces lo parezca. Muchas gracias Ana, la distancia no cambia (ni lo hará) todo lo que hemos pasado juntas.

Gracias a mi familia. A mis abuelas, a las que su nieta mayor ha abandonado por irse a “estudiar” muy lejos. Gracias a mi Tita Bele, a mis tíos y mis primos. Gracias a mi madrina por estar siempre tan orgullosa de su ahijada aventurera, y un agradecimiento muy especial a mi prima Andrea, que nació cuando yo comenzaba a batallar con la Biología y se ha convertido en un ser asombroso ya a su corta edad. Por supuesto, gracias a mis padres que, a pesar de no confiar a veces en mi buen criterio, me han enseñado que no hay nada más propio que una decisión y que, ante todo, hay que ser consecuente con lo decidido. Para mí, esa

cualidad se ha convertido en el objetivo más importante. Espero que este libro compense un poco todas las preocupaciones y desvelos que os he hecho pasar durante este tiempo.

Alguien dijo alguna vez que lo mejor de la vida son las sorpresas que trae. Mi agradecimiento final, y más personal, no podría ser para nadie más. Pilar, gracias por hacer que todo sea posible. Gracias por hacer que no me cueste imaginarnos intentando hacer un timelapse del sol de medianoche sentadas sobre el Círculo Polar, o recorriendo la Ruta 66 en un bus destartado con coyotes acechando nuestra camino, o quizás buceando en Madagascar, o negociando el precio de aguacates orgánicos en un mercadillo clandestino en Estambul. Gracias por la incertidumbre, por lo inesperado y lo excepcional. Sólo espero que podamos seguir repitiendo todos esos “¿Quién nos lo iba decir?” hasta que el mundo deje de serlo. Gracias, tantas como desde aquí a la Luna y vuelta, mil veces. Como siempre.



INDICE

ÍNDICE de TABLAS y FIGURAS	XXV
ABREVIATURAS	XXIX
RESUMEN	35
ABSTRACT	37
INTRODUCCIÓN	
1. EL PÁNCREAS. EL ISLOTE DE LANGERHANS.	41
2. REGULACIÓN DE LOS NIVELES DE GLUCOSA EN SANGRE.....	43
3. DISFUNCIÓN EN LA REGULACIÓN DE LA GLUCEMIA: DIABETES MELLITUS.....	47
4. DISRUPTORES ENDOCRINOS Y DIABETES MELLITUS.	50
4.1. El bisfenol A (BPA).	51
5. LA CÉLULA β PANCREÁTICA Y SU FUNCIONAMIENTO.	57
5.1. El canal de K^+ sensible a ATP (KATP).	59
5.2. Canales de calcio voltaje-dependientes (Ca_v).....	63
5.2.1. Canales Ca_v en la célula β pancreática.	67
5.3. Canales de potasio voltaje-dependientes (K_v) y canales de potasio activados por calcio (K_{Ca}).....	69
OBJETIVOS	81
MATERIAL Y MÉTODOS	
1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	83
2. AISLAMIENTO DE ISLOTES DE LANGERHANS.....	83
3. CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS AISLADAS DEL ISLOTE DE LANGERHANS.	84

4.	MODELO DE EXPOSICIÓN <i>IN VITRO</i> A BPA Y OTROS MODULADORES DE LA ACTIVIDAD ESTROGÉNICA.	85
5.	REGISTRO DE CALCIO INTRACELULAR EMPLEANDO IMAGEN DE FLUORESCENCIA.	87
5.1.	Registro ratiométrico de la movilización de calcio intracelular en islote intacto y células aisladas de islote de Langerhans.	87
5.2.	Registro de señales de calcio intracelular de célula β individual en islote completo empleando microscopía confocal.	90
6.	EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL EMPLEANDO MICROSCOPÍA DE EPIFLUORESCENCIA.	91
6.1.	Autofluorescencia de NAD(P)H.	91
6.2.	Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).	91
7.	REGISTROS DE ELECTROFISIOLOGÍA.	93
7.1.	Registro de corrientes de calcio.	94
7.2.	Registro de corrientes de potasio.	95
7.3.	Registro de potencial de membrana.	97
7.4.	Registros de capacidad de membrana (C_m).	98
7.5.	Identificación de célula β mediante parámetros electrofisiológicos.	99
8.	DETERMINACIÓN DE LA SECRECIÓN Y CONTENIDO DE INSULINA.	100
8.1.	Secreción estática de insulina.	100
8.2.	Determinación del contenido y secreción de insulina.	101
8.3.	Cuantificación de proteína total.	101
9.	OBTENCIÓN DE ARN Y RT-PCR CUANTITATIVA.	102
9.1.	Extracción de ARN de islote de Langerhans.	102
9.2.	Retrotranscripción.	103
9.3.	PCR a tiempo real.	103
10.	ESTADÍSTICA.	105

RESULTADOS

1. LA FORMA DEL POTENCIAL DE ACCIÓN ESTÁ ALTERADA EN LAS CÉLULAS β QUE HAN SIDO EXPUESTAS A 1 nM BPA.	109
2. LA EXPOSICIÓN CRÓNICA A DOSIS MEDIOAMBIENTALES DE BPA ALTERA LA HOMEOSTASIS DE $[Ca^{2+}]_i$ EN CÉLULAS β PANCREÁTICAS.	111
3. LAS CÉLULAS β EXPUESTAS DURANTE 48 HORAS A 1 nM BPA MUESTRAN ALTERACIONES EN SU EXOCITOSIS.....	118
4. LOS ISLOTES INCUBADOS DURANTE 48 HORAS CON 1 nM BPA CONTIENEN MÁS INSULINA Y PRESENTAN IMPORTANTES ALTERACIONES EN LA SECRECIÓN DE INSULINA.	121
5. LOS ISLOTES DE LANGERHANS EXPUESTOS A 1 nM BPA DURANTE 48 HORAS NO PRESENTAN CAMBIOS SIGNIFICATIVOS EN SU CAPACIDAD PARA METABOLIZAR LA GLUCOSA.....	123
6. LAS CÉLULAS β EXPUESTAS A BPA MUESTRAN UNA DISMINUCIÓN DOSIS-DEPENDIENTE Y NO MONOTÓNICA DE LA CORRIENTE MACROSCÓPICA DE Ca^{2+}	126
7. LAS CÉLULAS β EXPUESTAS A 1 nM BPA TAMBIÉN PRESENTAN ALTERADA LA CORRIENTE MACROSCÓPICA DE K^+	128
8. LA DISMINUCIÓN DE LA CORRIENTE DE Ca^{2+} EN CÉLULAS β EXPUESTAS A 1 nM BPA SE DEBE A UNA REDUCCIÓN DE LA CORRIENTE TIPO-R.....	129
9. LA EXPRESIÓN DE $Ca_v2.3$ ESTÁ DISMINUIDA EN CÉLULAS β EXPUESTAS A 1 nM BPA. ...	133
10. LOS EFECTOS DE BPA EN LA HOMEOSTASIS DE Ca^{2+} DE LA CÉLULA β SON MIMETIZADOS POR EL AGONISTA DPN.....	134
11. LA MOVILIZACIÓN DE Ca^{2+} NO ESTÁ ALTERADA EN CÉLULAS β PROVENIENTES DE RATONES $ER\beta^{-/-}$ EXPUESTAS A 1 nM BPA POR 48 HORAS.	139
12. $ER\alpha$ MODULA POSITIVAMENTE LA ENTRADA DE Ca^{2+} EN CÉLULA β AL SER ACTIVADO CON DOSIS ALTAS DE LIGANDO.	142
13. $ER\alpha$ MODULA LA ENTRADA DE Ca^{2+} EN CÉLULA β A TRAVÉS DE LA VÍA DE PI3K. .	146

DISCUSIÓN

1. Efecto de la exposición a dosis bajas de BPA sobre la actividad eléctrica de célula β	151
2. Efecto de la exposición a BPA sobre las variaciones de Ca^{2+} intracelular en células β ...	153
3. Efecto de la exposición a BPA sobre las exocitosis y la secreción de insulina de células β pancreáticas.	155
4. Efecto del BPA sobre las corrientes de Ca^{2+} voltaje-dependientes.	158
5. Mecanismo de acción del BPA.	162

OBJETIVOS	173
-----------------	-----

OBJETIVOS	175
-----------------	-----

BIBLIOGRAFÍA	181
--------------------	-----



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Comparación de la citoarquitectura del islote de Langerhans de ratón o humano41

Figura 2. Representación esquemática de la homeostasis de la glucosa44

Figura 3. Representación esquemática de los cambios que se producen en individuos con capacidad o no de contrarrestar la insulino-resistencia.48

Figura 4. Bisfenol A (BPA).....51

Figura 5. Ejemplos de curvas dosis-respuesta no monotónicas.55

Figura 6. Patrón típico de actividad eléctrica en célula β pancreática.57

Figura 7. Organización estructural de K_{ATP}59

Figura 8. Organización estructural de los canales Ca_v64

Figura 9. Organización estructural de los canales K_v70

Figura 10. Organización estructural de los canales BK.73

Figura 11. Acoplamiento estímulo – secreción en la célula β pancreática.76

Figura 12. Compuestos utilizados que actúan como moduladores de receptores de estrógenos.....86

Figura 13. Estructura química de fura-2.....87

Figura 14. Cambios en el espectro de excitación de la sonda fura-2.....88

Figura 15. Estructura de Rh-123.....92

Figura 16. Registro de corriente de calcio.....95

Figura 17. Registro de corriente de potasio.....96

Figura 18. Protocolo empleado para la monitorización de ΔC_m99

Figura 19. Caracterización del potencial de acción en células β que han sido expuestas a 1 nM BPA durante 48 h.110

Figura 20. Variación de $[Ca^{2+}]_i$ provocada por glucosa en islotes intactos expuestos durante 48h a 1 nM BPA.112

Figura 21. Variación de $[Ca^{2+}]_i$ en células β aisladas expuestas durante 48h a 1 nM de BPA.	114
Figura 22. Variación de $[Ca^{2+}]_i$ en células β aisladas expuestas durante 48h a 0.1, 1, 10 y 100 nM BPA en respuesta a despolarizaciones no metabólicas inducidas por $[K^+]_o$ elevadas.....	116
Figura 23. Sincronía y acoplamiento de células β en islotes intactos expuestos a 1 nM BPA durante 48h.	117
Figura 24. Exocitosis en células β aisladas expuestas a 1 nM BPA durante 48 h.	120
Figura 25. Contenido y secreción de insulina de islotes expuestos a 1 nM BPA durante 48 h.	122
Figura 26. Análisis de la función metabólica y mitocondrial en islotes intactos cultivados con 1 nM BPA durante 48 h.	124
Figura 27. Corrientes macroscópicas de Ca^{2+} en células β expuestas a BPA durante 48 h.....	127
Figura 28. Corrientes macroscópicas de K^+ en célula β	128
Figura 29. Disección farmacológica de la corriente macroscópica de Ca^{2+} en células β expuestas a BPA durante 48 horas	130
Figura 30. Bloqueo de la corriente de Ca^{2+} tipo-R en células tratadas con 1 nM BPA durante 48 h.....	132
Figura 31. Expresión génica en islotes de Langerhans cultivados durante 48h en presencia de distintas concentraciones de BPA.....	133
Figura 32. Corrientes macroscópicas de Ca^{2+} en célula β	135
Figura 33. Variación de $[Ca^{2+}]_i$ en células β aisladas expuestas durante 48h a 1 nM DPN o PPT en respuesta a despolarizaciones no metabólicas inducidas por $[K^+]_o$ elevadas.....	137
Figura 34. Variación de $[Ca^{2+}]_i$ en células aisladas de islote cultivadas con 1 nM BPA durante 48h en presencia o no de antagonistas selectivos de receptores de estrógenos.....	138

Figura 35. Homeostasis de Ca^{2+} en células β provenientes de ratones $\text{ER}\beta^{+/+}$ (WT) o $\text{ER}\beta^{-/-}$ (KO) que han sido expuestas a 1 nM BPA durante 48 h.	140
Figura 36. Expresión génica en islotes de Langerhans provenientes de ratones $\text{ER}\beta^{-/-}$, cultivados durante 48h en presencia de 1 nM BPA.	142
Figura 37. Corrientes macroscópicas de Ca^{2+} en células β aisladas cultivadas durante 48 h.....	143
Figura 38. Corrientes macroscópicas de Ca^{2+} en célula β	144
Figura 39. Expresión génica en islotes de Langerhans en relación a la actividad de $\text{ER}\alpha$	145
Figura 40. Corrientes macroscópicas de Ca^{2+} en célula β	146
Figura 41. Corrientes macroscópicas de Ca^{2+} registradas en células β incubadas durante 48h con 100 nM BPA en presencia de inhibidores específicos.	148

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de las soluciones extracelular e intracelular empleadas para el registro de corrientes de calcio.	94
Tabla 2. Composición de las soluciones extracelular e intracelular empleadas para el registro de corrientes de potasio.	96
Tabla 3. Composición de las soluciones extracelular e intracelular empleadas para el registro del potencial de membrana.	97
Tabla 4. Condiciones programadas para la reacción de retrotranscripción.	103
Tabla 5. Condiciones programadas para qPCR.	104
Tabla 6. Cebadores empleados en las reacciones de amplificación en la PCR cuantitativa.....	105

ABREVIATURAS

[Ca²⁺]_i	Concentración de calcio intracelular
λ	longitud de onda
Ψ_m	potencial de membrana mitocondrial
4-AP	4-aminopiridina
4-OHT	4-Hydroxytamoxifen
A	Amperios
ABCC	ATP-binding cassette transporter, subfamily C, gene
AC	Adenilato ciclasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADP	Adenosine d iphosphate (adenosina difosfato)
Akt/PKB	Proteína quinasa B
AP-1	Activator protein-1
ARN	Ácido ribonucleico
ARN_m	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosine t riphosphate (adenosina trifosfato)
AUC	Area u nder c urve
BK	Canal K _{Ca} de alta conductancia unitaria
BPA	Bisfenol A
BSA	B ovine serum a lbumin

Ca_v	Canal de calcio voltaje-dependiente
<i>Ca_v1c</i>	Canal de calcio, voltaje-dependiente, tipo-L, subunidad alfa 1C
<i>Ca_v1e</i>	Canal de calcio, voltaje-dependiente, tipo-R, subunidad alfa 1E
cAMP	Cyclic a denosine m onophosphate
cGMP	Cyclic g uanosine m onophosphate
ChTx	Charybdotoxina
C_m	Capacitancia de membrana
CTL	Control
Cx36	Conexina-36
DDT	Dicloro difenil tricloroetano
DDE	Dicloro difenil dicloroetileno
DES	Dietilestilbestrol
DEHP	Diethylhexyl phthalate
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPN	Diarylpropionitrile
EDC	E nvironmental e ndocrine- d isruptor c hemical
EDTA	E thylene d iamine t etraacetic a cid
EGTA	E thylene g lycol t etraacetic a cid
EFSA	E uropean F ood S afety A uthority
ELISA	E nzyme- L inked I mmuno S orbent A ssay
eNOS	E ndothelial n itric o xide s ynthase

EPA	US E nvironmental P rotection A gency
ERs	E strogen r eceptors
ERα	E strogen r eceptor a lfa
ERβ	E strogen r eceptor b eta
ERE	E strogen r esponse e lements
ERK	E xtracellular signal- r egulated k inase
F	Faradios
FADH₂	Flavín adenín dinucleótido reducido
FCCP	Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona
FOXO1	Forkhead box protein O1
G	Conductancia
GC-A	Receptor guanilil ciclase A
GLUT2	G lucose T ransporter 2
GPER	G protein-coupled e strogen r eceptor
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HEK	H uman e mryonic k idney cells
Hprt	H ypoxanthine-guanine p hosphoribosyltransferase gene
HVA	H igh voltage a ctivation
Hz	Hercios
I	Corriente
IbTx	Iberiotoxina
J	Densidad de corriente

[K⁺]_o	Concentración de potasio extracelular
K_{ATP}	Canal de potasio sensible a ATP
K_{Ca}	Canal de potasio voltaje-dependiente sensible a calcio
K_{ir}	Canal de potasio rectificador de entrada
KNCJ	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, gene
KO	Knockout
K_v	Canal de potasio voltaje-dependiente
MAPK	M itogen- A ctivated P rotein K inases
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MODY	M aturity O nset D iabetes of the Y oung
MΩ	Megaohmios
nM	Nanomolar
NAD/NADH	Nicotín adenín dinucleótido (oxidado/reducido)
Na_v	Canal de sodio voltaje-dependiente
NOAEL	No o bserved a dverse e ffect l evel
LOAEL	L owest o bserved a dverse e ffect l evel
LVA	L ow v oltage a ctivation
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	P hosphate b uffered s aline
PC	Policarbonato
PCBs	Policlorobifenilos // Bifenilos policlorados

PCR	P olymerase C hain R eaction
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa
PIP₂	Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
PIP₃	Fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato
PKC	Proteína quinasa C
PKG	Proteína quinasa G
PP	Polipéptido pancreático
PPT	Propil pirazol triol
Rh-123	Rodamina-123
RPMI	R oswell P ark M emorial I nstitute medio
RRP	R eady r easable p ool
R_s	Resistencia en serie
RT	Retrotranscripción
SERMs	S elective e strogen r eceptors m odulators
Sp1	Specificity protein 1
SUR	S ulfonylurea r eceptor
SK	Canal K _{Ca} de baja conductancia
T_h	constante de tiempo de inactivación
T_m	constante de tiempo de activación
TEA	Tetraetilamonio
u.a.	Unidades arbitrarias
V	Voltaje

V_{mb}

Potencial de membrana

WT

Wild-type



El bisfenol-A (BPA) es el componente principal de los plásticos de policarbonato, se usa también como aditivo en la fabricación de muchos otros tipos de plásticos y para la producción de resinas epoxi. La presencia de BPA es generalizada en multitud de productos de consumo, en contacto directo con alimentos y bebidas. El BPA ha sido detectado en la orina del 93% de los ciudadanos estadounidenses. El BPA se ha clasificado como un disruptor endocrino, que actúa como un estrógeno exógeno mediante su unión con los receptores de estrógenos ER α y ER β . Diversos estudios epidemiológicos han relacionado la exposición a BPA con el desarrollo de ciertas patologías, incluyendo desórdenes metabólicos como la diabetes mellitus y la obesidad. Trabajos realizados durante la última década sugieren que el BPA podría contribuir en la etiología de la diabetes tipo-2, ya que el BPA causa resistencia a la insulina y altera la función de la célula β pancreática en ratones expuestos.

Trabajos previos de nuestro grupo han demostrado que el BPA incrementa la expresión del gen de la insulina y que tiene un efecto insulino-trópico rápido al promover la inhibición de la actividad del canal K_{ATP}. Ambas respuestas implican la transducción de señales a través de ER α o ER β , respectivamente, localizados fuera del núcleo. En el presente estudio, hemos estudiado cómo la exposición persistente a BPA puede modular directamente y a largo plazo la función de la célula β pancreática y el islote de Langerhans. Para ello hemos establecido un modelo de exposición *in vitro* utilizando islotes de Langerhans aislados o células β disgregadas que se han mantenido en presencia de BPA durante 48 horas. La caracterización de las posibles alteraciones debidas al BPA se ha realizado mediante un abordaje multidisciplinar, combinando técnicas electrofisiológicas (actividad eléctrica, corrientes macroscópicas y medidas de la capacidad de membrana), microscopía de fluorescencia con sondas sensibles a calcio, medida de la secreción de insulina y estudio de los cambios en la expresión de ARNm mediante PCR a tiempo real. Los resultados que hemos obtenido muestran que la exposición a BPA provoca cambios

muy significativos en el funcionamiento de la célula β pancreática. A una dosis tan baja como 1 nM, el BPA altera la forma del potencial de acción de las células β en respuesta a glucosa, disminuyendo su amplitud y haciéndolo más ancho. A esta dosis de exposición, hallamos que la entrada de calcio, en respuesta a glucosa o estímulos despolarizantes no-metabólicos, estaba disminuida en células β expuestas. Sin embargo, al incrementar la dosis de exposición a 100 nM BPA, los cambios en la entrada de calcio no se detectaron, por lo que la relación entre la dosis de BPA y el efecto que describimos se produce de un modo no monotónico. El fenómeno de la nomonotonicidad aparece frecuentemente en la literatura en relación a los efectos provocados por la exposición a EDCs. Así mismo, la exposición a 1 nM BPA altera muy significativamente la capacidad excitotónica de las células β y su secreción de insulina. La disección farmacológica de la corriente macroscópica de calcio revela que la reducción particular de la corriente tipo-R era la responsable de este cambio. Empleando PCR a tiempo real, hallamos que la transcripción del canal $C_v2.3$, que conduce la corriente R, estaba reducida en las células cultivadas en presencia de BPA. Este efecto transcripcional se produjo por igual con independencia de la dosis de BPA empleada, lo que indica una relación monotónica entre la dosis de BPA y su efecto sobre la expresión del canal, a pesar de no observarse un efecto de BPA sobre la entrada de calcio a las dosis más altas que utilizamos. El efecto de una dosis baja de BPA sobre la entrada de calcio en la célula β se reprodujo al emplear un agonista específico de $ER\beta$ (DPN), mientras que fueron inexistentes en células β provenientes de ratones $ER\beta$ -knockout. Estos resultados parecen indicar que $ER\beta$ está implicado en la mediación de las respuestas a dosis bajas de BPA (1 nM). Sin embargo, la discrepancia entre la nomonotonicidad en la entrada de calcio y la monotonicidad en el efecto sobre la expresión del canal tipo-R, sugiere la existencia de otro mecanismo modulado por dosis más altas de BPA que actúa regulando la entrada de calcio de forma opuesta. Nuestros resultados sugieren que la activación de $ER\alpha$ a dosis altas (100 nM y 1 μ M) provoca la potenciación de la corriente macroscópica de calcio, y que este mecanismo es dependiente de la activación de la vía de PI3K. El solapamiento de estos efectos opuestos a través de $ER\beta$ y $ER\alpha$ tendría como consecuencia la aparición de la nomonotonicidad.

Bisphenol-A (BPA) is the main component of the polycarbonate plastics, and it is also used as an additive in the manufacture of many others types of plastics and epoxy resins. BPA is extensively present in daily consumer goods in close contact with food and beverages, and it is detected in the urine of 93% of USA citizens. BPA has been classified as an endocrine disruptor chemical (EDC), which acts like a xenoestrogen by binding to estrogen receptors ER α and ER β . Epidemiological studies show that BPA exposure is linked to the development of some diseases, including metabolic disorders like diabetes mellitus and obesity. In the last decade, several works suggest that BPA could be involved in the etiology of type-2 diabetes, because it elicits insulin resistance and alters pancreatic β -cell function in BPA-treated mice.

Previous works of our group have demonstrated that BPA increases the expression levels of the insulin gene, and that BPA-induced insulinotropic effects depends on rapid K_{ATP} inhibition. These mechanisms are mediated by ER α and ER β extranuclear-initiated cascades respectively. The main goal of this project is to characterize how BPA chronic exposure could directly modulate the function of pancreatic β -cells and islets of Langerhans. To address this aim, we have established an *in vitro* long-lasting exposure model using dispersed β -cells and isolated islets of Langerhans, both maintained during 48 hours with BPA always present in the culture medium. We have used a multidisciplinary approach combining several experimental techniques: electrophysiological measurements (electrical activity, global currents and changes in membrane capacity), intracellular calcium recordings using fluorescent dyes, insulin secretion and mRNA expression levels using qPCR.

Our results demonstrate that BPA causes significant alterations in β -cell function. BPA at a dose as low as 1 nM promotes changes in the shape of glucose-induced action potentials, decreasing its amplitude and increasing its width.

Likewise, 1 nM BPA reduces calcium entry triggered by membrane depolarizations, both in response to glucose or non-metabolic stimuli. Nevertheless, a higher dose, 100 nM BPA, has no effect on our endpoint. Accordingly, we conclude that the relationship between BPA and its effects on calcium entry is non-monotonic. Nonmonotonicity is a common phenomenon in the field of EDCs. The exposure to 1 nM BPA alters in the same extent the exocytotic capacity and insulin secretion of pancreatic β -cells. Pharmacological dissection of macroscopic calcium current suggests that BPA-induced decrease on calcium influx is a consequence of R-type calcium current reduction. Using qPCR, we found that BPA reduces mRNA expression levels of R-type pore-forming subunit, and this transcriptional effect is produced by BPA at any tested doses, revealing a monotonic relationship at this regulation level. The effect of BPA on calcium entry is mimicked using a specific ER β agonist (DPN), and abolished in β -cells from ER β knockout mice. These findings suggest that the functional alterations promoted by low doses of BPA are mediated predominantly by ER β . Disagreement between BPA-induced effects on calcium entry and transcriptional regulation of R-type calcium channel suggests the participation of a counteracting mechanism regulated by higher BPA doses. We found that high BPA doses (≥ 100 nM) potentiate voltage-gated calcium entry in pancreatic β -cells through extranuclear ER α -mediated PI3K-dependent mechanism. We conclude that the NMDR relationship between BPA exposure and calcium entry seems to be the outcome of the opposite effects mediated by ER β and ER α on the processes regulating voltage-operated calcium currents in pancreatic β -cells.

INTRODUCCIÓN



1. EL PÁNCREAS. EL ISLOTE DE LANGERHANS.

El páncreas es un órgano glandular localizado en la cavidad retroperitoneal, que está constituido por dos partes claramente diferenciadas a nivel morfológico y funcional: las porciones exocrina y endocrina. El páncreas exocrino se constituye de tejido glandular acinar y racimoso, cuya función es la producción del jugo pancreático que es secretado en el duodeno, y que es fundamental para la digestión de los alimentos. Por otro lado, la porción endocrina del páncreas está constituida por unidades funcionales discretas de estructura claramente definida, los islotes de Langerhans. Los islotes de Langerhans son masas celulares de forma esférica distribuidas aleatoriamente entre el parénquima exocrino del páncreas, cuya función es la secreción al torrente circulatorio de las hormonas implicadas en la regulación de los valores plasmáticos de glucosa.

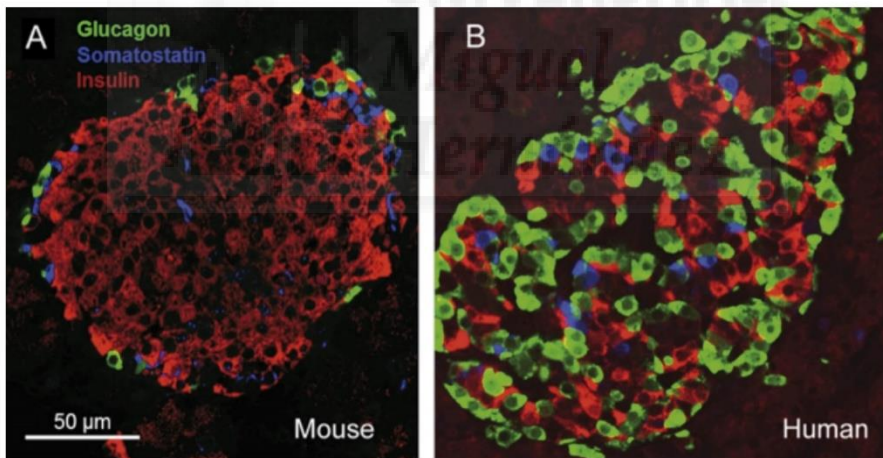


Figura 1. Comparación de la citoarquitectura del islote de Langerhans de ratón (A) o humano (B). Imágenes de inmunofluorescencia empleando un marcaje triple: anti-insulina (rojo), anti-glucagón (verde) y anti-somatostatina (azul), donde se observa con claridad la diferente estructuración de los tipos celulares dentro del islote: mientras que en el ratón aparece una masa central prominente de células β , en los islotes humanos la distribución es heterogénea formando un mosaico celular desordenado que es único de la especie humana. Modificada de Abdulreda *et al.*, CellR4 2013.

El islote de Langerhans está constituido por distintos tipos celulares, los cuales se clasifican en función de las hormonas que sintetizan y secretan. La célula β pancreática es la responsable de la síntesis y secreción de la hormona insulina, siendo el tipo celular mayoritario del islote de Langerhans. La célula α , productora de la hormona glucagón, es el segundo tipo celular más abundante del islote pancreático. Entre los tipos celulares menos abundantes se encuentra la célula δ , que sintetiza el polipéptido somatostatina, y la célula PP, que secreta el denominado polipéptido pancreático. Recientemente se ha descrito la aparición de otro tipo celular en los islotes humanos, la célula ϵ (Wierup *et al.*, 2002). Estas células aparecen aisladas y en número muy reducido en los islotes de adultos, pero constituyen una subpoblación prominente durante el desarrollo fetal del páncreas. Estas células ϵ expresan exclusivamente el polipéptido ghrelina. Los islotes pancreáticos son estructuras altamente vascularizadas y reciben una profusa inervación del sistema nervioso autónomo, simpático y parasimpático. Es importante señalar que la citoarquitectura de los islotes de Langerhans presenta variaciones importantes en función de la especie animal (figura 1). En los islotes humanos, las diferentes poblaciones celulares aparecen dispersas con una distribución totalmente heterogénea, donde las células β suponen en torno al 30-75% de la masa del islote, las células α constituyen del 10-65%, y la masa restante está constituida por los tipos celulares minoritarios, siendo las células δ las más abundantes dentro de éstos (Brissova *et al.*, 2005). En el caso del ratón, los islotes de Langerhans muestran una arquitectura muy característica, diferenciándose claramente una masa central homogénea de células β , rodeada por un manto periférico más o menos continuo donde se encuentran las otras poblaciones celulares del islote. Además de este cambio estructural, los islotes murinos presentan una contribución porcentual diferente de cada tipo celular, con una mayor proporción de células β (alrededor del 80%) (Brissova *et al.*, 2005). Estos cambios arquitectónicos podrían tener implicaciones de gran relevancia en la regulación paracrina y en el funcionamiento sincrónico del islote, ya que la cantidad de interacciones homotípicas (contacto entre células del mismo tipo) o heterotípicas (contacto entre células que no son del mismo tipo, por ejemplo el que se da entre una célula β y una célula α) entre los tipos celulares cambia sensiblemente: mientras que

el 71% de las células β en los islotes de ratón están en contacto directo con otras células β vecinas, este tipo de asociación β - β sólo se da en un 29% entre células β de islotes humanos (Brissova *et al.*, 2005; Cabrera *et al.*, 2006).

2. REGULACIÓN DE LOS NIVELES DE GLUCOSA EN SANGRE.

El funcionamiento apropiado del organismo requiere del mantenimiento de los valores sanguíneos de glucosa dentro de unos márgenes estrechos, que además deben ser regulados de forma eficaz y rápida, dependiendo de los desafíos homeostáticos que se presenten. El islote de Langerhans tiene un papel principal en la regulación de la glucemia, ya que las hormonas secretadas por sus subpoblaciones celulares son reguladores poderosos del metabolismo en los tejidos periféricos. Desde su descubrimiento en el año 1921, la insulina, sintetizada y liberada por las células β del islote, ha mantenido un protagonismo predominante como la hormona clave en la homeostasis glucídica. La insulina alcanzó este status preponderante al demostrarse que el hígado, el músculo y el tejido adiposo son tejidos diana sobre los que ejerce potentes efectos reguladores (figura 2), y que, además, la deficiente secreción o acción de la insulina tiene como consecuencia el desarrollo de hiperglucemia, que es el principal signo clínico de la diabetes. La insulina es una pequeña hormona proteica de estructura globular, que está constituida por dos cadenas polipeptídicas unidas mediante puentes disulfuro intercatenarios: cadena A (21 aa) y cadena B (30 aa). El estímulo principal para la secreción de insulina es la elevación de los valores plasmáticos de glucosa (figura 2). En el hígado, la insulina inhibe la producción hepática de glucosa (gluconeogénesis y glucogenólisis) al bloquear el factor de transcripción FOXO1 como consecuencia de la activación de la vía de la quinasa Akt, lo que supone un incremento en la acumulación de glucógeno en el hígado (Schwartz *et al.*, 2013). En el músculo, la insulina estimula la captación de glucosa desde el torrente circulatorio al promover una mayor translocación de transportadores de glucosa en la membrana celular, y estimular el metabolismo de la glucosa y su uso para la síntesis de glucógeno. Finalmente, en el

tejido adiposo la insulina tiene efectos lipogénicos y anti-lipolíticos; por un lado, promueve la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos, y también inhibe la lipólisis actuando sobre la lipasa termosensible (Chang *et al.*, 2004). Estos efectos dependientes de la acción de la insulina en los tejidos periféricos conducen a la restauración de los valores basales de glucosa en sangre (figura 2).

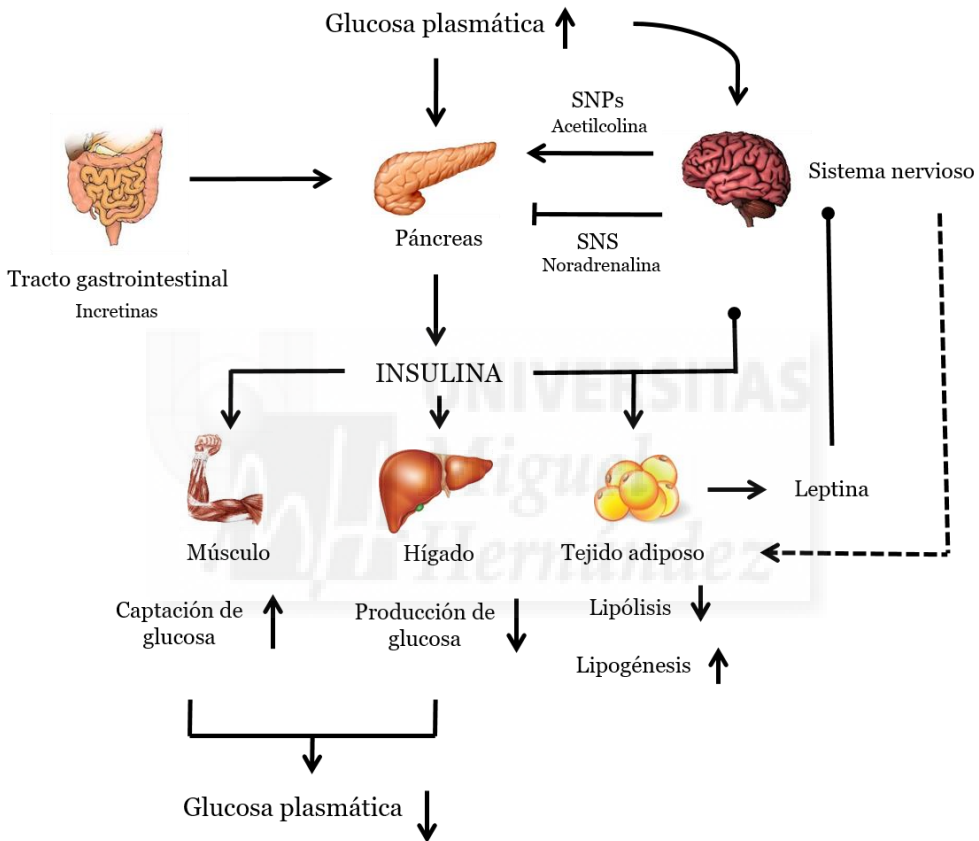


Figura 2. Representación esquemática de la homeostasis de la glucosa. En la figura se representan las acciones homeostáticas llevadas a cabo para controlar la glucemia, centrándonos principalmente en la acción de la insulina.

A pesar del papel clave de la insulina, y tras casi 100 años de intensa investigación centrada en su papel fisiológico, hoy sabemos que forma parte de un

complejo sistema de regulación. El islote de Langerhans secreta otra hormona que tiene una implicación profunda, aunque más desconocida, en la regulación de la glucemia: el glucagón. El glucagón es secretado por las células α y lleva a cabo acciones opuestas a la insulina. El glucagón es liberado a la sangre cuando los niveles plasmáticos de glucosa son bajos, y señala para preservar la glucemia en unos valores adecuados evitando así la hipoglucemia. A nivel periférico, el glucagón estimula la producción hepática de glucosa (glucogenólisis y gluconeogénesis), ya que el hígado es la fuente principal de glucosa en situación de ayuno. Finalmente, en el tejido adiposo promueve el catabolismo en adipocitos, estimulando la β -oxidación de ácidos grasos y la hidrólisis de triglicéridos (lipólisis) (Longuet *et al.*, 2008). Investigaciones recientes demuestran que la desregulación de los valores sanguíneos de glucagón aparece en los estados prediabéticos (hipoglucagonemia) (Merino *et al.*, 2015) y diabéticos (hiperglucagonemia), y que probablemente esta alteración intervenga de algún modo en el desarrollo de la patología diabética (Lee *et al.*, 2016).

La secreción hormonal del islote pancreático se encuentra ampliamente regulada. En cuanto a las relaciones paracrinas que se establecen entre los tipos celulares del islote, se ha descrito un efecto inhibitorio de la insulina sobre la secreción de glucagón, un efecto estimulador del glucagón sobre la liberación de insulina, en tanto que la somatostatina tendría un efecto inhibitorio en la secreción de ambas hormonas (Gromada *et al.*, 2007). Es bien conocido que el sistema nervioso, tanto a nivel central como periférico, es responsable de diferentes procesos glucorregulatorios. Está ampliamente demostrado que el islote pancreático recibe abundante inervación del sistema nervioso autónomo: la estimulación de la rama parasimpática tiene un efecto neto positivo sobre la secreción de insulina, debido en gran parte a la activación de receptores muscarínicos por la acetilcolina, mientras que la estimulación simpática conllevaría un bloqueo de la secreción de insulina como consecuencia de la descarga de catecolaminas por parte de los terminales nerviosos (Rodríguez-Díaz & Caicedo, 2013). Alternativamente, hay evidencias suficientes para aceptar que el cerebro participa de la regulación de la glucemia,

aunque todavía se discute su jerarquía en el sistema homeostático. Algunos investigadores dividen el protagonismo entre el islote y el cerebro, ambos trabajando en un sistema cooperativo y redundante, de tal modo que las deficiencias de uno podrían ser compensadas, al menos en parte, por las adaptaciones funcionales del otro. En la regulación cefálica de los niveles de glucosa intervendrían mecanismos diversos, algunos de los cuales son dependientes de la señalización de insulina en el cerebro, mientras que otros, de los que poco se conoce aún, actuarían de forma directa e independiente de la insulina (Schwartz *et al.*, 2013).

Desde su descubrimiento en 1994, la leptina, una hormona peptídica producida por los adipocitos, ha ido ganando protagonismo en la regulación de la homeostasis de la glucosa. Hay estudios demuestran que aumenta la sensibilidad hepática a insulina, inhibe la producción de glucosa en el hígado y aumenta su captación por los tejidos diana (Fernandez-Formoso *et al.*, 2015). Se ha demostrado que la administración intracerebroventricular de leptina normaliza la hiperglucemia en ratas con una insuficiencia severa de insulina (inducida por estreptozotocina). Este mecanismo regulador no es mediado por una acción periférica de la leptina, y es independiente de la ingesta y de la recuperación de la capacidad secretora de las células β (German *et al.*, 2011). Adicionalmente, la leptina regularía la secreción hormonal del islote a través de una acción directa (Marroqui *et al.*, 2012) e indirecta (Fernandez-Formoso *et al.*, 2015), aumentando la secreción de glucagón e inhibiendo la de insulina. A pesar de todos estos novedosos resultados, es muy importante señalar que la producción de leptina está íntimamente vinculada con la insulina, y una deficiencia severa de insulina se traduce en una severa insuficiencia de leptina, ya que la insulina es también una señal homeostática necesaria para el funcionamiento apropiado de múltiples órganos, entre ellos el tejido adiposo. Por lo tanto, se podría entender también que la leptina es una hormona reguladora subordinada a la acción de la insulina (Schwartz *et al.*, 2013).

3. DISFUNCIÓN EN LA REGULACIÓN DE LA GLUCEMIA: DIABETES MELLITUS.

La incapacidad del organismo para mantener estable la glucemia dentro de un estrecho intervalo conlleva el desarrollo de desórdenes metabólicos, de entre los cuales la diabetes mellitus es el más común. La diabetes mellitus es una enfermedad crónica cuyo signo clínico más característico es la presencia persistente de valores anormalmente altos de glucosa en sangre (hiperglucemia crónica). Esta desregulación de la glucemia puede ser consecuencia de una insuficiente producción de insulina en el páncreas, de una señalización ineficaz de la insulina en los tejidos periféricos, o deberse a ambas. En la diabetes no controlada, la hiperglucemia crónica tendrá efectos glucotóxicos sobre múltiples tejidos corporales, siendo especialmente vulnerables los tejidos nervioso y vascular, lo que conlleva el desarrollo de complicaciones agudas (retinopatía, nefropatía, neuropatías, etc.) que pueden tener un desenlace fatal.

En función de su etiología, la patología diabética se ha clasificado en cuatro subtipos diferentes: diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, diabetes gestacional y diabetes tipo MODY (del inglés *Maturity Onset Diabetes of the Young*). La diabetes tipo 1 se caracteriza por una producción deficiente de insulina debido a la destrucción autoinmune particular de la célula β (Eizirik *et al.*, 2009), y su sintomatología suele debutar a edades tempranas. El caso de la diabetes tipo 2 es más complejo; las alteraciones tienen un origen multifactorial, donde se combina el desarrollo de resistencia periférica a la acción de la insulina y una disfunción progresiva de los islotes pancreáticos para producirla.

Durante las últimas décadas, la diabetes se ha convertido en una pandemia global, siendo uno de los principales problemas de salud pública a escala mundial. Según datos recientes de la OMS, en el año 2014, 422 millones de personas en el mundo padecían diabetes, lo que supone un 8.5% de la población adulta mundial (mayores de 18 años). Así mismo, en el año 2012, la diabetes fue la causa directa de

1.5 millones de muertes en el mundo, y las complicaciones secundarias asociadas a altos valores de glucosa en sangre causaron otros 2.2 millones de fallecimientos. El incremento de la prevalencia de esta enfermedad se ha disparado en las últimas décadas, y el porcentaje de población afectada se ha duplicado desde 1980 (entonces era del 4.7%). Además, el incremento anual de nuevos casos se ha acelerado de forma imparable durante los últimos años, y las estadísticas actuales superan o igualan las estimaciones de población afectada para el año 2030 (Wild *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2011).

Como ya fue mencionado, la pérdida de sensibilidad a la acción de la insulina en los tejidos diana es un trastorno asociado al desarrollo de la diabetes. Esta resistencia a la insulina aparece también en la obesidad, por lo que se la considera, junto con el sobrepeso, un factor de riesgo para el desarrollo de diabetes. Sin embargo, en condiciones fisiológicas, las células β del islote son capaces de llevar a cabo procesos compensatorios, tanto funcionales como estructurales (por ejemplo, aumento de su masa), a fin de aumentar la disponibilidad de insulina, de tal modo que la baja efectividad de la hormona queda contrarrestada y la glucemia permanece estable. Por lo tanto, la diabetes tipo 2 se desarrollará cuando las capacidades compensatorias de la célula β ya no sean suficientes para contrarrestar el estado de resistencia, dando lugar, por lo tanto, a hiperglucemia (Kahn *et al.*, 2006). En un estado saludable, la habilidad de la célula β para adaptarse a las fluctuaciones en la sensibilidad a insulina de los tejidos diana depende de dos parámetros: regulación de la respuesta funcional (adaptando la biosíntesis y/o secreción de insulina), y un incremento de la masa de célula β (adaptación estructural). En los individuos diabéticos se observa una disfunción progresiva de la célula β , que presenta una severa reducción de su capacidad para liberar insulina en respuesta a glucosa u otros secretagogos, y una manifiesta reducción de la masa de célula β (figura 3) (Cnop *et al.*, 2005).

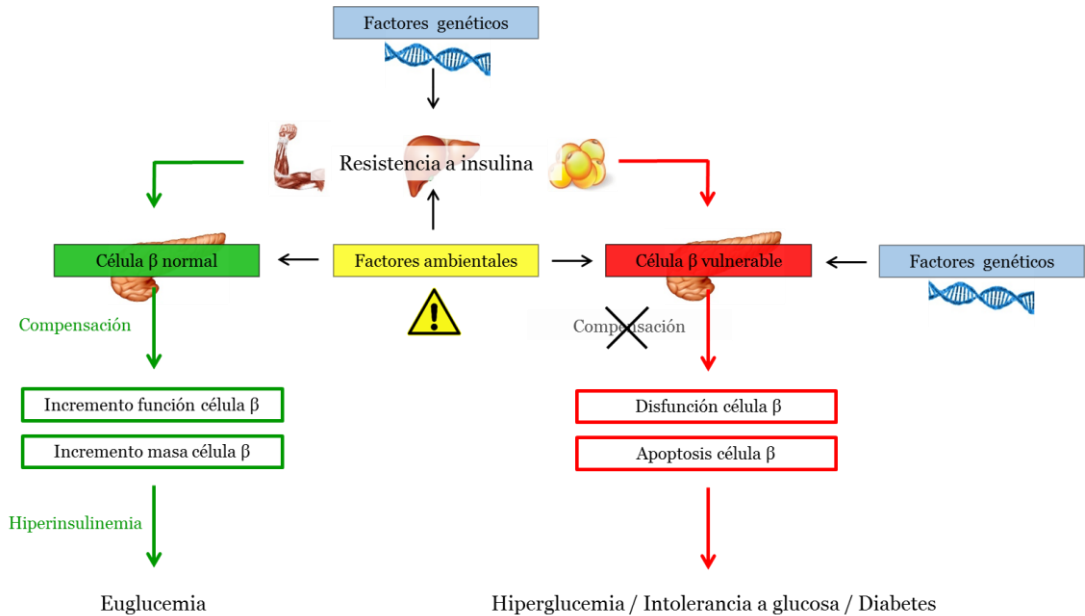


Figura 3. Representación esquemática de los cambios que se producen en individuos con capacidad o no de contrarrestar la insulino-resistencia. En la figura se ponen de manifiesto las interacciones entre genes y ambiente para el desarrollo de desórdenes en la homeostasis de la glucosa. Modificado de Kahn *et al.*, 2006.

La mayor parte de los casos de diabetes tipo 2 son el resultado de la interacción entre los genes y el ambiente (figura 3). De tal modo que determinados factores ambientales nocivos convierten en patológica una cierta predisposición genética, aumentando así la propensión a sufrir diabetes y otros desórdenes metabólicos. Muchos de estos factores ambientales están relacionados con el estilo de vida en las sociedades actuales, por ejemplo, una alimentación poco saludable (ingesta calórica y consumo excesivo de grasas) y la falta de actividad física (sedentarismo) (Kahn *et al.*, 2006). Desde un punto de vista más amplio, puede ser considerado un factor de riesgo para el desarrollo de la diabetes, cualquier factor que actúe alterando la funcionalidad de la célula β o la sensibilidad a insulina, ya que está generando una susceptibilidad que puede ser determinante para el desarrollo futuro de la diabetes.

4. DISRUPTORES ENDOCRINOS Y DIABETES MELLITUS.

Durante la última década, multitud de trabajos de investigación, rigurosos e independientes, han demostrado una estrecha correlación entre la exposición a compuestos químicos medioambientales y el desarrollo de ciertas patologías, que afectan especialmente a la función endocrina de humanos y otros animales. Según la definición, “un disruptor endocrino o EDC (del inglés *environmental Endocrine-Disrupting Chemical*) es un compuesto químico exógeno, o una mezcla de éstos, que interfiere con las acción de las hormonas (Zoeller *et al.*, 2012). Entre los EDCs más estudiados encontramos compuestos químicos utilizados extensivamente en la producción de plásticos, como el bisfenol A (BPA) y los ftalatos (como el DEHP); los PCBs (como por ejemplo las dioxinas); los biocidas, como la atrazina (herbicida) y los insecticidas DDT, DDE, lindano, etc.

El ejemplo paradigmático de disrupción endocrina con consecuencias dramáticas para la salud es el caso del *diethylstilbestrol* (DES). El DES es un estrógeno sintético no esteroideo, que fue prescrito a mujeres embarazadas en los años 50 y hasta 1975 para prevenir los abortos y otras posibles complicaciones gestacionales. Un elevado porcentaje de las hijas que sufrieron una exposición intrauterina a DES desarrollaron adenocarcinoma vaginal de inicio temprano (con una probabilidad cuarenta veces mayor que las hijas de embarazos sin tratamiento con DES) (Herbst *et al.*, 1971). Esto demostró que las consecuencias de la exposición a disruptores endocrinos pueden ser multigeneracionales. Paulatinamente se demostró que los descendientes de ambos sexos (especialmente las mujeres) nacidos de estos embarazos sufrían, con una incidencia significativamente incrementada, numerosos desórdenes reproductivos, ciertos cánceres, criptorquidia, y otras enfermedades (Paulose *et al.*, 2015).

4.1. El bisfenol A (BPA).

El bisfenol A (BPA) es el componente principal empleado en la polimerización del plástico de policarbonato (PC) y en la síntesis de resinas epoxi, y es utilizado también como aditivo en la fabricación de otros muchos tipos de plásticos (figura 4). El BPA fue sintetizado por primera vez en el año 1891, y su actividad como modulador estrogénico fue descrita por Dodds y Lawson en 1936 (Dodds & Lawson, 1936). Debido a su bajo coste de producción y a sus ventajosas propiedades físicas (fácil de moldear, transparencia, alta resistencia frente a la deformación, buena estabilidad dimensional, apto como aislamiento eléctrico, etc.), el PC se ha utilizado extensivamente en multitud de aplicaciones comerciales desde su descubrimiento en 1953.

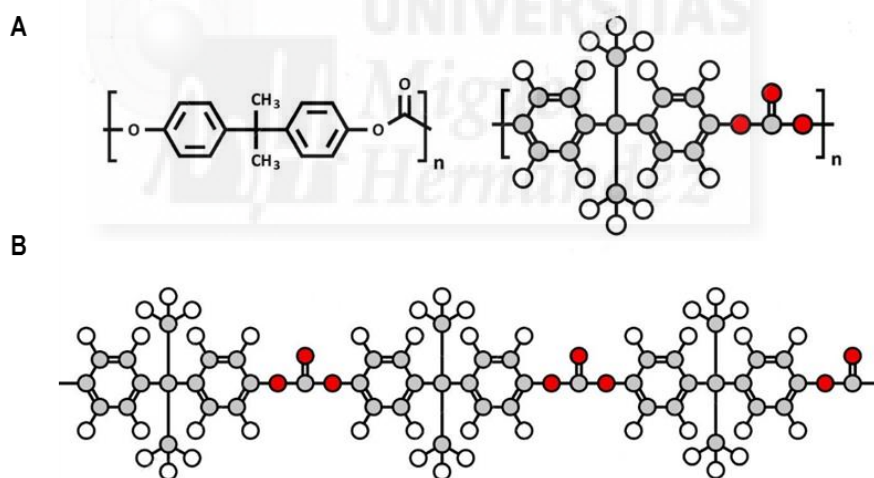


Figura 4. Bisfenol A (BPA). (A) Composición y estructura química del BPA. (B) Estructura del policarbonato (PC) formado por la polimerización de BPA.

Podemos encontrar el plástico de PC en un gran número de productos cotidianos: juguetes infantiles, componentes eléctricos, componentes de automóviles, electrodomésticos y aparatos electrónicos, sistemas de almacenamiento óptico de

información digital (CD-ROM, DVD), etc. El BPA se usa también en la fabricación de envases y embalajes para productos de consumo, y es muy habitual el uso de resinas de epoxi para recubrir el interior de latas de alimentos y bebidas (por ejemplo, latas de refrescos, conservas y precocinados). En el año 2013, la producción global de BPA se acercó a las 7 millones de toneladas, siendo el producto químico industrial más sintetizado a escala global (vom Saal *et al.*, 2014). La presencia de BPA en recipientes que están en contacto con productos de consumo hace posible una vía oral de contaminación: aunque el polímero es biológicamente inerte, el BPA libre puede ser transferido a los alimentos y bebidas (también al medioambiente) al hidrolizarse de la estructura del policarbonato; esta despolimerización es más probable cuando los plásticos son sometidos a altas temperaturas, o al exponerse a sustancias con pH ácido o básico. La exposición real a BPA es generalizada, como lo demuestra el hecho de que este compuesto químico industrial haya sido detectado en la orina de casi el 93% de los ciudadanos estadounidenses (Calafat *et al.*, 2008). Tras su ingestión, el BPA es rápidamente metabolizado a formas sin actividad biológica (BPA-conjugado), teniendo una vida media de aproximadamente 4 – 5 horas en adultos sanos. Cuando el BPA es absorbido por el tracto gastrointestinal, se conjuga con ácido glucurónico en el hígado, siendo este el primer paso en su metabolización; a continuación es rápidamente eliminado de la sangre y excretado en la orina. Según algunos trabajos, la eliminación del BPA sería prácticamente completa después de 24 horas tras la exposición (Volkel *et al.*, 2002). El BPA-glucurónico es el principal metabolito del BPA en ratones; otros metabolitos descritos en la literatura se forman preferencialmente cuando se aplican dosis más altas de BPA, probablemente debido a la saturación de la vía de glucuronidación. Sin embargo, esta metabolización y excreción del BPA no tiene una eficacia absoluta, y se detecta BPA libre con regularidad en muestras de orina y sangre en estudios de biomonitorización. La mayoría de estos estudios sugieren que la concentración sérica promedio de BPA se encuentra en el rango de 1 – 3 ng/ml (4 – 13 nM) en humanos, es decir, este sería el nivel medio de exposición interna debido a la contaminación a través de diferentes vías (oral, transdérmica, etc.) (Vandenberg *et al.*, 2010). A día de hoy, la EPA (*US Environmental Protection Agency*) establece

que son seguros los niveles diarios de exposición a BPA por debajo de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$; sin embargo, la autoridad homóloga en Europa (la EFSA, *European Food Safety Authority*) ha modificado recientemente sus recomendaciones, estableciendo el límite tolerable de exposición en 4 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ (Gore *et al.*, 2015).

El establecimiento de los límites tolerables de exposición diaria a BPA, y muchos otros disruptores endocrinos, sigue siendo un tema controvertido. En el caso del BPA, el límite tolerable establecido de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ es mil veces menor que la dosis más baja que provoca efectos adversos en animales de laboratorio (50 $\text{mg}/\text{kg}/\text{día}$) (Vandenberg *et al.*, 2012). Sin embargo, numerosos estudios documentan que los EDCs (incluido el BPA) pueden actuar a dosis bajas (en el rango nanomolar, e incluso picomolar). El panel de expertos del *National Toxicology Program* (dependiente de la EPA) ha definido que un efecto a dosis bajas de un EDC es cualquier cambio biológico que, o bien ocurre en el rango de exposición que es habitual para humanos, o que sucede a dosis que están por debajo de las que son tradicionalmente utilizadas en los test toxicológicos clásicos. En el año 2006, vom Saal & Welshons al revisar la literatura sobre los efectos a dosis bajas de BPA, identificaron 109 estudios que encontraron efectos significativos de dosis bajas de BPA en modelos animales, donde las alteraciones se observaban con concentraciones sanguíneas de BPA en estos animales que son similares, o incluso están por debajo, a los niveles detectados rutinariamente en humanos. Además, en 40 de esos estudios se describieron cambios significativos con niveles de BPA por debajo de la dosis de referencia de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ (vom Saal & Welshons, 2006). Estudios farmacocinéticos más recientes han estimado que exposiciones de 400 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ producirían una concentración de BPA libre en plasma en el rango promedio que se encuentra en humanos (Vandenberg *et al.*, 2007). En 1997, por primera vez, se describió el efecto de la exposición a dosis bajas de BPA sobre el desarrollo fetal o perinatal; en este estudio, se administraban dosis de 2 o 20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ por vía oral a ratones gestantes, y se comprobó que el peso de la próstata se incrementaba significativamente en los ratones macho adultos que habían sido expuestos en su etapa fetal (Nagel *et al.*, 1997). Así mismo, numerosos estudios epidemiológicos han establecido que la exposición a dosis medioambientales de

estos compuestos tiene una fuerte asociación con el desarrollo de ciertas enfermedades (diabetes, obesidad, cáncer, enfermedades cardiovasculares, desórdenes del desarrollo y la función sexual, etc.) (Dickerson *et al.*, 2007; Lang *et al.*, 2008; Trasande *et al.*, 2012; Ranciere *et al.*, 2015). Las evidencias científicas acumuladas en la última década sobre el impacto negativo que la exposición a EDCs tiene, o podría tener en el futuro, sobre la salud exigen que deban ser consideradas para el establecimiento de las normativas de salud pública y medioambiental. Además, la aplicación del principio de precaución debería ser prioritaria cuando se discuten las directrices para la protección de períodos de la vida que son particularmente sensibles a cualquier perturbación de su fisiología, por ejemplo el desarrollo fetal o perinatal, y la adolescencia (vom Saal *et al.*, 1997; Garcia-Arevalo *et al.* 2014; Garcia-Arevalo *et al.* 2016).

Numerosos trabajos de investigación han descrito que el comportamiento de la mayoría de EDCs se ajusta a curvas dosis-respuesta no monotónicas (vom Saal *et al.*, 1997; Welshons *et al.*, 1999). Por definición, una curva no monotónica es aquella en la que el valor de su pendiente fluctúa de negativo a positivo, o viceversa, al menos una vez en el rango de dosis examinado (figura 5). A día de hoy, la existencia de nomonotonidad en los efectos provocados por EDCs es difícilmente discutible, ya que existen multitud de publicaciones en las que se observa este fenómeno. Sin embargo, su existencia no se ha considerado en el diseño de los test toxicológicos clásicos de los ensayos de riesgo. La nomonotonidad en la respuesta de un EDC supone que puede tener efectos a dosis bajas que no aparecen cuando las dosis de exposición aumentan. Conceptualmente, por lo tanto, la nomonotonidad de los EDCs supone un reto para los conceptos toxicológicos clásicos, en particular el dogma “todo es veneno, nada es sin veneno: solo la dosis hace el veneno”, que debemos interpretar como que cualquier sustancia a dosis lo suficientemente altas provoca efectos perjudiciales en las células de forma inespecífica (Nadal *et al.*, 2017).

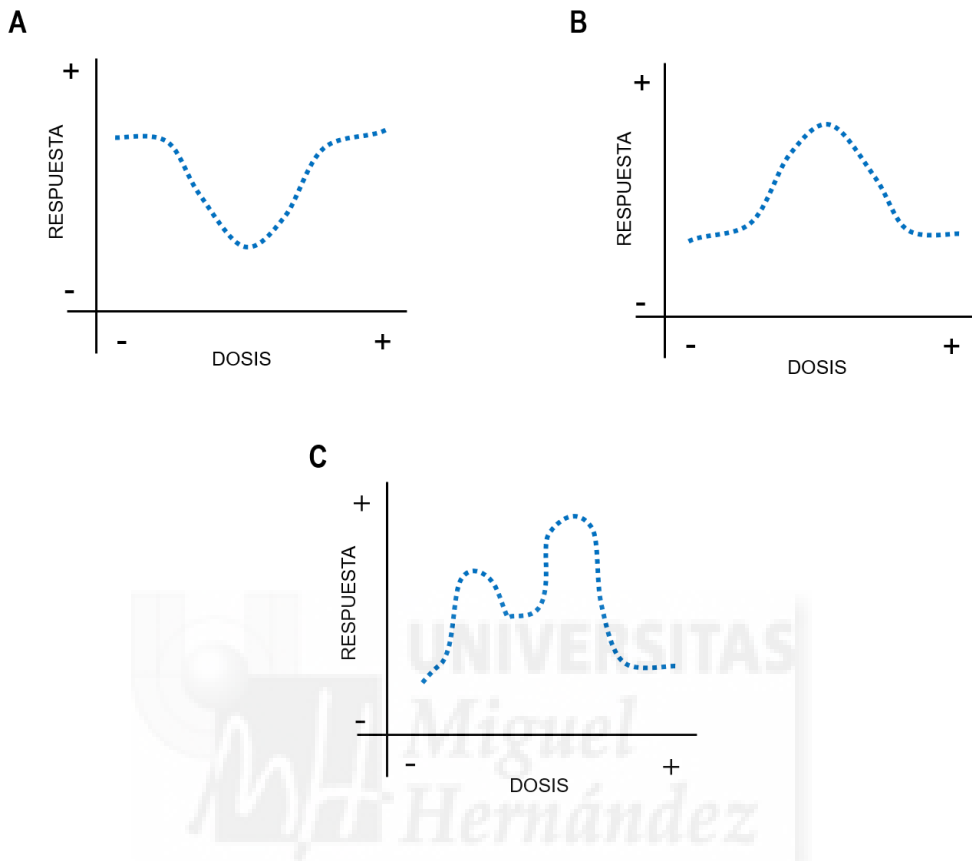


Figura 5. Ejemplos de curvas dosis-respuesta no monotónicas. Se muestran tres tipos distintos: (A) con forma de U, (B) con forma de U-invertida, y (C) una curva multifásica. Modificado de Vandenberg *et al.* 2012.

Una de las limitaciones más importantes con la que nos encontramos es el desconocimiento de los mecanismos moleculares que subyacen al fenómeno de la nomonotonicidad de los EDCs. A día de hoy, una vez descrita inequívocamente la existencia de este fenómeno, se está trabajando intensamente en el descubrimiento de los mecanismos particulares que lo hacen posible. En el caso del BPA, sus efectos en diversos tipos celulares y tejidos son consecuencia de sus acciones tras unirse a los receptores de estrógenos (ERs), ER α y ER β . Tradicionalmente, el BPA ha sido considerado un estrógeno débil. Esto se debe a que la afinidad del BPA por los ERs

es entre 1000 – 10000 veces menor que la de 17 β -estradiol (Kuiper *et al.*, 1997; Kuiper *et al.*, 1998); además, el BPA ha demostrado ser menos eficiente en la activación de la transcripción de genes que contienen EREs (donde se unen ER α y ER β actuando como factores de transcripción) (Matthews *et al.*, 2001). Sin embargo, hay numerosos ejemplos en la literatura que encuentran alteraciones significativas, tanto en estudios *in vivo* como *in vitro*, provocadas por la exposición a dosis bajas de BPA (vom Saal & Hughes, 2005). Por ejemplo, en la célula β pancreática, la exposición a 1 nM BPA aumenta la expresión de insulina y tiene un efecto rápido aumentando su secreción (Alonso-Magdalena *et al.* 2008; Soriano *et al.*, 2012). Por lo tanto, el BPA debe ser capaz de regular otras vías de señalización en la célula. ER α y ER β en el núcleo pueden regular la transcripción de genes de un modo no-clásico al anclarse a otros factores de transcripción, como AP-1 y Sp1 (Safe & Kim, 2008). Además, ER α y ER β también se encuentran en el citosol, desde donde inician cascadas de señalización que producen efectos rápidos en las células (Razandi *et al.*, 1999). La señalización extranuclear de ERs implica multitud de vías celulares. Se ha descrito que tanto ER α (Simoncini *et al.*, 2000; Alonso-Magdalena *et al.*, 2008) como ER β (Soriano *et al.*, 2009) pueden interactuar con quinasas (PI3K, MAPK, etc.) y otras proteínas (receptor GC-A) para activar cascadas de señalización y aumentar la producción de segundos mensajeros. En la célula β pancreática, una dosis baja de BPA (1 nM) provoca un incremento de las señales de Ca²⁺ a través de un mecanismo rápido, extranuclear y no genómico (Nadal *et al.*, 2000). Por otro lado, la exposición a BPA, tanto *in vivo* (Alonso-Magdalena *et al.*, 2006) como *in vitro* (Alonso-Magdalena *et al.*, 2008), regula el contenido de insulina en los islotes de Langerhans, a través de un mecanismo que implica el incremento de la expresión del gen de la insulina como consecuencia de la activación de la vía de señalización de ERK1/2 por ER α localizado en el citosol (Alonso-Magdalena *et al.*, 2008; Wong *et al.*, 2010).

5. LA CÉLULA β PANCREÁTICA Y SU FUNCIONAMIENTO.

La célula β pancreática, responsable de la secreción de insulina, es eléctricamente excitable. Este hecho fue descrito por primera vez en 1968 por Dean y Matthews, que registraron la actividad eléctrica de células pancreáticas en islotes intactos de ratón (Dean & Matthews, 1968). La glucosa es el principal estímulo que promueve la actividad de la célula β . A concentraciones bajas de glucosa (< 5 mM), la célula β está inactiva y la secreción de insulina es baja. En esta situación el potencial de membrana de la célula β permanece estable en valores negativos (≈ -70 mV). Al incrementarse la concentración de glucosa, se produce una progresiva y lenta despolarización desde el potencial de reposo. Cuando se alcanza un determinado valor umbral del potencial de membrana (de -55 mV a -50 mV), la célula β comienza a disparar potenciales de acción (figura 6).

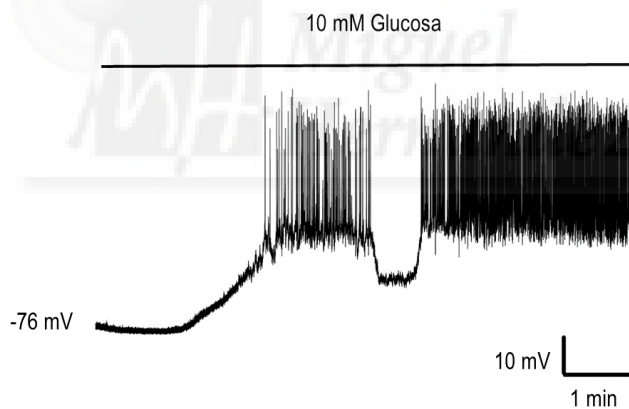


Figura 6. Patrón típico de actividad eléctrica en célula β pancreática. Se muestra la actividad representativa de célula β en islote intacto al ser estimulada con 10 mM glucosa en la solución extracelular. El registro del potencial de membrana se realizó mediante la técnica de patch-clamp en configuración de parche-perforado. Registro cedido por Dr. S. Soriano.

La actividad eléctrica de la célula β exhibe un patrón oscilatorio característico, de 6 mM a 17 mM glucosa, que consiste en ráfagas de potenciales de acción superpuestas sobre mesetas despolarizadas, las cuales aparecen separadas por intervalos eléctricamente silentes (repolarización) (Rorsman *et al.*, 2000; Rorsman *et al.*, 2012). La amplitud del pico de los potenciales de acción se encuentra normalmente próximo a los 0 mV, sin que esta magnitud se vea afectada claramente por la concentración de glucosa. En cambio, la glucosa sí provoca un cambio dependiente de la concentración en la frecuencia oscilatoria, de tal modo que un aumento de la glucosa extracelular se traduce en un incremento de la presencia de fases activas en la célula β (Rorsman *et al.*, 2012).

La utilización de la técnica de *patch-clamp*, desarrollada por E. Neher y B. Sackmann a finales de los años 70 (Neher & Sackmann, 1976), supuso un hito que permitió demostrar la existencia de canales iónicos en las células, y caracterizar qué flujos iónicos están implicados en la generación de los potenciales de acción. En el caso de la célula β , la intensa labor de investigación que se llevó a cabo durante la década de 1980, permitió desarrollar un modelo eléctrico para la interacción estímulo – secreción, que goza de una amplia aceptación. El conocimiento desarrollado durante los últimos 30 años ha ido sumando información detallada hasta la consecución de un sistema de gran complejidad del que todavía queda por descubrir. En el modelo murino, cuando la concentración de glucosa en el medio extracelular y el ratio ATP/ADP son bajos, el canal K^+ sensible a ATP (K_{ATP}) está abierto. En esta situación, hay un flujo catiónico (K^+) de salida constante a través de K_{ATP} que es responsable del potencial negativo en reposo de la célula β . Cuando la concentración de glucosa se eleva, ésta es transportada rápidamente al interior celular a través del transportador GLUT2. La metabolización de la glucosa supone un incremento de la razón ATP/ADP, que provoca la reducción dependiente de ATP de la actividad de K_{ATP} . El cese del flujo de salida de K^+ se traduce en una despolarización progresiva de la membrana, la apertura de canales de

Ca^{2+} dependientes de voltaje (Ca_v) tras superar su umbral de activación, la elevación subsecuente de la concentración intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) y, finalmente, la exocitosis dependiente de Ca^{2+} de los gránulos de insulina (Rorsman *et al.*, 2012; Rorsman *et al.*, 2011). El acoplamiento eléctrico entre las células β hace que las oscilaciones en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aparezcan sincronizadas en todo el islote (Zhang *et al.*, 2008). Esta descripción simplificada del modelo de acoplamiento estímulo-secreción en las células β de ratón es aplicable también en el caso de humanos, aunque la identidad y contribución particular de los canales iónicos implicados no es idéntica. Una particularidad destacada es que el grado de sincronización entre células β de islotes humanos es significativamente menor; como ya se mencionó, esto puede ser debido a su organización citoarquitectónica heterogénea que impide la continuidad eléctrica que sí aparece en los islotes de ratón y rata (Cabrera *et al.*, 2006). En los siguientes apartados se llevará a cabo una descripción de las corrientes y canales iónicos implicados en la generación de la actividad eléctrica de las células β de ratón, ya que es el modelo experimental utilizado en el presente trabajo.

5.1. El canal de K^+ sensible a ATP (KATP).

El canal K_{ATP} está constituido por la combinación de dos proteínas: Kir6.x y SUR (acrónimo del inglés, *Sulphonylurea Receptor*), ésta última pertenece a la familia de proteínas ABC (*ATP-binding cassette*). En el genoma de vertebrados aparecen dos genes que codifican proteínas de la familia Kir, *KCNJ8* (Kir6.1) y *KCNJ11* (Kir6.2), y dos genes SUR, *ABCC8* (SUR1) y *ABCC9* (SUR2). En las células del islote pancreático el canal está formado por la combinación de Kir6.2 y SUR1. Estudios biofísicos y bioquímicos demuestran que el K_{ATP} consiste en cuatro subunidades Kir6.2 que forman el poro del canal, y cuatro subunidades reguladoras SUR1, cada una de las cuales está íntimamente asociada a una subunidad Kir6.2 (figura 7) (Shyng & Nichols, 1997).

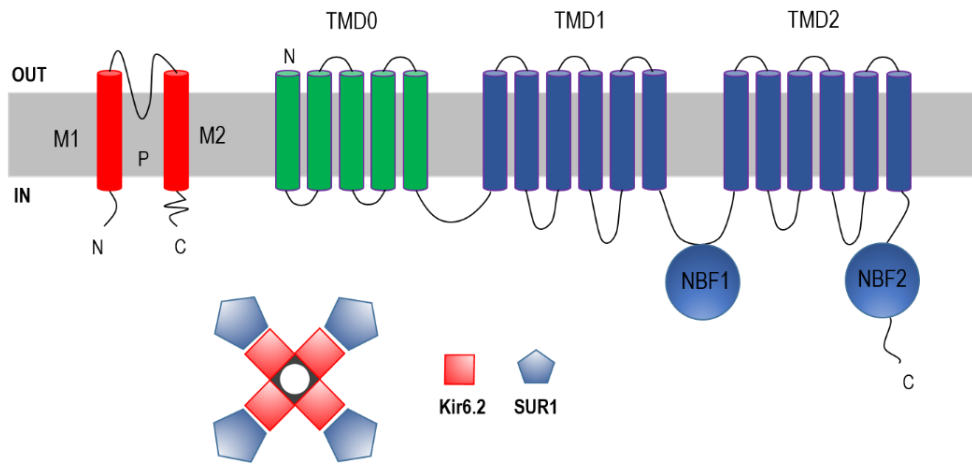


Figura 7. Organización estructural de K_{ATP} . (A) Topología de las subunidades que constituyen el canal K_{ATP} , Kir 6.2 y SUR1. Se indican los distintos dominios transmembrana de ambas subunidades. (B) Proyección de planta de la organización que adquieren las distintas subunidades formadoras del canal en torno al poro de permeación.

El K_{ATP} es la interfaz que comunica el metabolismo celular con la excitabilidad eléctrica de la célula β pancreática. La característica más definitoria de este canal es su inhibición por el ATP intracelular, que se liga a la subunidad Kir6.2 provocando su cierre. Por el contrario, los Mg-nucleótidos (Mg-ADP y Mg-ATP) estimulan la apertura del canal al asociarse con la subunidad SUR1. Otros compuestos también regulan la actividad del canal al interactuar con la subunidad reguladora SUR1: algunos, como el diazóxido, actúan abriendo el canal, mientras que otros, como las sulfonilureas tolbutamida y glibenclamida, provocan el cierre del K_{ATP} . La apertura/cierre (*gating*) de K_{ATP} es independiente tanto del voltaje como del tiempo. En la célula β , el canal K_{ATP} es esencial en el acoplamiento estímulo-secreción, de tal modo que, cuando la concentración de glucosa no es estimuladora, el ratio ATP/ADP es lo suficientemente bajo para permitir un robusto flujo de salida (de K^+) que mantiene la membrana hiperpolarizada y, por la tanto, la célula β permanece silente. Cuando la concentración de ATP aumenta debido al metabolismo de la glucosa, el K_{ATP} se cierra, lo que supone la despolarización de la membrana que, si

supera el umbral de activación requerido, provoca el inicio de una actividad eléctrica regenerativa en la célula β y la consecuente secreción pulsátil de insulina (Rorsman *et al.*, 2000; Ashcroft & Rorsman, 2013). La actividad de K_{ATP} puede ser regulada además por otros compuestos, como los estrógenos, a través de vías rápidas de señalización extranucleares. Trabajos realizados en células β de ratón muestran que dosis bajas de 17β -estradiol (100 pM-1 nM) reducen la actividad del canal K_{ATP} a través de un mecanismo dependiente de glucosa que implica la producción de cGMP (Soriano *et al.*, 2009). Soriano *et al.* demostraron que $ER\beta$ está implicado en la inhibición rápida que concentraciones fisiológicas de 17β -estradiol ejercen sobre la actividad de K_{ATP} ; este efecto está mediado por la activación del receptor de membrana GC-A (guanilato ciclasa-A) tras su interacción con $ER\beta$ (ligado a 17β -estradiol), y la producción del segundo mensajero cGMP, que a su vez actúa activando la vía de la quinasa PKG. Como consecuencia de la activación de esta ruta de señalización, la actividad de K_{ATP} se reduce, potenciando la entrada de Ca^{2+} y la secreción de insulina (Soriano *et al.*, 2009). Por lo tanto, la activación de $ER\beta$ regula el acoplamiento estímulo-secreción en célula β y provoca una acción insulínica rápida. Posteriormente, se ha demostrado que una dosis baja de BPA (1 nM) tiene igualmente un efecto insulínico rápido en células β humanas y de ratón, y que este efecto está relacionado con la disminución de la actividad del canal K_{ATP} (Soriano *et al.*, 2012).

La cinética de apertura y cierre de K_{ATP} es esencial para explicar el mecanismo de la actividad eléctrica producida por glucosa. Los modelos más aceptados asumen la existencia de una regulación rápida, implicada en el disparo de espigas dentro de la ráfaga, y otra regulación lenta, relacionada con los períodos sin actividad entre ráfagas, del *gating* de K_{ATP} , las cuales serían responsables del característico patrón de disparo de la célula β . En un intervalo de concentración de glucosa entre 6 y 20 mM, la célula β presenta una actividad eléctrica que consiste en ráfagas de potenciales de acción que se disparan sobre una meseta despolarizada, y que aparecen separadas por intervalos silentes tras la repolarización momentánea del

potencial de membrana. Todavía a día de hoy se desconoce el mecanismo electrofisiológico que origina esta actividad oscilatoria, pero es muy probable que la actividad del K_{ATP} participe en su génesis. Según el modelo vigente en la actualidad, ésta es la secuencia de eventos implicados en la generación del patrón oscilatorio: la activación gradual de una corriente de salida a través de canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} (K_{slow}) y la reapertura de K_{ATP} tienen una participación equitativa en el cese de las ráfagas de potenciales de acción. K_{slow} se activa como consecuencia del incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ tras la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje en la fase activa del potencial de acción. Este incremento de Ca^{2+} en el interior de la célula también conlleva una mayor actividad de las bombas Ca^{2+} -ATPasas, lo que supone un mayor consumo energético y la disminución de los niveles de ATP. Este último evento hace más probable la reapertura de K_{ATP} . En esta situación, cuando la corriente de salida de K^+ domina sobre los flujos de entrada despolarizantes, la ráfaga concluye al repolarizarse la membrana de la célula β . El cese de la actividad eléctrica supone la restauración de los niveles basales de Ca^{2+} y, por lo tanto, se produce el cierre de los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} y la acumulación de ATP, que puede volver a cerrar nuevamente K_{ATP} iniciando una segunda ráfaga. El incremento de la duración de las ráfagas que se observa al incrementarse la concentración de glucosa resultaría de una menor reactivación de K_{ATP} durante la fase de actividad. Este decaimiento de la actividad de K_{ATP} respondería a una mayor producción de ATP (debido a la mayor disponibilidad de glucosa), con lo que, a pesar del consumo necesario para gestionar el Ca^{2+} intracelular, se produciría un incremento de la concentración de ATP en dominios submembrana (Ashcroft & Rorsman, 2013). Por lo tanto, la actividad de K_{ATP} no sólo es importante para iniciar la actividad eléctrica de células β , sino que también los ciclos de reactivación y cierre del canal son fundamentales para generar el típico comportamiento oscilatorio de célula β . Así mismo, el alargamiento de los períodos de tiempo en que la célula β permanece activa subyace al incremento proporcional de la secreción de insulina en respuesta a glucosa.

El mecanismo cinético del *gating*, rápido o lento, de K_{ATP} sigue siendo controvertido. El conocimiento actual se basa en la construcción de complejos modelos predictivos. Estos análisis revelan la existencia de un único estado abierto (O, del inglés *Open*) y varios estados cerrados (C, del inglés *Closed*). Cada una de las cuatro subunidades Kir6.2-SUR1 pueden hallarse en una conformación O o C, y el canal K_{ATP} sólo permitirá el flujo de corriente si todas las subunidades están abiertas, por lo que el cambio conformacional de una única unidad a estado cerrado será suficiente para provocar el cierre de K_{ATP} . Múltiples ligandos afectan a la actividad de K_{ATP} al controlar la conformación de sus subunidades: phosphatidylinositol-4,5-bisfosfato (PIP_2) activa K_{ATP} , mientras que el ATP lo inhibe. Ambos regulan la actividad del canal al interactuar directamente con Kir6.2, estando probablemente sus sitios de unión superpuestos, por lo que la unión de uno u otro es mutuamente excluyente. PIP_2 y ATP actúan estabilizando los estados abierto y cerrado del canal, respectivamente, y, dependiendo del estado metabólico de la célula β , el canal K_{ATP} aparecerá predominante ligado a PIP_2 o ATP. Por otro lado, la interacción de Mg-nucleótidos con la subunidad reguladora SUR1 provoca la activación de K_{ATP} ; estos ligandos se unen con los dominios citoplasmáticos NBFs. Cómo la interacción de Mg-nucleótidos, Mg-ADP o Mg-ATP, está acoplada con la apertura del canal todavía no se conoce con exactitud. La hipótesis es que la unión de Mg-ATP a los sitios de unión de NBF1 y NBF2 provoca su dimerización y hace posible su actividad catalítica. La hidrólisis del Mg-ATP ligado a NBF2 libera la energía que provoca un cambio estructural que atrapa a K_{ATP} en una conformación abierta, anulando la inhibición de ATP sobre Kir6.2. Este bloqueo dependiente de nucleótidos puede ser mantenido al volverse a unir Mg-ADP (Nichols, 2006).

5.2. Canales de calcio voltaje-dependientes (Ca_v).

El cierre del K_{ATP} provoca una lenta despolarización de la célula β hasta alcanzar el voltaje umbral para la activación de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Ca_v), el influjo de Ca^{2+} y el disparo de potenciales de acción. Los canales Ca_v

modulan los niveles de Ca^{2+} citosólico en la célula β , y las oscilaciones intracelulares de Ca^{2+} motivan la pulsatilidad en la secreción de insulina (Martin *et al.*, 1995; Barbosa *et al.*, 1996). La secreción de insulina por parte de la célula β muestra una fuerte dependencia del Ca^{2+} , y el bloqueo farmacológico de la corriente a través de Ca_v perjudica gravemente la liberación de insulina. Los flujos de Ca^{2+} juegan un papel esencial en la generación de la actividad eléctrica de la célula β , siendo los principales responsables de la fase ascendente del potencial de acción y también influyendo en la repolarización al modular la actividad de los canales de K^+ activados por Ca^{2+} .

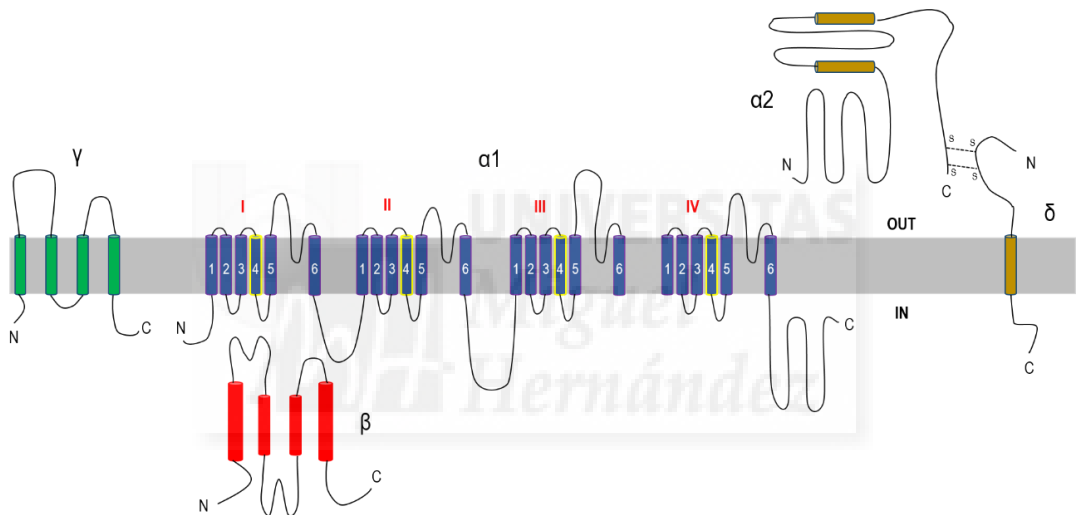


Figura 8. Organización estructural de los canales Ca_v . Topología de membrana de la diferentes subunidades que constituyen un canal Ca_v prototípico. Pueden observarse los dominios I-IV de la subunidad formadora del poro ($\alpha 1$), así como las subunidades accesorias cuya función es la regulación de la actividad del canal ($\alpha 2\delta$, β y γ).

Estructural y funcionalmente, los canales Ca_v son moléculas de gran complejidad, que fueron purificados y descritos a lo largo de la década de los 80 (Curtis & Catterall, 1984; Curtis & Catterall, 1985; Curtis & Catterall, 1986;

Takahashi *et al.*, 1987). Los Ca_v constan de cinco subunidades: $\alpha 1$, $\alpha 2$, β , γ y δ (figura 8).

El modelo actual para la estructura de los Ca_v incluye una subunidad principal transmembrana $\alpha 1$ (190 kDa), que se asocia con el dímero $\alpha 2\delta$ (170 kDa), una subunidad β intracelular fosforilada (55 kDa), y una pequeña subunidad γ transmembrana (33 kDa) (Takahashi *et al.*, 1987). La subunidad $\alpha 1$ es la constitutiva del poro del canal en los Ca_v ; su secuencia de unos 2000 aminoácidos se organiza en cuatro dominios transmembrana repetitivos (I-IV), cada uno de los cuales está formado por seis segmentos transmembrana (S1-S6), con un prominente lazo extracelular entre S5 y S6 que es responsable de la selectividad iónica del poro. El sensor de voltaje de Ca_v se localiza a nivel de los segmentos S4, y se debe a la presencia de residuos de arginina y lisina con carga positiva. La subunidad intracelular β consta de cuatro segmentos helicoidales no intercalados en la membrana celular, y su estructura tridimensional de alta resolución fue determinada mediante cristalografía de rayos-X (Chen *et al.*, 2004; Van Petegem *et al.*, 2004). La subunidad $\text{Ca}_v\beta$ se liga a la subunidad $\alpha 1$ a través de un único sitio de unión que se encuentra en el lazo citosólico entre los dominios I y II de $\alpha 1$; esta interacción $\text{Ca}_v\alpha 1\beta$ es muy estrecha y permanece estable dentro del complejo del canal. Es muy probable que $\text{Ca}_v\beta$ interactúe con otras proteínas citosólicas a través de otros dominios, pudiendo regular éstas la función de la subunidad β dentro del complejo (Catterall, 2011). Aunque la expresión de la subunidad $\alpha 1$ formadora del poro es suficiente para conseguir canales Ca_v funcionales en células de músculo esquelético, la ausencia de las otras subunidades supone una expresión disminuida del canal, alteraciones en la cinética de activación/inactivación y en la dependencia del voltaje. Se ha demostrado que la coexpresión de $\text{Ca}_v\beta$ incrementa la expresión del canal en la membrana (Bichet *et al.*, 2000) y le confiere las propiedades electrofisiológicas particulares de los canales Ca_v (Catterall, 2011). Aunque depende de la isoforma de $\text{Ca}_v\beta$ que se exprese, en general desplaza la dependencia del voltaje del canal, tanto activación como inactivación, hacia potenciales más negativos (Catterall, 2011).

La gran diversidad, funcional y estructural, de las corrientes y canales de calcio que demuestran dependencia del voltaje ha llevado a desarrollar múltiples nomenclaturas que pueden resultar confusas, utilizando distintas terminologías para referirse a las mismas entidades. Tradicionalmente, las corrientes de calcio voltaje-dependientes se han clasificado en función de una nomenclatura fenomenológica, es decir, atendiendo a sus propiedades biofísicas y farmacológicas. Siguiendo este principio, las corrientes Ca_v se designaron como tipo-L, -P/Q, -N, -R o -T. A su vez, las corrientes tipo-L, -P/Q, -N y -R se engloban dentro de las corrientes de calcio de alto umbral de activación (HVA, del inglés *High Voltage Activation*). Mientras que la corriente tipo-T se clasifica como de bajo umbral de activación (LVA, del inglés *Low Voltage Activation*), ya que esta corriente se activa a potenciales mucho más negativos. Finalmente, ya entrado el nuevo siglo, se ha propuesto una nueva nomenclatura de consenso derivada de las diferentes propiedades estructurales de los canales Ca_v . En este caso, los diferentes canales Ca_v son clasificados por los subtipos de subunidades α_1 que expresan. Se han descrito hasta el momento diez subtipos distintos que se organizan en tres familias en función de sus similitudes estructurales (Yang & Berggren, 2006):

- **Ca_v1:** incluye cuatro miembros ($Ca_{v1.1}$, $Ca_{v1.2}$, $Ca_{v1.3}$ y $Ca_{v1.4}$). Atendiendo a sus propiedades biofísicas, la corriente conducida a través de Ca_{v1} es la denominada de tipo-L (del inglés *long-lasting*), caracterizada por conductancias unitarias de gran amplitud, una cinética de inactivación lenta, su sensibilidad a dihidropiridinas (DHPs), y su regulación mediante fosforilación por PKA.
- **Ca_v2:** incluye tres miembros, $Ca_{v2.1}$, $Ca_{v2.2}$, y $Ca_{v2.3}$, que conducen respectivamente las corrientes tipo-P/Q, tipo-N y tipo-R. Las corrientes tipo-P/Q y tipo-N presentan propiedades eléctricas muy similares, y solamente son distinguibles empleando bloqueadores específicos: la

corriente tipo-P/Q es inhibida específicamente por ω -agatoxina IVA, mientras que la corriente tipo-N es bloqueada con alta afinidad por ω -conotoxina GVIA. La corriente tipo-R se describió por primera vez en células granulares del cerebelo como la corriente Ca_v residual que permanece cuando se bloquea simultáneamente con la DHP nimodipina, ω -agatoxina IVA y ω -conotoxina GVIA (de ahí la denominación de *Resistente*). Recientemente se ha purificado una nueva toxina, SNX-482, a partir del veneno de la tarántula *Hysteroocrates gigas*, que presenta gran afinidad por el canal $Ca_v2.3$ y que actúa bloqueándolo. Biofísicamente, la corriente tipo-R se caracteriza por cinética de inactivación más rápida en comparación con otros canales HVA.

- **Ca_v3:** incluye tres miembros, $Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$, y $Ca_v3.3$. Esta familia engloba los canales de bajo umbral de activación (LVA), es decir, conducen la denominada corriente-T. Biofísicamente se caracteriza por presentar una conductancia unitaria de amplitud reducida y una cinética de inactivación rápida.

5.2.1. Canales Ca_v en la célula β pancreática.

Como ya se mencionó con anterioridad, la generación de potenciales de acción y la secreción de insulina por parte de la célula β pancreática presenta una fuerte dependencia de los flujos de Ca^{2+} . En la actualidad se acepta de forma generalizada que Ca_v tipo-L es el subtipo principal de Ca_v en la célula β de todas las especies caracterizadas. Por lo tanto, C_v1 se expresa en todas las células β primarias y las líneas celulares insulinossecretoras, aunque la proporción de la corriente macroscópica de calcio debida a Ca_v tipo-L varía entre especies (Yang & Berggren, 2006). De forma particular, en la célula β de ratón la corriente macroscópica de Ca^{2+}

se debe mayoritariamente a la activación de canales Ca_v de tipo-L, con contribución de canales Ca_v de tipo-R y tipo-P/Q o -N. No existen evidencias de la presencia de canales LVA (tipo-T o Ca_v3) en la célula β de ratón. En estas células, la corriente macroscópica de Ca^{2+} comienza a detectarse a un umbral de despolarización en torno a -50 mV, activándose rápidamente durante la despolarización y alcanzando su máxima amplitud entre -10 y +10 mV. La constante de tiempo de activación (τ_m) de Ca_v es < 1 ms para pulsos despolarizantes de -30 mV o superiores (asumiendo una cinética m^2). La inactivación de Ca_v se produce lentamente, y pueden diferenciarse claramente dos fases de inactivación que consisten en un componente inicial rápido (constante de tiempo de inactivación, $T_h \approx 2$ ms), seguido de un componente mucho más lento ($T_h \approx 400$ ms), cuando los registros son llevados a cabo en células β de islotes intactos en configuración *perforated-patch* (Rorsman *et al.*, 2011). Las constantes de tiempo de inactivación (T_h) varían considerablemente en función de las condiciones experimentales, los parámetros del registro y la especie. Experimentos sustituyendo el Ca^{2+} por Ba^{2+} (los Ca_v también son permeables a este ion) en la solución extracelular han permitido demostrar que la inactivación rápida de esta corriente presenta una fuerte dependencia de Ca^{2+} (es inexistente en presencia de Ba^{2+}), mientras que su inactivación lenta es principalmente dependiente del voltaje. Debido a su cinética de inactivación y reactivación, es muy probable que los Ca_v jueguen un rol principal, no solo en la fase ascendente del potencial de acción, sino también en la producción de la actividad eléctrica regenerativa de la célula β . La exploración electrofisiológica de los tiempos de recuperación de la inactivación lenta y rápida de Ca_v determinó que la recuperación del componente lento se ajusta a una exponencial simple con una constante temporal de 4.9 ± 0.6 s, mientras que la inactivación rápida exhibe una constante temporal de tan solo 142 ± 33 ms (Rorsman *et al.*, 2011). En las células β de ratón, la corriente a través de canales tipo-L tiene una contribución de aproximadamente el 50% de la corriente macroscópica en registros de *whole-cell*.

La presencia de otros canales Ca_v en la célula β ha sido demostrado mediante un abordaje farmacológico. La presencia de $Ca_v2.1$ ha sido demostrada al observar una corriente remanente de Ca^{2+} tras el bloqueo conjunto con isradipina y SNX-482; esta

corriente residual supone un 20% de la corriente Ca_v total. Al emplear un cóctel de isradipina, SNX-482 y ω -agatoxina IVA, el bloqueo de la corriente Ca_v es prácticamente total, con lo que esta corriente residual debe ser conducida por $Ca_v2.1$ (tipo-P/Q) o $Ca_v2.2$ (tipo-N) (Schulla *et al.*, 2003). Algunos estudios apuntan a la ausencia de canales $Ca_v2.2$ (tipo-N) en la célula β de ratón ya que la utilización de ω -conotoxina GVIA no afecta a la amplitud de la corriente Ca_v (Gilon *et al.*, 1997). El uso de ratones knockout para el canal $Ca_v2.3$ (Matsuda *et al.*, 2001; Pereverzev *et al.*, 2002; Jing *et al.*, 2005) y el descubrimiento del bloqueante SNX-482 (Newcomb *et al.*, 1998) permitió confirmar la presencia de este canal en las células β de ratón. La aplicación de SNX-482 supone un 60% de bloqueo de la corriente Ca_v resistente al bloqueo con dihidropiridinas. Las células β provenientes de ratones $Ca_v2.3^{-/-}$ exhiben una reducción significativa de la corriente macroscópica de Ca^{2+} en torno al pico de amplitud máxima, que supone una disminución de aproximadamente el 20%. Como ya se mencionó, las células β de ratón no presentan corriente Ca_v con las propiedades eléctricas de los canales LVA (tipo-T o Ca_v3), sin embargo supone un componente relevante de la corriente macroscópica de Ca^{2+} en células humanas. En este caso, la corriente Ca_v tipo-T comienza a activarse tras una pequeña despolarización (-60 mV) y el pico de máxima amplitud aparece sobre -30 mV (Yang & Berggren, 2006).

5.3. Canales de potasio voltaje-dependientes (K_v) y canales de potasio activados por calcio (K_{Ca}).

Tras la secuencia de eventos eléctricos descritos en los apartados anteriores (despolarización debida al cierre del canal K_{ATP} , activación de canales Ca_v e incremento de la $[Ca^{2+}]_i$), se produce la repolarización de la membrana de la célula β tras la activación de canales de K^+ voltaje-dependientes (K_v) y canales de K^+ voltaje-dependientes sensibles a Ca^{2+} (K_{Ca}). Los canales de K^+ son la superfamilia más amplia y diversa de canales iónicos. Hasta el momento se han descrito doce familias de canales K_v en mamíferos ($K_v1 - K_v12$), y otras cinco familias de canales

K_{Ca} (K_{Ca1} – K_{Ca5}). Múltiples factores son responsables de la enorme diversidad existente en cuanto a las propiedades biofísicas de las corrientes K_v : formación de canales heteromultiméricos, asociación con proteínas accesorias, *splicing* alternativo de sus ARNm y variaciones postraduccionales (fosforilación, palmitoilación, etc.).

La estructura paradigmática de los canales K_v es un tetrámero, con sus cuatro subunidades α organizadas para formar el poro del canal. En el caso de los K_v , cada subunidad consta de seis segmentos transmembrana, estando S5 y S6 unidos por un por un lazo extracelular (P-loop) que penetra en la membrana sin atravesarla y que participa de la configuración del poro (figura 9). La estructura S5 – P-loop – S6 es común a todos los canales de K^+ (arquitectura canónica), con una pequeña secuencia proteica muy conservada en el lazo (TVGYG) que le atribuye su selectividad iónica (Choe, 2002).

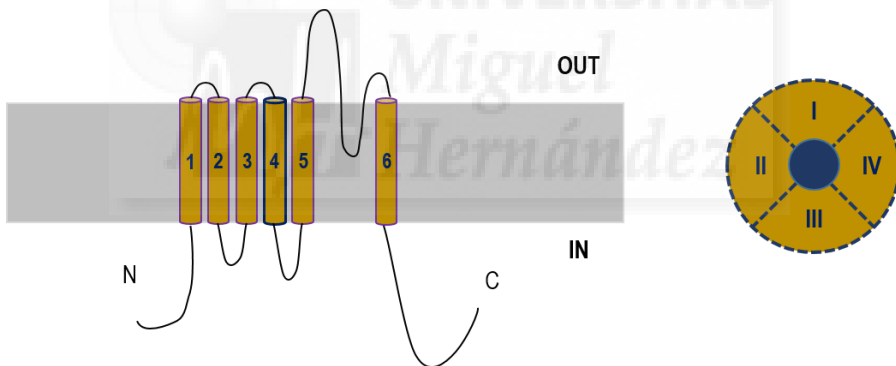


Figura 9. Organización estructural de los canales K_v . (A) Topología de membrana de una subunidad formadora del poro del canal K_v , la cual se caracteriza por la presencia de seis segmentos transmembrana, con el sensor de voltaje localizado en S4. (B) Proyección de planta de la organización que adquieren las cuatro subunidades para estructurar el tetrámero que conforma el poro de permeación del canal.

A pesar de la enorme heterogeneidad en su composición (lo que les atribuye diferencias muy sutiles en su comportamiento), las distintas familias de K_v pueden

organizarse atendiendo a rasgos comunes reconocibles en sus parámetros biofísicos y propiedades farmacológicas. Atendiendo a una primera clasificación vasta de las corrientes repolarizantes de K^+ dependientes de voltaje, se describe una corriente-A que se activa e inactiva muy rápidamente (el nombre que recibe deriva de la característica forma del trazo de esta corriente) y una corriente rectificadora-tardía que se activa más lentamente y no se inactiva (o lo hace muy lentamente tras varios segundos). La corriente repolarizante de K^+ se describió por primera vez en células β de ratón en el año 1986 (Rorsman & Trube, 1986), y en células β humanas en el año 1991 (Kelly *et al.*, 1991). Debido a su cinética de activación/inactivación, la corriente K_v de células insulinosecretoras se clasificó como de rectificación-tardía. Algunos estudios posteriores han descrito la posible participación de una corriente-A (o similar) en la repolarización de células insulinosecretoras (célula β de rata y células de insulinoma de ratón MIN6) (MacDonald & Wheeler, 2003). Sin embargo, la presencia de este componente voltaje-dependiente de tipo-A en la célula β sigue siendo controvertido ya que las condiciones experimentales, presencia de subunidades reguladoras, fosforilación, temperatura, etc., tienen una gran influencia en la cinética de esta corriente. La corriente de salida de K^+ voltaje-dependiente en célula β implica un componente mayoritario independiente de Ca^{2+} a través de K_v (80-85% del total), y un componente minoritario cuya actividad es también dependiente de Ca^{2+} (K_{Ca} , 15-20%).

En células β de roedores y líneas celulares insulinosecretoras se ha identificado el $K_v2.1$ como el canal más relevante en la conducción de la corriente de salida de K^+ voltaje-dependiente. Mediante múltiples aproximaciones se ha demostrado que la corriente a través de $K_v2.1$ regula la excitabilidad de la célula β , el patrón oscilatorio de $[Ca^{2+}]_i$ y la secreción de insulina (MacDonald *et al.*, 2001; MacDonald *et al.*, 2002). La corriente K_v en la célula β repolariza la membrana durante el potencial de acción, limitando la entrada de Ca^{2+} y la secreción de insulina. La primera evidencia de la participación de la corriente de salida de K^+ en la actividad de célula β vino dada por el uso del bloqueante de K_v (y K_{Ca}) tetraetilamonio (o

TEA). La inhibición de esta corriente aumenta la duración del potencial de acción y actúa como un compuesto insulinoatrópico dependiente de glucosa (aunque sería más preciso decir dependiente de despolarización). La estimulación de la secreción de insulina también se ha descrito tras la inhibición de la corriente de salida de K^+ empleando bloqueantes más específicos como 4-aminopiridina (4-AP, bloqueo de K_v), hanatoxina o C-1 (péptidos antagonistas de $K_v2.1$) (MacDonald *et al.*, 2003). La familia K_v2 se caracteriza a nivel biofísico por presentar un umbral de activación elevado (entre -30 y -20 mV), y presentar una cinética de activación/inactivación prototípica de un rectificador-tardío.

Los canales K_{Ca} muestran la particularidad de ser activados por la despolarización de membrana y/o la elevación de la $[Ca^{2+}]_i$. Se han descrito tres familias de canales K_{Ca} atendiendo a su conductancia: canales K_{Ca} de alta conductancia unitaria ($K_{Ca1.1}$ o BK), cuya activación muestra una dependencia cooperativa del voltaje y de la $[Ca^{2+}]_i$; los canales K_{Ca} de baja conductancia (K_{Ca2} o SK), cuya activación es independiente del voltaje pero son sensibles a bajas concentraciones de $[Ca^{2+}]_i$; y los canales K_{Ca} de conductancia intermedia ($K_{Ca3.1}$), que presentan una cinética de activación similar a los anteriores (Magleby, 2003). Aunque la conductancia K_v predominante en célula β de roedores es a través de $K_v2.1$, se ha descrito la expresión de canales BK en estas células y algunas líneas celulares insulinosectoras (Satin *et al.*, 1989; Mancilla & Rojas, 1990). Estructuralmente, los canales BK están formados también por cuatro subunidades α que se organizan construyendo el poro del canal. Cada subunidad presenta una topología compleja, que consta de una estructura compartida con los K_v (el complejo canónico S5 – P – S6, común a todos los canales de K^+ , y cuatro segmentos helicoidales transmembrana S1 – S4, donde se hallan las regiones que aportan la dependencia del voltaje), y algunas novedades arquitectónicas propias de los BK (una región transmembrana helicoidal, S0, que hace que la cola aminoterminal sea extracelular, y una región carboxiterminal formando una vasta protuberancia

intracelular que contiene los dominios del canal sensibles a Ca^{2+} , RCK1 y RCK2) (figura 10) (Magleby, 2003).

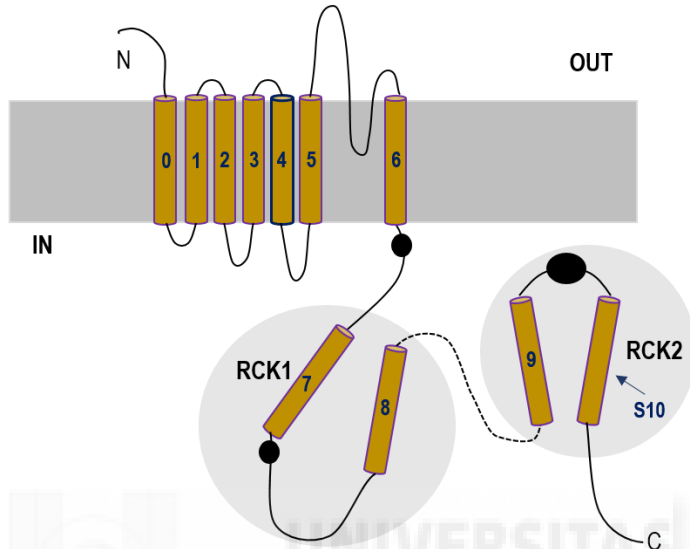


Figura 10. Organización estructural de los canales BK. Topología de membrana de la subunidad α formadora del poro del canal BK ($\text{K}_{\text{Ca}1}$). Puede observarse una prominente cola citoplasmática donde se localizan sitios particulares que han sido identificados como las regiones implicadas en la regulación ejercida por el Ca^{2+} .

El papel del canal BK en la fisiología de la célula β sigue siendo controvertido. Diversos estudios tempranos propusieron que la corriente I_{BK} no tiene una influencia significativa en la secreción de insulina estimulada por glucosa o en las células β de ratón. Por ejemplo, Kukuljan *et al.* (1991) demostraron que el bloqueo farmacológico de I_{BK} mediante charybdotoxina (ChTx) no afectaba a la forma del PA o de las ráfagas de disparo. Sin embargo, trabajos empleando células β de ratones *knockout* para $\text{K}_{\text{v}2.1}$ demostraron que estas células mantienen su capacidad para repolarizar el PA, y se sigue observando una I_{K} de salida de la que entonces se desconocía su identidad molecular (aunque el PA dura más y la frecuencia de disparo aparece reducida). De igual modo, la ablación farmacológica de I_{Kv} provocaba un

enlentecimiento en la fase descendente del PA, pero no impedía la repolarización en células β de ratón (Jacobson *et al.*, 2007). Estas observaciones demostraron que debe existir una I_K repolarizante adicional articulando la forma y el disparo de PAs, evidenciando claramente que la repolarización de la célula β es un proceso muy complejo, con múltiples conductancias activándose en secuencias rápidas, solapadas e incluso redundantes, las cuales varían sustancialmente entre distintas especies e incluso dependiendo de la cepa de ratón utilizada. Estudios recientes han arrojado algo de luz a este respecto, aunque en ocasiones los resultados puedan parecer contradictorios. Houamed *et al.* (2010) demostraron que I_{BK} tiene un papel esencial en condiciones fisiológicas, regulando la amplitud del PA, el influjo de Ca^{2+} y la secreción de insulina estimulada por glucosa. El umbral de activación de I_{BK} es muy similar al de I_{Kv} , pero su cinética de activación es más rápida y se inactiva parcialmente, con lo que la contribución de I_{BK} debe ser predominante en la fase inicial del disparo del PA, en contra de lo propuesto en estudios anteriores (Kukuljan *et al.*, 1991). El bloqueo de I_{BK} con paxilina provocó un incremento muy significativo de la amplitud del PA (≈ 21 mV), un aumento de la entrada de Ca^{2+} ($\approx 12\%$) y, finalmente, repercutió poderosamente en la secreción de insulina estimulada por glucosa (incremento del 67%) (Houamed *et al.* 2010). El hecho de que trabajos contrastados hayan arrojado resultados ambiguos y numerosas discrepancias acerca de la contribución de I_{BK} puede ser explicado teniendo en cuenta las posibles diferencias entre cepas de ratones en cuanto a los niveles de expresión de los distintos tipos de canales, o incluso dependiendo de las condiciones experimentales en las que se realizaron los registros: temperatura de registro, la elección de drogas peptídicas (ChTx o IbTx) o liposolubles (paxilina) para el bloqueo de I_{BK} , registros en *perforated-patch*, posible inclusión de subunidades β en la topología del canal BK. Teniendo en cuenta estos resultados, se ha propuesto un modelo más refinado de la generación del PA en célula β de ratón: en presencia de glucosa, la despolarización hasta el voltaje umbral conlleva la activación de I_{Cav} , disparándose la fase ascendente del PA rápidamente. La rápida despolarización y la entrada de Ca^{2+} provocan la activación de I_{BK} (comenzando ≈ 4 ms después del disparo y coincidiendo con los últimos ≈ 3 ms de la fase ascendente). La corriente de salida a través de BK trunca

el ascenso del PA. A continuación, la activación de una corriente más lenta a través de K_v (retraso de ≈ 2 ms) contribuye a la corriente repolarizante ($I_{BK} + I_{Kv}$) que subyace a la fase descendente del PA. Por lo tanto, I_{BK} es predominante en una etapa más temprana de la repolarización, mientras que I_{Kv} contribuiría con mayor dominancia más tardíamente tras la inactivación de BK (Houamed *et al.* 2010). Este modelo es conciliador con la observación de que el bloqueo de BK provoca un incremento en la amplitud del PA (Houamed *et al.* 2010), mientras que el bloqueo o la ablación de $K_v2.1$ aumenta la duración del PA y atenúa la frecuencia de disparo (debido a la inhibición de AHP), modificando solo de forma marginal la amplitud del PA (Jacobson *et al.*, 2007).

Las células β de ratón expresan también el canal SK, si bien su papel en la regulación de su actividad eléctrica es todavía incierto. Como ya se mencionó con anterioridad, la activación de SK es independiente de voltaje (presenta modificaciones sobresalientes del sensor transmembrana S4) y, a diferencia de lo que ocurre en BK, la sensibilidad a Ca^{2+} no es debida a la presencia de sitios de unión específicos en la propia topología de las subunidades α , sino a su estrecha vinculación con la calmodulina mediante un dominio de unión anexo a S6 (Stocker, 2004). El bloqueo farmacológico de SK empleando apamina no ha mostrado tener consecuencias significativas sobre la secreción de insulina estimulada por glucosa (Lebrun *et al.* 1983), así como tampoco sobre la forma del PA (Jacobson *et al.*, 2010). Estos resultados sugieren que I_{SK} tiene un papel marginal en la generación de la actividad eléctrica estimulada por glucosa en célula β de ratón en condiciones fisiológicas, si bien los canales SK podrían ganar relevancia funcional en ciertas condiciones (por ejemplo cuando el influjo de Ca^{2+} aparece aumentado). Esta afirmación deriva de la observación de que el bloqueo con apamina en células β aumenta la duración del PA y disminuye la frecuencia de disparo siempre que se haya producido la ablación o el bloqueo de la corriente a través de $K_v2.1$ (Jacobson *et al.*, 2010).

Finalmente, los flujos iónicos descritos en los apartados anteriores se encadenan en una serie de eventos consecutivos para generar el típico patrón de actividad eléctrica de la célula β y el acoplamiento estímulo – secreción. El modelo que se ha explicado en este trabajo se ilustra, resumidamente, en la figura 11.

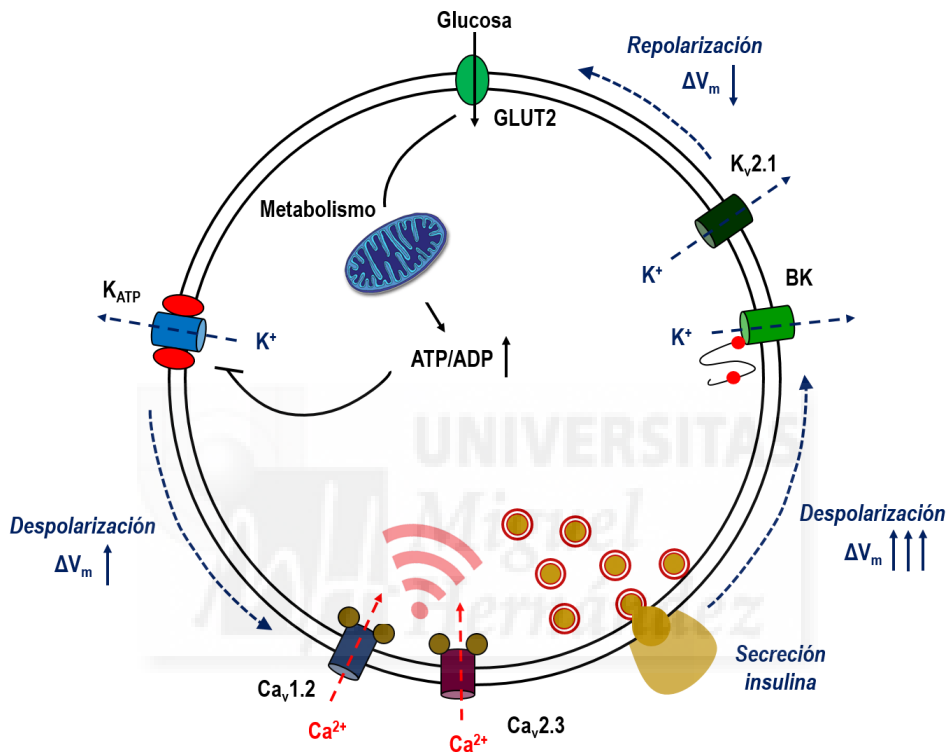


Figura 11. Acoplamiento estímulo – secreción en la célula β pancreática. Representación esquemática de los flujos iónicos implicados en la iniciación y regeneración de la actividad eléctrica de la célula β , la cual desencadena la secreción de gránulos de insulina.

OBJETIVOS



El BPA es uno de los compuestos químicos con mayor volumen de producción a escala global. Es el componente principal de los plásticos de policarbonato, y se usa como aditivo en la producción de otros muchos tipos de plásticos, apareciendo en muchos bienes de consumo en contacto con alimentos y bebidas. La ingestión de productos contaminados con BPA parece constituir la principal fuente de exposición para los humanos, aunque también parece contribuir significativamente la absorción de BPA por vía transdérmica. Además, el BPA es detectado regularmente en muestras de agua, aire y polvo. La mayor parte de los individuos en países industrializados presentan BPA (o sus metabolitos) en la orina, lo que indica claramente que la exposición a BPA es real y generalizada entre la población.

El BPA es considerado un disruptor endocrino, ya que interfiere en la señalización hormonal del organismo al unirse y modular la actividad de los receptores de estrógenos, y es considerado, por lo tanto, un estrógeno exógeno (o xenoestrógeno). Diversos estudios epidemiológicos han relacionado la exposición a BPA con el desarrollo de numerosas patologías, entre las que se encuentra la diabetes mellitus.

Los ratones expuestos a BPA muestran alteraciones muy significativas de la homeostasis de la glucosa. Estos ratones son intolerantes a la glucosa y muestran una marcada insulino-resistencia en sus tejidos periféricos, con un incremento de los niveles circulantes de insulina. En la célula β pancreática, la aplicación aguda de dosis bajas de BPA tiene un efecto insulínico rápido, que es consecuencia de la disminución de la actividad de K_{ATP} , y del aumento consecuente de las señales de calcio intracelular en respuesta a glucosa.

El objetivo general del presente trabajo consistió en evaluar las acciones directas que el BPA tiene sobre la funcionalidad de la célula β pancreática. Nuestro interés

se centrará en dosis cercanas al rango de exposición real a BPA (0.4 – 5 µg/kg/día es el rango estimado de consumo diario para la población estadounidense) (Lakind *et al.*, 2008), aplicado, no de forma puntual, sino durante un período de tiempo prolongado. Nuestro modelo de exposición consistirá en mantener en cultivo durante 48 horas islotes pancreáticos aislados en presencia constante de BPA. Ya que la particularidad funcional más destacada de la célula β pancreática es su excitabilidad (que controla la secreción de insulina), hemos decidido realizar un abordaje primario mediante técnicas electrofisiológicas, para proceder después a la descomposición secuencial de los eventos celulares que tienen su punto final en la secreción de insulina. Además, nos hemos propuesto confrontar el principio de linealidad de la toxicología clásica, con la intención de descubrir una explicación molecular del fenómeno de no monotonicidad de EDCs, ejemplificado en nuestro estudio de la acciones del BPA en la célula β pancreática.

Los objetivos específicos del presente son los siguientes:

- Estudiar los efectos que la exposición a BPA tiene sobre la actividad eléctrica de la célula β pancreática.
- Estudiar los efectos que la exposición a BPA tiene sobre la señalización intracelular de Ca^{2+} en el islote de Langerhans y la célula β pancreática.
- Estudiar los efectos que la exposición a BPA tiene sobre la exocitosis y la secreción de insulina de la célula β pancreática.
- Estudiar los efectos que la exposición a BPA tiene sobre la capacidad metabólica y la función mitocondrial de la célula β .
- Estudiar los efectos que la exposición a BPA tiene sobre las corrientes de Ca^{2+} y K^{+} de la célula β .
- Estudiar los mecanismos de acción a través de los que el BPA altera el funcionamiento de la célula β .

MATERIAL y MÉTODOS



1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Las muestras biológicas empleadas en este trabajo fueron obtenidas a partir de ratones macho adultos (\approx 12 semanas de edad) de la cepa C57BL/6J, procedentes de la colonia del Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la UMH. Los animales se mantuvieron estabulados en condiciones estandarizadas y estables (ciclo 12 horas luz/12 horas oscuridad, temperatura aproximada de 22°C), con acceso *ad libitum* a comida y agua. Los procedimientos empleados en este trabajo fueron previamente evaluados y aprobados por el Comité de Ética de la UMH conforme a la legislación estatal y europea vigente.

2. AISLAMIENTO DE ISLOTES DE LANGERHANS.

Para la obtención de los islotes de Langerhans, la eutanasia de los ratones se practicó mediante dislocación cervical. Tras esterilizar el área de intervención, se realizó una laparotomía media completa que dejó al descubierto las vísceras del abdomen. La masa intestinal y los lóbulos hepáticos se retiraron a un lado para facilitar la localización del conducto biliar común o conducto colédoco, el cual deriva en su parte proximal de la convergencia del conducto hepático común y el conducto cístico, y que drena en el duodeno tras su fusión muy distal con el conducto pancreático principal, generando un segmento corto de la vía biliar que se inserta en el duodeno formando una estructura fácilmente reconocible denominada ámpula hepatopancreática o ampolla de Vater. Para proceder a la canulación del conducto colédoco, se practicó una ligadura en la parte más distal del conducto de tal modo que queda obstruida la comunicación con el duodeno; a continuación se hizo una pequeña incisión en la parte proximal del colédoco que permitió introducir una fina cánula en el conducto biliar fijándola con una sutura quirúrgica. Tras establecer y asegurar el acceso, se acopló una jeringa a la cánula y se perfundió una solución con 0.5 mg/ml de la enzima colagenasa (tipo V; Sigma) hasta que el páncreas incrementó su volumen hasta su capacidad máxima [composición de la solución de aislamiento

(en mM): 115 NaCl, 5 KCl, 10 NaHCO₃, 1.1 MgCl₂, 1.2 NaH₂CO₄, 2.5 CaCl₂, 25 HEPES, 0.25% BSA y 5 glucosa; ajustado pH 7.4 con NaOH]. Rápidamente se procedió a extraer el páncreas perfundido liberando sus adherencias con los órganos circundantes, y se introdujo en un tubo tipo Falcon al que se añadió solución con colagenasa hasta que el páncreas quedó completamente sumergido. A continuación, este tubo se introdujo en un baño a 37°C para proceder a la digestión enzimática del tejido exocrino. El tiempo requerido para la disgregación puede variar dependiendo del lote de la enzima, por lo que el proceso se inspeccionó visualmente hasta observar claramente la desintegración de la masa pancreática. Al finalizar el tiempo de digestión requerido, la reacción enzimática se paró al añadir solución de aislamiento fría, y posteriormente se mantuvo la preparación obtenida en frío y posición vertical para permitir el precipitado del disgregado pancreático. A continuación se desechó el sobrenadante, y el pellet se resuspendió en solución de aislamiento fresca. Esta suspensión con los islotes pancreáticos se fraccionó y diluyó consecutivamente para facilitar la recuperación de los mismos. La suspensión se colocó en placas Petri estériles, y los islotes de Langerhans se recuperaron uno a uno bajo una lupa binocular con la ayuda de una micropipeta. Una vez recuperados, se lavaron en solución limpia hasta conseguir una pureza óptima de la preparación. Los islotes de Langerhans obtenidos se mantuvieron en un incubador a 37°C durante al menos 1 hora para permitir su recuperación del proceso antes de su utilización para cualquier procedimiento experimental.

3. CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS AISLADAS DEL ISLOTE DE LANGERHANS.

Tras el tiempo de recuperación, los islotes fueron transferidos a un vial y se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos. A continuación, se retiró cuidadosamente el sobrenadante y el pellet con los islotes se resuspendió en una solución comercial que contiene Tripsina al 0.05% (Sigma). Los islotes se incubaron a 37°C durante 3 minutos en esta solución enzimática para permitir la actividad peptidasa. Pasado este tiempo, la disgregación se facilitó también mecánicamente con un suave pipeteo, y la reacción enzimática fue detenida al añadir medio de

cultivo suplementado en un volumen que debe ser al menos dos veces el utilizado durante la digestión. La suspensión celular se centrifugó nuevamente a 1000 rpm durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y el pellet de células disgregadas se resuspendió en un volumen de medio de cultivo determinado en función de la densidad celular deseada en la siembra. La siembra de células pancreáticas tuvo lugar en cubreobjetos redondos de vidrio de 12 o 24 mm de diámetro, dependiendo del experimento a realizar con esta preparación. Previamente, los cubreobjetos habían recibido un tratamiento con 0.01% de poli-L-lisina (Sigma) durante 1 hora para facilitar la adherencia de las células; el remanente de poli-L-lisina se lavó tres veces con dH₂O estéril. Una vez que los cubreobjetos fueron sembrados se mantuvieron en el incubador durante 90 minutos antes de añadir el medio de cultivo con los tratamientos estrogénicos según fuera requerido.

4. MODELO DE EXPOSICIÓN *IN VITRO* A BPA Y OTROS MODULADORES DE LA ACTIVIDAD ESTROGÉNICA.

Los islotes de Langerhans intactos o las células pancreáticas aisladas se cultivaron durante 48 horas en medio RPMI 1640 con 11 mM glucosa y sin rojo fenol, suplementado con 200 U/ml penicilina, 0.2 mg/ml estreptomycin, 2 mM L-glutamina y 8% FBS *charcoal-stripped* (del inglés *Fetal Bovine Serum*). El *stripping* del suero a través de filtros de carbón activado (*charcoal*) permite retirar sustancias lipofílicas (hormonas esteroideas, tiroideas, etc.) que podrían interferir con los niveles basales de activación estrogénica de las muestras.

Los distintos moduladores de la actividad de los receptores de estrógenos utilizados durante las incubaciones, su estructura y especificaciones se recogen en la figura 12. Debido a su naturaleza hidrofóbica, todos estos compuestos fueron solubilizados en DMSO, y las preparaciones *control* incluyen DMSO isovolumétrico

como vehículo. Durante el período de incubación con los tratamientos, las preparaciones se mantuvieron a 37°C y 5% saturación CO₂, y los medios de cultivo con los tratamientos fueron renovados cada 24 horas.

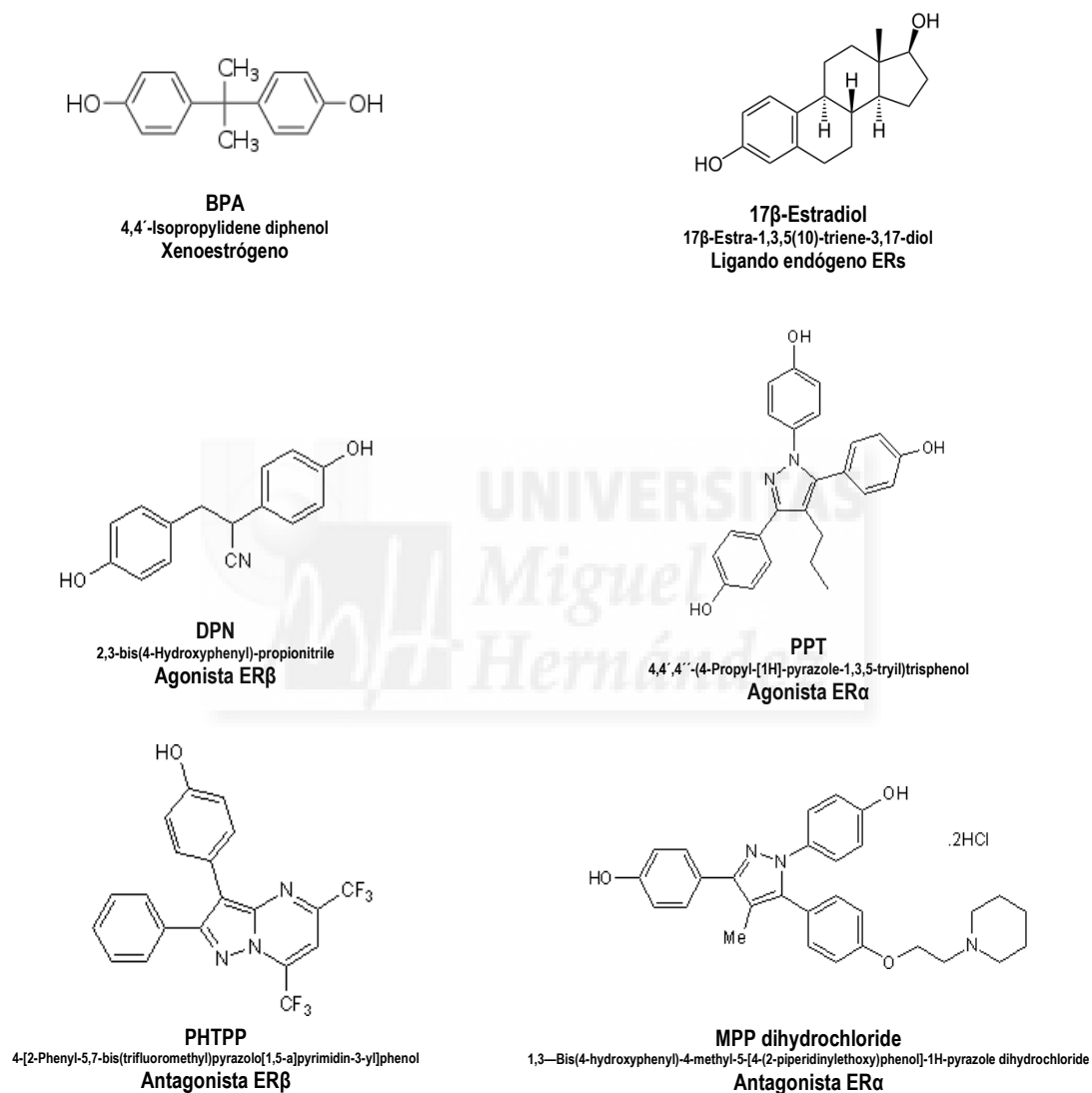


Figura 12. Compuestos utilizados que actúan como moduladores de receptores de estrógenos: estructura, nombre comercial, nomenclatura IUPAC y actividad específica.

5. REGISTRO DE CALCIO INTRACELULAR EMPLEANDO IMAGEN DE FLUORESCENCIA.

5.1. Registro ratiométrico de la movilización de calcio intracelular en islote intacto y células aisladas de islote de Langerhans.

Transcurrido el período de cultivo en presencia de los diferentes compuestos estrogénicos, se procedió de dos modos diferentes en función de la preparación que fuera a ser registrada. Para el caso de los islotes intactos, estos se incubaron durante al menos 1 hora en medio de aislamiento que contenía $4 \mu\text{M}$ de la sonda fluorescente fura-2/AM (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), en una cámara de atmósfera húmeda, a temperatura ambiente, en oscuridad y gaseados continuamente con carbógeno (mezcla O_2 95%, CO_2 5%). Cuando se trabajó con cultivos primarios de células pancreáticas, los cubreobjetos sembrados se incubaron igualmente en presencia de $4 \mu\text{M}$ de fura-2/AM, pero durante no más de 30 minutos a 37°C y 5% CO_2 . Durante estos períodos, las preparaciones se mantuvieron en presencia de los tratamientos que correspondían, por lo que la exposición a BPA u otros moduladores estrogénicos se mantuvo hasta el momento exacto del registro.

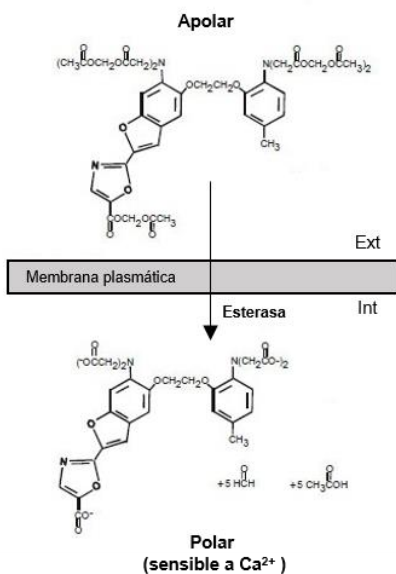


Figura 13. Estructura química de fura-2 AM y representación esquemática de su proceso de transporte y desesterificación en el interior celular.

Debido a sus propiedades de fluorescencia, la sonda fura-2 ha sido extensamente utilizada durante décadas para monitorizar las variaciones intracelulares de calcio a tiempo real. La forma esterificada de la sonda, fura-2/AM es lipopermeable y atraviesa con facilidad las membranas celulares; una vez en el citosol, la sonda es desesterificada por enzimas con actividad esterasa, dando lugar a su forma polar (carga neta negativa) que es retenida en el interior celular y que puede quelar el calcio citosólico libre (figura 13).

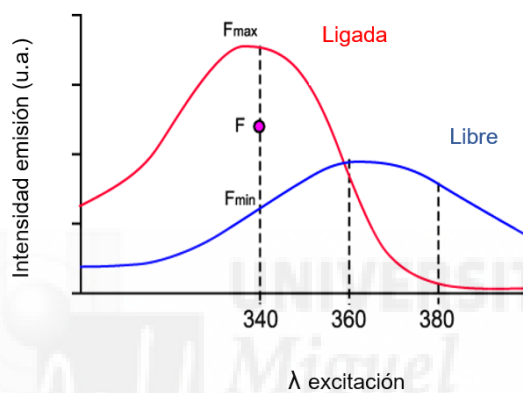


Figura 14. Cambios en el espectro de excitación de la sonda fura-2 en función de si se halla ligada o no a Ca^{2+} ; la unión a Ca^{2+} provoca un desplazamiento del máximo de emisión a $\lambda_{\text{excitación}}$ de 340nm.

Las variaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ provocan el desplazamiento del espectro de excitación de la sonda, y en esta habilidad se basa su uso como indicador de la concentración de calcio intracelular a partir de medidas ratiométricas. La unión de calcio aumenta la emisión de fluorescencia de fura-2 al ser excitada a una longitud de onda de 340 nm de un modo directamente proporcional a la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ libre, mientras que la señal emitida disminuye al ser excitada a 380 nm ($\lambda_{\text{emisión}} = 510 \text{ nm}$) (figura 14). Este hecho permite expresar clásicamente las variaciones de calcio como la razón F_{340}/F_{380} . En este trabajo se optó por expresar los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mediante

el parámetro F360/F380, donde F360 es el punto isobéptico de la sonda fura-2, es decir, la longitud de onda concreta para la cual la emisión de la sonda es independiente de la concentración de calcio; por lo tanto, este parámetro viene dado por la razón entre un valor que varía solamente en función de la constante de decaimiento de la sonda y los cambios en la fluorescencia emitida al excitar a 380 nm, los cuales son dependientes de la $[Ca^{2+}]_i$.

Para el registro de las variaciones de $[Ca^{2+}]_i$, los islotes fueron transferidos a una cámara cuya base está constituida por un cubreobjetos circular de 24 mm de diámetro, previamente tratado con poli-L-lisina. En el caso de tratarse de cultivos celulares, los cubreobjetos sembrados se introdujeron en la misma cámara de registro, la cual se adaptó en un soporte conectado con un baño termostatzado; el conjunto fue fijado sobre la platina de un microscopio invertido de fluorescencia Axiovert 200 (Zeiss, Jena, Alemania). La cámara de registro recibe un sistema de perfusión, por el que se hizo pasar una solución extracelular [composición base (en mM): 120 NaCl, 5 KCl, 25 NaHCO₃, 1.1 MgCl₂, 2.5 CaCl₂; pH 7.4 mantenido por el gaseado constante de carbógeno] a una temperatura y velocidad constantes. El sistema de registro está basado en una lámpara de arcoxenón como fuente de iluminación; el haz de luz se filtra a través de un sistema intercambiador automatizado (Lambda 10-2; Sutter Instruments, Novato, CA, USA) equipado con filtros que permiten alternativamente el paso a una λ de 360 o 380 nm. A continuación, el haz filtrado es reflejado en un espejo dicróico que lo desvía hacia la muestra a través de un objetivo 40x Fluar (Zeiss; 1.3 de apertura numérica e inmersión en aceite). La emisión de la sonda es transmitida igualmente por el objetivo y dirigida a través del espejo dicróico hacia un filtro de emisión, el cual la envía hacia una cámara digital de alta resolución ORCA C4742-95 (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japón). El software empleado para el registro de las señales de fluorescencia fue Aquacosmos 2.6 (Hamamatsu Photonics), y la frecuencia de adquisición fue 1 imagen cada 3s.

5.2. Registro de señales de calcio intracelular de célula β individual en islote completo empleando microscopía confocal.

Para el registro de las señales intracelulares de calcio de células individuales en islotes intactos se utilizó microscopía confocal. La preparación de los islotes fue muy similar a la descrita en el apartado anterior, con la salvedad de que la sonda fluorescente con la que se incubaron fue fluo-4/AM (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). La utilización de fluo-4/AM como indicador en imagen dinámica de calcio ofrece las siguientes características: su forma unida a calcio exhibe un gran incremento en la emisión de fluorescencia (> 100 veces), por lo que ofrece una gran sensibilidad de detección; a diferencia de fura-2, fluo-4 no ve desplazado su espectro de excitación en sus formas libre o ligada, por lo que la medida obtenida no es ratiométrica y depende únicamente de una $\lambda_{\text{excitación}}$; para su forma unida a calcio, $\lambda_{\text{excitación/emisión}}$ es 494/506 nm. En este caso, el *setup* de registro estuvo constituido por un microscopio invertido Axiovert 200M (Zeiss) con un módulo láser confocal acoplado (modelo LSM 510; Zeiss). La fuente de excitación empleada fue un láser de argón con una única $\lambda_{\text{excitación}}$ de 488 nm. La excitación de la muestra y la señal de fluorescencia emitida se dirigieron a través de un objetivo 40x Plan NeoFluar (Zeiss; 1.3 de apertura numérica e inmersión en aceite). Finalmente, la señal de fluorescencia recogida se hizo pasar por un filtro con paso de banda de 506-530 nm. La confocalidad nos permite tomar la señal de secciones ópticas en cualquier plano horizontal del islote, en este caso particular de 12 μm . Las imágenes se tomaron con una frecuencia de adquisición de 2 imágenes/s, y una resolución digital de 256 x 256 píxeles. Los registros se expresaron como los cambios de fluorescencia a 526 nm, y fueron procesados mediante el software ZEN 2009 (Zeiss).

6. EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL EMPLEANDO MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA.

6.1. Autofluorescencia de NAD(P)H.

El uso de sustratos metabolizables en la célula β provoca un aumento en la concentración de ATP, que es consecuencia de un incremento en la producción de equivalentes reducidos para la respiración mitocondrial, principalmente NAD(P)H y FADH₂. El fundamento de estos experimentos radica en las diferentes propiedades de fluorescencia de las formas reducida y oxidada de los nucleótidos de piridina; así se produce un incremento en la señal de fluorescencia al aumentar las formas reducidas de la molécula (NAD(P)H), mientras que un incremento de su estado oxidado (NAD(P)⁺) se correlaciona con un decaimiento de la fluorescencia. Por lo tanto, los cambios en la fluorescencia registrada dependen del ratio NAD(P)H / NAD(P)⁺, el cual varía principalmente según la actividad del ciclo de Krebs. En este caso particular, se evaluaron los cambios en la autofluorescencia de NAD(P)H en islotes intactos al perfundir concentraciones crecientes de glucosa (3, 8, 11 y 16 mM). Cada glucosa ensayada se perfundía secuencialmente en el baño termostatzado durante 15 min, lo que provocó un incremento escalonado de la fluorescencia. La autofluorescencia de NAD(P)H se registró excitando a 365 nm y tomando la fluorescencia emitida a 445 nm a intervalos de 1 min. Antes de comenzar estos registros, los islotes fueron incubados durante 1 hora en medio de aislamiento con baja glucosa (5 mM glucosa, 0,25% BSA), en presencia de 1 nM BPA cuando correspondía.

6.2. Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).

Para monitorizar los cambios en el potencial de membrana mitocondrial, los islotes se incubaron durante 10 min en medio de aislamiento (5 mM glucosa, 0,25%

BSA) con la sonda fluorescente rhodamine-123 (Rh-123, 10 $\mu\text{g/mL}$, MW 380.3) (figura 15), y fueron posteriormente perfundidos con concentraciones crecientes de glucosa (3, 8, 11 y 16 mM). La sonda Rh-123 es un catión lipofílico que se acumula en la matriz mitocondrial en forma proporcional al potencial de membrana mitocondrial, viéndose alteradas sus propiedades de fluorescencia. El metabolismo de la glucosa provoca cambios en el potencial de membrana de la mitocondria que son debidos al desplazamiento bidireccional de protones a través de la membrana mitocondrial interna; en la respiración oxidativa se produce una extrusión activa de protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana que provoca la energización de la membrana mitocondrial interna, produciéndose un transporte pasivo de los mismos dirigido a través de la ATP-sintasa para la producción de ATP. Esta polarización provoca la disminución de la intensidad de fluorescencia de Rh-123 (por un proceso de *quenching*), mientras que la despolarización de la membrana mitocondrial interna induce la recuperación de la fluorescencia de la sonda. La disminución de la intensidad de fluorescencia es directamente proporcional a la concentración de Rh-123 acumulada en la matriz mitocondrial como consecuencia de la hiperpolarización de la membrana mitocondrial interna, por lo tanto la agregación de las moléculas de sonda en la mitocondria cargada negativamente está asociada al *quenching* de la misma. El compuesto FCCP (*p*-trifluorometoxyphenylhydrazone) fue añadido al finalizar cada registro como control interno del proceso: el FCCP es un desacoplador mitocondrial que provoca la despolarización de la membrana mitocondrial interna, incrementando así la fluorescencia de Rh-123. Rh-123 fue excitada a 480 nm y su emisión fue registrada a 530 nm. Los datos de fluorescencia se tomaron empleando el software Aquacosmos, registrándose una imagen de fluorescencia cada 30 s.

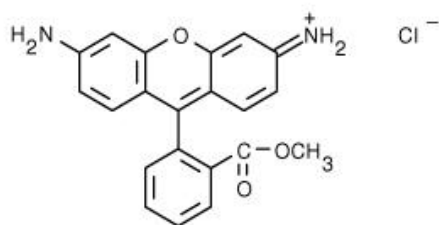


Figura 15. Estructura de Rh-123.

7. REGISTROS DE ELECTROFISIOLOGÍA.

Mediante la técnica de *patch-clamp* pudieron ser registrados los flujos iónicos dirigidos a través de la membrana plasmática de células β aisladas. Los registros electrofisiológicos se llevaron a cabo empleando un amplificador Axopatch 200B conectado a una tarjeta periférica de conversión AD/DA Digidata 1322A (ambos de Axon Instruments, Union City, CA, USA). El control de los componentes del sistema de registro, la adquisición y procesado de las señales se realizó mediante el software Clampex 9.0. El cubreobjetos con la siembra de células pancreáticas se depositó en una cámara de registro (modelo RC-26GLP; Warner Instruments, Hamden, CT, USA) por la que se hacía circular una solución extracelular mediante un sistema de perfusión. La temperatura de la solución extracelular fue monitorizada constantemente por una sonda sumergida en la cámara de registro, la cual está conectada a un controlador CL-100 (Warner Instruments), que realiza un control eficiente de la temperatura de la solución perfundida (32-35°C) al estar acoplado a un SC-20 Dual In-line Solution Heater/Cooler. La cámara de registro se ajustó en la platina de un microscopio invertido Axiovert 200. Los electrodos empleados se elaboraron a partir de capilares de borosilicato (100 mm longitud, 1.5 mm OD, 0.84 mm ID; World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) empleando un estirador de pipetas horizontal modelo P-97 (Sutter Instruments, Novato, CA, USA). La punta de las micropipetas fue suavizada en una microforja MF-830 (Narishige Group, Tokyo, Japón); típicamente, se trabajó con R_{pipeta} entre 4 y 6 M Ω . La aproximación de la micropipeta y el contacto con la célula se consiguió mediante un sistema de soporte (*holder*) controlado tridimensionalmente por un micromanipulador MPC-200 (Sutter Instruments); este soporte incorpora un preamplificador CV 203BU Headstage (Sutter Instruments). El *holder* incluye un electrodo de plata clorurada que, a través del preamplificador, se conecta con el amplificador mediante un cable coaxial que conduce las señales eléctricas. Cuando se realizaron registros de capacitancia (C_m), la superficie externa de la punta de la micropipeta se recubrió con la silicona Sylgard 184 (Dow Corning, Midland, MI, USA), la cual fue curada en un solenoide al rojo.

7.1. Registro de corrientes de calcio.

El registro de la corriente macroscópica de calcio se llevó a cabo en configuración de *whole-cell* (figura 16A) empleando la técnica de *voltage-clamp* (V-clamp). Las señales eléctricas se registraron con una frecuencia de adquisición de 10 kHz, con una ganancia de 10 mV/pA, y empleando un filtro *lowpass* de 2 kHz implementado en el amplificador. La composición de las soluciones intracelular y extracelular empleadas en estos registros se recoge en la tabla 1.

	Composición (en mM)
Sol. extracelular	118 NaCl, 5.6 KCl, 20 TEA-Cl, 1.2 MgCl ₂ , 2.6 CaCl ₂ , 5 HEPES, 5 glucosa; pH 7.4 ajustado con NaOH.
Sol. intracelular	0.05 EGTA, 140 CsCl, 10 NaCl, 1 MgCl ₂ , 3 Mg-ATP, 5 HEPES; pH 7.2 ajustado con CsOH.

Tabla 1. Composición de las soluciones extracelular e intracelular empleadas para el registro de corrientes de calcio.

El protocolo utilizado para la construcción de la relación corriente ($I_{Ca^{2+}}$) – voltaje (V_{pulsos}) consistió en una serie de 15 pulsos de voltaje consecutivos sobre un potencial de fijación de -70 mV (V_h); cada pulso tenía un salto intermedio de 50 ms de duración con un incremento de 10 mV/pulso en un rango de voltaje de entre -60 y +80 mV (figura 16B). Las corrientes de calcio se expresaron al integrar la corriente de entrada respecto del tiempo para cada uno de los pulsos de despolarización dados. Los valores resultantes de la relación I-V se normalizaron en función del tamaño

celular, que fue dado como la capacidad de la membrana plasmática (condensador) en picofaradios (pF).

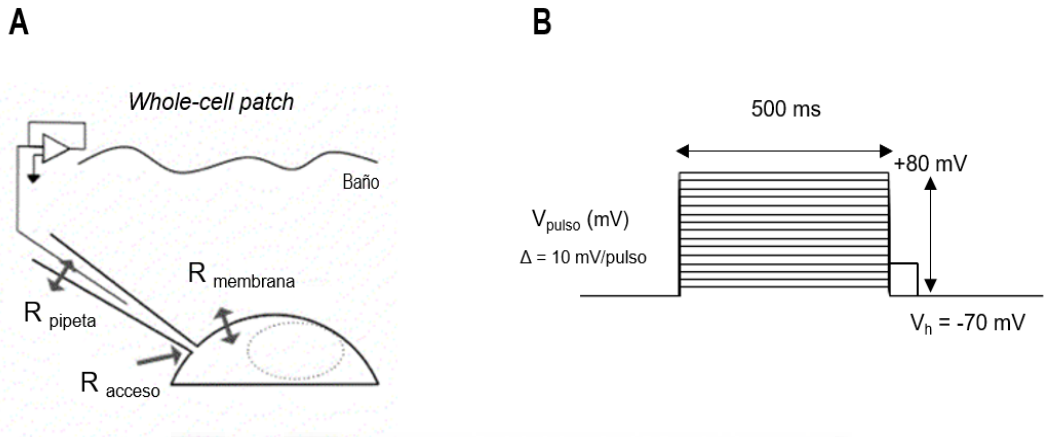


Figura 16. Registro de corriente de calcio. (A) Representación simplificada de los componentes y circuito eléctrico en *whole-cell* patch clamp. (B) Protocolo aplicado para la construcción de I-V de canales de calcio voltaje dependientes (Ca_v).

7.2. Registro de corrientes de potasio.

Para el registro de la corriente de potasio se empleó la misma configuración, técnica, frecuencia de adquisición y filtrado de la señal que para la medida de la corriente de calcio descrita en el apartado anterior. En la toma de datos, la única diferencia residió en la ganancia empleada, en este caso fue de 2 mV/pA. La composición de la solución extracelular perfundida y de la solución intracelular con que se rellenó la micropipeta aparece en la tabla 2.

	Composición (en mM)
Sol. extracelular	138 NaCl, 5.6 KCl, 1.2 MgCl ₂ , 2.6 CaCl ₂ , 5 HEPES, 5 glucosa; pH 7.4 ajustado con NaOH.
Sol. intracelular	10 EGTA, 120 KCl, 1 CaCl ₂ , 1 MgCl ₂ , 3 Mg-ATP, 10 HEPES; pH 7.2 ajustado con KOH.

Tabla 2. Composición de las soluciones extracelular e intracelular empleadas para el registro de corrientes de potasio.

El protocolo empleado para construir la relación $I_{K^+} - V_{\text{pulso}}$ consistió en una secuencia de 15 pulsos de voltaje sobre un potencial de membrana mantenido a -70 mV; en este caso el salto de voltaje se mantenía durante 500 ms, con un incremento de 10 mV en cada pulso hasta un máximo de despolarización de $+80$ mV. Tras el salto de voltaje, el potencial de membrana se mantuvo a -30 mV durante 50 ms antes de volver al V_h (figura 17). La relación $I_{K^+} - V_{\text{pulso}}$ se obtuvo al tomar el máximo de corriente evocada durante el pulso completo para cada despolarización dada.

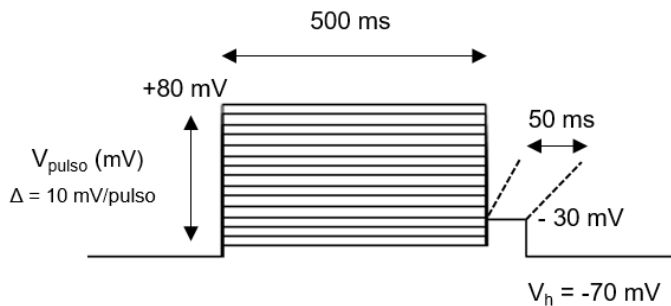


Figura 17. Registro de corriente de potasio. Protocolo aplicado para la construcción de $I - V$ de canales de potasio voltaje dependientes (K_v).

7.3. Registro de potencial de membrana.

La medida del potencial de membrana (V_{mp}) se llevó a cabo en configuración de parche perforado empleando la técnica de *current-clamp* (I-clamp), lo que conlleva la fijación de la corriente permitiendo cambios libres del voltaje. La composición de las soluciones extracelular e intracelular aparece detallada en la tabla 3.

	Composición (en mM)
Sol. extracelular	140 NaCl, 3.6 KCl, 0.5 MgCl ₂ , 1.5 CaCl ₂ , 10 HEPES; pH 7.4 ajustado con NaOH.
Sol. intracelular	76 K ₂ SO ₄ , 10 NaCl, 10 KCl, 1 MgCl ₂ , 5 HEPES; pH 7.35 ajustado con KOH.

Tabla 3. Composición de las soluciones extracelular e intracelular empleadas para el registro del potencial de membrana.

Para la permeabilización de la membrana plasmática en la región del parche, se añadieron 240 $\mu\text{g/ml}$ del antibiótico Anfotericina B (Sigma) a la solución intracelular; la formación de poros en la membrana plasmática dentro del parche proporcionó acceso eléctrico sin dializar el interior celular. Para monitorizar la eficacia del antibiótico y conseguir un acceso adecuado, los registros comenzaron en *voltage-clamp* y se siguió la disminución de la R_s hasta alcanzar un valor menor de 30 $\text{M}\Omega$. Una vez conseguido un acceso satisfactorio, se pasó a *current-clamp* sin inyección alguna de corriente (0 pA) y se registró el voltaje de la membrana durante un intervalo de tiempo determinado para una concentración de glucosa concreta en la solución de perfusión (típicamente 0 mM glucosa para valorar el potencial de reposo y 11 mM glucosa como concentración estimuladora de la actividad eléctrica

de la célula β). La composición de las soluciones, extracelular e intracelular, empleadas para el registro de la actividad eléctrica de la célula β se recoge en la tabla 3.

El análisis de todos los parámetros relacionados con el potencial de membrana se realizó mediante las herramientas disponibles del software Clamfit 9.0 (Axon Instruments, Union City, CA, USA), teniendo en cuenta todos los potenciales de acción (PA) disparados durante los 90 s posteriores al comienzo de la actividad. El análisis de estos PA se realizó a partir de un PA modelo generado por el software tomando como referencia los registros obtenidos; este PA de referencia fue utilizado para rastrear eventos similares en segmentos predeterminados del registro permitiendo el cálculo automático de los parámetros que serán referidos en este trabajo.

7.4. Registros de capacidad de membrana (C_m).

La medida de la capacidad de membrana (C_m) se realizó en configuración *whole-cell* empleando la técnica de *voltage-clamp*. Como en los registros descritos con anterioridad se empleó un amplificador Axopatch 200B, pero en este caso se empleó el software libre jClamp (SciSoft) para controlar los parámetros y componentes del sistema. La solución de perfusión empleada contenía (en mM): 118 NaCl, 5.6 KCl, 20 TEA-Cl, 1.2 MgCl₂, 5 CaCl₂, 5 HEPES (pH 7.4 ajustado con NaOH); la concentración de glucosa en la solución extracelular varía en función del experimento. La solución intracelular con la que se rellenaron las micropipetas fue (en mM): 0.05 EGTA, 140 CsCl, 10 NaCl, 1 MgCl₂, 3 Mg-ATP, 5 HEPES, 0.1 cAMP (pH 7.2 ajustado con CsOH).

La medida de capacitancia fue posible al introducir en el protocolo una estimulación de un solo seno, lo que quiere decir que sobre un V_h de -70 mV se hizo oscilar una senoide de 1 kHz de frecuencia y 20 mV de amplitud, que permitió

calcular la C_m a partir de la corriente sinusoidal resultante. Esta estimulación sinusoidal fue interrumpida para aplicar pulsos despolarizantes, los cuales permiten la movilización y exocitosis de vesículas de insulina; esta yuxtaposición consistió en un tren de 10 pulsos cuadrados de despolarización, que suponían un salto de voltaje sobre un V_h de -70 mV hasta 0 mV con una duración de 500 ms, aplicándose los pulsos con una frecuencia de 1 Hz (1 pulso/s) (figura 18). Durante la aplicación de los pulsos no es posible la medida de C_m debido al aumento de la conductancia (G) consecuencia de la activación de corrientes de Ca^{2+} voltaje-dependientes; estas interrupciones vienen a explicar el perfil característico que muestran las representaciones gráficas de ΔC_m . Los cambios en la capacidad (ΔC_m) se expresaron como el incremento máximo obtenido tras aplicar el tren de pulsos de despolarización, normalizado respecto al tamaño celular inicial (pF).

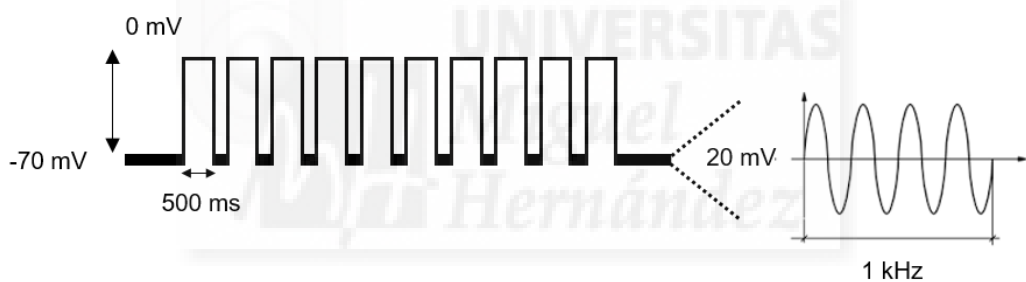


Figura 18. Protocolo empleado para la monitorización de ΔC_m . Se representa la aplicación de un tren de 10 pulsos de voltaje, aplicados sobre una estimulación sinusoidal de 1 kHz de frecuencia y 20 mV de amplitud.

7.5. Identificación de célula β mediante parámetros electrofisiológicos.

La existencia de numerosos tipos celulares en los islotes pancreáticos hace necesaria la identificación y discriminación entre los distintos tipos celulares que pudiésemos registrar. Para los registros electrofisiológicos de células β , las células que fueron pinchadas se seleccionaron *a priori* teniendo en cuenta su tamaño,

partiendo de la premisa de que el tamaño promedio de las células β es mayor que el de α o δ . Así mismo, al aplicar los protocolos predeterminados para el registro de la actividad eléctrica, encontramos que, por definición, la contribución a través de Na_v es prácticamente inexistente en célula β a voltajes en los que se disparan potenciales de acción, mientras que sí se detecta corriente de Na^+ a potenciales despolarizados en células α o δ (Gopel *et al.*, 1999). Para evaluar la inactivación voltaje-dependiente de Na_v se empleó un protocolo de 16 barridos sobre un V_h de -70 mV que consisten en un primer segmento o *pre-pulso* de 50 ms de duración con saltos de voltaje de -150 a 0 mV incrementándose el voltaje 10 mV en cada barrido; a continuación se aplicó un pulso cuadrado desde V_h a $+10$ mV con una duración de 5 ms. En el caso de las células β , voltajes a valores hiperpolarizantes en el *pre-pulso* permiten la deinactivación de Na_v . La magnitud de la corriente resultante se expresó en función del voltaje del *pre-pulso*, y las curvas $I_{\text{Na}^+} - V_{\text{prepulso}}$ permitieron la categorización de las células registradas, ya que en las células β la conductancia de Na^+ es prácticamente nula ya a voltajes de *pre-pulso* similares al potencial de reposo.

8. DETERMINACIÓN DE LA SECRECIÓN Y CONTENIDO DE INSULINA.

8.1. Secreción estática de insulina.

Una vez concluido el período de exposición en cultivo a BPA, se hicieron grupos homogéneos de 5 islotes en una placa de 24 pocillos y se preincubaron durante 2 horas en medio de secreción [composición (en mM): 140 NaCl, 5 KCl, 20 HEPES, 1 MgCl₂, 2.5 CaCl₂; pH 7.4] con una concentración no estimuladora de glucosa (3 mM), 1 g/L BSA y que contenía los tratamientos en las mismas condiciones que el cultivo previo. Transcurrido este período, los grupos de islotes fueron transferidos a 400 μl de buffer de secreción (sin BSA) que incluía los estímulos según correspondiese. En estas condiciones, la secreción de insulina se prolongó durante 1 hora a 37°C y 5% saturación de CO_2 . Al finalizar la incubación, se añadió a cada pocillo una solución concentrada de BSA hasta conseguir una concentración del 1%

en un volumen final de secreción de 500 μ l. La secreción fue interrumpida definitivamente a baja temperatura, y para ello las placas fueron depositadas durante 15 minutos en un lecho frío. Los grupos de islotes fueron recuperados cuidadosamente en un volumen constante de 5 μ l de medio, y depositados en 20 μ l de buffer de lisis (70% EtOH/ 0.12% HCl). Este lisado celular se mantuvo *overnight* a 4°C y en agitación para facilitar su completa homogenización. Por otro lado, el medio de secreción se recogió en viales de vidrio, que fueron sellados y almacenados ultracongelados (-80°C) hasta el momento de la cuantificación de insulina.

8.2. Determinación del contenido y secreción de insulina.

La cuantificación de la insulina secretada y del contenido de insulina de los islotes se realizó empleando el kit *Mouse Insulin ELISA* (Merckodia AB, Uppsala, Suecia). Para ello se procedió siguiendo el protocolo descrito por el fabricante, empleando 10 μ l del secretado o lisado de los islotes. Para ajustarse al rango de detección del kit (< 0.2 μ g/l), las muestras colectadas de secreción y contenido fueron diluidas 1:10 y 1:100 respectivamente. Las lecturas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro iMark Microplate Reader (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

8.3. Cuantificación de proteína total.

La cantidad de proteína total de cada grupo de islotes empleados en la secreción se valoró espectrofotométricamente mediante el método de Bradford. Esta cuantificación permite la normalización de los datos de secreción y contenido de insulina, anulando cualquier cambio que pueda deberse a diferencias en el tamaño de los islotes de Langerhans. La cuantificación de proteína total se realiza a partir de 10 μ l del lisado de los islotes (dilución 1:1000), a los que se les añade 200 μ l de reactivo de Bradford. Esta mezcla se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Inmediatamente después, se obtuvo un valor de absorbancia a 595 nm para

cada una de las muestras empleando un espectrofotómetro iMark Microplate Reader (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). La concentración de proteína se obtuvo a partir de una recta patrón elaborada empleando concentraciones crecientes de BSA (0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mg/ml).

9. OBTENCIÓN DE ARN Y RT-PCR CUANTITATIVA.

9.1. Extracción de ARN de islote de Langerhans.

La extracción de ARN de islote de Langerhans se realizó a partir de grupos de 200–250 islotes. Transcurrido el tiempo de exposición en cultivo, los grupos de islotes son colectados, transferidos a un vial tipo Eppendorf y mantenidos en frío. Antes de proceder con la extracción, la muestra con islotes fue centrifugada y lavada con PBS para eliminar los restos del medio de cultivo. La purificación del ARN total se realizó empleando el kit comercial RNeasy Micro (Qiagen), el cual está especialmente indicado para la extracción de ARN de muestras pequeñas. Debido a la naturaleza de la muestra que nos ocupa, el tampón de lisis comercial RLT se suplementó con 0.01% β -mercaptoetanol intentando prevenir la actividad ARNasa. Una vez obtenido el lisado, se procedió a la purificación de ARN siguiendo los pasos descritos por la casa comercial. La concentración de ARN de las muestras se cuantificó empleando el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). La pureza de la muestra de ARN fue evaluada mediante el valor de la razón entre las absorbancias obtenidas a 260 y 280 nm; las muestras con un ratio $260/280 \approx 2.0$ fueron consideradas aptas para su uso. Las muestras de ARN se mantuvieron ultracongeladas (-80°C) hasta su uso para la retrotranscripción.

9.2. Retrotranscripción.

Mediante retrotranscripción o transcripción reversa (RT, del inglés *reverse transcription*) obtuvimos el ADN complementario (ADNc) del ARNm purificado para cada una de las muestras. La RT se realizó empleando el kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), y tuvo lugar en un termociclador CFX96 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) empleando el programa convencional que aparece en la tabla 4. La RT tuvo lugar a partir de 0.5 µg de ARN, y a la mezcla de reacción se añadió un inhibidor de ribonucleasas (RNase Inhibitor, Ambion®, Thermo Fisher Scientific).

	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4
Temperatura	25°C	37°C	85°C	4°C
Tiempo	10 min	120 min	5 min	∞

Tabla 4. Condiciones programadas para la reacción de retrotranscripción.

9.3. PCR a tiempo real.

La determinación cuantitativa de los niveles de expresión de los mensajeros de genes de interés tuvo lugar mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR, del inglés *quantitative PCR*). Las amplificaciones se realizaron a partir de 1 µl de ADNc en un volumen final de 10 µl; la mezcla de reacción contenía 200 nM de los cebadores directo y reverso, e IQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador CFX96 Real Time System (Bio-Rad) empleando el protocolo que se especifica en la tabla 5.

Pre- Incubación	Amplificación			Curva de Melting	
	95°C	95°C	60°C	72°C	65°C
3 min	5 s	5 s	10 s	5 s	---
1x	D	H	P	1x	
	45x				

Tabla 5. Condiciones programadas para qPCR. *D* = desnaturalización; *H* = hibridación; *P* = polimerización.

En esta técnica la cuantificación es posible debido a las propiedades del fluoróforo SYBR Green I; esta sonda ve aumentada significativamente su emisión de fluorescencia cuando se intercala en ADN de doble cadena. Este valor de fluorescencia emitida es el parámetro que toma el equipo al finalizar cada ciclo de amplificación; este dato es directamente proporcional al número de copias sintetizadas y depende, por lo tanto, de la cantidad de ADNc de partida. Las lecturas de fluorescencia obtenidas fueron analizadas con el programa CFX Manager (v1.6, Bio-Rad), y los niveles de expresión de cada gen de interés se expresaron respecto de los niveles de un gen de expresión constitutiva, y fueron hallados mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, donde C_t es el valor referido al número de ciclos necesarios para producir un incremento significativo de fluorescencia respecto de la señal basal, y donde $\Delta C_t = C_{t \text{ gen diana}} - C_{t \text{ gen endógeno}}$.

Las parejas de cebadores utilizados para la amplificación de los genes de interés aparecen recogidas en la tabla 6. Los cebadores utilizados muestran preferencialmente las siguientes características: son complementarios a secuencias interexónicas para asegurar la amplificación exclusiva de mensajeros; longitud ≈ 20 pb; temperatura de melting $\approx 60^\circ\text{C}$; amplicón < 200 pb. La especificidad de los productos de amplificación se comprobó mediante un doble chequeo. En primer

lugar, empleando herramientas bioinformáticas (Primer-BLAST, NCBI). Por otro lado, la especificidad se evaluó atendiendo a la curva de melting de cada par de cebadores generada al completarse el proceso de amplificación; la obtención de un único pico sugiere la síntesis de un único amplicón.

Gen símbolo	Directo (5'-3')	Reverso (5'-3')	Amplicón (pb)	Nº acceso GenBank
<i>Hprt</i>	-GGTTAAGCAG TACAGCCCCA-	-TCCAACACTT CGAGAGGTCC-	73	NM_013556
<i>Cacna1c</i>	-GAGCCACGGT GAATCAGGA-	-GCAGTACTCGG CTTCTTCACTCA-	74	NM_009781
<i>Cacna1e</i>	-CCGATGATGA TGAGAGGGAT-	-TGCTGACTGT CTTCCAATGC-	118	NM_009782

Tabla 6. Cebadores empleados en las reacciones de amplificación en la PCR cuantitativa.

10. ESTADÍSTICA.

Los datos se representan como el promedio \pm error estándar. Se ha aplicado *Student's t-test* o *ANOVA* en función del número de condiciones experimentales y los requisitos comparativos de cada ensayo en particular. Cuando el muestreo no cumplía las asunciones particulares para la aplicación de test paramétricos, se utilizó estadística no-paramétrica. Independientemente del test utilizado, se considera significativa la diferencia entre grupos cuando $p \leq 0.05$.

RESULTADOS



1. LA FORMA DEL POTENCIAL DE ACCIÓN ESTÁ ALTERADA EN LAS CÉLULAS β QUE HAN SIDO EXPUESTAS A 1 nM BPA.

Para investigar las acciones directas que el BPA tiene sobre la funcionalidad de la célula β , evaluamos en primer lugar su actividad eléctrica. Para ello, empleamos cultivos primarios de células de islote expuestas durante 48 horas a 1 nM BPA. En este caso, los registros se realizaron en configuración de parche-perforado, ya que era fundamental evitar la diálisis del medio intracelular y así preservar la capacidad metabólica de las células. Cuando fueron perfundidas con 11 mM glucosa, las células β de ambos grupos presentaron el patrón de actividad eléctrica típico de este tipo celular (figura 19A), pero las células cultivadas en presencia de 1 nM BPA presentaron diversas alteraciones en las propiedades de los potenciales de acción generados en respuesta a 11 mM glucosa. El potencial de membrana en reposo no varía en las células expuestas a BPA, al perfundir con una concentración subestimuladora de glucosa (3 mM), éste se mantuvo alrededor de -70 mV independientemente de la condición experimental. Al incrementar la concentración de glucosa a 11 mM en la solución extracelular, las células β de ambos grupos se despolarizaron progresivamente hasta alcanzar el umbral de disparo de potenciales de acción. A 11 mM glucosa, el V_m alcanzado en esta fase activa (línea base del potencial de acción) fue -52.9 ± 1.9 mV en las células control, y -53.1 ± 2.5 mV en las células BPA ($n = 11$ células / condición). Tampoco hallamos diferencia alguna en la frecuencia de disparo que mostraron las células β de uno u otro grupo (CTL = 4.2 ± 0.2 Hz; BPA = 4.4 ± 0.1 Hz). Sin embargo, encontramos que la exposición a 1 nM BPA provocaba cambios significativos en el perfil de las espigas (figura 19B). En primer lugar, la amplitud de los potenciales de acción fue significativamente menor en las células β cultivadas con BPA (figura 19C; CTL = 50.8 ± 0.4 mV; BPA = 43 ± 0.4 mV). En segundo lugar, las células β expuestas a BPA mostraron una fase de repolarización del potencial de acción más lenta, lo que supuso espigas de mayor duración en las células tratadas con BPA. Este cambio se refleja en el parámetro referido al tiempo transcurrido (en ms) para completar la mitad de un período entre dos espigas (figura 19D; CTL = 12.5 ± 0.2 ms; BPA = 13.6 ± 0.2 ms). Tomando en

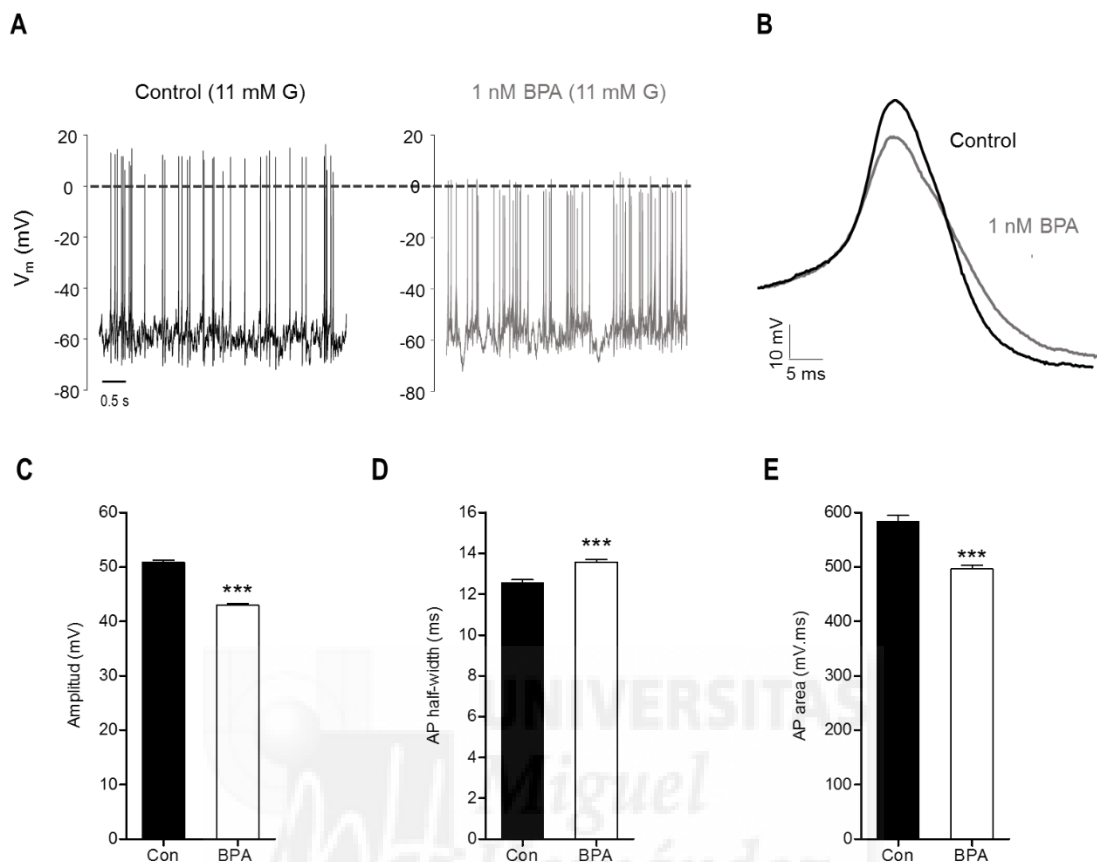


Figura 19. Caracterización del potencial de acción en células β que han sido expuestas a 1 nM BPA durante 48 h. (A) Registros representativos de la actividad eléctrica generada a 11 mM glucosa en células control (izq.) o BPA (drcha.). (B) Detalle de la forma de los potenciales de acción (11 mM glucosa) generados en células control (línea negra) o BPA (línea gris), que han sido superpuestos para facilitar su comparación. (C) Análisis de la amplitud de los potenciales de acción generados en células control o BPA al perfundir una solución extracelular con 11 mM glucosa. (D) Análisis de la duración de los potenciales de acción en células control o BPA, tomando el parámetro *AP half-width*. (E) Análisis del área bajo el potencial de acción en células control o BPA, este parámetro resulta de la relación entre la amplitud (mV) y la anchura (ms) del mismo. $n = 11$ células / condición. En (C-E) se analizaron 1600 potenciales de acción de células control y 1780 potenciales de acción en células tratadas con 1 nM BPA. Student's *t*-test: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

conjunto ambos parámetros, encontramos que el área bajo cada potencial de acción es significativamente menor en las células β expuestas a 1 nM BPA durante 48 horas (figura 19E; CTL = 583.2 ± 11.4 mV.ms; BPA = 496.5 ± 7.2 mV.ms). Finalmente, las células BPA también mostraron diferencias en el potencial alcanzado en la fase refractaria, con valores de amplitud del anti-pico significativamente reducidos (CTL = 8.4 ± 0.1 mV; BPA = 7.7 ± 0.1 mV).

2. LA EXPOSICIÓN CRÓNICA A DOSIS MEDIOAMBIENTALES DE BPA ALTERA LA HOMEOSTASIS DE $[Ca^{2+}]_i$ EN CÉLULAS β PANCREÁTICAS.

Como ya se explicó en el capítulo introductorio, el patrón de disparo de ráfagas de potenciales de acción en la célula β genera sus características oscilaciones intracelulares de Ca^{2+} . El ion Ca^{2+} actúa como segundo mensajero participando en multitud de procesos subcelulares (cascadas de señalización intracelular, actividad enzimática, movilización de motores del citoesqueleto, etc.). En el caso de la célula β pancreática, el ion Ca^{2+} desempeña un papel principal en el acoplamiento estímulo-secreción: el aumento de la concentración de glucosa en plasma supone un incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ en la célula β que, a su vez, hace posible la movilización y exocitosis de gránulos de insulina. Por lo tanto, cualquier perturbación referida a la gestión de la $[Ca^{2+}]_i$ en la célula β puede alterar sensiblemente su funcionalidad, afectando probablemente su capacidad secretora. Ya que encontramos que el BPA actúa sobre la célula β provocando cambios manifiestos en su actividad eléctrica, a continuación decidimos explorar si la exposición sostenida y directa a BPA tenía consecuencias en la célula β en cuanto a la señalización de Ca^{2+} , para ello usamos técnicas de microfluorimetría con sondas sensibles a Ca^{2+} , fura-2 o fluo-4, que empleamos en función de los requerimientos de cada experimento. Para llevar a cabo una valoración más completa, optamos por monitorizar la señal de Ca^{2+} en dos preparaciones distintas: islotes de Langerhans intactos o células individualizadas de islote.

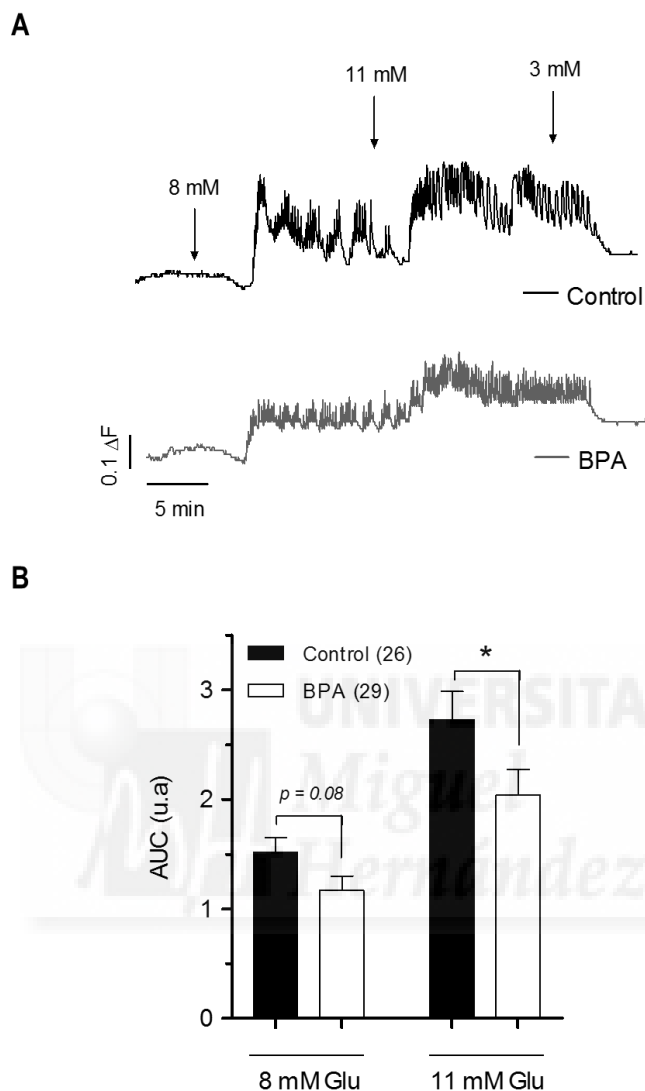


Figura 20. Variación de $[Ca^{2+}]_i$ provocada por glucosa en islotes intactos expuestos durante 48h a 1 nM BPA. (A) Registros representativos del calcio movilizado al incrementar en la solución externa la [glucosa] en la secuencia creciente que aparece indicada en islotes intactos cultivados en ausencia o presencia de 1 nM BPA. **(B)** Análisis del área bajo la curva (AUC) de los experimentos mostrados en (A). Entre paréntesis se muestra el número de islotes registrados para cada condición experimental. Mann-Whitney test, * $p \leq 0.05$.

En primer lugar, monitorizamos las señales intracelulares de Ca^{2+} en islotes intactos cultivados durante 48 horas en presencia de 1 nM BPA. Una vez incubados con la sonda fura-2, los islotes fueron estimulados con concentraciones crecientes de glucosa, 8 y 11 mM, a partir de una concentración basal de glucosa de 3 mM. Cuando son expuestos a concentraciones estimulantes de glucosa (> 7 mM), los islotes de Langerhans muestran un patrón bifásico de oscilaciones de Ca^{2+} muy característico (figura 20A): la primera fase tras la estimulación consiste en un transitorio inicial de amplio período cuya amplitud es proporcional a la concentración extracelular de glucosa; y una segunda fase que sigue a este pico inicial y que consiste en un patrón más o menos constante de oscilaciones de mayor frecuencia y menor amplitud, parámetros que dependen nuevamente de la concentración de glucosa, de tal modo que, una concentración más elevada de glucosa suele traducirse en oscilaciones más duraderas y de menor frecuencia en esta segunda fase. En estos experimentos, empleamos el parámetro *área bajo la curva* (AUC, del inglés *Area Under Curve*) como indicador global de la entrada de Ca^{2+} , y observamos que el AUC de los islotes cultivados en presencia de 1 nM BPA apareció disminuida cuando son estimulados con 11 mM glucosa (CTL = 2.73 ± 0.26 u.a.; BPA = 2.04 ± 0.24 u.a.); esta disminución no fue significativa estadísticamente cuando se empleó una concentración de glucosa menor, 8 mM en este caso (CTL = 1.52 ± 0.14 u.a.; BPA = 1.17 ± 0.13 u.a.). Estos resultados indican que la exposición sostenida a BPA provoca que las señales de Ca^{2+} en los islotes pancreáticos aparezcan disminuidas al incrementarse la concentración extracelular de glucosa (figura 20B).

Alternativamente, se analizaron las señales de Ca^{2+} inducidas por glucosa en células individuales del islote. En este caso, el cultivo primario de células pancreáticas se mantuvo también durante 48 horas en presencia de 1 nM BPA. Pasado este tiempo, y una vez incubadas con la sonda fura-2, las células fueron estimuladas con 11 mM glucosa, a partir de una concentración basal de 3 mM glucosa. El patrón de actividad que mostraron las células a baja o alta concentración de glucosa permitió distinguir la célula β de los otros tipos celulares del islote. Al

incrementar la concentración de glucosa en la solución extracelular, se produjo un incremento de $[Ca^{2+}]_i$ en las células β , las cuales exhibieron patrones de actividad muy desiguales y totalmente asincrónicos (figura 21A). El incremento máximo de fluorescencia (F_{max}) fue significativamente de menor amplitud en las células expuestas a 1 nM BPA (CTL = 0.89 ± 0.03 u.a.; BPA = 0.66 ± 0.05 u.a.) (figura 21B). Así mismo, cuando analizamos el porcentaje de células que mostraron actividad al ser estimuladas con 11 mM glucosa, encontramos que este porcentaje era significativamente menor en el grupo tratado con BPA: mientras que en el grupo control respondían alrededor del 60% de las células, sólo un 33% de las células expuestas a BPA mostraron actividad al aumentar la concentración de glucosa. Este cambio sugiere que la exposición a BPA provoca un menor reclutamiento de células β en respuesta a concentraciones estimulatorias de glucosa.

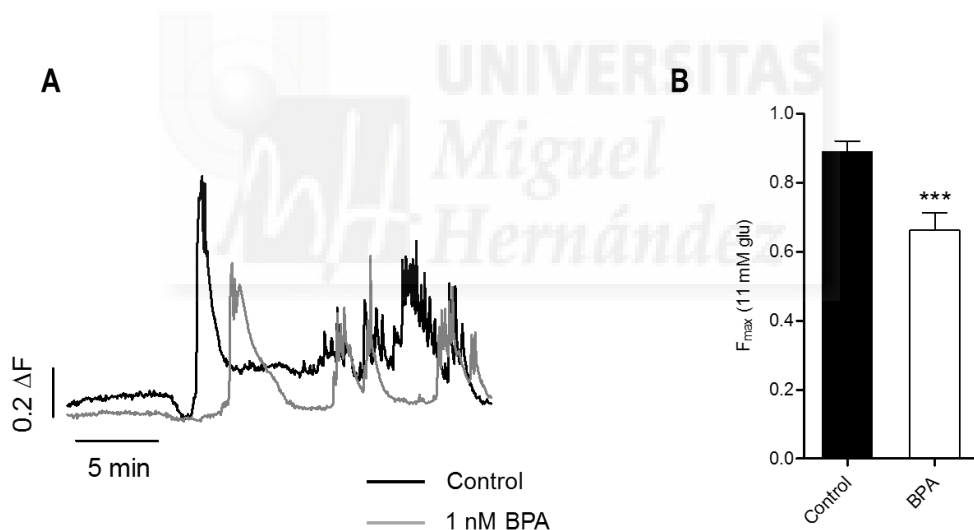


Figura 21. Variación de $[Ca^{2+}]_i$ en células β aisladas expuestas durante 48h a 1 nM de BPA. (A) Registros representativos de células tratadas con 1 nM BPA o vehículo isovolumétrico obtenidos al incrementar la $[glucosa]_{ext}$ a 11 mM (B) Incremento máximo de fluorescencia (F_{max}) registrado en el grupo de células que responden para cada uno de los grupos experimentales descritos. Células control, $n = 38$; células BPA, $n = 21$. Student's *t*-test: $*** p < 0.001$.

Una vez descrita la disminución de las señales de Ca^{2+} inducidas por una concentración elevada de glucosa en el medio externo, nos dispusimos a valorar si esta alteración era consecuencia de cambios a nivel metabólico, o si se daba también al despolarizar las células individuales con estímulos no metabólicos. Para ello empleamos concentraciones elevadas de K^+ en la solución extracelular, 20 mM o 65 mM KCl, añadiendo además 100 μM diazóxido a fin de permeabilizar la célula y facilitar los flujos de K^+ . Este protocolo de estimulación permite explorar de forma sencilla y rápida las causas de la disminución de las señales de Ca^{2+} , e indicaría que la alteración se produce a nivel de la entrada de Ca^{2+} a través de canales voltaje-dependientes. Aplicando la ecuación de Nernst, una $[\text{K}^+]_o$ de 20 y 65 mM equivale a un salto de voltaje desde el potencial de reposo hasta, aproximadamente, -45 y -15 mV respectivamente. En este experimento, las células fueron cultivadas durante 48 horas en presencia de 0.1, 1, 10 y 100 nM BPA, lo que nos permitió construir una curva dosis-respuesta. En este caso, las células fueron estimuladas durante 3 min, y la rápida despolarización de las mismas provoca un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en forma de un único pico de fluorescencia (figura 22A). El parámetro analizado en estos experimentos fue la amplitud del ΔF en el pico. Cuando perfundimos con 65 mM K^+ , observamos que la amplitud de la señal de fluorescencia es significativamente menor en las células expuestas a 0.1 y 1 nM BPA, siendo la diferencia más acusada en 1 nM BPA, donde la señal aparece reducida un 22% (CTL = 0.93 ± 0.01 u.a.; BPA = 0.72 ± 0.02 u.a). Esta alteración no aparece cuando las células fueron incubadas con concentraciones más elevadas de BPA, 10 y 100 nM (figura 22C). Por lo tanto, la exposición a BPA provoca un defecto en la movilización de Ca^{2+} en la célula β siguiendo una curva no monotónica. Al perfundir con 20 mM K^+ y, por lo tanto, al inducir una despolarización menor en las células, las diferencias aparecen nuevamente, aunque en este caso la reducción hallada cuando incubamos con 1 nM BPA es menor (17%) (figura 22B). Tal como se esperaba, la amplitud de la señal inducida por 65 mM K^+ es significativamente mayor a la generada por 20 mM K^+ para cualquier concentración de BPA empleada. Estos resultados parecen indicar que los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ son debidos a una alteración en la entrada de Ca^{2+} cuando la célula se despolariza.

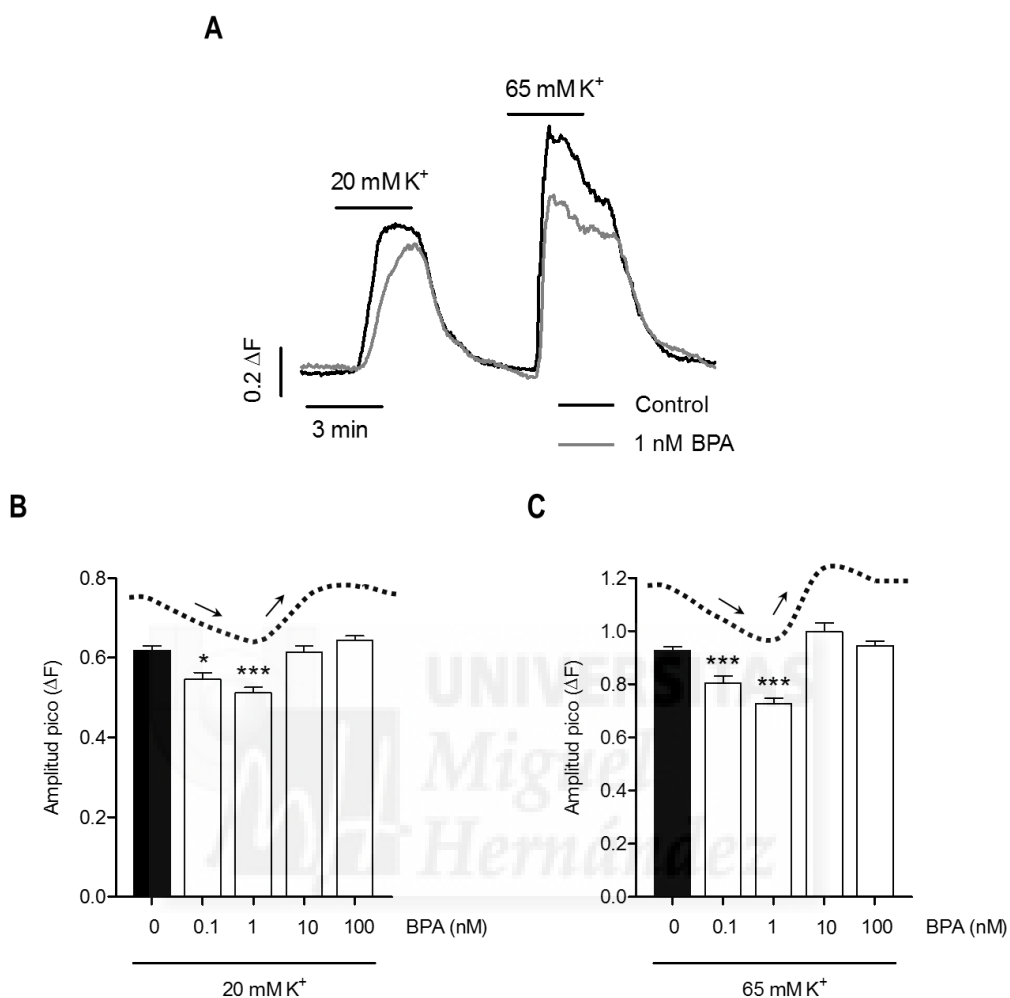
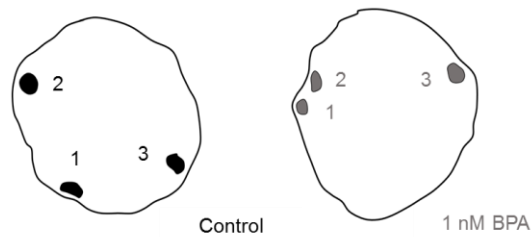


Figura 22. Variación de $[Ca^{2+}]_i$ en células β aisladas expuestas durante 48h a 0.1, 1, 10 y 100 nM BPA en respuesta a despolarizaciones no metabólicas inducidas por $[K^+]_o$ elevadas. (A) Registros representativos de la variación de $[Ca^{2+}]_i$ en células individuales expuestas a vehículo isovolumétrico o 1 nM BPA al incrementar la $[K^+]_o$ a 20 mM y 65 mM secuencialmente empleando en la solución externa 3 mM glucosa y 100 μ M diazóxido. (B) y (C) Variación promedio de fluorescencia (ΔF) en células aisladas cultivadas en presencia de concentraciones crecientes de BPA al perfundir las concentraciones de $[K^+]_o$ tal como se indican en (A). Empleando 1-way ANOVA (Dunnnett's test): * $p \leq 0.05$, * $p < 0.001$ respecto del control para la misma $[K^+]_o$. Células control, $n = 139$; 0.1 nM BPA, $n = 83$; 1 nM BPA, $n = 145$; 10 nM BPA, $n = 66$; 100 nM BPA, $n = 78$.**

A



B

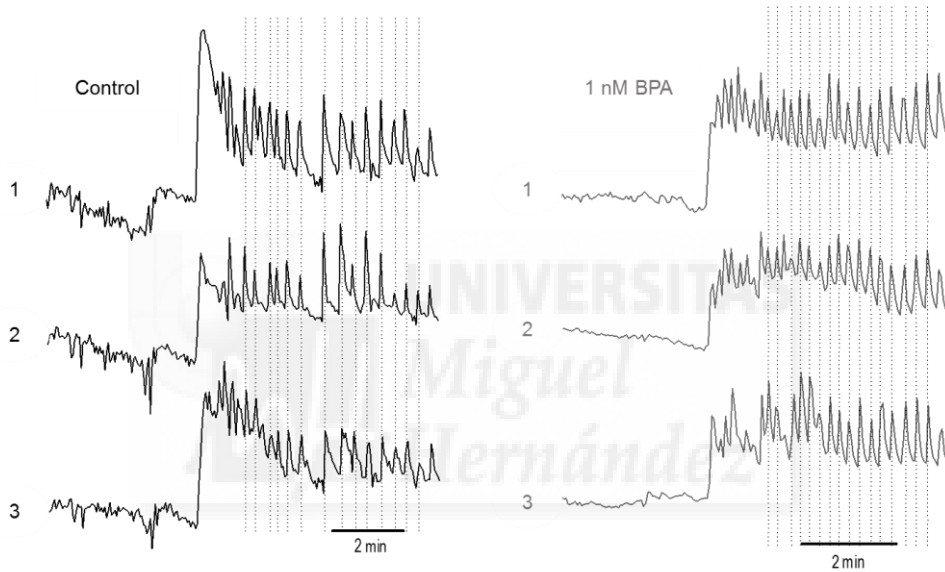


Figura 23. Sincronía y acoplamiento de células β en islotos intactos expuestos a 1 nM BPA durante 48h. (A) Representación esquemática de la ubicación en los islotos control o tratados con 1 nM BPA de las células cuya actividad se muestra en (B) y (C). (B) Variación de $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a 11 mM glucosa en células β aisladas de islotos control. Se muestran tres trazos representativos de células β aisladas de un mismo islo, cuya posición se muestra en (A). (C) Igual que en (B) pero en el caso de islotos cultivados en presencia de 1 nM BPA durante 48h. En (B) y (C) los registros que se muestran son representativos para el estudio de la sincronía en célula β a partir de los obtenidos en 49 células de 4 islotos control y 44 células de 4 islotos BPA.

Finalmente, decidimos evaluar si la exposición a BPA altera la sincronía de las células β dentro del islote de Langerhans, ya que alteraciones en el acoplamiento eléctrico de las mismas también podrían contribuir a una disminución de los niveles de $[Ca^{2+}]_i$. Para ello se llevaron a cabo experimentos de microfluorimetría con la sonda fluo-4 mediante microscopía confocal. En estos experimentos se emplearon nuevamente islotes intactos mantenidos en presencia de 1 nM BPA durante 48 horas. Ya en la platina de registro, estos islotes fueron estimulados con 11 mM glucosa en la solución extracelular. Como ocurría al registrar la señal del islote completo con microscopía de epifluorescencia (fura-2), las células β del islote muestran la típica respuesta bifásica del incremento de $[Ca^{2+}]_i$ al ser estimuladas con 11 mM glucosa. El alineamiento temporal de la respuesta de varias células β dentro del mismo islote nos permitió analizar la sincronía de las mismas. A este respecto, descartamos cualquier alteración debida a la incubación con BPA: las respuestas de Ca^{2+} son perfectamente sincrónicas tanto a nivel del primer transitorio como del patrón oscilatorio posterior en ambos grupos de islotes, control o tratados con BPA, descartando alteraciones en la sincronía debidas a la exposición a BPA (figura 23).

3. LAS CÉLULAS β EXPUESTAS DURANTE 48 HORAS A 1 nM BPA MUESTRAN ALTERACIONES EN SU EXOCITOSIS.

Como se describió con anterioridad, la exocitosis de gránulos de insulina por parte de la célula β demuestra una estrecha dependencia respecto del incremento de la $[Ca^{2+}]_i$. Nuestro siguiente objetivo consistió en el análisis de las consecuencias fisiológicas de la reducción de la entrada de Ca^{2+} debida a BPA. Decidimos, en primer lugar, estudiar si esta alteración se correlacionaba con modificaciones en la capacidad excitotónica de estas células. Para ello, realizamos registros de capacitancia (ΔC_m) en células aisladas de islote de Langerhans, las cuales se han mantenido durante 48 horas en presencia o no de 1 nM BPA. Estos registros de ΔC_m siempre se acompañaron con medidas de corriente de Ca^{2+} . Para una exploración más

exhaustiva, estos experimentos se realizaron con dos concentraciones distintas de glucosa en el medio extracelular, 5 y 11 mM, lo que nos permitió estudiar cómo la glucosa está afectando al proceso en ambos grupos experimentales.

En nuestros experimentos, el ΔC_m se debe a la $[Ca^{2+}]_i$ acumulada debido a un tren de 10 pulsos de 500 ms de duración desde V_h a 0 mV, aplicados con una frecuencia de 1 Hz. El parámetro analizado en nuestro estudio fue el incremento total acumulado al completarse la estimulación, siempre normalizado por el tamaño celular. Esta medida está integrada tanto por los gránulos anclados en microdominios citoplasmáticos próximos a la membrana plasmática o RRP (del inglés, *Ready Releasable Pool*), como por gránulos de insulina movilizados con posterioridad desde reservas más alejadas. La descarga del RRP se asocia al incremento de capacitancia tras los dos primeros pulsos del protocolo (Hoppa *et al.*, 2009). Cuando empleamos una concentración no estimuladora de glucosa en la solución extracelular (5 mM), el ΔC_m total fue 51.7 ± 5.2 fF/pF en las células control y 38.0 ± 3.5 fF/pF en las células BPA, lo que supuso una reducción significativa de la exocitosis en las células β expuestas a 1 nM BPA por 48 horas (figura 24A y 24B). De forma inversa, cuando la concentración de glucosa en el baño se incrementó a 11 mM, las células expuestas a 1 nM BPA presentaron un incremento significativo de la exocitosis (control = 45.4 ± 6.4 fF/pF; BPA = 70.3 ± 8.0 fF/pF) (figura 24C y 24D). Si atendemos al comportamiento de las células control, observamos que los valores obtenidos a 5 y 11 mM glucosa son similares, esto es explicable porque el voltaje está controlado por los parámetros que predeterminamos en el amplificador y no dependen de la $[ATP]_i$. Sin embargo, los resultados expuestos sugieren que debe existir en las células BPA un mecanismo amplificador de la exocitosis, el cual debe ser dependiente del metabolismo de la glucosa, pero ajeno al control que ejerce la $[ATP]_i$ sobre la excitabilidad de la célula β .

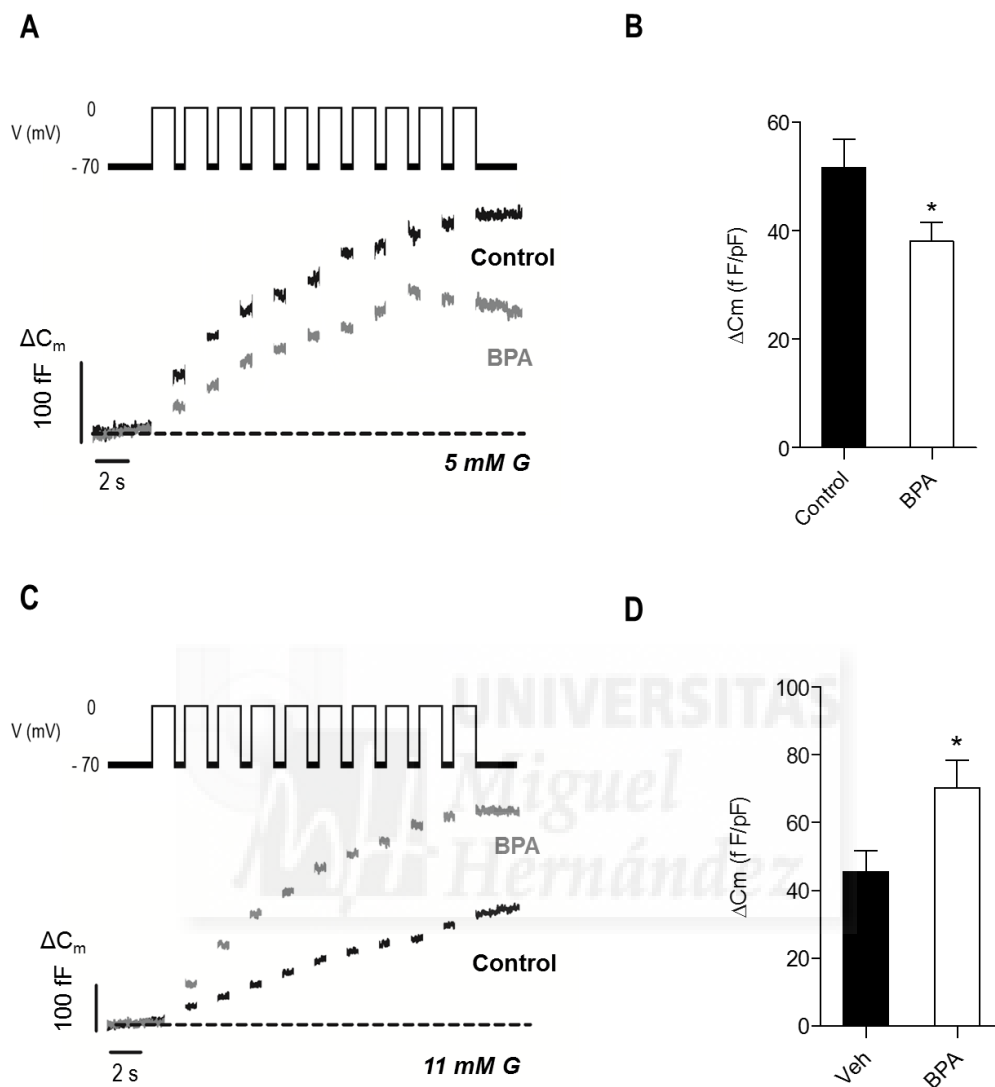


Figura 24. Exocitosis en células β aisladas expuestas a 1 nM BPA durante 48 h. Registros representativos del ΔC_m evocado por un tren de 10 pulsos despolarizantes de larga duración en células control o BPA empleando en la solución externa 5 mM glucosa (A) o 11 mM glucosa (C). (B) y (D) Análisis de los experimentos mostrados en A y C respectivamente, el parámetro cuantificado es el ΔC_m total acumulado normalizado por el tamaño celular. Para los experimentos en A y B: control, $n = 20$; BPA, $n = 21$. Para los experimentos en C y D: control, $n = 13$; BPA, $n = 18$. Student's *t*-test: * $p \leq 0.05$.

4. LOS ISLOTES INCUBADOS DURANTE 48 HORAS CON 1 nM BPA CONTIENEN MÁS INSULINA Y PRESENTAN IMPORTANTES ALTERACIONES EN LA SECRECIÓN DE INSULINA.

Teniendo en cuenta los resultados expuestos con anterioridad, decidimos analizar las consecuencias que tiene la exposición a BPA en la función secretora de las células β . Con este fin, transcurridas las 48 horas de incubación, se valoró la capacidad de secreción *in vitro* de los islotes de Langerhans como respuesta ante distintos estímulos despolarizantes. En cuanto al contenido de insulina, los islotes incubados con 1 nM BPA durante 48 horas muestran un incremento significativo del mismo, los valores obtenidos fueron 18.16 ± 1.56 $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína para los islotes del grupo control y 29.60 ± 4.66 $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína en los islotes expuestos a 1 nM BPA durante 48 horas (figura 25A). Por un lado empleamos como estímulo para la secreción una $[\text{K}^+]_o$ de 65 mM, esto nos permitió valorar la capacidad secretora de la célula β independientemente de su estado y/o capacidad metabólica, mostrando tan solo la secreción de insulina debida a la entrada Ca^{2+} tras despolarizar la membrana. En este caso, la respuesta secretora de los islotes expuestos a 1 nM BPA se hallaba reducida aproximadamente a la mitad, los valores obtenidos fueron 35.69 ± 7.32 ng/mg proteína en los islotes control y 18.00 ± 2.71 ng/mg proteína en los islotes BPA (figura 25B). Esta diferencia se mantuvo al expresar los datos de secreción en relación al contenido de insulina de los islotes. Alternativamente, empleamos concentraciones crecientes de glucosa (3, 8 o 16 mM glucosa) como estímulo durante la secreción. En este caso, observamos que el incremento de la concentración extracelular de glucosa provocó, como era esperable, un aumento progresivo de la secreción de insulina en los islotes control a 3, 8 y 16 mM glucosa respectivamente. En los islotes incubados con BPA, los valores de secreción aparecieron aumentados respecto de los controles para las concentraciones estimuladoras de glucosa empleadas (figura 25C). Cuando los datos de secreción se expresaron normalizados por el contenido de insulina del islote, es decir, como el porcentaje de insulina secretado, se mantuvo un aumento significativo de la secreción en respuesta a 8 mM glucosa en los islotes BPA (control $\approx 0.15\%$; BPA $\approx 0.25\%$). Sin embargo, la

diferencia a 16 mM glucosa se neutralizaba (control $\approx 0.56\%$; BPA $\approx 0.59\%$) (figura 25D). Por lo tanto, encontramos que el BPA tiene acciones opuestas en la secreción de insulina, dependiendo de si ésta implica o no al metabolismo de la glucosa.

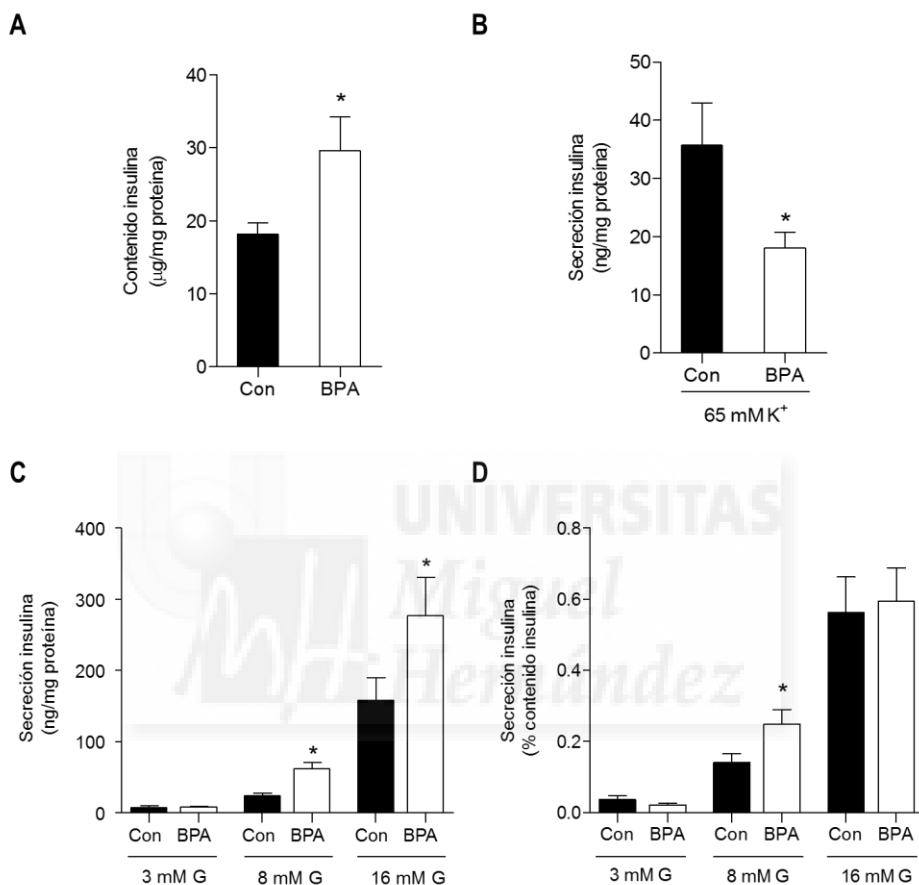


Figura 25. Contenido y secreción de insulina de islotes expuestos a 1 nM BPA durante 48 h. (A) Contenido de insulina normalizado en islotes control o expuestos a 1 nM BPA. (B) Secreción de insulina normalizada de islotes control o BPA como respuesta a la incubación estática con una solución que contenía 65 mM KCl. (C) Secreción de insulina normalizada de islotes control o BPA en respuesta a las concentraciones de glucosa que se indican. (D) Como en C, pero en este caso expresando la secreción de insulina como valor porcentual respecto del contenido total de insulina de los islotes. En A: control, $n = 38$; BPA, $n = 35$. En B-D: $n = 7 - 11$ para cada tratamiento y estímulo de secreción. Student's *t*-test: * $p \leq 0.05$.

5. LOS ISLOTES DE LANGERHANS EXPUESTOS A 1 nM BPA DURANTE 48 HORAS NO PRESENTAN CAMBIOS SIGNIFICATIVOS EN SU CAPACIDAD PARA METABOLIZAR LA GLUCOSA.

Ya que la glucosa es el modulador primordial de la actividad de la célula β pancreática, y por lo tanto de la secreción de insulina, decidimos evaluar si la exposición a BPA pudiese tener consecuencias en la ruta de metabolización de la glucosa, centrándonos en el rendimiento de la glucólisis y el ciclo de Krebs. En primer lugar, nos dispusimos a evaluar el rendimiento energético del catabolismo de la glucosa en islotes que fueron o no cultivados en presencia de 1 nM BPA. Esto fue posible debido a las distintas propiedades de fluorescencia que presentan las formas oxidada y reducida de la coenzima NAD^+/NADH , que es el principal agente implicado en las reacciones de transferencia de electrones en las reacciones glucolíticas y del ciclo de Krebs. En este caso, la técnica microfluorimétrica que empleamos se basa en el incremento de la señal de fluorescencia detectada como consecuencia del aumento en la producción de NADH. La estimulación secuencial con concentraciones crecientes de glucosa (3, 8, 11 y 16 mM) provocó en los islotes control un incremento escalonado de la señal de fluorescencia, como consecuencia de la producción acumulada del agente reductor NADH para cada concentración de glucosa; una vez que los islotes vuelven a ser perfundidos con una solución con 3 mM glucosa, la producción de NADH cesa y la fluorescencia disminuye progresivamente a medida que las formas reducidas acumuladas ceden sus electrones a la cadena de transporte mitocondrial (figura 26A). La exposición a 1 nM BPA durante 48 horas no provocó ningún cambio significativo en el comportamiento de los islotes, los cuales presentan un patrón de fluorescencia muy similar a los islotes control (figura 26A y 26B). Por lo tanto, podemos concluir que la exposición a largo plazo no parece alterar el rendimiento oxidativo de la glucosa en el islote de Langerhans. Este resultado se reprodujo al realizar el experimento empleando cultivos de células aisladas tratadas o no con 1 nM BPA por 48 horas (figura 26C y 26D).

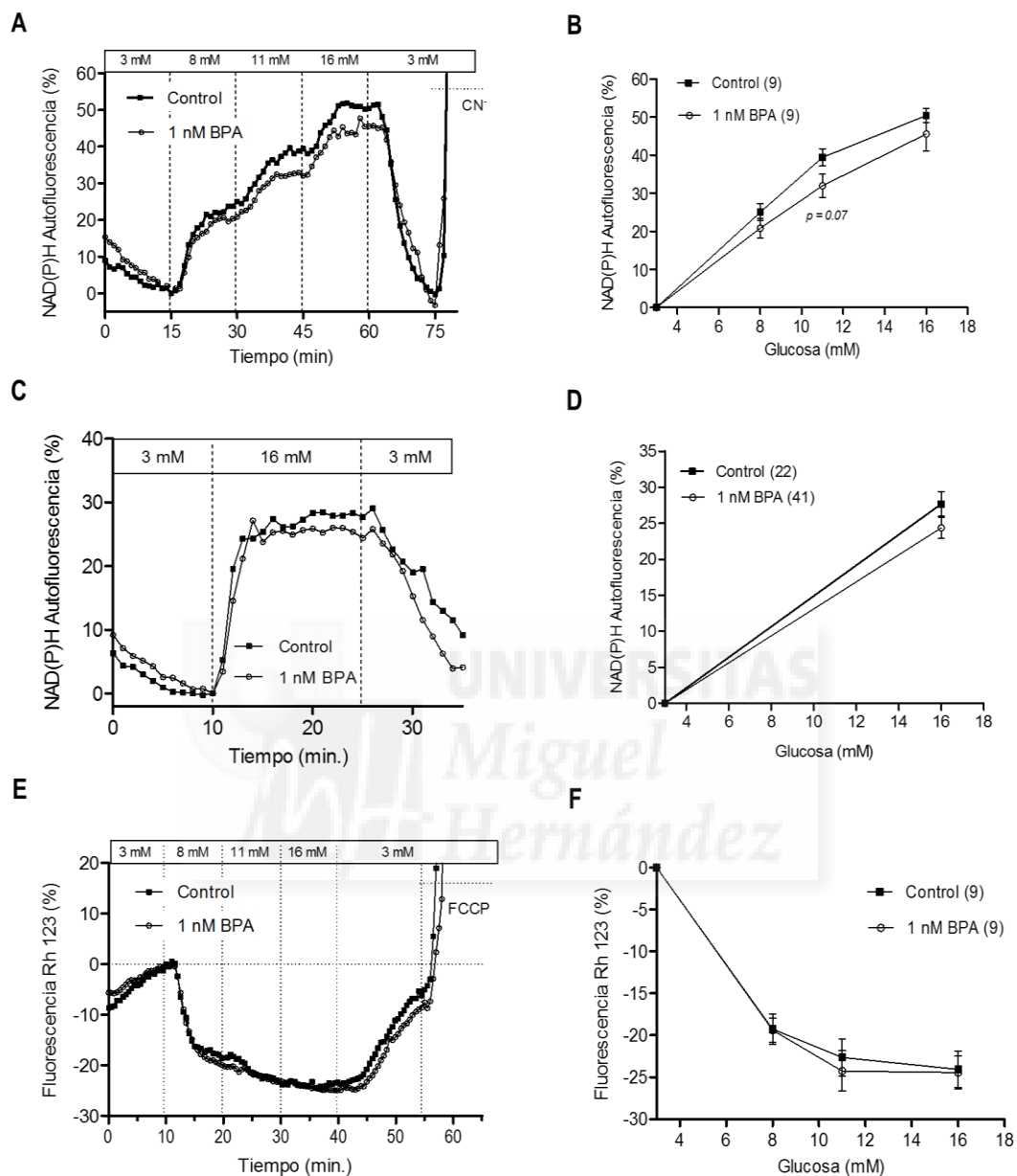


Figura 26. Análisis de la función metabólica y mitocondrial en islotes intactos cultivados con 1 nM BPA durante 48 h. (A) Variación promedio en la autofluorescencia de NADH en islotes cultivados durante 48h con 1 nM BPA o vehículo isovolumétrico (control) al perfundir secuencialmente las concentraciones de glucosa que se indican. **(B)** Valor máximo de (cont.)

Subsecuentemente decidimos evaluar de un modo más directo la función mitocondrial en islotes que fueron mantenidos durante 48 horas con 1 nM BPA. El ensayo consistió en monitorizar los cambios del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) como consecuencia del metabolismo glucídico. Estos experimentos se realizaron utilizando el sensor fluorescente Rh-123. Rh-123 se acumula en la matriz mitocondrial de forma proporcional a la hiperpolarización del potencial de la membrana mitocondrial; la acumulación y agregación de Rh-123 se correlaciona directamente con un decaimiento de su emisión de fluorescencia debido a un fenómeno de desactivación fluorescente (o *quenching*, es decir un proceso que tiene como consecuencia la disminución de la intensidad de fluorescencia emitida por Rh-123). Por lo tanto, al perfundir consecutivamente con concentraciones crecientes de glucosa, observamos una disminución escalonada de la señal registrada de Rh-123 en los islotes de Langerhans. Esta variación dinámica de la fluorescencia emitida por Rh-123 no presenta ninguna diferencia entre los islotes control o BPA (figura 26E y 26D). Este resultado sugiere pues que la exposición prolongada a 1 nM BPA no afecta tampoco a la actividad mitocondrial en los islotes de Langerhans.

Figura 26 (cont.) fluorescencia que se alcanza para cada una de las concentraciones de glucosa ensayadas en los grupos experimentales descritos. (C) y (D) Igual que A y B, pero en el caso de la autofluorescencia de NADH registrada en células aisladas de islote (E) Variación promedio en la fluorescencia de Rh -123 en islotes cultivados durante 48h con 1 nM BPA al incrementar la concentración de glucosa en la secuencia que se indica. (D) Valor máximo de fluorescencia que se alcanza para cada una de las concentraciones de glucosa ensayadas en los grupos experimentales descritos. *En A-F se representan los cambios porcentuales referidos respecto de la fluorescencia basal (3 mM glucosa). Entre paréntesis se indica el número de islotes o células promediadas para cada grupo experimental.*

6. LAS CÉLULAS β EXPUESTAS A BPA MUESTRAN UNA DISMINUCIÓN DOSIS-DEPENDIENTE Y NO MONOTÓNICA DE LA CORRIENTE MACROSCÓPICA DE Ca^{2+} .

Para comprender cómo el BPA provoca la reducción de la entrada de Ca^{2+} en las células β , decidimos realizar una caracterización electrofisiológica detallada de las células tras su exposición a dosis mediambientalmente relevantes de BPA. Para ello empleamos la técnica de *patch-clamp* en células aisladas del islote de Langerhans cultivadas durante 48 horas en presencia de distintas dosis de BPA. Tanto en las células del grupo control como en las tratadas con BPA, la construcción de las curvas $I_{\text{Ca}^{2+}} - V$ muestra que el voltaje umbral para la activación de Ca_v es -30 mV; por encima de este voltaje, la $I_{\text{Ca}^{2+}}$ se incrementa paulatinamente hasta alcanzar un máximo a 0 mV. A voltajes cada vez más positivos, la $I_{\text{Ca}^{2+}}$ se va reduciendo hasta convertirse en una corriente de salida a voltajes que superan el potencial de reversión de Ca^{2+} ($> +50$ mV). Analizando esta relación $I_{\text{Ca}^{2+}} - V$, encontramos que la densidad de corriente de entrada de Ca^{2+} (corriente en relación a la superficie celular o $J_{\text{Ca}^{2+}}$) fue significativamente menor en las células β expuestas a 1 nM BPA, y esta diferencia apareció para cualquier V_{pulso} entre -30 y +30 mV (figura 27B). Esta caracterización se repitió en células β expuestas a 100 nM BPA durante el mismo período de tiempo. En este caso, no se observó ninguna diferencia en la densidad de la corriente de entrada de Ca^{2+} entre las células control o tratadas (figura 27C). Este hallazgo está en sintonía con los resultados obtenidos en microfluorimetría, y corrobora la ausencia de efecto de las dosis más alta de BPA evaluada (100 nM) sobre la actividad de célula β , mientras que la alteración es máxima a dosis bajas mediambientalmente relevantes (1 nM). Cuando representamos la amplitud máxima de $I_{\text{Ca}^{2+}}$ (es decir, a 0 mV) como un valor porcentual respecto de la corriente control, observamos que la incubación con 1 nM BPA supuso una reducción en la densidad de corriente de un 24%, mientras que la exposición a una dosis cien veces mayor no modificó la corriente macroscópica de Ca^{2+} , lo que corrobora la existencia de una relación no-monotónica entre la dosis de BPA y sus acciones sobre la entrada de Ca^{2+} a través de los Ca_v (figura 27D).

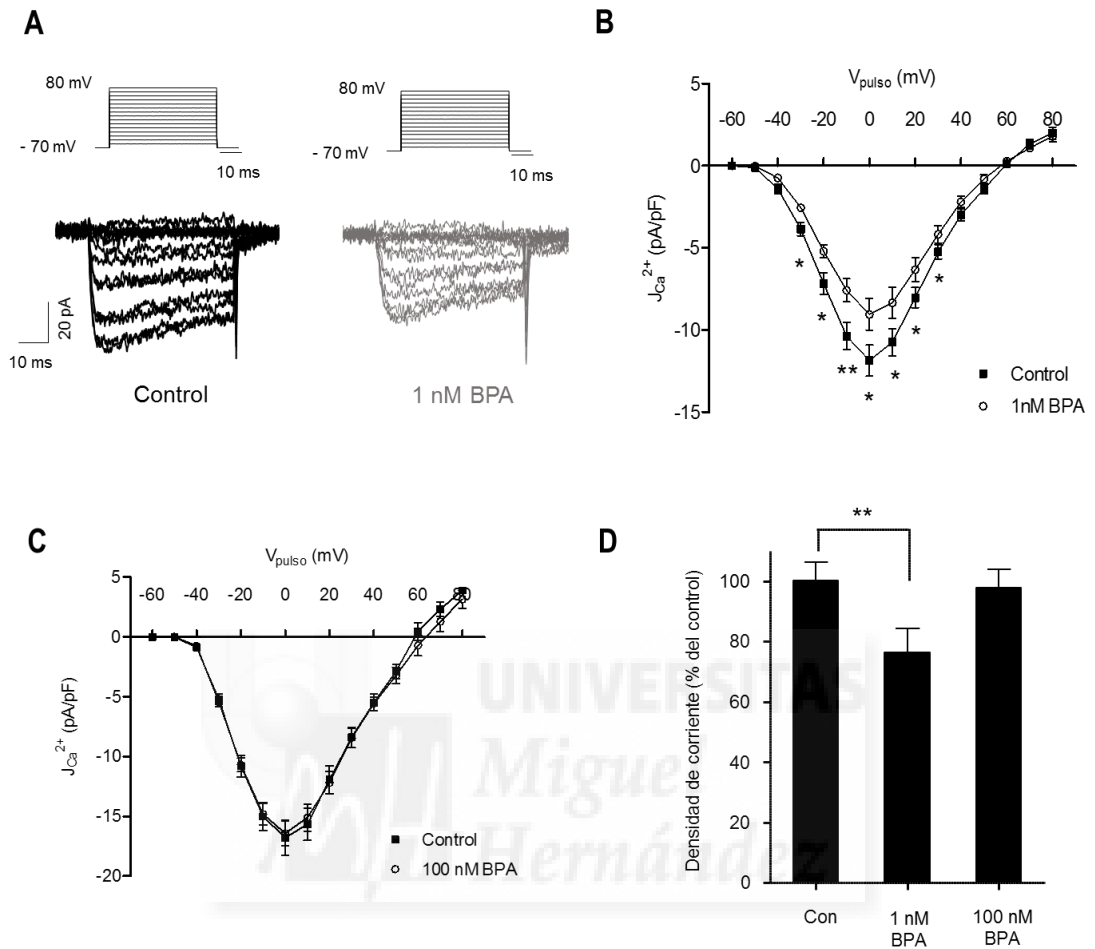


Figura 27. Corrientes macroscópicas de Ca^{2+} en células β expuestas a BPA durante 48 h. (A) Registros representativos de corrientes de Ca^{2+} en células control o expuestas a 1 nM BPA por 48h. (B) Relación $J_{\text{Ca}^{2+}} - V$ construida tomando la corriente máxima alcanzada (componente inicial) para cada uno de los pulsos de despolarización dados en células control o expuestas a 1 nM BPA durante 48 h. (C) Igual que en B, pero registrando la $I_{\text{Ca}^{2+}}$ en células cultivadas en presencia de 100 nM BPA. (D) Densidad de corriente expresada porcentualmente respecto de su control en células expuestas a 1 o 100 nM BPA tras un pulso de despolarización a 0 mV. En B: control, $n = 33$; BPA, $n = 33$. En C: control, $n = 12$; BPA, $n = 12$. En D, se expresan porcentualmente los experimentos mostrados en A y B. Student's *t*-test para cada pulso de voltaje; * $p \leq 0.05$; ** $p < 0.01$.

7. LAS CÉLULAS β EXPUESTAS A 1 nM BPA TAMBIÉN PRESENTAN ALTERADA LA CORRIENTE MACROSCÓPICA DE K^+ .

Nuestra caracterización electrofisiológica de la célula β expuesta a dosis bajas de BPA también incluyó el estudio de las corrientes de K^+ . Estas corrientes de salida de K^+ , a través de K_v y $K_{Ca^{2+}}$, son fundamentales en la fase de repolarización del potencial de acción de la célula β , y su regulación puede tener consecuencias sobre su excitabilidad. Esta exploración fue posible igualmente mediante la técnica de *patch-clamp*, registrando células β aisladas cultivadas en presencia de 1 nM BPA durante 48 horas.

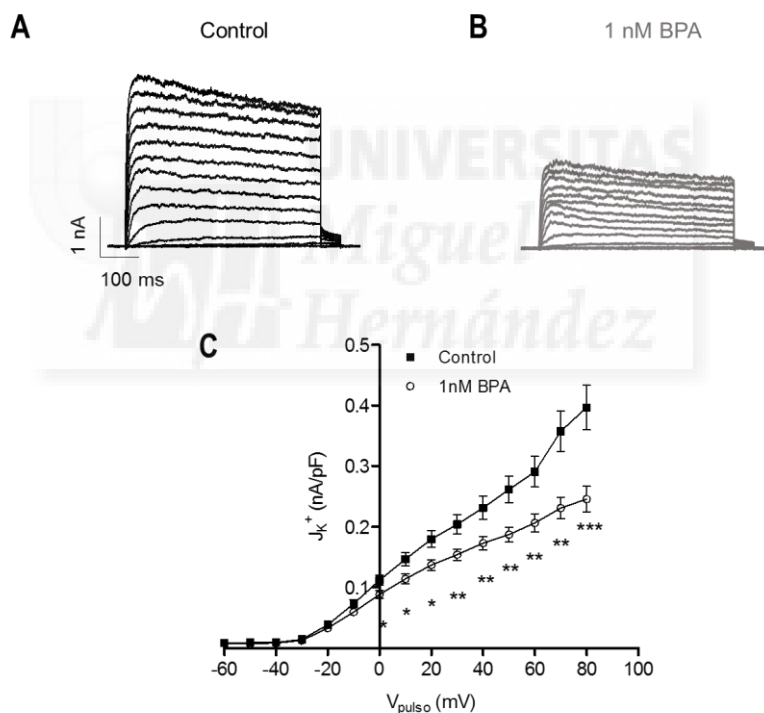


Figura 28. Corrientes macroscópicas de K^+ en célula β . Registros representativos de corrientes de K^+ en células control (A) o expuestas a 1 nM BPA por 48h (B). (C) Relación J_{K^+} - V construida tomando la corriente máxima alcanzada (componente inicial) para cada uno de los pulsos de despolarización dados en ambos grupos experimentales. En C: control, $n = 15$; BPA, $n = 18$. Student's *t*-test para cada pulso de voltaje; * $p \leq 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

No se halló ninguna diferencia en la dependencia del voltaje entre las células control y las tratadas con BPA, en ambos casos el umbral de activación de I_{K^+} fue -20 mV, observándose un incremento lineal de la corriente a voltajes más positivos. Tras construir las curvas $I_{K^+} - V$ observamos que la incubación con 1 nM BPA produjo una robusta disminución de la densidad de corriente de salida de K^+ a V_{pulsos} a partir de 0 mV (figura 28).

8. LA DISMINUCIÓN DE LA CORRIENTE DE Ca^{2+} EN CÉLULAS β EXPUESTAS A 1 nM BPA SE DEBE A UNA REDUCCIÓN DE LA CORRIENTE TIPO-R.

Habiendo descrito previamente la reducción de la corriente de entrada de Ca^{2+} en células β mantenidas durante 48 horas en presencia de BPA, nos dispusimos a averiguar qué subtipo o componente de la corriente macroscópica de Ca^{2+} está afectado por el BPA. Para ello empleamos las distintas propiedades farmacológicas que definen cada subfamilia de Ca_v , añadiendo a la solución de perfusión, según fuese oportuno, bloqueantes específicos de cada tipo de corriente de Ca^{2+} . Para resolver esta disección farmacológica, optamos por combinar nuevamente la imagen de Ca^{2+} (fura-2) y la técnica de *patch-clamp*. En ambos casos, utilizamos preparaciones de células individuales del islote expuestas a 1 nM BPA durante 48 horas. En los experimentos de *patch-clamp*, durante un mismo registro, las células fueron perfundidas secuencialmente con una solución extracelular que no contenía droga alguna, una segunda que contenía 25 μ M nifedipina, y por último una solución con 200 nM SNX-482 (figura 29A). Esto permitió calcular la contribución porcentual de cada componente de la corriente de Ca^{2+} en las células registradas, ya que la nifedipina es una dihidropiridina que actúa bloqueando la corriente de tipo-L (Ca_v 1), y SNX-482 es una droga de reciente descubrimiento que bloquea específicamente la corriente tipo-R (Ca_v 2.3).

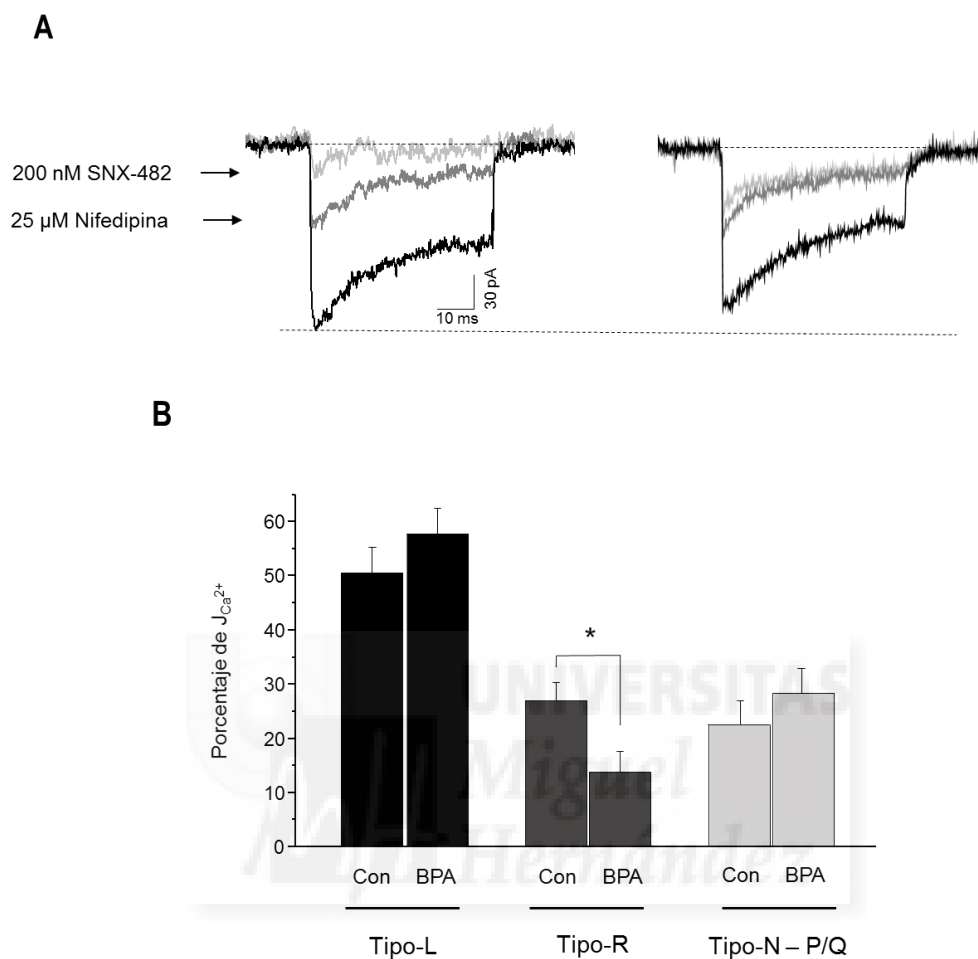


Figura 29. Disección farmacológica de la corriente macroscópica de Ca^{2+} en células β expuestas a BPA durante 48 h. (A) Registros representativos a partir de los cuales se ha podido calcular la contribución de cada subtipo de corriente para células control (izq.) o BPA (drcha.), y que consistieron en el bloqueo progresivo de $I_{\text{Ca}^{2+}}$ al perfundir secuencialmente soluciones extracelulares que contenían 25 μM nifedipina y 200 nM SNX-482. **(B)** Contribución porcentual de cada componente de la corriente macroscópica de Ca^{2+} (tipo-L, -R o -P/Q) en células control o cultivadas con 1 nM BPA. Control, $n = 8$; BPA, $n = 9$. Student's *t*-test: * $p \leq 0.05$.

Coincidiendo con lo descrito en célula β , la corriente de Ca^{2+} a través de canales $\text{Ca}_v 1$ (tipo-L) en nuestras células control supuso alrededor del 50% de la corriente total en el pico generado con un salto de voltaje a 0 mV. Esta contribución de los canales $\text{Ca}_v 1$ no cambió en las células incubadas con 1 nM BPA. El bloqueo con SNX-482 de la corriente remanente nos permitió valorar la contribución de la corriente de Ca^{2+} tipo-R. En las células control, la corriente a través de $\text{Ca}_v 2.3$ (tipo-R) supuso un 25% de la corriente macroscópica de Ca^{2+} . Esta contribución apareció significativamente reducida en las células β cultivadas en presencia de 1 nM BPA: la corriente tipo-R en células BPA supuso tan sólo un 12% de la corriente total de Ca^{2+} , es decir, este componente apareció reducido a la mitad en células que fueron expuestas sostenidamente a 1 nM BPA. Por último, la corriente que resultó de la suma del bloqueo de nifedipina y SNX-482 supuso alrededor del 20-25% de la corriente inicial invariablemente en células control o BPA. Esta corriente resistente a nifedipina y SNX-482 se identificó como tipo P/Q ($\text{Ca}_v 2.1$) (figura 29B).

Para confirmar el resultado obtenido con la exploración electrofisiológica, realizamos una aproximación complementaria mediante registros de imagen de calcio con fura-2. En este caso, grupos de células control o BPA se incubaron durante 30 minutos con 200 nM SNX-482 antes de ser transferidas a la cámara de registro. A continuación, fueron estimuladas empleando una $[\text{K}^+]_o$ de 65 mM, lo que genera un pico de entrada de Ca^{2+} debido a la despolarización de las células. Cuando las células no fueron preincubadas con el bloqueante SNX-482, observamos la disminución esperada en la amplitud del pico de Ca^{2+} en las células expuestas durante 48 horas a 1 nM BPA (CTL = 0.87 ± 0.02 u.a.; BPA = 0.76 ± 0.03 u.a.) (figura 30A y 30B). Sin embargo, tras el período de incubación con el bloqueante SNX-482, la diferencia entre el grupo de células control y BPA no aparece (CTL = 0.89 ± 0.03 u.a.; BPA = 0.94 ± 0.02 u.a.) (figura 30C y 30D). Esta ausencia de efecto debe ser explicada porque el bloqueo de la corriente de Ca^{2+} tipo-R en las células control es comparable al efecto que tiene la incubación a largo plazo con 1 nM BPA en la célula β . Por lo tanto, la neutralización de la diferencia preexistente indica que SNX-482 es

incapaz de reducir la corriente de Ca^{2+} en células BPA, ya que es el componente tipo-R de la corriente el que está bloqueado de hecho por la propia exposición a 1 nM BPA.

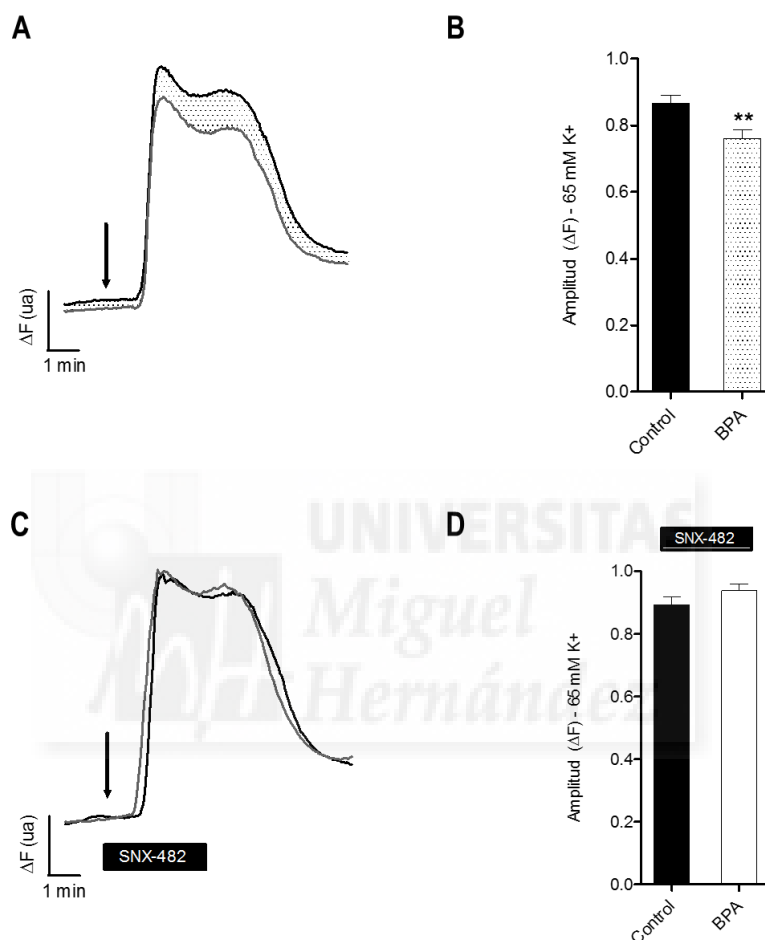


Figura 30. Bloqueo de la corriente de Ca^{2+} tipo-R en células tratadas con 1 nM BPA durante 48 h. (A) Registros representativos de la variación de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en respuesta a 65 mM KCl en células tratadas o no con 1 nM BPA. (B) Análisis de la amplitud de la señal de fluorescencia de los experimentos mostrados en A. (C) y (D) Como A y B, pero en el caso de células expuestas o no a 1 nM BPA por 48 h y que además han sido incubadas con el bloqueante selectivo 200 nM SNX-482 durante los 30 min previos a la medición. En B: control, $n = 44$; BPA, $n = 33$. En D: control, $n = 34$; BPA, $n = 41$. Student's *t*-test: ** $p < 0.01$.

9. LA EXPRESIÓN DE $Ca_v2.3$ ESTÁ DISMINUIDA EN CÉLULAS β EXPUESTAS A 1 nM BPA.

Nuestro siguiente objetivo se centró en averiguar cómo el BPA ejerce su regulación sobre la corriente de Ca^{2+} tipo-R. Como ya se describió, este subtipo de I_{Ca2+} fluye a través del canal $Ca_v2.3$ (*Cacna1e*). Ya que los ERs actúan como factores de transcripción, el BPA podría modular los niveles de expresión de este canal. Así mismo, la regulación podría ser no-genómica, pudiendo darse a nivel post-transcripcional o post-traducciona, así como también podría deberse a la activación de vías de señalización que modifiquen las propiedades biofísicas del canal $Ca_v2.3$.

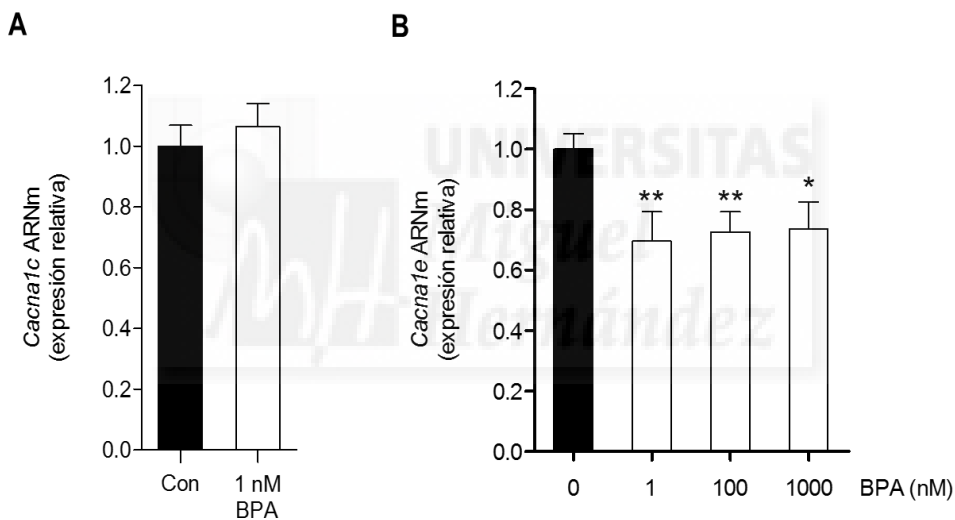


Figura 31. Expresión génica en islotes de Langerhans cultivados durante 48h en presencia de distintas concentraciones de BPA. (A) Expresión de ARNm (relativa al control) del gen *Cacna1c* ($Ca_v1.2$) en islotes cultivados en presencia de 1 nM BPA. **(B)** Expresión de ARNm (relativa al control) del gen *Cacna1e* ($Ca_v2.3$) en islotes cultivados en presencia de 1 nM, 100 nM o 1 μ M BPA. $n = 3-6$ experimentos independientes. En A: control, $n = 8$; 1 nM BPA, $n = 7$. En B: control, $n = 35$; 1 nM BPA, $n = 12$; 100 nM BPA, $n = 13$; 1 μ M BPA, $n = 7$. Los niveles de expresión referidos se han calculado en relación a la expresión del gen de interés en los islotes control en cada experimento independiente. Student's *t*-test (vs. control): * $p \leq 0.05$, ** $p < 0.01$.

Para abordar esta cuestión, cuantificamos los niveles de expresión de los mensajeros de los canales $Ca_v1.2$ (tipo-L) y $Ca_v2.3$ (tipo-R) en islotes de Langerhans que permanecieron en cultivo 48 horas en presencia de BPA. En ambos casos, las parejas de cebadores se diseñaron para amplificar específicamente regiones de las subunidades formadoras del poro del canal, *Cacna1c* y *Cacna1e* respectivamente. Tras el análisis de las amplificaciones, encontramos que la exposición a 1 nM BPA no modificaba la expresión del canal $Ca_v1.2$ (figura 31A), mientras que la expresión del ARNm del canal $Ca_v2.3$ apareció significativamente disminuida tras la incubación con 1 nM BPA (figura 31B). Este resultado indica que la regulación que dosis bajas de BPA ejercen sobre la señalización de Ca^{2+} es debida a su actividad como modulador de la transcripción. Cuando elevamos la concentración de BPA en el cultivo hasta 100 nM o 1 μ M, encontramos que la expresión del ARNm del canal $Ca_v2.3$ se encontraba igualmente reducida, con una disminución que es de la misma magnitud que la hallada cuando empleamos 1 nM BPA (figura 31B).

10. LOS EFECTOS DE BPA EN LA HOMEOSTASIS DE Ca^{2+} DE LA CÉLULA β SON MIMETIZADOS POR EL AGONISTA DPN.

Una vez descrita la regulación de la corriente de Ca^{2+} tipo-R de la célula β por acción directa del BPA, nos dispusimos a averiguar cuál es la ruta a través de la que son mediados estos efectos. Como ya se mencionó con anterioridad, los efectos ejercidos por el BPA son debidos a su capacidad para actuar como ligando de los receptores de estrógenos $ER\alpha$ y $ER\beta$. Para explorar el mecanismo de acción implicado en los efectos descritos en nuestro trabajo, optamos en primer lugar por una aproximación farmacológica empleando agonistas específicos de receptores estrogénicos. Para ello, sustituimos el BPA en nuestros cultivos por PPT o DPN, que actúan respectivamente como agonistas de $ER\alpha$ o $ER\beta$. Tras el período de incubación de 48 horas en presencia de estos agonistas, y tal como ocurría en el caso de la exposición a BPA, nos dispusimos a realizar un doble abordaje mediante registros de electrofisiología e imagen de calcio intracelular.

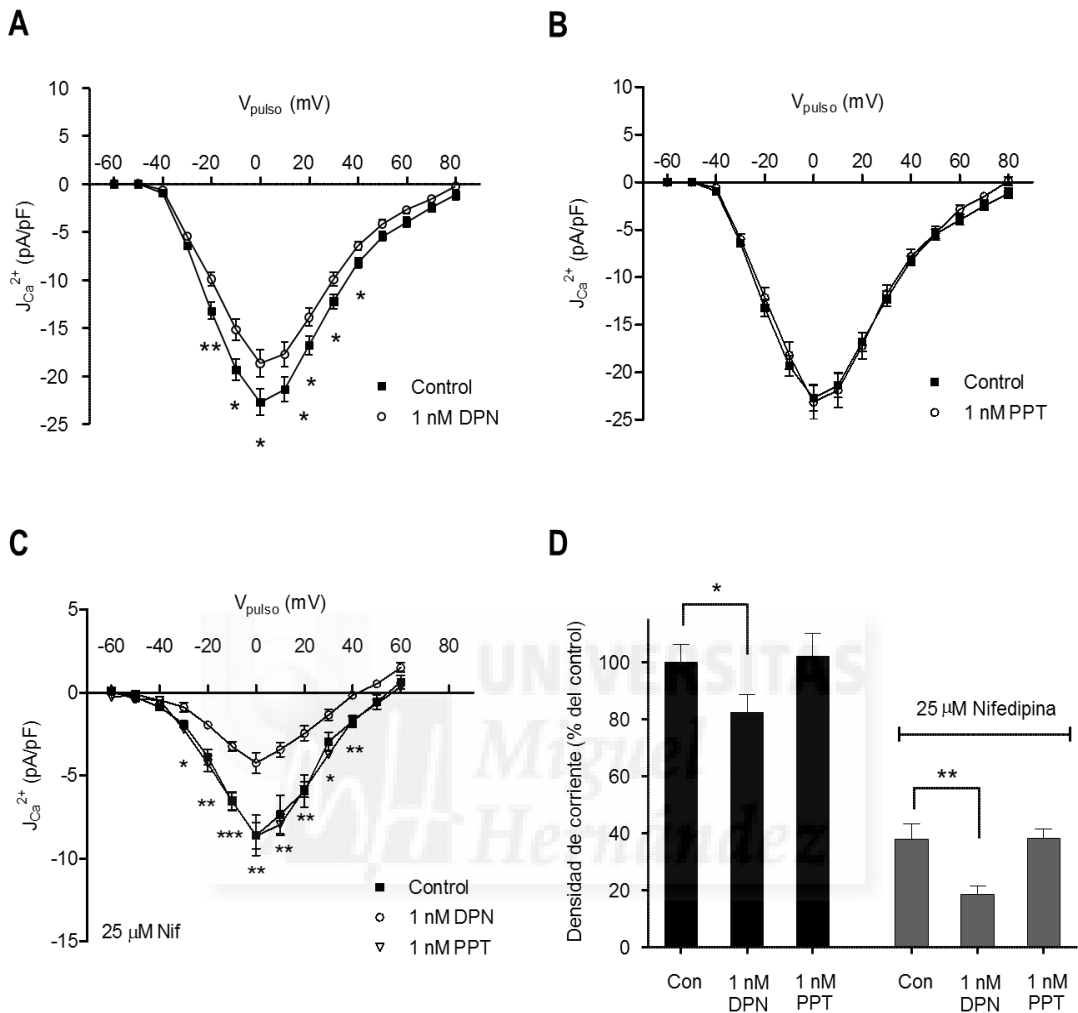


Figura 32. Corrientes macroscópicas de Ca^{2+} en célula β . Relación $J_{\text{Ca}^{2+}} - V$ para las corrientes de Ca^{2+} de células β cultivadas durante 48 h en presencia de 1 nM DPN (**A**), 1 nM PPT (**B**). (**C**) Relación $J_{\text{Ca}^{2+}} - V$ construidas a partir de registrados realizados en presencia de 25 μM nifedipina en células β tratadas con 1 nM DPN o PPT. (**D**) Densidad de corriente (a 0 mV) expresada porcentualmente respecto del control en células expuestas a DPN o PPT, cuando no se emplea ningún bloqueante específico (barras negras) o cuando está presente 25 μM nifedipina en la solución extracelular (barras grises). En A: control, $n = 20$; DPN, $n = 21$. En B: control, $n = 20$; PPT, $n = 16$. En C: control, $n = 6$; DPN, $n = 7$; PPT, $n = 5$. Student's *t*-test: * $p \leq 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Cuando llevamos a cabo los experimentos de *patch-clamp*, la reducción que el BPA provoca sobre la corriente macroscópica de Ca^{2+} fue reproducida por el agonista DPN, pero no por PPT, cuando usamos en ambos casos una concentración de 1nM (figura 32A y 32B). Cuando las células fueron expuestas a 1 nM DPN, la $I_{\text{Ca}^{2+}}$ a 0 mV fue un 18% más pequeña (CTL = -22.72 ± 1.36 pA/pF; DPN = -18.70 ± 1.40 pA/pF) (figura 32D). Esta disminución debida a la exposición a 1 nM DPN es comparable en magnitud a la obtenida con 1 nM BPA. Por lo tanto, estos resultados sugieren que los efectos a largo plazo que 1 nM BPA tiene sobre la fisiología de la célula β pancreática son debidos a una modulación a través de ER β . Finalmente, suponiendo la misma afectación del componente tipo-R de $I_{\text{Ca}^{2+}}$, realizamos las mediciones de corriente añadiendo 25 μM nifedipina en la solución extracelular. El bloqueo de $\text{C}_v1.2$ supuso una disminución muy acusada de $I_{\text{Ca}^{2+}}$ en las células control, a 0 mV fue -10.80 ± 1.19 pA/pF, lo que equivale a una reducción de más del 50% de la corriente total comparando con células control registradas en ausencia de nifedipina (figura 32D). En el caso de las células tratadas con los agonistas específicos de ER, la corriente remanente de Ca^{2+} se redujo drásticamente en las células que fueron expuestas a 1 nM DPN, mientras que no se produjo cambio alguno en el caso de 1 nM PPT (DPN = -5.89 ± 0.92 pA/pF.; PPT = -10.85 ± 1.05 pA/pF) (figura 32C). Este resultado viene a confirmar por un lado que el mecanismo de acción podría estar mediado por ER β , y por otro lado el efecto sobre un subtipo de corriente de Ca^{2+} que no debe ser el tipo-L, ya que la reducción de $I_{\text{Ca}^{2+}}$ se manifiesta aún en presencia de nifedipina.

En paralelo, estos efectos dependientes de la señalización a través de ER β fueron demostrados además mediante experimentos de imagen de calcio intracelular. Tras una exposición de 48 horas a 1 nM DPN o PPT, registramos las señales de Ca^{2+} en células aisladas de islote en respuesta a 65 mM K^+ en la solución extracelular. Nuevamente, encontramos que la incubación con 1 nM DPN provocaba una disminución significativa de la amplitud de la señal de Ca^{2+} , mientras que la

exposición a 1 nM PPT no provocaba ningún cambio en la respuesta de las células (CTL = 0.89 ± 0.02 u.a.; DPN = 0.74 ± 0.04 u.a.; PPT = 0.90 ± 0.02 u.a.) (figura 33).

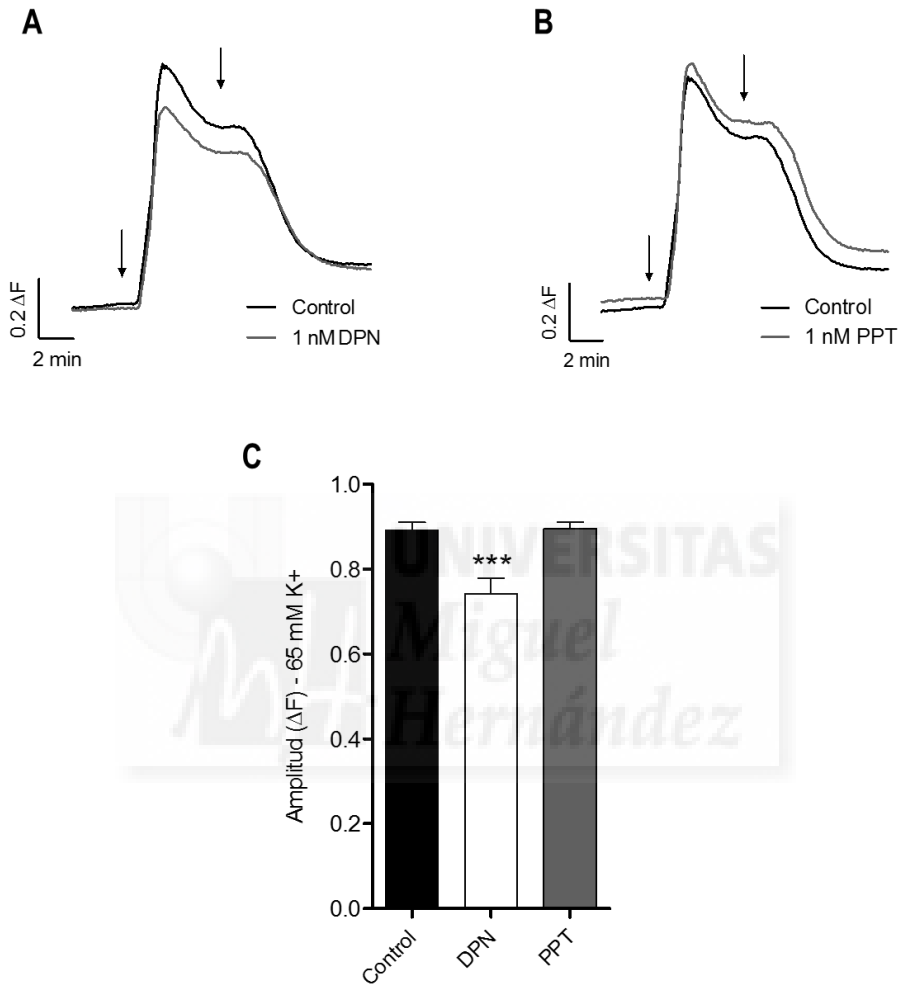


Figura 33. Variación de $[Ca^{2+}]_i$ en células β aisladas expuestas durante 48h a 1 nM DPN o PPT en respuesta a despolarizaciones no metabólicas inducidas por $[K^+]_o$ elevadas. Registros representativos de la variación de $[Ca^{2+}]_i$ en células individuales expuestas a 1 nM DPN (A) o PPT (B) al ser estimuladas con 65 mM KCl en la solución externa. (B) Cuantificación de la variación promedio de fluorescencia (ΔF) del experimento mostrado en A. Empleando 1-way ANOVA (Dunnett's test): *** $p < 0.001$. Células control, $n = 56$; 1 nM DPN, $n = 50$; 1 nM PPT, $n = 63$. En A y B las flechas indican el momento de la estimulación y lavado de la solución 65 mM KCl.

Complementariamente, realizamos mediciones microfluorimétricas de la $[Ca^{2+}]_i$ en células que fueron expuestas a 1 nM BPA en combinación o no con antagonistas selectivos de ER α o ER β . Empleamos 100 nM del compuesto MPP para impedir la unión de BPA a ER α . Por otro lado, utilizamos el compuesto PHTPP para bloquear la señalización de BPA a través de ER β , en este caso particular, debido a su menor efectividad antagonista, empleamos dos concentraciones distintas, 10 y 1 μ M.

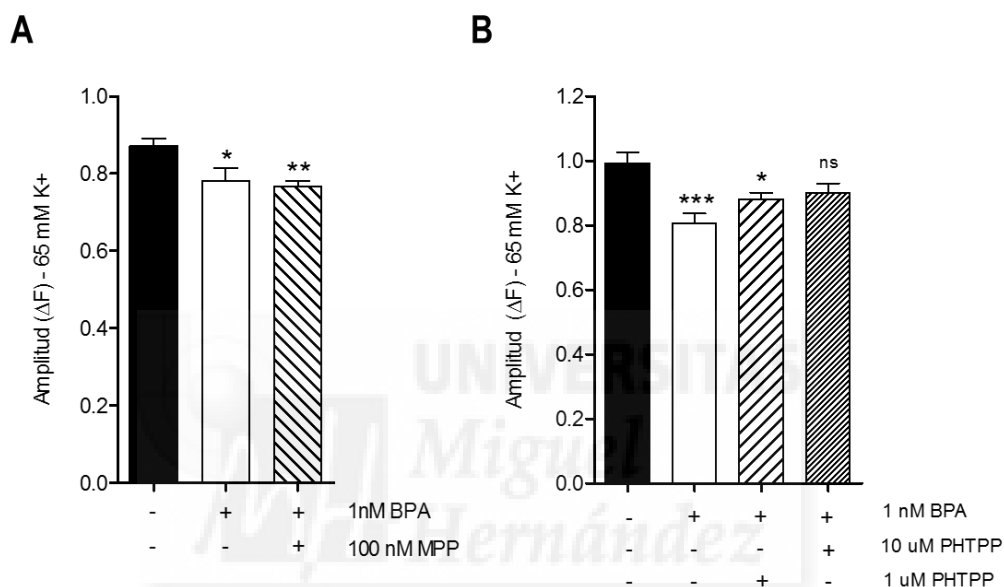


Figura 34. Variación de $[Ca^{2+}]_i$ en células aisladas de islote cultivadas con 1 nM BPA durante 48h en presencia o no de antagonistas selectivos de receptores de estrógenos.

(A) ΔF en respuesta a despolarizaciones no metabólicas (65 mM K⁺) en células cultivadas sólo con 1 nM BPA o combinando 1 nM BPA con 100 nM MPP. (B) Igual que en A, pero en este caso las células pancreáticas fueron cultivadas en presencia solo de 1 nM BPA, o 1 nM BPA junto con dos concentraciones distintas del antagonista de ER β PHTPP, 1 y 10 μ M. Para mayor simplicidad y claridad, en A y B no se muestran los tratamientos realizados simplemente en presencia de los antagonistas pues no existe ningún efecto significativo debido a la incubación “per se” con 100 nM MPP, y 1 o 10 μ M de PHTPP. Empleando 1-way ANOVA (Dunnnett’s test): * $p \leq 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns = no significativo. En A: control, $n = 27$; BPA, $n = 35$; BPA + MPP, $n = 45$. En B: control, $n = 22$; BPA, $n = 24$; BPA + 10 μ M PHTPP, $n = 33$; BPA + 1 μ M PHTPP, $n = 22$.

Cuando bloqueamos la vía de ER α , la disminución de la señal de Ca²⁺ generada por la exposición a BPA apareció aun cuando ésta se produjo en presencia de 100 nM MPP (figura 34A), es decir, el bloqueo farmacológico del receptor ER α no impidió que el BPA ejerciese una modulación a largo plazo de la señalización de Ca²⁺ de la célula β . Sin embargo, cuando cultivamos en presencia de 1 nM BPA e impedimos su unión a ER β , observamos que la disminución de la señal de Ca²⁺ en las células BPA se neutralizaba progresivamente al aumentar la concentración del antagonista PHTPP, con lo que al cultivar en presencia de 1 nM BPA y 10 μ M PHTPP, el cambio de amplitud de la señal de fluorescencia ya no fue estadísticamente significativo (figura 34B). Estos resultados sugieren nuevamente la participación necesaria de ER β en la transducción de señales de 1 nM BPA para modular la corriente de Ca²⁺ tipo-R.

11. LA MOVILIZACIÓN DE Ca²⁺ NO ESTÁ ALTERADA EN CÉLULAS β PROVENIENTES DE RATONES ER β ^{-/-} EXPUESTAS A 1 nM BPA POR 48 HORAS.

Para confirmar la implicación de ER β en los efectos generados por la exposición a largo plazo a dosis bajas de BPA, dispusimos de ratones *knockout* para ER β (ER β ^{-/-}). Estos ratones han sido manipulados mediante ingeniería genética y sus células no disponen de copias funcionales para ER β . Por lo tanto, tras la extracción de sus islotes y la preparación de los cultivos primarios, dispusimos de células β con una deficiencia total de ER β . Las células provenientes de ratones ER β ^{+/+} (WT) o ER β ^{-/-} (KO) fueron expuestas nuevamente a 1 nM BPA durante 48 horas, tras lo cual fueron empleadas en experimentos de *patch-clamp* o imagen de imagen de Ca²⁺.

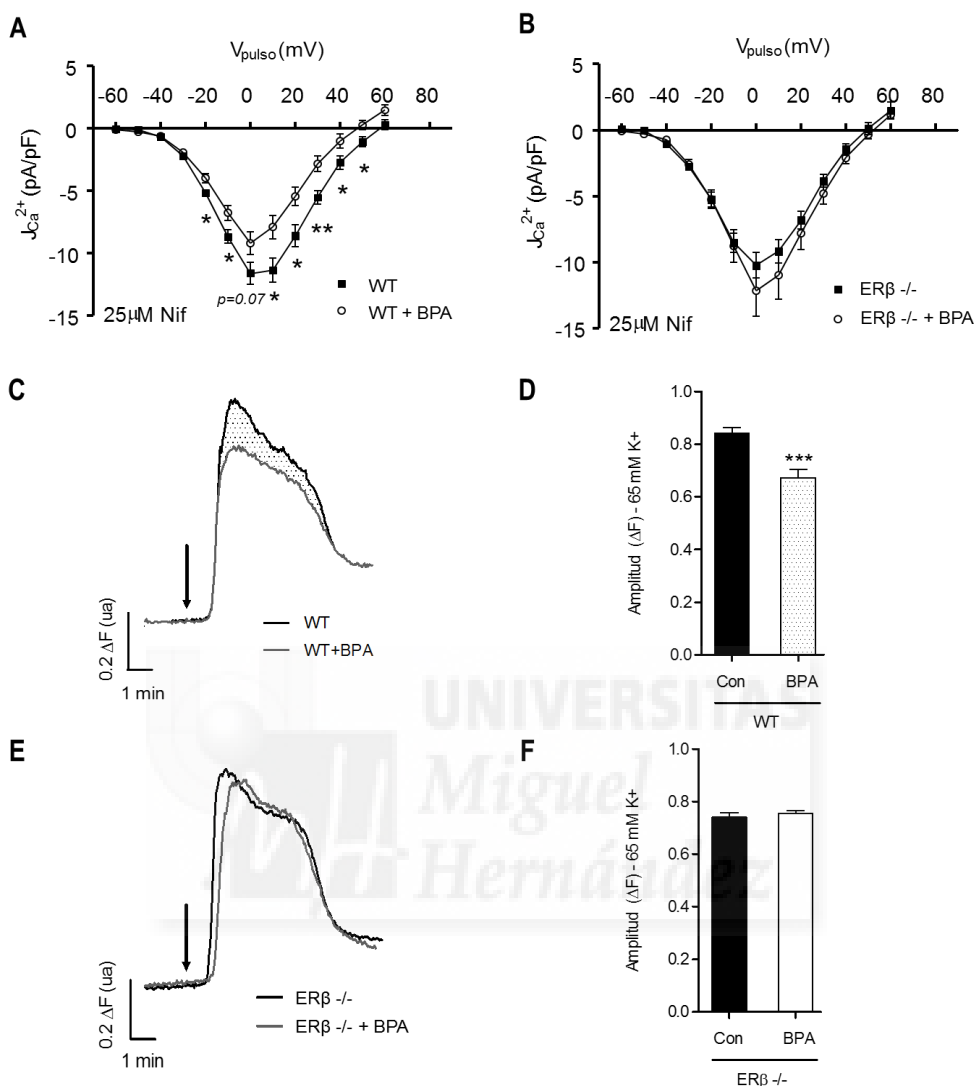


Figura 35. Homeostasis de Ca^{2+} en células β provenientes de ratones ER $\beta^{+/+}$ (WT) o ER $\beta^{-/-}$ (KO) que han sido expuestas a 1 nM BPA durante 48 h. Corriente macroscópica de Ca^{2+} expresada como la relación $J_{Ca^{2+}} - V$ en células β expuestas o no a 1 nM BPA obtenidas de ratones WT (A) o ER $\beta^{-/-}$ (B). Registros representativos de las señales de Ca^{2+} generadas como respuesta a 65 mM KCl en células WT (C) o ER $\beta^{-/-}$ (E) expuestas o no a 1 nM BPA durante 48 h. (D) y (F) Cuantificación de la amplitud de la señal de fluorescencia de los experimentos que se muestran en C y E respectivamente. En A: control, $n = 12$; BPA, $n = 18$. En B: control, $n = 11$; BPA, $n = 11$. En D: control, $n = 40$; BPA, $n = 34$. En F: control, $n = 43$; BPA, $n = 50$. Student's *t*-test: * $p \leq 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

En los registros de corriente de Ca^{2+} optamos por añadir 25 μM nifedipina en la solución extracelular, con el fin de bloquear la corriente tipo-L y permitir únicamente la corriente a través de $\text{Ca}_v2.3$ y $\text{Ca}_v2.1/\text{Ca}_v2.2$. En estos experimentos, las células β provenientes de ratones WT y expuestas durante 48 horas a 1 nM BPA mostraron la reducción esperable de la corriente de Ca^{2+} que permanece cuando el flujo iónico a través de $\text{C}_v1.2$ está impedido (figura 35A). Sin embargo, cuando empleamos células provenientes de $\text{ER}\beta^{-/-}$, observamos que la incubación a largo plazo con BPA no provocaba ningún cambio en la corriente de Ca^{2+} generada para cualquier voltaje testado (figura 35B). Este hallazgo se reprodujo igualmente cuando medimos los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en respuesta a despolarizaciones con 65 mM KCl. Las células de WT incubadas con 1 nM BPA mostraron una reducción del 20% en la amplitud de la señal de fluorescencia (CTL = 0.84 ± 0.02 u.a.; BPA = 0.67 ± 0.03 u.a.) (figura 35C y 35D). En el caso de las células provenientes de $\text{ER}\beta^{-/-}$, no encontramos diferencias en la amplitud de la respuesta debidas a la exposición a BPA (CTL = 0.74 ± 0.02 u.a.; BPA = 0.75 ± 0.01 u.a.) (figura 35E y 35F). Estos resultados coinciden con los obtenidos empleando agonistas y antagonistas de ERs (figuras 32-34), y vienen a demostrar que los efectos de BPA aquí descritos en relación a la regulación de la entrada de Ca^{2+} podrían implicar la transducción de señales a través de $\text{ER}\beta$.

Igualmente, decidimos cuantificar la expresión de ARNm de canales de Ca^{2+} en islotes $\text{ER}\beta^{-/-}$ expuestos a 1 nM BPA (figura 36). Encontramos que la ausencia de $\text{ER}\beta$ no solo impide que 1 nM BPA provoque una reducción de la expresión de $\text{Ca}_v2.3$, sino que se observa una tendencia manifiesta al incremento de la expresión de este canal debido a BPA (figura 36B). Este resultado nos indica que la señalización a través de $\text{ER}\beta$ es la responsable de la reducción de la corriente tipo-R, probablemente por la regulación de la expresión de *Cacna1e*, que codifica el poro del canal $\text{Ca}_v2.3$.

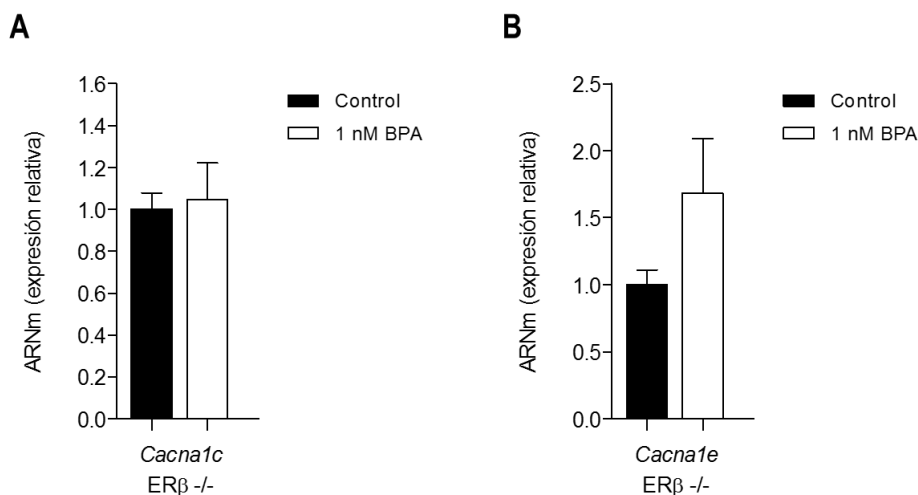


Figura 36. Expresión génica en islotes de Langerhans provenientes de ratones $ER\beta^{-/-}$, cultivados durante 48h en presencia de 1 nM BPA. (A) Expresión de ARNm (relativa al control) de *Cacna1c* (Ca_v1.2). (B) Expresión de ARNm (relativa al control) de gen *Cacna1e* (Ca_v2.3). Control, $n = 6$; BPA, $n = 6$. Student's *t*-test.

12. $ER\alpha$ MODULA POSITIVAMENTE LA ENTRADA DE Ca^{2+} EN CÉLULA β AL SER ACTIVADO CON DOSIS ALTAS DE LIGANDO.

Para estudiar la posible participación de $ER\alpha$ en la regulación de la corriente tipo-R, medimos la corriente macroscópica de Ca^{2+} en células β aisladas incubadas durante 48 horas en presencia de PPT (agonista específico de $ER\alpha$) en dosis varios órdenes de magnitud por encima de 1 nM. Como ya expusimos en un apartado anterior, la exposición a 1 nM PPT no provocaba cambios en la magnitud de $I_{Ca^{2+}}$ (figura 32B). Sin embargo, observamos que la incubación con 100 nM y 1 μ M PPT promueve un incremento gradual de la $I_{Ca^{2+}}$ registrada (figura 37A - 37D). Al ser incubadas con 100 nM PPT, la densidad máxima de corriente fue alrededor de un 20% mayor en las células tratadas con el agonista de $ER\alpha$; al incrementar la concentración de PPT en el cultivo hasta 1 μ M, la $I_{Ca^{2+}}$ a 0 mV fue aproximadamente un 35% más grande en la células tratadas (figura 37E).

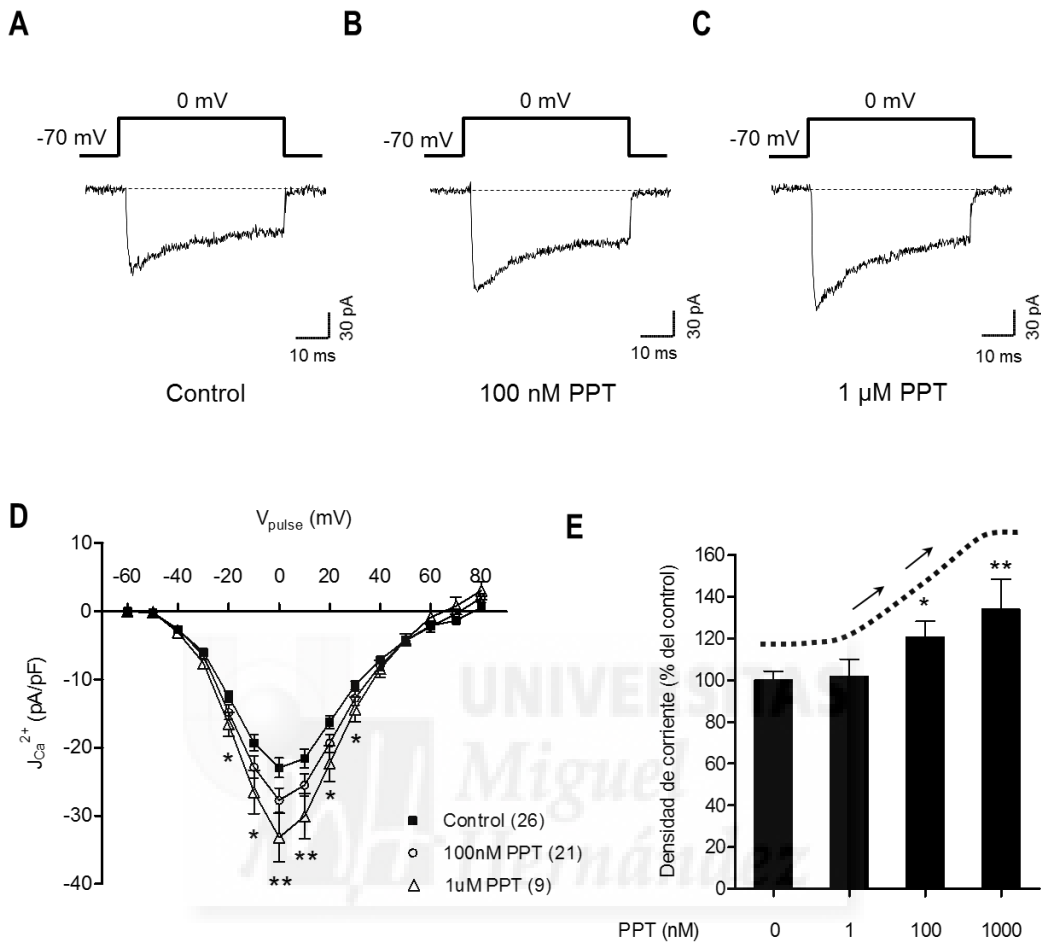


Figura 37. Corrientes macroscópicas de Ca^{2+} en células β aisladas cultivadas durante 48 h. Registros representativos de corrientes de Ca^{2+} en células control (A) o expuestas a 100 nM PPT (B) o 1 μ M PPT (C) (sólo se representa la I provocada por un pulso de 0 mV). (D) Relación $J_{Ca^{2+}}$ - V construida tomando la corriente máxima alcanzada (componente inicial) para cada uno de los pulsos de despolarización dados de los experimentos mostrados en (A-C). (E) Densidad máxima de corriente en células expuestas a dosis crecientes de PPT (1, 100 y 1000 nM) expresada porcentualmente en relación a las corrientes control registradas en cada experimento particular. En D: control, n = 26; 100 nM PPT, n = 21; 1 μ M PPT, n = 9. En E: 1 nM PPT, n = 16 (vs control, n = 20); 100 nM PPT, n = 21 (vs control, n = 26); 1000 nM PPT, n = 9 (vs control, n = 14); total células control = 46. Student's t-test: * p \leq 0.05; ** p < 0.01.

Estos resultados indican que la activación de ER α con altas dosis de ligando tendría un efecto positivo sobre la entrada de Ca $^{2+}$ en la célula β y que, por lo tanto, la incubación con dosis elevadas de BPA podría tener las mismas consecuencias al activar ER α . Esta acción positiva de BPA a dosis altas a través de ER α podría explicar la ausencia de cambios en la corriente de Ca $^{2+}$ cuando las células fueron expuestas, por ejemplo, a 100 nM BPA. Para testar esta hipótesis, decidimos incubar nuevamente células aisladas en presencia de 100 nM BPA, pero en esta ocasión hacerlo en presencia de 100 nM MPP (antagonista de ER α). En este caso, con los efectos de ER α bloqueados por MPP, observamos que 100 nM BPA provoca una disminución de la corriente de Ca $^{2+}$, que es comparable en magnitud a la que describimos para 1 nM BPA, es decir, en torno a un 20% de reducción de la densidad máxima de corriente (figura 38).

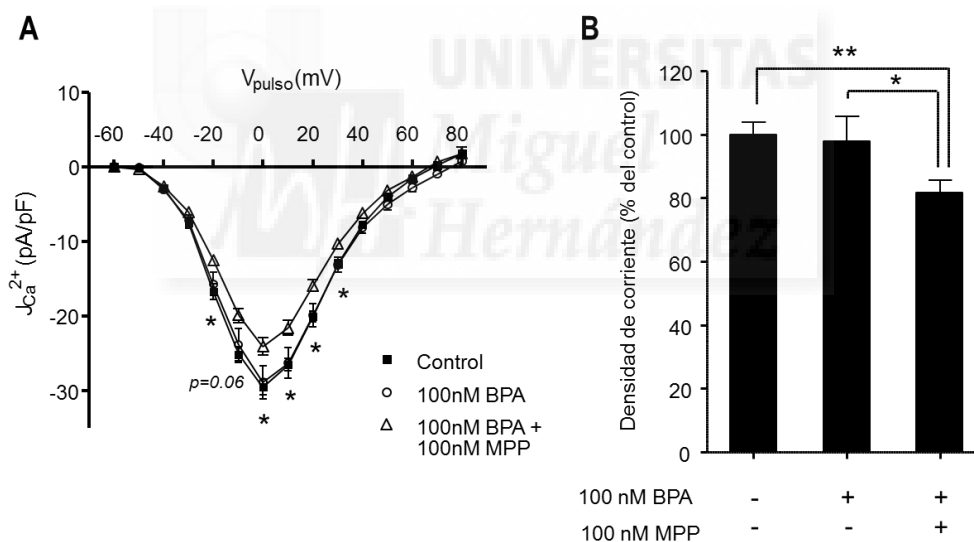


Figura 38. Corrientes macroscópicas de Ca $^{2+}$ en célula β . (A) Relación $J_{Ca^{2+}}$ - V para las corrientes de Ca $^{2+}$ de células β cultivadas durante 48 h con 100 nM BPA, en presencia o no del antagonista MPP. (B) Densidad máxima de corriente expresada como porcentaje respecto del control del experimento mostrado en (A). Control, $n = 14$; 100 nM BPA, $n = 9$; 100 nM BPA + 100 nM MPP, $n = 18$. En A, Student's t -test comparando 100 nM BPA versus 100 nM BPA + 100 nM MPP. Student's t -test: * $p \leq 0.05$; ** $p < 0.01$.

Ya que ER α parece tener un efecto contrario al de ER β sobre la entrada de Ca²⁺, nos dispusimos a averiguar si la regulación a través de ER α se produce también al controlar la expresión del gen que codifica para el canal Ca_v2.3. Para ello, cuantificamos la expresión de su mensajero en islotes de Langerhans cultivados durante 48 horas en presencia de 100 nM o 1 μ M PPT. Como puede observarse en la figura 39A, la incubación con dosis elevadas de PPT no provocó cambios significativos en el expresión del canal Ca_v2.3. Empleando igualmente PCR a tiempo real, encontramos que el bloqueo de ER α empleando MPP no produjo ningún cambio sustancial en el efecto que *per se* tiene 100 nM BPA sobre la expresión de Ca_v2.3 (figura 39B).

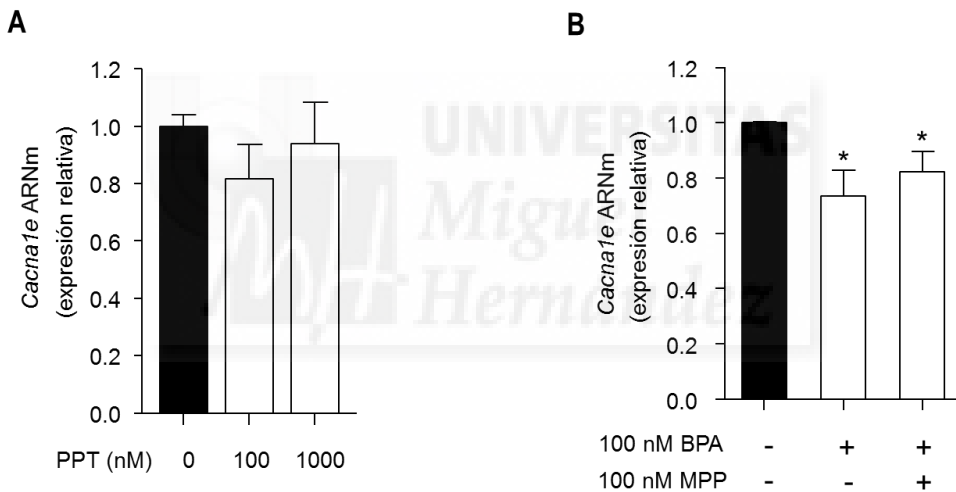


Figura 39. Expresión génica en islotes de Langerhans en relación a la actividad de ER α .

(A) Niveles de expresión de ARNm (relativa al control) del gen *Cacna1e* (Ca_v2.3) en islotes expuestos a 100 nM o 1 μ M PPT. (B) Niveles de expresión de ARNm (relativa al control) del gen *Cacna1e* (Ca_v2.3) en islotes expuestos a 100 nM BPA en presencia o no de un antagonista específico de ER α (MPP). En A: control, n = 13; 100 nM PPT, n = 11; 1 μ M PPT, n = 11. En B: control, n = 7; 100 nM BPA, n = 7; 100 nM BPA + 100 nM MPP, n = 7. Student's t-test: * p \leq 0.05.

13. ER α MODULA LA ENTRADA DE Ca $^{2+}$ EN CÉLULA β A TRAVÉS DE LA VÍA DE PI3K.

Ya que ER α no parece actuar sobre la transcripción del gen que codifica para el canal Ca $_v$ 2.3 (ni tampoco sobre otros canales de Ca $^{2+}$ como Ca $_v$ 1.2), estudiamos la posible implicación de vías alternativas en la regulación de la entrada de Ca $^{2+}$ tras la activación de ER α . En estos experimentos de *patch-clamp*, las células aisladas fueron expuestas a dosis altas de ligandos de ER α , 100 nM PPT o BPA, en presencia de inhibidores específicos de PI3K (wortmannin, 100 nM) o ERK 1/2 (PD98059, 10 μ M).

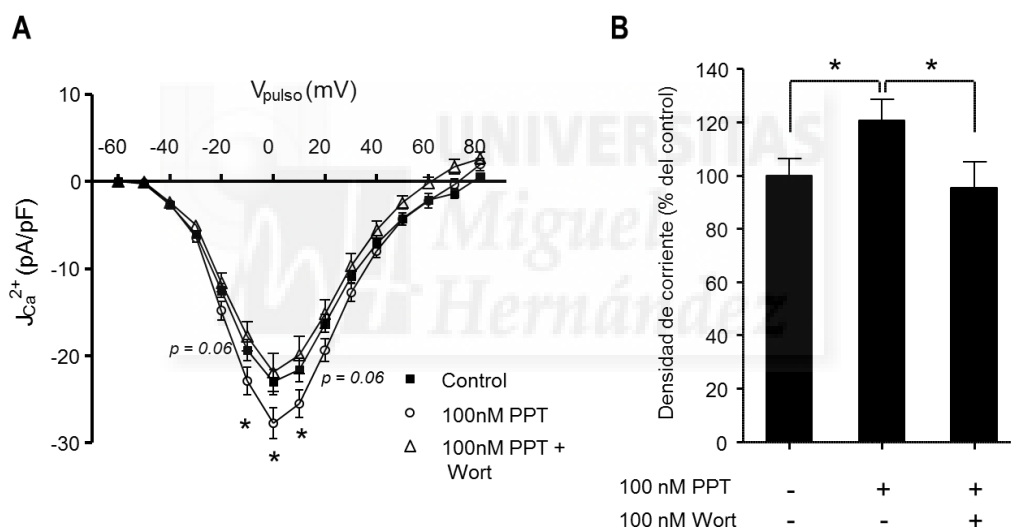


Figura 40. Corrientes macroscópicas de Ca $^{2+}$ en célula β . (A) Relación $J_{Ca^{2+}}$ - V para las corrientes de Ca $^{2+}$ de células β cultivadas durante 48 h con 100 nM PPT, en presencia o no de wortmannin (100nM). (B) Densidad máxima de corriente expresada como porcentaje respecto del control del experimento mostrado en (A). Control, $n = 26$; 100 nM PPT, $n = 21$; 100 nM PPT + 100 nM WORT, $n = 12$. En A, Student's *t*-test comparando 100 nM PPT versus 100 nM PPT + 100 nM WORT. Student's *t*-test: * $p \leq 0.05$.

Al explorar la vía de PI3K, comprobamos, en primer lugar, que la incubación con 100 nM wortmannin no alteraba *per se* la corriente de Ca^{2+} en las células en cultivo ($V_{\text{pulso}} = 0$ mV; $J_{\text{Ca}^{2+}}$ control = -28.33 ± 2.63 pA/pF; $J_{\text{Ca}^{2+}}$ 100 nM WORT = -26.40 ± 2.70 pA/pF). Control, n = 10; WORT, n = 14). Como ya se recogió en el apartado anterior, la incubación durante 48 horas con 100 nM PPT provocó un incremento significativo de la corriente máxima registrada ($V_{\text{pulso}} = 0$ mV; $J_{\text{Ca}^{2+}}$ control = -22.97 ± 1.45 pA/pF; $J_{\text{Ca}^{2+}}$ 100 nM PPT = -27.72 ± 1.78 pA/pF). Sin embargo, las células que fueron incubadas conjuntamente con 100 nM PPT y el inhibidor específico wortmannin mantuvieron una corriente de Ca^{2+} equiparable a las células control ($J_{\text{Ca}^{2+}}$ 100 nM PPT + wortmannin = -21.90 ± 2.21 pA/pF), y significativamente menor con respecto a las células que fueron tratadas únicamente con 100 nM PPT (figura 40). Encontramos pues que el inhibidor wortmannin impide la acción de PPT sobre la corriente de Ca^{2+} . A continuación, realizamos el mismo experimento de electrofisiología sustituyendo 100 nM PPT (activación exclusiva de $\text{ER}\alpha$) por 100 nM BPA (activación de ambos receptores, $\text{ER}\alpha$ y $\text{ER}\beta$). El resultado que obtuvimos anteriormente con 100 nM BPA fue replicado nuevamente: a esta concentración, la incubación con BPA no tiene efecto en la corriente de Ca^{2+} de la célula β ($V_{\text{pulso}} = 0$ mV; $J_{\text{Ca}^{2+}}$ control = -26.19 ± 1.14 pA/pF; $J_{\text{Ca}^{2+}}$ 100 nM BPA = -26.97 ± 1.56 pA/pF). Ahora bien, cuando se combinó con wortmannin durante el período de tratamiento, la exposición a 100 nM BPA sí tuvo la capacidad de provocar una reducción significativa de la corriente de Ca^{2+} ($J_{\text{Ca}^{2+}}$ 100 nM BPA + wortmannin = -22.75 ± 1.20 pA/pF) (figura 41A y 41B). Alternativamente, empleamos el inhibidor de ERK1/2 PD98059 conjuntamente con 100 nM BPA durante las 48 horas de exposición. En este caso, no se produjo ningún cambio significativo en la acción de 100 nM BPA debido a la presencia del inhibidor (figura 41C y 41D). Estos resultados ponen de manifiesto la participación de la vía de PI3K en la modulación que ejerce $\text{ER}\alpha$ sobre la entrada de Ca^{2+} en la célula β pancreática, tras su activación persistente con dosis altas de ligando. Como se desarrollará en el capítulo de discusión, estos efectos opuestos de $\text{ER}\beta$ y $\text{ER}\alpha$ sobre la entrada de Ca^{2+} en la célula β suponen una posible explicación de los mecanismos que subyacen al fenómeno de las dosis-respuesta no monotónicas de los disruptores endocrinos.

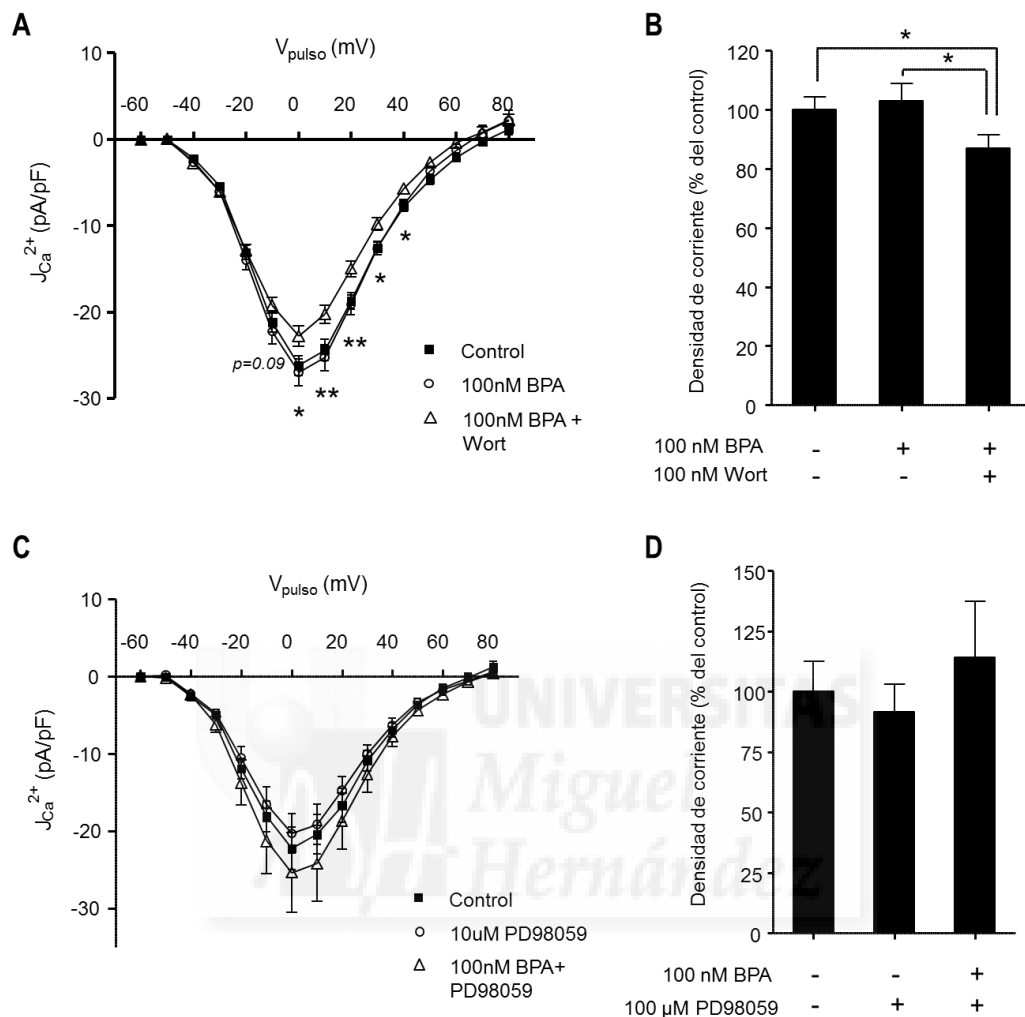


Figura 41. Corrientes macroscópicas de Ca^{2+} registradas en células β incubadas durante 48h con 100 nM BPA en presencia de inhibidores específicos. Relación $J_{Ca^{2+}} - V$ para las corrientes de Ca^{2+} de células β cultivadas durante 48 h con 100 nM BPA, en presencia o no de 100 nM wortmannin (A) o 10 μ M PD98059 (C). (B) Densidad máxima de corriente expresada como porcentaje respecto del control del experimento mostrado en (A). (D) Igual que en (B) pero para el experimento mostrado en (C). En A-B: control, $n = 12$; 100 nM BPA, $n = 15$; 100 nM BPA + 100 nM WORT, $n = 16$. En C-D: control, $n = 9$; 10 μ M PD98059, $n = 8$; 100 nM BPA + 10 μ M PD98059, $n = 9$. En A, Student's t -test comparando 100 nM BPA versus 100 nM BPA + 100 nM WORT. Student's t -test: * $p \leq 0.05$, ** $p < 0.01$.

DISCUSIÓN



1. Efecto de la exposición a dosis bajas de BPA sobre la actividad eléctrica de célula β .

Desde hace décadas, el BPA se utiliza de forma masiva en la producción de todo tipo de plásticos que aparecen en productos de uso rutinario. El comportamiento del BPA como un estrógeno fue descrito antes de que éste fuese redescubierto por la industria química, lo que pone en entredicho la idoneidad de esta elección desde su comienzo (Dodds & Lawson, 1936). A día de hoy, el BPA sigue siendo uno de los compuestos químicos con mayor volumen de mercado. Si observamos nuestro entorno más inmediato, cualquiera que sea, comprobaremos que nuestro consumo se sustenta en el uso de plásticos. En el año 2015, la producción mundial de plásticos alcanzó las 322 millones de toneladas (fuente ©PlasticsEurope). El BPA es omnipresente en nuestro día a día, si bien es especialmente preocupante su presencia en objetos que están en contacto con productos de consumo (recipientes, embalajes, latas, etc.). En ciertas circunstancias (por ejemplo, ante cambios del pH o al incrementarse la temperatura), el BPA puede ser transferido a los alimentos y/o bebidas, constituyendo una vía oral de contaminación. Aunque la ingestión ha sido considerada la fuente principal de la contaminación interna, en los últimos años ha ganado protagonismo una posible ruta adicional, la absorción transdérmica de BPA, que es muy abundante, por ejemplo, en el papel térmico empleado para la impresión de comprobantes de compra (Mielke *et al.*, 2011). Multitud de estudios de biomonitorización han encontrado niveles detectables de BPA en fluidos humanos (orina, sangre, leche materna, etc.) (Vandenberg *et al.*, 2007), por lo que puede decirse que, con independencia de la ruta de absorción, la contaminación interna es real y, debido a la ubicuidad del BPA, posiblemente se trate de una contaminación crónica y virtualmente inevitable. De hecho, el BPA es detectable en la orina del 93% de la población estadounidense (Calafat *et al.*, 2008). Además, algunos estudios sugieren que la exposición diaria a BPA es mucho mayor de lo que inicialmente se pensaba (Taylor *et al.*, 2011; Vandenberg *et al.*, 2013).

Las células β pancreáticas son eléctricamente excitables. El cometido último de este tipo celular es la secreción de insulina en respuesta a un incremento de la concentración plasmática de glucosa, y esta tarea depende de su actividad eléctrica. En el acoplamiento estímulo-secreción, el canal K_{ATP} juega un papel central en el control de la excitabilidad de la célula β pancreática. Cuando la concentración de glucosa en el medio externo es baja, los canales K_{ATP} permanecen en estado abierto, manteniéndose el potencial de membrana entorno a su valor de reposo (≈ -70 mV). Cuando los niveles extracelulares de glucosa aumentan, su internalización y posterior metabolización provoca un incremento de la razón ATP/ADP, lo que supone el cierre de los K_{ATP} , y la consecuente despolarización del potencial de membrana hasta un valor umbral, en el que se activa una corriente de entrada de Ca^{2+} a través de canales Ca_v . La fluctuaciones entre los diferentes estados de activación de los canales que participan, genera un patrón de actividad eléctrica muy característico de célula β , el cual se caracteriza por el disparo de espigas de potenciales de acción sobre mesetas de despolarización (denominadas ráfagas), que aparecen separadas por períodos eléctricamente silentes. La actividad eléctrica de la célula β origina el patrón oscilatorio de la $[Ca^{2+}]_i$ que subyace a la pulsatilidad en la secreción de insulina (Santos *et al.* 1991; Valdeolmillos *et al.*, 1992; Martin *et al.*, 1995; Barbosa *et al.*, 1996).

Cuando analizamos detalladamente los potenciales de acción generados por una concentración de glucosa de 11 mM, observamos que la exposición sostenida (48 horas) a una dosis baja de BPA (1 nM) provoca alteraciones importantes en los potenciales de acción disparados por las células β aisladas. Los potenciales de acción de estas células expuestas son de menor amplitud y mayor duración, con una disminución neta del área bajo cada uno de ellos. Por lo tanto, la exposición a 1 nM BPA altera ambas fases del potencial de acción, ascendente (despolarización) y descendente (repolarización), modificando la forma de cada potencial de acción individual, sin que esto afecte la frecuencia de disparo. Tomando el modelo vigente, la afectación de ambos componentes del potencial de acción sugiere una alteración

provocada por BPA de la corriente de Ca^{2+} voltaje-dependiente (responsable de la fase ascendente del PA), y/o de los flujos de K^+ , que están involucrados en la repolarización del potencial de acción (Rorsman & Trube, 1986). Teniendo en cuenta los registros de actividad eléctrica que hemos obtenido en ambos grupos experimentales, es poco probable que cambios en la actividad del canal K_{ATP} sean responsables del tipo de alteraciones observadas. Las células β cultivadas en presencia de 1 nM BPA no presentan cambios en el potencial de membrana en reposo, y la estimulación de la actividad eléctrica por glucosa es perfectamente comparable entre ambos grupos. Aunque no se ha analizado específicamente en este trabajo, un incremento o reducción de la conductancia del K_{ATP} supondrían cambios manifiestos en la excitabilidad de la célula β , de tal modo que una menor actividad de K_{ATP} supone que la generación de la actividad eléctrica aparezca a glucosas más bajas (Olofsson *et al.*, 2007), lo que es debido a un potencial de membrana más despolarizado en el reposo (Irlles *et al.*, 2015). Así mismo, cambios en la conductancia y/o cinética de K_{ATP} parecen más relacionados con alteraciones del patrón oscilatorio (por ejemplo, duración de las ráfagas) (Ashcroft & Rorsman, 2013), y no tanto con la forma de cada espiga.

2. Efecto de la exposición a BPA sobre las variaciones de Ca^{2+} intracelular en células β .

Está ampliamente caracterizado como el patrón de actividad eléctrica en la célula β es el responsable de la generación de sus típicas oscilaciones intracelulares de Ca^{2+} (Santos *et al.* 1991). Habiendo demostrado que la exposición a 1 nM BPA altera el perfil de las espigas de los potenciales de acción de la célula β , decidimos estudiar la repercusión que estos cambios tenían sobre la señal de Ca^{2+} . La exposición a una dosis baja de BPA provoca una reducción de la cantidad de Ca^{2+} disponible en el citoplasma de las células β en respuesta a glucosa. Esta disminución de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ refleja una menor entrada de Ca^{2+} debida a la amplitud reducida de sus potenciales de acción por efecto del BPA. Por otro lado, las células tratadas no muestran cambios

patentes en el patrón oscilatorio de la señal intracelular de Ca^{2+} , esto sugiere nuevamente que no existen cambios relacionados con la duración de las ráfagas o la capacidad de la célula β para ser excitada, y que, por lo tanto, no es probable que el canal K_{ATP} esté afectado (Irles *et al.*, 2015).

Los resultados obtenidos en los experimentos de imagen de Ca^{2+} en respuesta a altas concentraciones de K^+ , demuestran que la disminución en la entrada de Ca^{2+} debida a la exposición a BPA no puede ser explicada simplemente por posibles modificaciones en el metabolismo de la glucosa. En estos experimentos, además, decidimos estudiar los efectos sobre la señalización de Ca^{2+} de un rango amplio de dosis de BPA (0.1, 1, 10 y 100 nM), lo que permite construir una curva dosis-respuesta. La exposición a BPA provoca que la entrada de Ca^{2+} sea de menor magnitud en las células β aisladas cuando son expuestas a dosis bajas (con un efecto máximo a 1 nM), pero el efecto no se encuentra cuando la concentración de BPA en el cultivo se incrementa varios órdenes de magnitud (10 y 100 nM). Por lo tanto, hallamos que este efecto de BPA sobre la fisiología de la célula β es no monótonico. El concepto de la nomonotonidad está relacionado con los efectos a dosis bajas que se describen para hormonas y EDCs. Una curva dosis-respuesta es no monótonica cuando su pendiente cambia de signo en algún punto del rango de dosis probado. Por contraposición, una respuesta es monótonica cuando el signo de la pendiente de la curva no cambia, independientemente de si el efecto es lineal o no. En el caso del efecto del BPA que encontramos sobre la entrada de Ca^{2+} en la célula β , la curva dosis-respuesta tendría la forma de una U-invertida, ya que el efecto (negativo) es máximo a dosis intermedias e inexistente en los extremos del rango (Vandenberg *et al.*, 2012; Vandenberg, 2013). La aparición de la reducción de la entrada de Ca^{2+} utilizando un estímulo que despolariza la célula con independencia del metabolismo de la glucosa, sugiere que el cambio promovido por el BPA debe estar relacionado con flujos iónicos voltaje-dependientes.

3. Efecto de la exposición a BPA sobre las exocitosis y la secreción de insulina de células β pancreáticas.

En nuestro modelo, encontramos que la incubación persistente con una dosis tan baja de BPA como 1 nM provoca cambios sustanciales en la capacidad exocitótica de las células β . Según los resultados que hemos obtenido, la exposición a BPA altera la exocitosis de la célula β , y las consecuencias son diferentes en función de los niveles de glucosa en el medio extracelular. De tal modo que, cuando la concentración de glucosa es baja (5 mM), las células expuestas a BPA muestran una disminución significativa de ΔC_m , lo que debe ser interpretado como una reducción en la magnitud de su respuesta exocitótica. Sin embargo, cuando se eleva la concentración extracelular de glucosa hasta 11 mM, se produce el efecto opuesto, y la incubación con la misma dosis de BPA (1 nM) provoca una potenciación de la exocitosis en la célula β . Ya que en estos experimentos, el amplificador del sistema de registro controla en todo momento el voltaje de la membrana, la potenciación que describimos no debería estar relacionada con un cambio en el voltaje, sino que el metabolismo de la glucosa, o la producción de algún segundo mensajero, podría amplificar la exocitosis independientemente de la variación de Ca^{2+} . A día de hoy, se aceptada la existencia de un segundo mecanismo implicado en la secreción de insulina estimulada por glucosa, al que se ha denominado “vía metabólica amplificadora” (Henquin, 2000). Inicialmente, este concepto surgió de la observación de que la concentración de glucosa puede estimular la secreción de insulina aun cuando se impide farmacológicamente el cierre del canal K_{ATP} (por ejemplo, empleando diazóxido). Este efecto requiere que la glucosa sea metabolizada, pero no implica ningún cambio en el potencial de membrana o una elevación mayor de la $[Ca^{2+}]_i$ (Gembal *et al.*, 1992; Sato *et al.*, 1992). Por lo tanto, la glucosa estimula la secreción de insulina a través de mecanismos que no se restringen únicamente a la inhibición del canal K_{ATP} , ni suponen un incremento mayor de la $[Ca^{2+}]_i$ (Henquin, 2000). Todavía se desconoce la explicación mecanística para este fenómeno, y el segundo mensajero o efector responsable es todavía una incógnita. Sin embargo, muchas evidencias se han ido acumulando en

los últimos años. Es muy probable que los cambios en el ratio ATP/ADP, que son consecuencia del metabolismo de la glucosa, participen de ambas vías de estimulación de la secreción de insulina. El uso de inhibidores de la actividad fosfatasa sugiere que la fosforilación/desfosforilación de determinadas proteínas de cascadas moduladoras de la exocitosis estaría implicadas en esta vía amplificadora. Los resultados de diversos estudios apuntan a que los efectos amplificadores de la glucosa no estarían mediados directamente por la activación de las vías de adenilato ciclasa/PKA o fosfolipasa C/PKC (Gembal *et al.*, 1993; Zawalich & Zawalich, 1997; Sato *et al.*, 1998). Por lo tanto, según nuestros resultados en los experimentos de exocitosis, el BPA podría modular ambas vías implicadas en la secreción de insulina; por un lado, disminuyendo el mecanismo desencadenante de la secreción promoviendo una menor entrada de Ca^{2+} ; y alternativamente, el BPA también impulsaría una mayor potenciación a través de la vía amplificadora, por la que se aumentaría la eficacia del Ca^{2+} intracelular para promover la exocitosis, sin que esto implique un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Esta explicación sería compatible con los resultados que hemos obtenido al registrar la señal de Ca^{2+} intracelular (disminuida) y la exocitosis (aumentada) en las células BPA al ser estimuladas con 11 mM glucosa.

El análisis de los resultados de secreción de insulina sugiere de igual modo efectos opuestos de BPA en su regulación. En presencia de concentraciones estimulatorias de glucosa, los islotes incubados en presencia de 1 nM BPA secretan una mayor cantidad de insulina (Alonso-Magdalena *et al.*, 2008). En este trabajo, cuando los islotes aislados fueron cultivados en presencia de dosis bajas de BPA durante 48 horas, se observó igualmente un incremento del contenido de insulina y de la secreción de la misma. Además, en estos experimentos se demostró que la dosis de BPA empleada se relaciona con la síntesis de insulina de manera no monotónica, con incremento de su contenido a dosis intermedias del intervalo (1 y 10 nM BPA), que no se reproducen a dosis mayores (100 y 1000 nM BPA), ajustándose la curva dosis-respuesta a la forma de una U-invertida (Alonso-

Magdalena *et al.*, 2008). Sin embargo, cuando los islotes son despolarizados con alto K^+ , en presencia de una concentración baja de glucosa, se observa que la incubación con BPA provoca una reducción manifiesta de la secreción de insulina. Teniendo en cuenta los resultados discutidos con anterioridad, esta menor secreción puede ser el reflejo de una disminución del Ca^{2+} intracelular disponible, que sin embargo podría ser utilizado de forma más eficiente cuando se eleva la concentración de glucosa.

Ya que el BPA parece potenciar la secreción de insulina mediante un mecanismo dependiente del metabolismo de la glucosa (aunque no relacionado con su capacidad para modular actividad eléctrica), evaluamos si la exposición a BPA tenía algún impacto en el rendimiento de vías glucolíticas y/o la actividad mitocondrial de la célula β . Estos experimentos consisten en la medida de las señales de fluorescencia de NADH (autofluorescencia) y de los cambios en la emisión de la sonda fluorescente Rh-123 como consecuencia de las variaciones en el Ψ_m (Rafacho *et al.* 2010; Irlles *et al.*, 2015). En nuestro modelo de exposición, una concentración de 1 nM BPA no produce ningún cambio en la producción de NADH en respuesta a las concentraciones de glucosa testadas, y esto ocurre tanto en islotes intactos como en células individuales. Atendiendo a los resultados obtenidos, incluso puede observarse una disminución, aunque no significativa, en la cantidad de poder reductor producido a 11 mM glucosa. En el caso de la función mitocondrial, la exposición a BPA tampoco alteraría la capacidad de energización de las mitocondrias de la célula β en respuesta a elevaciones de glucosa. Estos hallazgos nos permiten confirmar varios puntos relevantes. En primer lugar, si tomamos el estado metabólico como un indicador de bienestar celular, nuestros resultados sugieren que el BPA no provoca citotoxicidad en nuestro modelo y no comprometería la viabilidad de la célula β . En segundo lugar, la exposición a dosis medioambientalmente relevantes de BPA no parece alterar la producción de intermediarios de la glucólisis y/o el ciclo de Krebs, así como tampoco parece interferir en la actividad mitocondrial de las células β . Por lo tanto, nuestros

resultados sugieren, aunque de forma indirecta, que la producción de ATP en respuesta a glucosa no varía en las células β incubadas con BPA.

4. Efecto del BPA sobre las corrientes de Ca^{2+} voltaje-dependientes.

Una vez que hemos descrito que las dosis bajas de BPA provocan una disminución significativa de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en respuesta a despolarizaciones de membrana, nos centramos en averiguar cuál era el mecanismo subyacente. Valiéndonos de la técnica de *patch-clamp*, encontramos que las células β cultivadas en presencia de 1 nM BPA presentaban una disminución significativa de la corriente macroscópica de Ca^{2+} al ser estimuladas con trenes de pulsos de voltaje. Es decir, el BPA altera la densidad global de corriente conducida por los Ca_v . Aunque no se ha estudiado lo suficiente, se han descrito efectos de BPA (agudos y crónicos) sobre diversos tipos de canales de Ca^{2+} expresados en diferentes tipos celulares (Soriano *et al.*, 2016), si bien las dosis empleadas en la mayoría de estos trabajos suelen ser altas (en el rango μM), por lo que podrían ser considerados ensayos más propios de la toxicología ya que emplean dosis muy superiores a los valores reales de exposición diaria a BPA. Deutschmann *et al.* (2013) encontraron que el BPA podría actuar sobre los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes como un potente inhibidor inespecífico, que afectaría del mismo modo a los subtipos -L, -N, -P/Q, -R y -T de la corriente que son expresados en distintos tipos celulares (células endocrinas GH3 de rata, neuronas de la raíz dorsal y cardiomiocitos de ratón, y células HEK que expresan una forma recombinante del canal tipo-R de humanos). En este estudio, la inhibición ejercida por BPA es rápida y reversible, y parece deberse a la unión directa del BPA a la parte extracelular de la subunidad formadora del poro del canal, produciéndose la inhibición en presencia de dosis altas de BPA (EC_{50} : 26-35 μM) (Deutschmann *et al.*, 2013). En nuestro estudio, no es probable que los resultados obtenidos se deban a un bloqueo directo ejercido por BPA, en primer lugar porque los registros electrofisiológicos se realizan tras una larga exposición a BPA, pero nunca en su presencia; y en segundo lugar, porque la reducción de la corriente de Ca^{2+} que

describimos se produce a dosis 1000 veces más bajas (1 nM) que las descritas en el trabajo de Deutschmann *et al.* En otro trabajo reciente, se ha descrito que la aplicación aguda de BPA provoca la inhibición rápida de canales de Ca^{2+} tipo-T expresados en células HEK. Sugiriendo que el BPA a concentraciones altas actuaría impidiendo el flujo de corriente al bloquear el poro del canal. Aunque se necesitan dosis elevadas para bloquear los subtipos $\text{Ca}_v3.1$ y $\text{Ca}_v3.3$, el canal $\text{Ca}_v3.2$ se inhibiría con dosis de BPA más bajas (en el rango nM) (Michaela *et al.*, 2014).

En nuestro modelo, cuando incrementamos la dosis de BPA en el cultivo hasta 100 nM, las células β expuestas a esta dosis no presentan ninguna alteración en la densidad de la corriente macroscópica de Ca^{2+} (como ya ocurría al medir las señales intracelulares de Ca^{2+}). Por lo tanto, la regulación que ejerce BPA sobre la corriente Ca^{2+} es dosis-dependiente y no monotónica, promoviendo una reducción de los flujos iónicos a través de Ca_v a una dosis baja (1nM), que no ocurre al incrementar la dosis de exposición hasta 100 nM. Estamos, entonces, ante una acción de BPA sobre una propiedad fundamental de la célula β , que potencialmente podría ser crítica para su función y que sólo se manifiesta a dosis bajas. En los últimos años, distintos estudios epidemiológicos han relacionado la exposición a BPA con el padecimiento de ciertas patologías, entre ellas la diabetes mellitus. En la etiología de esta enfermedad participarían conjuntamente la predisposición genética y los factores ambientales. En el caso de la diabetes, y teniendo en cuenta la multitud de evidencias científicas publicadas en los últimos años (Shankar & Teppala, 2011; Silver *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012; Sabanayagam *et al.*, 2013), la exposición a BPA podría ser considerada un factor de riesgo para su desarrollo. Diversas publicaciones refieren, en modelos animales, alteraciones muy significativas del metabolismo glucídico en rangos de concentración de BPA (0.1-100 nM) muy por debajo del rango de concentraciones que suelen ensayarse en los test estandarizados de bioseguridad. Experimentos *in vivo* en los que ratones macho adultos fueron expuestos a 100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ durante varios días (4 – 8 días), demostraron que el BPA causa resistencia a la acción de la insulina e intolerancia a la glucosa. Además, los islotes de Langerhans de estos

ratones expuestos tenían aumentada su secreción de insulina estimulada por glucosa, y presentaban un incremento manifiesto del contenido de insulina. Estas alteraciones contribuyeron a la aparición de hiperinsulinemia en los ratones (Alonso-Magdalena *et al.*, 2006; Batista *et al.*, 2012). Las alteraciones descritas a nivel del islote de Langerhans en los ratones tratados con BPA podrían deberse a una respuesta secundaria para contrarrestar la resistencia a insulina, o podrían ser también el resultado de una acción directa del BPA sobre las células del islote pancreático.

Las células β de ratón expresan distintos tipos de Ca_v , y la corriente conducida por éstos presenta propiedades biofísicas características (tipo-L, tipo -R y tipo-P/Q). La mayor parte de la corriente macroscópica de Ca^{2+} ($\approx 50\%$) exhibe propiedades de corriente tipo-L (dirigida principalmente a través de los canales $\text{Ca}_v1.2$). Los ratones que no disponen de canales $\text{Ca}_v1.2$ funcionales ($\text{Ca}_v1.2^{-/-}$) son intolerantes a la glucosa, y sus células β muestran una fuerte disminución en la primera fase de la secreción de insulina. Sorprendentemente estas células no presentan cambios significativos en los niveles intracelulares de Ca^{2+} o en la generación de actividad eléctrica en respuesta a 10 mM glucosa. Se ha sugerido que los canales $\text{Ca}_v1.2$ están estructuralmente vinculados a la maquinaria exocitótica, y que el componente de la corriente de Ca^{2+} a su través se invierte preferencialmente en la movilización de las vesículas maduras del RRP, es decir, en la magnitud de la primera fase de secreción (Schulla *et al.*, 2003). El 50% restante corresponde a las corrientes tipo-R y tipo-P/Q, cada una de ellas representa alrededor del 25% de la corriente total de Ca^{2+} . La corriente tipo-R es conducida a través de $\text{Ca}_v2.3$ (Vajna *et al.*, 1998), mientras que la corriente tipo-P/Q fluye a través del canal $\text{Ca}_v2.1$. Decidimos realizar una disección farmacológica para apuntar qué componente particular de la corriente de Ca^{2+} está afectado por BPA. Para ello usamos nifedipina y SNX-482 para bloquear respectivamente el componente tipo-L y tipo-R, y poder así diseccionar la contribución porcentual de cada uno. En nuestro trabajo, la descomposición de la corriente de Ca^{2+} de las células β no expuestas (control) se ajusta a lo descrito en la literatura, con un 50% atribuible a tipo-L y un 25% a tipo-R. Sin embargo, la

contribución atribuida a la corriente de Ca^{2+} tipo-R aparece reducida a la mitad ($\approx 12\%$) en las células β expuestas a una dosis baja de BPA (1 nM). Por lo tanto sería la reducción de la corriente a través de $\text{Ca}_v2.3$ la responsable de los cambios que hallamos en las células expuestas a BPA. Este resultado es ratificado mediante un abordaje complementario. En este caso, como hicimos anteriormente, medimos la magnitud de la señal de Ca^{2+} desencadenada por 65 mM KCl en células β permeabilizadas (con diazóxido). Cuando las células fueron preincubadas con el inhibidor SNX-482, las diferente magnitud de respuesta entre células expuesta o no a BPA se anuló. De este resultado podemos deducir que este inhibidor específico es incapaz de bloquear significativamente la corriente de Ca^{2+} en células expuestas a BPA, y que el bloqueo ejercido sobre la corriente tipo-R en las células control supone que se equiparen las magnitudes de respuesta entre ambos grupos de células. Todo ello señala nuevamente que es el componente tipo-R la diana de acción del BPA en nuestro modelo. Las alteraciones que nosotros describimos (disminución de la entrada de Ca^{2+} , de la exocitosis y secreción de insulina) son similares a las encontradas en células β de ratones $\text{Ca}_v2.3^{-/-}$. Estas células que carecen de corriente tipo-R presentan una disminución de la corriente macroscópica de Ca^{2+} de aproximadamente un 23%. Este dato es idéntico a la reducción que hallamos en células β expuestas a 1 nM BPA por 48 horas (24%). Así mismo, las células β de ratones $\text{Ca}_v2.3^{-/-}$ muestran una disminución manifiesta de su exocitosis (21%), siendo este cambio atribuible a alteraciones selectivas de componentes tardíos de la secreción de insulina (sin afectar a la magnitud de la fase inicial). En cuanto a la homeostasis de Ca^{2+} intracelular, las células β que carecen de $\text{Ca}_v2.3$ presentan una disminución de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en respuesta a 15 mM glucosa (Jing *et al.*, 2005). Estos resultados referidos a la exocitosis y las señales de Ca^{2+} estimuladas por glucosa son comparables con los resultados que hemos obtenido con la incubación con 1 nM BPA en células β pancreáticas.

5. Mecanismo de acción del BPA.

Las células β pancreáticas expresan los receptores de estrógenos, ER α y ER β (Nadal *et al.*, 2000; Alonso-Magdalena *et al.*, 2008). Se ha descrito que la activación particular de uno u otro receptor media diversas acciones en la célula β . La activación extranuclear de ER α , por 17 β -estradiol o BPA, estimula la síntesis de insulina (Alonso-Magdalena *et al.*, 2008; Wong *et al.*, 2010). Así mismo, ER α tiene efectos antiapoptóticos en la célula β a través de la activación de vías rápidas en el citosol (Le May *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2009). En cuanto a ER β , se ha demostrado que tiene un rol principal para la activación de cascadas de transducción de señales estrogénicas que estimulan la secreción de insulina. Se ha demostrado que ER β tiene un efecto rápido sobre el canal K_{ATP}, de tal modo que dosis bajas de 17 β -estradiol o BPA (1 nM) provocan una menor actividad de este canal (a través de un mecanismo que es dependiente de la producción cGMP y glucosa) (Soriano *et al.*, 2008; Soriano *et al.*, 2012). Alternativamente, se ha demostrado que la activación de ER β , en un amplio rango de dosis, incrementa significativamente la tasa de proliferación de la célula β (Alonso-Magdalena *et al.*, 2008). En los últimos años, diversos trabajos han descrito la presencia de otro ER en la célula β . Este receptor, denominado GPER (del inglés *G protein-coupled estrogen receptor*), estaría implicado en la transducción de señales rápidas (no genómicas) de 17 β -estradiol, y parece tener capacidad para regular la secreción de insulina y la supervivencia celular (Liu *et al.*, 2009; Balhuizen *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2011; Sharma & Prossnitz 2011).

La función de ER α y/o ER β en los efectos que describimos de BPA sobre la entrada de Ca²⁺ en células β es evaluado empleando ligando selectivos (PPT, DPN, MPP y PHTPP) y células provenientes de ratones ER β *knockout* (ER β ^{-/-}). Los efectos de 1 nM BPA sobre la magnitud de las señales de Ca²⁺ en respuesta a 65 mM KCl y la corriente de Ca²⁺ voltaje-dependiente son reproducidos por la misma dosis del agonista específico de ER β DPN, mientras que la actividad con dosis bajas de PPT (agonista de ER α) no provoca ningún cambio en estos parámetros. En el mismo

sentido, encontramos que la anulación farmacológica de ER α (usando el bloqueante MPP) no impide que BPA actúe reduciendo la entrada de Ca²⁺ a dosis bajas, por lo que se sugiere que ER α no tiene una participación necesaria en la mediación de este efecto. Analizando con detalle los resultados de los experimentos empleando agonistas y antagonistas de ERs, parece que es ER β el responsable de mediar los efectos de dosis bajas de BPA (en concreto 1 nM). Es necesario señalar que la disminución de la corriente macroscópica de Ca²⁺ provocada por la incubación con 1 nM DPN aparece aún en presencia de nifedipina, lo que demuestra que no es el componente tipo-L el que es regulado por ER β , apuntando nuevamente a la modulación de la corriente a través de Ca_v2.3.

Cuando analizamos mediante PCR cuantitativa la expresión de los principales Ca_v de la célula β , encontramos que la exposición a 1 nM BPA provoca una disminución (\approx 30%) del ARNm del canal Ca_v2.3, en concreto de la subunidad formadora del poro del canal (*Cacna1e*). Esta reducción es comparable a la magnitud de bloqueo de la corriente tipo-R provocado por el BPA que encontramos en los experimentos de disección farmacológica de la corriente de Ca²⁺. Nuestros resultados sugieren, por lo tanto, que el BPA a una dosis tan baja como 1 nM regula la expresión de *Cacna1e*. Notablemente, la incubación con dosis más altas de BPA, 100 nM y 1 μ M, provoca una reducción de la expresión de *Cacna1e*, que es equivalente a la encontrada con una dosis baja de BPA. Estos resultados indican que dosis altas de BPA también actúan reprimiendo la expresión del canal tipo-R, sin que esto tenga un efecto neto negativo sobre la entrada o la corriente de Ca²⁺. Por lo tanto, BPA parece regular la transcripción del gen *Cacna1e* a través de ER β tanto a dosis bajas como altas. ER β y ER α son miembros de una amplia familia de receptores nucleares con capacidad de activar/reprimir multitud de genes en un gran número de tejidos. Los ERs pueden regular la expresión génica a través de diversos mecanismos. En primer lugar, los ERs regulan la transcripción al unirse directamente a los elementos de respuesta a estrógenos (o EREs) que aparecen en las regiones promotoras de genes diana. Los EREs son secuencias palindrómicas que son

reconocidas en el genoma por ERs homodiméricos unidos a ligando (Weatherman *et al.*, 2001; Harrington *et al.*, 2003). Empleando herramientas bioinformáticas, hemos comprobado que el promotor del gen *Cacna1e* no incluye las secuencias ERE consenso más estudiadas. Esto sugiere que el efecto de BPA sobre la transcripción de este gen no está mediado por un efecto genómico clásico de ER β . Además de unirse a ERE consenso, los ERs unidos a ligando pueden regular la transcripción al reconocer genes que contengan ERE no-consenso o ERE $\frac{1}{2}$. Y, finalmente, los ERs también pueden modular la transcripción sin tener que unirse al ADN. En este caso, los ERs llevan a cabo una regulación transcripcional mediante un mecanismo no-clásico en el núcleo, que consiste en el anclaje proteína-proteína entre el ER y otros factores de transcripción, como Sp1 y AP-1. La transactivación o transrepresión de genes tras la formación de los complejos transcripcionales ER/Sp1 o ER/AP-1 son procesos de gran complejidad molecular, y dependen de la estructura del ligando que se una a ER, el subtipo de ER al que se una (ER α o ER β), la localización del receptor, el promotor del gen y el estado o contexto de la célula (Safe & Kim, 2008). Una de las características más interesantes de esta regulación genómica no-clásica es que se ha descrito que los antiestrógenos pueden activar igualmente la transcripción a través de estos elementos. Los antiestrógenos como el ICI 182780 y el 4-OHT pueden actuar activando AP-1 (al igual que 17 β -estradiol) en células endometriales cancerosas; sin embargo, son incapaces de activar AP-1 en otras células tumorales, como MCF-7 y ZR-75, que expresan ER (Webb *et al.*, 1995). Fujimoto *et al.* (2004) encontraron que la mayoría de xenoestrógenos (incluido el BPA) son capaces de activar ER/AP-1, aunque preferencialmente mediante ER α (Fujimoto *et al.*, 2004). Otros trabajos han demostrado que existen diferencias muy significativas en la activación de ER α /AP-1 y ER β /AP-1 dependiendo de la estructura del ligando; Weatherman *et al.* (2001) hallaron que los moduladores de estrógenos que testaron (SERMs: GW-5638 y GW-7604) promueven la transactivación de AP-1, y que su potencia es mucho mayor a través de ER β que de ER α . Estas diferencias no se deben a una mayor selectividad por uno u otro receptor (se unen por igual a ER β y ER α), aunque su afinidad de unión es más débil que para otros SERMs con efectos tisulares similares (raloxifene y 4-hydroxytamoxifen) (Weatherman *et al.*, 2001). Es

importante señalar que el BPA ha sido considerado un estrógeno débil, con una afinidad por ERs que se ha estimado entre 1000 y 10000 veces menor que la de 17 β -estradiol en ensayos ERE-*luc*, por lo que suele considerarse que tiene poca potencia como modulador de la actividad de vías transcripcionales clásicas (Kuiper *et al.*, 1997; Kuiper *et al.*, 1998). Así mismo, la actividad transcripcional de los ERs tras la unión de su ligando depende del reclutamiento o disociación de coreguladores (estimuladores o represores), cuya disponibilidad en la célula parece estar sometida a un intrincado control (expresión, regulación post-traducciona, fosforilación, etc.) (McKenna & O'Malley, 2002). Por último, los ERs localizados en el citoplasma pueden regular igualmente la expresión génica a partir de la activación de cascadas de señalización iniciadas fuera del núcleo. El incremento de la expresión del gen de la insulina debido a 17 β -estradiol se debe a la interacción de ER α con la tirosina quinasa Src, que activa ERK1/2, que a su vez fosforila al factor de transcripción NeuroD1; esta fosforilación promueve su translocación al núcleo y su unión en el región del promotor de la insulina (Wong *et al.*, 2010). Serán necesarios nuevos experimentos para describir cuál es el mecanismo concreto que utiliza el BPA para reprimir la expresión del gen *Cacna1e* mediante la modulación de ER β , ya que la activación de ER α en nuestro modelo no parece tener ningún efecto sobre la expresión de este canal.

La regulación dependiente de ER β se confirma al emplear células β provenientes de ratones *knockout* que no disponen copias funcionales de ER β . En estas células ER β ^{-/-}, la incubación con una dosis baja de BPA no provoca la disminución de la entrada de Ca²⁺ a través de Ca_v, que sí se observa en las células β de ratones WT. Cuando analizamos la expresión del ARNm de Ca_v en estas células encontramos un resultado muy interesante; la incubación persistente con 1 nM BPA no sólo no disminuye la transcripción de *Cacna1e* en los islotes ER β ^{-/-}, sino que promueve una marcada tendencia a su incremento. Este resultado no solo vendría a confirmar la implicación de ER β en el mecanismo que lleva a la reducción de la entrada de Ca²⁺

a 1 nM BPA, sino que sugiere una acción contrarreguladora cuando ER β está ausente.

Nuestros resultados apuntan hacia un posible papel opuesto de ER α en la regulación de la entrada de Ca $^{2+}$ a través de canales voltaje-dependientes. Cuando incubamos las células β en presencia del antagonista MPP, el bloqueo específico que realiza sobre ER α impide su activación. En estas condiciones de cultivo, 100 nM BPA es capaz de reducir la corriente de Ca $^{2+}$, en una proporción similar a 1 nM. Este resultado sugiere que la activación de ER α en un rango de dosis altas contrarresta los efectos mediados por ER β sobre la corriente de Ca $^{2+}$, derivados de la disminución de la expresión del canal tipo-R.

Cuando las células β se exponen a dosis cada vez más altas de un ligando específico de ER α (1 nM, 100 nM y 1 μ M de PPT), observamos que, mientras la dosis más baja (1nM) no provoca ninguna alteración, la elevación de la dosis de PPT empleada provoca un incremento dosis-dependiente (100 nM y 1 μ M) en la entrada de Ca $^{2+}$ en la célula β . Estos resultados indican que la activación de ER α en un cierto rango de dosis mediaría acciones contrarias a las descritas para ER β sobre la entrada de Ca $^{2+}$ en células β como consecuencia de la despolarización de membrana, y que este efecto de la vía de ER α no se debe al incremento de la transcripción de Ca $_v$ 2.3. Este resultado sugiere que ER β y ER α actúan a través de diferentes rutas de señalización. Está bien descrito que 17 β -estradiol activa vías alternativas uniéndose a ERs fuera del núcleo. Estas vías están relacionadas con la activación de PI3K y ERKs, que están involucrados en multitud de procesos celulares (Nadal *et al.*, 2005; Ropero *et al.*, 2006). La interacción entre ER α y PI3K se describió en las células del endotelio vascular, donde 17 β -estradiol estimula la actividad de la sintasa de óxido nítrico (eNOS); esta acción está mediada por la unión dependiente de ligando de ER α con la subunidad reguladora (p85 α) de PI3K, lo que provoca el incremento de actividad de su subunidad catalítica (p110) y el consecuente aumento en la producción intracelular de fosfoinosítidos. Cascada abajo, PIP $_3$ promueve la

activación de la vía de PKB/Akt que conduce a la rápida activación de eNOS (Simoncini *et al.*, 2000; Simoncini *et al.*, 2004). PIP₃ se liga al dominio PH (dominio con homología a la Pleckstrina) de Akt, induciendo su translocación en la membrana plasmática, donde Akt puede ser fosforilada por la quinasa PDK1 promoviendo su activación (p-Akt) (Catalucci *et al.*, 2009). La fase más inicial en el incremento de la actividad de eNOS depende de la activación por parte de ER α de la ruta de las MAP quinasas (Chen *et al.*, 1999). Estos trabajos demuestran la existencia de efectos estrogénicos no genómicos, mediante el acoplamiento físico y funcional de ER α con proteínas de cascadas de señalización fuera del núcleo y la producción de segundos mensajeros. En nuestro modelo, el incremento de la corriente de Ca²⁺ que provoca 100 nM PPT es completamente bloqueado por el inhibidor de PI3K, wortmannin. Sin embargo, el inhibidor de la vía de las MAP quinasas, PD 98059, no parece tener ningún efecto sobre la activación del mecanismo mediado por ER α sobre la entrada de Ca²⁺, a pesar de que se ha demostrado que la activación de ER α a dosis bajas es suficiente para activar ERK1/2 (Alonso-Magdalena *et al.*, 2008). Estos experimentos sugieren la implicación de PI3K, y no de ERK1/2, en la regulación que ejerce ER α sobre la corriente de Ca²⁺, si bien el mecanismo exacto todavía se desconoce. Por lo tanto, en nuestro modelo, ER β y ER α regulan la entrada de Ca²⁺ en la célula β pancreática a través de diferentes mecanismos de acción. Resultados similares a los observados empleando el antagonista MPP se obtienen cuando la inhibición se realiza sobre PI3K, ya que parece ser un efector necesario situado cascada abajo tras la activación de ER α . Por lo tanto, nuestros resultados indican que la activación de ER α , en un rango de dosis elevadas, desencadena mecanismos amplificadores de la entrada de Ca²⁺, los cuales contrarrestarían los efectos negativos mediados por ER β . La conjugación simultánea de estos fenómenos contrarios generaría un efecto neto nulo sobre la corriente de Ca²⁺, tal como observamos al utilizar dosis más altas de BPA (por ejemplo 100 nM). Se ha demostrado que la activación de Akt provoca un incremento de la corriente de Ca²⁺ tipo-L en neuronas y cardiomiocitos (Viard *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2006). La ausencia de PTEN en cardiomiocitos promueve un aumento de la corriente tipo-L, que no es debido a una mayor expresión de este canal y que se impide al emplear inhibidores de PI3K o Akt. Del mismo modo, IGF1

incrementa la corriente de Ca^{2+} tipo-L en cardiomiocitos a través de la activación de la vía PI3K α /Akt (Sun, *et al.*, 2006). En cuanto al mecanismo molecular que subyace a la potenciación de la corriente de Ca^{2+} dependiente de la activación de PI3K/Akt, se ha demostrado que la fosforilación de la subunidad auxiliar $\text{Ca}_v\beta 2$ por Akt promueve la translocación de subunidades formadores de poro del canal $\text{Ca}_v 2.2$ en la membrana plasmática de neuronas (Viard *et al.*, 2004). En este estudio se describe un novedoso mecanismo postraduccional mediante el cual Akt regula la densidad de la corriente tipo-L en condiciones fisiológicas (Viard *et al.*, 2004). Un estudio posterior describió que la fosforilación de $\text{Ca}_v\beta 2$ mediada por Akt aumenta la densidad de la subunidad $\text{Ca}_v\alpha 1$ en la membrana plasmática de cardiomiocitos, ya que la forma fosforilada de $\text{Ca}_v\beta 2$ protege las secuencias PEST de $\text{Ca}_v\alpha 1$, de tal modo que esta secuencia señal no sería accesible para la maquinaria de degradación proteolítica (Catalucci *et al.*, 2009). Los dominios PEST son secuencias muy conservadas evolutivamente en el poro (subunidad $\text{Ca}_v\alpha 1$) de los canales Ca_v (Catalucci *et al.*, 2009), por lo que este mecanismo podría estar relacionado con la homeostasis de Ca^{2+} en otros tipos celulares, incluyendo la célula β pancreática.

La acciones opuestas de ER α y ER β descritas en nuestro modelo, nos llevan a pensar que este antagonismo podría estar implicado en el fenómeno de la nomonotonicidad en los efectos de BPA. En los últimos años, se ha invertido una gran cantidad de recursos para investigar los mecanismos moleculares que subyacen, sin embargo pocos avances se habían producido en el campo de los EDCs. Es importante señalar que las acciones celulares desencadenadas por el BPA se encuadran en un sistema de señalización hormonal de enorme complejidad, cuyo efecto neto dependerá de multitud de variables. El BPA, como xenoestrógeno, puede ligarse a varios receptores, además los niveles de expresión de éstos varían ostensiblemente dependiendo del tipo celular y el tejido, y pueden activar vías transcripcionales clásicas o no clásicas (nivel nuclear) o vías extragenómicas desde diversos efectores en el citoplasma (Nadal *et al.*, 2001; Nadal *et al.* 2005; Ropero *et al.*, 2006).

En el modelo que proponemos, la exposición a BPA provoca una disminución en la entrada de Ca^{2+} siguiendo una curva no monotónica, de tal modo que el efecto descrito a una dosis baja (1nM) no es detectable cuando se incrementa 100 veces la dosis de BPA; en este caso, nuestros resultados sugieren que esta nomonotonicidad no responde a un mecanismo singular, sino que este fenómeno sería la consecuencia del solapamiento de los efectos opuestos que $\text{ER}\beta$ y $\text{ER}\alpha$ tienen sobre la corriente de Ca^{2+} , y cuya activación depende de la dosis empleada (se desplaza a la derecha en el caso de $\text{ER}\alpha$). Estos hallazgos en célula β deberían ser considerados, junto a la multitud de efectos a dosis bajas de EDCs que aparecen en la literatura, para confrontar las consideraciones actuales para la evaluación del riesgo de estos compuestos (Vandenberg *et al.*, 2012; Gore *et al.*, 2015). En nuestro estudio, la nomonotonicidad del efecto de BPA sobre la entrada de Ca^{2+} pone de manifiesto que este fenómeno debe ser considerado en el diseño de test toxicológicos, ya que la bioseguridad determinada para dosis altas en ensayos de riesgo no garantizaría la ausencia de efectos a dosis más bajas. Tradicionalmente, en toxicología y para los procesos de regulación llevados a cabo por las agencias con competencias, la evaluación estandarizada del riesgo de un compuesto químico consiste en un conjunto de pruebas estandarizadas que llevan a establecer la dosis más baja a la cual un efecto es detectable (denominada LOAEL por sus siglas en inglés), y la dosis por debajo de la cual ningún efecto es observable (o NOAEL). Una vez determinadas, se aplican una serie de cálculos que conducen a la determinación de una dosis de referencia que es considerada segura para la exposición de los humanos. Normalmente, la dosis de referencia se establece en una dosis entre 3 y 1000 veces más baja que el NOAEL. Es necesario destacar que la dosis de referencia se asimila como exposición tolerable y es considerada segura, aun cuando no es testada directamente en los ensayos de riesgo (Vandenberg *et al.*, 2012). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en nuestro estudio, el diseño de los ensayos toxicológicos clásicos arrojaría un falso negativo en cuanto a la seguridad de BPA evaluando nuestro punto final (la señalización de Ca^{2+}), ya que la dosis más alta que examinamos no produce efecto y carece de valor predictivo en cuanto a la respuesta

que hallamos a dosis más bajas. Sin embargo, a día de hoy, las normativas que establecen los estándares de exposición a compuestos químicos siguen siendo desarrolladas asumiendo el principio de monotonidad, sin examinar directamente en los ensayos de riesgo las dosis bajas, que serían, presumiblemente, a las que está expuesto el público general (Vandenberg *et al.*, 2012).



CONCLUSIONES



1. Los resultados presentados en este trabajo sugieren que la exposición a BPA altera directamente la funcionalidad de la célula β pancreática, provocando cambios significativos en la forma del potencial de acción, la señalización de calcio, el contenido de insulina, la exocitosis y la secreción de insulina.
2. La disminución en la señalización de calcio inducida por el BPA se ajusta a la forma de una curva dosis-respuesta no monotónica: el BPA disminuye las señales de calcio a concentraciones de exposición bajas (100 pM y 1 nM BPA), mientras que dosis mayores (10 y 100 nM BPA) no alteran este parámetro.
3. La reducción en la entrada de calcio tras la incubación con 1 nM BPA es consecuencia de la expresión disminuida del ARNm de la subunidad formadora del poro $Ca_v\alpha1e$ (*Cacna1e*) a través de un mecanismo mediado por $ER\beta$, lo que promueve la reducción de la corriente tipo-R. Notablemente, la expresión del canal tipo-R aparece disminuida para cualquiera de las dosis de BPA probadas (de 1 nM a 1 μ M), lo que sugiere que el efecto mediado por $ER\beta$ sobre la transcripción de este canal es monotónica, en contraposición al efecto no monotónico de BPA sobre la entrada de calcio.
4. Dosis altas de BPA (≥ 100 nM) potencian la entrada de calcio voltaje-dependiente en las células β pancreáticas a través de un mecanismo dependiente de PI3K y mediado por $ER\alpha$.
5. **En resumen, la nomonotonicidad existente entre las dosis de exposición a BPA y la entrada de calcio en célula β parece ser la consecuencia de los efectos opuestos mediados por $ER\beta$ y $ER\alpha$ sobre la regulación de las corrientes de calcio voltaje-dependiente. Nuestros resultados sugieren la existencia de dos mecanismos independientes que se activarían a diferentes dosis de ligando. Dosis bajas de BPA activarían de forma particular la vía de $ER\beta$, que tiene un efecto transcripcional no-clásico**

sobre la expresión del canal tipo-R. Mientras que concentraciones más altas de BPA provocarían la activación simultánea de ambos mecanismos contrarreguladores mediados por ER β y ER α , lo que tendría un efecto neto nulo en la entrada de calcio.



1. The results presented in this work suggest that BPA exposure at 1 nM directly alters pancreatic β -cell function, eliciting significant changes in the shaping of action potentials, calcium signaling, insulin content, exocytosis and insulin secretion.
2. BPA-induced decrease on calcium signaling follows a non-monotonic dose response (NMDR) curve: it decreases calcium signaling at low concentrations of exposure (100 pM and 1 nM BPA), while higher doses (10 and 100 nM BPA) have no effects.
3. Calcium entry reduction after incubation with 1 nM BPA is a consequence of an ER β -mediated downregulation in the mRNA levels of the pore-forming Ca α 1e subunit (*Cacna1e*), therefore promoting a diminution of R-type calcium current. Remarkably, R-type channel expression is diminished within the entire range of BPA doses tested (1 nM to 1 μ M), suggesting that the effect of the ER β -mediated regulation in channel transcription is monotonic, contrary to the while BPA effects on calcium entry.
4. High BPA doses (\geq 100 nM) potentiate voltage-gated calcium entry in pancreatic β -cells through extranuclear ER α -mediated PI3K-dependent mechanism.
5. **In summary, the NMDR relationship between BPA exposure and calcium entry seems to be the outcome of the opposite effects mediated by ER β and ER α on the processes regulating voltage-operated calcium currents in pancreatic β -cells. Apparently, two independent mechanisms act at different ligand doses. Low BPA doses particularly activate the ER β pathway, which has a non-classical transcriptional effect on R-type calcium channel expression. At higher BPA concentrations, the simultaneous activation of both counteracting mechanisms involving ER β and ER α has no macroscopic effects on calcium entry.**

BIBLIOGRAFÍA



1. Ahren B. Autonomic regulation of islet hormone secretion--implications for health and disease. *Diabetologia*. 2000;43(4):393-410.
2. Alonso-Magdalena P, Morimoto S, Ripoll C, Fuentes E, Nadal A. The estrogenic effect of bisphenol A disrupts pancreatic beta-cell function in vivo and induces insulin resistance. *Environ Health Perspect*. 2006;114(1):106-112.
3. Alonso-Magdalena P, Quesada I, Nadal A. Endocrine disruptors in the etiology of type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. 2011;7(6):346-353.
4. Alonso-Magdalena P, Ropero AB, Carrera MP, et al. Pancreatic insulin content regulation by the estrogen receptor ER alpha. *PLoS One*. 2008;3(4):e2069.
5. Alonso-Magdalena P, Ropero AB, Garcia-Arevalo M, et al. Antidiabetic actions of an estrogen receptor beta selective agonist. *Diabetes*. 2013;62(6):2015-2025.
6. Alonso-Magdalena P, Ropero AB, Soriano S, et al. Bisphenol-A acts as a potent estrogen via non-classical estrogen triggered pathways. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;355(2):201-207.
7. Alonso-Magdalena P, Ropero AB, Soriano S, et al. Bisphenol-A acts as a potent estrogen via non-classical estrogen triggered pathways. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;355(2):201-207.
8. Ashcroft FM, Rorsman P. K(ATP) channels and islet hormone secretion: New insights and controversies. *Nat Rev Endocrinol*. 2013;9(11):660-669.
9. Balhuizen A, Kumar R, Amisten S, Lundquist I, Salehi A. Activation of G protein-coupled receptor 30 modulates hormone secretion and counteracts cytokine-induced apoptosis in pancreatic islets of female mice. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;320(1-2):16-24.

10. Barbosa RM, Silva AM, Tome AR, Stamford JA, Santos RM, Rosario LM. Real time electrochemical detection of 5-HT/insulin secretion from single pancreatic islets: Effect of glucose and K⁺ depolarization. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;228(1):100-104.
11. Batista TM, Alonso-Magdalena P, Vieira E, et al. Short-term treatment with bisphenol-A leads to metabolic abnormalities in adult male mice. *PLoS One*. 2012;7(3):e33814.
12. Bichet D, Cornet V, Geib S, et al. The I-II loop of the Ca²⁺ channel alpha1 subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit. *Neuron*. 2000;25(1):177-190.
13. Brissova M, Fowler MJ, Nicholson WE, et al. Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *J Histochem Cytochem*. 2005;53(9):1087-1097.
14. Cabrera O, Berman DM, Kenyon NS, Ricordi C, Berggren PO, Caicedo A. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(7):2334-2339.
15. Calafat AM, Ye X, Wong LY, Reidy JA, Needham LL. Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004. *Environ Health Perspect*. 2008;116(1):39-44.
16. Catalucci D, Zhang DH, DeSantiago J, et al. Akt regulates L-type Ca²⁺ channel activity by modulating Cavalpha1 protein stability. *J Cell Biol*. 2009;184(6):923-933.
17. Catterall WA. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(8):a003947.

18. Chang L, Chiang SH, Saltiel AR. Insulin signaling and the regulation of glucose transport. *Mol Med.* 2004;10(7-12):65-71.
19. Charollais A, Gjinovci A, Huarte J, et al. Junctional communication of pancreatic beta cells contributes to the control of insulin secretion and glucose tolerance. *J Clin Invest.* 2000;106(2):235-243.
20. Chen L, Magliano DJ, Zimmet PZ. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus--present and future perspectives. *Nat Rev Endocrinol.* 2011;8(4):228-236.
21. Chen YH, Li MH, Zhang Y, et al. Structural basis of the alpha1-beta subunit interaction of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Nature.* 2004;429(6992):675-680.
22. Chen Z, Yuhanna IS, Galcheva-Gargova Z, Karas RH, Mendelsohn ME, Shaul PW. Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J Clin Invest.* 1999;103(3):401-406.
23. Choe S. Potassium channel structures. *Nat Rev Neurosci.* 2002;3(2):115-121.
24. Cnop M, Welsh N, Jonas JC, Jorns A, Lenzen S, Eizirik DL. Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: Many differences, few similarities. *Diabetes.* 2005;54 Suppl 2:S97-107.
25. Curtis BM, Catterall WA. Reconstitution of the voltage-sensitive calcium channel purified from skeletal muscle transverse tubules. *Biochemistry.* 1986;25(11):3077-3083.
26. Curtis BM, Catterall WA. Phosphorylation of the calcium antagonist receptor of the voltage-sensitive calcium channel by cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82(8):2528-2532.

27. Curtis BM, Catterall WA. Purification of the calcium antagonist receptor of the voltage-sensitive calcium channel from skeletal muscle transverse tubules. *Biochemistry*. 1984;23(10):2113-2118.
28. Dean PM, Matthews EK. Electrical activity in pancreatic islet cells. *Nature*. 1968;219(5152):389-390.
29. Deutschmann A, Hans M, Meyer R, Haberlein H, Swandulla D. Bisphenol A inhibits voltage-activated Ca^{2+} channels in vitro: Mechanisms and structural requirements. *Mol Pharmacol*. 2013;83(2):501-511.
30. Dickerson SM, Gore AC. Estrogenic environmental endocrine-disrupting chemical effects on reproductive neuroendocrine function and dysfunction across the life cycle. *Rev Endocr Metab Disord*. 2007;8(2):143-159.
31. Dodds E.C. LW. Synthetic oestrogenic agents without the phenanthrene nucleus. *Nature*. 1936;137(3476):996.
32. Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, et al. The structure of the potassium channel: Molecular basis of K^{+} conduction and selectivity. *Science*. 1998;280(5360):69-77.
33. Eizirik DL, Colli ML, Ortis F. The role of inflammation in insulinitis and beta-cell loss in type 1 diabetes. *Nat Rev Endocrinol*. 2009;5(4):219-226.
34. Fernandez-Formoso G, Perez-Sieira S, Gonzalez-Touceda D, Dieguez C, Tovar S. Leptin, 20 years of searching for glucose homeostasis. *Life Sci*. 2015;140:4-9.

35. Forster C, Makela S, Warri A, et al. Involvement of estrogen receptor beta in terminal differentiation of mammary gland epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(24):15578-15583.
36. Fujimoto N, Kitamura S. Effects of environmental estrogenic chemicals on AP1 mediated transcription with estrogen receptors alpha and beta. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004;88(1):53-59.
37. Garcia-Arevalo M, Alonso-Magdalena P, Rebelo Dos Santos J, Quesada I, Carneiro EM, Nadal A. Exposure to bisphenol-A during pregnancy partially mimics the effects of a high-fat diet altering glucose homeostasis and gene expression in adult male mice. *PLoS One*. 2014;9(6):e100214.
38. Garcia-Arevalo M, Alonso-Magdalena P, Servitja JM, et al. Maternal exposure to bisphenol-A during pregnancy increases pancreatic beta-cell growth during early life in male mice offspring. *Endocrinology*. 2016;157(11):4158-4171.
39. Gembal M, Detimary P, Gilon P, Gao ZY, Henquin JC. Mechanisms by which glucose can control insulin release independently from its action on adenosine triphosphate-sensitive K⁺ channels in mouse B cells. *J Clin Invest*. 1993;91(3):871-880.
40. Gembal M, Gilon P, Henquin JC. Evidence that glucose can control insulin release independently from its action on ATP-sensitive K⁺ channels in mouse B cells. *J Clin Invest*. 1992;89(4):1288-1295.
41. German JP, Thaler JP, Wisse BE, et al. Leptin activates a novel CNS mechanism for insulin-independent normalization of severe diabetic hyperglycemia. *Endocrinology*. 2011;152(2):394-404.

42. Gilon P, Yakel J, Gromada J, Zhu Y, Henquin JC, Rorsman P. G protein-dependent inhibition of L-type Ca²⁺ currents by acetylcholine in mouse pancreatic B-cells. *J Physiol.* 1997;499 (Pt 1)(Pt 1):65-76.
43. Gopel S, Kanno T, Barg S, Galvanovskis J, Rorsman P. Voltage-gated and resting membrane currents recorded from B-cells in intact mouse pancreatic islets. *J Physiol.* 1999;521 Pt 3:717-728.
44. Gopel S, Zhang Q, Eliasson L, et al. Capacitance measurements of exocytosis in mouse pancreatic alpha-, beta- and delta-cells within intact islets of langerhans. *J Physiol.* 2004;556(Pt 3):711-726.
45. Gopel S, Zhang Q, Eliasson L, et al. Capacitance measurements of exocytosis in mouse pancreatic alpha-, beta- and delta-cells within intact islets of langerhans. *J Physiol.* 2004;556(Pt 3):711-726.
46. Gore AC, Chappell VA, Fenton SE, et al. EDC-2: The endocrine society's second scientific statement on endocrine-disrupting chemicals. *Endocr Rev.* 2015;36(6):E1-E150.
47. Gromada J, Franklin I, Wollheim CB. Alpha-cells of the endocrine pancreas: 35 years of research but the enigma remains. *Endocr Rev.* 2007;28(1):84-116.
48. Harrington WR, Sheng S, Barnett DH, Petz LN, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. Activities of estrogen receptor alpha- and beta-selective ligands at diverse estrogen responsive gene sites mediating transactivation or transrepression. *Mol Cell Endocrinol.* 2003;206(1-2):13-22.
49. Henquin JC. Regulation of insulin secretion: A matter of phase control and amplitude modulation. *Diabetologia.* 2009;52(5):739-751.

50. Henquin JC. Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes*. 2000;49(11):1751-1760.
51. Herbst AL, Ulfelder H, Poskanzer DC. Adenocarcinoma of the vagina. association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women. *N Engl J Med*. 1971;284(15):878-881.
52. Hoppa MB, Collins S, Ramracheya R, et al. Chronic palmitate exposure inhibits insulin secretion by dissociation of Ca^{2+} channels from secretory granules. *Cell Metab*. 2009;10(6):455-465.
53. Houamed KM, Sweet IR, Satin LS. BK channels mediate a novel ionic mechanism that regulates glucose-dependent electrical activity and insulin secretion in mouse pancreatic beta-cells. *J Physiol*. 2010;588(Pt 18):3511-3523.
54. Irls E, Neco P, Lluesma M, et al. Enhanced glucose-induced intracellular signaling promotes insulin hypersecretion: Pancreatic beta-cell functional adaptations in a model of genetic obesity and prediabetes. *Mol Cell Endocrinol*. 2015;404:46-55.
55. Jacobson DA, Kuznetsov A, Lopez JP, Kash S, Ammala CE, Philipson LH. Kv2.1 ablation alters glucose-induced islet electrical activity, enhancing insulin secretion. *Cell Metab*. 2007;6(3):229-235.
56. Jacobson DA, Mendez F, Thompson M, Torres J, Cochet O, Philipson LH. Calcium-activated and voltage-gated potassium channels of the pancreatic islet impart distinct and complementary roles during secretagogue induced electrical responses. *J Physiol*. 2010;588(Pt 18):3525-3537.

57. Jing X, Li DQ, Olofsson CS, et al. CaV2.3 calcium channels control second-phase insulin release. *J Clin Invest.* 2005;115(1):146-154.
58. Johnston J, Forsythe ID, Kopp-Scheinflug C. Going native: Voltage-gated potassium channels controlling neuronal excitability. *J Physiol.* 2010;588(Pt 17):3187-3200.
59. Kanno T, Ma X, Barg S, et al. Large dense-core vesicle exocytosis in pancreatic beta-cells monitored by capacitance measurements. *Methods.* 2004;33(4):302-311.
60. Kelly RP, Sutton R, Ashcroft FM. Voltage-activated calcium and potassium currents in human pancreatic beta-cells. *J Physiol.* 1991;443:175-192.
61. Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology.* 1997;138(3):863-870.
62. Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology.* 1997;138(3):863-870.
63. Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, et al. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology.* 1998;139(10):4252-4263.
64. Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, et al. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology.* 1998;139(10):4252-4263.
65. Kukuljan M, Goncalves AA, Atwater I. Charybdotoxin-sensitive K(ca) channel is not involved in glucose-induced electrical activity in pancreatic beta-cells. *J Membr Biol.* 1991;119(2):187-195.

66. Kumar R, Balhuizen A, Amisten S, Lundquist I, Salehi A. Insulinotropic and antidiabetic effects of 17beta-estradiol and the GPR30 agonist G-1 on human pancreatic islets. *Endocrinology*. 2011;152(7):2568-2579.
67. Kuo CC, Moon K, Thayer KA, Navas-Acien A. Environmental chemicals and type 2 diabetes: An updated systematic review of the epidemiologic evidence. *Curr Diab Rep*. 2013;13(6):831-849.
68. Lang IA, Galloway TS, Scarlett A, et al. Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *JAMA*. 2008;300(11):1303-1310.
69. Le May C, Chu K, Hu M, et al. Estrogens protect pancreatic beta-cells from apoptosis and prevent insulin-deficient diabetes mellitus in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(24):9232-9237.
70. Lebrun P, Atwater I, Claret M, Malaisse WJ, Herchuelz A. Resistance to apamin of the Ca²⁺-activated K⁺ permeability in pancreatic B-cells. *FEBS Lett*. 1983;161(1):41-44.
71. Lee YH, Wang MY, Yu XX, Unger RH. Glucagon is the key factor in the development of diabetes. *Diabetologia*. 2016;59(7):1372-1375.
72. Liu S, Le May C, Wong WP, et al. Importance of extranuclear estrogen receptor-alpha and membrane G protein-coupled estrogen receptor in pancreatic islet survival. *Diabetes*. 2009;58(10):2292-2302.
73. Longuet C, Sinclair EM, Maida A, et al. The glucagon receptor is required for the adaptive metabolic response to fasting. *Cell Metab*. 2008;8(5):359-371.

74. Lopez M, Tena-Sempere M. Estrogens and the control of energy homeostasis: A brain perspective. *Trends Endocrinol Metab.* 2015;26(8):411-421.
75. MacDonald PE, Ha XF, Wang J, et al. Members of the Kv1 and Kv2 voltage-dependent K(+) channel families regulate insulin secretion. *Mol Endocrinol.* 2001;15(8):1423-1435.
76. MacDonald PE, Sewing S, Wang J, et al. Inhibition of Kv2.1 voltage-dependent K+ channels in pancreatic beta-cells enhances glucose-dependent insulin secretion. *J Biol Chem.* 2002;277(47):44938-44945.
77. MacDonald PE, Wheeler MB. Voltage-dependent K(+) channels in pancreatic beta cells: Role, regulation and potential as therapeutic targets. *Diabetologia.* 2003;46(8):1046-1062.
78. Magleby KL. Gating mechanism of BK (Slo1) channels: So near, yet so far. *J Gen Physiol.* 2003;121(2):81-96.
79. Mancilla E, Rojas E. Quinine blocks the high conductance, calcium-activated potassium channel in rat pancreatic beta-cells. *FEBS Lett.* 1990;260(1):105-108.
80. Marroqui L, Gonzalez A, Neco P, et al. Role of leptin in the pancreatic beta-cell: Effects and signaling pathways. *J Mol Endocrinol.* 2012;49(1):R9-17.
81. Martin F, Reig JA, Soria B. Secretagogue-induced [Ca²⁺]_i changes in single rat pancreatic islets and correlation with simultaneously measured insulin release. *J Mol Endocrinol.* 1995;15(2):177-185.
82. Matsuda Y, Saegusa H, Zong S, Noda T, Tanabe T. Mice lacking ca(v)2.3 (alpha1E) calcium channel exhibit hyperglycemia. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;289(4):791-795.

83. Matthews JB, Twomey K, Zacharewski TR. In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors alpha and beta. *Chem Res Toxicol.* 2001;14(2):149-157.
84. Mauvais-Jarvis F, Clegg DJ, Hevener AL. The role of estrogens in control of energy balance and glucose homeostasis. *Endocr Rev.* 2013;34(3):309-338.
85. McKenna NJ, O'Malley BW. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell.* 2002;108(4):465-474.
86. McTaggart JS, Clark RH, Ashcroft FM. The role of the KATP channel in glucose homeostasis in health and disease: More than meets the islet. *J Physiol.* 2010;588(Pt 17):3201-3209.
87. Merino B, Alonso-Magdalena P, Lluésma M, et al. Pancreatic alpha-cells from female mice undergo morphofunctional changes during compensatory adaptations of the endocrine pancreas to diet-induced obesity. *Sci Rep.* 2015;5:11622.
88. Michaela P, Maria K, Silvia H, L'ubica L. Bisphenol A differently inhibits CaV3.1, ca V3.2 and ca V3.3 calcium channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2014;387(2):153-163.
89. Mielke H, Partosch F, Gundert-Remy U. The contribution of dermal exposure to the internal exposure of bisphenol A in man. *Toxicol Lett.* 2011;204(2-3):190-198.
90. Morani A, Warner M, Gustafsson JA. Biological functions and clinical implications of oestrogen receptors alfa and beta in epithelial tissues. *J Intern Med.* 2008;264(2):128-142.

91. Nadal A, Alonso-Magdalena P, Ripoll C, Fuentes E. Disentangling the molecular mechanisms of action of endogenous and environmental estrogens. *Pflugers Arch.* 2005;449(4):335-343.
92. Nadal A, Fuentes E, Ripoll C, et al. Extranuclear-initiated estrogenic actions of endocrine disrupting chemicals: Is there toxicology beyond paracelsus? *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2017.
93. Nadal A, Fuentes E, Ripoll C, et al. Extranuclear-initiated estrogenic actions of endocrine disrupting chemicals: Is there toxicology beyond paracelsus? *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2017.
94. 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.* 1999;517 (Pt 1)(Pt 1):85-93.
95. Nadal A, Ropero AB, Laribi O, Maillet M, Fuentes E, Soria B. Nongenomic actions of estrogens and xenoestrogens by binding at a plasma membrane receptor unrelated to estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(21):11603-11608.
96. Nagel SC, vom Saal FS, Thayer KA, Dhar MG, Boechler M, Welshons WV. Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative in vivo bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol. *Environ Health Perspect.* 1997;105(1):70-76.
97. Neher E, Sakmann B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature.* 1976;260(5554):799-802.

98. Newcomb R, Szoke B, Palma A, et al. Selective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the tarantula *hysterocrates gigas*. *Biochemistry*. 1998;37(44):15353-15362.
99. Nichols CG. KATP channels as molecular sensors of cellular metabolism. *Nature*. 2006;440(7083):470-476.
100. Olofsson CS, Collins S, Bengtsson M, et al. Long-term exposure to glucose and lipids inhibits glucose-induced insulin secretion downstream of granule fusion with plasma membrane. *Diabetes*. 2007;56(7):1888-1897.
101. Paulose T, Speroni L, Sonnenschein C, Soto AM. Estrogens in the wrong place at the wrong time: Fetal BPA exposure and mammary cancer. *Reprod Toxicol*. 2015;54:58-65.
102. Pereverzev A, Mikhna M, Vajna R, et al. Disturbances in glucose-tolerance, insulin-release, and stress-induced hyperglycemia upon disruption of the $ca(v)2.3$ (alpha 1E) subunit of voltage-gated $ca(2+)$ channels. *Mol Endocrinol*. 2002;16(4):884-895.
103. Pereverzev A, Mikhna M, Vajna R, et al. Disturbances in glucose-tolerance, insulin-release, and stress-induced hyperglycemia upon disruption of the $ca(v)2.3$ (alpha 1E) subunit of voltage-gated $ca(2+)$ channels. *Mol Endocrinol*. 2002;16(4):884-895.
104. Pereverzev A, Vajna R, Pfitzer G, Hescheler J, Klockner U, Schneider T. Reduction of insulin secretion in the insulinoma cell line INS-1 by overexpression of a $ca(v)2.3$ (alpha 1E) calcium channel antisense cassette. *Eur J Endocrinol*. 2002;146(6):881-889.
105. Pettersson K, Grandien K, Kuiper GG, Gustafsson JA. Mouse estrogen receptor beta forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor alpha. *Mol Endocrinol*. 1997;11(10):1486-1496.

106. Quesada I, Todorova MG, Alonso-Magdalena P, et al. Glucose induces opposite intracellular Ca²⁺ concentration oscillatory patterns in identified alpha- and beta-cells within intact human islets of langerhans. *Diabetes*. 2006;55(9):2463-2469.
107. Rafacho A, Marroqui L, Taboga SR, et al. Glucocorticoids in vivo induce both insulin hypersecretion and enhanced glucose sensitivity of stimulus-secretion coupling in isolated rat islets. *Endocrinology*. 2010;151(1):85-95.
108. Ranciere F, Lyons JG, Loh VH, et al. Bisphenol A and the risk of cardiometabolic disorders: A systematic review with meta-analysis of the epidemiological evidence. *Environ Health*. 2015;14:46-015-0036-5.
109. Ravier MA, Guldenagel M, Charollais A, et al. Loss of connexin36 channels alters beta-cell coupling, islet synchronization of glucose-induced Ca²⁺ and insulin oscillations, and basal insulin release. *Diabetes*. 2005;54(6):1798-1807.
110. Razandi M, Pedram A, Greene GL, Levin ER. Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: Studies of ERalpha and ERbeta expressed in chinese hamster ovary cells. *Mol Endocrinol*. 1999;13(2):307-319.
111. Rodriguez-Diaz R, Caicedo A. Novel approaches to studying the role of innervation in the biology of pancreatic islets. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2013;42(1):39-56.
112. Ropero AB, Alonso-Magdalena P, Ripoll C, Fuentes E, Nadal A. Rapid endocrine disruption: Environmental estrogen actions triggered outside the nucleus. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2006;102(1-5):163-169.
113. Rorsman P, Braun M, Zhang Q. Regulation of calcium in pancreatic alpha- and beta-cells in health and disease. *Cell Calcium*. 2012;51(3-4):300-308.

114. Rorsman P, Eliasson L, Kanno T, Zhang Q, Gopel S. Electrophysiology of pancreatic beta-cells in intact mouse islets of langerhans. *Prog Biophys Mol Biol*. 2011;107(2):224-235.
115. Rorsman P, Eliasson L, Renstrom E, Gromada J, Barg S, Gopel S. The cell physiology of biphasic insulin secretion. *News Physiol Sci*. 2000;15:72-77.
116. Rorsman P, Trube G. Calcium and delayed potassium currents in mouse pancreatic beta-cells under voltage-clamp conditions. *J Physiol*. 1986;374:531-550.
117. Sabanayagam C, Teppala S, Shankar A. Relationship between urinary bisphenol A levels and prediabetes among subjects free of diabetes. *Acta Diabetol*. 2013;50(4):625-631.
118. Safe S, Kim K. Non-classical genomic estrogen receptor (ER)/specificity protein and ER/activating protein-1 signaling pathways. *J Mol Endocrinol*. 2008;41(5):263-275.
119. Santos RM, Rosario LM, Nadal A, Garcia-Sancho J, Soria B, Valdeolmillos M. Widespread synchronous $[Ca^{2+}]_i$ oscillations due to bursting electrical activity in single pancreatic islets. *Pflugers Arch*. 1991;418(4):417-422.
120. Satin LS, Hopkins WF, Fatherazi S, Cook DL. Expression of a rapid, low-voltage threshold K current in insulin-secreting cells is dependent on intracellular calcium buffering. *J Membr Biol*. 1989;112(3):213-222.
121. Sato Y, Aizawa T, Komatsu M, Okada N, Yamada T. Dual functional role of membrane depolarization/ Ca^{2+} influx in rat pancreatic B-cell. *Diabetes*. 1992;41(4):438-443.
122. Sato Y, Henquin JC. The K^{+} -ATP channel-independent pathway of regulation of insulin secretion by glucose: In search of the underlying mechanism. *Diabetes*. 1998;47(11):1713-1721.

123. Schulla V, Renstrom E, Feil R, et al. Impaired insulin secretion and glucose tolerance in beta cell-selective $ca(v)1.2$ Ca^{2+} channel null mice. *EMBO J.* 2003;22(15):3844-3854.
124. Schwartz MW, Seeley RJ, Tschop MH, et al. Cooperation between brain and islet in glucose homeostasis and diabetes. *Nature.* 2013;503(7474):59-66.
125. Shankar A, Teppala S. Relationship between urinary bisphenol A levels and diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(12):3822-3826.
126. Sharma G, Prossnitz ER. Mechanisms of estradiol-induced insulin secretion by the G protein-coupled estrogen receptor GPR30/GPER in pancreatic beta-cells. *Endocrinology.* 2011;152(8):3030-3039.
127. Shyng S, Nichols CG. Octameric stoichiometry of the KATP channel complex. *J Gen Physiol.* 1997;110(6):655-664.
128. Silver MK, O'Neill MS, Sowers MR, Park SK. Urinary bisphenol A and type-2 diabetes in U.S. adults: Data from NHANES 2003-2008. *PLoS One.* 2011;6(10):e26868.
129. Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil DP, Ley K, Chin WW, Liao JK. Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature.* 2000;407(6803):538-541.
130. Simoncini T, Mannella P, Fornari L, Caruso A, Varone G, Genazzani AR. Genomic and non-genomic effects of estrogens on endothelial cells. *Steroids.* 2004;69(8-9):537-542.
131. Soriano S, Alonso-Magdalena P, Garcia-Arevalo M, et al. Rapid insulinotropic action of low doses of bisphenol-A on mouse and human islets of langerhans: Role of estrogen receptor beta. *PLoS One.* 2012;7(2):e31109.

132. Soriano S, Ripoll C, Alonso-Magdalena P, et al. Effects of bisphenol A on ion channels: Experimental evidence and molecular mechanisms. *Steroids*. 2016;111:12-20.
133. Soriano S, Ropero AB, Alonso-Magdalena P, et al. Rapid regulation of K(ATP) channel activity by 17{beta}-estradiol in pancreatic {beta}-cells involves the estrogen receptor {beta} and the atrial natriuretic peptide receptor. *Mol Endocrinol*. 2009;23(12):1973-1982.
134. Stocker M. Ca(2+)-activated K⁺ channels: Molecular determinants and function of the SK family. *Nat Rev Neurosci*. 2004;5(10):758-770.
135. Sun H, Kerfant BG, Zhao D, et al. Insulin-like growth factor-1 and PTEN deletion enhance cardiac L-type Ca²⁺ currents via increased PI3Kalpha/PKB signaling. *Circ Res*. 2006;98(11):1390-1397.
136. Takahashi M, Seagar MJ, Jones JF, Reber BF, Catterall WA. Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(15):5478-5482.
137. Taylor JA, Vom Saal FS, Welshons WV, et al. Similarity of bisphenol A pharmacokinetics in rhesus monkeys and mice: Relevance for human exposure. *Environ Health Perspect*. 2011;119(4):422-430.
138. Trasande L, Attina TM, Blustein J. Association between urinary bisphenol A concentration and obesity prevalence in children and adolescents. *JAMA*. 2012;308(11):1113-1121.
139. Vajna R, Schramm M, Pereverzev A, et al. New isoform of the neuronal Ca²⁺ channel alpha1E subunit in islets of langerhans and kidney--distribution of voltage-gated Ca²⁺ channel alpha1 subunits in cell lines and tissues. *Eur J Biochem*. 1998;257(1):274-285.

140. Valdeolmillos M, Nadal A, Contreras D, Soria B. The relationship between glucose-induced K⁺ATP channel closure and the rise in [Ca²⁺]_i in single mouse pancreatic beta-cells. *J Physiol.* 1992;455:173-186.
141. Van Petegem F, Clark KA, Chatelain FC, Minor DL, Jr. Structure of a complex between a voltage-gated calcium channel beta-subunit and an alpha-subunit domain. *Nature.* 2004;429(6992):671-675.
142. Vandenberg LN. Non-monotonic dose responses in studies of endocrine disrupting chemicals: Bisphenol a as a case study. *Dose Response.* 2013;12(2):259-276.
143. Vandenberg LN, Chahoud I, Heindel JJ, Padmanabhan V, Paumgarten FJ, Schoenfelder G. Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Environ Health Perspect.* 2010;118(8):1055-1070.
144. Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, et al. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: Low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr Rev.* 2012;33(3):378-455.
145. Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, et al. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: Low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr Rev.* 2012;33(3):378-455.
146. Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons WV. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod Toxicol.* 2007;24(2):139-177.
147. Vandenberg LN, Hunt PA, Myers JP, Vom Saal FS. Human exposures to bisphenol A: Mismatches between data and assumptions. *Rev Environ Health.* 2013;28(1):37-58.

148. Viard P, Butcher AJ, Halet G, et al. PI3K promotes voltage-dependent calcium channel trafficking to the plasma membrane. *Nat Neurosci.* 2004;7(9):939-946.
149. Volkel W, Colnot T, Csanady GA, Filser JG, Dekant W. Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chem Res Toxicol.* 2002;15(10):1281-1287.
150. vom Saal FS, Hughes C. An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment. *Environ Health Perspect.* 2005;113(8):926-933.
151. vom Saal FS, Timms BG, Montano MM, et al. Prostate enlargement in mice due to fetal exposure to low doses of estradiol or diethylstilbestrol and opposite effects at high doses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(5):2056-2061.
152. vom Saal FS, Welshons WV. Evidence that bisphenol A (BPA) can be accurately measured without contamination in human serum and urine, and that BPA causes numerous hazards from multiple routes of exposure. *Mol Cell Endocrinol.* 2014;398(1-2):101-113.
153. vom Saal FS, Welshons WV. Large effects from small exposures. II. the importance of positive controls in low-dose research on bisphenol A. *Environ Res.* 2006;100(1):50-76.
154. Wang T, Li M, Chen B, et al. Urinary bisphenol A (BPA) concentration associates with obesity and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(2):E223-7.
155. Weatherman RV, Clegg NJ, Scanlan TS. Differential SERM activation of the estrogen receptors (ERalpha and ERbeta) at AP-1 sites. *Chem Biol.* 2001;8(5):427-436.

156. Webb P, Lopez GN, Uht RM, Kushner PJ. Tamoxifen activation of the estrogen receptor/AP-1 pathway: Potential origin for the cell-specific estrogen-like effects of antiestrogens. *Mol Endocrinol*. 1995;9(4):443-456.
157. Welshons WV, Nagel SC, Thayer KA, Judy BM, Vom Saal FS. Low-dose bioactivity of xenoestrogens in animals: Fetal exposure to low doses of methoxychlor and other xenoestrogens increases adult prostate size in mice. *Toxicol Ind Health*. 1999;15(1-2):12-25.
158. Wierup N, Svensson H, Mulder H, Sundler F. The ghrelin cell: A novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. *Regul Pept*. 2002;107(1-3):63-69.
159. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004;27(5):1047-1053.
160. Wong WP, Tiano JP, Liu S, et al. Extranuclear estrogen receptor-alpha stimulates NeuroD1 binding to the insulin promoter and favors insulin synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(29):13057-13062.
161. Yang SN, Berggren PO. The role of voltage-gated calcium channels in pancreatic beta-cell physiology and pathophysiology. *Endocr Rev*. 2006;27(6):621-676.
162. Zawulich WS, Zawulich KC. Regulation of insulin secretion via ATP-sensitive K⁺ channel independent mechanisms: Role of phospholipase C. *Am J Physiol*. 1997;272(4 Pt 1):E671-7.
163. Zhang Q, Galvanovskis J, Abdulkader F, et al. Cell coupling in mouse pancreatic beta-cells measured in intact islets of langerhans. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci*. 2008;366(1880):3503-3523.

164. Zoeller RT, Brown TR, Doan LL, et al. Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: A statement of principles from the endocrine society. *Endocrinology*. 2012;153(9):4097-4110.

