

INSTITUTO DE BIOINGENIERÍA

ADAPTACIONES FUNCIONALES DE LA CÉLULA BETA PANCREÁTICA EN UN MODELO DE OBESIDAD GENÉTICA EN RATÓN



Memoria presentada por
Esperanza Irlés Vidal
Para optar al grado de doctor

Dirigida por
Dr. Iván Quesada Moll
Dr. Ángel Nadal Navajas
Elche, 2015

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 Esperanza Irlés Vidal, titulada “**ADAPTACIONES FUNCIONALES DE LA CÉLULA BETA PANCREÁTICA EN UN MODELO DE OBESIDAD GENÉTICA EN RATÓN**”, que se desarrolló dentro del programa de doctorado de Bioingeniería de este instituto de investigación.

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

EUGENIO VILANOVA GISBERT
Catedrático de Toxicología
Director del Instituto de Bioingeniería



Dr. **IVÁN QUESADA MOLL**, Profesor Titular en la Universidad Miguel Hernández de Elche y Dr. **ÁNGEL NADAL NAVAJAS**, Catedrático de Fisiología de la Universidad Miguel Hernández,

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo de investigación titulado “**ADAPTACIONES FUNCIONALES DE LA CÉLULA BETA PANCREÁTICA EN UN MODELO DE OBESIDAD GENÉTICA EN RATÓN**”, presentado por Esperanza Irlés Vidal para optar al grado de doctor en Bioingeniería, ha sido realizado bajo nuestra dirección y supervisión en el Instituto de Bioingeniería, y que se encuentra en condiciones de ser defendido ante el tribunal correspondiente nombrado por esta universidad.

Y para que así conste y a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado, en Elche a junio de 2015.

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

ÁNGEL NADAL NAVAJAS
Catedrático de Fisiología
Área de Fisiología
Universidad Miguel Hernández

CURRICULIM VITAE

Unidad de Fisiología Celular y Nutrición

Instituto de Bioingeniería. Universidad Miguel Hernández de Elche

Edificio Vinalopó, Avenida de la Universidad, s/n

03202 Elche, España

+34 965 22 20 12

eirles@umh.es

FORMACIÓN ACADÉMICA

Septiembre 2006 – Abril 2011 **Licenciada en Biotecnología.** Universidad Politécnica de Valencia - Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural. Nota media: 7.70 (2.01).

Septiembre 2011 – Sept 2012 **Máster en Bioingeniería – Bioingeniería celular y tisular.** Universidad Miguel Hernández de Elche – Instituto de Bioingeniería. Nota media: 9.67 (3.00).

Septiembre 2012 – presente **Doctorado en Bioingeniería.** Universidad Miguel Hernández de Elche – Instituto de Bioingeniería.

EXPERIENCIA COMO INVESTIGADORA

Abril 2012 - presente Estudiante de doctorado en la Unidad de Fisiología Celular y Nutrición, Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández.

Abril 2011 - Abril 2012 Investigador en la Fundación Biomédica del Hospital General Universitario de Elche:

Trabajo Final de Máster: “*Estudio de validación de marcadores moleculares con valor clínico en tumores gliales*”.

Julio 2010 - Marzo 2011

Trabajo Final de Carrera. “*Estudio piloto de validación de marcadores moleculares con valor diagnóstico, pronóstico y predictivo de respuesta en tumores gliales*”. Fundación para la Investigación biomédica del Hospital General Universitario de Elche.

Julio - Septiembre 2009

Estancia en la Unidad de Consejo Genético en Cáncer-Síndrome de Lynch - Laboratorio de Investigación Fundación de la Comunidad Valenciana para la investigación biomédica, la docencia y la cooperación internacional y para el desarrollo del Hospital General Universitario de Elche.

IDIOMAS

Portugués: Nivel A2, en formación actualmente

Inglés: Nivel B2, Junio 2012

- *First Certificate in English* – University of Cambridge.
- Certificado de Nivel Avanzado - Escuela Oficial de Idiomas.

Alemán: Nivel A2, Junio 2012: Certificado Nivel Básico – Escuela Oficial de Idiomas.

Valenciano: Bilingüe. *Certificat de Grau Superior de Coneixements de Valencià* (2005)

- Junta Qualificadora de Coneixements de Valencià. Conselleria de Cultura, Educació i Ciència.

ESTANCIAS EN INSTITUCIONES CIENTÍFICAS

Agosto – Noviembre 2014 Estancia en el Laboratorio de Pancreas Endocrino e
Metabolismo de la Universidad de Campinas
(UNICAMP), Sao Paulo, Brasil.

PUBLICACIONES

1. Santos-Silva JC, Ribeiro RA, Vettorazzi JF, Irles E, Rickli S, Borck PC, Porciuncula P, Quesada I, Nadal A, Boschero AC, Carneiro EM. **Taurine supplementation ameliorates glucose homeostasis, prevents insulin and glucagon hypersecretion, and controls β , α , and δ -cell masses in genetic obese mice.** Amino Acids. 2015 May 5. [Epub ahead of print]
2. Irles E, Ñeco P, Lluesma M, Villar-Pazos S, Santos-Silva JC, Vettorazzi JF, Alonso-Magdalena P, Carneiro EM, Boschero AC, Nadal Á, Quesada I. **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.
3. Martinez-Canto A, Castillejo A, Mata-Balaguer T, Castillejo MI, Hernandez-Illan E, Irles E, Barbera VM, Egoavil C, Guarinos C, Alenda C, Ochoa E, Lazaro R, Fajardo S, Lacueva J, Calpena R, Soto JL. **TGFBR1 intralocus epistatic interaction as a risk factor for colorectal cancer.** PLoS One. 2012;7(1):e30812.

Próximas publicaciones

1. Irles E, Lluesma M, Rafacho A, Villar-Pazos S, Vettorazzi JF, Santos-Silva JC, Alonso-Magdalena P, Boschero AC, Carneiro EM, Nadal A, Quesada I. **Impaired regulation of pancreatic alpha-cells and glucagon responses during glucose intolerance and prediabetic obesity.** *En preparación.*

COMUNICACIONES A CONGRESOS

1. *XXXVII Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas (SECF)*.
24-26 Septiembre de 2014, Granada (España)

Póster: Functional up-regulation of beta-cells allows for the compensatory adaptations to insulin resistance in a model of genetic obesity.

Irles E, Lluesma M, Ñeco P, Villar-Pazos S, Santos-Silva JC, Alonso-Magdalena P, Carneiro EM, Boschero AC, Nadal A, Quesada I.

2. *Beta cell regeneration and genome regulation-EASD Islet Study Group Annual Meeting*
27-29 Septiembre de 2013, Sitges (España)

Póster: Hyperinsulinemia in obese *ob/ob* mice is associated to increased electrical activity and exocytosis.

Ñeco P, Irles E, Soriano S, Nadal A, Quesada I

3. *XXVI Congreso de la Sociedad Española de Anatomía Patológica y División Española de la Academia Internacional de Patología*
22-24 Mayo de 2013, Cádiz (España)

Comunicación oral: Ausencia de citomegalovirus en gliomas. Un análisis comparativo de inmunohistoquímica, CISH y carga viral cuantitativa por PCR en tiempo real.

CM Egoavil Rojas, A Culiáñez, A García-Martínez, E Irles, A Castillejo, E Andrada, I Aranda, J Soto, C Alenda, V Barbera.

Póster: Estudio inmunohistoquímico de IDH1 en astrocitomas: correlación con la mutación y utilidad como marcador pronóstico y terapéutico.

A Culiáñez, C Egoavil, L Heredia, A García-Martínez, E Irles, A Paya, A Castillejo, J Soto, VM Barbera, C Alenda.

4. *2013 United States & Canadian Academy of Pathology Annual Meeting*
March 2-8, 2013, Baltimore, MD, USA.

Póster: Lack of Human Cytomegalovirus in Gliomas. A Viral Load Analysis by Quantitative Real Time PCR.

Araceli Garcia-Martinez, Esperanza Irles, Victor M Barbera, Cecilia Egoavil, Cristina Alenda, Adela Castillejo, Maria Isabel Castillejo, Enrique Ochoa, Mari Carmen Barea, Teresa Quintanar, Laura Heredia, Pedro Moreno, Joaquin Herrero, Maria Jose Portugués, Ana Culiáñez, Encarna Andrada, Javier Sendra, Alvaro Rodriguez-Lescure, Artemio Paya, Ignacio Aranda, Jose Luis Soto.

Póster: Validation of immunohistochemistry for identification of *IDH1* mutation in gliomas.

Cecilia M. Egoavil, Artemio Payá, Esperanza Irles, Araceli García-Martínez, Jose Luis Soto, Adela Castillejo, María Isabel Castillejo, Teresa Quintanar,

Joaquin Herrero, Alvaro Rodriguez- Lescure, Maria Jose Portugues, Pedro Moreno, Laura Heredia, Encarnacion Andrada, Ignacio Aranda, Victor M. Barberá, Cristina Alenda.

5. *22nd Biennial Congress of the EUROPEAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH: From Basic Research to Personalised Cancer Treatment.*
7-10 Julio 2012, Barcelona, España.

Póster: *SOCS1* methylation is associated to *MGMT* methylation and *IDH1* mutation in gliomas.

Irles E, Alenda C, Egoavil C, García-Martínez A, Hernandez-Illan E, Martínez-Cantó A, Castillejo MI, Quintanar T, Castillejo A, Barbera VM.

6. *European Society of Human Genetics Conference*
23-26 Junio 2012, Nürnberg, Alemania.

Póster: Tumor-specific age-dependent DNA methylation of *RUNX3*, *CDKN2A* and *CACNA1G* genes in colorectal cancer.

Hernandez-Illan E, Castillejo A, Martinez-Canto A, Castillejo MI, Irles E, Barbera VM, Lazaro R, Ochoa E, Soto JL.

Póster: *TGFBR1* Intralocus Epistatic Interaction as a Risk Factor for Colorectal Cancer.

Ana Martinez-Canto, Adela Castillejo, Trinidad Mata-Balaguer, Maria-Isabel Castillejo, Eva Hernandez-Illan, Esperanza Irles, Victor Barbera, Cecilia Egoavil, Carla Guarinos, Cristina Alenda, Enrique Ochoa, Rafael Lazaro, Silvia Fajardo, Javier Lacueva, Rafael Calpena and Jose-Luis Soto.

7. *XIII Congreso de la Sociedad Española de Oncología Médica*
19-21 Octubre de 2011, Málaga (España)

Comunicación oral: Caracterización de nuevos marcadores moleculares en tumores gliales.

M^a Teresa Quintanar Verdúñez, Esperanza Irles Vidal, Encarna Andrada Becerra, Elena Asensio Martínez, Asunción Soto Gutiérrez, Víctor Barberá Juan, Javier Sendra Tello, José Luis Soto Martínez, José Miguel Segura Ibáñez, Álvaro Rodríguez-Lescure.

Póster: Evolución de los tumores primarios del sistema nervioso central (SNC) con la introducción de los nuevos tratamientos.

M^a Teresa Quintanar Verdúñez, Asunción Soto Gutiérrez, Elena Asensio Martínez, Álvaro Arroyo Salgado, Esperanza Irles Vidal, Javier Sendra Tello, Víctor Barberá Juan, José Luis Soto Martínez, Encarna Andrada Becerra, Álvaro Rodríguez-Lescure.

8. *European Human Genetics Conference 2011*
28-31 Mayo de 2011, Ámsterdam (Países Bajos)

Póster: Androgen Receptor is a target gene for mutations in colorectal tumors with microsatellite instability and the mutated alleles undergo

hypermethylation. E. Hernández-Illán, A. Martínez-Cantó, E. Irlés, M.I. Castillejo, C. Egoavil, V.M. Barberá, C. Guarinos, L. Pérez-Carbonell, C. Alenda, A. Payá, R. Jover, J.L. Soto, A. Castillejo.

9. *EORTC-EANO Conference 2011:Trends in Central Nervous System Malignancies*
25-26 Marzo de 2011, Bucarest (Rumanía).

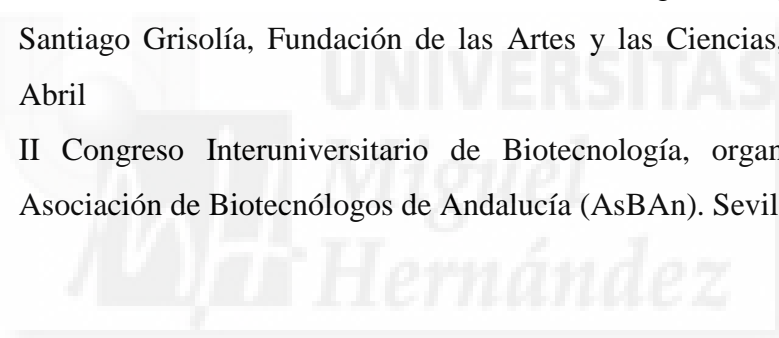
Póster: Strong association between IDH mutations and MGMT hypermethylation in gliomas.

Irlés E, Egoavil C, Hernandez-Illan E, Andrada E, Quintanar T, Sendra J, Rodriguez-Lescure A, Castillejo A, Soto JL, Barbera VM

CURSOS Y CONGRESOS

- 2014 Curso de Experimentación Animal. Universidad Miguel Hernández.
28/04 – 10/05
- 2012 22nd Biennial Congress of the EUROPEAN ASSOCIATION FOR
CANCER RESEARCH”: From Basic Research to Personalised Cancer
Treatment. 7-10 Julio 2012, Barcelona, España.
- 2011 International Symposium on Clinical and Basic Investigation in
Glioblastoma" organizado por la Red Española de Investigación en
Glioblastoma (REIG), Cátedra Santiago Grisolia y Fundación Ciudad de
las Artes y las Ciencias. Valencia, 23-25 June
- 2011 EORTC-EANO Conference 2011:Trends in Central Nervous System
Malignancies”, Bucarest (Rumanía), 25-26 Marzo
- 2009 El desafío oncológico 2: la Oncología Española, 30 años de andadura,
por el Hospital General Universitario de Valencia y el Instituto
Valenciano de Oncología de Valencia. Valencia, 2-3 diciembre
- 2009 Gestión económica, miembro de la organización y asistencia al IV
Congreso Interuniversitario de Biotecnología, organizado por la
Asociación de Biotecnólogos de Valencia (ABiVa) y la Universidad
Politécnica de Valencia. Valencia, 8-11 Julio
- 2009 VII Jornadas de Jóvenes Investigadores, organizadas por la Federación
de Jóvenes Investigadores. Barcelona, 25-27 Febrero
- 2009 I Jornada de Biotecnología de la Comunidad Valenciana, organizada por
la Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, 12 Marzo

- 2008 III Jornada sobre Biología Sintética, organizada por la Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, 11-12 Diciembre
- 2008 Congreso Científico BIOTEC2008, por la Sociedad Española de Biotecnología (SEBiot) y Congreso Empresarial BIOSPAIN2008 organizado por la Asociación Española de Bioempresas (ASEBIO). Granada, 17-19 Septiembre
- 2008 III Congreso Interuniversitario de Biotecnología, organizado por la Asociación de Biotecnólogos de León (ABLE). León, 9-12 Julio
- 2008 Cursos magistrales “Molecular Mechanisms of Synaptic Plasticity” (impartido por el Dr Graham L. Collingridge) y “Genomic Research from Human to the Environment” (impartido por el Dr J. Craig Venter), organizados por la Cátedra Santiago Grisolia, Fundación de las Artes y las Ciencias, Valencia, 5-7 Mayo
- 2008 1ª Jornada sobre Preservación de la Fertilidad, organizada por la Cátedra Santiago Grisolia, Fundación de las Artes y las Ciencias, Valencia, 29 Abril
- 2007 II Congreso Interuniversitario de Biotecnología, organizado por la Asociación de Biotecnólogos de Andalucía (AsBAN). Sevilla, 10-13 Julio



AGRADECIMIENTOS

En el tiempo que lleva realizar una tesis doctoral son muchas las personas que entran en nuestra vida, ya sea de forma temporal o para quedarse en ella para siempre. De todos ellos, en primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores, al Dr. Iván Quesada y al Dr. Ángel Nadal, por brindarme la oportunidad de llevar a cabo esta experiencia en su laboratorio. Gracias también a la Dra. Cristina Ripoll y a la Dra. Ester Fuentes; todos juntos velan por el funcionamiento del laboratorio. Mil gracias a la Dra. Paloma Alonso-Magdalena, siempre dispuesta a compartir su experiencia y a resolver nuestras interminables dudas al son de “Paloma, una preguntita...”.

No puedo dejar de hacer mención especial a Luisi y Salomé, por el tiempo compartido tanto dentro como fuera del laboratorio; Salomé por ser como una hermana mayor y Luisi, por ser la persona más divertida que he conocido nunca. Chicas, sois el motor del laboratorio, que funciona porque vosotras estáis ahí día tras día, al pie del cañón, siempre pendientes de apoyarnos en todo lo que haga falta. Sin vosotras, el laboratorio no funcionaría como lo hace. Gracias a todos los que han ido pasando por el laboratorio, cada uno aportando su granito de arena a su manera, porque en el tiempo compartido han contribuido a forjar mi “yo” de hoy: Mónica, Melissa, Eva, Patri, Alejandro, Tania, Manolo, Toñi, Marta y Bea. Gracias al Dr. Sergi Soriano, que nunca se fue del todo del laboratorio.

A Sabrina. La gallega que decidió trasladarse a la ciudad donde rara vez llueve. Mil gracias. Porque con ella he compartido intensas discusiones sobre el funcionamiento de los canales iónicos, fundamentos estadísticos, elucubraciones y teorías científicas variadas; viajes inolvidables, excursiones a gélidos ríos y a perdernos en la nieve, a cruzar España de parte a parte en coche; gracias por estar ahí en los momentos difíciles y en los buenos también, por aprender juntas a aguantarnos mutuamente en los momentos de crisis existencial y, asimismo, aprender a salir a flote.

No puedo dejar de hablar de Brasil y los brasileños. Mi primer contacto con Brasil fue Junia, quien durante su estancia en nuestro laboratorio me enseñó gran parte de lo que sé y llegó a ser como una hermana. Un año después llegó Jean, y sin pensarlo gané otro hermano brasileño. Gracias por todos los momentos compartidos. Mi mayor agradecimiento al Profesor Everardo por brindarme la oportunidad de conocer su laboratorio en la UNICAMP. Al Dr. Alex Rafacho por ser un gran científico y un gran

amigo. Mi estancia en Brasil me permitió conocer cómo se hace ciencia en otros lugares y vivir situaciones que no había imaginado que fuera a vivir allí: gracias Zé por estar allí.

No recuerdo cuándo fue la primera vez que pensé que me gustaría practicar este deporte poco común. Pero sí recuerdo que este pensamiento me acompañó muchos años hasta que finalmente me planteé seriamente empezar a practicar el deporte que ahora considero que está hecho “a mi medida”: la esgrima. Parece una locura... y realmente lo es... pero compensa, por todo lo que aporta. Para mí, ha sido mi vía de escape, mi “otra vida” fuera del laboratorio, y sin la cual, no me cabe la menor duda, habría dejado una tesis inacabada. Porque con la esgrima se aprende a enfrentar cualquier situación, mantener la calma aún en los peores momentos; porque perder los nervios es lo peor que se puede hacer y una buena esgrima requiere aprender a sobreponerse, hacer caso omiso de todo aquello que nos distrae y actuar siempre con rectitud y sin perder la elegancia. Por supuesto, no puedo olvidar a Ana, con quien aprendí las primeras nociones de esgrima en el Club de Esgrima Elche; ella me guió en mis primeros “pasitos esgrimísticos”, me transmitió su pasión por la esgrima y me instó a seguir entrenando aún cuando ella tuvo que dejar el Club. Así acabé conociendo a mis compañeros de sala del SEUA, con Vicente, nuestro maestro, a la cabeza de nuestra gran familia de fanáticos de la esgrima. A mis hermanos espadistas, mil gracias por los asaltos intensos hasta caer sin aliento, los ultra rápidos en los que ni te enteras de que has perdido, por los mil y un consejos... y por soportar a la nueva hermana hiperactiva: Ángel, Víctor, Adrián, Roberto (gracias por presentarme a “la francesa”, mi fiel compañera) y Rafa (gracias por ser un gran “desconocido”). Y a los floretistas, que aunque no son de los nuestros, también los queremos: Patri, Gema, Clara, los Juanes, Dani, Jaume. Mil gracias a todos también por los buenos momentos fuera de la sala, ya sea en las competiciones o en las cervezas “porque sí”. Gracias a los compañeros de mi nueva sala, el CEA; aunque hemos compartido poco tiempo aún, también habéis aportado vuestro granito de arena en las últimas semanas de esta tesis. Y espero que sigáis haciéndolo en la nueva etapa que comienzo. Gracias a Fernando, nuestro maestro, a Jorge, Javi, Jaime, Paula, Paco, Carlos, Ana, Arantxa, Adrián, Reme, Almudena, Gabriella, Nuno y Oriol.

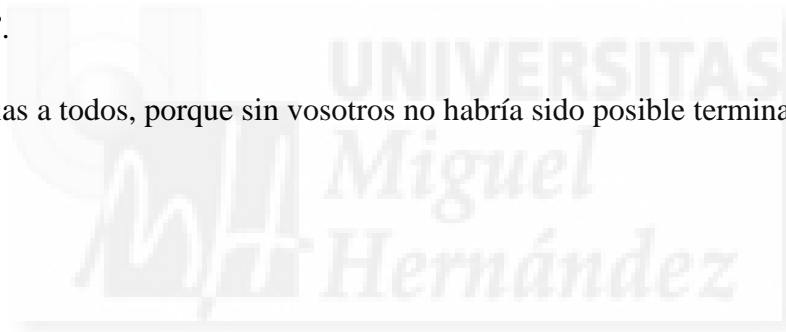
Gracias a mis chicas “fuera del lab”. Pilar, que decidió irse a vivir la aventura americana, porque aunque nos separen 6000 km, siento como si estuviéramos al lado,

que puedo contar contigo para lo que sea cuando sea. A Paula, Bárbara, Ángela, Marta, que no nos vemos mucho aunque estemos más cerquita, pero siempre habéis estado ahí para lo que hiciera falta... y porque todas juntas iniciamos nuestra aventura científica. A Eva, porque al terminar la carrera recorrimos de la mano los primeros senderos de la ciencia y eso no se olvida; y a Araceli, porque fue un placer compartir contigo mi tiempo y trabajo.

A Víctor, José Luis, Adela, Isa, Ana, porque con ellos aprendí a dar mi primeros pasos y a desenvolverme en el laboratorio; gracias por inculcarme vuestros valores y por vuestra inestimable amistad.

Gracias a mi familia. Por estar siempre ahí. A mis padres, por los valores que me han inculcado y por dejarme hacer mis propias elecciones. A mis hermanos, por aguantarme todo este tiempo. A mi abuela, por su constante interés en saber qué tal me iba con “mis ratas”. A mi prima Susi, por responder siempre a las llamadas de “necesito desconectar”.

Gracias a todos, porque sin vosotros no habría sido posible terminar esta tesis.



ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	27
1.1 El páncreas endocrino. El islote de Langerhans.....	27
1.2 Homeostasis de la glucosa y diabetes.....	29
1.3 La célula beta: acoplamiento estímulo-secreción.....	33
1.4 Alteraciones en la célula beta y acción de la insulina en individuos diabéticos.....	38
1.5 Obesidad y diabetes: fisiopatología de la DM-II asociada a la obesidad.....	40
1.6 El síndrome <i>ob/ob</i>	43
II. OBJETIVOS.....	47
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	51
3.1 Modelo animal de obesidad inducida por deficiencia de leptina: ratón <i>ob/ob</i>	51
3.2 Medidas plasmáticas y tests de tolerancia <i>in vivo</i>	51
3.3 Aislamiento de islotes de Langerhans.....	52
3.4 Cultivo primario de células aisladas.....	53
3.5 Determinación de actividad mitocondrial mediante técnicas de fluorescencia.....	53
3.6 Registros de electrofisiología.....	55
3.7 Monitorización de la señalización de calcio intracelular.....	56
3.8 Secreción <i>ex vivo</i> y contenido de insulina.....	57
3.9 Expresión proteica: <i>Western Blot</i>	58
3.10 Expresión génica: PCR cuantitativa a tiempo real.....	59
3.11 Análisis estadístico.....	60

IV. RESULTADOS.....	63
4.1 Caracterización fenotípica del modelo animal. Los ratones <i>ob/ob</i> presentan intolerancia a glucosa y resistencia a insulina.....	63
4.2 La función mitocondrial está aumentada en los islotes de <i>ob/ob</i>	67
4.3 Las células β de <i>ob/ob</i> presentan alteraciones del potencial de membrana.....	70
4.4 La señalización de $[Ca^{2+}]_i$ está aumentada en islotes de <i>ob/ob</i>	73
4.5 Los islotes de los ratones obesos secretan más insulina y tienen aumentada la exocitosis.....	77
4.6 El acoplamiento y la sincronía entre células β disminuye en los islotes de los ratones obesos.....	79
4.7 Expresión génica.....	81
V. DISCUSIÓN.....	85
5.1 Modelo de obesidad y prediabetes.....	86
5.2 Adaptaciones funcionales de la célula β en el estado prediabético asociado a la obesidad.....	87
5.2.1 Alteración del metabolismo mitocondrial.....	87
5.2.2 Alteración de las propiedades eléctricas.....	88
5.2.3 Alteración de la señalización de Ca^{2+}	89
5.2.4 Alteración de la biosíntesis y secreción de insulina.....	92
5.2.5 Alteración del acoplamiento celular.....	93
VI. CONCLUSIONES.....	97
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	101

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1: Inmunohistoquímica en páncreas de ratón.....	27
Figura 2: Citoarquitectura del islote de Langerhans en diferentes especies.....	28
Figura 3: Homeostasis de la glucosa.....	31
Figura 4: Esquema del proceso de secreción de insulina estimulada por glucosa.....	36
Figura 5: Acoplamiento entre la actividad eléctrica de la membrana celular, las oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$ y la secreción de insulina.....	37
Figura 6: Progresión de la resistencia a la insulina a la diabetes tipo 2.....	39
Figura 7: Riesgo relativo de padecer diabetes tipo 2 en función del IMC.....	40
Figura 8: Programa de temperaturas de PCR cuantitativa.....	58
Figura 9: Caracterización fenotípica.....	63
Figura 10: Homeostasis de la glucosa I: tolerancia a la glucosa.....	64
Figura 11: Homeostasis de la glucosa II: sensibilidad a la insulina.....	66
Figura 12: HOMA-IR.....	66
Figura 13: Metabolismo mitocondrial I: producción de NAD(P)H en islotes intactos.....	67
Figura 14: Metabolismo mitocondrial II: producción de NAD(P)H en células aisladas.....	68
Figura 15: Metabolismo mitocondrial III: potencial de membrana mitocondrial en islotes intactos.....	69
Figura 16: Potencial de membrana.....	70
Figura 17: Análisis de los parámetros del potencial de membrana I.....	71
Figura 18: Detalle del potencial de membrana.....	72
Figura 19: Análisis de los parámetros del potencial de membrana II.....	72

Figura 20: Señalización de calcio intracelular dependiente de glucosa I: perfiles oscilatorios.....	73
Figura 21: Señalización de calcio intracelular dependiente de glucosa II: análisis de los registros.....	74
Figura 22: Señalización de calcio intracelular independiente de metabolismo de glucosa I: potasio.....	76
Figura 23: Señalización de calcio intracelular independiente de metabolismo de glucosa II: α -Ketoisocaproato (KIC).....	76
Figura 24: Síntesis de insulina y exocitosis.....	77
Figura 25: Secreción de insulina <i>ex vivo</i>	78
Figura 26: Señalización de calcio en célula β individual.....	79
Figura 27: Acoplamiento entre células β	80
Figura 28: Expresión de Conexina-36 en islotes de CTL y <i>ob/ob</i>	80
Figura 29: Expresión génica en islotes de CTL y <i>ob/ob</i>	82
Figura 30: Alteraciones funcionales de la célula β	91
Tabla 1: Secuencia de los primers utilizados para qPCR.....	59

ABREVIATURAS

ADP: adenosín difosfato

ATP: adenosín trifosfato

AUC: área bajo la curva

BSA: albúmina sérica bovina

[Ca²⁺]_i: concentración de calcio intracelular

Ca_v: canal de calcio dependiente de voltaje

C_m: capacitancia de membrana

CTL: control

Cx36: conexina 36

DM: Diabetes Mellitus

DR: rectificadores tardíos

ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

FAD⁺/FADH₂: flavín adenín dinucleótido, en su forma oxidada y reducida

GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GcK: glucokinasa

GIP: polipéptido gástrico inhibitorio

GLP-1: péptido similar al glucagón tipo 1

GLUT2: transportador de glucosa 2

GSIS: secreción de insulina estimulada por glucosa

HOMA-IR: modelo homeostático de evaluación de la resistencia a insulina

IL6: interleucina 6

IMC: índice de masa corporal

IR: receptor de insulina

IU: unidad internacional

K_{ATP}: canal de potasio sensible a ATP

K_{Ca}: canal de potasio dependiente de calcio

KIC: alfa ketoisocaproato

KIR6.2: canal de potasio rectificador de entrada

K_v: canal de potasio dependiente de voltaje

NAD(P)⁺/NAD(P)H: nicotinamida adenina dinucleótido (fosfato), en su forma oxidada y reducida

NDIC: *National Diabetes Information Clearinghouse*

NEFAs: ácidos grasos no esterificados

NIH: *National Institutes of Health*

OMS: Organización Mundial de la Salud

PKC: fosfokinasa C

PVDF: fluoruro de polivinilideno

SUR1: receptor de sulfonilureas 1

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa

V_m: potencial de membrana

Ψ _m: potencial de membrana mitocondrial



INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1.1 El páncreas endocrino. El islote de Langerhans

El páncreas es un órgano impar localizado en el abdomen, en la región retroperitoneal. Está constituido por dos porciones con histología y funcionalidad claramente diferenciadas: el páncreas exocrino y el páncreas endocrino. El páncreas exocrino representa aproximadamente el 98% de la masa total del órgano. Está formado por células epiteliales organizadas en estructuras esféricas u ovoides huecas, llamadas acinos pancreáticos, y participa en el proceso de digestión mediante la secreción de enzimas digestivas y bicarbonato sódico al intestino delgado. Por otro lado, la porción endocrina del páncreas, que apenas representa el 1-2% de la masa total del órgano, está constituida por pequeñas agrupaciones esferoidales de células llamadas islotes de Langerhans ($\text{Ø} \approx 200\text{-}300\mu\text{m}$; 1000-3000 células/islote), y su función es la regulación de la homeostasis de la glucosa plasmática mediante la secreción de diversas hormonas (Figura 1).

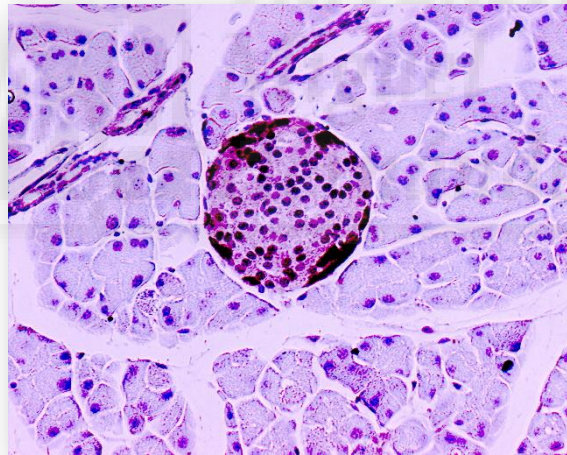


Figura 1. Inmunohistoquímica en páncreas de ratón. En el centro de la imagen se observa un islote de Langerhans, rodeado por tejido exocrino. Se realizó una tinción con hematoxilina y marcación de las células α , en la periferia del islote, con un anticuerpo anti-glucagón.

El islote de Langerhans lo conforman diferentes tipos celulares que producen diversas hormonas en respuesta a cambios en los niveles de nutrientes en sangre: las células alfa (α), productoras de glucagón, las células beta (β), productoras de insulina, las células delta (δ), productoras de somatostatina, las células PP, productoras de

polipéptido pancreático, y las células épsilon (ϵ), productoras de ghrelina (Quesada et al., 2008). Los islotes están rodeados por una densa red de capilares que permite tanto una rápida detección de cambios en la concentración de nutrientes en sangre como una rápida difusión de las hormonas producidas por el islote. Además, existe una regulación paracrina importante entre las células del islote que permite el establecimiento de interacciones entre las mismas. Los islotes también están inervados por los sistemas simpático, parasimpático y sensorial, que participan así de la regulación de la actividad del páncreas endocrino (Ahren, 2000).

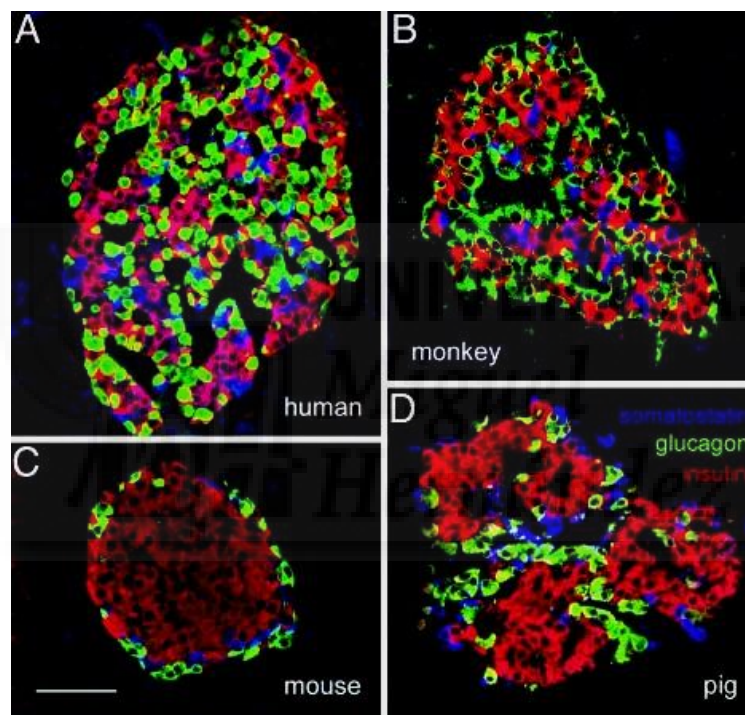


Figura 2. Citoarquitectura del islote de Langerhans en diferentes especies. La imagen muestra secciones ópticas de $1\mu\text{m}$, obtenidas por microscopía confocal, de islotes de humano (A), mono (B), ratón (C) y cerdo (D) marcados mediante inmunohistoquímica para insulina (rojo), glucagón (verde) y somatostatina (azul). Barra: $50\mu\text{m}$. Imagen modificada de Cabrera *et al.* 2006.

Las células α tienen función hiperglucemiante. Secretan glucagón en respuesta a concentraciones bajas de glucosa en sangre y esta hormona estimula la liberación de glucosa a partir de los depósitos de glucógeno, principalmente en hígado, así como la gluconeogénesis. La actividad secretora de estas células es inhibida por la presencia de altas concentraciones de glucosa, aunque se ha descrito una reactivación paradójica de

la secreción a concentraciones de glucosa suprafisiológicas (Salehi et al., 2006). Las células β tienen, por el contrario, función hipoglucemiante. La insulina que secretan cuando la glucemia está elevada (glucosa $> 6-7$ mM) facilita la captación de glucosa plasmática en los tejidos periféricos. Por el contrario, cuando los niveles de glucosa plasmática son bajos, la célula β está inactiva. Las células δ , mediante la secreción de somatostatina a concentraciones intermedias de glucosa, ejercen un control paracrino inhibitorio tanto sobre las células α como las β .

La proporción y localización de los diferentes tipos celulares en el islote varía según especies, como puede observarse en la Figura 2 (Cabrera et al., 2006). En islotes de ratón, principal modelo animal de estudio, las células β representan el 70-80% de las células del islote y se encuentran formando un núcleo central, que es rodeado por un manto de células α (15-20%). En cambio, los islotes humanos cuentan con una mayor proporción de células α (hasta un 45%) que se encuentran entremezcladas con las células β y otros tipos celulares (Brissova et al., 2005).

1.2 Homeostasis de la glucosa y diabetes

El mantenimiento de una concentración de glucosa plasmática dentro del rango fisiológico es esencial para el buen funcionamiento del cerebro/sistema nervioso, ya que la glucosa es el único sustrato que usa el cerebro, en condiciones normales, como fuente de energía. Por consiguiente, una situación de hipoglucemia altera principalmente la función del sistema nervioso central. Por otro lado, una situación de hiperglucemia da lugar a diferentes efectos negativos que afectan a múltiples órganos y tejidos, como se describirá más adelante al describir la diabetes. Por tanto, para controlar la glucemia el organismo se sirve de un complejo sistema de homeostasis controlado por realimentación negativa en el que los principales protagonistas son el glucagón y la insulina. La insulina es secretada por las células β cuando la glucosa plasmática está elevada ($> 6-7$ mM) y es transportada por el torrente sanguíneo hasta los tejidos diana, donde ejerce su función anabólica, ya sea activando o inhibiendo diferentes procesos metabólicos (Figura 3). En músculo y tejido adiposo, principalmente, la insulina promueve la captación de glucosa. En tejido adiposo también promueve la formación de ácidos grasos (lipogénesis) e inhibe la lipólisis. En hígado promueve el almacenamiento de glucosa en forma de glucógeno (glucogenogénesis) e inhibe la degradación del

glucógeno y la síntesis de glucosa a partir de precursores no glucídicos (gluconeogénesis). Por tanto la acción de la insulina lleva a la disminución de la glucosa plasmática que, a su vez, activa la secreción de glucagón por parte de las células α pancreáticas. Como puede verse en la parte derecha de la Figura 3, el glucagón ejerce acciones contrarias a las de la insulina, favoreciendo tanto la liberación de glucosa al torrente sanguíneo como disminuyendo la captación de la misma por los tejidos diana (Quesada et al., 2008).

No obstante, la regulación de la homeostasis glucémica no es tan simple ni es regulada únicamente por el efecto antagónico insulina-glucagón. Además de a la glucosa, el páncreas endocrino también está sujeto a regulación autocrina, paracrina, endocrina, neural y por nutrientes (Ahren, 2000; Taborsky y Mundinger, 2012; Marroqui et al., 2014).

Cuando se producen alteraciones en la regulación del sistema de homeostasis glucémica puede llegar a desarrollarse diabetes mellitus. La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad multifactorial crónica caracterizada por niveles elevados de glucosa en sangre, alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas, a consecuencia de una producción insuficiente de insulina, la acción defectuosa de la misma sobre sus tejidos diana o la combinación de ambas. La DM presenta un cuadro clínico muy característico que incluye un aumento de la frecuencia urinaria (poliuria), de la sed (polidipsia), del hambre (polifagia) y pérdida de peso. Además, en estadios avanzados de la enfermedad, debido a la hiperglucemia mantenida, es muy frecuente el desarrollo de retinopatías, nefropatías, neuropatías y enfermedades cardiovasculares (Herrera, 2007).

El diagnóstico de la DM se realiza, además de por la presencia del cuadro clínico previamente descrito, por la presencia de hiperglucemia ($\geq 200\text{mg/dL}$) en una muestra de sangre aleatoria. Para un diagnóstico más preciso, pueden tomarse medidas de glucemia en ayunas y 2h después de haber bebido una solución con 75g de glucosa. En función de los resultados obtenidos, el diagnóstico puede ser de Diabetes Mellitus, tolerancia a la glucosa alterada o glucemia en ayuno alterada. Otro test que se viene utilizando en los últimos años, aunque no siempre está disponible en los países con pocos recursos, es el test de hemoglobina glicosilada. Este test refleja los valores promedio de glucosa plasmática en las 8-12 semanas anteriores a la realización de la

prueba, por lo que aporta una medida del control glucémico en los últimos meses. Se aplica un valor de corte de 6.5% para diagnosticar diabetes. No obstante, valores inferiores a este punto de corte no descartan totalmente el diagnóstico de diabetes determinado por los tests de glucosa clásicos (Nathan et al., 2007; OMS: Organización Mundial de la Salud).

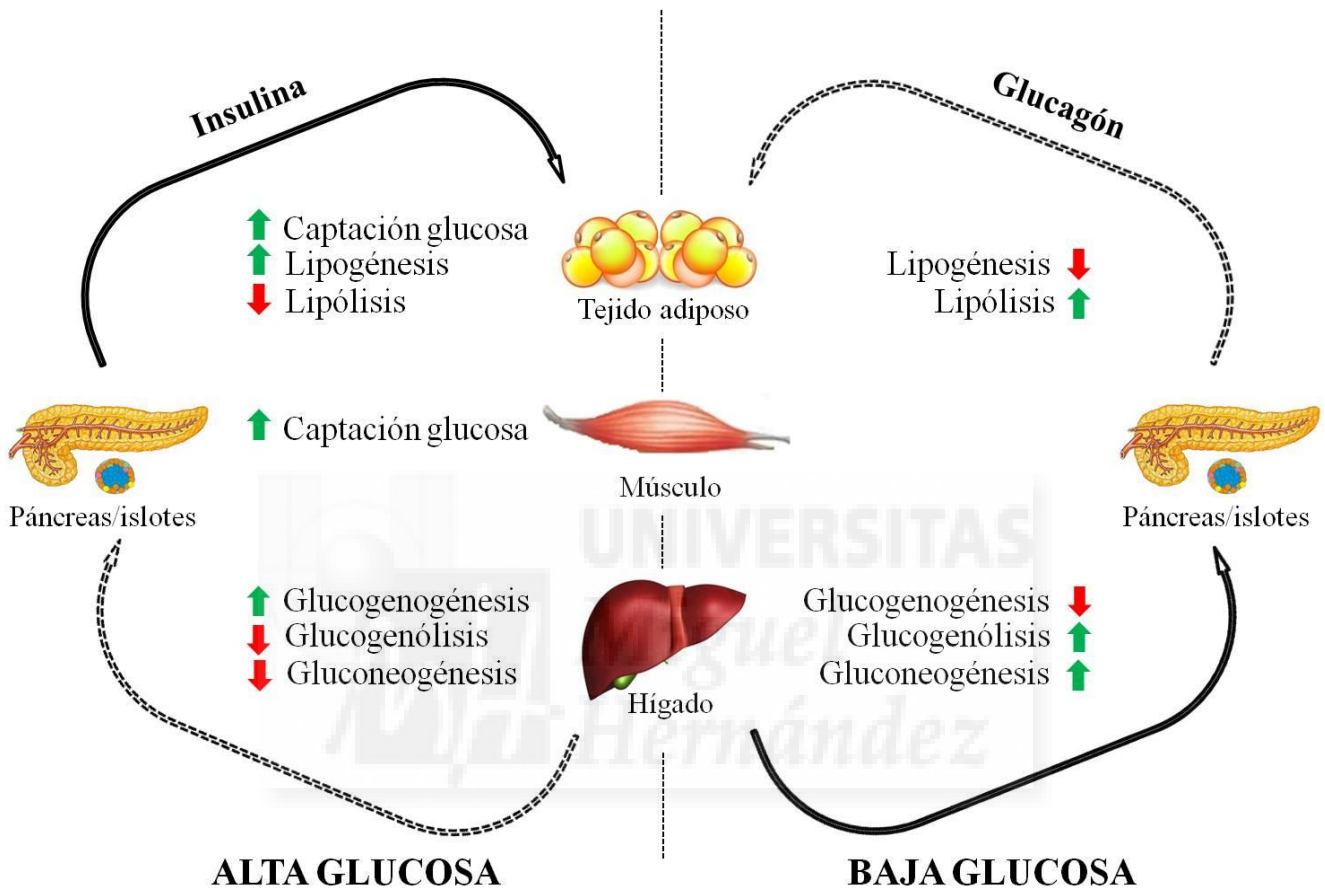


Figura 3. Homeostasis de la glucosa. El lado izquierdo de la imagen muestra los procesos que tienen lugar en los tejidos periféricos (eje central) cuando la concentración de glucosa plasmática es elevada y el páncreas secreta insulina. En estas condiciones, en los tejidos periféricos se produce una mayor captación de glucosa y tienen lugar procesos anabólicos. Por el contrario, el lado derecho de la imagen muestra los procesos que ocurren en los tejidos periféricos cuando la concentración de glucosa plasmática es baja y el páncreas secreta glucagón. En esta situación, en los tejidos periféricos son estimulados los procesos de catabolismo del glucógeno y síntesis de glucosa. Las flechas con línea continua representan la secreción de insulina y el efecto que ésta tiene, la disminución de la glucosa plasmática, que induce la secreción de glucagón. Las flechas con línea discontinua representan la secreción de glucagón a bajas glucosadas y el efecto que éste tiene, un aumento en la concentración de glucosa plasmática, que induce la secreción de insulina.

En función de la etiología, se suele distinguir entre tres tipos de diabetes (OMS):

- Diabetes tipo I: DM debida a una deficiencia casi absoluta en la producción de insulina como consecuencia de la destrucción de las células β . La DM-I

puede ser autoinmune, si la destrucción de las células β se debe a un proceso autoinmune, o idiopática, si la destrucción de las mismas responde a otro proceso. La DM-I se presenta, por lo común, en niños y adolescentes, aunque no de forma exclusiva y supone que los pacientes dependerán de inyecciones de insulina exógena durante toda su vida.

- Diabetes tipo II: DM caracterizada por la presencia de hiperglucemia debida a un defecto en la secreción de insulina, muchas veces acompañado por resistencia a insulina en los tejidos diana de la hormona. Al contrario que la DM-I, suele aparecer en la edad adulta, aunque en los últimos años está aumentando la tasa de aparición de DM-II en niños y adolescentes. Este tipo de diabetes está asociado con un estilo de vida sedentario, una mala alimentación y la obesidad. También tiene un componente genético importante; se han descrito mutaciones en varios genes implicados en la regulación de la producción y la acción de la insulina. Otros factores de riesgo son la hipertensión arterial y la dislipidemia (valores de colesterol en sangre anormalmente altos). En estadios tempranos de la enfermedad, el paciente no necesita inyecciones de insulina; puede ser tratado con esquemas de dieta y ejercicio físico únicamente o en combinación con algún antidiabético oral. En estadios más avanzados, los pacientes sí comienzan a ser tratados con insulina.
- Diabetes gestacional: DM que se desarrolla de forma temporal durante el embarazo, debido a la aparición de resistencia a la insulina en este estado.

De los tres tipos descritos, la DM-II es la más frecuente, con diferencia, representando aproximadamente el 90% de todos los casos de diabetes en el mundo. Según las últimas estadísticas de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el mundo hay más de 347 millones de personas con diabetes, se calcula que las muertes por diabetes se duplicarán en 10 años (en 2012 la diabetes fue causa directa de 1.5 millones de muertes) y que, para el año 2030, la diabetes será la séptima causa de muerte mundial. Estas cifras indican que la diabetes se está convirtiendo en una epidemia mundial, en gran parte debido al rápido aumento del sobrepeso, la obesidad y la inactividad física.

1.3 La célula beta: acoplamiento estímulo-secreción

La célula β es una célula eléctricamente excitable que responde a diferentes estímulos fisiológicos produciendo potenciales de acción y, en última instancia, secretando insulina. Su actividad eléctrica está estrechamente regulada por la acción conjunta de diferentes tipos de canales iónicos localizados en la membrana plasmática. Además, el potencial de membrana (V_m) de las células β tiene como característica el estar regulado por glucosa, siendo ésta uno de los principales factores que determinan el estado eléctrico de la célula.

A continuación se describen los principales canales iónicos implicados en la actividad eléctrica y la secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS: *glucose-stimulated insulin secretion*) en células β de ratón.

- Canales de potasio sensibles a ATP (K_{ATP}). Los canales K_{ATP} de la célula β son hetero-octámeros formados por cuatro subunidades del canal KIR6.2, que forman el poro, y cuatro subunidades reguladoras del receptor de sulfonilureas SUR1 (Bichet et al., 2003). Las subunidades KIR6.2 contienen un sitio de unión de ATP, que determina el bloqueo del canal. Las subunidades SUR1, por otro lado, ejercen otro tipo de regulación del canal. Estas subunidades poseen sitios de unión para regulación de la actividad del canal por sulfonilureas (tolbutamida, glibenclamida, glimepirida), otros agentes hipoglucémicos como las glinidas, y activadores del canal (Drews et al., 2010).

En condiciones de reposo, dadas en ausencia de glucosa o a bajas concentraciones de la misma, el V_m es de unos -70mV . Esto quiere decir que el interior de la célula tiene una carga negativa respecto al exterior celular, condición que está determinada, principalmente, por la corriente de salida de iones K^+ a través de los canales K_{ATP} . La probabilidad de apertura de los K_{ATP} depende en gran medida del metabolismo de la glucosa. Cuando se produce un aumento de la concentración de glucosa extracelular, ésta entra en la célula a través del transportador específico GLUT2, en ratón. La glucólisis y posterior metabolismo mitocondrial llevan a la activación del ciclo de Krebs y producción de especies reducidas (NAD(P)H y FADH_2) que ceden sus electrones a la cadena de transporte electrónico. La activación de la cadena de transporte electrónico está acoplada a la producción de ATP mediante la ATP-sintasa

(Quesada et al., 2006). Así, como resultado del metabolismo de la glucosa, aumenta la relación ATP/ADP en el citoplasma, responsable del bloqueo de los canales K_{ATP} y, en consecuencia, se produce una despolarización de la membrana plasmática.

- Canales de calcio dependientes de voltaje (Ca_v). Cada uno de estos canales está constituido por varias subunidades: α_1 , $\alpha_2\delta$, β y γ . La subunidad α_1 forma el poro conductor selectivo de iones Ca^{2+} , contiene el sensor de voltaje y las estructuras de activación/inactivación. Las otras subunidades modulan la activación e inactivación del canal, la amplitud de las corrientes. En función de la estructura primaria de la subunidad α_1 , los Ca_v se dividen en tres familias: Ca_v1 , Ca_v2 y Ca_v3 . Aunque aún sigue siendo tema de debate qué canales se encuentran en la célula β y cuál es su papel en el funcionamiento de la misma, se sabe que los canales de Ca^{2+} -tipo L (familia Ca_v1) son cruciales. Estos canales tienen un umbral elevado para la activación dependiente de voltaje, por lo que generan las llamadas corrientes de Ca^{2+} activadas por alto voltaje. Además, se inactivan lentamente, lo que permite conseguir cambios de larga duración en la concentración intracelular de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$), necesarios para la estimulación de la secreción de insulina. Las corrientes Ca_v en célula β de ratón se activan a potenciales por encima de $-50mV$, tienen un máximo de corriente a $-20mV$ y se revierten sobre los $+50mV$. Además de la regulación por voltaje, las corrientes de los canales de Ca^{2+} -tipo L también están sujetas a inactivación dependiente de Ca^{2+} durante estados de despolarización sostenida.

La entrada de Ca^{2+} a través de Ca_v controla importantes procesos celulares entre los que se encuentra la exocitosis, por lo que una correcta actividad y densidad de estos canales en las células β es indispensable para conseguir niveles adecuados de secreción de insulina. En presencia de glucosa, la célula β comienza a metabolizarla, el ATP resultante bloquea los canales K_{ATP} y se produce una despolarización de la membrana plasmática. Cuando el bloqueo de los canales K_{ATP} es suficiente para generar un V_m de $\approx -50mV$, se activan los canales Ca_v , comienza a entrar Ca^{2+} al citoplasma desde el exterior celular y se generan potenciales de acción. Para alcanzar este nivel de despolarización es necesaria una concentración de glucosa de 7-8 mM; por debajo de esta concentración no es frecuente observar la entrada de Ca^{2+} (Drews et al., 2010).

- Canales de potasio dependientes de voltaje (K_v). Son canales a través de los cuales se produce una corriente de salida de K^+ , dependiente de voltaje, que permite la repolarización del potencial de membrana. Están formados por homómeros o heterotetrámeros de canales de K^+ constituidos por seis dominios transmembrana. En función de su cinética de activación e inactivación se distinguen dos tipos de K_v : los rectificadores tardíos (DR), llamados así porque su activación tiene lugar tras un breve lapso de tiempo una vez alcanzado el potencial de membrana umbral para su activación (Rorsman y Trube, 1986), y los tipo A, cuya activación es rápida una vez alcanzado el voltaje umbral de activación (Smith et al., 1989).

En células β de ratón, el rectificador tardío $K_v2.1$, es responsable, aproximadamente, del 80-85% de la corriente de salida de K^+ dependiente de voltaje. Este canal se activa a potenciales de membrana de entre -30 y -20mV y la corriente de salida de K^+ hiperpolariza el potencial de membrana, de forma que permite la terminación de los potenciales de acción de Ca^{2+} .

- Canales de potasio dependientes de $[Ca^{2+}]_i$ (K_{Ca}). Son canales a través de los cuales se produce la salida de K^+ de la célula (15-20% de la corriente total de salida de K^+), con una estructura similar a la de los K_v , pero cuya actividad no está regulada por voltaje sino por la concentración intracelular de Ca^{2+} . Aunque se ha descrito la existencia de diversos canales K_{Ca} en células β , a día de hoy no se conoce con exactitud qué tipo de K_{Ca} contribuye a la repolarización. Una de las funciones más importantes de los K_{Ca} , junto a los K_{ATP} , es su implicación en el patrón oscilatorio de Ca^{2+} (Kanno et al. 2002).

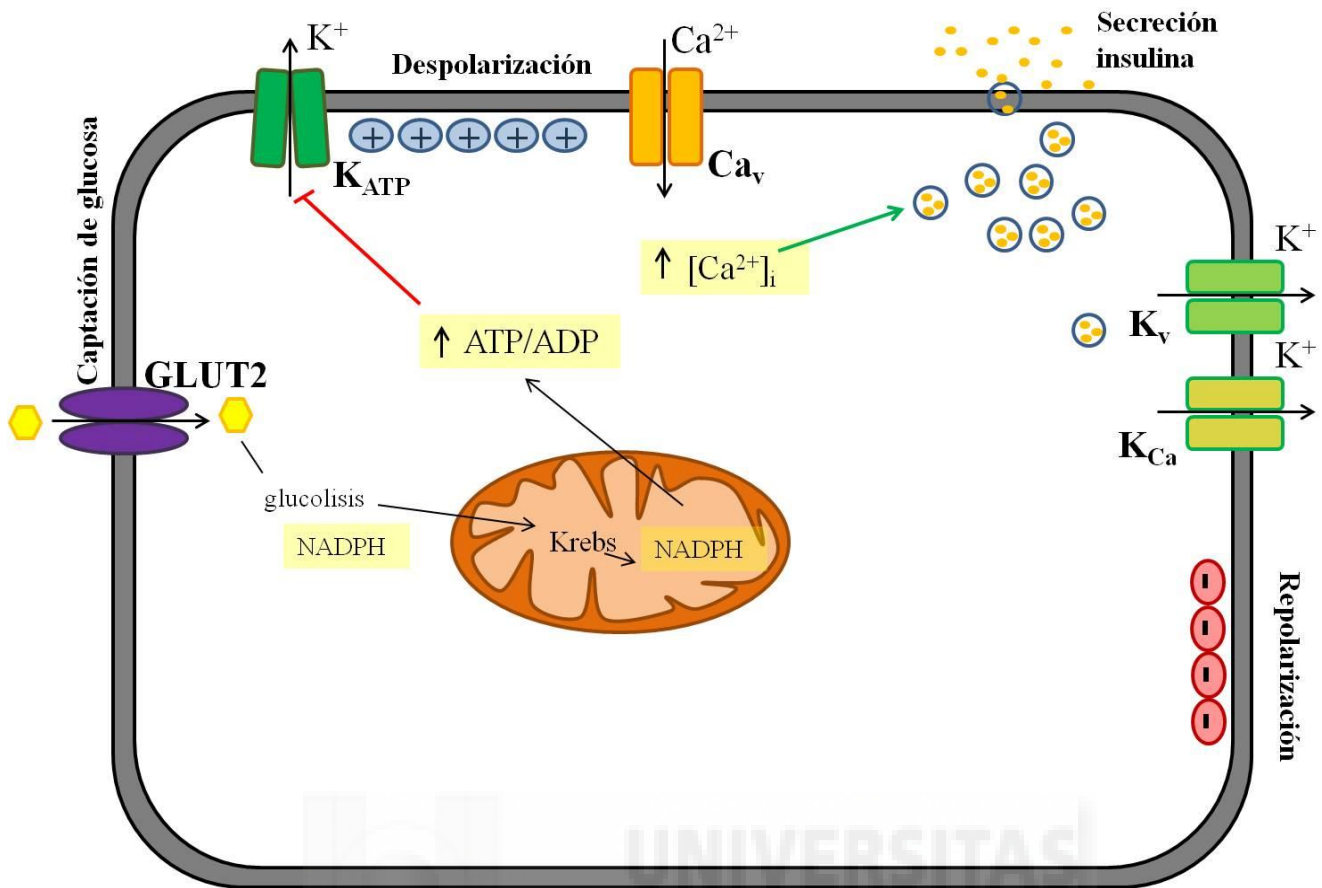


Figura 4. Esquema del proceso de secreción de insulina estimulada por glucosa. De izquierda a derecha, la entrada de glucosa en la célula a través de GLUT2 y su posterior metabolismo llevan a un aumento del ratio ATP/ADP. En consecuencia, se produce un bloqueo de los canales K_{ATP} y la consecuente despolarización de la membrana plasmática. Cuando la concentración de glucosa es suficiente para inducir una despolarización que alcanza V_m de unos -50mV , se activan los Ca_v y se producen potenciales de acción y oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$. La entrada de este catión en la célula estimula la secreción de insulina. Por otro lado, los canales K_v y K_{Ca} se encargan de la repolarización de la membrana, lo que da lugar al cese o a la activación del patrón oscilatorio de los potenciales de acción y el $[Ca^{2+}]_i$.

En la Figura 4 se representa de forma simplificada el proceso de secreción de insulina estimulada por glucosa, con los canales iónicos implicados. La entrada de glucosa y su metabolismo inducen un aumento de la razón ATP/ADP, que bloquea los canales K_{ATP} . Esto provoca una despolarización de la membrana plasmática. Cuando se alcanza un potencial de unos -50mV se activan los Ca_v y se produce la entrada de Ca^{2+} en la célula, que participa como inductor de la exocitosis de las vesículas de insulina. Los canales K_{Ca} y K_v son responsables de la terminación de los potenciales de acción y oscilaciones de Ca^{2+} . La acción coordinada de los diferentes canales iónicos permite que

la actividad eléctrica, las oscilaciones de Ca^{2+} intracelular y la secreción de insulina se comporten de forma sincronizada (Figura 5) (Santos et al., 1991; Valdeolmillos et al., 1993). Este acoplamiento celular se produce mediante uniones tipo *gap junction*, gracias a los poros establecidos, principalmente, por Conexina36.

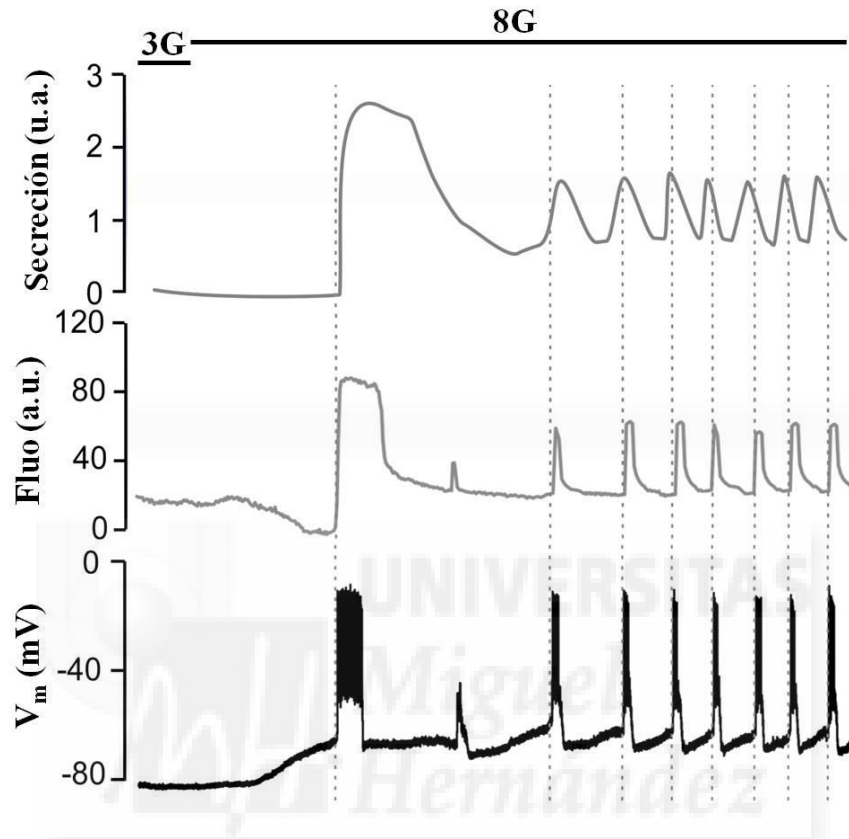


Figura 5. Acoplamiento entre la actividad eléctrica de la membrana celular, las oscilaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la secreción de insulina. La actividad eléctrica de la célula (gráfico inferior) se encuentra acoplada con las señales de variación de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (gráfico central) y de la secreción de insulina (gráfico superior), garantizando así una respuesta rápida y eficaz frente al estímulo.

La secreción de las vesículas de insulina sigue una dinámica característica. Como puede verse en la Figura 5, tanto la señal de Ca^{2+} como la secreción de insulina muestran dos fases diferentes; una primera fase compuesta por un aumento de la señal transitorio y de gran amplitud, seguida de una segunda fase compuesta por oscilaciones de menor amplitud y mayor frecuencia. La primera fase correspondería a la exocitosis de los gránulos de insulina que se encuentran asociados a la membrana plasmática, mientras que la segunda fase correspondería a la exocitosis de gránulos de insulina procedentes de un grupo de reserva, que poco a poco transitan hacia la membrana, se

asocian a ella y son secretados. Estas dos fases son consecuencia de la acción conjunta de dos vías de estimulación de la secreción de insulina; la vía inductora o *triggering pathway*, mediada por el bloqueo de los canales K_{ATP} y la consecuente entrada de Ca^{2+} , y la vía metabólica amplificadora, que contribuye en hasta un 50% a la secreción total de insulina (Henquin, 2011).

1.4 Alteraciones en la célula beta y acción de la insulina en individuos diabéticos

La diabetes tipo 2 se establece fundamentalmente por la incapacidad de las células beta de compensar la resistencia a la insulina. Ésta se define como la pérdida de la sensibilidad a la insulina en los tejidos diana de la hormona. Esto ocurre por alteraciones en la señalización de la insulina en estos tejidos, ya sea por alteraciones en la expresión y/o funcionalidad del receptor de insulina (IR) o en pasos posteriores de la cascada de señalización. Existen diversas causas etiológicas para la resistencia a la insulina: pertenecer a ciertas etnias, padecer algunas enfermedades asociadas al desarrollo de resistencia a insulina, el uso de esteroides, consumo de algunos medicamentos, edad avanzada, problemas de sueño y el hábito de fumar, entre otros factores (National Diabetes Information Clearinghouse, NDIC; National Institutes of Health, NIH). Además, en los últimos años están cobrando cada vez mayor importancia como factores de riesgo la inactividad física y el sobrepeso (NDIC, NIH). Estos dos últimos factores se comentarán con mayor detalle en el apartado 1.5.

El diagnóstico de la diabetes tipo 2, como se explicó en el apartado 1.2, se basa principalmente en el hallazgo de concentraciones de glucosa plasmática anómala. Antes de llegar a presentar valores de glucemia tan elevados como para diagnosticar diabetes, los pacientes han pasado por estadios previos caracterizados por anomalías en la homeostasis de la glucosa. En etapas iniciales, ligeros incrementos en la glucemia, generalmente asociados con resistencia a la insulina, consiguen ser contrarrestados por un aumento de la producción de insulina. Es decir, las células beta se adaptan a la mayor demanda de insulina y, durante un periodo de tiempo, consiguen producir cantidades de hormona suficientes para compensar la resistencia a insulina y mantener la glucemia dentro de los valores normales. Esta compensación ocurre a través del aumento de la masa de células beta y por incremento en su eficiencia secretora (Gonzalez et al., 2013). No obstante, en determinado momento la población de células beta deja de ser capaz de

compensar por pérdida de funcionalidad y/o de masa celular frente a la resistencia a la insulina, dando lugar a hiperglucemia creciente y, en última instancia, diabetes tipo 2, situación en la que además de resistencia a la insulina se produce también pérdida de masa de célula beta y un gran deterioro de su función (Sachdeva y Stoffers, 2009) (Figura 6).

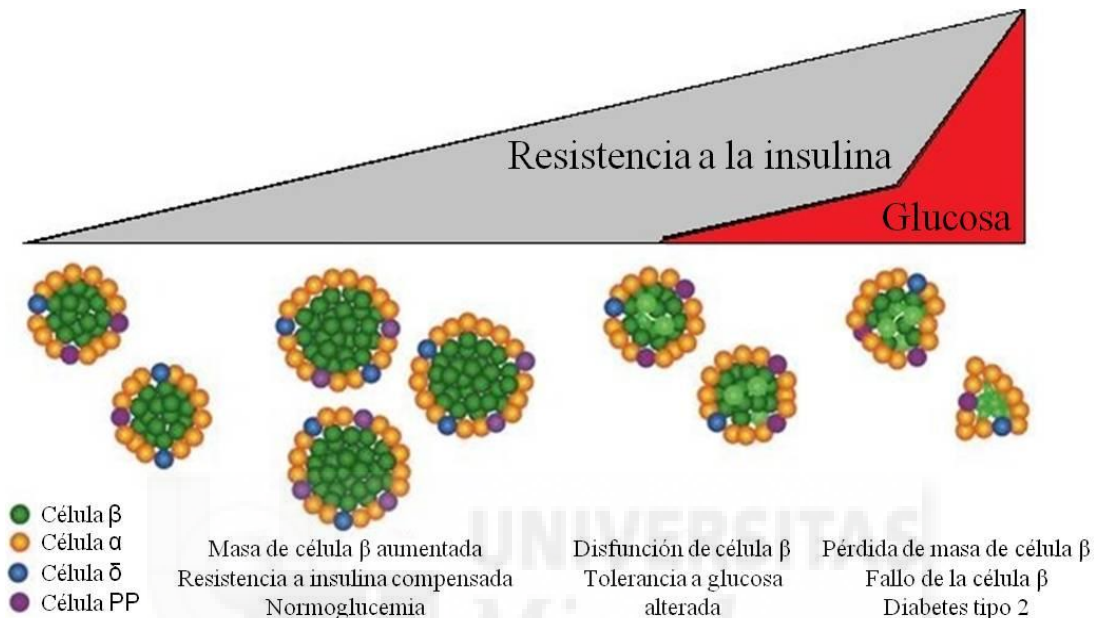


Figura 6. Progresión de la resistencia a la insulina a la diabetes tipo 2. La imagen superior muestra la progresión de la resistencia a la insulina a la diabetes tipo 2, pasando por un estado intermedio de tolerancia a glucosa alterada. En la parte inferior de la imagen, la adaptación de los islotes a las diferentes etapas descritas anteriormente. Imagen modificada de Sachdeva y Stoffers, 2009.

A nivel funcional se ha descrito una reducción de la capacidad secretora de los islotes de pacientes diabéticos. Los niveles basales de secreción de insulina, a concentraciones de glucosa no estimulantes, no son diferentes, pero a glucosas estimulantes se ha observado una deficiencia en la secreción estimulada por glucosa en los islotes de pacientes con diabetes tipo 2 (Fernandez-Alvarez et al., 1994; Deng et al., 2004; Del Guerra et al., 2005). Esto se relacionó con una reducción de la oxidación de la glucosa en islotes de diabéticos y se especuló que la mitocondria podría estar implicada en la disfunción de la célula beta en pacientes diabéticos. Un estudio sobre la morfología y función de las mitocondrias mostró que, efectivamente, estas aparecen hipertrofiadas en las células β de los pacientes con diabetes y que no son capaces de aumentar su producción de ATP en presencia de alta glucosa (Anello et al., 2005).

En cuanto a la masa de célula- β , se ha descrito ampliamente una pérdida de la misma de en torno al 30% en individuos diabéticos. Esta reducción se debe a un aumento de la apoptosis en combinación con tasas normales de proliferación de célula- β y neoformación de células- β a partir de ductos (Butler et al., 2003a; Marchetti et al., 2004). Esta disminución en la población de células β no parece que sea la causante de diabetes manifiesta, a menos que se dé en combinación con defectos funcionales.

1.5 Obesidad y diabetes: fisiopatología de la DM-II asociada a la obesidad

La obesidad se está convirtiendo en los últimos años en un grave problema a nivel mundial, con cifras ciertamente preocupantes. Al año mueren en el mundo 2.8 millones de personas; en el año 2014, el 39% de los adultos (mayores de 18 años) presentaron sobrepeso, y un 13%, obesidad; en 2013, 42 millones de niños menores de 5 años tenían obesidad o sobrepeso (OMS). Estas alarmantes cifras no hacen más que aumentar, principalmente debido al estilo de vida cada vez más extendido en los países desarrollados, un estilo de vida caracterizado por baja actividad física y hábitos alimenticios incorrectos.

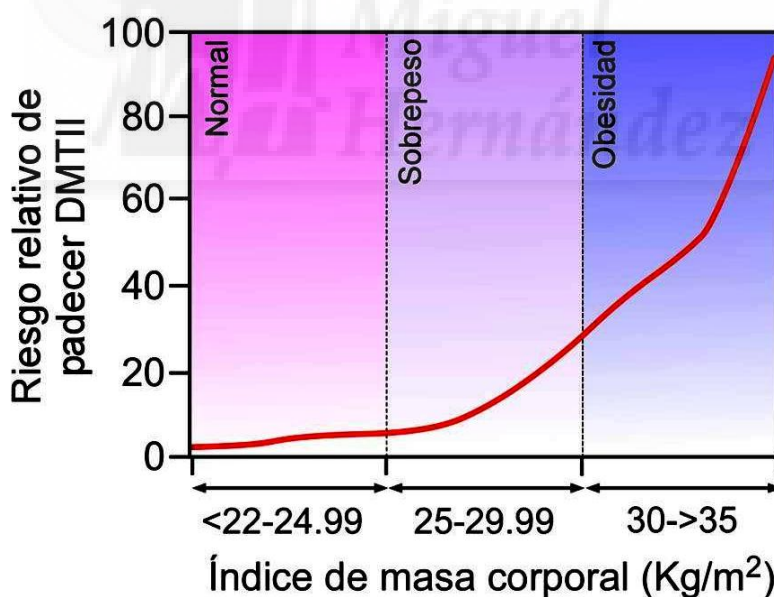


Figura 7. Riesgo relativo de padecer diabetes tipo 2 en función del IMC. De izquierda a derecha, la imagen muestra el riesgo relativo de padecer diabetes tipo 2 en función de que el IMC sea normal o indicador de sobrepeso u obesidad. Imagen modificada de Colditz et al. 1995.

Para determinar anomalías en el peso corporal de forma simple se suele utilizar el índice de masa corporal (IMC) (Gray y Fujioka, 1991). El IMC se calcula dividiendo

el peso corporal, en kg, por el cuadrado de la altura, en metros. Valores de $IMC \geq 25$ indican sobrepeso y valores de $IMC \geq 30$ indican obesidad. Un IMC elevado se ha relacionado con un mayor riesgo de padecer diversas patologías crónicas como enfermedades cardiovasculares, cáncer y diabetes mellitus tipo 2 (Haslam y James, 2005) (Figura 7).

La obesidad se asocia con desarrollo de resistencia a la insulina (Reaven, 1988). Gran parte de los individuos obesos son resistentes a la insulina, aunque no todos ellos acaban desarrollando hiperglucemia o, en última instancia, diabetes. Por el contrario, la mayoría de los pacientes obesos son capaces de compensar la resistencia mediante adaptación de la población de células- β pancreáticas a la mayor demanda de insulina (Perley y Kipnis, 1966; Polonsky et al., 1988; Kahn et al., 1993). Únicamente en los casos en los que el páncreas no es capaz de producir una respuesta compensatoria se alcanzan estados de hiperglucemia y/o diabetes (Kahn, 2001).

El tejido adiposo participa activamente en la modulación del metabolismo mediante la liberación de ácidos grasos no esterificados (NEFAs, *non-esterified fatty acids*), glicerol, hormonas y citoquinas proinflamatorias (Wellen y Hotamisligil, 2005; Scherer, 2006; Shoelson et al., 2006). De forma adicional, macrófagos y otros tipos celulares que se encuentran en el tejido adiposo también participan de esta modulación del metabolismo mediante la liberación de diversos factores, como interleucina 6 (IL-6) o factor de necrosis tumoral α (TNF- α) (Wellen y Hotamisligil, 2005; Fain et al., 2004). En la obesidad, el incremento de tejido adiposo y de los tipos celulares que lo acompañan, facilita que factores como adipoquinas y quimiocinas sean producidos en proporciones mayores a las normales. Este desbalance puede llevar al desarrollo de resistencia a la insulina, ya sea por el efecto directo de las adipoquinas o por la producción de citoquinas por parte de los macrófagos infiltrados, atraídos por la mayor producción de quimiocinas (Virtue y Vidal-Puig, 2008).

Las células β poseen una gran plasticidad a la hora de regular la secreción de insulina mediante adaptación funcional e incrementando su masa total. Se ha descrito que en respuesta a la resistencia a insulina causada por la obesidad, la pubertad y el embarazo, las células β pueden responder aumentando hasta 5 veces la liberación de insulina y hasta un 50% su volumen total (Perley y Kipnis, 1966; Moran et al., 1999; Buchanan et al., 1990; Klöppel et al., 1985; Butler et al., 2003). En cuanto a las

adaptaciones funcionales, todo parece indicar que la célula- β se adapta aumentando el metabolismo de la glucosa. Uno de los cambios que se ha descrito es el aumento de la actividad de la glucoquinasa (GcK), la enzima limitante del metabolismo de la glucosa, que es responsable de la fosforilación de la misma una vez que entra en la célula a través de su transportador (Chen et al., 1994). Otro estudio muestra que tanto la oxidación como el flujo de la glucosa están aumentados, este último por un aumento de la piruvato carboxilasa y de la lanzadera malato-piruvato, encargadas del abastecimiento de intermediarios del ciclo de Krebs (Liu et al., 2002). Otro mecanismo que podría participar de la adaptación funcional es la señalización por NEFAs. Estos potencian la secreción de insulina tanto en respuesta a secretagogos glucídicos como no glucídicos y han sido señalados como participantes activos de la hiperinsulinemia compensatoria (Stefanovski et al., 2011). Los NEFAs median su estimulación tanto por su unión a GPR40 y activación de la señalización de calcio intracelular (Itoh et al., 2003) como por su implicación en la formación de Acetil-CoA, que puede activar la exocitosis directamente o a través de la activación de PKC (Prentki et al., 2002). Las incretinas, producidas en la mucosa intestinal, como GIP (*gastric inhibitory polypeptide*) y GLP-1 (*glucagon-like peptide*), también estimulan la secreción de insulina a través de su receptor específico en la célula- β (Drucker, 2006). Hay indicios de que apuntan a una posible alteración de la respuesta a incretinas en estados obesos, como muestra un estudio en el que la interrupción de la señalización de GIP previene el desarrollo de diversas anomalías metabólicas relacionadas con la diabetes asociada a la obesidad (Irwin et al., 2007).

El incremento en la masa total de célula- β puede tener lugar de tres formas: por formación de nuevas células (hiperplasia), ya sea por proliferación de las ya existentes o por neoformación, por aumento del tamaño de las células (hipertrofia) y/o por una reducción de la tasa de muerte celular o apoptosis (Bonner-Weir, 2000). Además de los efectos comentados anteriormente, GLP-1 puede también contribuir al aumento de masa de célula- β gracias a su actividad mitogénica; estimula la proliferación y reduce la apoptosis (Drucker, 2006). Por su parte, la exposición a largo plazo a alta glucosa y NEFAs también induce aumento de la masa, tanto por hipertrofia como por hiperplasia en el caso de la glucosa, y por inducción de la proliferación en el de los NEFAs.

Cuando la célula- β ya no es capaz de compensar la resistencia a la insulina en un ambiente obesógeno, pueden generarse disfunciones en su actividad: deja de responder

a glucosa correctamente, disminuye su capacidad secretora, y el aumento de la glucemia resultante tiene efectos deletéreos sobre las células (glucotoxicidad). La exposición a largo plazo a NEFAs también desempeña un papel en la pérdida progresiva de la funcionalidad de la célula- β , disminuyendo tanto la biosíntesis como la secreción de insulina estimulada por glucosa (Zhou y Grill, 1994). En el escenario de la obesidad, cuando tanto la glucemia como los NEFAs se encuentran en niveles elevados, ambos factores actúan de forma sinérgica con un mayor impacto deletéreo en la funcionalidad de la célula- β , lo que se conoce como glucolipotoxicidad (El-Assaad et al., 2003).

1.6 El síndrome *ob/ob*

El síndrome *ob/ob*, cuya principal característica es la marcada obesidad que provoca, apareció por primera vez en 1949 en una colonia de los Laboratorios Jackson (Bar Harbor, Maine) de forma espontánea y se transfirió a la colonia C57BL, ampliamente caracterizada. Mediante experimentos de parabiosis, en los que se unieron quirúrgicamente ratones *ob/ob* y ratones control con el fin de que compartieran el mismo sistema circulatorio, se descubrió que los ratones obesos carecían de cierto factor circulante producido por los ratones control pero, al mismo tiempo, presentaban una alta sensibilidad a dicho factor. Posteriormente, mediante experimentos de clonaje posicional, se pudo determinar que el factor circulante responsable del fenotipo *ob/ob* es la leptina, una hormona producida, principalmente, por el tejido adiposo. El síndrome está causado por una mutación recesiva en el gen de la leptina. La deficiencia de leptina se asocia con un fenotipo caracterizado por hiperfagia, obesidad severa, hiperglucemia, hiperinsulinemia, menor temperatura corporal, menor actividad locomotora, menor actividad del sistema inmune e infertilidad. Estos ratones son resistentes a la insulina y, frente a esta situación de mayor demanda de insulina, el páncreas endocrino se ve sometido a una serie de adaptaciones en un intento de mantener una correcta homeostasis de la glucosa. La alteración de la morfología del páncreas endocrino es otra de las características del fenotipo *ob/ob*; el páncreas presenta una mayor proporción de tejido endocrino, los islotes son más grandes, más numerosos y con mayor proporción de células β (Lindström, 2007).

El síndrome *ob/ob* varía en función del background genético. En background C57BL/6J, el empleado en este trabajo, el fenotipo es menos agresivo que en otros

backgrounds. En un background 6J, los ratones presentan una hiperglucemia leve que desaparece con la edad, mientras que en otros backgrounds, los ratones son manifiestamente diabéticos (Lindström, 2010).

Los *ob/ob* no se diferencian de los ratones control al nacer, pero en tan sólo dos semanas de vida desarrollan hiperinsulinemia y presentan mayor peso. A las 4 semanas de edad son hiperglucémicos y los valores de glucosa plasmática siguen aumentando hasta alcanzar valores máximos en torno a los 3-5 meses. A partir de este momento, los niveles de glucosa plasmática disminuyen hasta alcanzar valores normales en individuos viejos.



OBJETIVOS



II. OBJETIVOS

La obesidad es uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de diabetes tipo II debido a la resistencia a la insulina característica del estado obeso. Actualmente existe una gran preocupación por el incremento desmesurado de las tasas de obesidad en los países desarrollados, atribuibles a un estilo de vida caracterizado por la mala alimentación y la baja actividad física que, cada vez más, se están instalando en nuestra sociedad.

En la mayoría de los casos de obesidad se produce una adaptación del páncreas que compensa los mayores requerimientos de insulina. No obstante, una parte considerable de los individuos obesos acaban desarrollando diabetes tipo II cuando el páncreas no es capaz de cumplir esos requerimientos. Puesto que la diabetes tipo II es, a día de hoy, una patología crónica, sería de gran importancia establecer qué procesos ocurren en el páncreas durante la etapa compensatoria, así como en la etapa inicial de disfunción, para tratar de desarrollar tratamientos más efectivos.

En este marco, son muchos los estudios que muestran que la adaptación del páncreas a esta situación de gran demanda se produce principalmente mediante modificaciones estructurales. En cambio, la atención que se ha prestado a la adaptación funcional es mucho menor. Aunque en los últimos años la gran plasticidad funcional de la célula β pancreática ha ganado mayor atención, se desconocen la mayoría de los procesos celulares que ocurren durante su adaptación.

Por ello, en la presente tesis el objetivo fue identificar qué procesos celulares implicados en la secreción de insulina se encuentran alterados en el estado prediabético asociado a la obesidad y contribuyen a la plasticidad funcional de la célula β en estas condiciones.



MATERIAL Y MÉTODOS

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Modelo animal de obesidad inducida por deficiencia de leptina: ratón *ob/ob*

Todos los procedimientos empleados en el presente trabajo fueron aprobados previamente por el Comité de Ética Animal de la UMH de acuerdo a la regulación nacional y europea vigente.

Se utilizaron ratones *ob/ob* hembra (background C57BL/6J) comprados a los Laboratorios Harlan (Barcelona, España) y, como control, se utilizaron hembras C57BL/6J de la misma edad proporcionadas por el Servicio de Experimentación Animal de la UMH (SEA-UMH). Los ratones *ob/ob* se adquirieron a edades tempranas (4-6 semanas) y se mantuvieron en el SEA-UMH hasta alcanzar la edad de 12 semanas (adulto), edad a la cual se realizaron todos los experimentos. Los animales se mantuvieron a 22°C con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas (de 8:00 a 20:00), con libre acceso a agua y dieta estándar. De forma puntual, para los experimentos de electrofisiología, los ratones se adquirieron de Janvier (Janvier Labs, Le Genest sur l'Isle, France).

3.2 Medidas plasmáticas y tests de tolerancia *in vivo*

Los niveles de glucosa plasmática se midieron con un glucómetro comercial (Accu-Chek) a partir de una pequeña muestra de sangre obtenida por amputación del extremo terminal de la cola del ratón. Los niveles de insulina plasmática se determinaron mediante un kit comercial de ELISA (Crystal Chemical), a partir de sangre obtenida por la cola del ratón. Para la determinación de insulina plasmática, la sangre obtenida se centrifugó durante 15min a 10.000 rpm y 4°C para separar la fase plasmática de la fase celular. El plasma obtenido se utilizó para cuantificar los niveles de insulina.

Para el test de tolerancia a glucosa, los animales fueron sometidos a ayuno durante las 12 horas previas a la realización del test. A cada ratón se le inyectó, vía intraperitoneal, una dosis de glucosa de 2g/kg. Antes de la inyección de glucosa, se determinó la glucosa plasmática y se extrajo sangre para la posterior determinación de insulina plasmática (tiempo 0). Tras la administración de la glucosa, se determinó la

glucosa plasmática en los tiempos 15, 30, 60, 90, 120 y 180 minutos. A los 30 min post-inyección también se recolectó sangre para la determinación de la concentración de insulina.

La sensibilidad a insulina se evaluó realizando un test de tolerancia a insulina, en el cual se aplicó 1IU/kg de insulina a los ratones en estado de alimentación. Durante el test se tomaron medidas de la glucemia plasmática en los tiempos 0, 15, 30, 45 y 60 min. De forma adicional, se calculó el índice HOMA-IR (modelo homeostático de evaluación de la resistencia a insulina). Dicho cálculo se realizó utilizando la siguiente fórmula: $[\text{Glucemia en ayunas (mg/dL)} * \text{Insulinemia en ayunas (mU/L)}] / 405$ (Xia et al., 2002; Konrad et al., 2007).

3.3 Aislamiento de islotes de Langerhans

Para obtener los islotes de Langerhans, los ratones se sacrificaron mediante dislocación cervical o decapitación y a continuación se practicó una incisión en el abdomen sin dañar los órganos. Se localizó el colédoco o conducto biliar común y se practicó una sutura en su parte distal, antes de su unión a la segunda porción del duodeno. Antes de unirse al duodeno, el colédoco se fusiona con el conducto pancreático principal; la sutura debe realizarse entre la unión del conducto pancreático y el biliar y entre la unión del conducto biliar y el duodeno, de forma que el conducto pancreático no quede obstruido, pero sí la conexión con el duodeno. Una vez asegurada la sutura, se realizó una pequeña incisión en el colédoco y, mediante una fina cánula, se introdujo una solución (composición del medio de aislamiento, en mM: 115 NaCl, 10 NaHCO₃, 5 KCl, 1.1 MgCl₂, 1.2 NaH₂PO₄, 25 HEPES, 2.5 CaCl₂, 0.25% BSA y 5 D-glucosa, pH 7.4) con 0.8mg/mL de colagenasa tipo V (Sigma, España). Con ayuda de una jeringa se introdujo solución hasta que, mediante inspección visual, se consideró que el páncreas se había llenado correctamente. A continuación, se extrajo rápidamente el páncreas, se introdujo en un tubo falcon, se recubrió con unos 4-5 mL de solución con colagenasa y se introdujo en un baño a 37°C, durante aproximadamente 10 minutos, para favorecer la digestión enzimática de la porción exocrina del páncreas. Transcurrido este tiempo, se completó la digestión mediante agitación, se añadió medio de aislamiento frío (sin colagenasa) y se mantuvo en hielo para detener la actividad de la

enzima. Posteriormente, los islotes fueron separados del tejido exocrino disgregado con ayuda de una micropipeta y visualización con lupa binocular (Zeiss, Alemania).

Los islotes, libres de tejido exocrino, se trasladaron a una placa Petri con medio de aislamiento y se dejaron recuperar durante 2 horas en un incubador (37°C, 5% CO₂) antes de su utilización en los experimentos pertinentes.

3.4 Cultivo primario de células aisladas

Para el cultivo de células aisladas de islote, una vez transcurrido el tiempo de recuperación, estos fueron transferidos a un tubo falcon de 15mL y centrifugados 10 minutos a 1000 rpm. A continuación se retiró el sobrenadante de medio de aislamiento y el pellet de células se resuspendió en 1mL de trispina 0.05% (Sigma, Madrid). Se introdujo el falcon en el incubador a 37°C durante 3 minutos, se completó la disgregación mecánicamente con una pipeta, se paró la reacción enzimática añadiendo 2-3mL de medio de cultivo (RPMI 1640 suplementado con 10% FBS, 0.1mg/ml estreptomycin, 100UI/ml penicilina y 11mM D-glucosa) y se centrifugó de nuevo el falcon 10 minutos a 1000 rpm. El pellet de células disgregadas se resuspendió en medio de cultivo y las células se sembraron en cubres de vidrio de 24 mm de diámetro pretratados con poli-L-lisina 0.01% (Sigma, Madrid).

Se introdujo el cultivo primario de células en el incubador (37°C, 5% CO₂) y se dejaron transcurrir 1-2 horas antes de añadir 1mL más de medio de cultivo, para facilitar el proceso de adherencia de las células a los cubres. Las células se introdujeron de nuevo en el incubador hasta el día siguiente.

3.5 Determinación de actividad mitocondrial mediante técnicas de fluorescencia

Como medida indirecta de la actividad mitocondrial se realizaron registros de fluorescencia de NAD(P)H. El NAD(P)⁺, en su forma oxidada, es un molécula poco fluorescente, pero en la forma reducida, NAD(P)H, aumenta su fluorescencia, por lo que se suele referir a la autofluorescencia de NAD(P)H. En la célula beta, la mayoría de la producción de NAD(P)H tiene lugar en la mitocondria como subproducto del metabolismo de la glucosa (Patterson et al., 2000), por lo que se monitorizó la

producción de NAD(P)H como medida indirecta de la actividad mitocondrial. Para ello, los islotes se colocaron, individualmente, en una cámara termostata a 37°C acoplada a un microscopio invertido de epifluorescencia (Axiovert 200; Zeiss, Jena, Germany) y fueron perfundidos con una solución con concentraciones crecientes de glucosa (composición de la solución de perfusión, en mM: 120 NaCl, 1.8 NaHCO₃, 5 KCl, 1.1 MgCl₂, 20 HEPES, 2.5 CaCl₂, pH 7.4; concentraciones de glucosa, en mM: 0.5, 3, 8, 11, 16, 22). Con este sistema, la señal de fluorescencia que se detecta es la fluorescencia cumulativa de varios planos focales del islote, por lo que la señal media corresponde fundamentalmente a la medida de la fluorescencia de las células beta, que son el tipo celular más abundante en el islote. Para la excitación de la muestra se utilizó un filtro de banda de 365nm y la emisión se filtró a 445±25 nm. El aumento gradual de la concentración de glucosa en la solución de perfusión produce incrementos graduales en la producción de NAD(P)H que se reflejan en incrementos de la señal de fluorescencia de forma escalonada. Con una velocidad de perfusión de 2.3mL/min, los islotes fueron sometidos a cada estímulo de glucosa durante 15min, tiempo necesario para alcanzar un aumento de fluorescencia estable en cada incremento de la concentración de glucosa. Al final de cada registro, se perfundió de nuevo la solución con concentración de glucosa basal (0.5mM) para comprobar que la señal de fluorescencia volvía a los valores iniciales. Las imágenes de fluorescencia fueron tomadas a intervalos de 60 segundos. De forma adicional, también se monitorizó la producción de NAD(P)H en células aisladas. Para ello, se utilizaron cultivos primarios de células de islote disgregado mediante digestión con tripsina (ver apartado 3.4). Antes de iniciar los registros, los cubres con la células se preincubaron durante 15 minutos con la solución de perfusión 0mM glucosa para llevar la señal de fluorescencia a niveles basales, puesto que el medio de cultivo contenía 11mM glucosa. Tras esta preincubación, las células fueron perfundidas durante 10 min con cada concentración de glucosa (0, 5.6 y 22mM glucosa). Los registros de fluorescencia se representaron como el incremento de fluorescencia porcentual respecto a la fluorescencia a niveles basales de glucosa ($F(\%) = 100 \cdot [F - F_{\min}] / F_{\min}$) independientemente de la fluorescencia máxima alcanzada, o como el incremento de fluorescencia porcentual comprendido entre 0 y 100% para cada uno de los grupos ($F(\%) = 100 \cdot [F - F_{\min}] / [F_{\max} - F_{\min}]$).

También se monitorizaron cambios en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$). El ψ_m depende del metabolismo de la glucosa; concentraciones crecientes de

glucosa llevan a una hiperpolarización de la membrana mitocondrial debido al transporte de protones en la cadena electrónica desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana. Para llevar a cabo estas determinaciones, los islotes se cargaron durante 10 min con rhodamine-123 (Rhod-123) a una concentración de 10 μM . Rhod-123 es una sonda fluorescente lipofílica que se intercala en la membrana mitocondrial de forma dependiente del potencial. Cuando la membrana mitocondrial se hiperpolariza, la sonda se intercala en la membrana y las moléculas de Rhod-123 se agregan generando un proceso de *quenching*. La despolarización de la membrana mitocondrial permite la redistribución de la sonda al citosol y la recuperación de la señal de fluorescencia (Zhou et al., 2000).

Los experimentos se realizaron en el sistema descrito para los experimentos de autofluorescencia de NAD(P)H, pero usando un filtro de banda de 480 nm y filtro de emisión a 520 ± 25 nm. Las imágenes se tomaron cada 30 segundos. Los registros se representaron de forma análoga a los anteriores experimentos.

3.6 Registros de electrofisiología

Los registros de electrofisiología se realizaron en células β superficiales de islotes intactos y se utilizó un sistema compuesto por un amplificador HEKA EPC-10 USB con una interfaz LIH 8+8 AD/DA integrada (HEKA Elektronik, Alemania) que permite un control digital de los componentes y procesos a través del software Patchmaster (HEKA Elektronik, Alemania). Los islotes intactos fueron sujetados mediante ligera succión aplicada al interior de una pipeta *holding* de amplio calibre, como ya ha sido descrito previamente (Göpel et al., 1999).

Para los registros de potencial de membrana se usó la configuración de parche perforado (*perforated-patch*) (Gonzalez et al., 2013). La solución de la pipeta fue la siguiente (mM): 76 K_2SO_4 , 10 NaCl, 10 KCl, 1 MgCl_2 , 5 HEPES (pH=7.35), y 0.24 mg/mL de anfotericina B. La solución del baño fue la siguiente (mM): 140 NaCl, 3.6 KCl, 1.5 CaCl_2 , 5 NaHCO_3 , 0.5 MgSO_4 , 0.5 NaH_2PO_4 , 10 HEPES (pH=7.4) y diferentes concentraciones de D-glucosa.

Los experimentos de excitotoxicidad fueron realizados usando la configuración *whole-cell* y los registros de capacitancia de membrana (C_m) se realizaron con la técnica

de fijación de voltaje con electrodo único en la configuración de *whole-cell* estándar. La monitorización de las variaciones de C_m se realizó gracias al modo *sine+DC* de la extensión *LockIn* implementada en el *software* del amplificador (Gonzalez et al., 2013). Para estos experimentos, la solución de la pipeta contenía (mM): 140 CsCl, 10 NaCl, 1 MgCl₂, 0.05 EGTA, 3 Mg-ATP, 0.1 cAMP y 5 HEPES (pH=7.2), mientras que la solución del baño contenía (mM): 118 NaCl, 5.6 KCl, 20 tetraetilamonio-Cl, 1.2 MgCl₂, 5 CaCl₂, 5 HEPES y 5 de D-glucosa (pH=7.4).

Sólo fueron utilizados los experimentos con resistencias en serie y corrientes *leak* estables y bajas, así como resistencias de sello altas (>3 MΩ). Todos los experimentos fueron realizados a temperatura fisiológica (34-36°C). Las células β fueron funcionalmente identificadas por su capacidad para generar un patrón oscilatorio característico de actividad eléctrica en presencia de glucosa y por la inactivación de las corrientes de Na⁺ en estado estacionario (Göpel et al., 1999; Göpel et al., 2000; Gonzalez et al. 2013).

3.7 Monitorización de la señalización de calcio intracelular

Para el estudio de la variación de la concentración intracelular de calcio se usaron islotes intactos. Los islotes aislados se dejaron recuperar un mínimo de 2h en medio de aislamiento en el incubador. Tras la recuperación, los islotes fueron cargados, durante un mínimo de 1h, a temperatura ambiente, en condiciones de humedad y gaseados con carbógeno (95% O₂ – 5% CO₂), con la sonda fluorescente de calcio Fura-2 en su forma acetoximetiléster (AM) (2μM) (Molecular Probes, Holanda). Durante la incubación, esta sonda, en su forma lipofílica esterificada, atraviesa la membrana celular. Una vez dentro de la célula, las esterasas celulares hidrolizan los grupos AM de la sonda, quedando ésta retenida en el citoplasma.

La medida de calcio intracelular se llevó a cabo en el mismo microscopio descrito en el apartado 3.5, pero se usaron filtros de banda de excitación de 360 y 380nm. La fluorescencia emitida tras la excitación a estas dos longitudes de onda fue recogida usando un filtro de 510 nm. Las imágenes fueron tomadas a intervalos de 3 segundos. Los registros de fluorescencia se expresaron como la razón 360/380.

Los cambios en la señalización intracelular de Ca^{2+} se analizaron de la siguiente forma. Como medida de la cantidad total de calcio se calculó el área bajo la curva (AUC, *area under the curve*) en los últimos 5 minutos de cada estímulo. Para cambios transitorios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se extrajo la fluorescencia basal de la fluorescencia máxima y se expresó como el incremento de fluorescencia ($\Delta F(F-F_0)$).

Para el análisis de la sincronía de las células β se monitorizó la señal de Ca^{2+} en células individuales de islotes intactos, con la sonda fluorescente Fluo-4, en un microscopio confocal de fluorescencia (Zeiss LSM510 laser). Mediante el microscopio confocal se seleccionó una sección óptica de $9\mu\text{m}$ próxima al plano ecuatorial de cada islote. Los islotes se cargaron con $2\mu\text{m}$ Fluo-4 durante, al menos, 1 hora. La sonda se estimuló mediante un láser de 488nm y la señal de emisión se recogió con un filtro de banda de 505-530 nm.

3.8 Secreción *ex vivo* y contenido de insulina

Tras el aislamiento, los islotes se recuperaron 2h en el incubador a 37°C y 5% CO_2 . A continuación se hicieron grupos homogéneos de 5 islotes y se transfirieron a pocillos con $400\mu\text{L}$ de medio de secreción (en mM: 140 NaCl, 4.5 KCl, 2.5 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 20 HEPES; pH = 7.4) con los diferentes estímulos de glucosa. Después de 1h de incubación con los estímulos, se añadieron a cada pocillo $100\mu\text{L}$ de la misma solución de secreción suplementada con un 5% de BSA, se incubó la placa a temperatura ambiente durante 3 min y después se detuvo la secreción depositando las placas durante 15min sobre hielo. Se recogió el medio de cada pocillo y se guardó a -80°C hasta la determinación de la concentración de insulina liberada por los islotes mediante un kit de radioinmunoensayo (Coat-A-Count, Siemens). Los islotes se recogieron y transfirieron a una solución de etanol/HCl para promover su lisis. El sobrenadante resultante se usó para determinar el contenido de insulina en los islotes de cada grupo. De esta manera, se pudo expresar la secreción de insulina normalizada por el contenido.

Para cuantificar el contenido de insulina en un experimento independiente del anterior, se hicieron grupos homogéneos de 5 islotes, al igual que para los experimentos de secreción, pero estos islotes no fueron estimulados con las diferentes concentraciones

de glucosa, sino que permanecieron todo el tiempo de recuperación a una concentración de 5.6mM glucosa. Los islotes fueron lisados con un tampón HCl/etanol y se mantuvieron *overnight* en agitación a 4°C. Posteriormente, se centrifugaron a 12.000rpm durante 15 minutos y 4°C para lisar mecánicamente las estructuras celulares que no habían sido lisadas con el tampón. El sobrenadante resultante se utilizó para cuantificar el contenido en insulina mediante radioinmunoensayo (RIA Coat-A-Count, Siemens), utilizando una dilución 1:1000. Los datos de contenido de insulina se relativizaron por la proteína total de los islotes, determinada mediante un ensayo de Bradford.

3.9 Expresión proteica: *Western Blot*

Se extrajo proteína de grupos de 200-300 islotes, de animales en condiciones de alimentación. Los islotes se lisaron con un tampón de lisis comercial (Cell Lysis Buffer, Cell Signaling Technology, Danvers, MA) y las proteínas se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida 4-20% (Mini Protean Gel, BioRad). Posteriormente, las proteínas se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) mediante transferencia semi seca con el Trans Blot Turbo (BioRad). La membrana se bloqueó con leche al 5% y posteriormente se procedió a la incubación con los anticuerpos de las proteínas a detectar, producidos en conejo: anticuerpo policlonal anti-conexina36 (1:1000; Invitrogen) y anticuerpo monoclonal anti- β -Tubulina (1:1000; Cell Signaling). La β -Tubulina se utilizó como control de referencia. La visualización de las bandas de proteína se realizó mediante la incubación con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa, adición del sustrato SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher) y detección de la quimioluminiscencia resultante en el sistema Chemi Doc MP System (BioRad). La intensidad de las bandas se cuantificó con el programa Image Lab 4.1 TM Software (BioRad). La expresión de la proteína de interés, Conexina36, se relativizó en cada caso por la expresión de β -Tubulina.

3.10 Expresión génica: PCR cuantitativa a tiempo real

Se extrajo RNA total de grupos de 300-400 islotes, de animales en condiciones de alimentación, con el kit RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen). La concentración de RNA se determinó mediante espectrofotometría (NanoDrop 2000, Thermo Scientific) y se sintetizó cDNA a partir de 500ng de RNA total usando el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Las reacciones de PCR cuantitativa a tiempo real se llevaron a cabo en un termociclador CFX96 Real Time System (Bio-Rad, Hercules, California). La reacción de PCR se realizó en un volumen total de 10µL, utilizando 200nM de cada primer, 1µL de cDNA y 1X de TM SYBR®Green supermix (Bio-Rad). El protocolo de temperaturas empleado se muestra en la Figura 8.

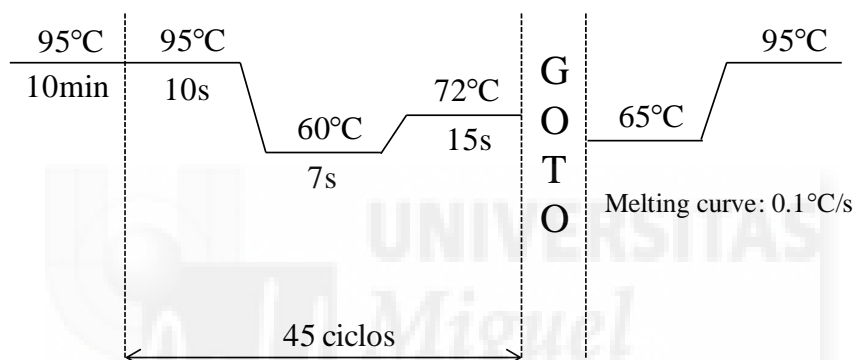


Figura 8: Programa de temperaturas de PCR cuantitativa

Los valores de fluorescencia obtenidos fueron analizados con el software CFX Manager, versión 1.6 (Bio-Rad), y los niveles de expresión se calcularon mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. La expresión de los genes de interés se relativizó a los niveles de expresión del gen de expresión constitutiva *GAPDH* (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa). En la Tabla 1 se muestran las secuencias de los cebadores utilizados.

	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'
<i>GAPDH</i>	CCTGCACCACCAACTGCTTAG	GCCCCACGGCCATCACGCCA
<i>Insulin</i>	AGCAGGAAGGTTATTGTTTC	ACATGGGTGTGTAGAAGAAG
<i>Glucagon</i>	GGCTCCTTCTCTGACGAGATGAGCAC	CTGGCACGAGATGTTGTGAAGATGG
<i>GLUT2</i>	GGAAGAGGCATCGACTGAGCAG	GCCTTCTCCACAAGCAGCACAG
<i>Glucokinase</i>	GAAGCACACTCAGGTCTTGCTC	AAAACAGCCAGGTCTGGGCAGC
<i>Connexin36</i>	ACCATCTTGAGAGGCTGCTGGA	ATCTTCTCGTTTGCTCCCTCCGC
<i>TRPM5</i>	CAAATCCCTCTGGATGAAATTGATG	CCAGCCAGTTGGCATAGA

Tabla 1: Secuencia de los primers utilizados para qPCR.

3.11 Análisis estadístico

Los datos se muestran como la media \pm error estándar, a menos que se indique otra cosa. Se consideró que había diferencias estadísticamente significativas cuando se obtuvo un valor de $p \leq 0.05$ al realizar una prueba t de Student. Los valores de significancia estadística se indican de la siguiente forma: *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$; ***, $p \leq 0.001$.



RESULTADOS

UNIVERSITAS
*Miguel
Hernández*

IV. RESULTADOS

4.1 Caracterización fenotípica del modelo animal. Los ratones *ob/ob* presentan intolerancia a glucosa y resistencia a insulina

A la edad adulta de 12 semanas, las hembras *ob/ob* presentaron un marcado aumento del peso corporal (Figura 9A), con un valor promedio de 40.8 ± 0.4 g, frente a los 20.7 ± 0.2 g en los ratones control (Figura 9B). También presentaron hiperglucemia tanto en estado de alimentación (*fed*) como tras 12 horas de ayuno (*fasted*) (Figura 9C).

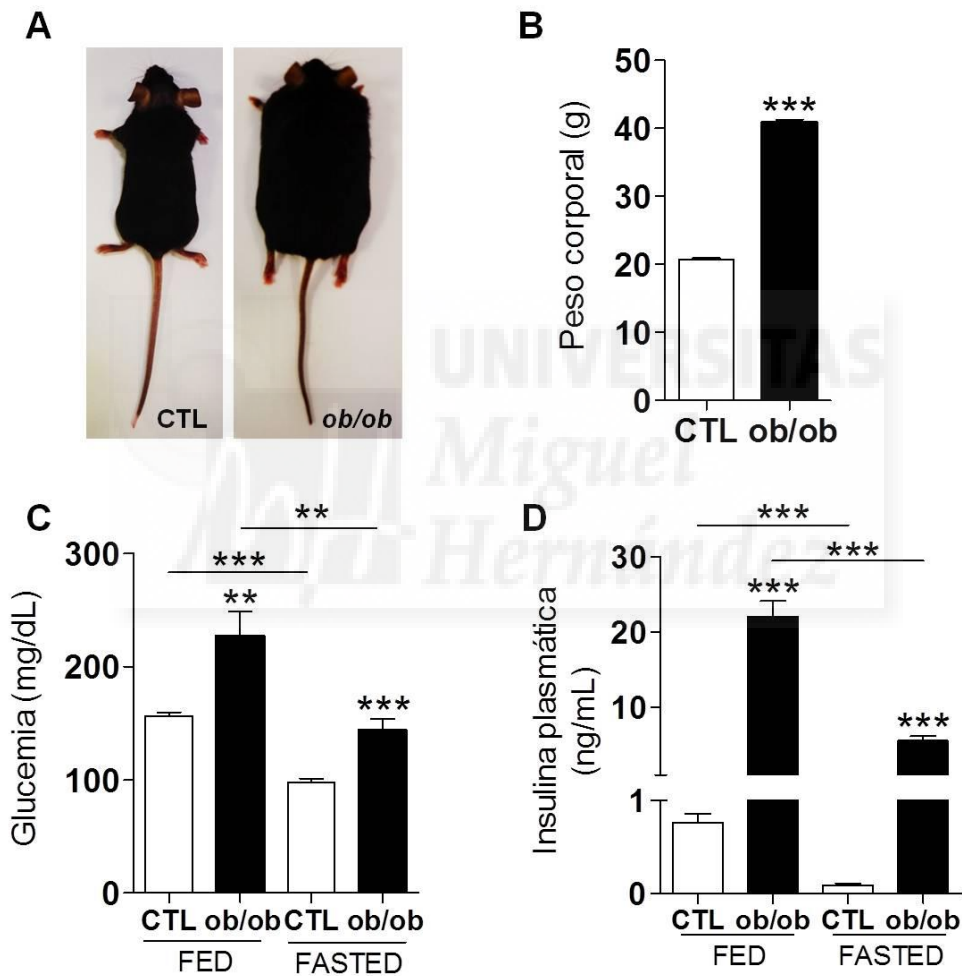


Figura 9. Caracterización fenotípica. A, Fotografías de ratones de los dos grupos de estudio, CTL y *ob/ob*, a las 12 semanas de edad. B, Peso corporal promedio (CTL, n=35; *ob/ob*, n=28). C, Glucosa plasmática promedio en condiciones de alimentación (*fed*; CTL, n=26; *ob/ob*, n=23) y tras 12 horas ayuno (*fasted*; CTL, n=20; *ob/ob*, n=18). D, Insulina plasmática promedio en condiciones de alimentación (*fed*; CTL, n=13; *ob/ob*, n=11) y tras 12 horas ayuno (*fasted*; CTL, n=8; *ob/ob*, n=7).

Con el fin de averiguar a qué puede ser debida la hiperglucemia de los ratones obesos, se determinó la concentración plasmática de insulina, tanto en condiciones de alimentación como de ayunas. Así, en la Figura 9D se observa una marcada hiperinsulinemia en los ratones obesos en los dos estados (*fed* y *fasted*). A pesar de la elevada cantidad de insulina plasmática presente en los ratones obesos, estos presentaron niveles plasmáticos de glucemia aumentados respecto a los controles.

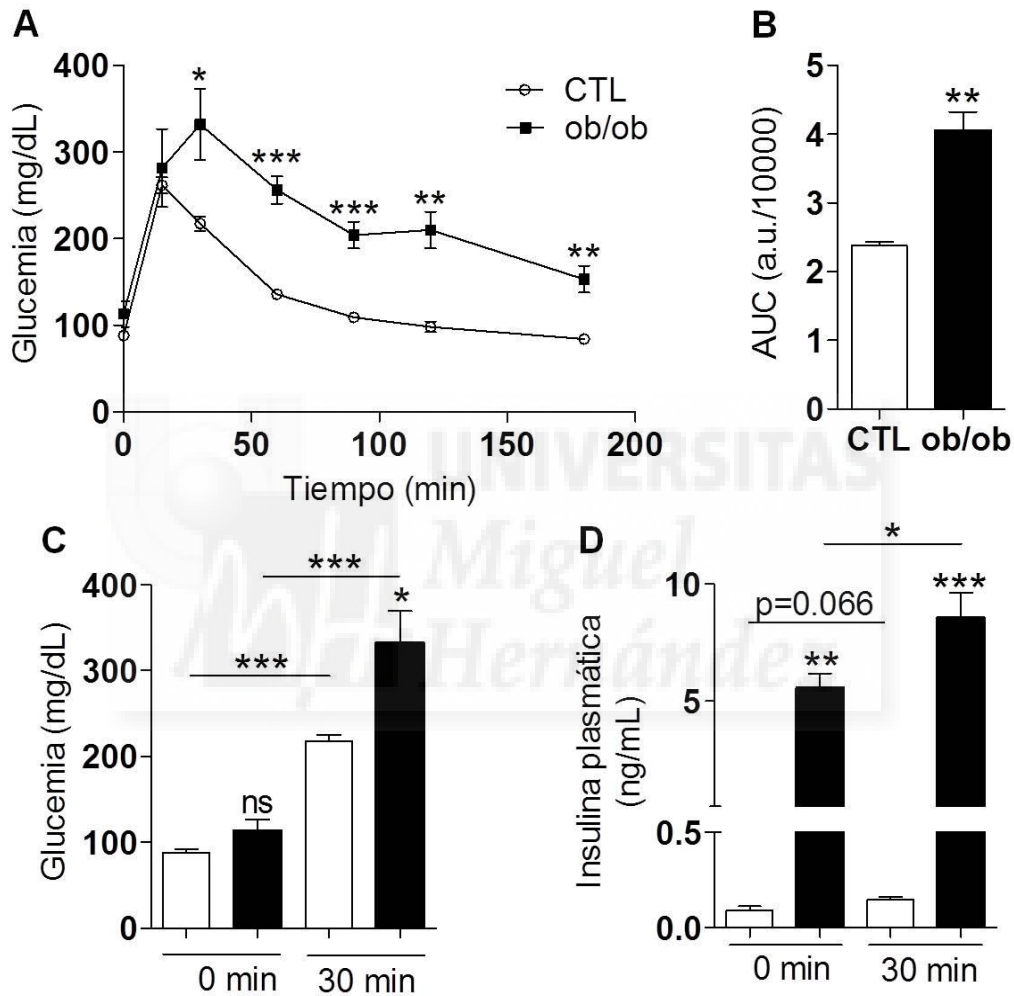


Figura 10. Homeostasis de la glucosa I: tolerancia a la glucosa. A, Evolución de la glucosa plasmática en un test de tolerancia a glucosa. Las medidas fueron tomadas a tiempo 0, 15, 30, 60, 90, 120 y 180 minutos tras la aplicación de una dosis de glucosa de 2g/kg (CTL, n=8; *ob/ob*, n=7). B, Área bajo la curva del experimento en A. C, Valores promedio de las glucemias en ayunas (t=0), inmediatamente antes de la inyección de glucosa, y después de 30 minutos (CTL, n=8; *ob/ob*, n=7). D, Valores promedio de la concentración de insulina plasmática inmediatamente antes y 30 minutos después de la inyección de glucosa (CTL, n=8; *ob/ob*, n=7).

También se realizaron pruebas de tolerancia a glucosa con el fin de determinar de una forma más dinámica las alteraciones en la homeostasis de la glucosa. Por una parte, se realizó un test de tolerancia a glucosa en el que, tras 12 horas de ayuno, se administró a los ratones, vía intraperitoneal, una carga de glucosa de 2g/kg y se determinó la concentración de glucosa plasmática a diferentes tiempos (t=0, 15, 30, 60, 90, 120 y 180 minutos) (Figura 10A). Se observó que los ratones obesos presentan una marcada intolerancia a la glucosa puesto que, incluso después de 180 min tras la inyección de glucosa, no son capaces de normalizar la glucemia a niveles basales y el área bajo la curva es prácticamente el doble que la de los ratones control (Figura 10B). En la Figura 10C se muestra que a los 30 minutos los ratones *ob/ob* presentan una glucemia mucho mayor que los controles. Además, en los ratones control la glucemia ya ha empezado a descender respecto al punto anterior, por mediación de la acción de la insulina; en cambio, en los *ob/ob* la glucemia sigue aumentando (Figura 10A). De forma adicional, también se tomaron muestras de sangre a t=0 y t=30 para determinar la concentración de insulina plasmática en respuesta a la inyección de glucosa (Figura 10D). En este caso se observa que, aunque a los 30min los *ob/ob* presentan una insulinemia mayor que a t=0, dicha insulina no es capaz de regular los niveles de glucemia, que siguen aumentando en este punto y cuya disminución no se observa hasta la medición a 60min. Es decir, que, a pesar de que no parecen mostrar una deficiencia en la secreción de insulina estimulada por glucosa, no son capaces de regular correctamente los niveles glucémicos.

Por otra parte, se realizó un test de tolerancia a insulina para evaluar la sensibilidad a dicha hormona (Figura 11).

Dicho test mostró que los ratones obesos presentan una elevada resistencia a la insulina. Como puede verse en la Figura 11A, tras la aplicación de la dosis de insulina, la glucemia plasmática de los ratones control disminuyó considerablemente mientras que en los ratones obesos el descenso de la glucemia fue mucho menor. El menor descenso de la glucemia en los ratones obesos, en combinación con una mayor glucemia a t=0 (Figura 11C), implica niveles mayores de glucosa plasmática total a lo largo de todo el experimento, reflejado por el área bajo la curva (Figura 11B).

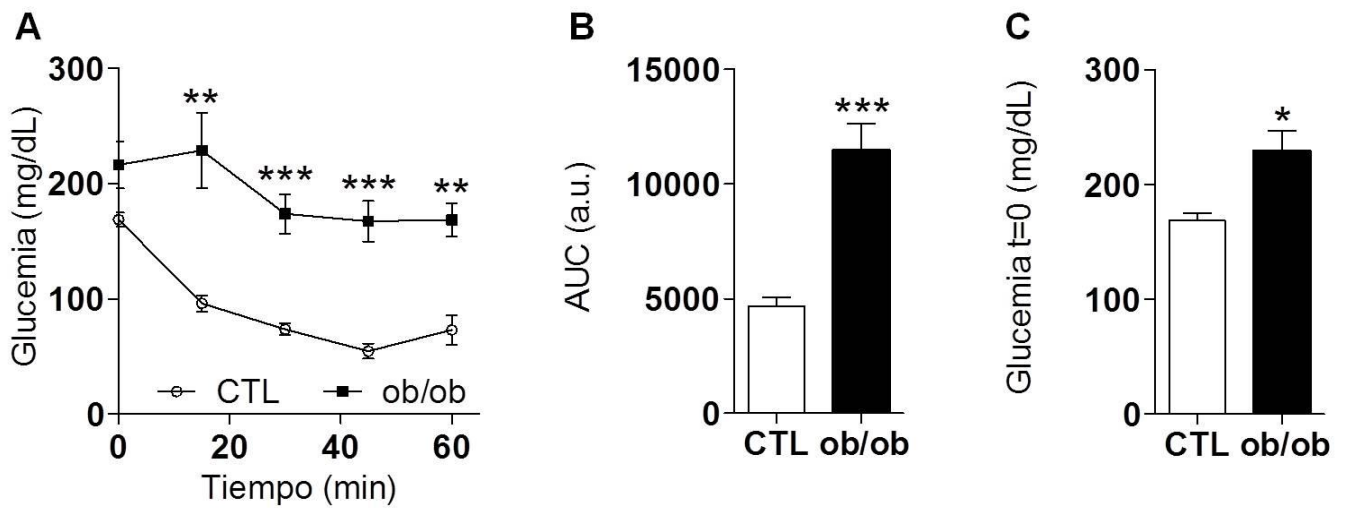


Figura 11. Homeostasis de la glucosa II: sensibilidad a la insulina. A, Evolución de la glucosa plasmática. Las medidas fueron tomadas a tiempo 0, 15, 30, 45 y 60 minutos tras la aplicación de una dosis de insulina de 1IU/kg (n=8 en ambos grupos experimentales). B, Área bajo la curva del experimento en (A). C, Valores promedio de las glucemias a t=0, antes de la inyección de insulina, en estado de alimentación.

Adicionalmente, como medida de la resistencia a insulina se calculó el índice HOMA-IR. Como puede observarse en la Figura 12, los ratones obesos presentan una marcada resistencia a la insulina.

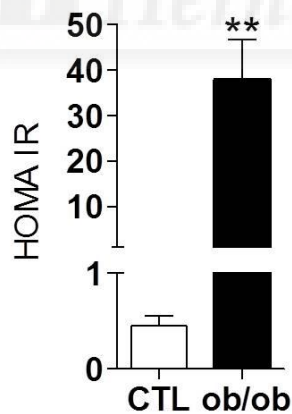


Figura 12. HOMA-IR. Índice de resistencia a insulina en ratones CTL (n=8) y *ob/ob* (n=6).

4.2 La función mitocondrial está aumentada en los islotes de *ob/ob*

El metabolismo de la glucosa en la célula genera NAD(P)H como subproducto tanto de la glucólisis, en el citoplasma, como del ciclo de Krebs, en la mitocondria. En la célula β , la mayor parte de la producción de NAD(P)H tiene lugar en las mitocondrias, por lo que se monitorizó la producción de NAD(P)H en respuesta a glucosa como medida indirecta de la actividad mitocondrial.

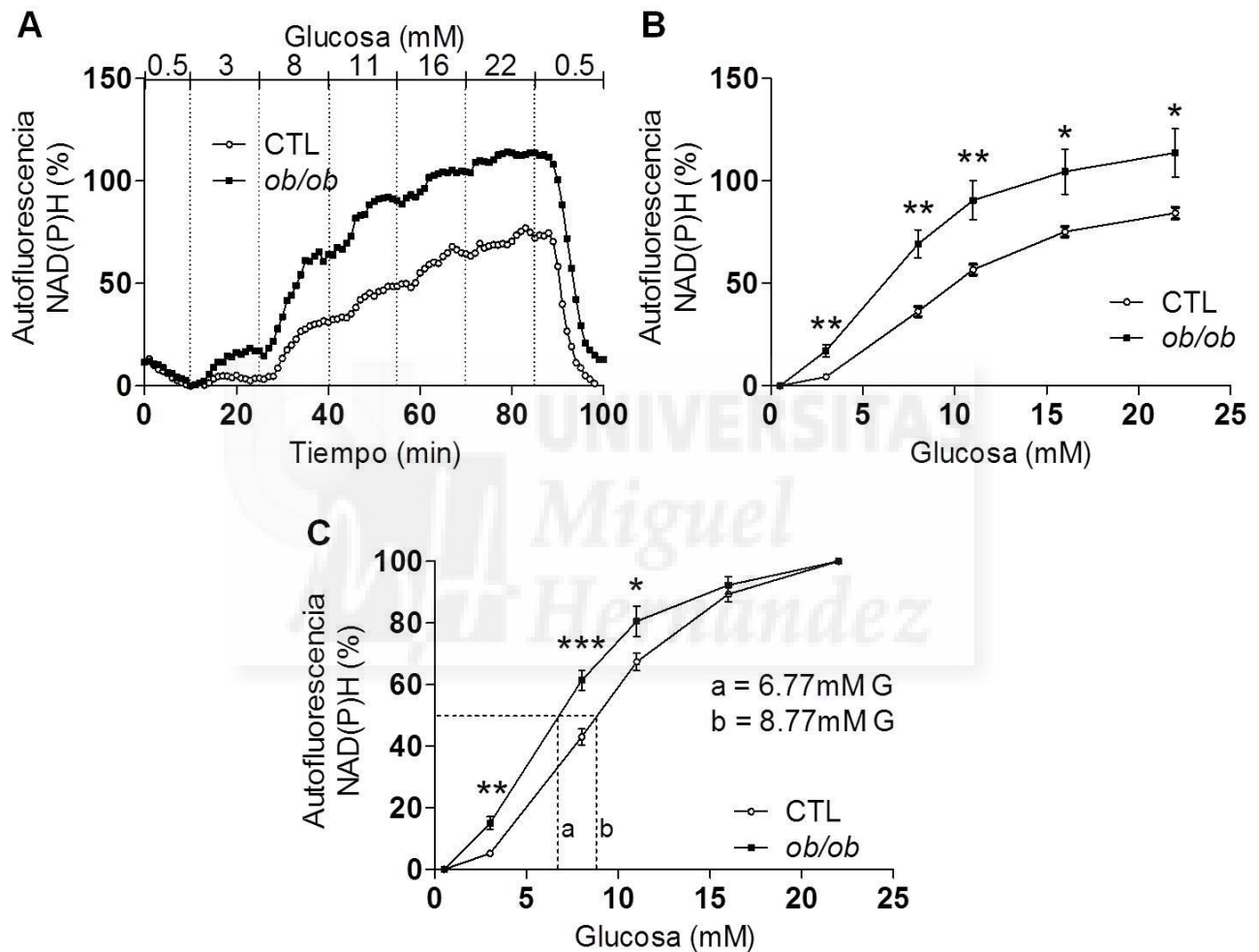


Figura 13. Metabolismo mitocondrial I: producción de NAD(P)H en islotes intactos. A, Dinámica de la variación de los valores promedio de autofluorescencia de NAD(P)H (normalizada por la fluorescencia basal a 0.5mM glucosa) en islotes de ratones CTL (n=6) y *ob/ob* (n=6). B, Valores promedio de fluorescencia de NAD(P)H (%) en cada concentración de glucosa. C, Fluorescencia de NAD(P)H normalizada de 0 a 100%.

En la Figura 13 puede observarse que concentraciones crecientes de glucosa producen incrementos escalonados en la fluorescencia de NAD(P)H. Con cada incremento en la concentración de glucosa, la fluorescencia aumenta siguiendo una

función sigmoidea hasta alcanzar un *plateau*, punto en el que el mecanismo celular encargado de metabolizar la glucosa se satura para determinada concentración de glucosa. El análisis de la producción de NAD(P)H en islotes de ratones CTL y *ob/ob* mostró que los islotes de los ratones obesos producen mayor cantidad de NAD(P)H que los de los ratones CTL.

En la Figura 13A se muestra el promedio de la evolución de la fluorescencia en cada grupo, en función del tiempo y en respuesta a glucosa, y se observa que, desde las concentraciones más bajas, los islotes de los ratones obesos responden a cada concentración del estímulo con mayores incrementos de la fluorescencia que los islotes de los ratones CTL. En la Figura 13B se representan los datos de forma simplificada, en función de la concentración de glucosa, donde se tomó como referencia el valor de fluorescencia alcanzado en el *plateau* de cada estímulo. Para cada concentración de glucosa se ve un claro aumento de la fluorescencia en los islotes de *ob/ob*.

En la figura 13C los datos anteriores se expresaron como incrementos porcentuales de fluorescencia comprendidos entre la fluorescencia basal (0%) y la fluorescencia máxima (100%) en cada grupo experimental. Los islotes de *ob/ob* mostraron una mayor sensibilidad a glucosa, puesto que a una concentración de 6.77mM alcanzaron la mitad de la fluorescencia máxima, valor que los islotes de CTL no alcanzaron hasta una concentración promedio de glucosa de 8.77mM.

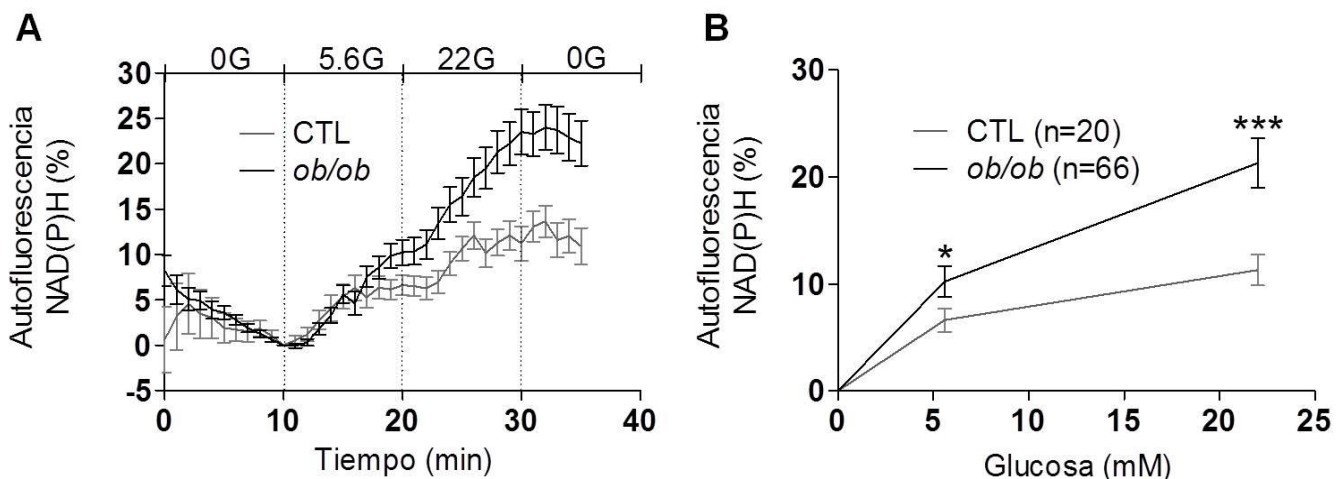


Figura 14. Metabolismo mitocondrial II: producción de NAD(P)H en células aisladas. A, Valores promedio de autofluorescencia de NAD(P)H (normalizada por la fluorescencia basal a 0.5mM glucosa) en células aisladas de islotes de CTL (n=20 células) y *ob/ob* (n=66 células). B, Valores promedio de fluorescencia de NAD(P)H (%) en cada concentración de glucosa.

Posteriormente se evaluó la autofluorescencia de NAD(P)H en cultivos primarios de células aisladas de islote para evaluar si el efecto observado en islotes de *ob/ob* se debe sólo al mayor tamaño y mayor número de células β de los mismos, es decir, a la adaptación estructural de los islotes, o si también ocurre una adaptación a nivel funcional a nivel de célula individual. Las Figuras 14A y 14B muestran que las células aisladas de islotes de *ob/ob* efectivamente presentan una mayor producción de NAD(P)H dependiente de glucosa.

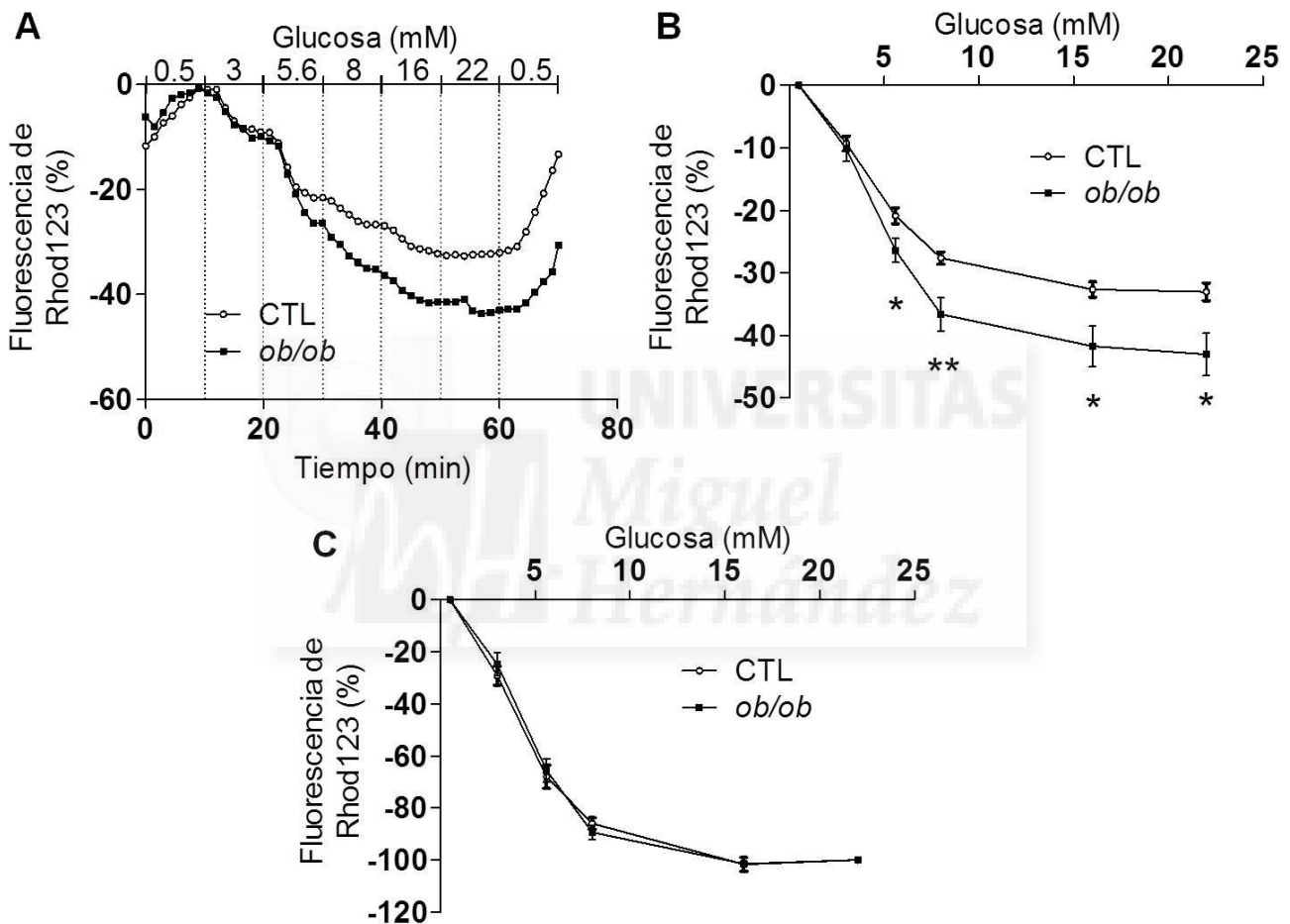


Figura 15. Metabolismo mitocondrial III: potencial de membrana mitocondrial en islotes intactos. A, Valores promedio de fluorescencia de Rhod123 (normalizada por la fluorescencia basal a 0.5mM glucosa) en islotes de ratones CTL (n=8) y *ob/ob* (n=9). B, Valores promedio de fluorescencia de Rhod123 (%) en cada concentración de glucosa. C, Fluorescencia de Rhod123 normalizada de 0 a 100%

El NAD(P)H producido en las mitocondrias como subproducto del metabolismo del piruvato en el ciclo de Krebs cede electrones a la cadena de transporte electrónico de la membrana mitocondrial, lo que genera cambios en el potencial de dicha membrana.

Así, al aumentar la concentración de glucosa, se observa una hiperpolarización de la membrana mitocondrial. Aprovechando la capacidad de la sonda fluorimétrica Rhod123 de intercalarse en las membranas mitocondriales de forma dependiente de potencial, se realizó un experimento para evaluar, de forma dinámica, los cambios en el potencial de membrana mitocondrial en respuesta a glucosa en islotes. En la Figura 15A se muestra cómo al aumentar la concentración de glucosa la fluorescencia de Rhod123 va disminuyendo de forma escalonada y cómo dicha fluorescencia es recuperada al volver a exponer los islotes a bajas concentraciones de glucosa. Cuando se comparó la dinámica de ambos grupos de islotes se observó que los islotes de los ratones obesos muestran una mayor disminución de la fluorescencia de Rhod123, lo que es indicativo de una mayor hiperpolarización de la membrana mitocondrial y, por ende, de una mayor actividad mitocondrial (Figuras 15A y 15B).

A pesar de que los datos de potencial de membrana mitocondrial respaldan los resultados de fluorescencia de NAD(P)H en cuanto a una mayor actividad de las mitocondrias en *ob/ob*, no se encontraron diferencias en la concentración de glucosa a la que se da el 50% de la variación en el ψ_m (Figura 15C).

4.3 Las células β de *ob/ob* presentan alteraciones del potencial de membrana

Los siguientes experimentos se realizaron usando la técnica de parche perforado (*perforated patch clamp*) en células β de islotes intactos, para así mantener unas condiciones lo más similares posible al contexto fisiológico (Göpel et al., 1999; Göpel et al., 2000; Göpel et al., 2004).

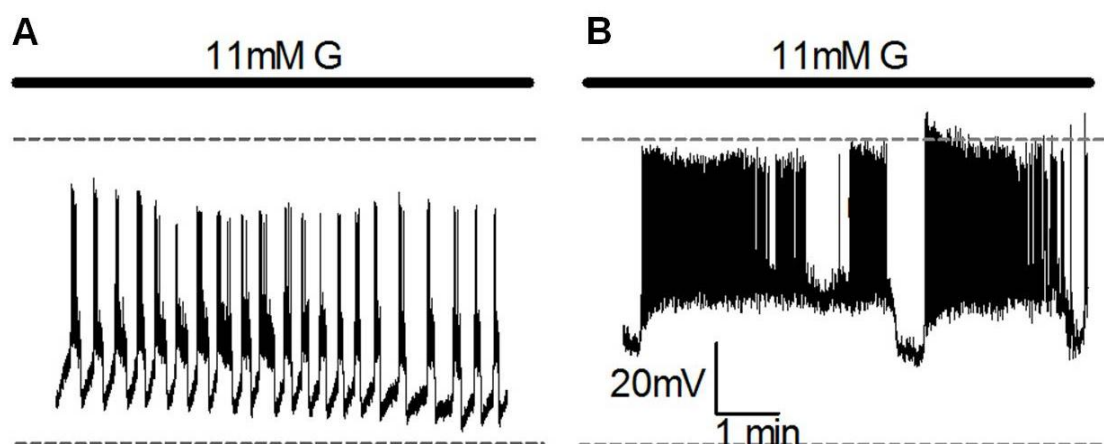


Figura 16. Potencial de membrana. Registros representativos de cambios en el potencial de membrana de células beta en islotes de CTL (A, n=6) y *ob/ob* (B, n=6) en respuesta a glucosa 11mM. La línea discontinua superior indica 0mV; la inferior, -80mV.

En comparación con las oscilaciones características del potencial de membrana en respuesta a glucosa 11mM en células de control (Figura 16A), las células β de *ob/ob* presentaron un perfil diferente (Figura 16B). En las células β de los ratones obesos la frecuencia de disparo durante una ráfaga (*burst*) es mayor que en las de los ratones control (Figura 17A). Al mismo tiempo, también se observó una mayor duración de la ráfaga (Figura 17B) y de la fase silente entre ráfagas (Figura 17C).

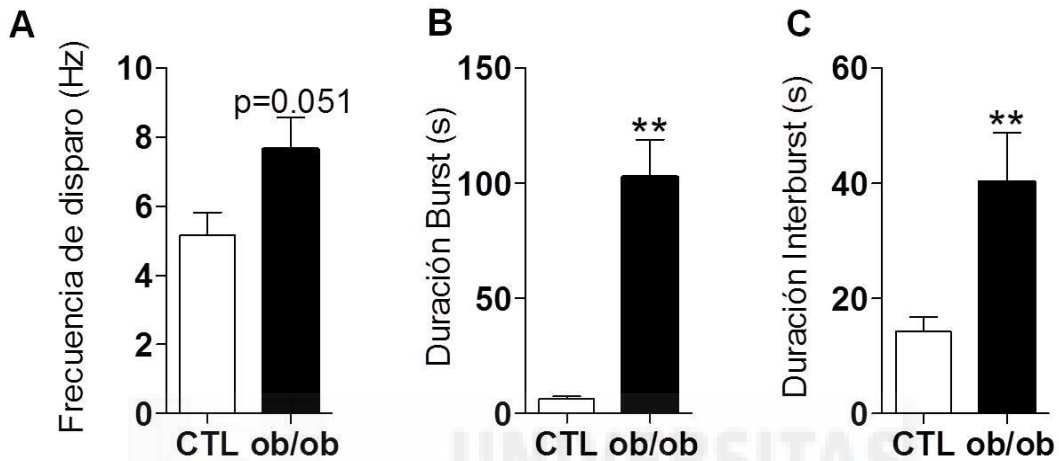


Figura 17. Análisis de los parámetros del potencial de membrana I. Frecuencia de disparo (A), duración del *burst* (B) y duración del *interburst* (C) de los experimentos representados en la Figura 8.

Un análisis más pormenorizado de los registros mostrados en la Figura 18 permitió comparar otras características del potencial de membrana. En las células β de los ratones obesos el *burst* es iniciado a potenciales menos negativos (CTL, -71.7 ± 1.9 mV; *ob/ob*, -57.2 ± 2.7 mV) (Figura 19A), los potenciales de acción comienzan a potenciales más despolarizados (CTL, -47.5 ± 2.2 mV; *ob/ob*, -39.8 ± 1.8 mV) (Figura 19B) y los picos alcanzan potenciales menos negativos (CTL, -24.1 ± 2.9 mV; *ob/ob*, -12.1 ± 2.2 mV) (Figura 19C). Como se discutirá más adelante, estas diferencias en la actividad eléctrica, especialmente la mayor frecuencia de disparo y la mayor duración del *burst*, deberían tener un impacto en la señalización de Ca^{2+} , puesto que los potenciales de acción en las células β de ratón son mediados principalmente por canales de Ca^{2+} (Göpel et al., 1999; Rorsman y Braun, 2013).

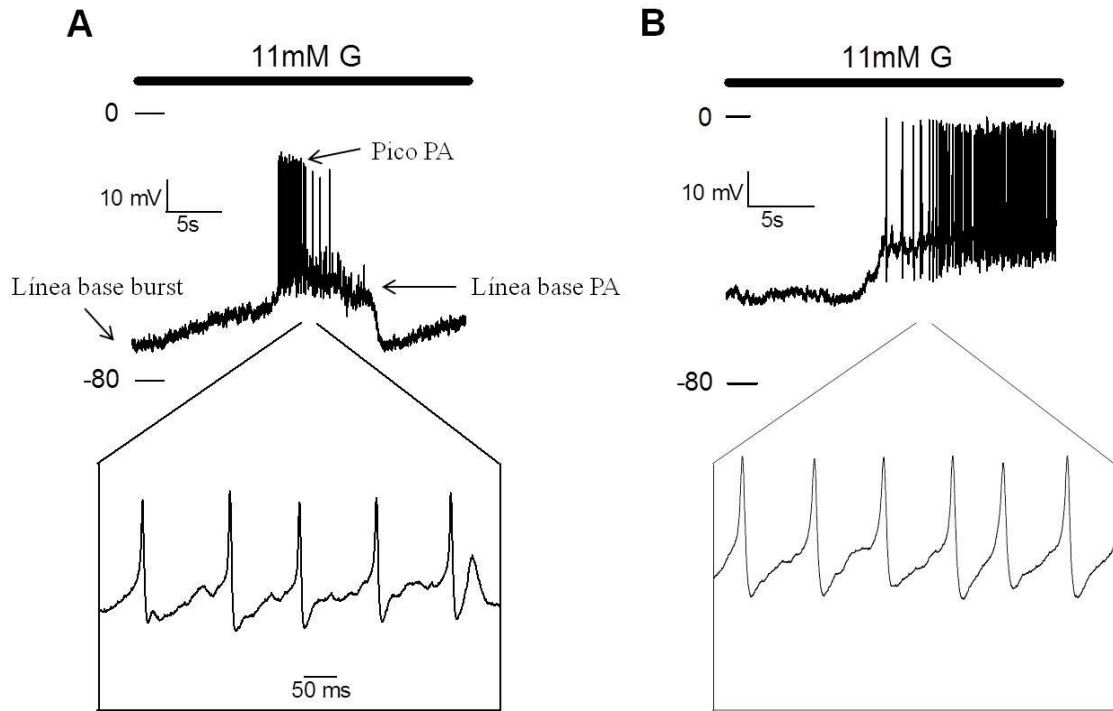


Figura 18. Detalle del potencial de membrana. Ampliación de un fragmento representativo de los registros de la Figura 8. A, Control; B, *ob/ob*.

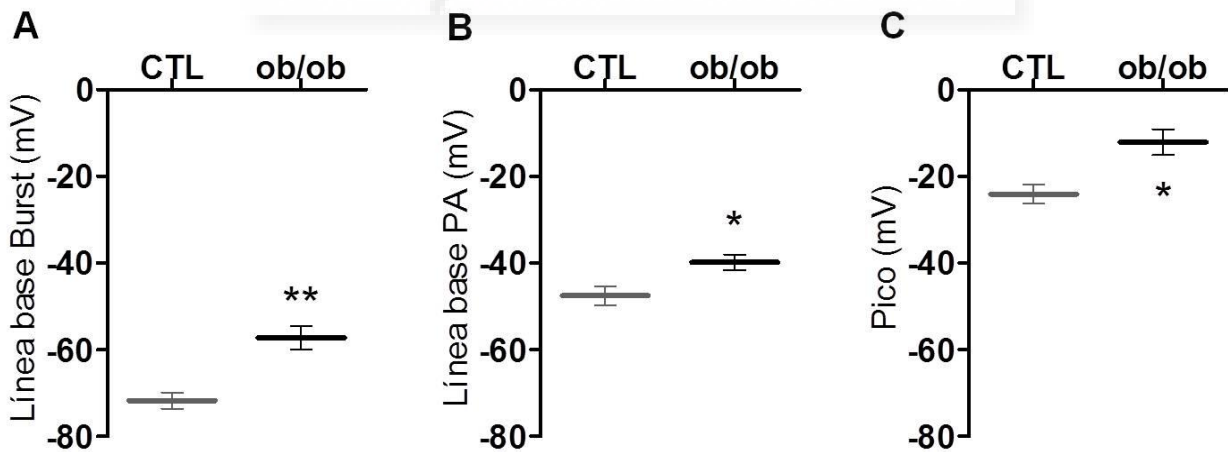


Figura 19. Análisis de los parámetros del potencial de membrana II. A, Línea base del *burst* de los registros de la Figura 10. CTL, n=6; *ob/ob*, n=3. B, Línea base del potencial de acción de los registros de la Figura 10. CTL, n=5; *ob/ob*, n=6. C, Voltaje del pico del potencial de acción de los registros de la Figura 10. CTL, n=5; *ob/ob*, n=6.

4.4 La señalización de $[Ca^{2+}]_i$ está aumentada en islotes de *ob/ob*

La señalización intracelular de calcio en la célula β desempeña una función esencial en el acoplamiento entre el metabolismo de la glucosa y la secreción de insulina. La exposición de los islotes a concentraciones estimulantes de glucosa produce un perfil característico de fluorescencia dependiente del calcio intracelular.

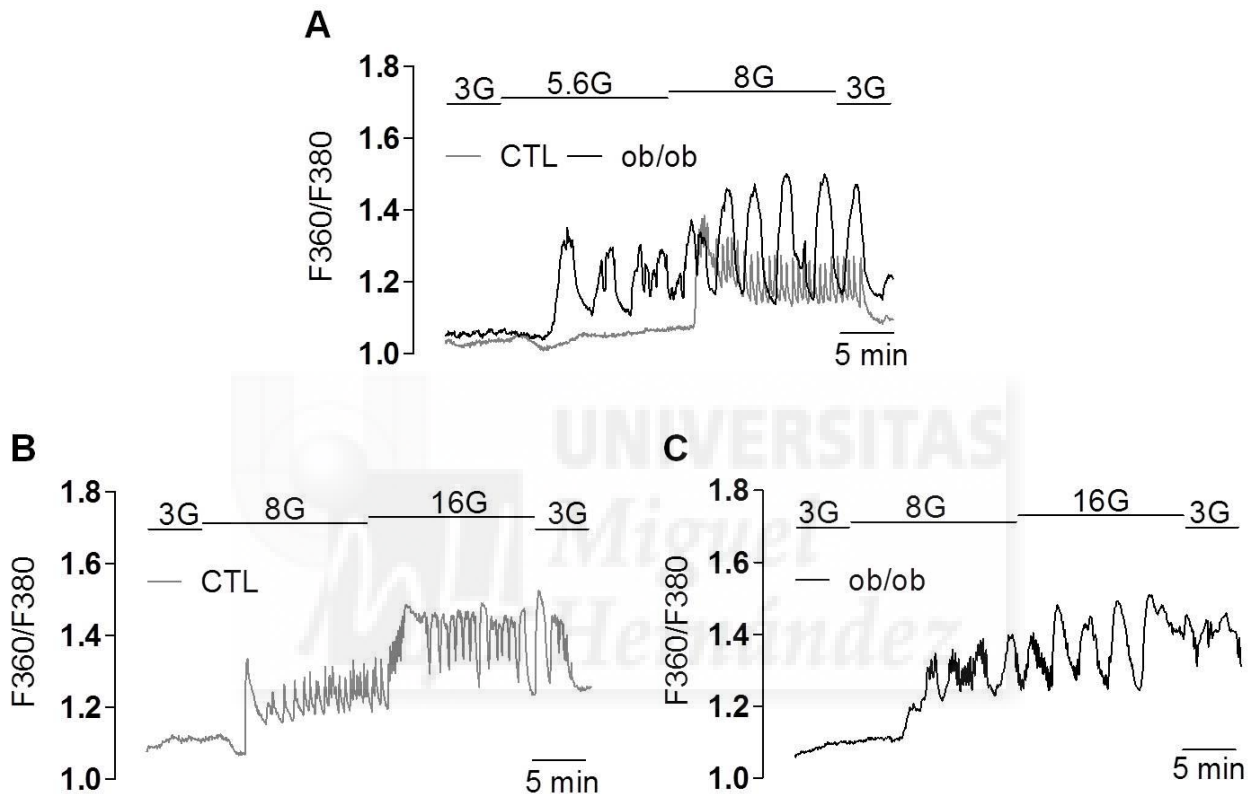


Figura 20. Señalización de calcio intracelular dependiente de glucosa I: perfiles oscilatorios. A, Registros representativos de islotes de CTL (n=9) y *ob/ob* (n=8) expuestos a 5.6 y 8mM glucosa. B, Registro representativo de islotes de CTL (n=8) expuestos a 8 y 16mM glucosa. C, Registro representativo de islotes de *ob/ob* (n=6) expuestos a 8 y 16mM glucosa.

Como puede observarse en las Figuras 20A y 20B, la exposición de los islotes de ratones CTL a una concentración estimulante de 8mM glucosa produjo un perfil de fluorescencia característico en el que se aprecia un primer incremento transitorio de la fluorescencia (correspondiente a la primera fase de la secreción de insulina), seguido por un patrón constante de oscilaciones rápidas y de menor amplitud (correspondiente a la segunda fase de la secreción de insulina). En la Figura 20B puede observarse también que al aumentar la concentración de glucosa (16mM) se produce un cambio en el patrón oscilatorio, siendo las oscilaciones de mayor amplitud y menor frecuencia.

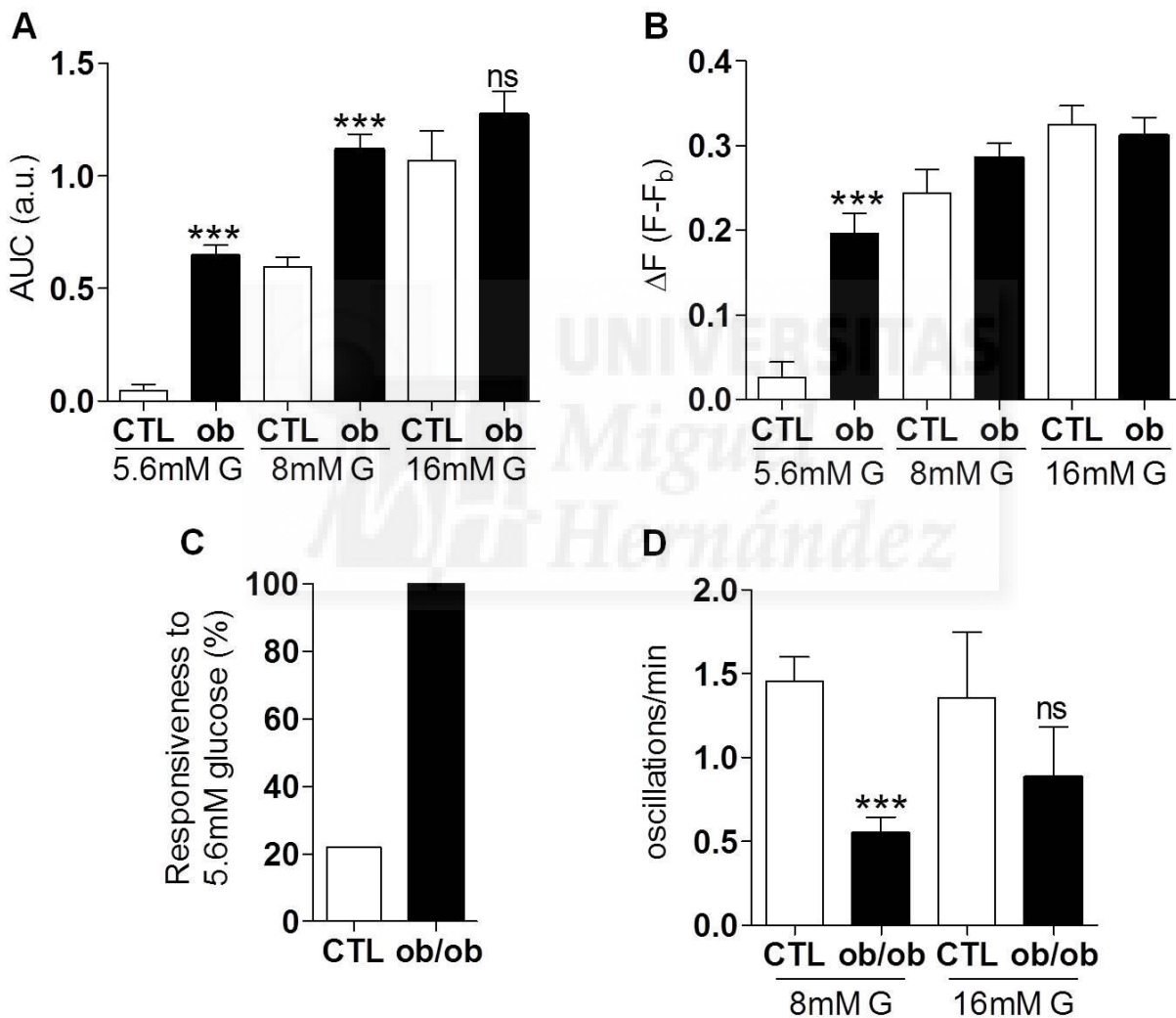


Figura 21. Señalización de calcio intracelular dependiente de glucosa II: análisis de los registros. A, Área bajo la curva (AUC) promedio de los registros de calcio intracelular representados en la Figura 12. B, Incremento de fluorescencia ($F-F_0$) del transitorio en cada concentración de glucosa testada en los registros de la Figura 12. C, Porcentaje de respuesta de los islotes a 5.6mM glucosa. D, Frecuencia de las oscilaciones de calcio intracelular a 8 y 16mM glucosa.

En comparación, el perfil de los registros de $[Ca^{2+}]_i$ en islotes de *ob/ob* resultó ser diferente en varios aspectos. En la Figura 20A se observa que los islotes de los ratones obesos presentan oscilaciones a 5.6mM glucosa, concentración a la cual los islotes de ratones CTL no son estimulados. En esta figura se observa también que los ratones obesos no presentan el patrón de oscilaciones rápidas característico de los ratones CTL a 8mM glucosa. En cambio, presentan oscilaciones de frecuencia mucho menor y de mayor amplitud. La Figura 20C muestra que en los islotes de los ratones obesos no se produce un cambio significativo entre 8 y 16mM glucosa.

Para un análisis más preciso, se calculó el área bajo la curva (AUC: *area under the curve*) como medida de la cantidad total de calcio intracelular (Figura 21A). Con este análisis se determinó que la $[Ca^{2+}]_i$ en islotes de *ob/ob* a 5.6mM glucosa es de la misma magnitud que la $[Ca^{2+}]_i$ que son capaces de movilizar los islotes de ratones CTL a mayor concentración de glucosa (8mM). La misma equivalencia se observó entre los islotes de *ob/ob* a 8mM glucosa y los de CTL a 16mM glucosa. No obstante, la cantidad de calcio que movilizan los islotes de *ob/ob* a 16mM glucosa no presenta un aumento respecto a la que movilizan estos mismos islotes a 8mM glucosa ni los CTL a 16mM glucosa. Por tanto, los islotes de los ratones obesos responden a menores concentraciones de glucosa y con respuestas de mayor magnitud a glucosas intermedias, pero a concentraciones de glucosa elevadas (16mM) no se observa diferencia. También se determinó el incremento de fluorescencia del primer transitorio a cada concentración de glucosa, observándose diferencias sólo a 5.6mM glucosa (Figura 21B), concentración a la cual el 100% de los islotes de *ob/ob* presentó un patrón oscilatorio, mientras que sólo el 22% de los islotes de CTL presentó una respuesta a esta concentración (Figura 21C). La Figura 21D muestra la diferencia en la frecuencia oscilatoria a 8mM glucosa, mientras que a 16mM, al igual que ocurre con el AUC, no hay diferencia.

Adicionalmente, se analizó la señalización de calcio intracelular en respuesta a estímulos independientes del metabolismo de la glucosa. Por un lado, los islotes fueron perfundidos con una solución de KCl 75mM, que produce una despolarización de la membrana celular activando canales de Ca^{2+} (Figura 22A). En este caso, no se observó ninguna diferencia entre los dos grupos (Figura 22B).

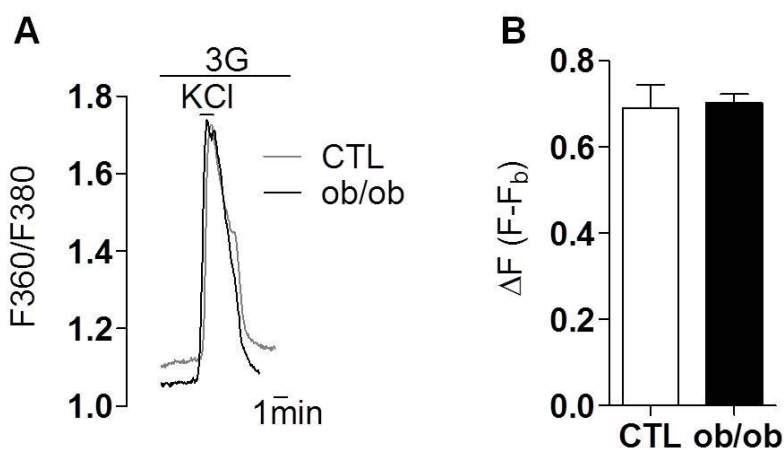


Figura 22. Señalización de calcio intracelular independiente de metabolismo de glucosa I: potasio. A, Registros representativos de la entrada de calcio en islotes de CTL (n=10) y *ob/ob* (n=6) en respuesta a despolarización con alta concentración de potasio (75mM KCl). B, Incremento de fluorescencia (F-F₀) del pico de despolarización por potasio.

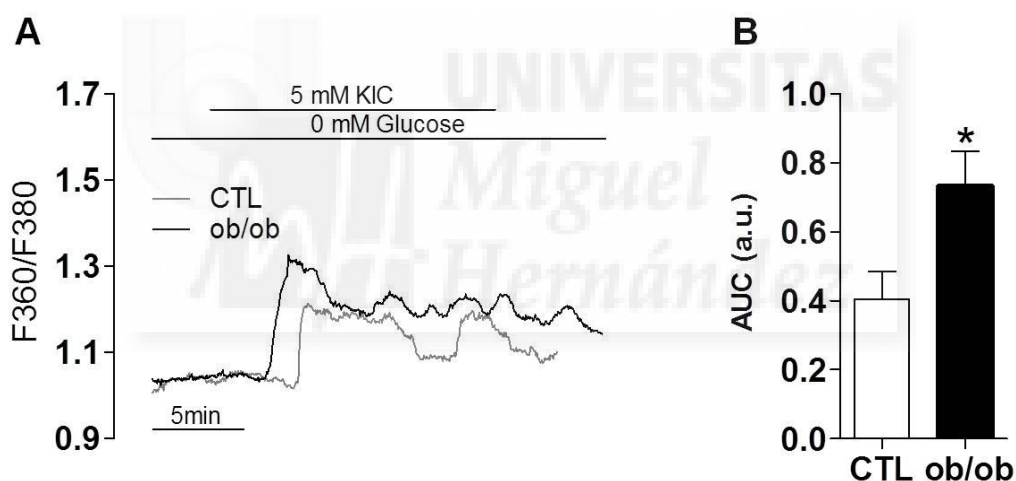


Figura 23. Señalización de calcio intracelular independiente de metabolismo de glucosa II: α -ketoisocaproato (KIC). A, Registros representativos de la entrada de calcio en islotes de CTL y *ob/ob* (n=6) en respuesta a despolarización con 5mM KIC. B, Área bajo la curva del experimento en (A), correspondiente a los últimos 5 min de estimulación con KIC.

Por otro lado, los islotes fueron perfundidos con una solución con α -ketoisocaproato (KIC) 5mM, en ausencia de glucosa. El KIC es un intermediario del metabolismo de la leucina que puede ser metabolizado en la mitocondria y generar Acetyl-CoA, el mismo metabolito que produce la glucosa y que forma parte del ciclo de Krebs. La exposición de los islotes a KIC permite evaluar la capacidad mitocondrial estimulada por un metabolito no glucídico. Como puede verse en la Figura 23A, la señal

de Ca^{2+} inducida por KIC 5mM es mayor en los islotes de *ob/ob*. En la Figura 23B se observa que la cantidad total de Ca^{2+} es casi el doble en los islotes de los ratones obesos.

4.5 Los islotes de los ratones obesos secretan más insulina y tienen aumentada la exocitosis

La señalización de Ca^{2+} está estrechamente relacionada con la secreción de insulina. Dada la mayor señal de Ca^{2+} observada en los islotes de los ratones obesos, el siguiente paso fue evaluar tanto la síntesis de insulina como la exocitosis de las células β .

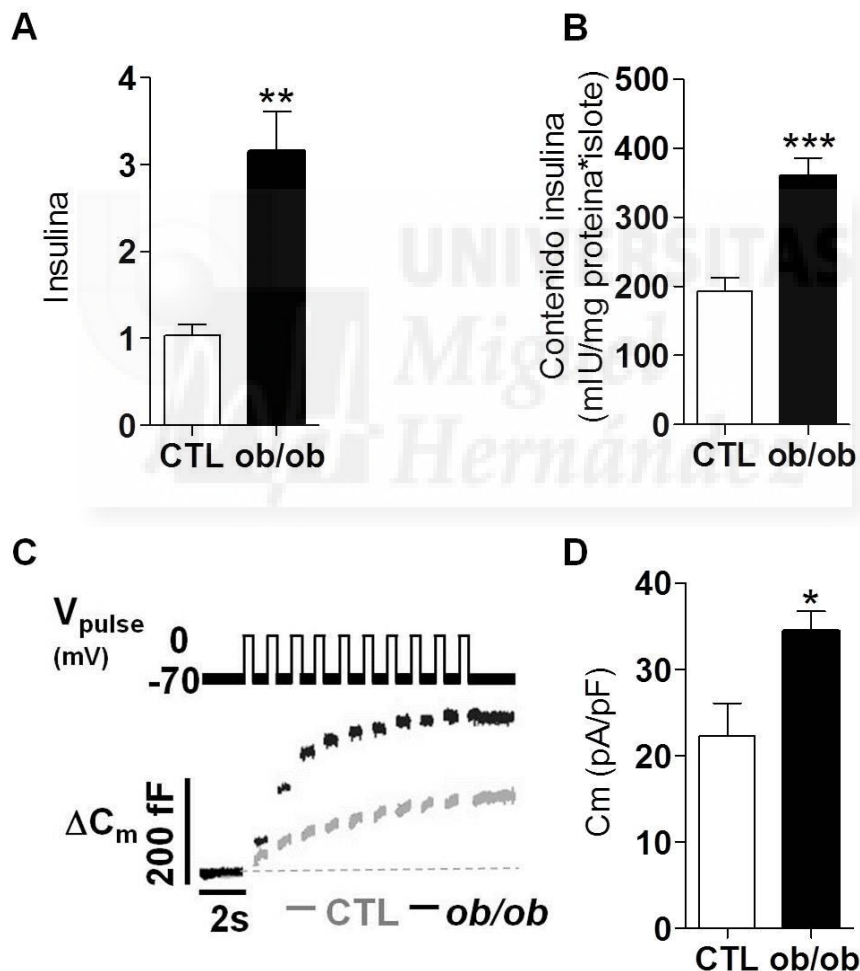


Figura 24. Síntesis de insulina y exocitosis. A, Expresión génica de insulina en ratones alimentados CTL y *ob/ob* (n=5). B, Contenido de insulina, relativizado por proteína total, en islotes de CTL (n=16) y *ob/ob* (n=15) en estado de alimentación. C, Respuesta exocitótica representativa de células β de CTL y *ob/ob* a 10 pulsos de despolarización de 500 milisegundos (de -70 a 0 mV). D, Capacitancia de la membrana de células β de ratones CTL y *ob/ob*, normalizada por el tamaño celular.

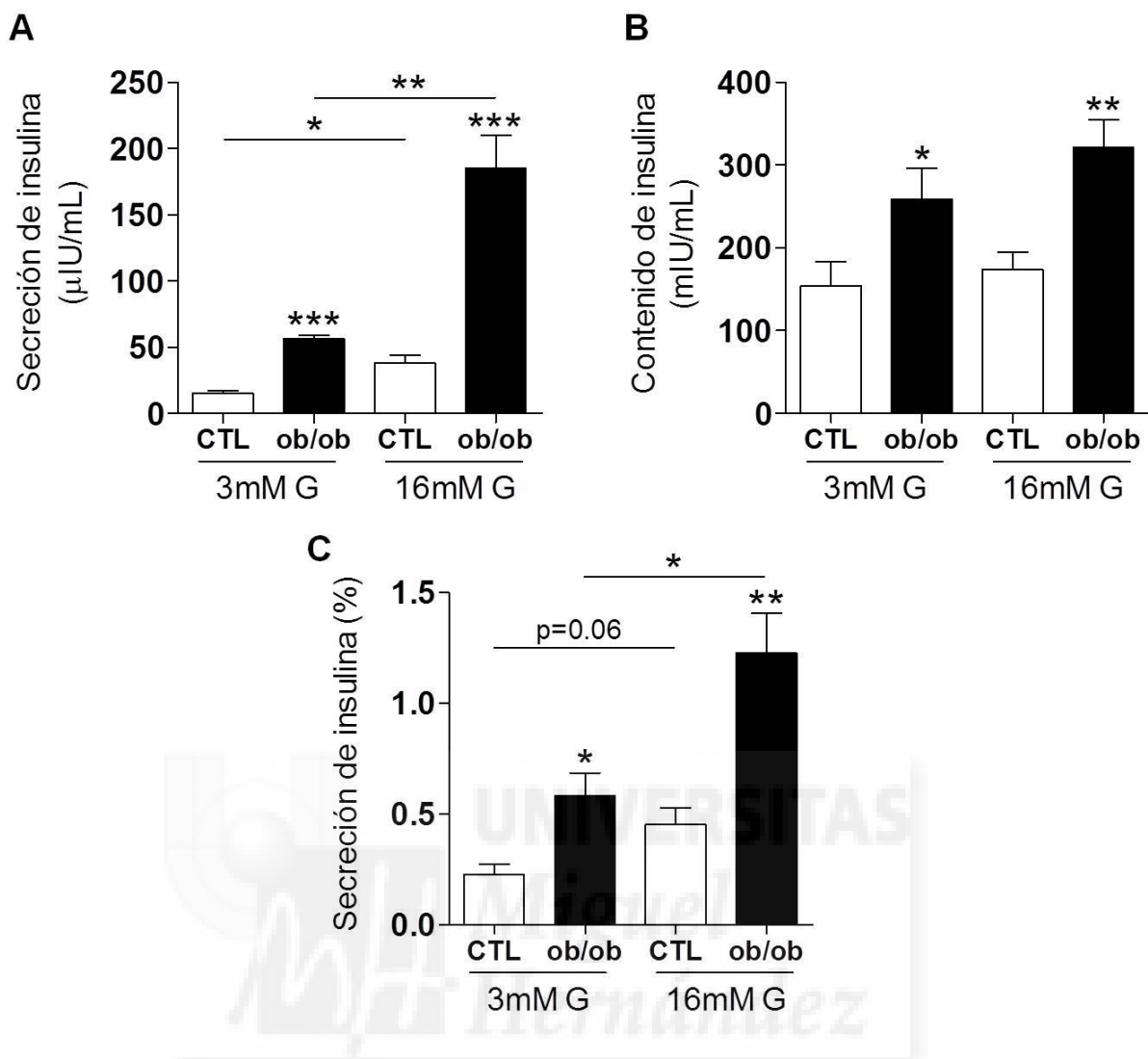


Figura 25. Secreción de insulina *ex vivo*. Secreción de insulina (A), contenido de insulina (B) y secreción de insulina normalizada por contenido (C) en islotes de ratones CTL y *ob/ob* (n=8).

La Figura 24A muestra que la expresión del gen de insulina está aumentada en islotes de *ob/ob*. A su vez, en la Figura 24B puede verse que el contenido de insulina también es mayor en los islotes de los ratones obesos. Por otro lado, en la Figura 24C puede observarse cómo, mediante despolarización inducida por pulsos eléctricos, las células de los ratones obesos presentan una mayor respuesta exocitótica. La mayor respuesta exocitótica sería debida, fundamentalmente, a una mayor cantidad de vesículas en el RRP (*readily releasable pool*), tal y como indica las respuesta a los dos primeros pulsos. Esta mayor respuesta exocitótica se mantiene incluso después de ser relativizada por el tamaño celular (Figura 24D). Estos resultados coinciden con la mayor capacidad de liberación de insulina, tal como se ha reportado previamente

(Fournier et al., 1990) y se observa en la Figura 25, donde tanto a glucosa basal como estimulante, los islotes de *ob/ob* secretan mayores cantidades de insulina

4.6 El acoplamiento y la sincronía entre células β disminuye en los islotes de los ratones obesos

El acoplamiento eléctrico entre las células β es esencial para garantizar una respuesta secretora rápida y eficaz frente a pequeñas variaciones de la glucemia. De hecho, en el ratón las células β de un islote funcionan como un sincitio. Para evaluar la sincronía a nivel de célula individual se realizaron experimentos de señalización de Ca^{2+} mediante microscopía confocal, puesto que dicha señalización está estrechamente ligada a la actividad eléctrica de las células. En la Figura 26A puede verse cómo las células β de ratones CTL inician la respuesta de forma simultánea, mientras que en la Figura 26B se observa que las células de los ratones *ob/ob* responden a diferentes tiempos.

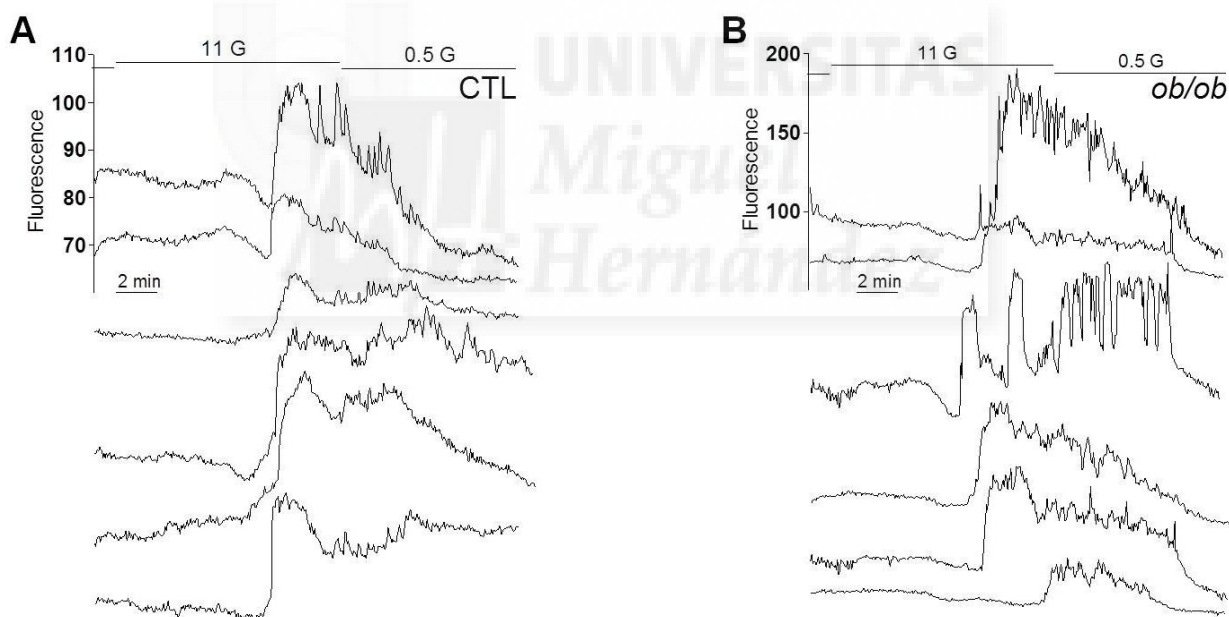


Figura 26. Señalización de calcio en célula β individual. A, Registros representativos de señalización de Ca^{2+} en células individuales de un islote de ratón CTL. B, Registros representativos de señalización de Ca^{2+} en células individuales de un islote de ratón obeso.

La Figura 27 muestra el desfase entre la respuesta de las diferentes células del islote. Para cada islote se tomó como referencia la primera célula que respondió y posteriormente se calculó el desfase del resto de células del islote. Así, en los islotes de ratones CTL se observó un desfase en la respuesta de 4.68 ± 1.34 s, y en los islotes de ratones *ob/ob*, de 58.04 ± 9.13 s.

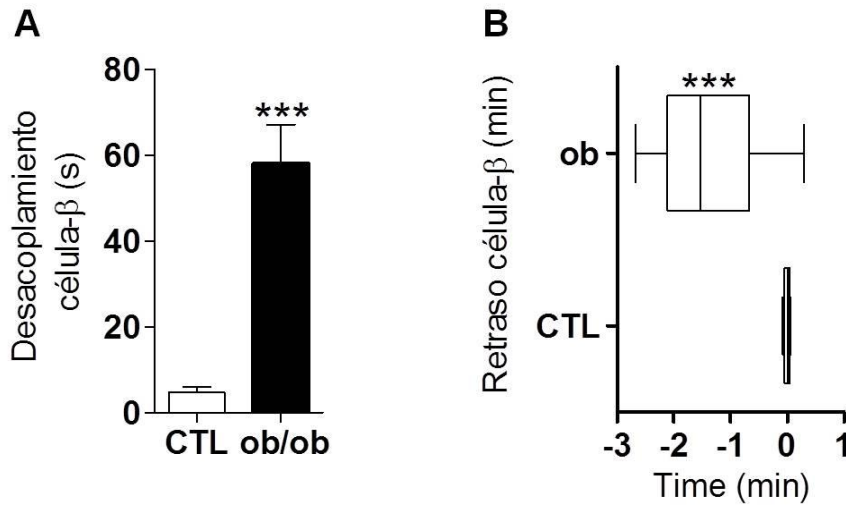


Figura 27. Acoplamiento entre células β . A, Desfase en la respuesta de las células β . B, tiempo de respuesta de las células β a alta glucosa.

También se observó que las células β de los ratones obesos responden más rápido al estímulo de glucosa (Figura 27B). Se tomó como tiempo cero el tiempo promedio de respuesta de las células de CTL y se calculó la anticipación o el retraso de la respuesta de las células de ratones obesos. Aunque la respuesta de algunas células de *ob/ob* fue incluso posterior a la respuesta de las células de CTL, las células de los ratones obesos respondieron, como promedio, 1.35 ± 0.15 min antes que las células de los ratones CTL.

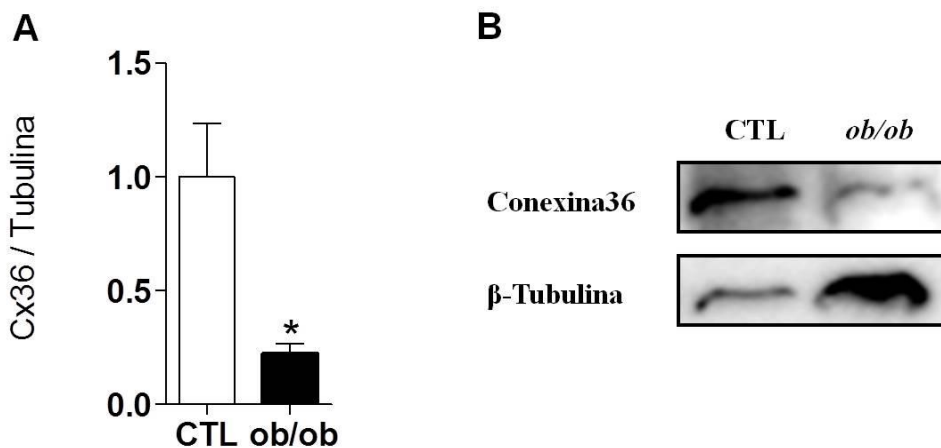


Figura 28. Expresión de Conexina-36 en islotes de CTL y *ob/ob*. A, Niveles de proteína de Conexina36 en islotes de CTL (n=4) y *ob/ob* (n=3). B, Imagen representativa de las bandas proteicas de *western blot* para Conexina36 y β -Tubulina.

El acoplamiento entre células β se produce gracias a las uniones de tipo *gap-junction*, formadas por poros proteicos de Conexina36. Por ello, se decidió evaluar la expresión de dicha proteína. En la Figura 28 se muestra que la expresión de la proteína Cx36 se encuentra drásticamente reducida en los islotes de *ob/ob*.

4.7 Expresión génica

En vista de los resultados anteriormente descritos se decidió evaluar la expresión génica de ciertas proteínas clave en los procesos que presentaron alguna alteración.

Dada la mayor actividad mitocondrial que presentan los islotes de los ratones obesos, se decidió evaluar la expresión génica del transportador de glucosa GLUT2 y de la enzima glucoquinasa (GcK). El análisis de la expresión génica de GLUT2 mostró que dicho transportador se encuentra reducido en los islotes de los ratones obesos (Figura 29A), mientras que el análisis de la expresión de GcK no mostró ninguna diferencia entre los grupos (Figura 29B).

También se analizó la expresión génica de Conexina36, puesto que la expresión proteica está alterada, pero no se observó ninguna diferencia entre los grupos (Figura 29C). Por último, también se cuantificó la expresión génica del canal iónico TRPM5, cuya alteración parece estar implicada en cambios en la señalización intracelular de Ca^{2+} , como se comentará posteriormente. La expresión de este canal resultó estar muy reducida en los islotes de *ob/ob* (Figura 29D).

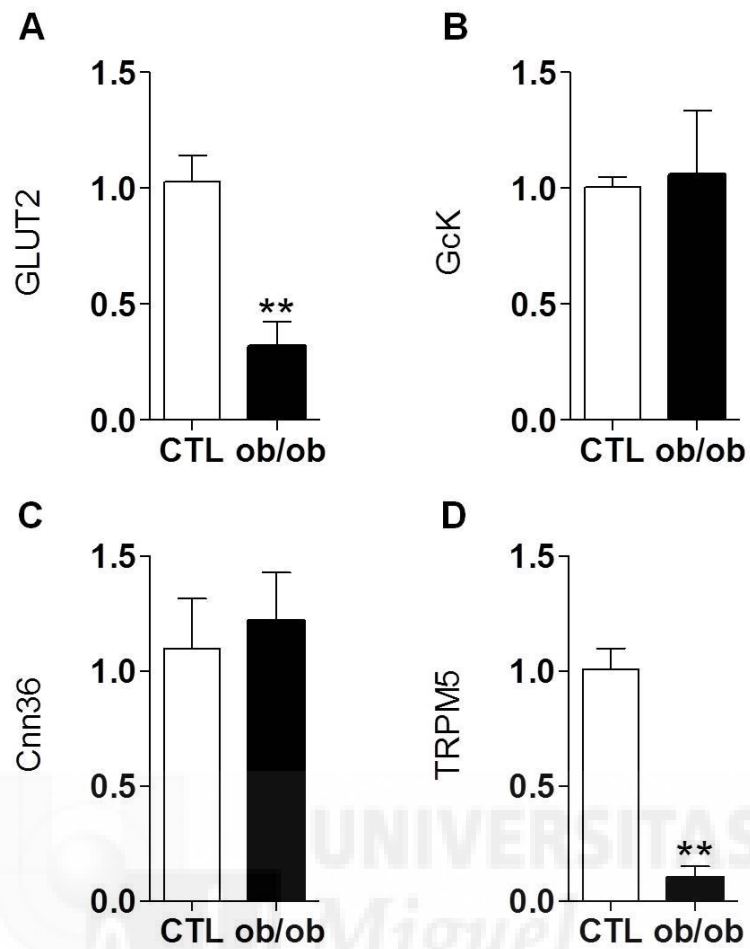


Figura 29. Expresión génica en islotes de ratones CTL y *ob/ob*. A, Expresión génica de GLUT2. B, Expresión génica de GcK. C, Expresión génica de Conexina36. D, Expresión génica de TRPM5.

DISCUSIÓN



V. DISCUSIÓN

La resistencia a insulina asociada a estados obesos es generalmente compensada gracias a la gran plasticidad del páncreas endocrino, que se adapta a la mayor demanda de insulina. Esta respuesta adaptativa puede tener lugar de dos formas, mediante cambios estructurales y/o funcionales. Mientras que las adaptaciones estructurales que ocurren en esta etapa han sido bien descritas en numerosos trabajos, tanto en humanos como en animales (Butler et al., 2003b; Sachdeva y Stoffers, 2009; Seino et al., 2001; Saisho et al., 2013), se ha prestado mucha menos atención a la adaptación funcional (Kahn et al., 2006; Kargar y Ktorza, 2008; Seino et al., 2011). No obstante, nuestro grupo ya demostró recientemente, en un modelo de obesidad inducida por dieta rica en grasa (HFD, *high fat diet*), que la célula β experimenta alteraciones funcionales en varias etapas de la secreción de insulina estimulada por glucosa (Gonzalez et al., 2013). En este modelo, hembras C57BL/6J fueron sometidas a dieta HFD o control durante 12 semanas a partir del destete. Al final del tratamiento, las hembras alimentadas con HFD presentaron sobrepeso, así como resistencia a la insulina e hiperinsulinemia. No obstante, la glucemia en condiciones de alimentación se mantuvo en un rango normal. Se ha propuesto que, en individuos obesos, en la progresión desde este estado normoglicémico hasta el estado diabético, las adaptaciones del páncreas dejan de ser suficientes para compensar la resistencia a la insulina, llevando así a un estado intermedio caracterizado por una marcada hiperinsulinemia, hiperglucemia moderada e intolerancia a la glucosa (Weir y Bonner-Weir, 2004). No obstante, no existe información sobre las adaptaciones funcionales que ocurren en este estado prediabético.

Por ello, en la presente tesis decidimos evaluar las adaptaciones funcionales que ocurren en las células β durante el estado prediabético caracterizado por niveles de insulina elevados, hiperglucemia moderada e intolerancia a glucosa. Para ello, aprovechamos el modelo murino *ob/ob*, que, además de una marcada obesidad, presenta estas características metabólicas que definen el estado prediabético.

5.1 Modelo de obesidad y prediabetes

El síndrome *ob/ob* depende del fondo genético de la cepa del ratón utilizado (Mayer y Silides, 1953; Coleman y Hummel, 1973). Con el fondo 6J, como es el caso de nuestros ratones, el síndrome cursa con menor severidad que en otras cepas. Aunque sí presentan una marcada resistencia a la insulina, no llegan a desarrollar diabetes severa sino una hiperglucemia transitoria. Decidimos emplear hembras puesto que éstas están más protegidas que los machos frente al desarrollo de diabetes (Liu y Mauvais-Jarvis, 2010). Puesto que nuestro interés era caracterizar las adaptaciones funcionales que ocurren en estados prediabéticos, consideramos que las hembras C57BL/6J presentan unas características apropiadas para el estudio, al mantener durante un período mayor las etapas previas al desarrollo de diabetes.

La caracterización inicial del modelo nos permitió confirmar que nuestros animales obesos eran hiperglucémicos a pesar de las grandes cantidades de insulina plasmática (Figura 9), en concordancia con estudios previos (Saleh et al., 2006). Caracterizaciones adicionales nos permitieron comprobar que los animales obesos presentaban también una elevada resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa, conjuntamente con niveles elevados de glucosa e insulina plasmáticas (Figuras 10 y 11). Mediante el test de tolerancia a la glucosa pudimos determinar que, aunque los ratones obesos conservan la capacidad de secretar insulina tras una carga de glucosa, y que esta respuesta es incluso mayor que en los ratones control, la insulina circulante no es capaz de mantener la glucemia en el rango normal. Esto se debe a la resistencia que presentan estos ratones a la insulina, como refleja el test de tolerancia a insulina, donde tras la aplicación de una carga de insulina, la glucemia de los ratones obesos apenas sufre un ligero descenso. Adicionalmente, el índice HOMA-IR aporta información cuantitativa sobre la sensibilidad a la insulina (Figura 12), indicando que esta resistencia a la hormona estaba presente.

Aunque la hiperinsulinemia de los *ob/ob* ha sido atribuida clásicamente a adaptaciones morfológicas (Baetens et al., 1978; Gepts et al., 1960; Tomita et al. 1992), algunos trabajos han mostrado que los islotes de *ob/ob* secretan mayores cantidades de insulina (Black et al., 1986; Fournier et al., 1990; Saleh et al., 2006). En esta tesis, pues, estudiamos diferentes etapas de la GSIS con el fin de definir qué adaptaciones funcionales sufren las células β en estas condiciones patológicas.

5.2 Adaptaciones funcionales de la célula β en el estado prediabético asociado a la obesidad

5.2.1 Alteración del metabolismo mitocondrial

El metabolismo de la glucosa está estrechamente relacionado con el metabolismo mitocondrial; el producto final de la glucólisis es transportado a la mitocondria, donde es incorporado como metabolito al ciclo de Krebs o ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Tanto durante la glucólisis, en el citoplasma, como en el ciclo de Krebs, en las mitocondrias, el metabolismo de la glucosa lleva a la formación de NAD(P)H a partir de NAD(P)⁺. En el caso de la célula β se ha descrito que la mayoría del NAD(P)H sintetizado a partir del metabolismo de la glucosa tiene lugar en las mitocondrias (Patterson et al., 2000), por lo que la medida dinámica de producción de NAD(P)H mediante técnicas de fluorescencia nos permitió evaluar de forma indirecta el metabolismo mitocondrial. Nuestros datos muestran que los islotes intactos de *ob/ob* producen una mayor cantidad de NAD(P)H que los CTL para cualquiera de las concentraciones de glucosa empleadas (Figuras 13 A y B) y que presentan una mayor sensibilidad a la glucosa (Figura 13 C). También observamos una mayor producción de NAD(P)H en células individuales de *ob/ob* (Figura 14), con lo que podemos afirmar que la mayor producción de NAD(P)H que observábamos en islotes intactos no se debe, al menos no exclusivamente, al mayor número de células β , sino que sería consecuencia de adaptaciones funcionales a nivel de célula individual.

En otro experimento diferente, midiendo directamente cambios en el potencial de membrana mitocondrial, reforzamos los resultados anteriores demostrando que en los islotes de los animales obesos se produce una mayor hiperpolarización del ψ_m (Figuras 15 A y B). Sin embargo, en este experimento no observamos diferencias en la concentración de glucosa a la que se produce el 50% de la variación del ψ_m (Figura 15 C). Una posible explicación sería que la técnica carezca de la sensibilidad suficiente para discriminar ligeras diferencias entre los grupos.

Estos hallazgos concuerdan con los descritos en otro modelo de resistencia a insulina en rata donde las células β de los animales tratados también muestran mayor producción de NAD(P)H e hiperpolarización del ψ_m (Rafacho et al., 2010). El desplazamiento hacia la izquierda de la curva dosis-respuesta a glucosa (Figura 13 C) concuerda con estudios previos que describen una mayor sensibilidad en individuos

obesos a glucosas bajas e intermedias (Chen et al., 1993). Sin embargo, estas diferencias entre obesos y controles se pierden a concentraciones de glucosa elevadas, como ya parecía indicar un trabajo anterior donde se observó una producción de ATP aumentada en islotes de *ob/ob* a bajas glucosas y síntesis equivalente a altas glucosas (Saleh et al., 2006).

La entrada de glucosa a través de su transportador GLUT2 y su posterior fosforilación, por mediación de la glucoquinasa (GcK), son pasos clave que pueden determinar el rendimiento del metabolismo de la glucosa. Dada la mayor actividad mitocondrial que hallamos en los islotes de los ratones obesos, decidimos evaluar la expresión génica de *GLUT2* y *GcK*. Tal y como ya se describió a nivel de proteína (Jetton et al., 2001), encontramos que la expresión de *GLUT2* en islotes de *ob/ob* está drásticamente reducida (Figura 29 A). En cambio, la expresión de *GcK* no está alterada (Figura 29 B). A pesar de la drástica reducción en la expresión de *GLUT2*, el metabolismo de la glucosa no tendría por qué verse alterado puesto que la enzima limitante en la vía glucolítica es la GcK, cuya expresión no está alterada (Chen et al., 2004).

5.2.2 Alteración de las propiedades eléctricas

El NAD(P)H sintetizado durante el metabolismo de la glucosa y la hiperpolarización del ψ_m están estrechamente acoplados con la síntesis de ATP (Quesada et al., 2006), molécula que participa activamente de la regulación de la actividad eléctrica de la célula β . Así, la mayor actividad mitocondrial descrita en el apartado anterior podría ser responsable, o al menos participar, de las diferencias encontradas en el patrón de actividad eléctrica de los islotes de los ratones obesos.

Anteriormente ya se describieron algunas diferencias en la actividad eléctrica de las células β de *ob/ob* (Rosario et al., 1985). Una de las principales diferencias encontradas es la menor polarización de la membrana de las células β de *ob/ob* (Figuras 16, 18 y 19 A). Además de por la mayor actividad mitocondrial, esto podría deberse a una permeabilidad alterada a K^+ (Rosario, 1985; Fournier et al., 1990). En concreto, podría ser debido a la menor densidad de canales K_{ATP} en la membrana de las células β de *ob/ob* (Park et al., 2013). Park y colaboradores describieron la implicación de la

leptina en la translocación de K_{ATP} a la membrana en condiciones de ayunas o baja glucosa. En condiciones normales, el ayuno o un descenso en la concentración circulante de glucosa inducirían la translocación de canales K_{ATP} a la membrana, facilitando así la hiperpolarización de la membrana celular y el cese de la secreción de insulina. No obstante, en las células β de *ob/ob*, debido a la deficiencia de leptina, no se produce este transporte de los canales en condiciones de ayunas o baja glucosa. Con base a este estudio previo se podría explicar tanto el estado más despolarizado de la membrana como la mayor excitabilidad de las células de los ratones obesos y, en consecuencia, la hiperinsulinemia en condiciones basales (Figura 25) o de ayuno (Figura 1 D) y la mayor sensibilidad a la glucosa (Figuras 13 C, 20 y 25). En cuanto a otros parámetros de actividad eléctrica, la menor densidad de K_{ATP} y, en consecuencia, mayor excitabilidad, podría explicar por qué a una concentración de 11mM glucosa las células β de *ob/ob* muestran un patrón de actividad eléctrica con una duración del *burst* mucho mayor a la de una célula CTL a la misma concentración de glucosa (Figura 17). De hecho, este perfil encontrado en los ratones obesos tiene mucha similitud al que se encontraría en células CTL a concentraciones de glucosa mucho mayores (20-30 mM), cuando la actividad eléctrica es prácticamente continua. La mayor duración del *burst* así como la mayor frecuencia de disparo pueden asociarse con la señal de calcio aumentada en los islotes de *ob/ob*, como se comentará en el próximo apartado. Además, las líneas basales del *burst* y el potencial de acción aparecieron estar ligeramente despolarizadas en comparación con los controles (Figuras 19 A y B), lo que podría sugerir una actividad alterada de los canales K_{Ca} (Rosario, 1985; Rosario et al., 1985; Black et al., 1988). Otra diferencia que muestran nuestros experimentos es que los potenciales de acción de los *ob/ob* alcanzan voltajes más despolarizados (Figura 19 C). Ya se ha descrito anteriormente que potenciales de acción mayores podrían estar asociados a mayores corrientes de entrada de Ca^{2+} debido a las características voltaje dependientes de los canales de Ca^{2+} (Houamed et al., 2010; Jacobson et al., 2010; Gonzalez et al., 2013). Así, en el caso de los *ob/ob*, los potenciales de acción más elevados podrían contribuir a la señal de Ca^{2+} aumentada, que discutiremos a continuación.

5.2.3 Alteración de la señalización de Ca^{2+}

En las células β de ratón la entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular al interior celular está ligada a la actividad de los canales de Ca^{2+} y a los potenciales de acción generados por la activación de dichos canales (MacDonald, 2011). De modo similar a las diferencias encontradas en la actividad eléctrica, la señalización de Ca^{2+} en islotes de *ob/ob* resultó estar alterada. Por un lado, observamos que la señalización de Ca^{2+} inducida por glucosa está aumentada, tanto en lo que se refiere a la cantidad total de Ca^{2+} que entra en los islotes como a la sensibilidad a la glucosa (Figuras 20 y 21). A concentraciones de glucosa de 5.6mM la totalidad de los islotes de *ob/ob* presentaron una respuesta mientras que sólo el 22% de los islotes de CTL respondieron a esta concentración de glucosa (Figura 21 C). Este aumento de la sensibilidad a la glucosa coincide con los resultados obtenidos en los experimentos de autofluorescencia de NAD(P)H y actividad eléctrica, y podrían deberse tanto al aumento de la actividad mitocondrial como a la mayor excitabilidad de la membrana. También es mayor la cantidad total de Ca^{2+} que movilizan los islotes de *ob/ob* a concentraciones bajas (5.6mM) e intermedias (8mM) de glucosa (Figuras 20 y 21 A), aunque esta propiedad se pierde a glucosas más elevadas (16mM), quizás porque la actividad eléctrica de las células de los ratones obesos a esta concentración de glucosa sea máxima. Estas diferencias en la cantidad total de Ca^{2+} que entra en los islotes podría deberse al patrón de actividad eléctrica, que como ya comentamos anteriormente, presenta *bursts* de mayor duración (Figura 17 B). Esto coincidiría también con la observación de la alteración del patrón oscilatorio de Ca^{2+} (Figuras 20 y 21 C). A 8mM glucosa, los islotes CTL responden con un incremento transitorio de Ca^{2+} seguido de un patrón constante de oscilaciones rápidas. En cambio, los islotes de *ob/ob* responden a esta concentración de glucosa con cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mucho más lentos. Es decir, las oscilaciones son de menor frecuencia (Figura 21 C). Colsoul y colaboradores asociaron recientemente la pérdida de oscilaciones rápidas en islotes de *ob/ob* con la pérdida o reducción de la expresión del canal iónico TRPM5 (Colsoul et al., 2010; Colsoul et al., 2014). Este canal permea cationes monovalentes de forma no selectiva, es activado por Ca^{2+} , aunque impermeable a él, y se piensa que puede desempeñar un papel en la despolarización del potencial de membrana durante las fases silentes y, por tanto, participar del comienzo de un nuevo potencial de acción (Colsoul et al., 2010). Mediante análisis de la expresión génica observamos que, efectivamente, la expresión

de dicho canal se encuentra drásticamente reducida en los islotes de los ratones obesos (Figura 28D), y por tanto que podría estar participando en la dinámica de la señal de Ca^{2+} en los islotes de *ob/ob*.

Por otro lado, la señalización de Ca^{2+} independiente de glucosa no resultó estar alterada al despolarizar con K^+ (Figura 22) pero sí se observaron diferencias en la señalización de Ca^{2+} inducida por KIC (Figura 23). La señalización de Ca^{2+} inducida por KIC fue mayor en los islotes de *ob/ob*, como representa el dato de mayor área bajo la curva (Figura 23 B). El KIC es un metabolito independiente de la glucosa pero que sí es metabolizado en la mitocondria (Martin et al., 1995), por lo que apoyaría nuestros resultados anteriores al respecto de la mayor actividad mitocondrial en los islotes de *ob/ob*.

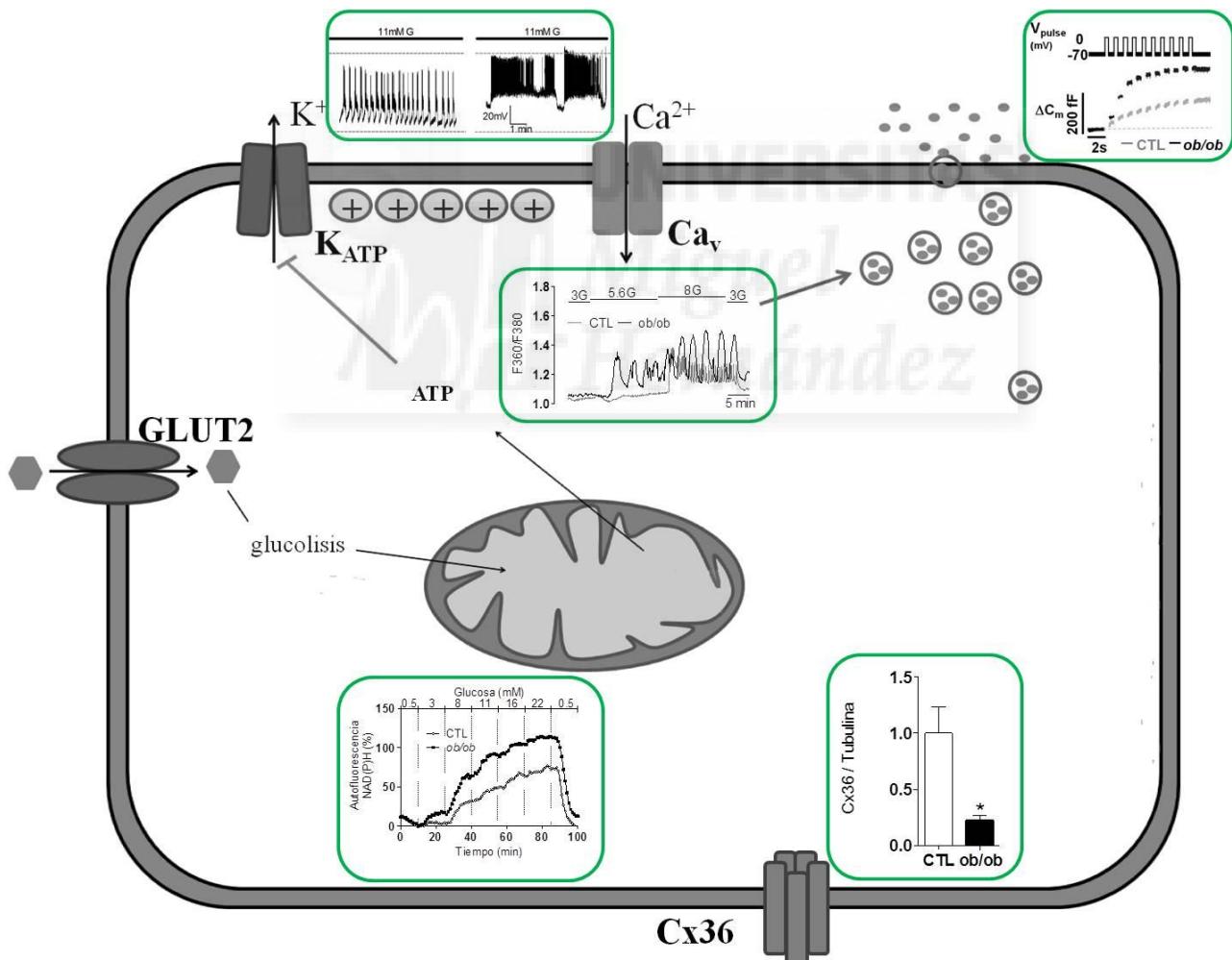


Figura 30. Alteraciones funcionales de la célula β . La imagen muestra experimentos representativos de cada uno de los procesos funcionales alterados descritos en este trabajo.

5.2.4 Alteración de la biosíntesis y secreción de insulina

Los altos niveles plasmáticos de insulina observados en los ratones obesos pueden tener diferentes orígenes: una mayor biosíntesis de insulina y/o secreción de la misma en respuesta a la resistencia a la insulina o que existan alteraciones en su degradación plasmática. Ya comentamos que los animales obesos son resistentes a la insulina (Figura 11). Por otro lado, la biosíntesis de insulina está también aumentada, como reflejan la mayor expresión del gen de la insulina (Figura 24 A) y el mayor contenido de la hormona en los islotes de *ob/ob* (Figura 24 B). La mayor biosíntesis está acompañada además de una mayor exocitosis de los gránulos de insulina (Figuras 24 C y D). Este experimento se realizó estimulando la exocitosis mediante pulsos eléctricos, de forma independiente del metabolismo celular, lo que demuestra que el proceso de exocitosis *per se* está aumentado. Además, la exocitosis en condiciones fisiológicas también puede verse aumentada por la mayor señalización de Ca^{2+} y a la mayor producción de NAD(P)H (Ivarsson et al., 2005; Reinbothe et al., 2009), como observamos en las células β de *ob/ob*.

Los islotes de *ob/ob* también secretan más insulina en respuesta al estímulo con glucosa (Figura 25) (Black et al., 1986; Fournier et al., 1990). Aunque a glucosa basal (3mM) no observamos alteración de la señal de Ca^{2+} en los islotes de los ratones obesos, la secreción de insulina sí está aumentada en estas condiciones, lo que corrobora resultados anteriores (Saleh et al., 2006). Esto podría deberse, al menos en parte, a que el proceso de exocitosis *per se* está aumentado, como comentábamos anteriormente. Aunque no se han explorado en este trabajo, también podrían estar alterados otros mecanismos celulares que participan del proceso de secreción de los gránulos de insulina, como el tráfico vesicular a la membrana. El mismo razonamiento podría aplicarse a la mayor secreción observada a glucosa 16mM. A esta concentración del estímulo la señal de Ca^{2+} tampoco era mayor en los islotes de *ob/ob*, aunque sí lo es la secreción de insulina. Así, a concentraciones de glucosa no estimulantes y elevadas, la secreción de insulina podría estar aumentada por la alteración de mecanismos independientes de Ca^{2+} , mientras que a concentraciones intermedias (5.6-8mM) la secreción se vería aumentada tanto por mecanismos dependientes como independientes de Ca^{2+} . Uno de estos mecanismos independientes podría ser el NAD(P)H, que ya hemos comentado que puede afectar directamente a la exocitosis (Ivarsson et al., 2005; Reinbothe et al., 2009) y cuya producción está aumentada en los islotes de los ratones

obesos. Nuestros resultados aportan indicios de que tanto la vía *triggering* como la amplificadora (Henquin, 2011) están aumentadas en las células β de *ob/ob*, dadas la señalización de Ca^{2+} y función mitocondrial aumentadas. No obstante, sería necesario abordar otras estrategias, no contempladas en este trabajo, para explorar qué otros mecanismos celulares podrían estar contribuyendo a la mayor secreción de insulina.

5.2.5 Alteración del acoplamiento celular

El acoplamiento celular entre células β permite la sincronía de la actividad eléctrica y de la señalización de Ca^{2+} en los islotes (Valdeolmillos et al., 1989; Santos et al., 1991; Valdeolmillos et al., 1993; Nadal et al., 1999; Quesada et al., 2006), necesaria para mantener una secreción de insulina adecuada. Alteraciones en este acoplamiento resultan en detrimento de la función secretora del islote (Vozzi et al., 1995; Charollais et al., 2000). En el presente trabajo observamos una disminución del acoplamiento de las señales de Ca^{2+} entre células β de islotes de *ob/ob* (Figuras 26 y 27), que podría ser debida a la menor expresión de la Conexina36 en estos islotes (Figura 28). Observamos que las células β de *ob/ob* de un mismo islotes no empezaban a oscilar todas al mismo tiempo, como ocurre en los controles (Figuras 26 A y B), con un desfase entre la primera y la última célula que empieza a oscilar, de 58.04 ± 9.13 segundos (Figura 27 B). Por otro lado, también fue diferente el tiempo que tardaban en responder las células β al estímulo de glucosa. En la Figura 28 B se muestra que las células β de *ob/ob* responden antes que las de los CLT, 1 minuto y 20 segundos como promedio, reforzando la hipótesis de una mayor sensibilidad a la glucosa.

Otro factor que podría estar reduciendo el acoplamiento celular es el mayor tamaño de los islotes de los *ob/ob* (Baetens et al., 1978; Gepts et al., 1960; Tomita et al., 1992), ya que la distancia intercelular afecta a la transmisión de la señal eléctrica y de Ca^{2+} (Andreu et al., 1997; Quesada et al., 2003).

De entre los mecanismos abordados en este trabajo, el acoplamiento celular parece ser el único que presenta una disminución. Nuestro grupo observó recientemente que el acoplamiento celular no presentaba alteraciones en islotes de ratones obesos normoglucémicos (Gonzalez et al., 2013), lo que nos lleva a especular que esta

disfunción podría ser uno de los primeros eventos que podrían llevar a la diabetes desde el estado prediabético en individuos obesos.



CONCLUSIONES



VI. CONCLUSIONES

1. Los ratones hembra *ob/ob*, a la edad adulta de 12 semanas, representan un modelo válido de estado prediabético asociado a la obesidad ya que presentan un perfil metabólico típicamente prediabético, caracterizado por hiperinsulinemia hiperglucemia e intolerancia a la glucosa.
2. Las células β de los ratones obesos presentan una función mitocondrial aumentada respecto a la de los controles, como indican la mayor producción de NAD(P)H y la mayor hiperpolarización del potencial de membrana mitocondrial.
3. La actividad eléctrica de la célula β de los ratones *ob/ob* presenta diversas alteraciones que le otorgan una mayor excitabilidad en respuesta a la glucosa.
4. La mayor función mitocondrial y actividad eléctrica alterada observadas en los ratones obesos contribuyen a la mayor sensibilidad a la glucosa de las células β .
5. Los islotes de los ratones obesos presentan una señalización de Ca^{2+} aumentada a concentraciones de glucosa intermedias (5.6 y 8mM), mientras que ésta no está alterada a concentraciones basales (3mM) y elevadas (16mM) del estímulo.
6. La biosíntesis de insulina está aumentada en los islotes de *ob/ob*, tanto a nivel de expresión génica como proteica.
7. La liberación de insulina es mayor en las células β de los ratones obesos, debido a una mayor secreción, tanto a concentraciones de glucosa basales como estimulantes, y a un aumento de la excitosis *per se*.
8. El acoplamiento celular que garantiza la sincronía de la células β se encuentra disminuido en los islotes de ratones *ob/ob* debido a una menor expresión de la proteína Conexina36.

9. Los resultados de este trabajo muestran que gran parte de los eventos implicados en la secreción de insulina estimulada por glucosa están aumentados en magnitud y/o sensibilidad a la glucosa en los ratones obesos, lo que aporta nuevos datos sobre la plasticidad funcional de la célula β para adaptarse a condiciones no fisiológicas y patológicas.



BIBLIOGRAFÍA

UNIVERSITAS
Miguel
Hernández

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Ahrén B. 2000. Autonomic regulation of islet hormone secretion--implications for health and disease. *Diabetologia*. 43(4):393-410.
- Andreu E, Soria B, Sanchez-Andres JV. 1997. Oscillation of gap junction electrical coupling in the mouse pancreatic islets of Langerhans. *J Physiol*. 498 (Pt 3):753-61.
- Anello M, Lupi R, Spampinato D, Piro S, Masini M, Boggi U, Del Prato S, Rabuazzo AM, Purrello F, Marchetti P. 2005. Functional and morphological alterations of mitochondria in pancreatic beta cells from type 2 diabetic patients. *Diabetologia*. 48:282-89.
- Baetens, D., Stefan, Y., Ravazzola, M., Malaisse-Lagae, F., Coleman, D.L., Orci, L., 1978. Alteration of islet cell populations in spontaneously diabetic mice. *Diabetes*. 27(1):1-7.
- Bichet D, Haass FA and Jan LY. 2003. Merging functional studies with structures of inward-rectifier K(+) channels. *Nat Rev Neurosci*. 4, 957-967.
- Black MA, Fournier LA, Heick HM, Bégin-Heick N. 1988. Different insulin-secretory responses to calcium-channel blockers in islets of lean and obese (ob/ob) mice. *Biochem J*. 249(2):401-7.
- Black, M., Heick, H.M., Bégin-Heick, N., 1986. Abnormal regulation of insulin secretion in the genetically obese (ob/ob) mouse. *Biochem J*. 238(3):863-9.
- Bonner-Weir S. 2000. Life and death of the pancreatic beta cells. *Trends Endocrinol Metab*. 11(9):375-8.
- Brissova M, Fowler MJ, Nicholson WE, Chu A, Hirshberg B, Harlan DM, Powers AC. 2005. Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *J Histochem Cytochem*. 53(9):1087-97.
- Buchanan TA, Metzger BE, Freinkel N, Bergman RN. 1990. Insulin sensitivity and B-cell responsiveness to glucose during late pregnancy in lean and moderately obese women with normal glucose tolerance or mild gestational diabetes. *Am J Obstet Gynecol*. 162(4):1008-14.
- Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC. 2003a. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes*. 52:102-10.
- Butler AE, Janson J, Soeller WC, Butler PC. 2003b. Increased beta-cell apoptosis prevents adaptive increase in beta-cell mass in mouse model of type 2 diabetes: evidence for role of islet amyloid formation rather than direct action of amyloid. *Diabetes*. 52(9):2304-14.
- Cabrera O, Berman DM, Kenyon NS, Ricordi C, Berggren PO, Caicedo A. 2006. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103(7):2334-9.
- Charollais A, Gjinovci A, Huarte J, Bauquis J, Nadal A, Martín F, Andreu E, Sánchez-Andrés JV, Calabrese A, Bosco D, Soria B, Wollheim CB, Herrera PL, Meda P. 2000.

Junctional communication of pancreatic beta cells contributes to the control of insulin secretion and glucose tolerance. *J Clin Invest.* 106(2):235-43.

Chen C, Hosokawa H, Bumbalo LM, Leahy JL. 1994. Mechanism of compensatory hyperinsulinemia in normoglycemic insulin-resistant spontaneously hypertensive rats. Augmented enzymatic activity of glucokinase in beta-cells. *J Clin Invest.* 94(1):399-404.

Chen NG, Tassava TM, Romsos DR. 1993. Threshold for glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic islets of genetically obese (ob/ob) mice is abnormally low. *J Nutr.* 123(9):1567-74.

Colditz GA, Willett WC, Rotnitzky A, Manson JE. 1995. Weight gain as a risk factor for clinical diabetes mellitus in women. *Ann Intern Med.* 122(7):481-6.

Coleman DL, Hummel KP. 1973. The influence of genetic background on the expression of the obese (ob) gene in the mouse. *Diabetologia.* 9:287-93.

Colsoul, B, Jacobs, G, Philippaert, K, Owsianik, G, Segal, A, Nilus, B, et al. 2014. Insulin downregulates the expression of the Ca²⁺-activated nonselective cation channel TRPM5 in pancreatic islets from leptin-deficient mouse models. *Pflugers Arch.* 466(3):611-21.

Colsoul, B, Schraenen, A, Lemaire, K, Quintens, R, Van Lommel, L, Segal, A, et al., 2010. Loss of high-frequency glucose-induced Ca²⁺ oscillations in pancreatic islets correlates with impaired glucose tolerance in *Trpm5*^{-/-} mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(11):5208-13.

Del Guerra S, Lupi R, Marselli L, Masini M, Bugliani M, Sbrana S, Torri S, Pollera M, Boggi U, Mosca F, Del Prato S, Marchetti P. 2005. Functional and molecular defects of pancreatic islets in human type 2 diabetes. *Diabetes.* 54:727-35.

Deng S, Vatamaniuk M, Huang X, Doliba N, Lian MM, Frank A et al. 2004. Structural and functional abnormalities in the islets isolated from type 2 diabetic subjects. *Diabetes.* 53:624-32.

Drews G, Krippeit-Drews P and Düfer M. Chapter 7: Electrophysiology of Islet Cells. En: *The Islets of Langerhans*. Uppsala: Springer. 2010. Pág. 115-164.

Drucker DJ. 2006. The biology of incretin hormones. *Cell Metab.* 3(3):153-65.

El-Assaad W, Buteau J, Peyot ML, Nolan C, Roduit R, Hardy S, Joly E, Dbaibo G, Rosenberg L, Prentki M. 2003. Saturated fatty acids synergize with elevated glucose to cause pancreatic beta-cell death. *Endocrinology.* 144(9):4154-63.

Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW. 2004. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology.* 145(5):2273-82.

Fernandez-Alvarez J, Conget I, Rasschaert J, Sener A, Gomis R, Malaisse WJ. 1994. Enzymatic, metabolic and secretory patterns in human islets of type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia.* 37:177-81.

Fournier, L.A., Heick, H.M., Bégin-Heick, N., 1990. The influence of K(+)-induced membrane depolarization on insulin secretion in islets of lean and obese (ob/ob) mice. *Biochem Cell Biol.* 68(1):243-8.

Gepts, W., Christophe, J., Mayer, J., 1960. Pancreatic islets in mice with the obese-hyperglycemic syndrome: lack of effect of carbutamide. *Diabetes.* 9:63-9.

Gonzalez A, Merino B, Marroquí L, Ñeco P, Alonso-Magdalena P, Caballero-Garrido E, Vieira E, Soriano S, Gomis R, Nadal A, Quesada I. 2013. Insulin hypersecretion in islets from diet-induced hyperinsulinemic obese female mice is associated with several functional adaptations in individual β -cells. *Endocrinology.* 154(10):3515-24.

Göpel S, Kanno T, Barg S, Galvanovskis J, Rorsman P. 1999. Voltage-gated and resting membrane currents recorded from B-cells in intact mouse pancreatic islets. *J Physiol.* 15;521 Pt 3:717-28.

Göpel, S., Zhang, Q., Eliasson, L., Ma, X.S., Galvanovskis, J., Kanno, T., et al., 2004. Capacitance measurements of exocytosis in mouse pancreatic alpha-, beta- and delta-cells within intact islets of Langerhans. *J Physiol.* 556(Pt 3):711-26.

Göpel, S.O., Kanno, T., Barg, S., Rorsman, P., 2000. Patch-clamp characterisation of somatostatin-secreting δ -cells in intact mouse pancreatic islets. *J Physiol.* 528(Pt 3):497-507.

Gray, DS and Fujioka, K. 1991. Use of relative weight and Body Mass Index for the determination of adiposity. *J Clin Epidemiol.* 44, 545-550.

Haslam, DW and James, WP. 2005. Obesity. *Lancet* 366, 1197-1209.

Henquin JC. 2011. The dual control of insulin secretion by glucose involves triggering and amplifying pathways in β -cells. *Diabetes Res Clin Pract.* 93 Suppl 1:S27-31.

Herrera-Pombo JL. Capítulo 1: Historia natural de la diabetes mellitus. Clasificación y diagnóstico de la diabetes mellitus y otras categorías de intolerancia a la glucosa. En: *Tratado SED de Diabetes Mellitus. Bases moleculares, clínicas y tratamiento.* Madrid: Editorial Médica Panamericana, S.A., 2007. Pág. 1-11.

Houamed KM, Sweet IR, Satin LS. 2010. BK channels mediate a novel ionic mechanism that regulates glucose-dependent electrical activity and insulin secretion in mouse pancreatic β -cells. *J Physiol.* 588(Pt 18):3511-23.

Irwin N, McClean PL, O'Harte FP, Gault VA, Harriott P, Flatt PR. 2007. Early administration of the glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor antagonist (Pro3)GIP prevents the development of diabetes and related metabolic abnormalities associated with genetically inherited obesity in ob/ob mice. *Diabetologia.* 50(7):1532-40.

Itoh Y, Kawamata Y, Harada M, Kobayashi M, Fujii R, Fukusumi S, Ogi K, Hosoya M, Tanaka Y, Uejima H, Tanaka H, Maruyama M, Satoh R, Okubo S, Kizawa H, Komatsu H, Matsumura F, Noguchi Y, Shinohara T, Hinuma S, Fujisawa Y, Fujino M. 2003. Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature.* 422(6928):173-6.

Ivarsson R, Quintens R, Dejonghe S, Tsukamoto K, in 't Veld P, Renström E, Schuit FC. 2005. Redox control of exocytosis: regulatory role of NADPH, thioredoxin, and glutaredoxin. *Diabetes*. 54(7):2132-42.

Jacobson DA, Mendez F, Thompson M, Torres J, Cochet O, Philipson LH. 2010. Calcium-activated and voltage-gated potassium channels of the pancreatic islet impart distinct and complementary roles during secretagogue induced electrical responses. *J Physiol*. 588(Pt 18):3525-37.

Jetton, TL, Liang, Y, Cincotta, AH, 2001. Systemic treatment with sympatholytic dopamine agonists improves aberrant beta-cell hyperplasia and GLUT2, glucokinase, and insulin immunoreactive levels in ob/ob mice. *Metabolism*. 50(11):1377-84.

Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. 2006. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*. 444(7121):840-6.

Kahn SE, Prigeon RL, McCulloch DK, Boyko EJ, Bergman RN, Schwartz MW, Neifing JL, Ward WK, Beard JC, Palmer JP, et al. 1993. Quantification of the relationship between insulin sensitivity and beta-cell function in human subjects. Evidence for a hyperbolic function. *Diabetes*. 42(11):1663-72.

Kahn SE. 2001. The importance of beta-cell failure in the development and progression of type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 86(9):4047-58.

Kanno, T., Rorsman, P., and Gopel, S.O. (2002). Glucose-dependent regulation of rhythmic action potential firing in pancreatic beta-cells by K(ATP)-channel modulation. *J Physiol* 545, 501-507.

Kargar C, Ktorza A. 2008. Anatomical versus functional beta-cell mass in experimental diabetes. *Diabetes Obes Metab*. 10 Suppl 4:43-53.

Klöppel G, Löhr M, Habich K, Oberholzer M, Heitz PU. 1985. Islet pathology and the pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes mellitus revisited. *Surv Synth Pathol Res*. 4(2):110-25.

Konrad D, Rudich A, Schoenle EJ. 2007. Improved glucose tolerance in mice receiving intraperitoneal transplantation of normal fat tissue. *Diabetologia*. 50(4):833-9.

Lindström P. 2007. The physiology of obese-hyperglycemic mice [ob/ob mice]. *ScientificWorldJournal*. 7:666-85.

Lindström P. 2010. Beta-cell function in obese-hyperglycemic mice [ob/ob Mice]. *Adv Exp Med Biol*. 2010;654:463-77.

Liu S, Mauvais-Jarvis F. 2010. Minireview: Estrogenic protection of beta-cell failure in metabolic diseases. *Endocrinology*. 151(3):859-64.

Liu YQ, Jetton TL, Leahy JL. 2002. beta-Cell adaptation to insulin resistance. Increased pyruvate carboxylase and malate-pyruvate shuttle activity in islets of nondiabetic Zucker fatty rats. *J Biol Chem*. 277(42):39163-8.

MacDonald, PE. 2011. Signal integration at the level of ion channel and exocytotic function in pancreatic β -cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 301(6):E1065-9.

- Marchetti P, Del Guerra S, Marselli L, Lupi R, Masini M, Pollera M. 2004. Pancreatic islets from type 2 diabetic patients have functional defects and increased apoptosis that are ameliorated by metformin. *J Clin Endocrinol Metab.* 89:5535–41.
- Marroquí L, Alonso-Magdalena P, Merino B, Fuentes E, Nadal A, Quesada I. 2014. Nutrient regulation of glucagon secretion: involvement in metabolism and diabetes. *Nutr Res Rev.* 27(1):48-62.
- Martin F, Sanchez-Andres JV, Soria B. 1995. Slow $[Ca^{2+}]_i$ oscillations induced by ketoisocaproate in single mouse pancreatic islets. *Diabetes.* 44(3):300-5.
- Mayer J, Silides N. 1953. A quantitative method of determination of the diabetogenic activity of growth hormone preparations. *Endocrinology.* 52:54–6.
- Moran A, Jacobs DR Jr, Steinberger J, Hong CP, Prineas R, Luepker R, Sinaiko AR. 1999. Insulin resistance during puberty: results from clamp studies in 357 children. *Diabetes.* 48(10):2039-44.
- Nadal A, Quesada I, Soria B. 1999. Homologous and heterologous asynchronicity between identified alpha-, beta- and delta-cells within intact islets of Langerhans in the mouse. *J Physiol.* 517 (Pt 1):85-93.
- Nathan DM, Turgeon H, Regan S. 2007. Relationship between glycated haemoglobin levels and mean glucose levels over time. *Diabetologia.* 50(11):2239-44.
- Park, SH, Ryu, SY, Yu, WJ, Han, YE, Ji, YS, Oh, K, Sohn, JW, et al., 2013. Leptin promotes K(ATP) channel trafficking by AMPK signaling in pancreatic β -cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(31):12673-8.
- Patterson, GH, Knobel, SM, Arkhammar, P, Thastrup, O, Piston, DW, 2000. Separation of the glucose-stimulated cytoplasmic and mitochondrial NAD(P)H responses in pancreatic islet beta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(10):5203-7.
- Perley M, Kipnis DM. 1966. Plasma insulin responses to glucose and tolbutamide of normal weight and obese diabetic and nondiabetic subjects. *Diabetes.* 15(12):867-74.
- Polonsky KS, Given BD, Van Cauter E. 1988. Twenty-four-hour profiles and pulsatile patterns of insulin secretion in normal and obese subjects. *J Clin Invest.* 81(2):442-8.
- Prentki M, Joly E, El-Assaad W, Roduit R. 2002. Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning, and glucolipotoxicity: role in beta-cell adaptation and failure in the etiology of diabetes. *Diabetes.* 51 Suppl 3:S405-13.
- Quesada I, Fuentes E, Andreu E, Meda P, Nadal A, Soria B. 2003. On-line analysis of gap junctions reveals more efficient electrical than dye coupling between islet cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 284(5):E980-7.
- Quesada I, Tudurí E, Ripoll C, Nadal A. 2008. Physiology of the pancreatic alpha-cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes. *J Endocrinol.* 199(1):5-19.
- Quesada, I, Todorova, MG, Soria, B, 2006. Different metabolic responses in alpha-, beta-, and delta-cells of the islet of Langerhans monitored by redox confocal microscopy. *Biophys J.* 90(7):2641-50.

- Rafacho, A, Marroquí, L, Taboga, SR, Abrantes, JL, Silveira, LR, Boschero, AC, et al., 2010. Glucocorticoids in vivo induce both insulin hypersecretion and enhanced glucose sensitivity of stimulus-secretion coupling in isolated rat islets. *Endocrinology*. 151(1):85-95.
- Reaven GM. 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 37(12):1595-607.
- Reinbothe TM, Ivarsson R, Li DQ, Niazi O, Jing X, Zhang E, Stenson L, Bryborn U, Renström E. 2009. Glutaredoxin-1 mediates NADPH-dependent stimulation of calcium-dependent insulin secretion. *Mol Endocrinol*. 23(6):893-900.
- Rorsman P, Braun M. 2013. Regulation of insulin secretion in human pancreatic islets. *Annu Rev Physiol*. 2013;75:155-79.
- Rorsman P, Trube G. 1986. Calcium and delayed potassium currents in mouse pancreatic beta-cells under voltage-clamp conditions. *J Physiol*. 374, 531-550.
- Rosario, LM, Atwater, I, Rojas, E, 1985. Membrane potential measurements in islets of Langerhans from ob/ob obese mice suggest an alteration in $[Ca^{2+}]_i$ -activated K^+ permeability. *Q J Exp Physiol*. 70(1):137-50.
- Rosario, LM. 1985. Differential effects of the K^+ channel blockers apamin and quinine on glucose-induced electrical activity in pancreatic beta-cells from a strain of ob/ob (obese) mice. *FEBS Lett*. 188(2):302-6.
- Sachdeva MM, Stoffers DA. 2009. Minireview: Meeting the demand for insulin: molecular mechanisms of adaptive postnatal beta-cell mass expansion. *Mol Endocrinol*. 23(6):747-58.
- Saisho Y, Butler AE, Manesso E, Elashoff D, Rizza RA, Butler PC. 2013. β -cell mass and turnover in humans: effects of obesity and aging. *Diabetes Care*. 36(1):111-7.
- Saleh MC, Wheeler MB, Chan CB. 2006. Endogenous islet uncoupling protein-2 expression and loss of glucose homeostasis in ob/ob mice. *J Endocrinol*. 190(3):659-67.
- Salehi A, Vieira E, Gylfe E. 2006. Paradoxical stimulation of glucagon secretion by high glucose concentrations. *Diabetes*. 55(8):2318-23.
- Santos RM, Rosario LM, Nadal A, Garcia-Sancho J, Soria B, Valdeolmillos M. 1991. Widespread synchronous $[Ca^{2+}]_i$ oscillations due to bursting electrical activity in single pancreatic islets. *Pflugers Arch*. 418(4):417-22.
- Scherer PE. 2006. Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. *Diabetes*. 55(6):1537-45.
- Seino S, Shibasaki T, Minami K. 2011. Dynamics of insulin secretion and the clinical implications for obesity and diabetes. *J Clin Invest*. 121(6):2118-25.
- Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. 2006. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest*. 116(7):1793-801.
- Smith PA, Bokvist K, Rorsman P. 1989. Demonstration of A-currents in pancreatic islet cells. *Pflugers Arch*. 413, 441-443.

- Stefanovski D, Richey JM, Woolcott O, Lottati M, Zheng D, Harrison LN, Ionut V, Kim SP, Hsu I, Bergman RN. 2011. Consistency of the disposition index in the face of diet induced insulin resistance: potential role of FFA. *PLoS One*. 6(3):e18134.
- Taborsky GJ Jr, Munding TO. 2012. Minireview: The role of the autonomic nervous system in mediating the glucagon response to hypoglycemia. *Endocrinology* 153(3):1055-62.
- Tomita, T, Doull, V, Pollock, HG, Krizsan, D, 1992. Pancreatic islets of obese hyperglycemic mice (ob/ob). *Pancreas*. 7(3):367-75.
- Valdeolmillos M, Nadal A, Soria B, García-Sancho J. 1993. Fluorescence digital image analysis of glucose-induced $[Ca^{2+}]_i$ oscillations in mouse pancreatic islets of Langerhans. *Diabetes*. 42(8):1210-4.
- Valdeolmillos M, Santos RM, Contreras D, Soria B, Rosario LM. 1989. Glucose-induced oscillations of intracellular Ca^{2+} concentration resembling bursting electrical activity in single mouse islets of Langerhans. *FEBS Lett*. 259(1):19-23.
- Virtue S, Vidal-Puig A. 2008. It's not how fat you are, it's what you do with it that counts. *PLoS Biol*. 6(9):e237.
- Vozzi C, Ullrich S, Charollais A, Philippe J, Orci L, Meda P. 1995. Adequate connexin-mediated coupling is required for proper insulin production. *J Cell Biol*. 131(6 Pt 1):1561-72.
- Weir GC, Bonner-Weir S. 2004. Five stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes. *Diabetes*. 53 Suppl 3:S16-21.
- Wellen KE, Hotamisligil GS. 2005. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest*. 115(5):1111-9.
- Xia Z, Sniderman AD, Cianflone K. 2002. Acylation-stimulating protein (ASP) deficiency induces obesity resistance and increased energy expenditure in ob/ob mice. *J Biol Chem*. 277(48):45874-9.
- Zhou YP, Grill VE. 1994. Long-term exposure of rat pancreatic islets to fatty acids inhibits glucose-induced insulin secretion and biosynthesis through a glucose fatty acid cycle. *J Clin Invest*. 93(2):870-6.
- Zhou YP, Pena JC, Roe MW, Mittal A, Levisetti M, Baldwin AC, Pugh W, Ostrega D, Ahmed N, Bindokas VP, Philipson LH, Hanahan D, Thompson CB, Polonsky KS. 2000. Overexpression of Bcl-x(L) in beta-cells prevents cell death but impairs mitochondrial signal for insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 278(2):E340-51.