



Universidad Miguel Hernández de Elche

Facultad de Ciencias Experimentales

TFG del Grado en Biotecnología

Departamento de Fisiología

Curso 2023 - 2024



Estudio del papel del receptor de estrógenos ER β
en la regulación de las corrientes de sodio y
potasio en célula β - pancreática usando la línea
celular INS-1E

Autor: Pedro Del Buey Salas

Tutor: Ángel Nadal Navajas

Cotutor: Roberto Sempere Martínez

Índice

1.Resumen:	3
2.Palabras clave:	4
3.Antecedentes:	4
4.Objetivos:	5
5.Introducción:.....	5
• Páncreas endocrino.....	5
• El islote de Langerhans:.....	5
• La célula beta pancreática.....	7
• Acoplamiento estímulo secreción.....	8
○ Canales iónicos y actividad eléctrica.....	11
○ Canal de K ⁺ sensible a ATP.....	11
○ Canales de Na ⁺ dependientes de voltaje.....	13
○ Canales de K ⁺ dependientes de voltaje.....	14
• Los receptores de estrógenos.....	17
○ ER α y ER β	18
○ GPER.....	18
• Moduladores de los receptores de estrógenos.....	20
6. Materiales y métodos:	21
• Materiales.....	22
• Métodos.....	24
7.Resultados:	32
8.Discusión:	35
• Corrientes de K ⁺	35
• Corrientes de Na ⁺	35
9.Conclusión y proyección futura:	36
10.Bibliografía:	37

1.RESUMEN:

Las hormonas esteroideas, como los estrógenos, además de sus conocidas acciones en el sistema reproductor, han demostrado tener efectos relevantes en la función de las células beta pancreáticas y la homeostasis de la glucosa [1]. Investigaciones recientes han sugerido que estos efectos de los estrógenos sobre el metabolismo de la glucosa podrían estar mediados por los receptores de estrógenos beta ($ER\beta$) y alfa ($ER\alpha$). Estos receptores se expresan abundantemente en los islotes pancreáticos y las células beta [3]. La función de la célula beta pancreática depende en gran medida de la actividad eléctrica producida por canales iónicos, incluyendo canales de potasio, sodio y calcio. En este proyecto utilizaremos la técnica de patch-clamp en su modalidad de célula entera para estudiar el papel del receptor de estrógenos $ER\beta$ en la regulación de las corrientes de potasio y de sodio. Como técnicas se utilizarán la línea celular secretora de insulina INS-1E, de rata. Este trabajo se centra en el manejo de esta línea, y en la utilización de la técnica de patch-clamp para estudiar las corrientes en condiciones de mayor actividad de $ER\beta$ producida por el agonista DPN, y, compararlas con un grupo control, con actividad normal de $ER\beta$.

1.ABSTRACT:

Steroid hormones, such as oestrogens, in addition to their known actions on the reproductive system, have been shown to have relevant effects on pancreatic beta-cell function and glucose homeostasis [1]. Recent research has suggested that these effects of oestrogens on glucose metabolism may be mediated by oestrogen receptors beta ($ER\beta$) and alpha ($ER\alpha$). These receptors are abundantly expressed in pancreatic islets and beta cells [3]. Pancreatic beta cell function is highly dependent on electrical activity produced by ion channels, including potassium, sodium and calcium channels. In this project we will use the whole-cell patch-clamp technique to study the role of the estrogen receptor $ER\beta$ in the regulation of potassium and sodium currents. The rat insulin-secreting cell line INS-1E will be used as techniques. The present work focuses on the handling of this line and the use of the patch-clamp technique to study the currents under conditions of increased $ER\beta$ activity produced by the agonist DPN, and compare them with a control group with normal $ER\beta$ activity.

2.PALABRAS CLAVE:

GSIS: Secreción de insulina estimulada por glucosa

VDCC: Canales de calcio dependientes de voltaje

K_{ATP}: Canal de potasio sensible a ATP

Kv2.1/Kv2.2 : Canales de potasio dependientes de voltaje

ER β /ER α : Receptores de estrógenos

Nav1.3/Nav1.7: Canales de sodio dependientes de voltaje

3.ANTECEDENTES:

Las hormonas esteroideas, como los estrógenos, han demostrado tener efectos relevantes en la función de las células beta pancreáticas y la homeostasis de la glucosa [1], además de sus conocidas acciones en el sistema reproductor. Diversos estudios han evidenciado la presencia de receptores estrogénicos en las células beta e islotes pancreáticos, sugiriendo un papel de estas hormonas en la regulación de la secreción de insulina.

En modelos animales, la deficiencia de estrógenos como en el estado de ovariectomía se ha asociado con intolerancia a la glucosa y disfunción de las células beta. Por otra parte, la terapia de reemplazo con estrógenos ha demostrado mejorar la sensibilidad a la insulina y la función secretora de las células beta en roedores ovariectomizados [2].

Investigaciones recientes han sugerido que estos efectos de los estrógenos sobre el metabolismo de la glucosa podrían estar mediados por los receptores estrogénicos beta (ER β) y alfa (ER α). Estos receptores se expresan abundantemente en los islotes pancreáticos y las células beta[3].

Estudios en modelos celulares y animales con ratones knockout para ER β y ER α han revelado un deterioro en la secreción de insulina estimulada por glucosa y una mayor susceptibilidad a desarrollar intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina [3]. Estos hallazgos sugieren que la activación de ER β y ER α podría ser clave para mantener una adecuada función de las células beta.

Aunque los efectos y mecanismo moleculares y celulares en los que se implica ER α son relativamente conocidos, los relacionados con ER β están menos estudiados. Algunas evidencias apuntan a que ER β podría modular la actividad de canales iónicos involucrados en el acoplamiento estímulo-secreción de insulina en las células beta, como los canales de potasio sensibles a ATP (K_{ATP}) [4]. No obstante, se requiere mayor investigación para dilucidar estas vías de señalización.

En este trabajo estudiamos si la activación del receptor ER β usando un agonista específico modifica las corrientes de sodio y de potasio, ya que, se ha visto en estudios anteriores que la expresión de varios canales de estos iones se ve alterada en función de la actividad de ER β . Existe un creciente interés en comprender el papel del receptor ER β en la función de las células beta pancreáticas y el control de la homeostasis de la glucosa, dada su potencial relevancia terapéutica en el tratamiento de la diabetes mellitus y los desórdenes metabólicos relacionados.

4.OBJETIVOS:

- Estudiar el papel del receptor de estrógenos ER β en la regulación de las corrientes iónicas de sodio y potasio , en la línea celular β -pancreática INS-1E
- Medir las corrientes de sodio (Na⁺) y de potasio (K⁺) en dos cohortes de células, una de ellas, incubada durante un tiempo fijo en medio con DPN, y que constituye la condición de mayor activación de ER β , y la otra cohorte, la control, que constituye la condición de actividad normal de ER β .

5.INTRODUCCIÓN:

5.1Páncreas endocrino:

El páncreas endocrino es uno de los dos tejidos funcionales principales que conforman el páncreas junto con el páncreas exocrino, su unidad funcional es el islote de Langerhans(Fig1). La función principal del páncreas endocrino es la biosíntesis y secreción de diversas hormonas importantes para la homeostasis de la glucosa y el metabolismo del organismo. El páncreas endocrino constituye solamente un 2% del páncreas, en el organismo humano está constituido por entre 1 y 2 millones de islotes, que se encuentran embebidos en el parénquima exocrino del páncreas, y se localizan principalmente en la parte central y en la cola [5].

El páncreas, y, especialmente los islotes de Langerhans se encuentran altamente irrigados por una densa red de capilares que reciben sangre de la circulación sistémica a través de la arteria esplénica, lo que permite a la porción endocrina reaccionar rápidamente a los cambios en la concentración de glucosa plasmática [5].

5.2 El islote de Langerhans:

Los islotes de Langerhans son agregados celulares de origen endodérmico que se encuentran diseminados en el parénquima del páncreas.

Desde el punto de vista histológico, los islotes se componen de diferentes poblaciones celulares (Fig1). Las células más abundantes son las células beta, productoras de insulina. Estas se ubican predominantemente en la región central del islote. La segunda población más numerosa son las células alfa, encargadas de sintetizar glucagón, localizadas en la periferia. Adicionalmente, se identifican las células delta secretoras de somatostatina, las células PP o F productoras de polipéptido pancreático, y las poco frecuentes células épsilon que liberan grelina [5].

Existen ciertas diferencias a nivel histológico en la composición del islote pancreático de los humanos con respecto al de los roedores murinos (utilizados en investigación) (Fig1), también existen importantes diferencias en la fisiología de la célula beta pancreática, como se describe más adelante [5].

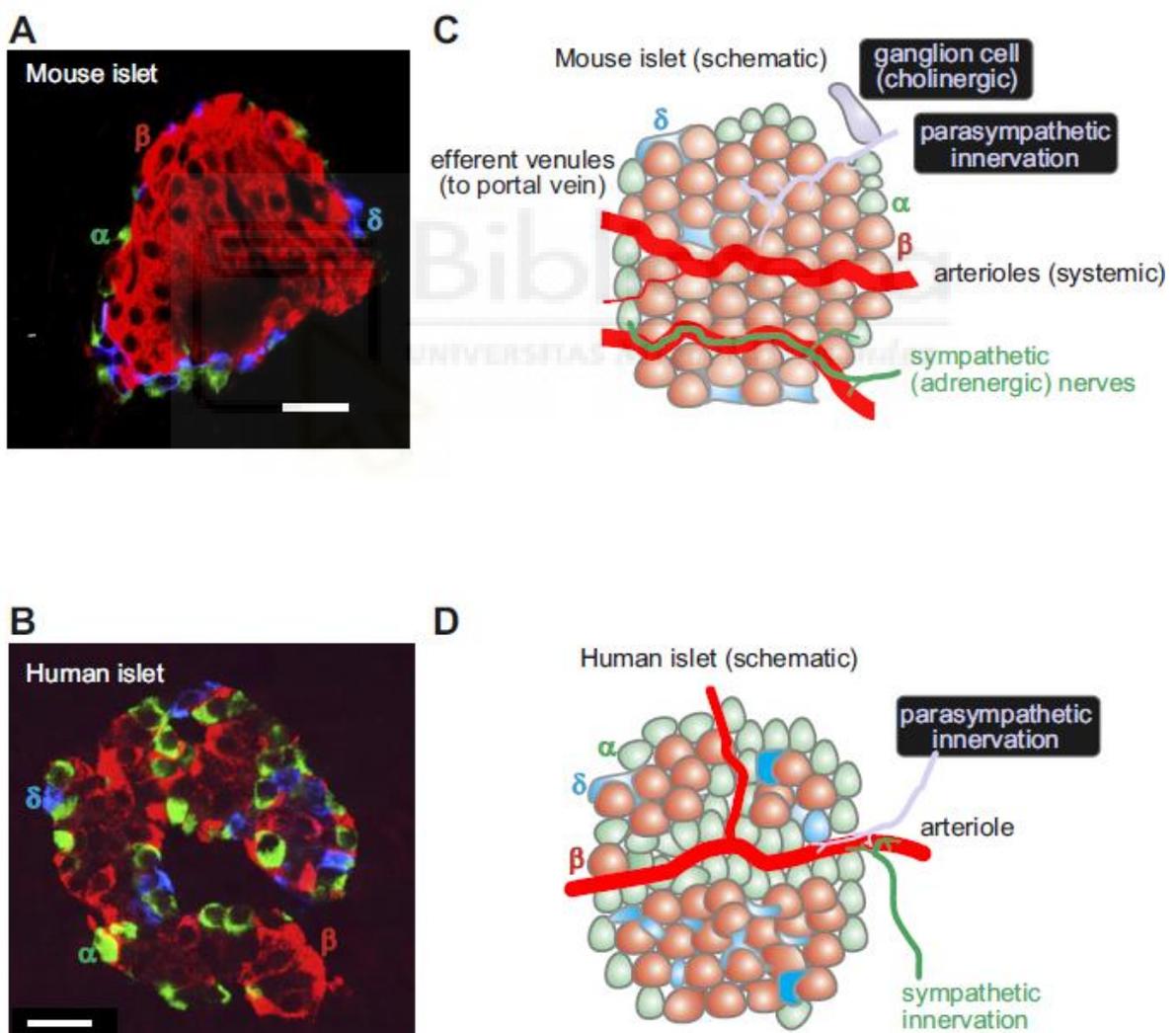


Fig1: Imagen obtenida por microscopía óptica confocal de fluorescencia de islotes pancreáticos teñidos por inmunohistoquímica de ratón (A) y de humano (B), se observan en rojo las células β , en verde las células α , y en azul las células delta (δ), las figuras C y D, representan la estructura de los islotes de ratón y de humano respectivamente de forma esquemática (obtenida de *Rorsman and Ashcroft, 2018*).

	Células Alfa (α) glucagón	Células beta (β) insulina	Células delta (δ) somatostatina
Ratón	15%	75%	5%
Humano	35-40%	50%	10-15%

Tabla1: %de células de cada tipo del total de células que compone cada islote en ratón y en humano (obtenida de Rorsman and Ashcroft, 2018)

La función principal de este micro-órgano es la regulación de la homeostasis de la glucosa sanguínea a través de un fino equilibrio entre las hormonas hiper e hipoglucemiantes insulina y glucagón respectivamente. Asimismo, la somatostatina actúa modulando o inhibiendo la secreción de dichas hormonas de manera coordinada.

En condiciones patológicas como la diabetes mellitus, se presentan alteraciones en la estructura y fisiología de los islotes pancreáticos que comprometen gravemente su actividad endocrina.

5.3 La célula beta pancreática:

La célula beta pancreática es el principal tipo celular que compone el islote de Langerhans, a nivel morfológico es una célula con forma poliédrica, con un diámetro de entre 13 y 18 μ m, su citoplasma posee gran cantidad de un tipo de vesículas llamadas gránulos secretores, los cuales contienen insulina en forma de Zn²⁺ – insulina₆ (un hexámero de insulina coordinado con dos átomos de zinc)[25]. Se trata de una célula eléctricamente excitable, y capaz de disparar potenciales de acción, proceso que será el que desencadene la secreción de la insulina. El potencial de membrana en reposo es de aproximadamente -60mV, este potencial de membrana, es mantenido gracias a un canal de potasio sensible a ATP que se encuentra en la célula β , el canal K_{ATP}, junto con la bomba electrogénica sodio potasio ATPasa que se encuentra constitutivamente activa, proteína se trata de un canal de potasio constitutivamente abierto que permite la difusión de K⁺ hacia afuera de la célula, manteniendo la polarización de -60mV. Cuando aumenta el ratio ATP/ADP en la célula debido al metabolismo de la glucosa, el aumento de ATP induce el cierre del canal, el bloqueo consecuente del canal de potasio hace que la célula se despolarice debido a las pequeñas corrientes entrantes de sodio, provocando que la célula genere potenciales de acción que conducen a la secreción de insulina (Fig 2).

5.4 Acoplamiento estímulo secreción:

La célula beta pancreática es capaz de detectar aumentos en la glucemia y de responder a estos cambios con la secreción de insulina. La glucosa proveniente de la circulación sanguínea entra a la célula β a través del transportador de glucosa *glut2* (en ratones) o *GLUT1* (en humanos). La glucosa es fosforilada, transformándose en glucosa- 6- fosfato por la enzima glucoquinasa (GCK), iniciando el proceso de glucólisis. Este paso es diferente al del resto de las células, ya que esta reacción normalmente es catalizada por la enzima hexoquinasa, la enzima glucoquinasa únicamente se expresa en el hígado y en células pancreáticas, y a diferencia de la hexoquinasa no presencia inhibición por el producto (G6P) [5].

La G6P es degradada a piruvato en la glucólisis, y, en el caso particular de la célula β , casi todo el piruvato entra en el ciclo de Krebs, en este tipo celular, las vías alternativas del piruvato como la síntesis de glucógeno, aminoácidos o ácidos grasos, así como la vía de las pentosas fosfato o la del sorbitol se encuentran muy poco activas, de manera que la mayoría de glucosa captada se transforma directamente en ATP [26].

La célula β -pancreática posee un canal de K^+ sensible a ATP (K_{ATP}) que se encuentra abierto a concentraciones bajas de glucosa. La generación de ATP consecuencia del catabolismo de la glucosa, aumenta la razón ATP/ADP de la célula, el aumento del ratio ATP/ADP induce el cierre del canal K_{ATP} . El cierre del canal K_{ATP} hace que la célula se despolarice paulatinamente, en el caso del ratón, esta despolarización hace que el potencial de membrana aumente hasta llegar al umbral de activación de los canales de calcio dependientes de voltaje (VDCC), la consecuente entrada de Ca^{2+} en el citoplasma provoca que los gránulos secretores se fusionen con la membrana liberando la insulina que contienen al torrente sanguíneo [24], debido a que las proteínas que permiten este proceso dependen de calcio para ello (Fig2).

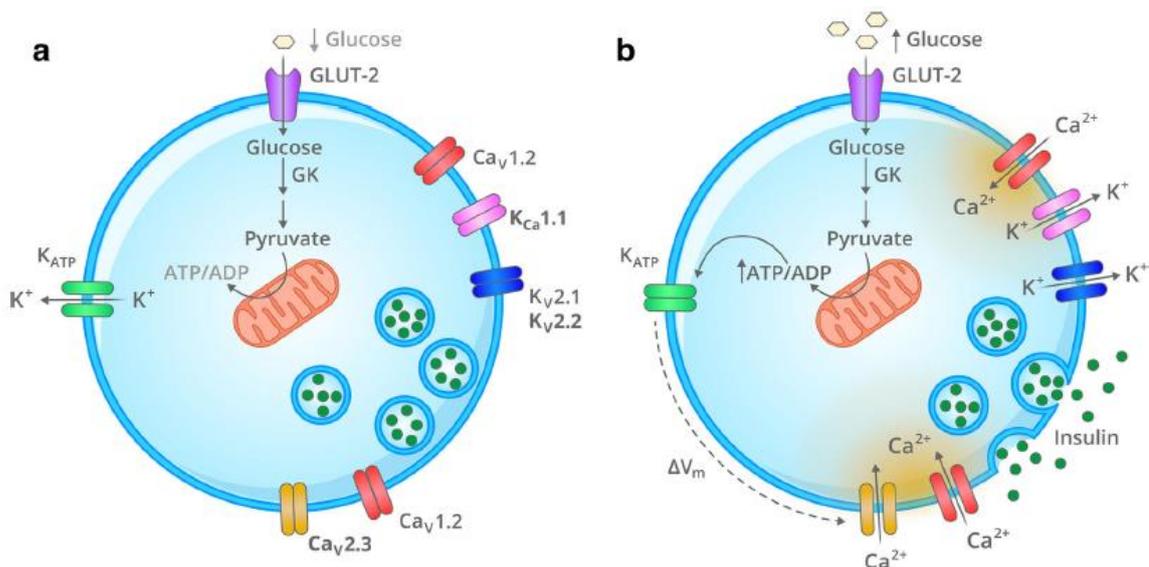


Fig2: El esquema representa una célula β en condiciones de baja glucosa (a) y en condiciones de alta glucosa(b), en las condiciones de baja glucosa (a), entra poca glucosa a la célula, lo que se traduce en una menor producción de ATP, esto hace que el ratio ATP/ADP sea bajo, como consecuencia el canal K_{ATP} (que se encuentra activo a una baja [ATP] y alta [ADP]) se encuentra activo, extrayendo potasio, por lo que la célula se encuentra polarizada, lo que significa que el potencial de membrana se encuentra por debajo del umbral de activación de los canales de Na^+ y K^+ dependientes de voltaje y la célula no secreta insulina. En la figura b se representa una situación de elevada glucosa, en esta, entra más glucosa a la célula, lo que se traduce en una mayor producción de ATP por glucólisis/ ciclo de Krebs/fosforilación oxidativa, como consecuencia, aumenta el ratio ATP/ADP, y por tanto el aumento de ATP inhibe la actividad del K_{ATP} , como consecuencia de ello, la célula se despolariza debido a pequeñas corrientes de entrada, al despolarizarse la célula, se activan los VDCC permitiendo la entrada de calcio y la secreción de insulina (Martínez-Pinna *et al.*, 2019) .

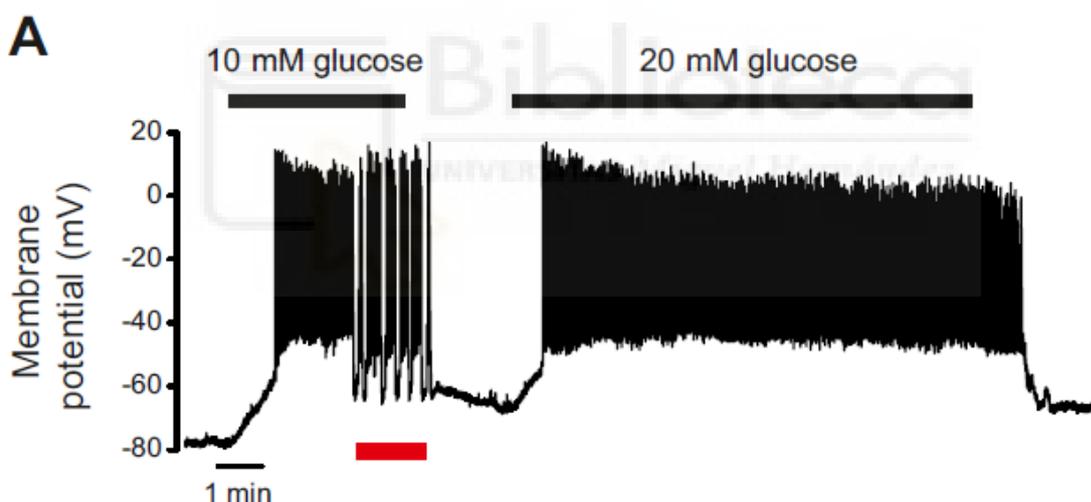


Fig3: Representación de un registro del potencial de membrana en current clamp en el que se observa la frecuencia de disparo de potenciales de acción en función de la concentración de glucosa, esto es debido a que la el ratio de ATP/ADP es inversamente proporcional a la probabilidad de apertura del canal K_{ATP} y a su conductancia, por lo que el aumentar el ratio ATP/ADP disminuye la corriente neta de K^+ hacia afuera, aumentando la despolarización y la frecuencia de disparo (obtenida de Rorsman and Ashcroft, 2018).

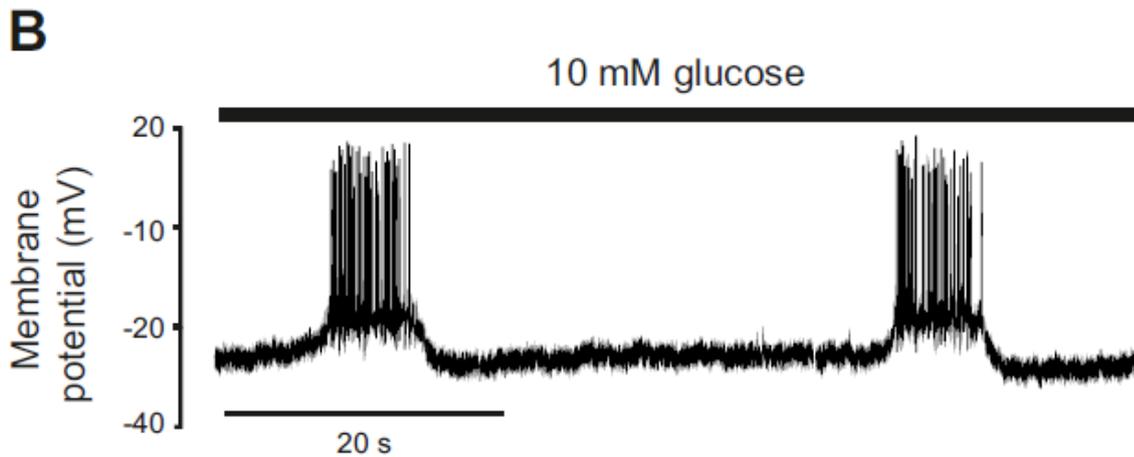


Fig4: Potencial de membrana con respecto al tiempo a 10mM de glucosa, en un intervalo de tiempo de 20s, como se puede observar, la actividad eléctrica de la célula β tiene la característica de ser a ráfagas, es decir, cuando se produce la despolarización, la célula genera muchos PA seguidos (ráfaga), cada ráfaga está separada por un intervalo sin actividad eléctrica (obtenida de Rorsman and Ashcroft, 2018).

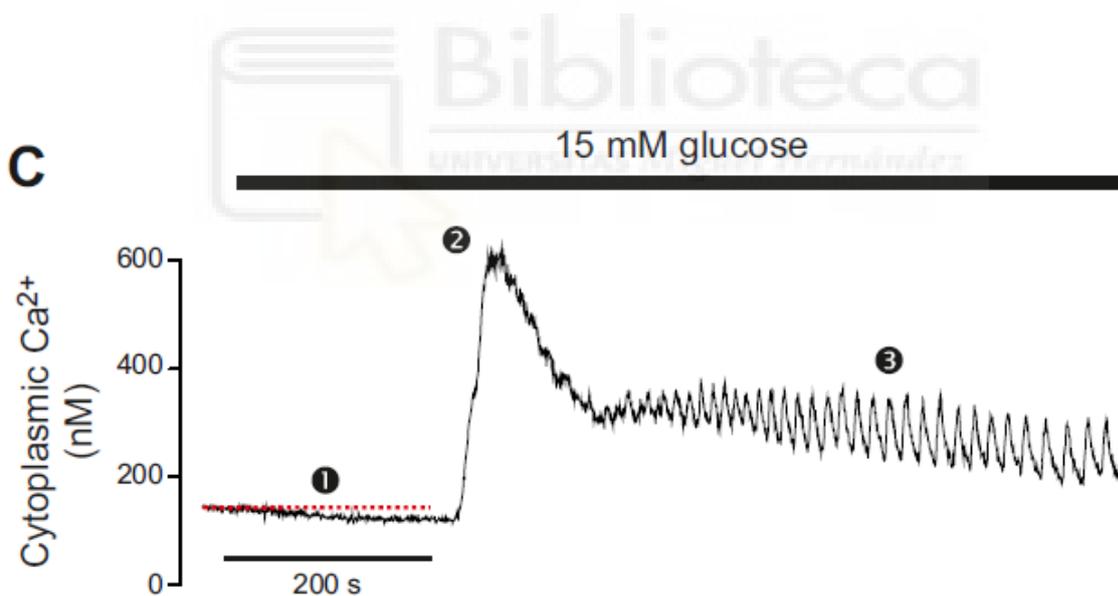


Fig5: Representación de la concentración intracelular de calcio en nM tras un aumento de glucosa de 0 a 15nM, se observa un aumento rápido de la $[Ca^{2+}]_i$ seguido de un periodo de rápidas oscilaciones, el cual se relaciona con los rápidos potenciales de acción y tiene como consecuencia, una secreción intermitente de insulina (obtenida de Rorsman and Ashcroft, 2018).

5.4.1 Corrientes iónicas y actividad eléctrica:

El proceso de secreción de insulina en la célula β de ratón está directamente regulado por las corrientes iónicas, que responden rápidamente a las señales intracelulares. Las corrientes iónicas principales son las corrientes de potasio, sodio y calcio (Fig6), las tres corrientes iónicas son responsables de la generación del potencial de acción (Figs3 y 4).

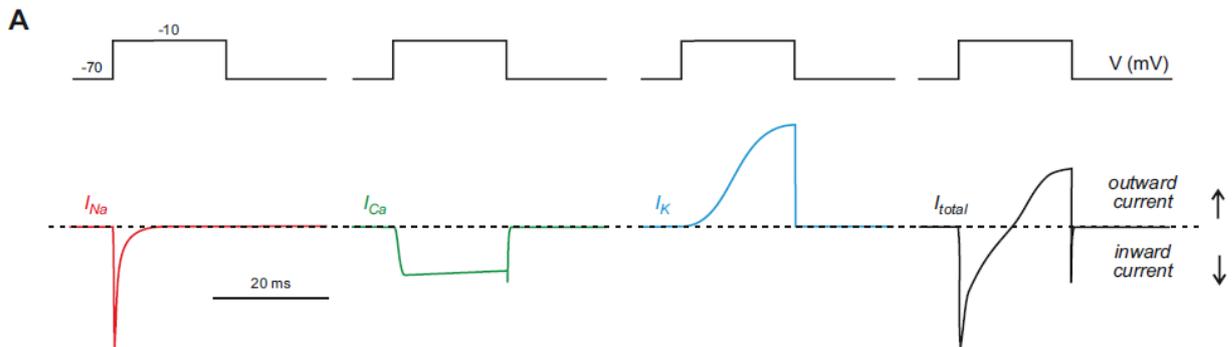


Fig6: Esquema que representa por separado las corrientes iónicas que participan en los potenciales de acción; y la corriente total al final, aplicando una despolarización de -70 a -10mV (en voltage clamp), el calcio y el sodio generan corrientes de entrada en la célula, moviéndose a favor del gradiente electroquímico, mientras que la de potasio es de salida (repolarizante), debido a que en el pico del potencial de acción, el potencial de membrana es positivo, por lo que el potasio tiende a salir (obtenida de Rorsman and Ashcroft, 2018).

5.4.2 Canal de potasio sensible a ATP:

El canal de potasio sensible a ATP es el canal que controla en última instancia la producción de potenciales de acción en la célula β -pancreática, de manera indirecta, a través de la disminución de la conductancia de la membrana para el potasio al cerrarse, lo que hace que la célula finalmente se despolarice debido al flujo neto de iones positivos hacia el interior de la célula.

El canal de K^+ sensible a ATP está formado por 4 subunidades Kir6.2, que forman un homotetrámero que constituye el poro transmembrana del canal, y 4 subunidades reguladoras SUR1(receptor de sulfonilureas) (Fig7).

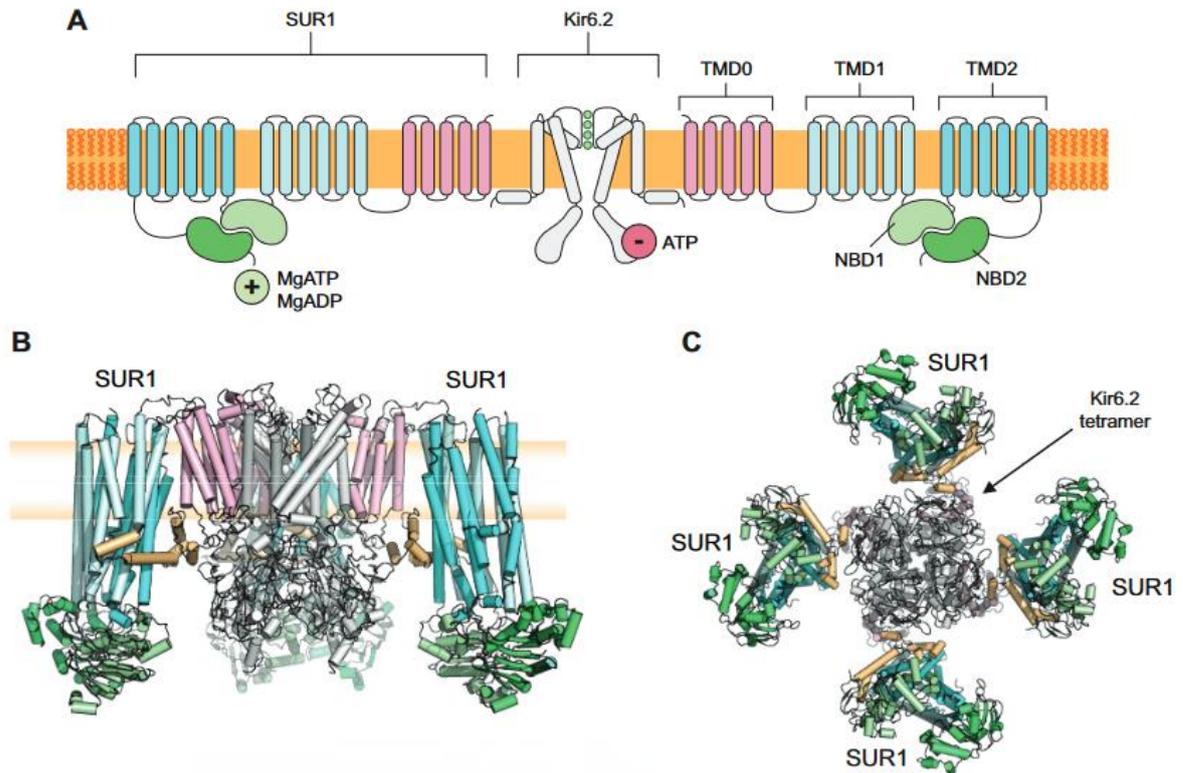


Fig7: Estructura del canal KATP: En el estado de alta energía (alta [ATP] y baja[ADP]) que como hemos explicado antes se corresponde con una alta glucemia en sangre, el ATP del citoplasma generado por el metabolismo de la glucosa, se une al canal Kir6.2 produciendo el cierre del canal, lo que impide la salida del potasio, produciendo que, eventualmente la célula se despolarice y libere insulina. En cambio, en condiciones de baja energía, (baja [ATP] y alta[ADP]), el ATP se une a Kir6.2 en mucha menor medida, y, al mismo tiempo, el ADP en la forma MgADP, se une a los dominios SUR1, produciendo la activación de Kir6.2, de manera que aumenta la probabilidad de apertura del canal, produciendo la salida de K^+ , y por tanto, manteniendo la célula hiperpolarizada, impidiendo la liberación de insulina (obtenida de Rorsman and Ashcroft, 2018).

5.5 Corrientes responsables de la generación de los potenciales de acción:

El umbral a partir del cual la despolarización de la célula llevará al potencial de acción, viene determinado por el potencial de activación de los canales iónicos dependientes de voltaje que se describirán a continuación. Estos canales iónicos voltaje-dependientes, se abren produciendo rápidas corrientes de entrada que se propagan a lo largo de la membrana, que a su vez activarán otros canales iónicos voltaje dependientes de salida de K^+ , esto conllevará una inversión del potencial de membrana seguida de una repolarización, y todo este proceso

se manifiesta en forma de un potencial de acción, que acabará induciendo la secreción de insulina por la entrada de Ca^{2+} .

5.5.1 Canales de Ca^{2+} activados por voltaje:

Son canales específicos para el calcio que se abren al alcanzarse un determinado potencial de membrana por encima del potencial de reposo (entre -60 y -70mV) , en células beta pancreáticas humanas, las corrientes de sodio empiezan a ser detectables a -60mV y es máxima a entre -40 y -30 mV. En la célula beta de ratón, comienza a ser detectable a -50mV y es máxima a 0mV. Estas diferencias entre célula β de humano y ratón se debe a la diferente proporción en la que están presentes los diferentes tipos de canales de calcio en la membrana (en ratón se expresan los canales de calcio tipo L y N, mientras que en humano se expresan los tipo L y T), cada tipo de canal difiere en sus propiedades biofísicas (cinética de apertura y de inactivación, umbral de activación etc...) y en las toxinas exógenas que bloquean el canal.

5.5.2 Canales de Na^{+} dependientes de voltaje:

Son canales de entrada específicos para el Na^{+} que se activan al alcanzarse un determinado potencial, contribuyen junto con los canales de Ca^{2+} al potencial de acción. Se ha visto que estos canales podrían tener funciones diferentes en la célula beta de ratón y de humano. En la célula β de ratón, las corrientes de Na^{+} están generadas principalmente por el canal Nav1.7 (Fig8) y parecen tener muy poca influencia en la despolarización (las corrientes de entrada del potencial de acción son principalmente de Ca^{2+})[22];[23];[5], no obstante, su función parece estar involucrada en el mantenimiento de una actividad secretora basal a bajas concentraciones de glucosa, ya que se ha comprobado que la $[\text{Ca}^{2+}]$ intracelular disminuye al bloquear los canales de sodio dependientes de voltaje[22];[23]. En humanos, el principal canal es el Nav1.6, que representa un 40% del total de canales de sodio y el resto lo conforman los canales Nav1.7(Fig8), Nav1.3 y Nav1.2 la función de estos canales parece tener mayor importancia que en ratón, ya que su bloqueo produce una disminución importante en la amplitud del potencial de acción y en muchos casos, acaba impidiendo su generación. Hay que tener en cuenta que los canales de Na^{+} presentan inactivación, es decir, tras abrirse, un dominio proteico del canal, se une rápidamente tapando el poro, e impidiendo el paso de iones aún cuando el potencial de membrana sigue estando por encima del umbral, en el caso del ratón, se ha observado que los canales de Na^{+} se encuentran en gran parte inactivados en el potencial de reposo, requiriendo un potencial más negativo para poder desinactivarse[5].

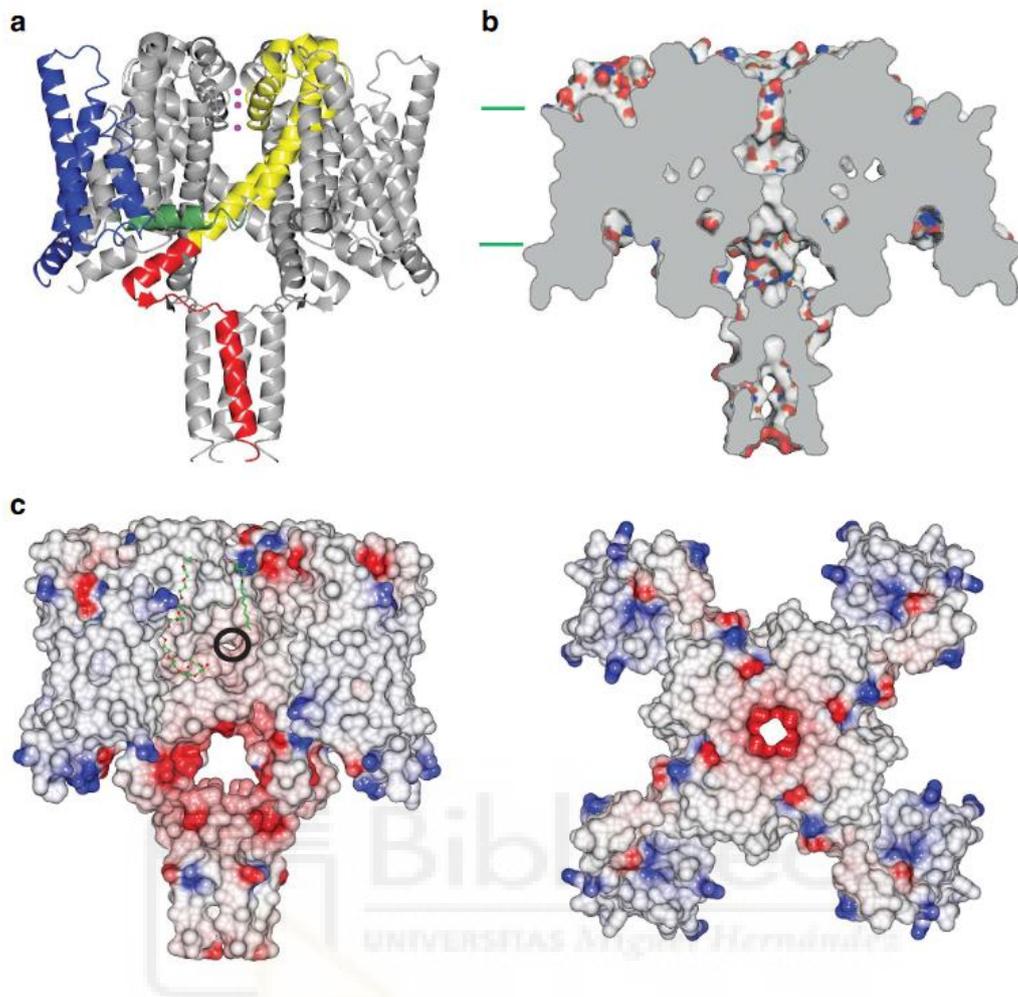


Fig8: Estructura del canal de sodio Nav1.7, de expresión predominante entre todos los canales de Na^+ en ratón y en rata [5], el canal, está formado por un homotetrámero de 4 subunidades alfa, en el modelo a, de la figura se representa en color, las distintas partes del monómero que constituye la subunidad α , de la siguiente manera: sensor de voltaje (azul), enlazador S4-S5 (verde), hélices formadoras del poro (amarillo), dominio C-terminal (rojo) e iones de sodio (púrpura). (obtenida de Sulaet *al.*, 2017).

5.5.3 Canales de K^+ dependientes de voltaje:

Son canales de salida específicos para el K^+ que se activan cuando la membrana está bastante despolarizada (potenciales de entre -20 y -10 mV) [21]. El más importante en la célula beta pancreática de ratón es el canal Kv2.1 (Fig9) (codificado por el gen *kcnb1*) se activa entre 20 y 30 milisegundos después del inicio del potencial de acción, contrarrestando la entrada de Ca^{2+} y de Na^+ , después de la activación de estos últimos, permitiendo la repolarización de la zona donde se encuentran y permitiendo que la membrana se vuelva a cargar rápidamente

[5]. Esta corriente de potasio hacia afuera contribuye al periodo refractario del potencial de acción, durante la actividad eléctrica, otros canales de potasio dependientes de voltaje como el Kv11.2 o Kv11.1 contribuyen también a la modulación de la frecuencia de los potenciales de acción activándose durante la fase de repolarización (al final del potencial de acción), generando corrientes de potasio retardadas, llamadas “Tail currents” que mantienen la célula hiperpolarizada, unos instantes después del potencial de acción, regulando de esta manera la frecuencia de disparo de potenciales de acción[5]. Cabe destacar que, a diferencia de la célula murina, en la célula humana, las corrientes repolarizantes de potasio están mediadas principalmente por los canales Kv2.2 y Kv1.6 (Fig 10) [5].

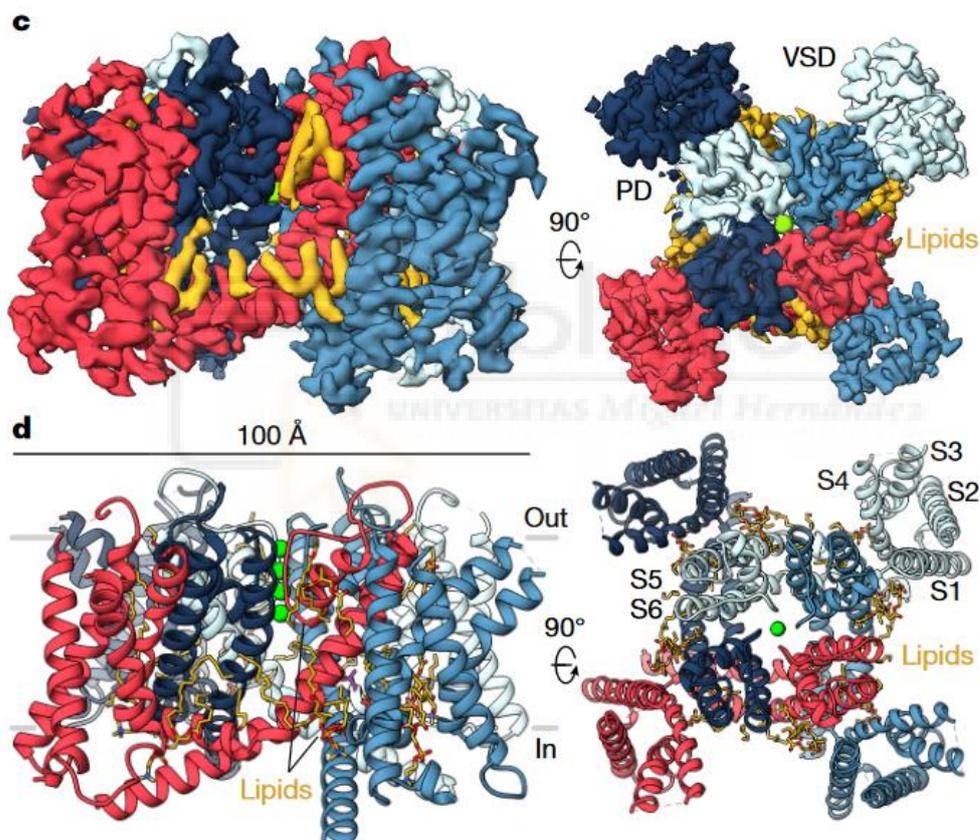


Fig9: Estructura del canal Kv2.1, formado por un tetrámero de subunidades α , cada una, representada en colores diferentes. Cada subunidad α , posee un dominio sensible a voltaje (VSD), y un dominio formador de poro (PD). (obtenida de Fernández-Mariño *et al.*,2023).

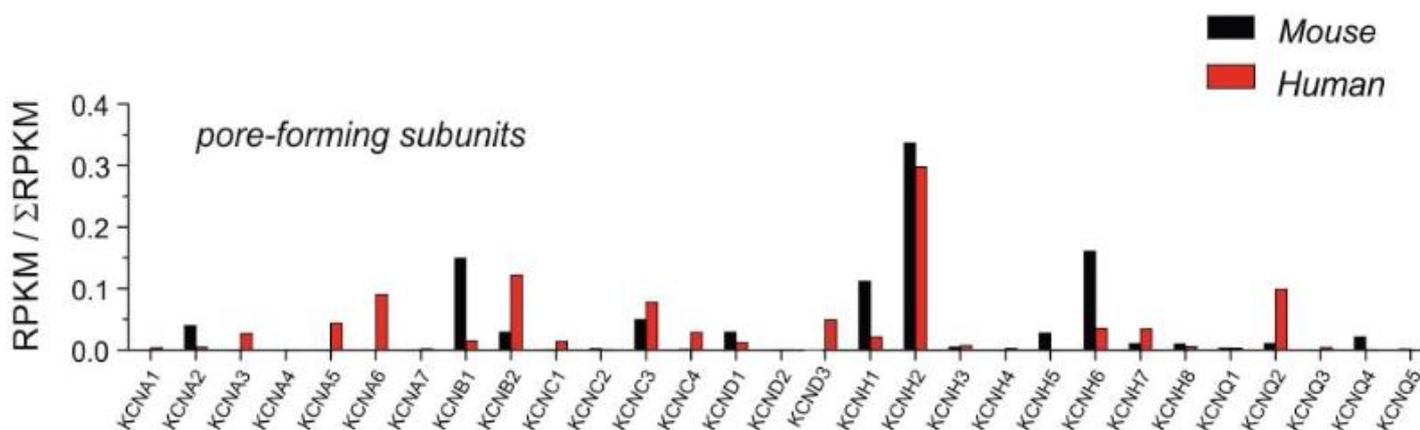


Fig10: La figura compara la expresión relativa de cada gen de canal de potasio en ratones y en humanos. Como se observa, en la célulaβ humana predomina la expresión de los canales de K⁺ repolarizantes Kv2.2 (KCNB2) y Kv1.6 (KCNA6), mientras que, en célula β de ratón , predominan Kv 2.1 (KCNB1) y Kv 10.1(KCNH1) (obtenida de Rorsman and Ashcroft, 2018).

5.5.4 Canales de potasio de alta conductancia activados por Ca²⁺:

Los canales de K⁺ de alta conductancia, llamados BK, son canales de K⁺ particulares, debido a que están formados por ocho subunidades , en lugar de siete como el resto de canales de potasio, se trata además de canales dependientes de voltaje y de Ca²⁺ simultáneamente. Este último se une a un bolsillo de unión localizado en el dominio carboxilo terminal del canal. Estos canales poseen una alta conductancia para el potasio y se activan a potenciales de membrana por encima de -30mV, siendo la conductancia máxima a +20mV. A pesar de la gran importancia de este tipo de canales en otros tejidos como el muscular, aún no se conoce muy bien qué función podría tener el canal BK en la célula beta, ya que a pesar de la alta densidad de estos canales en la membrana de la célulaβ, su bloqueo mediante toxinas específicas como la charbydotoxina , no parece alterar la actividad eléctrica de la célula, la frecuencia de disparo de PA o la repolarización de la célula durante este según diversos estudios [5]. No obstante, más recientemente se ha descubierto que los ratones con el gen del canal BK noqueado presentaban una importante disminución en la secreción de insulina y en la tolerancia a la glucosa[5], se cree que esto podría ser debido a que los canales BK actuaran contrarrestando la entrada de Ca²⁺, al activarse por el aumento de calcio intracelular, de esta manera el canal BK podría evitar una sobrecarga de Ca²⁺, la cual produce un fuerte efecto apoptótico, evitando por tanto una disminución de la masa de células β pancreáticas .

5.5.5 Canales de Cl⁻:

La célula β -pancreática tiene una concentración de cloro intracelular de unos 35mM. Esto predice un potencial de equilibrio del cloro, inverso, i.e. de -35mV y parece mostrar que, a potenciales de membrana más negativos, la apertura de los canales de Cl⁻ resultará en una entrada de Cl⁻, y por ende en una despolarización de la membrana. La relevancia funcional de estos canales no está clara (Ashcroft and Rorsman, 2017).

5.5.6 Canales de potasio independientes de voltaje:

Canales TRP (Transient receptor potential):

Los TRP son una gran familia de canales no selectivos de cationes que transportan cationes hacia el interior de la célula, principalmente Na⁺ y Ca²⁺ son canales implicados en funciones sensoriales (estímulos de presión, temperatura, gusto, audición etc...) en célula β -pancreática los TRP que se expresan en la membrana son: Trpc1, Trpm2, Trpm3, Trpm4, Trpm5, and Trpm7. La función de estos canales en la célula β - pancreática no está del todo esclarecida, no parecen ser decisivos para la despolarización dependiente de glucosa, pero sí se ha descrito que los canales Trpm4 y Trpm5 son necesarios para la sensibilidad de la célula β al ligando GLP-1 (capaz de estimular la secreción de insulina), sin embargo, el canal Trpm2 sí parece estar implicado en la GSIS, ya que el silenciamiento del gen que lo codifica reduce la entrada de Ca²⁺ a la célula disminuyendo por tanto, la GSIS; este canal está activado por el fosfato del dinucleótido de ácido nicotínico (NAADP), el cual ha demostrado ser un estimulador de la secreción de glucosa [5].

5.6 Los receptores de estrógenos:

Los receptores de estrógenos son receptores celulares cuyos ligandos naturales son los estrógenos como el 17 β - estradiol (el más potente), la estrona o el estriol. Su expresión se da en una gran variedad de tejidos, y tienen una gran importancia en el desarrollo embrionario, el crecimiento, la diferenciación sexual del organismo, la función reproductiva, la regulación del metabolismo etc. A nivel celular, los estrógenos pueden, a través de estos receptores, inducir efectos transcripcionales en el núcleo, o bien a nivel de las rutas de señalización celular citoplasmáticas. Habitualmente se dividen los mecanismos de señalización de los estrógenos en dos vías, la clásica y la no clásica. Se han descrito 3 tipos de receptores de estrógenos, ER α y ER β , que participan en la vía de señalización clásica y GPER (receptor de estrógenos acoplado a proteína G) que participa en la vía no clásica.

5.6.1 Receptores ER α y ER β

Pertenecen a la familia de los receptores nucleares tipo 2, es decir, son receptores que se encuentran localizados en el citoplasma, y que actúan en el núcleo (Fig11), estos receptores, además de su dominio de unión a ligando, tienen un dominio de unión a ADN, a través del cuál, actúan como factores de transcripción, al unirse el ligando al sitio de unión del receptor, este se transloca al núcleo y allí ejerce su efecto, bien uniéndose a secuencias reguladoras del ADN denominadas ERE (Estrogen response elements), a las cuales se une el receptor de estrógenos a través de su dominio de unión a ADN, o bien, interactuando con un factor de transcripción diferente que actúa sobre un promotor diferente (Fig11). Estos receptores se expresan en las células β - pancreáticas, y se ha comprobado que su señalización afecta a la capacidad de la célula para evocar la GSIS, principalmente a través de la regulación de la expresión génica de canales iónicos [4].

A pesar de que los efectos de la activación de ER α en la función de las células beta-pancreáticas están ampliamente descritos, los estudios que se han centrado en el papel de ER β en la función de la célula beta son escasos.. Algunas evidencias apuntan a que ER β podría modular, la actividad de canales iónicos involucrados en el acoplamiento estímulo-secreción de insulina en las células beta, como los canales de potasio sensibles a ATP (K_{ATP}), los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VDCC) , los canales de sodio dependientes de voltaje (Nav1.x), o los canales de K^+ [4].

5.6.2 Receptor GPER:

El receptor de estrógenos acoplado a proteína G es un receptor de estrógenos localizado principalmente en la membrana plasmática[6], se expresa en la célula beta pancreática, y se ha visto que su actividad tiene una importante influencia en la homeostasis de la glucosa, pudiendo alterar la secreción de insulina[18];[19], así como afectar a la supervivencia de la célula β [7];[9], este receptor es el responsable de las vías de señalización no clásicas de los estrógenos, la cual implica diversas rutas características de los receptores acoplados a proteínas G, como la PI3K/AKT, la vía de la adenilato ciclasa y la proteína quinasa A (PKA), que tienen efectos reguladores fuera del núcleo, regulando por ejemplo, canales iónicos, y también a nivel nuclear, regulando la transcripción de diversos genes[8], también se ha visto incluso que puede interactuar con las vías de señalización clásicas de ER α y ER β ,[7].

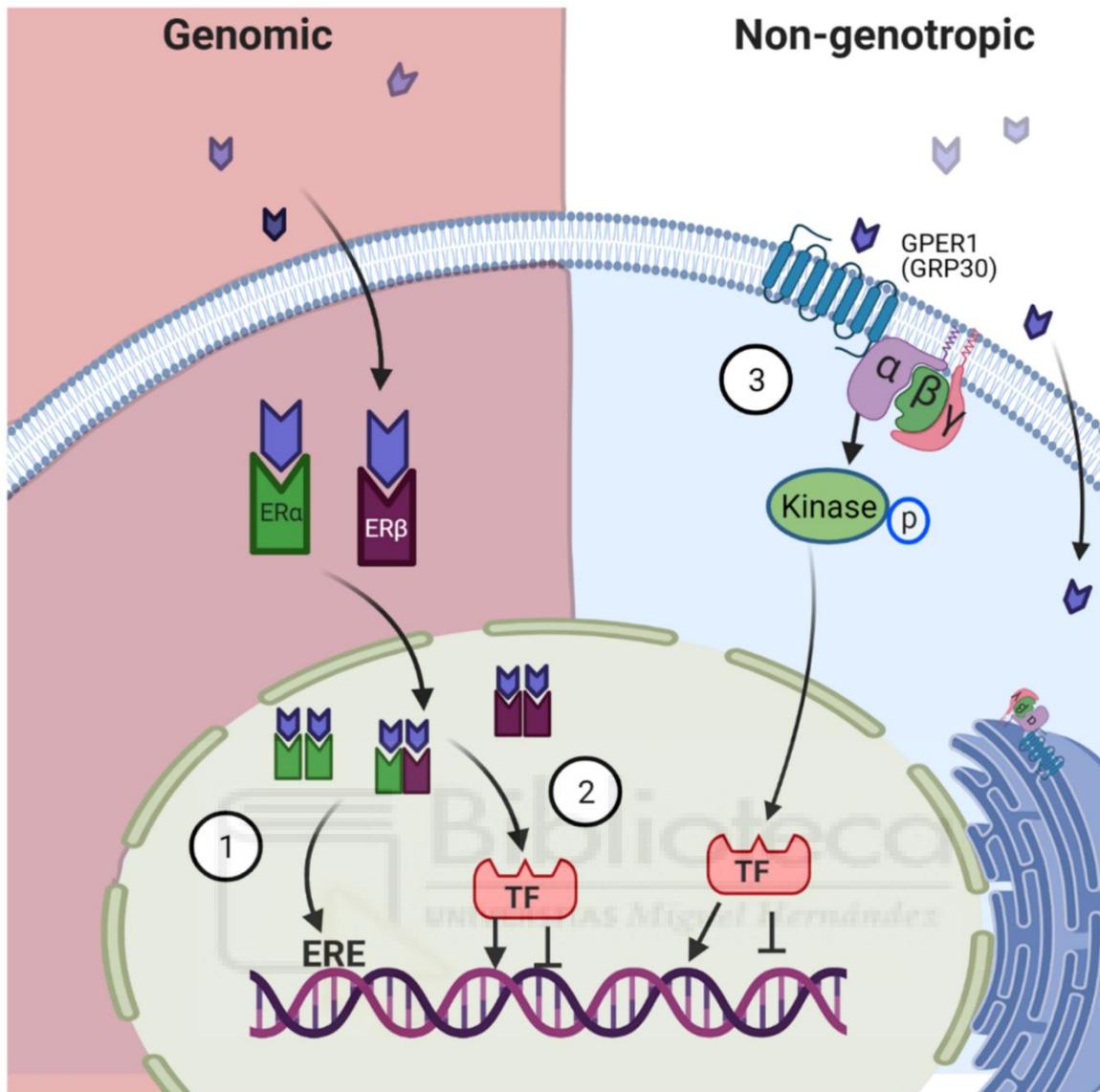


Fig11: Representación de las vías de señalización en función del receptor implicado, Se observa la vía clásica (genomic), y la vía no clásica (non genotoxic). En la vía clásica, participan los receptores ER α y ER β , que tras unirse a su ligando, se translocan hasta el núcleo, donde pueden, o bien, formar un homodímero (formando los complejos ER α /ER α o ER β /ER β), o formar un heterodímero (ER α /ER β), además, el complejo formado por los ER puede actuar directamente sobre el ADN, a través de un elemento de respuesta a estrógenos (ERE), o bien, a través de un factor de transcripción que actúe sobre un promotor diferente. En la vía no clásica, los estrógenos se unen a GPER, en la membrana, el cual, puede producir efectos también a nivel transcripcional, a través de vías de señalización que acaban con la actuación de un factor de transcripción, o bien, a través de vías de señalización citoplasmáticas que regulan la actividad de canales iónicos (Obtenida de *Lara-Castillo, 2021*).

5.7 Moduladores de los receptores de estrógenos:

Existen diversos fármacos capaces de actuar selectivamente sobre los receptores de estrógenos (Fig.12), estos son los SERM (selective estrogen receptor modulators), son compuestos xenobióticos que pueden activar o inhibir estos receptores, algunos de ellos, como el BPA, son contaminantes ambientales generados por las industrias, que se incorporan en el organismo a causa de su acumulación en los ecosistemas y en las cadenas tróficas. En este trabajo se ha utilizado el fármaco DPN, el cual es un agonista específico de ER β , para estudiar el papel de este receptor.

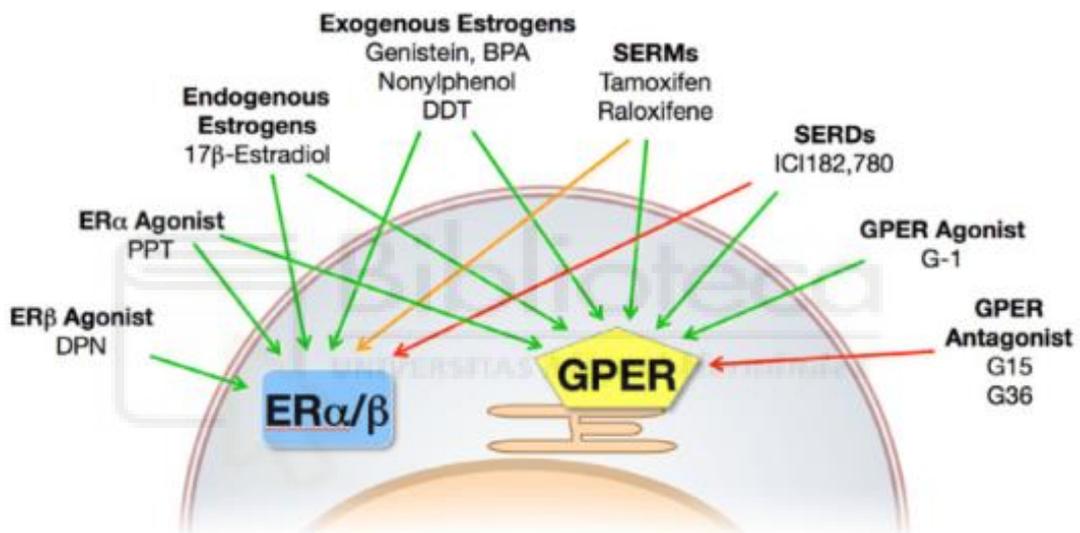


Fig12: Representación de diferentes agonistas y antagonistas de los receptores de estrógenos, y los receptores sobre los que actúan, algunos de estos fármacos como el tamoxifeno o el raloxifeno, son usados en el tratamiento de algunos tipos de cáncer como el de mama, en el que la actividad de estos receptores está alterada (obtenida de Prossnitz and Barton, 2014).

6. MATERIALES Y MÉTODOS:

6.1 Materiales:

Células INS-1E:

La línea celular INS-1E es una línea celular inmortalizada derivada de insulinoma de rata, obtenido a partir de rayos X, que ha sido transfectada con el gen de la insulina humana, esta línea celular es ampliamente utilizada en diabetología, ya que presenta un fenotipo equiparable al de una célula- β de rata real que permite el estudio de algunas de sus características como la actividad secretora de insulina, rutas de señalización celular, o, en el caso que nos ocupa, su actividad eléctrica. Estas células expresan los receptores de estrógenos ER α /ER β y GPER.

DPN:

El DPN, [2,3-Bis(4-hydroxyphenyl)propionitrile] (Fig13), es un fármaco agonista específico del receptor de estrógenos ER β , si bien tiene una muy leve afinidad por ER α , su afinidad por el primero es 70 veces mayor que por ER α , y su potencia para la activación de la transcripción por ER β alrededor de 80 veces mayor (EC₅₀ = 0.85 nM versus 66 nM para ER), por esta razón, se utilizó este fármaco en el trabajo para tratar de dilucidar el efecto de una sobreactivación del receptor de estrógenos Er β en la actividad eléctrica de la célula.

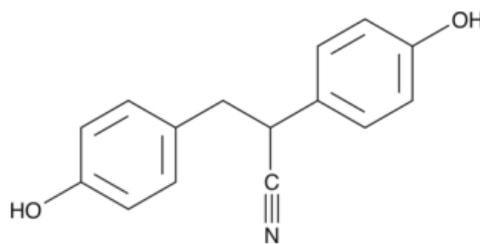


Fig13: Fórmula molecular del 2,3-Bis(4-hydroxyphenyl)propionitrile (DPN) [14], [15]

DMSO: Dimetilsulfóxido, se trata de un agente anfipático liposoluble que permite disolver en medios hidrofílicos compuestos muy hidrofóbicos como el DPN, utilizándose como vehículo para el fármaco.

Equipo de patch clamp:

El equipo de patch clamp, está formado por un microscopio óptico invertido, usado para observar las células a registrar montado sobre una mesa con suspensión neumática que elimina las vibraciones que puedan interferir en la medición, sobre la cual se encuentra una jaula de Faraday , que aísla la zona de campos electromagnéticos que interfieran con los registros. Sobre la platina del microscopio, en el lugar donde iría el portaobjetos, se encuentra montada una pequeña cámara, en cuya base se coloca el cristal en el que se encuentran adheridas las células; por esta cámara, circula la solución extracelular con un flujo de 150mL/h, y se encuentra mantenida a una temperatura estable de 32°C gracias a la acción de una placa peltier que calienta o enfría la solución en función de la medición de una sonda de temperatura. La solución es drenada por una bomba que descarta la solución que rebosa de la cámara. En la solución extracelular se encuentra sumergido el electrodo de referencia (encargado de medir el potencial extracelular), sobre la mesa, y al lado del microscopio, el electrodo de medición(encargado de medir el potencial intracelular), que se encuentra dentro de la pipeta con la que se accede al interior de la célula. El espacio interior de la pipeta se encuentra conectado a un tubo a través del cuál se puede aplicar mediante succión, o soplado, una presión positiva o negativa; este electrodo se encuentra montado sobre el micromanipulador (shutter instruments), que es un dispositivo que permite controlar el movimiento y la posición de la pipeta a través de un mando formado por tres diales que controlan la posición en los ejes X,Y,Z con una precisión de μM .

Amplificador: El amplificador de la marca Axon instruments, es el dispositivo al que se encuentran conectados los electrodos de medición y referencia, tiene un panel de control que permite controlar los parámetros de compensación de corrientes, capacitancias y resistencias, offsets, modo de registro y la inyección de corriente. El amplificador se encuentra conectado a un ordenador a través de la digidata.

Digidata (Axon instruments digidata 1550B): La adquisición de datos se realiza a través del software Clampex, que permite el monitoreo del registro del amplificador a tiempo real y la ejecución de los protocolos de inyección de corriente y registro que utilizaremos.

Solución extracelular: La solución extracelular que se encuentra circulando por el entorno de las células es una solución que trata de emular el líquido intersticial de las células beta pancreáticas, su composición iónica es la de las concentraciones extracelulares de cada electrolito en estado de equilibrio, las concentraciones son las siguientes.

Na ⁺ (NaCl)	138mM
------------------------	-------

K ⁺ (KCl)	5,6mM
Ca ²⁺ (CaCl ₂)	2,6mM
Mg ²⁺ (MgCl ₂)	1,2mM
HEPES(Tampón de pH)	5mM
Glucosa	5mM

Tabla 2: Composición de la solución extracelular (o de perfusión) para la medición de corrientes de K⁺ (la de medición de corrientes de Na⁺ se describe en la tabla 4).

Solución intracelular:

La solución intracelular es la solución con la que se rellena la pipeta de medición y en la que va sumergido el electrodo, de tal manera que la solución de la pipeta debe de poseer la osmolaridad del citoplasma, además de tener iones en las mismas concentraciones que el citoplasma.

K ⁺ (KCl)	120mM
MgATP	3mM
Ca ²⁺ (CaCl ₂)	1mM
Mg ²⁺ (MgCl ₂)	1mM
HEPES	10mM
EGTA	10mM

Tabla 3: Composición de la solución intracelular (de la pipeta) para la medición de corrientes de K⁺ (la de medición de corrientes de Na⁺ se describe en la tabla 5).

Pipetas de medición: Las micropipetas de medición consisten en tubos de borosilicato, las cuales, en su extremo se estrechan acabando en una abertura de un diámetro de aproximadamente 3 μM, las micropipetas se fabrican en un estirador, que es un aparato, que a partir de un tubo de borosilicato, fabrica dos micropipetas calentando el tubo por el centro y estirando de los extremos en varios pulsos a una temperatura y tensión controladas de manera que sea posible ajustar el diámetro de la abertura.

6.2 Métodos:

- Cultivo celular y preparación de células para registros:

La línea celular INS-1E fue mantenida en botes de cultivo (Falcon™ Tissue Culture Treated Flasks) en medio (describir medio), transfiriendo un subcultivo del bote inicial a un bote nuevo una vez por semana, y cambiando el medio a mitad de semana. Las células fueron mantenidas en todo momento en un incubador a 37°C y 5% de CO₂. Para realizar el subcultivo, las células fueron tripsinizadas, centrifugadas, separadas del medio mediante decantación, y resuspendidas en medio fresco, a partir de esta suspensión homogénea, se realizó un conteo de células mediante un hematocitómetro. A partir de la suspensión inicial, y sabiendo su concentración de células, se sembraron 3×10^6 de células en un bote nuevo. Para poder llevar a cabo los registros de patch clamp, a partir de la suspensión se sembraron 12 pocillos de una placa de 24 con 150.000 células por pocillo en 500uL de medio fresco, 5 días antes del registro. Cada pocillo de la placa tenía en el fondo un cubreobjetos de vidrio sobre el cuál crecen las células, y que sirve a modo de soporte para poder colocarlas posteriormente en el equipo de patch.

- Tratamiento de las células:

A partir de las células sembradas en la placa, se establecieron dos grupos, uno de incubación con DPN y otro control, durante las 48h inmediatamente anteriores al registro, las células fueron incubadas en medio de tratamiento (medio de cultivo filtrado con carbono activo para evitar la presencia de compuestos estrogénicos), para el grupo de células DPN, se añadió el fármaco DPN al medio de tratamiento (1nM de DPN disuelto en DMSO), y el grupo control, fue tratado únicamente con la misma cantidad de DMSO sin DPN.

- Estudio electrofisiológico:

La técnica de patch clamp: Patch clamp es una técnica que permite realizar mediciones de todo tipo de corrientes bioeléctricas, con ella podemos medir potenciales de acción en células excitables eléctricamente, como neuronas, células musculares o célula beta pancreática en nuestro caso, actividad de canales iónicos específicos o corrientes iónicas de iones específicos. El elemento más importante del equipo de patch clamp es el amplificador, este es un equipo que posee dos electrodos, uno de referencia (que se encuentra sumergido en el baño en el que se encuentran las células, por el que perfunde la solución extracelular) y el electrodo de registro, que se encuentra dentro de la pipeta con la que se perfora la célula, que además se encuentra sumergida en la solución cuya composición varía según el modo de trabajo.

- Modalidades de trabajo:

La técnica de patch clamp permite trabajar en varias modalidades diferentes en función del tipo de actividad eléctrica que queramos medir, tal y como se describe en la figura 14:

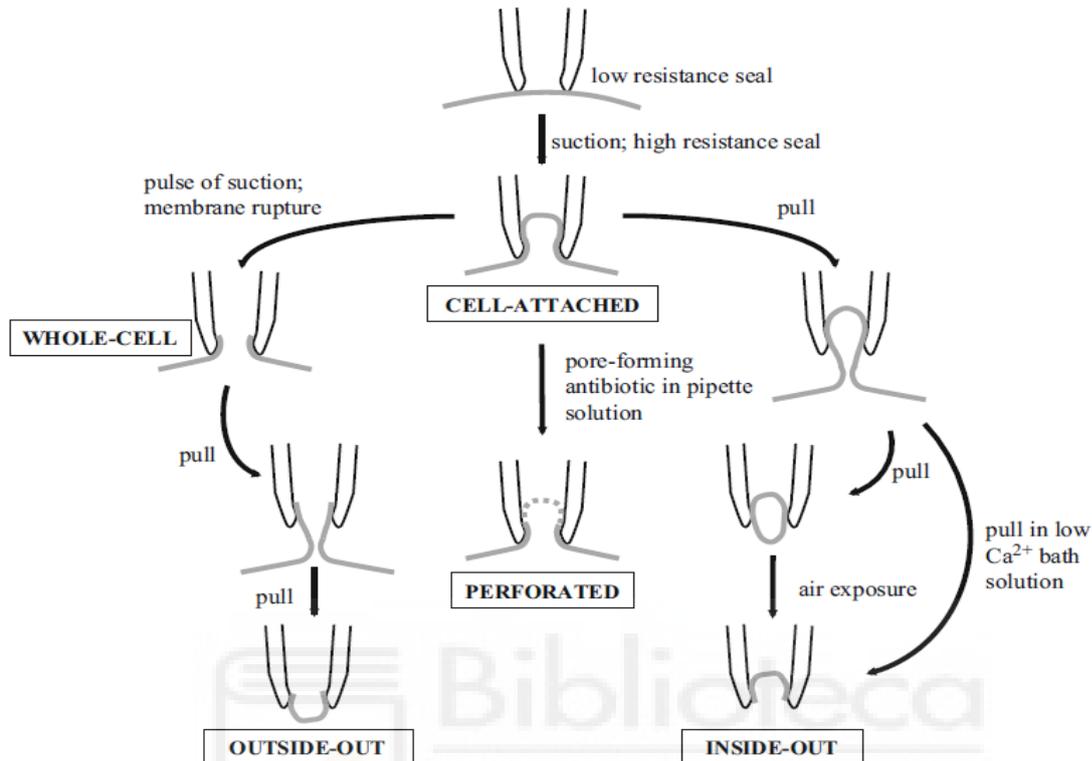


Fig14: Representación gráfica de la pipeta en las diferentes modalidades (imagen de *Patch clamp electrophysiology methods and protocols Humana press*).

1. Cell attached: En este caso, la pipeta se acerca a la célula hasta que entra en contacto con la membrana y, al aplicar una presión negativa, la membrana forma una protuberancia que se sella con las paredes de la pipeta quedando la solución intracelular en contacto con esa región de la membrana plasmática y aislada del medio extracelular (gigasello). Este modo de trabajo permite medir corrientes iónicas de los canales que se encuentran en esa región de la membrana.
2. Whole cell (célula entera): En este caso, se procede como en el modo cell attached, creando un gigasello, y posteriormente, se aplican pulsos rápidos de succión para romper la membrana y acceder al citoplasma, de este modo, el electrodo de registro tiene acceso al interior de la célula, por lo que el amplificador mide las corrientes iónicas que se dan en toda la célula.
3. Parche perforado: Para trabajar en este modo, se forma en primer lugar un gigasello, como en el modo cell attached, con la diferencia de que en este caso, la solución de la pipeta contiene anfotericina, un antibiótico que crea pequeños poros en la

membrana, que permiten el flujo de iones a través, este método permite tener acceso al interior de la célula como en el método de whole cell, pero existiendo un menor flujo entre la solución de la pipeta y el citoplasma, de manera que existe una menor difusión del citoplasma hacia el interior de la pipeta, lo que permite registrar potenciales de acción.

4. Outside out: Este método genera un parche de membrana en la punta de la pipeta de tal forma que el lado intracelular de la membrana y de los canales quedan en contacto con el interior de la pipeta, mientras que el lado extracelular queda en contacto con el baño.
5. Inside-out: Este modo es similar al anterior con la diferencia de que el lado extracelular queda expuesto al baño y el lado intracelular a la solución de la pipeta.

Los modos Outside-out e inside – out son útiles si queremos la actividad eléctrica de determinados canales iónicos en respuesta a determinados fármacos aplicados al baño.

En el caso que nos ocupa nuestro objetivo es medir las corrientes de potasio / sodio que la célula intercambia con el exterior, por lo que el modo de trabajo es el de whole cell (célula entera), en esta modalidad, el interior de la pipeta se encuentra comunicado con el citoplasma a través de un agujero en la membrana, de tal manera que el electrodo de registro se encuentra sumergido en una solución que se encuentra al mismo potencial que el interior de la célula, por lo que tendremos un circuito eléctrico en el cual, el electrodo de referencia mide el potencial extracelular, mientras que el electrodo de registro mide el potencial intracelular, como se representa en el siguiente esquema(Fig15):

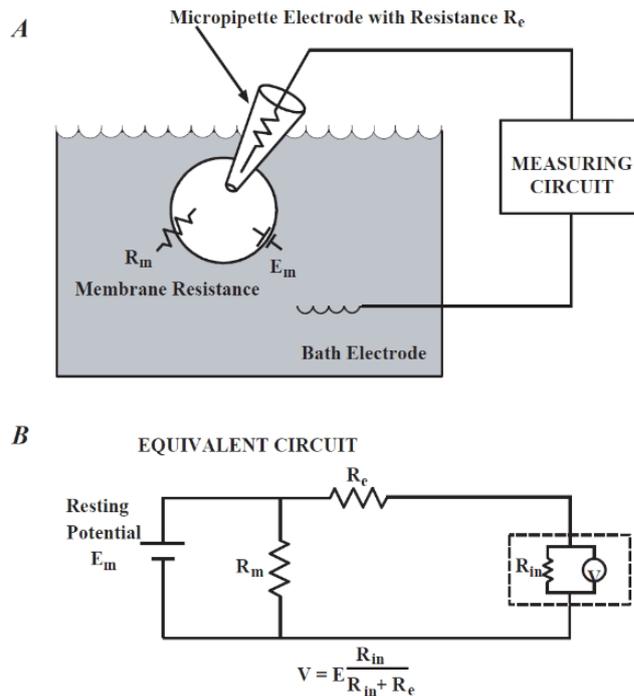


Fig15: La figura A representa el camino que siguen los iones, el amplificador registra a través del electrodo de medición (en el interior de la pipeta) el potencial eléctrico con respecto del que mide el electrodo de referencia, en contacto con el baño. La figura B representa el circuito eléctrico equivalente si las cargas fuesen electrones movidos por la fuerza electromotriz de una pila (imagen de *Electrophysiological Recording Techniques Wen-Jun Gao, PH.D. Drexel University College of Medicine*).

- Modos de registro:

Además de las diferentes modalidades de trabajo explicadas anteriormente, existen dos modos de adquisición de datos, Voltage Clamp y current clamp, debido a que queremos medir corrientes iónicas, el modo en el que se han realizado los experimentos es el modo Voltage clamp, en el cual, el sistema inyecta corriente en la célula a través del electrodo de la pipeta forzando a la célula a adoptar un potencial de membrana determinado, en ese momento, se producirá una corriente a través de los canales iónicos abiertos que el equipo es capaz de medir.

- Procedimiento de medición de corrientes de potasio:

Para este procedimiento se utiliza una solución extracelular isoosmolar con el líquido intersticial de la célula beta pancreática, (NaCl 138mM; KCl 5,6mM; CaCl₂ 2,6mM; MgCl₂ 1,2mM; HEPES 5mM; Glucosa 5mM. La solución tiene un pH de 7,4. Y una solución

intracelular isoosmolar con el citoplasma (KCl 120mM; MgATP 3mM; CaCl₂ 1mM; MgCl₂; 10mM HEPES; 10mM EGTA). Se trabaja en modo voltaje clamp.

En primer lugar, se coloca el cubreobjetos con las células en la cámara, una vez se encuentra fluyendo la solución extracelular a 34°C, se coge una pipeta, se rellena con solución intracelular, se coloca en el amplificador y, a través del micromanipulador, se mueve la micropipeta lentamente hasta tocar la membrana, para saber cuándo ocurre esto, el amplificador realiza un pulso test repetidas veces que se observa en la pantalla como una señal eléctrica cuadrada.



Fig16: Señal del pulso test: En el gráfico superior la pipeta todavía se encuentra libre, en el inferior, la pipeta tiene acceso a la membrana, y se observan las corrientes capacitivas.

Al tocar la membrana de la célula con la punta, la amplitud de la señal disminuye, debido a que aumenta drásticamente la resistencia al paso de corriente a través de la pipeta (Fig16), en este momento, aplicamos succión a través del tubo conectado a la pipeta, para sellar la membrana a esta, si se logra hacer un gigasello, veremos que desaparece la señal eléctrica y la resistencia que marca el amplificador es de más de 1G Ω (la resistencia de la pipeta por si sola es de unos 5 M Ω). Una vez hemos logrado el gigasello, aplicamos succión para romper la membrana y lograr acceder, al acceder a la célula, se observa en la pantalla del pulso test, una señal con dos picos opuestos y simétricos. Estos son las corrientes capacitivas de la célula, que se generan debido a que la membrana actúa como un condensador, produciéndose un movimiento de cargas al inyectar corriente. Para evitar que estas corrientes afecten a los registros, debemos compensarlas, para ello, lo que hacemos es girar el dial de compensación de capacitancia y el de resistencia en serie (corrige la resistencia del paso de corriente a través del orificio que conecta la pipeta con el interior de la célula). Una vez el gráfico del pulso test aparece plano, ya podemos iniciar el registro, al hacerlo, el amplificador aplica un protocolo automático en el que aplica sucesivos pulsos de voltaje a distintos potenciales y mide su correspondiente corriente. De manera que

obtenemos el histograma que representa la corriente con respecto al tiempo para cada pulso de voltaje.

- Medición de corrientes de Na⁺:

Para la medición de corrientes de Na⁺ se utilizó una solución de perfusión (solución extracelular), diferente a la descrita anteriormente() con la siguiente composición:

Na ⁺ (NaCl)	118mM
K ⁺ (KCl)	5,6mM
CdCl ₂	500μM
Ca ²⁺ (CaCl ₂)	2,6mM
Mg ²⁺ (MgCl ₂)	1,2mM
HEPES(Tampón de pH)	5mM
Glucosa	5mM
TEACl	20mM

Tabla4: Composición de la solución extracelular (o de perfusión) para la medición de corrientes de Na⁺.

En este caso, la composición de la solución extracelular es similar a la del potasio, pero en este caso se añade cadmio (CdCl₂) a 500 μM con el objetivo de bloquear las corrientes de Ca²⁺, al ser el cadmio un ión divalente que inhibe los canales de calcio. También se añade TEA-Cl (Cloruro de tetraetilamonio), un agente que bloquea los canales de potasio, para impedir que las corrientes de K⁺ interfieran con el registro de las corrientes de Na⁺.

La solución intracelular para medir corrientes de Na⁺ (Ajustada a pH 7,2) es la siguiente:

Cs ⁺ (CsCl)	130mM
MgATP	3mM
Ca ²⁺ (CaCl ₂)	1mM
Mg ²⁺ (MgCl ₂)	1mM
HEPES	10mM
EGTA	10mM

Tabla2: Composición de la solución intracelular para la medición de corrientes de Na⁺.

En el caso de la solución intracelular para medir corrientes se sustituye el KCl por CsCl, ya que el cesio inhibe los canales de potasio.

Para medir las corrientes de Na^+ mediante el setup de patch clamp, se realiza un procedimiento similar al utilizado para corrientes de K^+ ; se colocan las células (crecidas sobre el cubreobjetos) en la cámara de soporte, en la cual se perfunde la solución extracelular continuamente, a un flujo de 135mL/h y una temperatura de 32°C; se introduce la solución intracelular en la pipeta y se procede a elegir una célula y registrarla, realizando primero el gigasello; a continuación la ruptura de la membrana da acceso al interior, y es seguida por la compensación de los componentes resistivo y capacitivo celulares. Finalmente, se procede a la medición de las corrientes con el protocolo de inyección de corriente. En este caso, a diferencia del experimento de medición de corrientes de K^+ , se han medido las corrientes de Na^+ usando 3 protocolos de medición distintos aplicados en cada célula que se explican a continuación:

V_m inicial -70mV: En este caso, se aplican pulsos despolarizantes en los que se fijan potenciales de membrana de -60mV a +60mV , con una diferencia de 10mV entre cada pulso y se mide la corriente de entrada de sodio a cada potencial (Fig17), de forma análoga al protocolo aplicado para la medición de corrientes de K^+ .

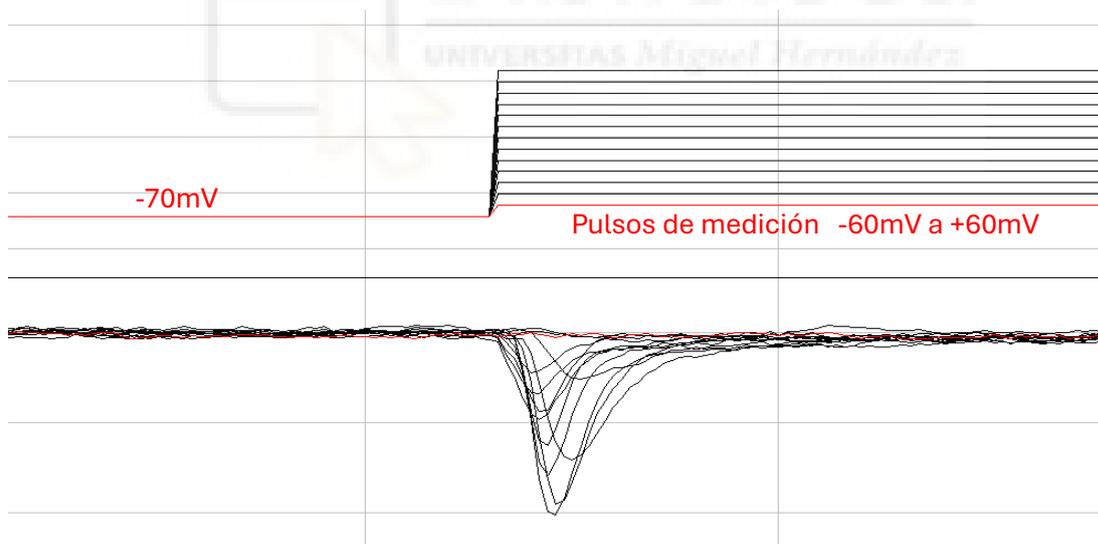


Fig17: Ejemplo de un registro de medición del protocolo $V_m = -70\text{mV}$, donde arriba aparece el potencial de membrana y abajo, las corrientes medidas a cada potencial.

V_m inicial -150mV : En este caso, se realiza la medición de corriente a los potenciales de membrana como en el protocolo anterior, con la diferencia de que antes de cada pulso despolarizante, se aplica un pulso hiperpolarizante que fija el potencial a -150mV (Fig18), de esta manera, se asegura que todos los canales de Na^+ se encuentren desactivados.

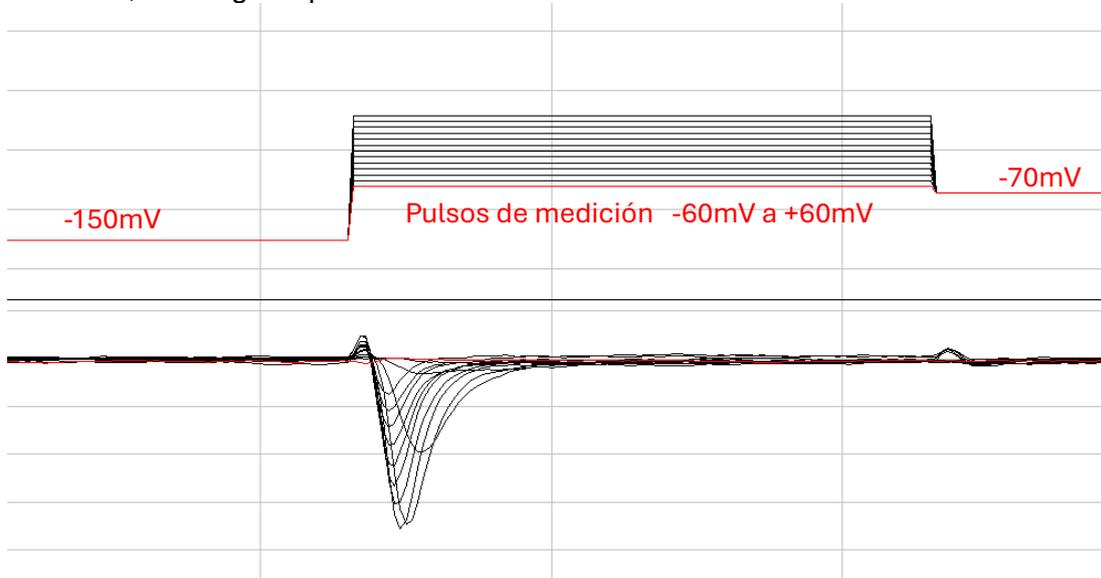


Fig18: Ejemplo de un registro de medición del protocolo V_m inicial = -150mV , donde arriba aparece el potencial de membrana y abajo, las corrientes medidas.

Inactivation: Este protocolo, en cada medición de corriente, primero aplica un prepulso que fija el potencial de membrana a un determinado valor, (diferente en cada medición) tras el cual aplica un pulso despolarizante a $+10\text{mV}$ (siempre el mismo), en el cual mide la corriente de Na^+ (Fig19).

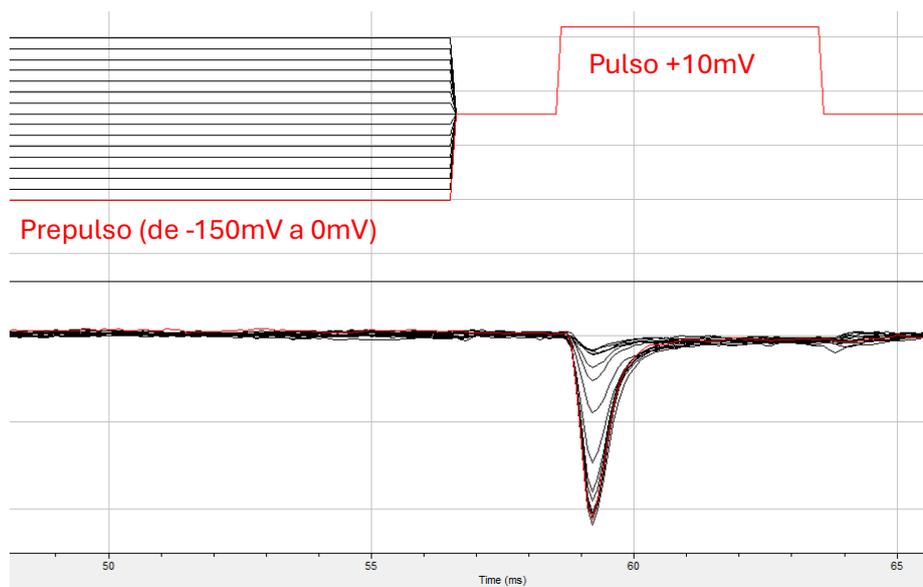


Fig19: Ejemplo de un registro de medición del protocolo de inactivación, donde arriba aparece el potencial de membrana y abajo, las corrientes medidas.

- Análisis estadístico:

Para analizar los valores de las corrientes, se utilizó el programa Graphpad prism 8, utilizando el método T- student, para comparar la desviación de los valores entre las dos condiciones (DPN y control) y calcular el valor de significancia estadística (p-value).

7.RESULTADOS

7.1 Corrientes de K⁺:

Las corrientes de potasio fueron medidas usando la modalidad whole cell en configuración voltaje clamp, a continuación se muestran dos gráficas seleccionadas, representativas, de las corrientes de K⁺ en cada una de las condiciones (control y DPN)(Fig20):

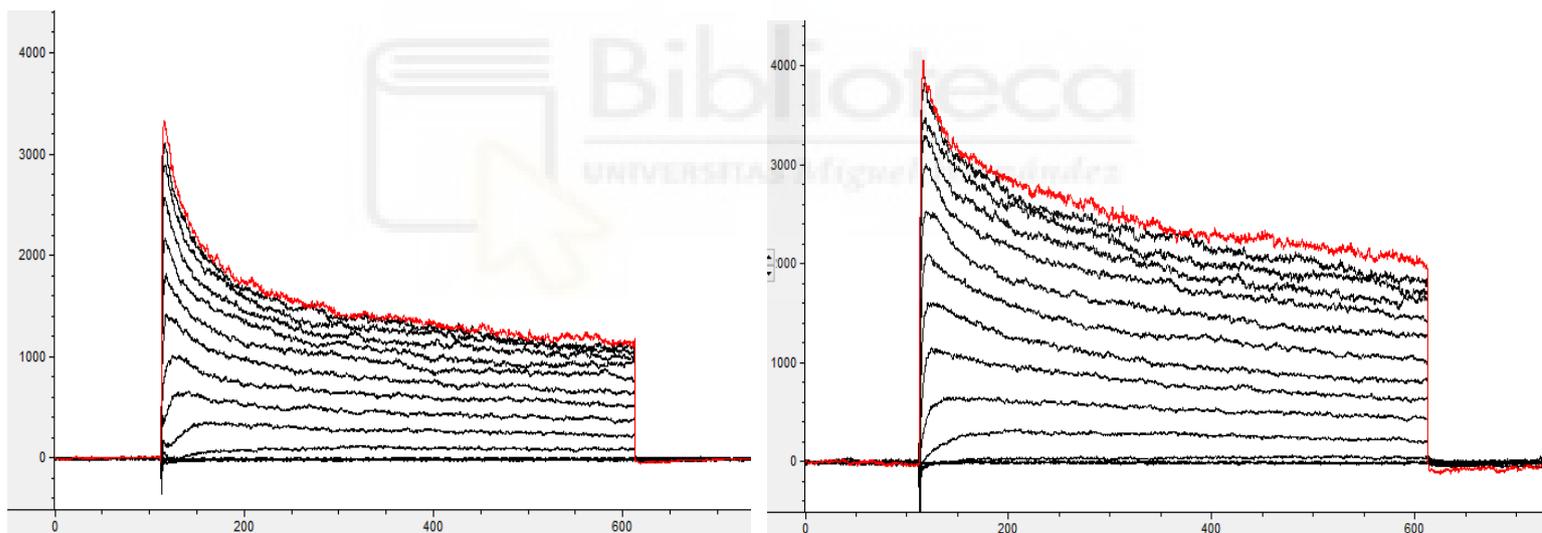


Fig20: Registro de las corrientes de K⁺ ; en INS-1E; del grupo control (izquierda) y del grupo DPN , representadas en pico amperios (pA) con respecto al tiempo en milisegundos, donde cada uno de los gráficos se corresponde con la medición, tras fijar el potencial de membrana a un determinado valor, empezando a -60mV y terminando por un pulso a +70mV, cuya corriente correspondiente está resaltada en rojo, registrándose la corriente más baja a un potencial de -20mV.

Posteriormente, se calculó la media de las corrientes para cada cohorte y se representaron en un gráfico IV con respecto a su potencial correspondiente.

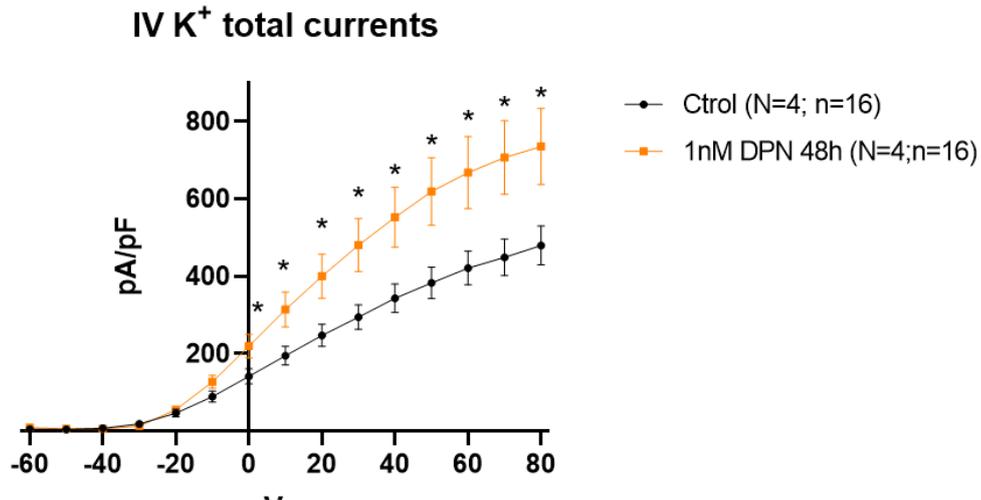


Fig21: Representación de las corrientes de K⁺ normalizadas con respecto a la capacitancia de membrana (pA/pF) donde pF es la unidad de medida de la capacitancia en picofaradios, con respecto al voltaje de membrana en milivoltios (mV), para las células del grupo control (en negro), y las del grupo DPN (en naranja), se observa un aumento significativo (valor p < 0,05) de las corrientes de K⁺ de las células incubadas con DPN, con respecto a las control.

7.2 Corrientes de Na⁺:

Se muestran a continuación gráficos representativos de cada una de las condiciones experimentales (control y DPN), de cada uno de los protocolos de medición aplicados para las corrientes de Na⁺.

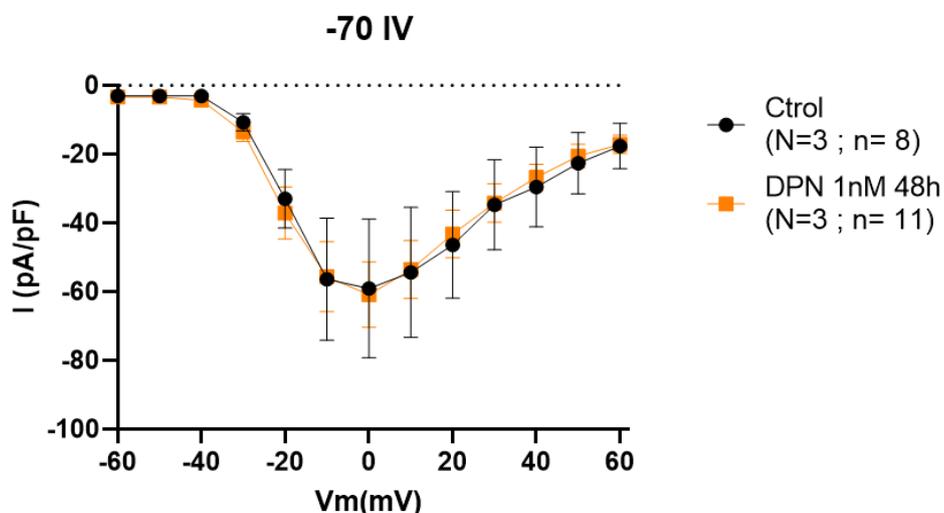


Fig. 22: Representación de la corriente al pico (máxima corriente) normalizada por la capacitancia de membrana con respecto al potencial de membrana fijado en cada medición.

En este caso, los pulsos despolarizantes, se aplican partiendo la célula de su potencial de membrana en reposo, es decir, en el momento anterior a aplicar cada pulso de voltaje, la célula se encuentra a -70mV . En este caso, no se observa diferencia en las corrientes entre las dos condiciones experimentales.

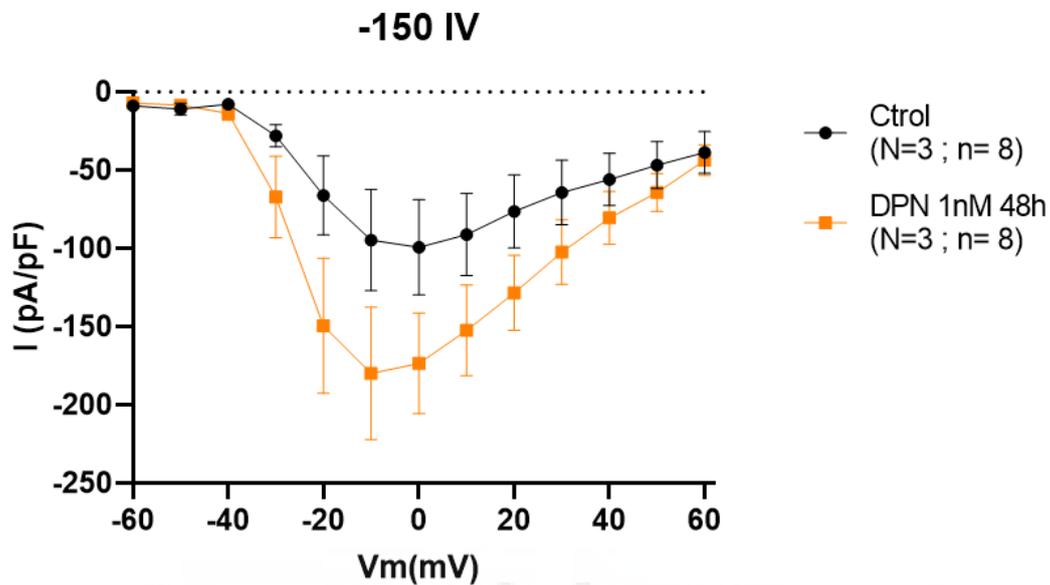


Fig. 23: Representación de la gráfica IV en la que se representa la corriente al pico (máxima corriente) normalizada por la capacitancia, medida tras la aplicación de los distintos pulsos de voltaje partiendo en este caso de un potencial de -150mV , es decir, en este caso, antes de fijar cada uno de los potenciales representados en el eje de abscisas, se fija primero el potencial a -150mV , esta hiperpolarización asegura la desinactivación de los canales de sodio. En este caso, se observa una mayor corriente de sodio en las células tratadas con DPN.

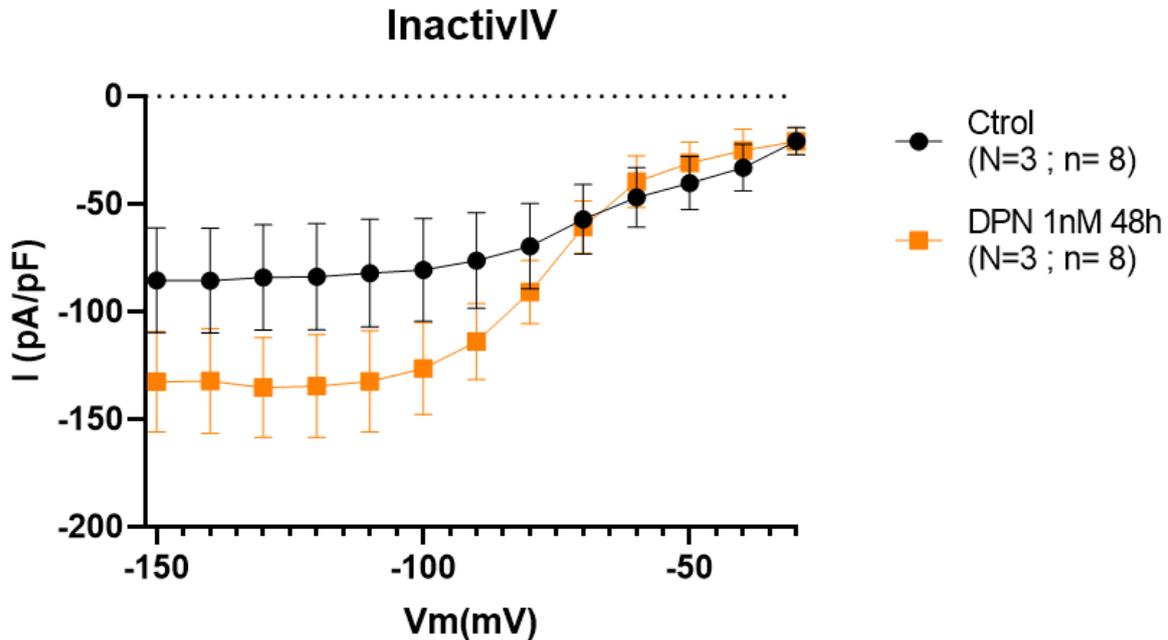


Fig. 24: Representación de la corriente al pico (máxima corriente) de Na⁺ (normalizada por la capacitancia) en función del potencial fijado en el prepulso (eje de abcisas), antes de medir la corriente a +10mV en células INS-1E.

8.DISCUSIÓN:

8.1 Corrientes de K⁺:

Como podemos observar claramente en la figura 21, la exposición de las células INS-1E a DPN 1nM durante 48h produce un aumento de la conductancia de su membrana para el potasio de manera significativa, este resultado sugiere que la activación del receptor ERβ por el xenoestrógeno DPN, aumenta las corrientes de K⁺. Si bien, solo con este experimento, no es posible explicar fehacientemente la causa del aumento de la intensidad de estas corrientes en respuesta a DPN, una posibilidad sería debido a que la activación específica de ERβ aumenta la expresión de los canales de K⁺, ya que como hemos explicado antes, ERβ puede actuar como factor de transcripción, induciendo la expresión de genes codificantes para canales iónicos [4].

8.2 Corrientes de Na⁺:

Con respecto a las corrientes de Na⁺, los resultados muestran que, en el caso del protocolo de -70mV (sin prepulso) (figura22), no hay ninguna diferencia en las corrientes de Na⁺, mientras que sí que hay un aumento en las corrientes de Na⁺, en las células incubadas con DPN 1nM al medir las corrientes partiendo de un potencial (prepulso) de -150mV(Fig23), igualmente, también se observa un aumento en estas corrientes al aplicar un pulso

despolarizante de +10mV aplicando previamente una hiperpolarización variable. En la línea de lo comentado previamente para las corrientes de K^+ , las diferencias en las corrientes de Na^+ podrían deberse a cambios en la expresión de los genes de los canales de Na^+ en respuesta a un aumento de la activación de $ER\beta$. Como hemos visto en los resultados, en el caso de las corrientes de Na^+ esta diferencia se observa solo al partir de un potencial de membrana hiperpolarizado, tal y como se observa en la figura 23, a su vez, como se observa en la figura 24, la diferencia entre las corrientes de sodio de las dos condiciones experimentales (control y DPN), disminuye con el aumento del valor del potencial de membrana inicial, de manera que a partir del potencial de reposo de -70mV, no se observa diferencia en la corriente, lo que coincide con lo descrito en la figura 22, esta dependencia del potencial de membrana inicial, podría explicarse debido a la propiedad de inactivación que tienen los canales de Na^+ , como se ha explicado anteriormente, los canales de sodio poseen un estado inactivado, en el cual no se abren aunque el potencial de membrana alcance el umbral de apertura, para que el canal se desinactive y recupere la capacidad de abrirse en respuesta a voltaje, es necesario que la célula vuelva a un potencial de membrana más o menos polarizado en función del tipo de canal de Na^+ . Se conoce que, en el caso de la célula β de rata, que es el tipo de célula, del que deriva la línea INS-1E utilizada como modelo en este trabajo, los canales de Na^+ , están conformados principalmente por dos tipos, los canales Nav1.7 y Nav1.3 [5], los canales Nav1.7, que son los mayoritarios en la célula β de rata, se encuentran en su mayoría inactivados al potencial de membrana de reposo, y necesitan un potencial de membrana muy negativo, de cerca de -100mV para desinactivarse [5], posiblemente, esta sea la causa de que las diferencias en la actividad de los canales de sodio, se observen al hiperpolarizar la célula a potenciales cercanos a -100mV antes de la despolarización, mientras que las corrientes de Na^+ observadas en la figura 22, probablemente sean debidas a los canales Nav1.3, que sí que se desinactivan al potencial de membrana de reposo [5]. La variación observada en los datos de las corrientes de sodio, podría deberse a que la mayor actividad de $ER\beta$, aumente la expresión de los canales Nav 1.7, generando el aumento de las corrientes evocadas tras aplicar prepulsos de -100mV o menos.

9.CONCLUSIÓN Y PROYECCIÓN FUTURA:

A la vista de los resultados, la exposición a DPN de las células de la línea INS-1E, produce una alteración de las corrientes iónicas, en este caso, aumentando, tanto las corrientes de K^+ , como las de Na^+ , por lo que parece que la activación específica del receptor $ER\beta$ por el agonista, produce este aumento.

Si bien únicamente con los estudios realizados en este trabajo no es posible conocer con detalle el mecanismo subyacente de este aumento, basándonos en experimentos llevados a cabo por otros autores, en los que se medía la expresión de los genes codificantes para canales de K⁺ y de Na⁺ en células betas expuestas a xenoestrógenos, en las cuales se ha observado que los xenoestrógenos producen alteraciones en la expresión génica de estos canales, cabría pensar que la mayor activación de ERβ aumentaría estas corrientes aumentando la expresión de, al menos, los genes codificantes para los canales de K⁺ y los de Na⁺, ya que ERβ actúa a nivel transcripcional, bien actuando como factor de transcripción, o a través de la interacción con otros factores de transcripción [12].

No obstante, para verificar estas hipótesis, será necesario realizar mayor investigación sobre ERβ, mediante estudios en los que se contraste la información existente con la obtenida en otro tipo de experimentos, como los siguientes:

Estudios electrofisiológicos para comparar las corrientes en células con el gen ERβ silenciado, con células con el gen de ERβ sobreexpresado, y con células con expresión normal de ERβ, para comprobar si las diferencias en la expresión de ERβ se correlacionan con un aumento o disminución de las corrientes iónicas de la célula.

Estudios de comparación de la expresión de los genes de los canales de potasio y sodio, en diferentes condiciones experimentales, como por ejemplo, en presencia y usencia de DPN o con ERβ silenciado o sobreexpresado, usando técnicas como la RT-qPCR o la secuenciación de RNA.

10.BIBLIOGRAFÍA:

- [1] Alemany M. Estrogens and the regulation of glucose metabolism. *World J Diabetes*. 2021 Oct 15;12(10):1622-1654. Doi: 10.4239/wjd.v12.i10.1622
- [2] Yan H, Yang W, Zhou F, Li X, Pan Q, Shen Z, Han G, Newell-Fugate A, Tian Y, Majeti R, Liu W, Xu Y, Wu C, Allred K, Allred C, Sun Y, Guo S. Estrogen Improves Insulin Sensitivity and Suppresses Gluconeogenesis via the Transcription Factor Foxo1. *Diabetes*. 2019 Feb;68(2):291-304. doi: 10.2337/db18-0638
- [3] Alonso-Magdalena P, Ropero AB, Carrera MP, Cederroth CR, Baquién M, Gauthier BR, Nef S, Stefani E, Nadal A. Pancreatic insulin content regulation by the estrogen receptor ER alpha. *PLoS One*. 2008 Apr 30;3(4):e2069. doi: 10.1371/journal.pone.0002069
- [4] Martínez-Pinna, J., Marroqui, L., Hmadcha, A. et al. Oestrogen receptor β mediates the actions of bisphenol-A on ion channel expression in mouse pancreatic beta cells. *Diabetologia* 62, 1667–1680 (2019).

- [5] Rorsman P, Ashcroft FM. Pancreatic β -Cell Electrical Activity and Insulin Secretion: Of Mice and Men. *Physiol Rev.* 2018 Jan 1;98(1):117-214. doi: 10.1152/physrev.00008.2017 ; PMID: PMC5866358.
- [6] Luo J, Liu D. Does GPER Really Function as a G Protein-Coupled Estrogen Receptor in vivo? *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020 Mar 31;11:148. doi: 10.3389/fendo.2020.00148. PMID: 32296387; PMID: PMC7137379.
- [7] Babiloni-Chust I, Dos Santos RS, Medina-Gali RM, et al. G protein-coupled estrogen receptor activation by bisphenol-A disrupts the protection from apoptosis conferred by the estrogen receptors ER α and ER β in pancreatic beta cells. *Environ Int.* 2022;164:107250. doi:10.1016/j.envint.2022.107250
- [8] Prossnitz ER, Barton M. Estrogen biology: new insights into GPER function and clinical opportunities. *Mol Cell Endocrinol.* 2014 May 25;389(1-2):71-83. doi: 10.1016/j.mce.2014.02.002. Epub 2014 Feb 12. PMID: 24530924; PMID: PMC4040308. DOI:10.1016/j.mce.2014.02.002
- [9] Sharma G, Prossnitz ER. Mechanisms of estradiol-induced insulin secretion by the G protein-coupled estrogen receptor GPR30/GPER in pancreatic beta-cells. *Endocrinology.* 2011;152(8):3030-3039. doi:10.1210/en.2011-0091
- [10] 17 β -Estradiol Regulates Glucose Metabolism and Insulin Secretion in Rat Islet β Cells Through GPER and Akt/mTOR/GLUT2 Pathway Che Bian Bowen Bai, Qian Gao , Siyi Li 1 and Yuyan Zhao 1 doi: <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00531>
- [11] Molecular mechanisms involved in the non-monotonic effect of bisphenol-a on Ca²⁺ entry in mouse pancreatic β -cells ; Villar-Pazos et al. 2017 DOI: 10.1038/s41598-017-11995-3
- [12] Lara-Castillo, N. Estrogen Signaling in Bone. *Appl. Sci.* 2021, 11, <https://doi.org/10.3390/app11104439>
- [13] Estrogen biology: New insights into GPER function and clinical opportunities Eric R. Prossnitz, Matthias Barton DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.02.002>
- [14] [https://www.caymanchem.com/product/10008842/2%2C3-bis-\(4-hydroxyphenyl\)-propionitrile](https://www.caymanchem.com/product/10008842/2%2C3-bis-(4-hydroxyphenyl)-propionitrile)
- [15] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/102614#section=Biological-Test-Results>
- [16] Electrophysiological Recording Techniques Wen-Jun Gao, PH.D. Drexel University College of Medicine
- [17] Patch clamp electrophysiology methods and protocols Humana press
- [18] Sharma G, Hu C, Brigman JL, Zhu G, Hathaway HJ, Prossnitz ER. GPER deficiency in male mice results in insulin resistance, dyslipidemia, and a proinflammatory state. *Endocrinology.* doi: 10.1210/en.2013-1357
- [19] Mårtensson, Ulrika E A et al. "Deletion of the G protein-coupled receptor 30 impairs glucose tolerance, reduces bone growth, increases blood pressure, and eliminates estradiol-

stimulated insulin release in female mice.” *Endocrinology* vol. 150,2 (2009): 687-98.
doi:10.1210/en.2008-0623

[20] Sula, A., Booker, J., Ng, L. et al. The complete structure of an activated open sodium channel. *Nat Commun* 8, 14205 (2017). <https://doi.org/10.1038/ncomms14205>

[21] Fernández-Mariño, A.I., Tan, XF., Bae, C. et al. Inactivation of the Kv2.1 channel through electromechanical coupling. *Nature* 622, 410–417 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06582-8>

[22] Plant, T.D. Na⁺ currents in cultured mouse pancreatic B-cells. *Pflugers Arch.* 411, 429–435 (1988). <https://doi.org/10.1007/BF00587723>

[23] Göpel, S., Kanno, T., Barg, S., Galvanovskis, J. and Rorsman, P. (1999), Voltage-gated and resting membrane currents recorded from B-cells in intact mouse pancreatic islets. *The Journal of Physiology*, 521: 717-728. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1999.00717.x>

[24] Rorsman, P., Renström, E. Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 46, 1029–1045 (2003). <https://doi.org/10.1007/s00125-003-1153-1>

[25] Tokarz VL, MacDonald PE, Klip A. The cell biology of systemic insulin function. *J Cell Biol.* 2018 Jul 2;217(7):2273-2289. doi: 10.1083/jcb.201802095. Epub 2018 Apr 5. PMID: 29622564; PMCID: PMC6028526.

[26] S. J. H. Ashcroft, C. J. Hedekov, P. J. Randle; Glucose metabolism in mouse pancreatic islets. *Biochem J* 1 June 1970; 118 (1): 143–154.

