



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

**LOS CANALES DE  $\text{Ca}^{2+}$  DEPENDIENTES DE VOLTAJE DURANTE  
LA ONTOGENIA DE LAS CÉLULAS BETA PANCREÁTICAS DE  
RATA Y SU MODULACIÓN POR ÁCIDOS GRASOS**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**NEIVYS GARCÍA DELGADO**

**DIRECTORA DE TESIS:**

**DRA. MARCIA HIRIART URDANIVIA**

**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM**

**COMITÉ TUTOR:**

**DRA. LETICIA VERDUGO DÍAZ**

**FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**DR. JUAN CARLOS GÓMORA MARTÍNEZ**

**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, ABRIL DE 2018**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS**

Esta Tesis se realizó en cumplimiento para obtener el grado de Doctorado en Ciencias de Neivys García Delgado dentro del posgrado en Ciencias Biomédicas en la Universidad Nacional Autónoma de México y con apoyo de una beca otorgada por CONACyT.

Agradezco a la Dra. Marcia Hiriart Urdanivia del Instituto de Fisiología Celular en la Universidad Nacional Autónoma de México por las facilidades otorgadas en su laboratorio que permitieron desarrollar este proyecto, por su excelente asesoría académica, sus enseñanzas, su apoyo y por la confianza depositada en mi al aceptarme como su alumna de Doctorado sin haberme conocido personalmente.

Agradezco a la Dra. Leticia Verdugo Díaz y al Dr. Juan Carlos Gómora Martínez por sus enseñanzas y apoyo académico como miembros de mi Comité Tutorial.

# ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS .....	1
ÍNDICE DE FIGURAS .....	2
ABREVIATURAS .....	4
RESUMEN .....	7
ABSTRACT .....	9
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>11</b>
<b>1.1 Estructura del páncreas .....</b>	<b>11</b>
<b>1.2 La insulina: síntesis y vías de secreción .....</b>	<b>13</b>
1.2.1 Síntesis .....	13
1.2.2 Secreción de insulina .....	13
<b>1.3 Acoplamiento entre la actividad eléctrica de la célula beta y la secreción de insulina estimulada por glucosa .....</b>	<b>15</b>
<b>1.4 Desarrollo posnatal de la célula beta pancreática de rata .....</b>	<b>18</b>
<b>1.5 Canales de calcio dependientes de voltaje (VGCC) .....</b>	<b>21</b>
1.5.1 Estructura y propiedades biofísicas .....	21
1.5.2 Nomenclatura .....	25
1.5.3 Expresión heterogénea de VGCC en las células beta pancreáticas .....	27
1.5.4 Papel de los VGCC en la fisiología de la célula beta y en la secreción de insulina .....	29
1.5.5 Modulación de los VGCC en células beta .....	32
<b>1.6 Papel de los ácidos grasos libres en la fisiopatología de la célula beta .....</b>	<b>34</b>
1.6.1 Ácidos grasos libres .....	34
1.6.2 Efectos de los AGL sobre los VGCC en las células beta .....	35
1.6.3 Modulación de la secreción de insulina por AGL en las células beta .....	38
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>43</b>
<b>3. HIPÓTESIS .....</b>	<b>46</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>47</b>
4.1 Objetivos generales .....	47
4.2 Objetivos específicos .....	47
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>48</b>
5.1 Reactivos y materiales .....	48

5.2 Animales de experimentación.....	48
5.3 Cultivo de células beta pancreáticas .....	49
5.4 Preincubación de las células beta pancreáticas con palmitato.....	49
5.5 Registros electrofisiológicos .....	50
5.6 Doble inmunotinción de insulina y subunidades $\alpha 1$ de los canales de calcio LVA en células aisladas.....	51
5.7 Secreción de insulina de células aisladas mediante el Ensayo Hemolítico Inverso (RHPA) .....	53
5.8 Análisis estadístico.....	55
6. RESULTADOS .....	56
A. <i>Caracterización electrofisiológica de los canales de calcio LVA y HVA durante el desarrollo posnatal de la célula beta pancreática de rata</i> .....	56
Detección de la corriente de calcio tipo T en células beta neonatas, P20 y adultas.....	56
Corrientes de calcio LVA y HVA registradas en células beta neonatas, P20 y adultas.....	58
Variabilidad de corrientes de calcio HVA en células beta P20 .....	63
Efecto de los bloqueadores de canales de calcio sobre las corrientes de calcio LVA y HVA en células beta adultas .....	65
B. <i>Expresión diferencial de las isoformas de los canales de calcio LVA durante el desarrollo posnatal de la célula beta pancreática de rata</i> .....	68
Las células beta neonatas, P20 y adultas expresan las tres isoformas de los canales tipo T .....	68
Expresión diferencial de las isoformas de los canales tipo T durante el desarrollo posnatal de la célula beta pancreática de rata.....	72
C. <i>Participación de los canales de calcio LVA y HVA en la secreción de insulina basal y estimulada por glucosa</i> .....	73
Efecto de los bloqueadores de los canales de calcio sobre la secreción de insulina basal y estimulada por glucosa en células beta adultas.....	73
Efecto de los bloqueadores de los canales de calcio sobre las subpoblaciones funcionales de células beta adultas.....	77
D. <i>Efecto dual del palmitato sobre la secreción de insulina basal y estimulada por glucosa en células beta adultas</i> .....	79
Efecto agudo (5 min) del palmitato sobre la secreción de insulina.....	79
Efecto de la preincubación durante una hora con palmitato sobre la secreción de insulina.....	81
Efecto de la preincubación durante una hora con palmitato sobre las subpoblaciones funcionales de células beta adultas .....	83

Efecto crónico (24 h) del palmitato sobre la secreción de insulina.....	84
Efecto crónico (24 h) del palmitato sobre las subpoblaciones funcionales de células beta adultas .....	86
Evaluación de la viabilidad celular luego de la exposición a palmitato .....	87
<i>E. Modulación de las corrientes de calcio LVA y HVA por palmitato en células beta adultas .....</i>	<i>89</i>
Efectos agudos (5 min) del palmitato sobre las corrientes de calcio .....	89
Efectos de la preincubación durante 1 h con palmitato sobre las corrientes de calcio .....	92
Efectos crónicos (24 h) del palmitato sobre las corrientes de calcio .....	94
Efectos crónicos (48-72 h) del palmitato sobre las corrientes de calcio .....	96
7. DISCUSIÓN.....	99
8. CONCLUSIONES.....	113
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115
10. ANEXOS.....	133

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.1</b> Clasificación, propiedades electrofisiológicas y farmacología de los VGCC-----	<b>26</b>
<b>Tabla 6.1.</b> Valores de capacitancia y máximos de corriente a -10 mV y +20 mV correspondientes a las corrientes LVA y HVA respectivamente, en células beta neonatas, P20 y adultas.-----	<b>60</b>
<b>Tabla 6.2.</b> Parámetros de Boltzmann calculados a partir de los valores de conductancia de Ca <sup>2+</sup> en células neonatas (n = 9), P20 (n = 15) y adultas (n = 9).-- -----	<b>61</b>
<b>Tabla 6.3.</b> Porcentaje de células beta neonatas, P20 y adultas que expresan las isoformas de los canales tipo T.-----	<b>71</b>
<b>Tabla 6.4.</b> Valores de capacitancia y máximos de corriente a -10 mV y +20 mV correspondientes a las corrientes LVA y HVA respectivamente, en células beta controles y preincubadas con palmitato (0.25, 0.5 y 1 mM) durante 5 min.-----	<b>91</b>
<b>Tabla 6.5.</b> Valores de capacitancia y máximos de corriente a -10 mV y +20 mV correspondientes a las corrientes LVA y HVA respectivamente, en células beta controles y preincubadas con palmitato (0.25, 0.5 y 1 mM) durante 1 h.-----	<b>94</b>
<b>Tabla 6.6.</b> Valores de capacitancia y máximos de corriente a -10 mV y +20 mV correspondientes a las corrientes LVA y HVA respectivamente, en células beta controles y preincubadas con palmitato (0.25, 0.5 y 1 mM) durante 24 h.-----	<b>96</b>
<b>Tabla 6.7.</b> Valores de capacitancia y máximos de corriente a -10 mV y +20 mV correspondientes a las corrientes LVA y HVA respectivamente, en células beta controles y preincubadas con palmitato (0.25 y 0.5 mM) durante 48-72 h.-----	<b>98</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> Estructura del páncreas.-----	<b>12</b>
<b>Figura 1.2.</b> Acoplamiento entre el estímulo de glucosa y la secreción de insulina.--- -----	<b>17</b>
<b>Figura 1.3.</b> Estructura general de los canales de calcio LVA y HVA.-----	<b>24</b>
<b>Figura 6.1.</b> Detección de la corriente tipo T en células beta neonatas, P20 y adultas.- -----	<b>57</b>
<b>Figura 6.2.</b> Corrientes de calcio LVA y HVA registradas en células beta neonatas, P20 y adultas.-----	<b>59</b>
<b>Figura 6.3.</b> Corrientes de calcio LVA y HVA registradas en células beta neonatas, P20 y adultas.-----	<b>62</b>
<b>Figura 6.4.</b> Variabilidad de corrientes de calcio HVA en células beta P20.-----	<b>64</b>
<b>Figura 6.5.</b> Efecto de los bloqueadores de canales de calcio sobre las corrientes de calcio LVA y HVA en células beta adultas.-----	<b>66</b>
<b>Figura 6.6.</b> Las células beta neonatas, P20 y adultas expresan las tres isoformas de los canales tipo T.-----	<b>69</b>
<b>Figura 6.7.</b> Expresión diferencial de las isoformas de los canales tipo T durante el desarrollo posnatal de la célula beta pancreática de rata.-----	<b>72</b>
<b>Figura 6.8.</b> Efecto de los bloqueadores de los canales de calcio sobre la secreción de insulina basal y estimulada por glucosa en células beta adultas.-----	<b>74</b>
<b>Figura 6.9.</b> Efecto de los bloqueadores de los canales de calcio sobre las subpoblaciones funcionales de células beta adultas.-----	<b>78</b>
<b>Figura 6.10.</b> Efecto agudo (5 min) del palmitato sobre la secreción de insulina basal y estimulada por glucosa en células beta adultas.-----	<b>80</b>
<b>Figura 6.11.</b> Efecto de la preincubación durante 1h con palmitato sobre la secreción de insulina basal y estimulada por glucosa en células beta adultas.-----	<b>82</b>

<b>Figura 6.12.</b> Efecto de la preincubación durante una hora con palmitato sobre las subpoblaciones funcionales de células beta adultas.-----	<b>84</b>
<b>Figura 6.13.</b> Efecto crónico (24 h) del palmitato sobre la secreción de insulina basal y estimulada por glucosa en células beta adultas.-----	<b>85</b>
<b>Figura 6.14.</b> Efecto crónico (24 h) del palmitato sobre las subpoblaciones funcionales de células beta adultas.-----	<b>87</b>
<b>Figura 6.15.</b> Viabilidad de células beta expuestas a 0.25, 0.5 y 1 mM de palmitato durante 1 h.-----	<b>88</b>
<b>Figura 6.16.</b> Viabilidad de células beta expuestas a 0.25,0.5 y 1 mM de palmitato durante 24 h.-----	<b>89</b>
<b>Figura 6.17.</b> Efectos agudos (5 min) del palmitato sobre las corrientes de calcio.-----	<b>90</b>
<b>Figura 6.18.</b> Efectos de la preincubación durante 1h con palmitato sobre las corrientes de calcio.-----	<b>92</b>
<b>Figura 6.19.</b> Efectos crónicos (24 h) del palmitato sobre las corrientes de calcio.-----	<b>95</b>
<b>Figura 6.20.</b> Efectos crónicos (48-72 h) del palmitato sobre las corrientes de calcio.-----	<b>97</b>

## ABREVIATURAS

RER	Retículo endoplásmico rugoso
GLP 1 y 2	Péptido parecido a glucagon 1 y 2
GSIS	Secreción de insulina estimulada por glucosa
ATP	Adenosin trifosfato
SUR1	Receptor de sulfonilurea 1
AMPC	Monofosfato cíclico de adenosina
AGL	Ácidos grasos libres
GPR	Receptor acoplado a proteína G
DAG	Diacilglicerol
PKC	Proteína cinasa C
PKA	Proteína cinasa A
RE	Retículo endoplásmico
IP3	Inositol trifosfato
GLUT 2	Transportador de glucosa tipo 2
ADP	Difosfato de adenosina
PMR	Potencial de membrana en reposo
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
P20	Posnatal 20
VGCC	Canales de calcio dependientes de voltaje (del inglés <i>voltage gated calcium channel</i> )
HVA	Canales activados a alto voltaje (del inglés <i>high voltage activated</i> )
LVA	Canales activados a bajo voltaje (del inglés <i>low voltage</i>

	<i>activated</i> )
Cav	Canal de calcio dependiente de voltaje
DHP	Dihidropiridinas
TTA-A <sub>2</sub>	(R)-2-(4-ciclopropilfenil)-N-(1-(5-(2,2,2 trifluoroetoxi) piridin 2-il) etil) acetamida
INS-1	Línea celular derivada de insulinoma
RINm5F	Línea celular de insulinoma de rata inducida por alta dosis de radiación de rayos X
NGF	Factor de crecimiento neuronal (del inglés <i>neuronal growth factor</i> )
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
PKG	Proteína cinasa dependiente de GMPc
CaMKII	Proteína cinasa dependiente de calcio/calmodulina tipo II
GK	Goto- Kakizaki
HIT-T15	Línea celular de insulinoma derivada de células beta pancreáticas de hamster
CPT-1	Carnitina palmitoil transferasa 1
ERK	Proteína cinasa regulada por señal extracelular (Del inglés <i>extracellular signal-regulated kinase</i> )
UCP2	Proteína desacoplante de la función mitocondrial (del inglés <i>mitochondrial uncoupling protein 2</i> )
SNAP-25	Proteína asociada al sinaptosoma de 25 kDa
NF-kB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
BSA	Albúmina sérica bovina

TTX	Tetrodotoxina
SBF	Suero bovino fetal
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico
PFH	Paraformaldehído
PBS	Sales de fosfato tamponantes (Del inglés <i>phosphate buffered saline</i> )
RHPA	Ensayo hemolítico inverso (del inglés <i>reverse hemolytic plaque assay</i> )
SP	Placas pequeñas (del inglés <i>small plaques</i> )
LP	Placas grandes (del inglés <i>long plaques</i> )
EEM	Error estándar de la media
I-V	Corriente-voltaje
ICa <sup>2+</sup>	Corriente de calcio
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero

## RESUMEN

La célula beta pancreática madura funcionalmente durante el primer mes de vida, lo que implica secretar la insulina necesaria y responder a los cambios en la glucosa extracelular. Existen evidencias que correlacionan cambios en la actividad de canales iónicos con la maduración de estas células. Entre los canales de calcio dependientes de voltaje (VGCC), los activados a bajo voltaje (LVA) han sido poco estudiados en células beta de cultivos primarios. Mientras que entre los activados a alto voltaje (HVA), el tipo L es el principal responsable del aumento en la concentración intracelular de calcio y la exocitosis de la insulina. Por otro lado, es conocido que los ácidos grasos libres constituyen importantes moléculas señalizadoras en diversos procesos celulares y entre ellos se encuentran los relacionados con las células beta. Se ha asociado su presencia con el desarrollo de patologías como la obesidad, el síndrome metabólico y la diabetes mellitus. Su papel en la disfunción de las células beta está relacionado con la actividad de canales iónicos, entre ellos, los VGCC.

Por tanto, en este trabajo decidimos evaluar los cambios en la expresión y la actividad de los VGCC durante el desarrollo posnatal de la célula beta pancreática de rata, así como caracterizar funcionalmente estos canales en la etapa adulta: su papel en la secreción de insulina y su modulación por palmitato.

Las células se obtuvieron de páncreas de ratas Wistar machos neonatas, de 20 días y de dos meses (adultas jóvenes). Los estudios electrofisiológicos se realizaron mediante la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana en la modalidad célula entera. La expresión de los canales se visualizó mediante inmunofluorescencia. La secreción de insulina en células beta aisladas se evaluó mediante el ensayo hemolítico inverso (RHPA).

La corriente HVA fue observada en todas las células y el porcentaje de detección de la corriente LVA aumentó con la edad. Los canales LVA y HVA presentaron un máximo de corriente cercano a  $-10$  mV y  $+20$  mV, respectivamente. La amplitud máxima de ambas corrientes fue mayor en las células adultas y la HVA aumentó con la maduración. Las corrientes de calcio en células beta de ratas P20 fueron

heterogéneas. En las tres edades se observó la presencia de las subunidades  $\alpha 1G$ ,  $\alpha 1H$  y  $\alpha 1I$  de los canales T. Las tres isoformas se expresaron diferencialmente durante el desarrollo posnatal. El Cav 3.1 fue el más expresado. Las células adultas expresaron más  $\alpha 1G$  y  $\alpha 1H$  que las células neonatas y P20. Mibefradil, TTA-A<sub>2</sub> y NiCl<sub>2</sub> bloquearon la corriente mediada por canales LVA en células beta adultas. Mibefradil y TTA-A<sub>2</sub> inhibieron la secreción de insulina en 5.6 mM de glucosa y nifedipina fue el más efectivo en 15.6 mM de glucosa. TTA-A<sub>2</sub> y nifedipina redujeron drásticamente la subpoblación de células beta funcionales LP en condiciones basal y estimulada por glucosa, respectivamente. La exposición a palmitato durante 1 hora aumentó la densidad de corriente HVA y la secreción de insulina tanto en condiciones basal como estimulada por glucosa. Sin embargo, la exposición crónica al ácido graso redujo la secreción de insulina y las corrientes mediadas por canales LVA y HVA.

Estos resultados muestran que los cambios en la expresión y la actividad de los VGCC durante el desarrollo posnatal desempeñan un importante papel en la maduración funcional de la célula beta pancreática de rata. Además, el palmitato modula de forma dual la secreción de insulina y la actividad de los VGCC en células adultas.

**Palabras claves:** canales LVA y HVA, desarrollo posnatal, secreción de insulina, palmitato.

## ABSTRACT

Pancreatic beta cells acquire functional maturity during the first month of development, allowing them to respond to variations in extracellular glucose concentration by secreting insulin. There is evidence that correlates changes in the activity of ion channels with the maturation of these cells. Within the voltage-gated calcium channels (VGCC), low-voltage-activated (LVA) channels have been poorly studied in primary beta cells, while the most studied channels are high-voltage-activated (HVA), principally L-type, mainly responsible for the increase in the intracellular calcium and insulin exocytosis. On the other hand, it is known that free fatty acids are important signaling molecules in various cellular processes and among them are those related to beta cells. Its presence has been associated with the development of pathologies such as obesity, metabolic syndrome and diabetes mellitus. Its role in the dysfunction of beta cells is related to the activity of ion channels, among them, VGCC.

Therefore, we decided to analyze the changes in the expression and activity of VGCC during the postnatal development in rat beta cells, their role in insulin secretion and their modulation by palmitate.

Beta cells were obtained from the pancreas of neonatal, 20 days and two months male old Wistar rats. Electrophysiological recordings were performed using whole-cell voltage clamp technique. Channels expression was visualized by immunofluorescence. Insulin secretion in isolated beta cells was evaluated by the reverse hemolytic plaque assay (RHPA).

The HVA current was observed in all the cells and the detection percentage of LVA current increased with the age of the animal. Peak currents of LVA and HVA channels were close to -10 mV and +20 mV, respectively. The maximum amplitude of both currents was higher in the adult cells and the HVA increased with maturation. The calcium currents in beta cells of P20 were heterogeneous. Immunocytochemistry revealed the presence of  $\alpha 1G$ ,  $\alpha 1H$  and  $\alpha 1I$  subunits of LVA channels at all ages. The three isoforms were differentially expressed during

postnatal development. The Cav 3.1 subunit was the most expressed in all ages. Adult beta cells expressed more  $\alpha 1G$  and  $\alpha 1H$  than neonatal and P20 cells. Mibefradil, TTA-A<sub>2</sub> and NiCl<sub>2</sub> blocked the current mediated by LVA channels in adult beta cells. Mibefradil and TTA-A<sub>2</sub> inhibited insulin secretion in 5.6 mM glucose and nifedipine was the most effective in 15.6 mM glucose. TTA-A<sub>2</sub> and nifedipine drastically reduced the LP functional beta cell subpopulation under basal and glucose-stimulated conditions respectively. Exposure to palmitate for 1 hour increased the HVA current density and insulin secretion in both basal and stimulating glucose conditions. However, chronic exposure to fatty acid reduced insulin secretion and the currents mediated by LVA and HVA channels.

We conclude that changes in expression and activity of VGCC during the development play an important role in the physiological maturation of beta cells. In addition, palmitate modulates in a dual manner the secretion of insulin and the activity of VGCC in adult cells.

**Key words:** LVA and HVA channels, postnatal development, insulin secretion, palmitate.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Estructura del páncreas

El páncreas es una glándula mixta compuesta por una parte exocrina y otra endocrina. La porción exocrina comprende el 95-97 % del páncreas total y está compuesta por el tejido acinar y un sistema de conductos pancreáticos cuya función principal es la secreción y el transporte de enzimas y bicarbonato necesarios para la degradación y la absorción de los nutrientes (Hiriart, 1997) (Figura 1.1).

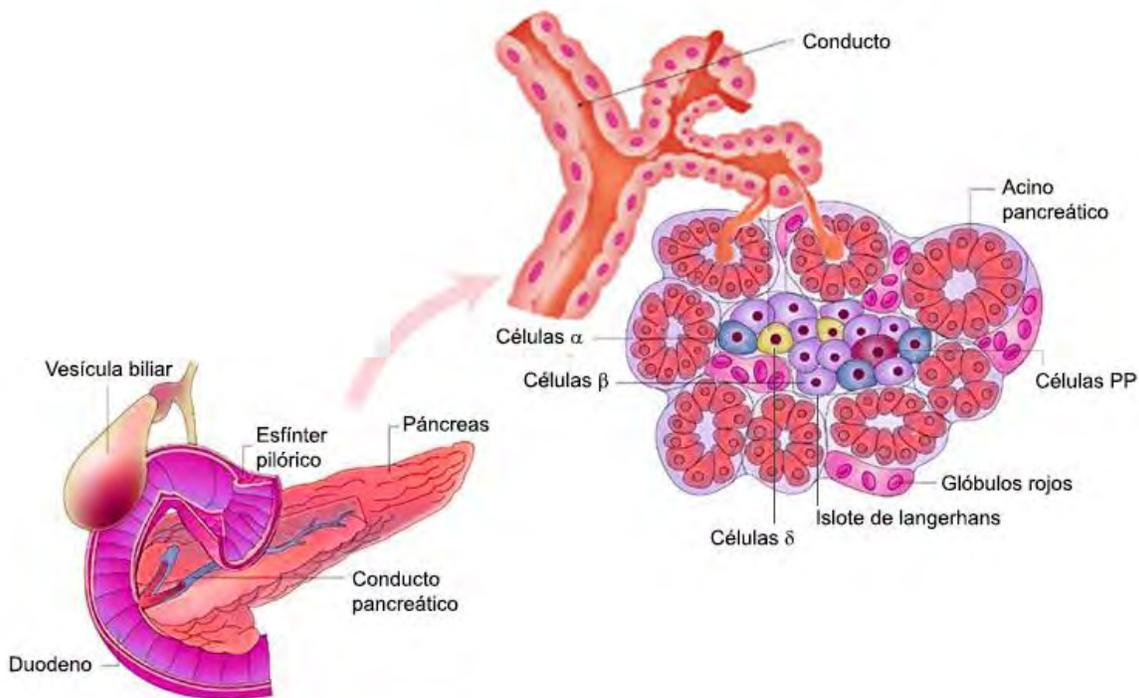
La porción endocrina está formada por los islotes pancreáticos o islotes de Langerhans y es vital en el control de la homeostasis de la glucosa en los organismos. Los islotes constituyen cerca del 2 % del páncreas total y están constituidos por cuatro tipos celulares:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y PP. Estas células secretan distintas hormonas peptídicas que pueden tener acción local (autocrina o paracrina) o pueden ser distribuidas a través del torrente sanguíneo hasta sus órganos blanco (Pipeleers, 1992).

Las células  $\alpha$  constituyen del 15 al 20 % del islote pancreático y generalmente se encuentran en la periferia del mismo. Estas células secretan glucagon principalmente en condiciones de hipoglucemia, el cual promueve la glucogenólisis y la gluconeogénesis hepática. La acción paracrina de esta hormona dentro del islote es estimular la secreción de insulina y somatostatina (Pipeleers, 1992).

Las células  $\delta$  representan del 5 al 10% del islote y secretan somatostatina. Esta hormona ejerce efectos inhibitorios sobre las secreciones pancreáticas endocrina y exocrina (Hiriart, 1997).

Las células PP constituyen menos del 2% del islote pancreático y secretan polipéptido pancreático. Esta hormona, al parecer, no tiene efecto sobre la insulina *in vivo*, pero inhibe la secreción de glucagon. Así mismo, tiene efectos inhibitorios sobre el vaciado gástrico, y la actividad motora intestinal (Brereton et al., 2015).

Las células  $\beta$  son el tipo celular más abundante dentro del islote, constituyen del 70 al 80 % de éste y en roedores se localizan en el centro del mismo. Estas células son de gran importancia en la homeostasis de la glucosa, ya que la síntesis y secreción de insulina es exclusiva de ellas en mamíferos. La insulina es una hormona hipoglucemiante (que reduce los niveles circulantes de glucosa plasmática). Esta hormona es secretada principalmente en respuesta a un aumento en las concentraciones extracelulares de glucosa, así como ante la presencia de otras hormonas pancreáticas y por estimulación nerviosa (Kulkarni, 2004). Además la insulina ejerce efectos autocrinos y paracrinos en el páncreas.



**Figura 1.1 Estructura del páncreas.** El páncreas se localiza en el abdomen, adyacente al duodeno. Es una glándula mixta formada por las células acinares y un sistema de conductos (parte exocrina) y los islotes pancreáticos o de Langerhans (parte endocrina). Los islotes pancreáticos están formados por cuatro tipos celulares,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y PP que secretan glucagón, insulina, somatostatina y polipéptido pancreático respectivamente.

## 1.2 La insulina: síntesis y vías de secreción

La insulina, sintetizada y secretada exclusivamente en mamíferos por las células beta pancreáticas, es una hormona anabólica esencial para la vida. En su ausencia, los mamíferos neonatos en pocas horas pueden desarrollar cetoacidosis severa y diabetes que puede conducir a la muerte.

### 1.2.1 Síntesis

La insulina es el producto directo de la traducción del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de insulina y es sintetizada como una prohormona. Esta molécula contiene las cadenas A y B de la insulina, el péptido señal y el péptido C. La pre-proinsulina formada se transloca a través del retículo endoplásmico rugoso (RER) con ayuda del péptido señal. Inmediatamente después de la translocación de la cadena polipeptídica, una peptidasa separa la proinsulina del péptido señal. En el lumen del RER la proinsulina formada se pliega y se transporta a la región cis del aparato de Golgi, donde es sometida a un procesamiento posterior y al empaquetamiento en vesículas de secreción. Una vez empaquetada, el péptido C se separa de las dos cadenas de la insulina y quedan almacenados péptido C e insulina madura en cantidades equimolares, junto a una pequeña concentración de proinsulina que ante un aumento en la concentración de glucosa extracelular es secretada (Jefferson et al., 2001).

### 1.2.2 Secreción de insulina

La secreción de insulina tiene dos componentes fundamentales, una secreción constitutiva y otra estimulada o regulada. Los mecanismos de la secreción constitutiva por los cuales algunos gránulos secretorios son liberados continuamente no han sido totalmente estudiados hasta ahora. Sin embargo, la secreción de insulina estimulada o regulada está mejor descrita. Esta secreción depende fuertemente del aumento en la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$ . Aunque la glucosa es su principal secretagogo, otras moléculas también pueden estimular o potenciar su secreción, como los aminoácidos, los ácidos grasos no esterificados,

hormonas como el glucagon y el péptido parecido a glucagon 1 y 2 (GLP1 y 2) y neurotransmisores como la acetilcolina. Otras hormonas como la epinefrina, norepinefrina y somatostatina regulan negativamente la secreción de insulina.

En el caso de los aminoácidos, aunque los mecanismos de acción no están totalmente claros, se conoce que un número relativamente pequeño de ellos puede promover o potenciar de forma sinérgica la secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS) en células beta (Hiriart et al., 2015). Se conoce que alanina y leucina aumentan la producción de ATP, lo que promueve el cierre de los canales de  $K^+$  sensibles a ATP ( $K_{ATP}$ ) (Hiriart et al., 2015). Un estudio en ratones *knockout* para el receptor de sulfonilurea 1 (SUR1) planteó que la glutamina ejerce efectos amplificadores sobre la GSIS que están mediados por vías dependientes de AMPc. Estos efectos son análogos a los del receptor GLP-1 sobre la secreción de insulina (Zhang and Li, 2013).

Los estudios en humanos han mostrado que los aminoácidos potencian la GSIS y esto constituye la base de la aplicación de terapias combinadas de ambos secretagogos: glucosa y aminoácidos, con el fin de lograr una respuesta secretora mayor. En la última década se ha revelado el importante papel a estas biomoléculas en desórdenes clínicos asociados con hipoglucemia sensible a aminoácidos en niños con hiperinsulinismo congénito (Zhang and Li, 2013).

Por otra parte, se ha reportado que concentraciones sanguíneas normales de ácidos grasos libres (AGL) son necesarios para mantener la GSIS en las células beta (Stein et al., 1997). Varios mecanismos se han propuesto para explicar el papel fisiológico de los AGL en la GSIS. Se conoce que durante el período de ayuno los AGL circulantes son oxidados y aumenta la síntesis de ATP, lo que conduce a la despolarización de la célula beta con la consecuente secreción de insulina. En tanto, luego de la ingesta, los AGL asociados al metabolismo de la glucosa, regulan las vías anapleróticas y catapleróticas mitocondriales y por tanto, la liberación de insulina. Se conoce además, que cuando la glucosa aumenta, la oxidación de los AGL disminuye y la acumulación resultante de acyl-CoAs de cadena larga facilita la fusión vesicular a la membrana de la célula beta. También es conocido que

receptores acoplados a proteína G como el GPR40, activados por AGL, amplifican la exocitosis de la insulina mediante diacilglicerol (DAG), la proteína cinasa C (PKC) y el inositol trifosfato (IP3), lo que conlleva al aumento en el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  en las células beta (Hiriart et al., 2015).

### **1.3 Acoplamiento entre la actividad eléctrica de la célula beta y la secreción de insulina estimulada por glucosa**

Las células beta son eléctricamente excitables y las señales eléctricas desempeñan un papel esencial en la entrada de calcio y en la regulación de la secreción de insulina (Drews et al., 2015; Mears, 2004; Barbosa et al., 1998; Dean and Matthews, 1970). A su vez, también se consideran sensores metabólicos, pues continuamente detectan y responden a cambios en la concentración de glucosa circulante, y regulan su homeostasis (Hiriart et al., 2015).

Cuando la concentración extracelular de glucosa aumenta de 4.5 a 5 mM (concentración basal) a más de 7 mM (concentración estimulante), la célula beta se despolariza e inicia una actividad eléctrica rítmica, que comienza con una despolarización lenta desde el potencial de reposo de -70 mV hasta un potencial en el cual se produce una actividad eléctrica sostenida (Drews et al., 2015). Esta actividad eléctrica consta de oscilaciones en el potencial de membrana que se caracterizan por una despolarización lenta seguida de una rápida, hasta alcanzar una meseta en la que se superponen ráfagas de potenciales de acción, separadas por períodos silentes eléctricamente, hasta que la membrana se repolariza. Estas oscilaciones continúan mientras los niveles de glucosa permanezcan elevados (Bertram and Sherman, 2000; Cook et al., 1991; Hiriart and Aguilar-Bryan, 2008).

El acoplamiento entre el estímulo de glucosa y la actividad eléctrica inicia con el transporte del azúcar al espacio intracelular. Las células beta de roedores expresan el transportador de glucosa tipo 2 (Glut 2). Una vez en el interior celular, la glucocinasa fosforila la glucosa, formándose glucosa 6-fosfato. Este paso es limitante para el metabolismo de la glucosa y fundamental para detectar los cambios

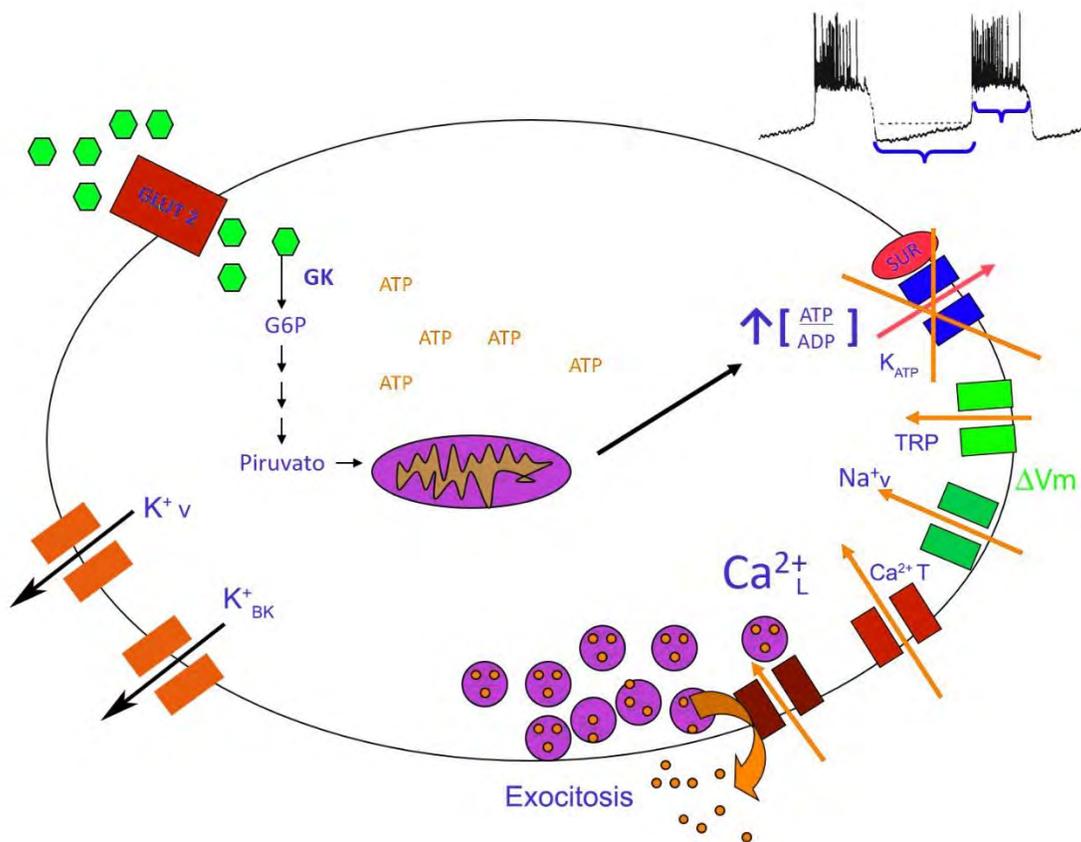
en la concentración de glucosa, por medio del cual se regula la cantidad de insulina secretada (Matschinsky, 2002).

En ausencia de glucosa, la relación ATP/ADP en el interior celular es baja y los canales  $K_{ATP}$ , que en conjunto con la actividad de la ATPasa de  $Na^+/K^+$  son los responsables del potencial de membrana en reposo (PMR) cercano a  $-70$  mV, están abiertos. Cuando aumenta la concentración extracelular de glucosa, ésta entra al interior celular mediante el transportador Glut 2. El catabolismo oxidativo de la glucosa mediante glucolisis, Ciclo de Krebs y fosforilación oxidativa, favorece el incremento en la razón ATP/ADP, lo que promueve el cierre de los canales  $K_{ATP}$  y la reducción en la permeabilidad al potasio. Este mecanismo, unido a la contribución de las corrientes catiónicas no selectivas, las que han sido asociadas a miembros de la familia de canales del tipo Receptor de Potencial Transitorio (TRP), favorecen la despolarización de la membrana hasta llegar a alrededor de los  $-40$  mV, el umbral de activación de canales sensibles a voltaje. Entre estos canales, los que se activan a potenciales menos despolarizados son los canales de  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  tipo T, aumentando así la entrada de  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  a las células (Hiriart, M. and Matteson, 1988; Hiriart et al., 2015). Esta entrada de cationes causa un incremento abrupto del potencial de membrana (hasta alrededor de  $-20$  mV), lo que a su vez facilita la activación de otros canales de  $Ca^{2+}$  que se activan a potenciales de membrana más positivos, principalmente de tipo L. Está reportado que en las células beta de roedores así como de otras especies y en líneas celulares de insulinoma, los canales tipo L son los principales responsables del influjo de  $Ca^{2+}$  (Mears, 2004; Davalli et al., 1996; Pressel and Mislner, 1991).

Los canales de  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  tipo T despolarizan la membrana hasta alcanzarse la fase de meseta que es mantenida principalmente por la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de canales tipo L. Cuando se alcanza el potencial umbral, las células beta comienzan a disparar los potenciales de acción. Esta actividad eléctrica es oscilatoria y consiste de grupos de potenciales de acción superpuestos a la meseta que están separados por los intervalos de repolarización. El incremento en la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$ , mediado principalmente por canales de calcio tipo L, desencadena la

exocitosis de la insulina contenida en gránulos de secreción (Hiriart and Aguilar-Bryan, 2008). (Figura 1.2).

Finalmente, canales de  $K^+$  dependientes de voltaje (de rectificación tardía) y canales de  $K^+$  de conductancia elevada sensibles a calcio (BK), son los responsables de la fase de repolarización, que contribuye a que la célula beta retorne a su PMR. El balance en la actividad de estos canales genera un patrón oscilatorio del voltaje transmembranal que se correlaciona con la secreción de insulina (Drews et al., 2015).



**Figura 1.2. Acoplamiento entre el estímulo de glucosa y la secreción de insulina.** La glucosa entra a la célula beta a través de Glut 2 en roedores y producto de su metabolismo se sintetiza ATP. El aumento en la razón ATP/ADP cierra los canales K<sub>ATP</sub>, lo que despolariza la membrana. La despolarización aumenta la probabilidad de apertura de

canales sensibles a voltaje, primero canales de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T y posteriormente canales HVA, de tipo L principalmente. El influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  aumenta la concentración de calcio intracelular, lo que conduce a la exocitosis de los gránulos que contienen insulina. Finalmente, canales de  $\text{K}^+$  dependientes de voltaje (de rectificación tardía) y canales de  $\text{K}^+$  de elevada conductancia que son sensibles a calcio (BK), son los responsables de la fase de repolarización, que contribuye a que la célula beta retorne a su PMR. En la parte derecha superior se esquematiza la actividad eléctrica de la célula beta. Los canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T despolarizan la membrana hasta alcanzarse la fase de meseta que es mantenida principalmente por la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales tipo L. Cuando se alcanza el potencial umbral, las células beta comienzan a disparar los potenciales de acción. Esta actividad eléctrica es oscilatoria y consiste de grupos de potenciales de acción superpuestos a la meseta que están separados por los intervalos de repolarización.

#### **1.4 Desarrollo posnatal de la célula beta pancreática de rata**

Las células beta pancreáticas adquieren la madurez funcional durante el primer mes de vida, lo que les permite secretar cantidades robustas de insulina y responder a los cambios en la concentración extracelular de glucosa.

Está bien establecido que los islotes fetales secretan poca insulina ante un estímulo de glucosa. Un estudio en páncreas de rata perfundidos de 3 días previos al nacimiento mostró la ausencia de una respuesta secretora bifásica a 16.7 mM de glucosa (Hole et al., 1988). Estos autores atribuyeron esta inmadurez a un fallo en el acoplamiento entre el metabolismo de los nutrientes y los canales  $\text{K}_{\text{ATP}}$ , lo que previene la despolarización de la membrana celular. Otros autores también reportaron un desajuste en el metabolismo de la glucosa en células beta de ratas de 21 días fetales (Rorsman et al., 1989). En este caso los autores explicaron que la inmadurez fisiológica en esta etapa fetal está dada por alteraciones en la función mitocondrial que conducen a una despolarización defectuosa, por lo que no aumenta el calcio intracelular y no se secreta insulina.

Curiosamente, se ha planteado que a diferencia de lo que sucede con la glucosa, otros secretagogos como leucina, arginina y teofilina pueden promover la liberación

de insulina en la etapa fetal, lo que sugiere que al menos una parte de la maquinaria secretora está desarrollada (Ammon et al., 1989). Otro estudio mostró que leucina, arginina y gliceraldehído además de estimular la secreción en los islotes fetales, son capaces de incrementar el calcio intracelular (Weinhaus et al., 1995). Un estudio posterior en células beta fetales porcinas y en *clusters* celulares de islotes humanos reveló que glucosa y leucina no son capaces de potenciar un aumento en el calcio intracelular. Estos autores atribuyeron las diferencias en los efectos de los secretagogos a la existencia de una maduración de las células beta dependiente del tiempo (Weinhaus et al., 2003).

Mientras que durante la etapa fetal la homeostasis de la glucosa es dependiente de la mamá, el nacimiento es una ventana de desarrollo crítica, ya que la nutrición de los organismos se vuelve totalmente dependiente de la disponibilidad de alimentos. La necesidad de mantener la glucemia podría ser una fuerza impulsora para que las células beta maduren y secreten insulina en respuesta a la concentración de nutrientes. Las células beta neonatales al igual que las fetales son consideradas inmaduras, su secreción de insulina es pobre y son incapaces de detectar variaciones en la concentración extracelular de glucosa. Sin embargo, las células beta adultas pueden secretar más insulina en respuesta a un aumento en la glucosa extracelular y son consideradas maduras (Navarro-Tableros et al., 2007b). En esta etapa, la secreción de insulina es bifásica y consta de una primera fase de alrededor de 10 minutos de duración y una segunda fase de secreción sostenida (Vignali et al., 2006).

La respuesta inicial o primera fase de la secreción de insulina en las células adultas se caracteriza por un rápido incremento en la secreción, que ocurre inmediatamente después del aumento en la concentración de glucosa y es seguido por una declinación también rápida. Si el aumento en la concentración de glucosa es sostenido, se produce la segunda fase de secreción, la cual es más lenta, gradual y puede sostenerse durante varias horas (Caumo and Luzi, 2004; Rorsman et al., 2000).

Se ha sugerido que la primera fase de la secreción resulta de la liberación de insulina contenida en los gránulos maduros que están anclados en las proximidades de la membrana plasmática. Sin embargo, la secreción de la segunda fase deriva de la insulina de los gránulos almacenados. En esta segunda fase también es importante la contribución de la insulina recién sintetizada (Daniel et al., 1999).

De manera interesante, este patrón bifásico de secreción se altera en presencia de patologías relacionadas con alteraciones en la síntesis, secreción y acciones de la insulina como la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (Porte and Kahn, 1991). Este trastorno metabólico se caracteriza por la presencia de hiperglucemia (elevadas concentraciones de glucosa sanguínea). Los pacientes con DM2 no producen suficiente insulina o presentan resistencia a la hormona, que es la incapacidad de los tejidos blanco de responder a las acciones de la insulina (American Diabetes Association). Los pacientes con DM2 presentan además de un patrón de secreción anormal, una pérdida selectiva de la primera fase y una atenuación de la segunda (Rorsman et al., 2000).

Otro momento crucial en el desarrollo de la célula beta es el período de ablactación (alrededor del día 20 en las ratas, P20). Un trabajo previo en nuestro laboratorio reveló que en este período constituye una ventana crítica en el desarrollo de la célula beta de rata, debido a los cambios que se producen en la alimentación del animal, que pasa de ser una dieta alta en grasa a una rica en carbohidratos (Aguayo-Mazzucato et al., 2006). Este estudio demostró que la etapa P20 se caracteriza por la presencia de hiperinsulinemia y por una resistencia a la insulina fisiológica. Resulta muy interesante profundizar en el estudio de este período del desarrollo de la rata, en el que los cambios fisiológicos que se producen deben estar íntimamente relacionados con los componentes de la maquinaria de respuesta de la célula beta, entre los que se incluyen receptores, enzimas y canales iónicos.

En nuestro laboratorio se han realizado otros estudios relacionados con la maduración de las células beta. Particularmente sobre los canales iónicos, se demostró que la densidad de corriente de bario y los niveles de expresión de ARNm

correspondientes a las subunidades  $\alpha 1B$ ,  $\alpha 1C$ ,  $\alpha 1D$  y  $\alpha 1G$  en células beta neonatales son menores que en las células adultas (Navarro-Tableros et al., 2007b).

Además, recientemente nuestro grupo reveló, mediante análisis de microarreglos, que los cambios en el transcriptoma están relacionados con la maduración de la célula beta de rata (Larqué et al., 2016). En este estudio mostramos que existe una expresión diferencial entre las etapas P20 y adulta en una variedad de genes relacionados con la fisiología de la célula beta, entre ellos genes implicados en la excitabilidad, el metabolismo, entre otros.

Como se puede ver, varios grupos de trabajo han puesto un especial énfasis en el estudio de la secreción hormonal durante la ontogenia de la célula beta pancreática, aunque aún faltan por esclarecer mejor los mecanismos y factores implicados en el proceso. Es por ello que consideramos esencial profundizar en los estudios sobre la maduración de la célula beta. Con esto, se puede contribuir a una mejor comprensión de la fisiología de la célula beta así como de las patologías relacionadas con alteraciones en su funcionamiento.

## **1.5 Canales de calcio dependientes de voltaje (VGCC)**

### **1.5.1 Estructura y propiedades biofísicas**

Los canales de calcio dependientes de voltaje (VGCC del inglés *voltage gated calcium channel*) son complejos multiproteicos membranales cuya probabilidad de apertura se modifica con el potencial de membrana, con lo cual la conformación de estos canales pasa, por ejemplo, de un estado cerrado a uno abierto. El calcio que es conducido a través de estos canales es un importante segundo mensajero en la transducción de las señales eléctricas en distintas respuestas celulares. El aumento en el calcio intracelular controla procesos celulares tan diversos como contracción muscular, exocitosis, endocitosis, transmisión sináptica, metabolismo celular, proliferación, diferenciación, desarrollo, entre otros. Estas acciones se llevan a cabo mediante la regulación de la fosforilación proteica, la expresión génica y el ciclo celular (Catterall, 2000).

Los VGCC están compuestos por subunidades proteicas diferentes ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y  $\gamma$ ). El modelo general propuesto indica que en estos canales, la subunidad principal ( $\alpha 1$ ) es una proteína transmembranal que forma el poro de conducción y que se asocia con el dímero  $\alpha 2\delta$  mediante enlaces disulfuro. A su vez, está unida a una subunidad  $\beta$  intracelular y en algunos casos a una subunidad transmembranal y (Figura 1.3), (Catterall, 2000).

Existen diferencias estructurales entre los tipos de canales de calcio y lo mencionado anteriormente se cumple para los canales activados a voltajes altos (HVA del inglés *high voltage activated*). Los canales tipo T o activados a bajo voltaje (LVA del inglés *low voltage activated*), a diferencia de los canales HVA, están formados exclusivamente por la subunidad  $\alpha 1$  (Figura 1.3) y hasta el momento no se ha demostrado que presenten subunidades reguladoras (Talavera and Nilius, 2006).

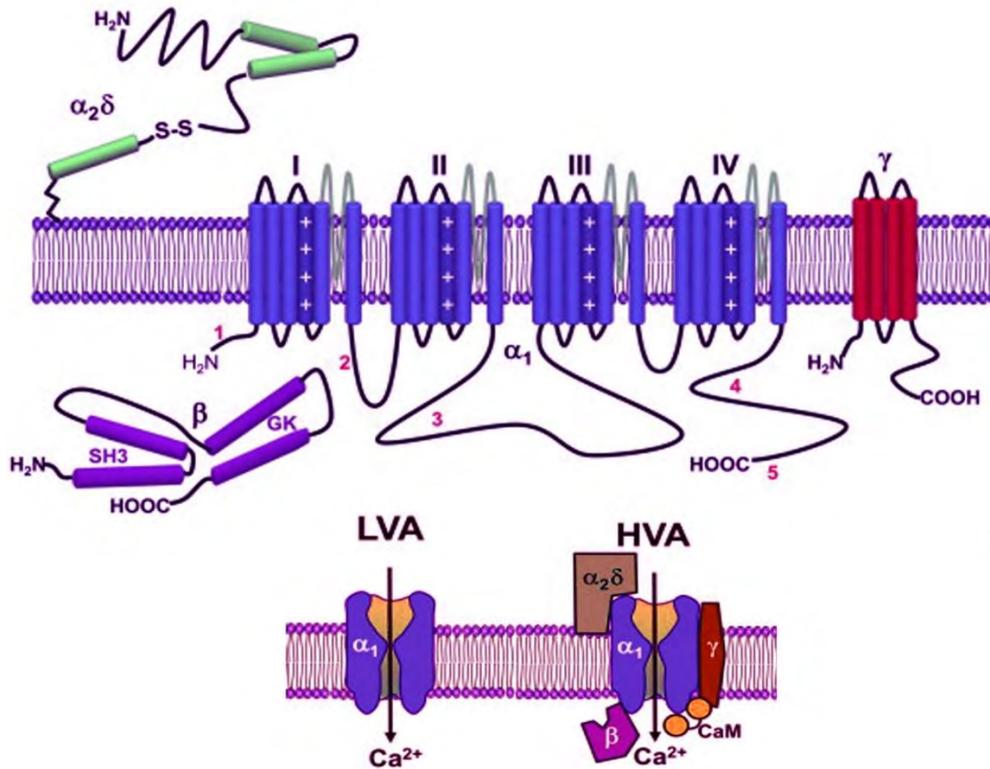
El tipo de subunidad  $\alpha 1$  le da al canal las características electrofisiológicas y farmacológicas, y al menos diez genes diferentes codifican para ellas (Catterall et al., 2005). La subunidad  $\alpha 1$  forma el poro hidrofílico conductor que permite el flujo de iones y contiene además regiones especializadas que determinan la selectividad del canal y su sensibilidad al voltaje. Está formada por cuatro repeticiones homólogas o dominios transmembranales (I al IV), unidos entre sí por asas intracelulares. Cada dominio está integrado por seis segmentos transmembranales (S1 al S6), contiene el poro y el dominio sensor de voltaje (S1 al S4), el que le confiere la sensibilidad al voltaje. Dentro de este dominio sensor de voltaje el segmento S4 es la región de cargas positivas.

Las subunidades  $\alpha 2\delta$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  no forman directamente el poro conductor, por lo que se denominan accesorias. Sin embargo, estas subunidades están relacionadas a la regulación de la translocación de los canales a la membrana, las propiedades de compuerta y la dependencia al voltaje (Arikkath and Campbell, 2003; Catterall, 2000).

La subunidad  $\beta$  es citosólica y se asocia con la subunidad  $\alpha 1$ , se han identificado 4 subtipos distintos (Vance et al., 1998). Entre sus funciones principales están el

mantener el tránsito de la subunidad  $\alpha 1$  a la membrana plasmática y puede regular las propiedades biofísicas del canal por contener varios sitios de fosforilación (Viard et al., 2004). En los islotes pancreáticos de rata se han identificado los ARNm que codifican para las subunidades  $\beta 2$  y  $\beta 3$  (Iwashima et al., 2001). Sin embargo, en estas células no están bien descritos los mecanismos que regulan la interacción de las subunidades  $\beta$  y  $\alpha 1$ .

Se conocen cuatro subtipos de subunidades  $\alpha 2\delta$ , que son codificadas como un dímero por un mismo gen. Se conoce que todos los subtipos aumentan la amplitud de la corriente y pueden modular la activación e inactivación del canal. Se conocen distintos subtipos de la subunidad  $\gamma$  ( $\gamma 1$  a  $\gamma 8$ ), expresados en una amplia variedad de tejidos. Aunque ningún subtipo está relacionado con el tráfico de los canales, algunos autores han planteado que su expresión inhibe la actividad del canal mediante la modulación negativa de la cinética de activación (Hullin et al., 1992).



**Figura 1.3 Estructura general de los canales de calcio LVA y HVA.** La subunidad  $\alpha_1$  forma el poro hidrofílico conductor que permite el flujo de iones y contiene además regiones especializadas que determinan la selectividad del canal y su sensibilidad al voltaje. Está formada por cuatro dominios transmembranales (I al IV), unidos entre sí por asas intracelulares. Cada dominio está integrado por seis segmentos transmembranales (S1 al S6), contiene el poro y la región de cargas positivas, conocida como sensor de voltaje, situado en el segmento S4, el que le confiere la sensibilidad al voltaje. Las subunidades  $\alpha_2\delta$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  no forman directamente el poro conductor, por lo que se denominan accesorias, y tienen funciones reguladoras en los canales HVA.

Los primeros estudios electrofisiológicos identificaron dos grandes grupos de canales de calcio: los de bajo umbral de activación o LVA y los de alto umbral o HVA (Carbone and Lux, 1984; Matteson and Armstrong, 1986) que presentan propiedades biofísicas diversas.

Los canales LVA se activan a potenciales de membrana cercanos a -60 mV, los canales HVA, a voltajes menos negativos, entre -30 y -20 mV. Además de activarse

a potenciales de membrana más negativos comparados con el resto de los canales de calcio, los canales LVA presentan valores pequeños de conductancia y cinéticas de activación e inactivación rápidas (Talavera and Nilius, 2006). Por su parte, los canales HVA se inactivan más lentamente y tienen una conductancia unitaria tres veces mayor que los LVA (Bean, 1985; Matteson and Armstrong, 1986). (Tabla 1.1)

## 1.5.2 Nomenclatura

Existen diversas formas de clasificar y nombrar a los VGCC. La clasificación teniendo en cuenta a estructura primaria de las subunidades  $\alpha 1$  fue propuesta en el año 2000 y describe tanto a los ARNm como a las proteínas que codifican (Ertel et al., 2000). Esta clasificación incluye tres familias: Cav1, Cav2 y Cav3. El primer término de la nomenclatura se refiere al ion permeante (en este caso  $\text{Ca}^{2+}$ ), seguido por el principal estímulo para la apertura o cierre del canal que es el voltaje y finalmente, dos números que indican en orden la familia de proteínas y la isoforma particular respectivamente. Hasta el momento se han identificado 10 isoformas, entre las que se incluyen: Cav1.1 ( $\alpha 1\text{S}$ ), Cav 1.2 ( $\alpha 1\text{C}$ ), Cav 1.3 ( $\alpha 1\text{D}$ ), Cav 1.4 ( $\alpha 1\text{F}$ ), Cav 2.1 ( $\alpha 1\text{A}$ ), Cav 2.2 ( $\alpha 1\text{B}$ ), Cav 2.3 ( $\alpha 1\text{E}$ ), Cav 3.1 ( $\alpha 1\text{G}$ ), Cav 3.2 ( $\alpha 1\text{H}$ ) y Cav 3.3 ( $\alpha 1\text{I}$ ).

Otra clasificación de los VGCC toma en consideración el voltaje que se requiere para activarlos. Teniendo en cuenta este criterio los VGCC se dividen en dos grandes grupos: los que se activan a bajo umbral de activación o LVA y los que se activan a alto umbral o HVA (Carbone and Lux, 1984; Matteson and Armstrong, 1986).

Una clasificación menos formal agrupa a los VGCC en canales de calcio tipo L, P/Q, N, R y T. Los Cav 1.1 al Cav 1.4 generan corrientes de larga duración (tipo L); Cav 2.1 fueron registradas por primera vez y caracterizadas en neuronas de Purkinje y en células granulares del cerebelo (tipo P/Q); Cav 2.2 fueron identificadas en neuronas (tipo N); Cav 2.3 se identificó en un inicio como la corriente de calcio remanente o residual cuando se bloquea el resto de los canales HVA (tipo R) y los

Cav 3.1 al Cav 3.3 generan corrientes transitorias (tipo T) (Catterall et al., 2005; Yang and Berggren, 2006).

Los diversos tipos de corrientes de calcio pueden ser distinguidos de forma individual por sus propiedades biofísicas, así como por su sensibilidad a diferentes toxinas y fármacos (Catterall, 2000). La Tabla 1.1 resume la clasificación de los VGCC, sus propiedades biofísicas y farmacológicas.

**Tabla 1.1 Clasificación, propiedades electrofisiológicas y farmacología de los VGCC**

CLASIFICACIÓN				PROPIEDADES BIOFÍSICAS				FARMACOLOGÍA
Númerica (subunidad $\alpha 1$ )	Alfabética (subunidad $\alpha 1$ )	Activación	Tipo	Activación	Inactivación	Conductancia unitaria (pS)	Conductancia relativa	
Cav 1.1	$\alpha 1S$	HVA	L	~ -30 mV	Lenta ( $\tau > 500$ ms)	25	$Ba^{2+} > Ca^{2+}$	DHP
Cav 1.2	$\alpha 1C$	HVA	L	~ -30 mV	Lenta ( $\tau > 500$ ms)	25	$Ba^{2+} > Ca^{2+}$	DHP
Cav 1.3	$\alpha 1D$	HVA	L	~ -30 mV	Lenta ( $\tau > 500$ ms)	25	$Ba^{2+} > Ca^{2+}$	DHP
Cav 1.4	$\alpha 1F$	HVA	L	~ -30 mV	Lenta ( $\tau > 500$ ms)	25	$Ba^{2+} > Ca^{2+}$	DHP
Cav 2.1	$\alpha 1A$	HVA	P/Q	~ -20 mV	Moderada ( $\tau \sim 50-80$ ms)	13	$Ba^{2+} > Ca^{2+}$	$\omega$ -Aga IVA
Cav 2.2	$\alpha 1B$	HVA	N	-	Rápida	-	-	$\omega$ -CTXG-VIA
Cav 2.3	$\alpha 1E$	HVA	R	-	Rápida	-	-	SNX 482
Cav 3.1	$\alpha 1G$	LVA	T	~ -70 mV	Muy rápido ( $\tau \sim 20-50$ ms)	8	$Ba^{2+} = Ca^{2+}$	Mibefradil, $NiCl_2$ , TTA-P2
Cav 3.2	$\alpha 1H$	LVA	T	~ -70 mV	Muy rápido ( $\tau \sim 20-50$ ms)	8	$Ba^{2+} = Ca^{2+}$	Mibefradil, $NiCl_2$ , TTA-P2
Cav 3.3	$\alpha 1I$	LVA	T	~ -70 mV	Muy rápido ( $\tau \sim 20-50$ ms)	8	$Ba^{2+} = Ca^{2+}$	Mibefradil, $NiCl_2$ , TTA-P2

DHP: Dihidropiridinas,  $\omega$ -Aga IVA:  $\omega$ -Agatoxina IVA,  $\omega$ -CTXG-VIA:  $\omega$ - Conotoxina G-VIA

TTA-P2: 3,5-dichloro-N-[1-(2,2-dimethyl-tetrahydro-pyran-4-ylmethyl)-4-fluoro-piperidin-4-ylmethyl]-benzamide

Datos tomados de Catterall et al., 2003; Choe et al., 2011; Yang and Berggren, 2006).

### **1.5.3 Expresión heterogénea de VGCC en las células beta pancreáticas**

Las células beta de las distintas especies y las líneas celulares de insulinoma expresan diferentes tipos de canales de VGCC. Esta expresión es heterogénea, teniendo en cuenta tanto el tipo de isoforma como el organismo o línea celular.

#### **Canales tipo L**

Es bien conocido que el influjo de calcio a través de los canales tipo L constituye la principal vía que desencadena la exocitosis de la insulina. Sin embargo, la expresión de las distintas isoformas de los canales tipo L difiere entre las especies (Barg et al., 2001; Liu et al., 2003; Seino, 1995, Horvath et al., 1998). Aunque las células beta de roedores expresan las subunidades  $\alpha 1D$  (Cav 1.3) y  $\alpha 1C$  (Cav1.2), está aceptado que en las células beta pancreáticas de rata y en líneas celulares la entrada de calcio está dada principalmente por la isoforma Cav1.3. La entrada de calcio a través de esta isoforma del canal está relacionada estrechamente con la secreción de insulina (Davalli et al., 1996; Rosenbaum et al., 2001; Satin, 2000; Sher et al., 2003; Yang and Berggren, 2006; Seino et al., 1992). Mientras que, se ha descrito que el Cav1.2 es más importante para la secreción de insulina en ratones (Schulla et al., 2003; Seino et al., 1992).

Es importante destacar que estas isoformas de los canales de calcio tipo L que expresan las células  $\beta$  pancreáticas y líneas celulares secretoras de insulina, tienen las mismas características biofísicas que los canales presentes en neuronas: poca o ninguna inactivación y alta sensibilidad a las DHP (Smith et al., 1989).

#### **Canales tipo N**

La aplicación de toxinas bloqueadoras de canales ha permitido el estudio de las corrientes residuales de calcio que no son inhibidas por las DHP. Esto facilitó la detección de los canales de calcio tipo N en células  $\beta$  de diferentes especies y en

líneas celulares secretoras de insulina. Sin embargo, la expresión de estos canales en las células beta pancreáticas sigue siendo controversial y varía ampliamente entre especies. La isoforma Cav2.2 y el ARNm que la codifica ha sido identificado en células  $\beta$  de rata, aunque están expresados casi en igual proporción en la membrana plasmática y en el citoplasma (Navarro-Tableros et al., 2007b).

Otros estudios han mostrado que los canales tipo N no están presentes en células  $\beta$  de ratón ni humanas (Braun et al., 2008). Sin embargo, su presencia en células beta de ratón es controversial, ya que otro trabajo mostró que la corriente mediada por estos canales representa una parte importante de la corriente total de calcio (Sher et al., 2003). La ausencia de estos canales en el páncreas humano ha sido corroborado por (Davalli et al., 1996). En células beta caninas también se ha observado que el Cav2.2 está prácticamente ausente (Pressel and Mislser, 1991). Además, se ha demostrado que las líneas celulares secretoras de insulina derivada de insulinoma de ratas (INS-1) y la inducida por alta dosis de radiación de rayos X, también procedente de ratas, (RINm5F), expresan canales tipo N, aunque existen datos controversiales sobre su expresión en células beta de ratas (Ramanadham and Turk, 1994; Horvath et al., 1998).

### **Canales tipo P/Q**

A diferencia de la corriente mediada por canales tipo N, la corriente tipo P/Q han sido descritas tanto en células beta de ratas (Ligon et al., 1998) como humanas (Braun et al., 2008). Este estudio en células beta humanas mostró que el bloqueo de estos canales disminuye la capacitancia celular, una medida indirecta de la exocitosis. Los canales Cav 2.1 también han sido detectados en una amplia variedad de líneas celulares secretoras de insulina como las INS-1 y las RINm5F (Magnelli et al., 1996; Pereverzev et al., 2002; Horvath et al., 1998).

## **Canales tipo T**

Por último, los canales de calcio tipo T están expresados en células beta pancreáticas de rata y en islotes humanos (Ashcroft and Rorsman, 1989; Barnett et al., 1995; Hiriart, M. and Matteson, 1988). Se ha planteado que la expresión de estos canales corresponde a la isoforma Cav3.1 (Seino, 1995; Sher et al., 2003; Zhuang et al., 2000). Sin embargo, no se han detectado en células beta de ratón en condiciones fisiológicas (Satin, 2000; Sher et al., 2003; Yang and Berggren, 2005).

### **1.5.4 Papel de los VGCC en la fisiología de la célula beta y en la secreción de insulina**

#### **Canales tipo L**

Los VGCC son proteínas esenciales en la fisiología de la célula beta, particularmente en el acoplamiento estímulo-secreción de insulina. Está muy bien establecido que el influjo de calcio que conlleva a la exocitosis de la insulina en las células beta pancreáticas, está dado principalmente por los canales de calcio tipo L (Hiriart et al., 2015) entre los que se encuentran principalmente los Cav1.3 (Davalli et al., 1996; Satin, 2000; Schulla et al., 2003). Sin embargo, se conoce que otras isoformas de los canales tipo L también están presentes en las células beta de roedores, particularmente el Cav1.2, el cual se ha sugerido que es más importante para la secreción de insulina en ratones (Schulla et al., 2003; Seino et al., 1992).

Algunos trabajos han demostrado que los canales de calcio formados por la subunidad  $\alpha 1D$  están vinculados de forma preferencial a la secreción de insulina estimulada por glucosa (Liu et al., 2003). Esto está en concordancia con los hallazgos encontrados en ratones *knockout* para esta subunidad ( $\alpha 1D^{-/-}$ ), los que desarrollan hiperglucemia y un estado de hipoinsulinemia (Namkung et al., 2001). Sin embargo, otros autores han sugerido que la subunidad  $\alpha 1C$  está asociada principalmente a la primera fase de la secreción de insulina. Esto ha sido apoyado por experimentos realizados en ratones con deleciones en esta subunidad, los cuales carecen de la fase de secreción rápida (Barg et al., 2001; Safayhi et al., 1997;

Schulla et al., 2003; Wiser et al., 1999). Debido a que Cav1.2 y Cav 1.3 tienen características biofísicas y farmacológicas similares, ha sido complejo discernir detalladamente la participación individual de ambas isoformas en la corriente total de calcio y en la secreción de insulina.

### **Canales tipo N**

La importancia fisiológica de los canales de calcio tipo N en la secreción de insulina estimulada por glucosa se ha demostrado en las líneas celulares secretoras de insulina RINm5F e INS-1. Sin embargo, hay que tener en consideración que estas células provienen de líneas tumorales que están en división constante y su fisiología difiere de la de las células procedentes de cultivos primarios.

En el caso de las células beta de ratas existe debate sobre su papel en la secreción hormonal (Horváth et al., 1998; Ramanadham and Turk, 1994). Un estudio de nuestro laboratorio demostró que la  $\omega$ - Conotoxina G-VIA, inhibidor específico de los canales de calcio tipo N, disminuye más de un 70 % la insulina liberada en presencia de 15.6 mM de glucosa, en células beta de ratas neonatas tratadas con factor de crecimiento nervioso (NGF del inglés *neuronal growth factor*), lo que evidencia que estos canales son funcionalmente importantes en la regulación de la GSIS (Navarro-Tableros et al., 2007a).

### **Canales tipo P/Q y R**

La participación de los canales tipo R en la GSIS ha sido ampliamente estudiada en la línea celular INS-1. Aunque algunos estudios han descartado la expresión de estos canales en las células beta pancreáticas de rata (Pereverzev et al., 2002), se ha planteado que esta isoforma participa particularmente en la segunda fase de la secreción. Además, se ha sugerido que las disfuncionalidades en estos canales están relacionadas con alteraciones en las células beta y que esto puede conducir incluso al desarrollo de DM2 (Grabsch et al., 1999; Pereverzev et al., 2002; Vajna et al., 1998, 2001).

## **Canales tipo T**

Los estudios encaminados a esclarecer el papel fisiológico de los canales tipo T en células beta de cultivos primarios son escasos. Sin embargo, se ha planteado que estos canales podrían desempeñar un papel importante en la regulación de la secreción de insulina, así como en el desencadenamiento de la apoptosis de la célula beta en respuesta a determinadas citocinas (Hiriart and Aguilar-Bryan, 2008). Se ha propuesto que estos canales facilitan la secreción de insulina mediante una potenciación de la excitabilidad general de las células beta, lo que facilita a su vez la activación de los canales HVA (Bhattacharjee et al., 1997; Yang and Berggren, 2006). Otros estudios han planteado que estos canales contribuyen al mantenimiento de la concentración basal de calcio intracelular (Wang et al., 1999).

Un estudio previo en nuestro laboratorio demostró que el fármaco pimozida, bloqueador de los canales tipo T, redujo la liberación de insulina un 58 % en condiciones estimulantes de glucosa, en células beta de ratas neonatas tratadas con NGF, lo que sugiere la importancia de estos canales en la GSIS (Navarro-Tableros et al., 2007a).

Adicionalmente se ha sugerido que los canales de calcio tipo T también están relacionados con la fisiopatología de la célula beta. La actividad exacerbada de los canales de calcio es común en los estados de prediabetes. Particularmente, un estudio mostró un aumento en las corrientes de calcio mediadas por canales T y L en células beta de ratas Goto-Kakizaki (GK). Estas son ratas Wistar que desarrollan espontáneamente DM2 sin obesidad y constituye un modelo genético de diabetes mellitus (Kato et al., 1996).

Por su importancia en la generación de la actividad eléctrica de las células beta unido a los escasos estudios sobre estos canales en cultivos primarios de células beta, estos canales nos resultaron importantes candidatos para el estudio de su

expresión y propiedades biofísicas durante la maduración de la célula beta, así como su papel en la secreción de insulina basal y estimulada por glucosa.

### **1.5.5 Modulación de los VGCC en células beta**

Aunque la despolarización de la membrana es lo que determina la apertura selectiva y la actividad de los VGCC, diversas biomoléculas y mecanismos pueden modular la función de estos canales en las células beta pancreáticas. Entre estos se pueden citar, la concentración intracelular de calcio, la fosforilación de proteínas, la translocación de los propios canales y la interacción con otras proteínas y con lípidos. A su vez, la regulación a la alta o a la baja de la expresión y/o función de los VGCC se refleja en variaciones en la exocitosis hormonal, lo que da como resultado una mayor o menor cantidad de insulina secretada (Yang and Berggren, 2005).

Particularmente, las cinasas de proteínas desempeñan un importante papel en la modulación de los VGCC. La fosforilación de los canales propicia la formación de complejos cinasa-canal, factores esenciales en el control de la concentración intracelular de calcio. Los VGCC en las células beta pancreáticas están modulados por diferentes cinasas: la activación de la cinasa dependiente de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc, PKA) incrementa la secreción de insulina mediada por  $\text{Ca}^{2+}$  (Yang and Berggren, 2005); la proteína cinasa C (PKC) tiene un papel tónico en el mantenimiento de la función de los canales y en el acoplamiento entre el estímulo y la secreción (Arkhammar et al., 1994); la cinasa dependiente de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc, PKG) aumenta el influjo de calcio mediado por canales tipo L y la cinasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina tipo II (CaMKII) media la inactivación dependiente de calcio de los canales tipo L (Yang and Berggren, 2005).

La señalización mediada por cinasas de tirosina también desempeña un papel importante en la regulación de la diferenciación, proliferación y sobrevivencia de las células beta pancreáticas (Navarro-Tableros et al., 2004; Welsh et al., 2000). Además los estudios han mostrado que la estimulación de los receptores de insulina contribuye, al menos de forma parcial, al aumento en el calcio intracelular mediado

por el influjo catiónico a través de los VGCC. Aunque este mecanismo no está totalmente dilucidado, no se descarta la posibilidad de que estas cinasas modulen a los VGCC mediante fosforilaciones (Yang and Berggren, 2005).

La activación de otros receptores con actividad cinasa de tirosina, como el receptor de alta afinidad (TrkA) al NGF, produce efectos a corto y largo plazo en las células beta, entre los que destacan el aumento en la densidad de corriente de bario mediada por VGCC (Navarro-Tableros et al., 2007a; Rosenbaum et al., 2001).

Se conoce que varios tipos de fosfatasas de proteínas están presentes en las células beta pancreáticas, pero su inhibición no tiene efecto sobre la actividad eléctrica de los VGCC en las células beta de ratón. Sin embargo, se mostró que aumentan notablemente la corriente de calcio en la línea celular secretora de insulina RINm5F, lo que se traduce en un aumento en la secreción de insulina (Ammala et al., 1994). Esto indica que al menos en algunas líneas celulares, los VGCC pudieran estar en contacto con fosfatasas de proteínas que se encuentran activas tónicamente y que mantienen un efecto dominante sobre las cinasas de proteínas, por lo que pueden ser sensibles a la inhibición de dichas fosfatasas (Yang and Berggren, 2005).

No son solamente proteínas las que pueden interactuar con los canales iónicos. Diversos lípidos como los AGL también pueden modular directa o indirectamente a los VGCC y a la secreción de insulina (Antollini y Barrantes, 2016; Ordway et al., 1991). En esta modulación mediada por AGL se profundizará más adelante.

De acuerdo con todo lo anterior, los VGCC no operan como proteínas aisladas, sino que están asociados a otras moléculas que participan en la regulación de su tránsito a la membrana (Altierab et al., 2002), el direccionamiento hacia sitios específicos y su asociación con otras moléculas con las cuales forman complejos especializados en la transducción de diversas señales (Yang and Berggren, 2005). Es por ello que en este estudio también nos resultó interesante estudiar los AGL, particularmente el palmitato, como moduladores de los VGCC y de la secreción de insulina en células beta.

## **1.6 Papel de los ácidos grasos libres en la fisiopatología de la célula beta**

### **1.6.1 Ácidos grasos libres**

Los ácidos grasos libres también conocidos como ácidos grasos no esterificados, son biomoléculas liberadas por los adipocitos hacia el torrente sanguíneo. Los AGL pueden circular libres en la sangre o como triglicéridos formando parte de las lipoproteínas. Son sintetizados en los adipocitos producto de la hidrólisis de los triglicéridos, proceso que es mediado por la lipasa sensible a hormona e inhibido por la insulina. Los AGL son constituyentes de las membranas biológicas, se sintetizan y catabolizan continuamente en las células y son una importante fuente de energía durante condiciones de ayuno. (Hiriart et al., 2014; Ordway et al., 1991).

Además, la actividad de muchas proteínas de membrana, incluyendo los canales iónicos, está modulada por la composición lipídica de las membranas en las que están insertadas. Cada vez es mayor el énfasis que hacen los investigadores en el papel regulador de los AGL teniendo en cuenta sus propiedades físico químicas. Aunque hasta la actualidad no hay una opinión consensuada que explique los mecanismos mediante los cuales este tipo de lípidos modula las proteínas de membrana, es muy probable que sean de naturaleza multifactorial (Antollini and Barrantes, 2016).

Los AGL constituyen moléculas señalizadoras en una gran variedad de procesos biológicos en diversos tipos celulares (Ordway et al., 1991), incluyendo las células  $\beta$ . A su vez, es reconocido que la disfunción en el metabolismo de los AGL conduce al desarrollo de enfermedades cardiovasculares, obesidad, hipertensión, condiciones proinflamatorias, síndrome metabólico, DM2 y enfermedades neurológicas relacionadas con alteraciones en el equilibrio de la insulina en el cerebro (Virmani et al., 2015).

Particularmente, los AGL están íntimamente relacionados con la fisiopatología de las células beta pancreáticas. El exceso de AGL circulantes es uno de los principales contribuyentes al desarrollo de la resistencia a la insulina (Delarue and Magnan, 2007). Se ha asociado su presencia con el desarrollo de patologías como el síndrome metabólico y la diabetes mellitus, aspectos en los que se profundizará más adelante.

### **1.6.2 Efectos de los AGL sobre los VGCC en las células beta**

La modulación de los canales de calcio dependientes de voltaje por AGL puede resultar en un aumento en la duración y la amplitud de los potenciales de acción y/o la hiperpolarización/despolarización de las membranas celulares, lo que determina la inhibición o potenciación de la excitación celular (Ordway et al., 1991).

Las acciones de los AGL sobre los canales iónicos pueden ser de dos tipos: directas e indirectas. Los efectos indirectos pueden deberse a alteraciones en la forma y fluidez de la bicapa lipídica y tienen lugar a través de vías de transducción de señales. En contraste, los efectos directos resultan de la interacción física de los ácidos grasos con el canal iónico en sí (Lundbaek, 1994; Ordway et al., 1991).

Existen varios ejemplos de interacciones directas entre AGL y proteínas. Diversos estudios bioquímicos han demostrado que los ácidos grasos actúan directamente sobre una variedad de enzimas, lo que ha sugerido un mecanismo de acción similar sobre los canales iónicos. Entre los sitios de unión a ácidos grasos definidos en diversas proteínas, los de la albúmina han sido los mejores estudiados. Es por ello que desde hace varias décadas se ha sugerido la existencia de sitios de unión análogos en los canales iónicos, ya sea dentro de la bicapa o en el ambiente acuoso (Ordway et al., 1991).

Muchos de los efectos indirectos de los AGL sobre los canales iónicos están relacionados con alteraciones en las propiedades mecánicas de las membranas biológicas. Esto se ha propuesto como un mecanismo general por el cual se puede alterar la función de una proteína de membrana (Lundbaek, 1994).

Las acciones indirectas de los AGL incluyen interacciones complejas en las que intervienen diversos componentes de vías de señalización celular y vías metabólicas, por ejemplo las proteínas cinasas. Como ya se mencionó, en las células beta pancreáticas los canales de calcio están modulados por diferentes cinasas: la PKA que aumenta la secreción de insulina mediada por calcio (Yang and Berggren, 2005); la PKC que mantiene el estado de fosforilación de los canales de calcio tipo L (Arkhammar et al., 1994) y la CaMKII que es la responsable de la inactivación mediada por calcio de los canales tipo L (Yang and Berggren, 2005).

El papel de las proteínas cinasas es de gran importancia en la regulación de los canales de calcio sensibles a voltaje. La fosforilación de estos canales provoca la formación de complejos entre la cinasa y el canal, que son esenciales en la regulación de los niveles de calcio intracelular (Linden and Routtenberg, 1989).

La modulación de los canales por AGL puede resultar en un aumento en la duración y la amplitud de los potenciales de acción y/o la hiperpolarización/despolarización de las membranas celulares, lo que determina la inhibición o potenciación de la excitación celular (Ordway et al., 1991).

A su vez, los efectos de los AGL sobre los canales iónicos son dependientes del tiempo y de la concentración (Graciano et al., 2011; Nolan et al., 2006).

Uno de los AGL más estudiados es el palmitato, entre otras razones, por ser el más común en la sangre. La exposición aguda a este AGL aumenta la concentración de calcio intracelular potenciando así la secreción de insulina por un mecanismo independiente al del canal  $K_{ATP}$ . Se ha demostrado que el palmitato aumenta la densidad de corriente mediada por canales de calcio tipo L y el número de gránulos de insulina liberados en células  $\beta$  de ratón (Olofsson et al., 2004). Otros estudios utilizando islotes pancreáticos han revelado también que el palmitato aumenta la concentración intracelular de calcio (Warnotte et al., 1994). Incluso, se ha planteado que este AGL, en exposición aguda, podría también modular la actividad de otro tipo de canales (Komatsu et al., 1999; Prentki et al., 2002).

Además, es conocido que la exposición crónica de las células beta a AGL provoca la pérdida de la agregación de los canales de calcio en la membrana. Esto podría llevar a que los gránulos competentes liberados no estén expuestos a las concentraciones exocitóticas adecuadas de calcio intracelular durante los potenciales de acción de estas células. Se ha sugerido que esta disociación de los complejos gránulos/canales de calcio podría tener consecuencias funcionales críticas, sobre todo teniendo en cuenta que estas células presentan una relativamente baja densidad de canales de calcio comparado con otras células endocrinas como por ejemplo las células cromafines. Se cree que esto contribuye a que las células beta puedan suprimir la secreción de insulina durante condiciones de ayuno/inanición (Rorsman et al., 2012).

En contraste, un trabajo realizado en células beta de ratas GK (modelo de ratas no obesas con DM2) reveló que la concentración intracelular de calcio no aumenta ante un incremento en los AGL en el plasma. Estos autores sí encontraron cambios discretos en la exocitosis, lo que se manifestó como una reducción de alrededor de un 50 % en la sensibilidad al calcio (Rose et al., 2007).

Varios hallazgos indican que el aumento de calcio mediado por AGL en las células beta comprende dos componentes: la movilización de los almacenes internos como el retículo endoplásmico (RE) y el influjo a través de los VGCC presentes en la membrana plasmática (Tian et al., 2008). Sin embargo, existe controversia en cuanto a si los efectos de los AGL en estas células son directos o indirectos (Fujiwara et al., 2005).

Un estudio que empleó modelos matemáticos de dinámicas de calcio, exocitosis y secreción, mostró el papel de la redistribución de los canales de calcio en la respuesta exocitótica y secretora desacoplada de las células beta expuestas a palmitato (Pedersen, 2010). Existe una fuerte evidencia de la existencia de un acoplamiento físico directo entre los gránulos de insulina disponibles inmediatamente para la liberación y los canales de calcio tipo L (Wiser et al., 1999). Los modelos de este estudio sugirieron que la exposición crónica a palmitato ocasiona la pérdida de los clusters de canales de calcio, lo que induce la disociación

de los canales de los gránulos secretores. Este autor también planteó que la unión de los gránulos a los canales de calcio podría inducir un cambio conformacional en la maquinaria exocitótica que altere la sensibilidad al calcio, alcanzándose un estado altamente sensible a calcio posterior a la disociación gránulos-canales (Pedersen, 2010).

Además de las investigaciones en cultivos primarios, se han realizado otros estudios en líneas celulares secretoras de insulina. En este sentido se ha visto que el palmitato provoca un aumento dependiente de glucosa en el calcio intracelular en la línea celular de insulinoma derivada de células beta pancreáticas de hamster (HIT-T15). Esta modulación está dada por la movilización del calcio de las pozas intracelulares y por la estimulación del influjo de calcio a través de los canales sensibles a voltaje. Estos autores sugirieron que el efecto del palmitato está mediado por la entrada y el metabolismo del ácido graso en la mitocondria (Remizov et al., 2003).

### **1.6.3 Modulación de la secreción de insulina por AGL en las células beta**

Las señales derivadas de lípidos son necesarias para la secreción normal de insulina (Koyama et al., 1997) y se conoce que compuestos como la coenzima A de cadena larga (CoA), malonyl-CoA y el DAG son requeridos por las células beta (Corkey et al., 1989; Prentki et al., 2002). A pesar de que desconocen los mecanismos exactos, se ha sugerido que los ácidos grasos de cadena larga pueden modular blancos intracelulares que estimulan la secreción de insulina (Latour et al., 2007; Prentki; and Corkey, 1996) o formar complejos lipídicos como el DAG, que interaccionan con proteínas de los gránulos de secreción promoviendo la fusión de las vesículas con insulina (Kwan et al., 2006).

Durante el ayuno, los ácidos grasos se encuentran libres en el citoplasma de la célula  $\beta$ , son canalizados hacia la mitocondria para la  $\beta$ -oxidación y generación de ATP (Nolan and Prentki, 2008) y no promueven la secreción de insulina. Sin

embargo, en el posprandio el aumento en la concentración de glucosa plasmática no sólo promueve la secreción de insulina por medio del cierre de los canales  $K_{ATP}$ , sino que también contribuye a la anaplerosis celular. El citrato producido en la mitocondria por el metabolismo de la glucosa forma malonil-CoA en el citosol (Roduit et al., 2004) el cual evita la  $\beta$ -oxidación inhibiendo a la carnitina palmitoil transferasa 1 (CPT-1), lo que conduce a la acumulación de ácidos grasos de cadena larga, los cuales pueden estimular la secreción de insulina.

Sin embargo, es bien conocido que los AGL juegan un importante papel en la disfunción de las células  $\beta$  en condiciones patológicas como la obesidad y la DM2. Está demostrado que la secreción de AGL por los adipocitos aumenta en estados de obesidad. Por otro lado, se sabe que la DM2 se caracteriza por una insuficiente secreción de insulina en respuesta a elevadas concentraciones de glucosa plasmática (Weyer et al., 1999). Precisamente, esta secreción de insulina disminuida correlaciona fuertemente con la obesidad (Kahn et al., 2006) y los niveles elevados de AGL (Boden and Shulman, 2002). Además, la ingesta de ácidos grasos saturados se ha asociado con la hiperinsulinemia y la resistencia a la insulina (Yaney and Corkey, 2003). En diversos estudios se ha comprobado que el aumento en las concentraciones de AGL circulantes conlleva a un aumento de la resistencia a la insulina periférica en una manera dependiente de la concentración, tanto en individuos obesos no diabéticos como en pacientes con DM2 (Roden et al., 1996; Santomauro et al., 1999).

Es por ello que, desde hace décadas, se ha propuesto que la diabetes es tanto un desorden lipídico como de intolerancia a la glucosa, y que señales metabólicas convergentes vinculan fuertemente a la diabetes con la obesidad (Prentki; and Corkey, 1996).

Los efectos de los AGL sobre la secreción de insulina, al igual que sobre los VGCC expuestos anteriormente, dependen tanto de la concentración del ácido graso como del tiempo de exposición (Carvalho et al., 2006).

Teniendo en cuenta el tiempo de exposición al ácido graso, se ha comprobado que una elevación transitoria en los AGL estimula la actividad eléctrica de las células

beta (Fernandez and Valdeolmillos, 1998) lo que potencia la GSIS; mientras que un aumento sostenido en los AGL desajusta este proceso (Graciano et al., 2011; Nolan et al., 2006). Otros autores han demostrado que posterior a una exposición aguda a los AGL (1-3 h), aumenta la secreción de insulina (Sako and Grill, 1990) y que éstos juegan un papel fundamental en la modulación del efecto estimulante de la glucosa (Warnotte et al., 1994). Estudios más recientes han mostrado que la exposición al palmitato durante 48 h reduce la GSIS por un mecanismo independiente de la producción de ceramidas. Estos autores encontraron una reducción en la activación de la CaMKII y de la proteína cinasa regulada por señal extracelular (ERK) (Del inglés *extracellular signal-regulated kinase*), lo cual podría estar relacionado con el desacople en la secreción de insulina (Watson et al., 2011).

En cuanto a los efectos dependientes de la concentración del AGL, se ha informado que concentraciones bajas de palmitato promueven la secreción de insulina, mientras que concentraciones altas la inhiben. En las últimas décadas la exposición constante de las células beta a AGL como el palmitato, se ha relacionado con la pérdida de la GSIS y con aumento en la apoptosis (Bollheimer et al., 1998; Maedler et al., 2003; Zhou and Grill, 1994), aunque el mecanismo aún no está completamente entendido.

La exposición crónica a los AGL disminuye la GSIS. Cuando los islotes de rata fueron expuestos a palmitato durante 48 h se observó un aumento en la secreción basal de insulina pero una marcada inhibición en la GSIS (Zhou and Grill, 1994). Estudios más recientes han mostrado que el tratamiento con palmitato durante 48 h reduce la GSIS por un mecanismo independiente de la producción de ceramidas. Estos autores reportaron una disminución en la activación de la CaMKII, lo cual podría estar relacionado con el desacople en la secreción de insulina (Watson et al., 2011). También se ha propuesto que los AGL inducen una alta tasa de oxidación, lo que aumenta la expresión de CPT-1 (Assimacopoulos-Jeannet et al., 1997). La exacerbada oxidación de ácidos grasos puede promover la insensibilidad de la célula a la glucosa, lo que resulta en la pérdida de la GSIS.

Existen varios mecanismos por los cuales los AGL disminuyen la GSIS: (1) La oxidación de AGL es inhibida por la glucosa. La presencia de glucosa elevada y AGL favorece la acumulación de citrato, el precursor del malonil-CoA, lo cual inhibe a la enzima responsable de transportar los ácidos grasos a la mitocondria y la acumulación de acyl-CoAs de cadena larga. (2) Los AGL activan a los canales  $K_{ATP}$  en las células  $\beta$  y es bien conocido que la apertura de estos canales bloquea la GSIS (Larsson et al., 1996). (3) Los AGL aumentan la expresión de la proteína desacoplante de la función mitocondrial (UCP-2) (Del inglés *mitochondrial uncoupling protein 2*), y es conocido que la sobreexpresión de la UCP-2 inhibe la síntesis de ATP. Las proteínas transportadoras son canales de protones que se encuentran en la membrana externa de las mitocondrias que desacoplan el gradiente electroquímico producido por la cadena respiratoria, lo que evita formar ATP (Rousset et al., 2004). (4) La acumulación de triglicéridos en las células  $\beta$  es inducida por los AGL y se ha sugerido que la GSIS está inversamente relacionada con el contenido de triglicéridos en los islotes (Dubois et al., 2004).

Otro estudio reveló que los efectos lipotóxicos de los AGL están mediados, en gran medida, por la acumulación de triglicéridos y el aumento en la UCP-2 en las células  $\beta$  (Yamashita et al., 2004).

Es conocido que los AGL actúan a través de receptores acoplados a proteínas G, entre los que destacan GPR40 y GPR120. Se ha visto que los AGL amplifican la secreción de insulina estimulada por glucosa por medio de un mecanismo que incluye la señalización a través de estos receptores y la disminución de las corrientes de  $K^+$  en las células  $\beta$  por medio de la vía de AMPc-PKA, lo que facilita la entrada de calcio a través de canales de calcio dependientes de voltaje y la secreción de insulina (Itoh et al., 2003; Zhao et al., 2006).

El GPR40, receptor de ácidos grasos de cadena larga, amplifica la exocitosis de la insulina mediante acciones mediadas por DAG, PKC, IP3, el aumento del influjo de calcio y la reducción de la conductancia de los canales de potasio activados por voltaje (Hiriart et al., 2015). Otro estudio, en concordancia con el anterior, mostró que los AGL amplifican la secreción de insulina estimulada por glucosa mediante un

efecto indirecto, específicamente a través de la activación de la PKC (Thams and Capito, 2001). Además, la activación del receptor GPR40 promueve la entrada de calcio intracelular, lo que induce la activación de la vía de la fosfolipasa C. Esto explica, en gran medida, el efecto neto sobre la secreción de insulina, ya que es bien conocido que el aumento en la concentración citosólica de calcio mediado fundamentalmente por canales de calcio tipo L desempeña un papel esencial en la secreción de insulina (Hiriart and Aguilar-Bryan, 2008).

Otros hallazgos que han permitido explicar mecanísticamente los efectos de los AGL sobre la secreción de insulina incluyen el aumento en los niveles de la proteína asociada al sinaptosoma de 25 KDa (SNAP-25), la proteína asociada al sinaptosoma de 25 kDa que participa en la exocitosis de las vesículas de insulina, en islotes de ratón expuestos al palmitato (Zraika et al., 2004).

Además, los AGL inhiben la expresión del gen de insulina en las células  $\beta$ . El palmitato reduce significativamente los niveles de ARNm de preproinsulina a elevadas concentraciones de glucosa, con un decremento asociado en las cantidades de insulina en los islotes de rata (Jacqueminet et al., 2000).

Los efectos de los AGL también están relacionados con el estado apoptótico que pueden inducir en las células beta y otros tipos celulares. Un estudio mostró que los AGL aumentan el estrés del RE en la línea celular INS-1E, lo que lleva a la apoptosis por medio de las acciones del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- $\kappa$ B) (Kharroubi et al., 2004).

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las células beta pancreáticas fetales y de animales neonatos se consideran inmaduras porque secretan muy poca insulina y son incapaces de secretar más insulina cuando aumenta la concentración extracelular de glucosa. Durante el desarrollo la célula beta adquiere la madurez funcional que le permite secretar las cantidades necesarias de insulina y responder adecuadamente a los cambios en la concentración de glucosa extracelular. En la etapa adulta las células betas son consideradas maduras y pueden detectar los cambios en la concentración extracelular de glucosa (Navarro-Tableros et al., 2007b). En esta etapa la secreción de insulina presenta un comportamiento bifásico, con una primera fase rápida y una segunda fase de secreción sostenida (Vignali et al., 2006).

Durante la etapa fetal la madre es la responsable de la homeostasis de la glucosa. Sin embargo, posterior al nacimiento la nutrición se hace dependiente de la disponibilidad de alimentos y la necesidad de mantener la glicemia podría ser una fuerza impulsora para que las células beta maduren y secreten insulina en respuesta a la concentración de nutrientes. Otra ventana crítica en el desarrollo de la célula beta es el destete (día 20 en las ratas de experimentación). El cambio de una dieta alta en grasa a otra rica en carbohidratos puede conducir a modificaciones en la maquinaria de respuesta celular que contribuyen a las condiciones de hiperinsulinemia y de resistencia a la insulina fisiológica que caracterizan a este período de ablactación en los animales (Aguayo-Mazzucato et al., 2006). Sin embargo, hay que destacar que este destete en el caso de las ratas utilizadas en este estudio fue paulatino y no de un día para otro, pues las crías desde el día posnatal 11, además de la leche materna también comienzan a ingerir parte de los pellets de los que se alimentan sus madres.

Los cambios fisiológicos que se producen durante el desarrollo posnatal pueden estar íntimamente relacionados con los componentes de la maquinaria de acoplamiento entre el estímulo y la secreción de la célula beta, entre los cuales juegan un papel esencial los canales iónicos.

Los canales de calcio sensibles a voltaje juegan un papel fundamental en el mecanismo de secreción de insulina estimulada por glucosa y en general en distintos aspectos de la fisiología de la célula beta. (Hiriart et al., 2015; Yang and Berggren, 2005). Está bien demostrado que los canales de calcio tipo L son los principales responsables de la exocitosis de la insulina. En el caso de los canales tipo T, aunque se ha planteado que estos canales podrían desempeñar un papel importante en la regulación de la secreción de insulina mediante la potenciación de la excitabilidad general celular (Bhattacharjee et al., 1997; Yang and Berggren, 2006) así como en el desencadenamiento de la apoptosis de la célula beta en respuesta a citocinas (Hiriart and Aguilar-Bryan, 2008), los estudios encaminados a esclarecer su papel fisiológico en las células beta son muy escasos.

Estudios previos en nuestro laboratorio han mostrado que la densidad de corriente de bario es menor en células neonatas que en adultas (Navarro-Tableros et al., 2007b). Además, un microarreglo reveló que los niveles de expresión de genes relacionados con la fisiología de la célula beta, entre los que se encuentran genes que codifican para canales iónicos, son mayores en células adultas que en células de 20 días (Larqué et al., 2016). Es por todo lo expuesto anteriormente que nos resultó de especial interés profundizar en los estudios relacionados con la maduración de la célula beta, con particular énfasis en la expresión y las características fisiológicas de los canales de calcio LVA y HVA durante el desarrollo posnatal de la célula beta. Profundizar en el conocimiento de cómo se lleva a cabo la maduración de la célula beta puede contribuir a una mejor comprensión de su fisiología así como de las patologías relacionadas con alteraciones en su funcionamiento.

Por otro lado, es conocido que los ácidos grasos libres constituyen importantes moléculas señalizadoras en una gran variedad de procesos celulares (Ordway et al., 1991), y entre ellos se encuentran los relacionados con las células beta. El exceso de AGL circulantes es uno de los principales contribuyentes al desarrollo de la resistencia a la insulina (Delarue and Magnan, 2007). Se ha asociado su presencia con el desarrollo de patologías como la obesidad, el síndrome metabólico

y la diabetes mellitus (Virmani et al., 2015). Además, se sabe que su papel en la disfunción de las células beta está relacionado con la actividad de canales iónicos, entre ellos, los VGCC (Graciano et al., 2011; Nolan et al., 2006).

Es por eso que además de estudiar la expresión diferencial y las propiedades electrofisiológicas de los canales LVA y HVA, nos resultó relevante estudiar la funcionalidad de estos canales, específicamente la relacionada con su papel en la secreción de insulina y con la modulación de su actividad eléctrica por palmitato, uno de los AGL más estudiados y abundantes en el organismo. Estas condiciones pudieran correlacionarse con las que están presentes en desórdenes como la obesidad y el síndrome metabólico.

### **3. HIPÓTESIS**

Las densidades de corrientes de calcio LVA y HVA son mayores en las células beta de ratas adultas comparado con las células de animales neonatos y de 20 días.

La actividad de los canales de calcio se incrementa en células beta expuestas a concentraciones bajas de palmitato.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivos generales**

- Caracterizar las propiedades electrofisiológicas y la expresión de los canales de calcio LVA Y HVA durante el desarrollo posnatal de la célula beta pancreática de rata (etapas neonatal, P20 y adultas).
- Analizar el efecto modulador del palmitato sobre la actividad de los canales de calcio LVA y HVA y sobre la secreción de insulina en las células beta pancreáticas de rata.

### **4.2 Objetivos específicos**

- Determinar la presencia de la corriente de calcio mediada por canales LVA durante el desarrollo posnatal de las células beta pancreáticas de rata.
- Comparar las propiedades electrofisiológicas de los canales LVA y HVA durante el desarrollo posnatal de las células beta pancreáticas de rata.
- Analizar los cambios en la expresión de las tres isoformas de los canales LVA o tipo T durante el desarrollo posnatal de las células beta pancreáticas de rata.
- Evaluar el efecto de fármacos bloqueadores de los canales LVA y HVA sobre las corrientes de calcio en células beta adultas.
- Analizar la contribución de los canales LVA y HVA a la secreción de insulina basal y estimulada por glucosa en células beta adultas mediante el uso de fármacos bloqueadores.
- Evaluar los efectos moduladores agudos y crónicos de distintas concentraciones de palmitato sobre los canales de calcio y la secreción de insulina basal y estimulada por glucosa en células beta adultas.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Reactivos y materiales

Los reactivos fueron obtenidos de las siguientes fuentes: colagenasa P, albúmina sérica bovina (BSA), Ficoll 400, palmitato de sodio, azul tripan, ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinaetanosulfónico (HEPES), poli-L-lisina, proteína A de *Staphylococcus aureus*, tripsina, insulina, complemento de cobayo, cloruro de níquel (II) y todas las sales de los registros electrofisiológicos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO); mibefradil, nifedipina, anticuerpo primario policlonal IgG levantado en conejo contra las subunidades  $\alpha 1G$ ,  $\alpha 1H$  y  $\alpha 1I$  de rata de Alomone Labs (Jerusalem, Israel); anticuerpo secundario IgG conjugado a FITC levantado en cabra contra IgG de conejo y anticuerpo secundario conjugado a Alexa Fluor 647 levantado en cabra contra cobayo de Jackson ImmunoResearch (West Grove, USA); anticuerpo contra insulina levantado en cobayo (Strategic Biosolution, Newark, DE); tetrodotoxina (TTX) de Calbiochem (La Jolla, CA); (R)-2-(4-ciclopropilfenil)-N-(1-(5-(2,2,2-trifluoroetoxi) piridin 2-il) etil) acetamida (TTA-A<sub>2</sub>) gentilmente donado por Merck (West Point, PA) al Dr. Juan Carlos Gomora; cajas Petri de cultivo de Corning (Corning, NY); solución de sales balanceada Hanks, RPMI-1640, solución de penicilina-estreptomina, suero bovino fetal (SBF) y solución de L-glutamina de Thermo Fisher Scientific Inc (Massachusetts, USA).

### 5.2 Animales de experimentación

Todos los métodos utilizados en este estudio fueron aprobados por el Comité de Cuidado de Animales del Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. El trabajo con animales fue realizado de acuerdo a los principios rectores internacionales para la investigación biomédica en animales, Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas, 2010. Las ratas Wistar macho neonatas (1 día posnatal), de 20 días y adultas jóvenes de dos meses de edad (250-280 g) fueron obtenidas del Bioterio local, mantenidas en un ciclo de

luz-oscuridad 14:10 h (0600–2000), con la dieta de laboratorio estándar para ratas y agua *ad libitum*.

### **5.3 Cultivo de células beta pancreáticas**

El día de cada experimento, cuatro animales por cultivo, sin ayuno previo, fueron anestesiados por vía intraperitoneal con pentobarbital sódico (40 mg/kg), y sacrificados por dislocación cervical después de la disección de los páncreas. Las células beta pancreáticas fueron obtenidas de ratas Wistar macho neonatas, de 20 días y adultas jóvenes (250-280 g) siguiendo un procedimiento previamente descrito (Aguayo-Mazzucato et al., 2006). Los islotes pancreáticos fueron aislados y separados del tejido acinar por una digestión con colagenasa P (0.5 mg/mL) en solución de sales balanceada Hanks y centrifugación en gradiente de Ficoll. Los islotes limpios fueron separados manualmente.

La disociación de las células se realizó mediante la incubación de los islotes en un baño con agitación constante por 5 minutos a 37 °C en solución Spinner libre de calcio, con 15 mmol/L de glucosa, 0.5 % de BSA y 0.01 % de tripsina, seguida de agitación mecánica. Previa a los experimentos, las células fueron cultivadas por 24-48 horas en medio RPMI-1640 (11.6 mmol/L de glucosa) con 10 % de SBF, 200 µM de L-glutamina, 200 unidades/mL de penicilina G, 200 µg/mL de estreptomina y 0.5 µg/mL de anfotericina B, lo que les permitió recuperarse de la disociación. La concentración de glucosa utilizada en el medio de cultivo mantiene la función y supervivencia celular.

### **5.4 Preincubación de las células beta pancreáticas con palmitato**

Previa a los experimentos de evaluación de los efectos del palmitato sobre la secreción de insulina y la actividad de los canales de calcio, las células beta adultas fueron preincubadas con 0.25, 0.5 y 1 mM del ácido graso durante 5 minutos, 1, 24 y 48-72 horas. El palmitato fue disuelto en BSA al 25 %.

## 5.5 Registros electrofisiológicos

Las corrientes macroscópicas de calcio sensibles a voltaje se registraron mediante la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana en la configuración célula completa (Hamill et al., 1981) y se utilizó  $\text{Ca}^{2+}$  como acarreador de carga. Se empleó un amplificador de señal Axopatch 200A (Axon Instruments, Foster City, CA) y todos los experimentos se realizaron a 22 °C. Se utilizaron tubos capilares KIMAX-51 (Kimble Glass, Vineland NJ) para los electrodos, los cuales tuvieron una resistencia en la punta de 2-4 MΩ. Las puntas de los electrodos se recubrieron con cera dental. La solución externa consistió de (mmol/L): 130 NaCl, 5 KCl, 10 HEPES, 2  $\text{MgCl}_2$ , 5  $\text{CaCl}_2$  y 10 de Glucosa, pH 7.3. La solución interna contenía (mmol/L): 120 CsAsp, 10 CsCl, 5 CsF, 10 HEPES, 2.5 BAPTA y 2 de ATP, pH 7.3. Las corrientes de sodio se bloquearon con la adición de 100 nmol/L de TTX a la solución externa.

Los transitorios capacitivos de la pipeta fueron cancelados antes de romper la membrana y la capacitancia celular total se determinó por la integración digital de los transitorios capacitivos con pulsos de +10mV a partir de un potencial de mantenimiento de -80 mV. Los transitorios capacitivos de la célula fueron cancelados y las resistencias en serie fueron compensadas utilizando el circuito interno de fijación de voltaje. Los transitorios capacitivos lineales así como las corrientes de fuga se sustrajeron mediante un procedimiento en línea P/2.

Los protocolos de registro utilizados para el análisis de las corrientes de calcio consistieron de 1) protocolo de rampa de voltaje de -80 a +60 mV, de 500 ms de duración y pendiente de 0.5 mV/ms y 2) protocolo de pulsos despolarizantes cuadrados de -60 a +40 mV con incrementos de 5 mV y 40 ms de duración. El potencial de mantenimiento fue -80 mV. Se analizaron las corrientes macroscópicas de calcio de células beta con capacitancias entre 4.5 y 11 pF.

Las curvas de activación de la corriente de calcio ( $I_{\text{Ca}^{2+}}$ ) HVA fueron obtenidas por la conversión de los valores de la corriente al pico a conductancias (G)

$$G_{I_{\text{Ca}^{2+}}} = I_{\text{Ca}^{2+}} / (V_m - E_{r_{\text{Ca}^{2+}}})$$

Donde  $I_{Ca^{2+}}$  es el valor de la corriente al pico,  $V_m$  es el potencial de pulso comando y  $E_{rCa^{2+}}$  es el potencial de inversión aparente, obtenido por la extrapolación de las relaciones I-V, el cual en la mayoría de los casos fue  $\sim +40$  mV.

Los valores de conductancia fueron normalizados y ajustados a una relación de Boltzmann:

$$G/G_{max} = \{1 + \exp [-(V - V_{a1/2})/k_a]\}^{-1}$$

Donde G es la conductancia al pico de  $I_{Ca^{2+}}$ ,  $G_{max}$  es la conductancia máxima de  $I_{Ca^{2+}}$ ,  $V_{a1/2}$  es el punto medio de la curva de activación y  $k_a$  es el factor de activación.

Los bloqueadores específicos de los canales de calcio: nifedipina (5  $\mu$ M), mibefradil (1 y 10  $\mu$ M), TTA-A<sub>2</sub> (10 y 50  $\mu$ M) y cloruro de níquel (50  $\mu$ M) fueron aplicados utilizando un Picospritzer (General Valve; Fairfield, NJ).

## **5.6 Doble inmunotinción de insulina y subunidades $\alpha 1$ de los canales de calcio LVA en células aisladas**

Las células aisladas en cultivo fueron fijadas en paraformaldehído (PFH) al 2 % en sales de fosfato amortiguadoras (PBS) (Del inglés *phosphate buffered saline*) por 30 minutos a temperatura ambiente, lavadas y permeabilizadas con una solución de bloqueo que contenía 2 % de BSA (w/v) y 0.1 % de Triton X (v/v) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se incubaron en una cámara húmeda durante una noche a 4°C con el anticuerpo primario policlonal IgG levantado en conejo contra las subunidades  $\alpha 1G$ ,  $\alpha 1H$  y  $\alpha 1I$  de rata correspondiente a las isoformas de los canales de calcio LVA (Alomone Labs; Jerusalem, Israel) a la dilución 1:100.

Al día siguiente las muestras se lavaron e incubaron con el anticuerpo primario levantado en cobayo contra insulina de rata (dilución 1:5000) durante una noche a 4°C. Al siguiente día, las muestras se lavaron e incubaron durante 2 horas a

temperatura ambiente con el anticuerpo secundario IgG conjugado a FITC levantado en cabra contra IgG de conejo (Jackson Immuno Research; Pennsylvania, USA) a la dilución 1:100. Posteriormente se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo secundario conjugado a Alexa Fluor 647 levantado en cabra contra cobayo (Jackson Immuno Research; Pennsylvania, USA) a la dilución 1:100. Seguidamente las muestras fueron incubadas con DAPI durante 5 minutos para visualizar los núcleos y finalmente fueron montadas en un medio que contenía 15 mM de NaN<sub>3</sub> (DAKO). Los controles negativos fueron células tratadas sólo con los anticuerpos secundarios.

### Imágenes y cuantificación de la fluorescencia

Las inmunotinciones fueron visualizadas con microscopía de epifluorescencia utilizando un microscopio invertido Olympus IX71 equipado con una lámpara de mercurio de 100 W y filtros apropiados para Alexa Fluor 647 (excitación 651 nm, emisión 667 nm) y FITC (excitación 488 nm, emisión 522 nm). Las imágenes de fluorescencia de cada campo se obtuvieron de manera separada. Las muestras se examinaron utilizando un objetivo de magnificación 20X y un objetivo de inmersión en aceite para fluorescencia 60X. Las imágenes fueron adquiridas con una cámara digital Q Imagin. Los tiempos de exposición para cada fluoróforo se optimizaron según el intervalo de intensidades de fluorescencia de las muestras. Las imágenes fueron adquiridas con el programa Image-Pro3DS 6.0 y almacenadas en formato TIFF (8 ó 12 bits de resolución).

El análisis de imágenes fue realizado con el programa Image J 1.36 (Wayne Rasband; National Institutes of Health, USA). Para cada célula en el campo se definió el área citoplasmática (no nuclear) y se cuantificó el promedio de la intensidad de fluorescencia por condición experimental y por edad. La fluorescencia específica se normalizó con respecto a la intensidad de fluorescencia de las células controles negativas. Se cuantificaron 150-200 células en campos separados por cada condición experimental y por edad. El análisis correspondió a 3 experimentos independientes por cada edad (4 ratas por cultivo por edad).

## **5.7 Secreción de insulina de células aisladas mediante el Ensayo Hemolítico Inverso (RHPA)**

El análisis de la secreción de insulina de las células beta aisladas se realizó mediante la técnica de Ensayo Hemolítico Inverso (RHPA de sus siglas en inglés *reverse hemolytic plaque assay*). Este ensayo permite identificar a las células secretoras de insulina y medir la secreción de células beta individuales. Está basado en el fenómeno de hemólisis mediada por complemento en presencia de un complejo antígeno-anticuerpo (Neill and Frawley, 1983). El ensayo se realizó como previamente fue descrito para las células beta pancreáticas (Hiriart, M. and Matteson, 1988).

### Marcaje de los eritrocitos

Los eritrocitos de carnero fueron conjugados con la proteína A de *Staphylococcus aureus* con el fin de unir anticuerpos contra insulina a su membrana. Para ello, los eritrocitos fueron lavados con solución salina (NaCl 0.9 %) y seguidamente se les agregó la proteína A (0.5 mg/mL) y CrCl<sub>3</sub> (0.2 mg/mL). Esta mezcla se incubó durante 1 hora a 37 °C y posteriormente los eritrocitos marcados se lavaron varias veces con solución salina y se almacenaron en RPMI 1640 con 0.1 % de BSA.

### Preparación de las cámaras de Cunningham

Las cámaras de Cunningham se construyeron utilizando portaobjetos previamente tratados con poli-L-lisina (0.5 mg/mL), sobre los cuales se colocó cinta adhesiva transparente con pegamento por ambos lados. Encima se colocaron cubreobjetos de forma que entre el portaobjetos y el cubreobjetos quedara un espacio pequeño que fue llenado por capilaridad con la mezcla de eritrocitos de carnero y células beta, la cual formó una monocapa sobre el portaobjetos.

### Ensayo Hemolítico Inverso (RHPA)

Las cámaras de Cunningham con la mezcla 1:1 (v/v) de eritrocitos de carnero marcados con proteína A y células beta se incubaron durante 1 hora a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> para asegurar que las células se pegaran a la base de la cámara.

Posteriormente, la monocapa celular se incubó durante 1 hora en las mismas condiciones, en medio Hanks ensayo con 5.6 ó 15.6 mM de glucosa con o sin los bloqueadores de los canales de calcio nifedipina (5  $\mu$ M), mibefradil (1  $\mu$ M) TTA-A<sub>2</sub> (50  $\mu$ M), cloruro de níquel) (50  $\mu$ M) o con nifedipina y TTA-A<sub>2</sub> en presencia del anticuerpo contra insulina levantado en cobayo (Strategic Biosolution, Newark, DE) (1:40). Al término de esta incubación se adicionó el complemento de cobayo (1:30) por un período de 1 h. Al finalizar el RHPA las células se fijaron con glutaraldehído 0.2 % y se conservaron en solución salina. En el caso de los ensayos con palmitato, previo a la adición del anticuerpo de insulina en condiciones basal y estimulante de glucosa, se preincubó con el ácido graso (0.25, 0.5 y 1 mM) durante 5 minutos, 1 hora y 24 horas.

#### Análisis de la secreción de insulina

La insulina secretada se detectó y cuantificó por la presencia de placas de hemólisis (inmunoplacas) alrededor de las células secretoras, que resultan de la lisis mediada por el complemento de los eritrocitos con los complejos insulina-anti-insulina unidos a la proteína A. Cada cámara fue escaneada utilizando un Sistema de Micro Disección Leica 6000 (version 6.4.1.2887) acoplado a una cámara Hitachi HV-D20. El diámetro de cada placa (expresado en  $\mu$ m<sup>2</sup>) se midió directamente en el monitor de un sistema de video (TM-90PSN, JVC) conectado a un microscopio.

El número de células formadoras de placas fue determinado y se expresó como porcentaje. El índice de secreción que corresponde a la actividad secretora global de las células beta fue estimado para cada condición experimental. Este índice de secreción es el resultado de la multiplicación del área promedio de las inmunoplacas por el porcentaje de células secretoras, y se expresó en unidades arbitrarias (Hiriart and Ramirez-Medeles, 1991). Al menos 100 células fueron analizadas en cada condición experimental en cada cultivo. Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

### Análisis de subpoblaciones funcionales de células beta pancreáticas

Con el propósito de analizar el comportamiento de las subpoblaciones funcionales de células beta y determinar si éstas se afectaron de forma diferencial por los tratamientos experimentales, se analizaron las distribuciones de frecuencia de las áreas de inmunoplaaca de todos los experimentos por cada condición experimental. Teniendo en consideración la presencia de diferentes subpoblaciones secretoras (Hiriart and Ramirez-Medeles, 1991), consideramos dos clasificaciones: células formadoras de placas pequeñas (SP del inglés *small plaques*), que tienen áreas de inmunoplaacas  $< 1900 \mu\text{m}^2$  y células formadoras de placas grandes (LP del inglés *long plaques*), que tienen áreas de inmunoplaacas  $> 1900 \mu\text{m}^2$  (Rosenbaum et al., 2001).

### **5.8 Análisis estadístico**

Todos los datos son informados como el promedio  $\pm$  el error estándar de la media (EEM); donde  $n$  denota el número de células o de experimentos según sea el caso. La significancia estadística fue obtenida con el análisis de varianza de una vía (ANOVA) y es reportada como el 95 % del intervalo de confianza (Statistic, versión 7.0).

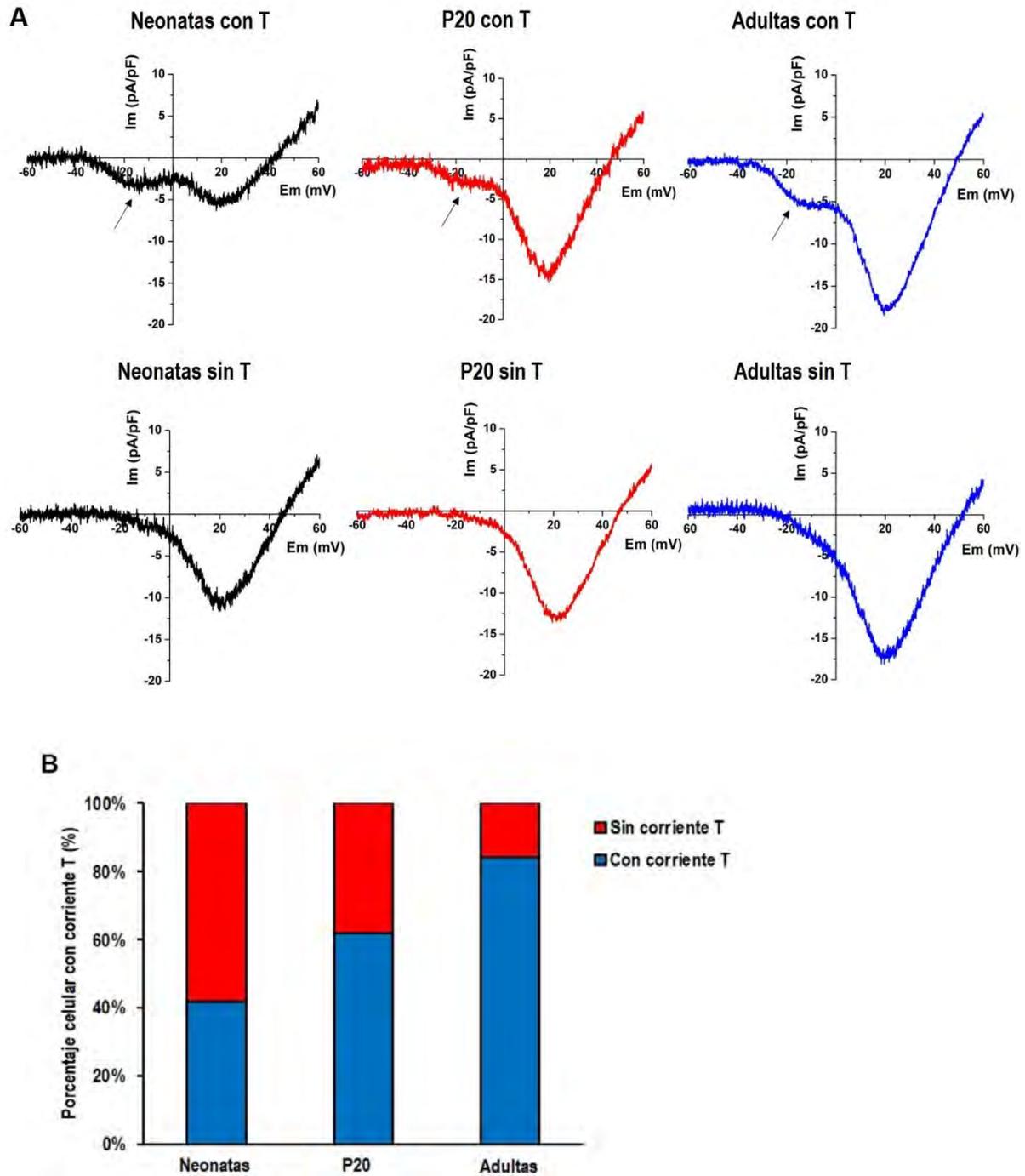
## 6. RESULTADOS

### ***A. Caracterización electrofisiológica de los canales de calcio LVA y HVA durante el desarrollo posnatal de la célula beta pancreática de rata***

#### **Detección de la corriente de calcio tipo T en células beta neonatas, P20 y adultas**

Como ya se comentó, no existen muchos estudios sobre la corriente de calcio mediada por canales tipo T en células beta de cultivos primarios, ni tampoco sobre esta corriente en etapas tempranas del desarrollo. Es por ello que nuestro primer propósito fue explorar la presencia de esta corriente durante el desarrollo posnatal de la célula beta pancreática de rata. Las corrientes a través de los canales de calcio de células beta individuales se registraron empleando la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana en la modalidad célula completa y utilizando calcio como acarreador de carga.

En la Figura 6.1A se muestran los registros de corrientes representativos obtenidos de células neonatas, de P20 y de adultas con y sin la corriente de calcio tipo T. Los porcentajes de detección de esta corriente en cada etapa del desarrollo se muestran en la Figura 6.1B. La corriente de calcio HVA fue detectada en el 100 % de las células analizadas. Sin embargo, la corriente LVA fue detectada en el 42 % de las células neonatas (n =76), en el 62 % de las células P20 (n=78) y en el 84 % de las células adultas (n=86). Interesantemente, la presencia de la corriente de calcio tipo T aumenta con la maduración de la célula beta pancreática.



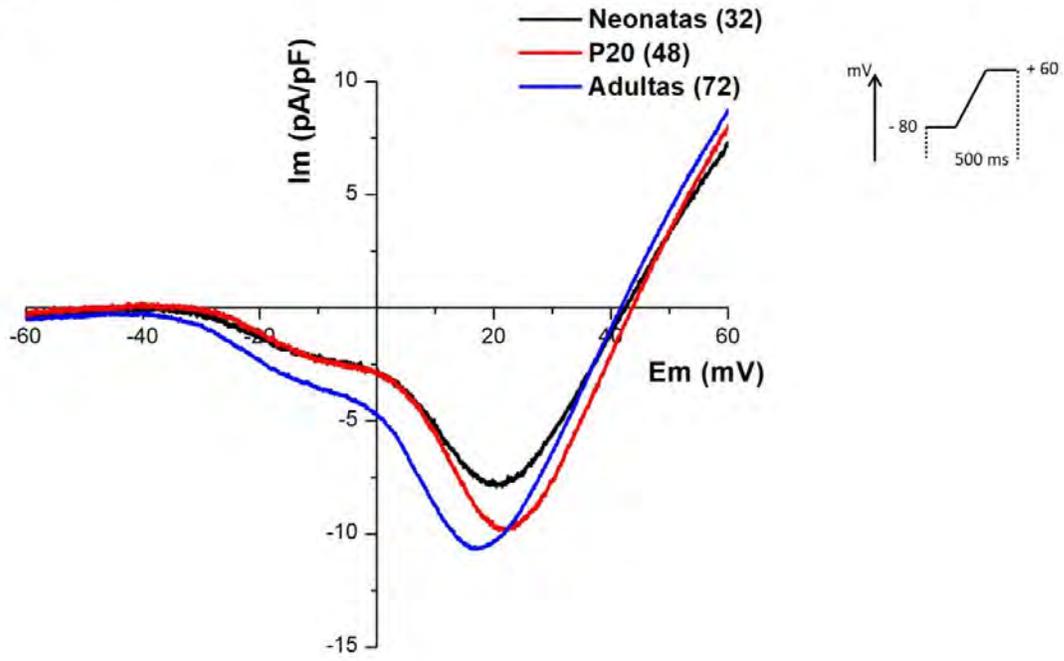
**Figura 6.1. Detección de la corriente tipo T en células beta neonatas, P20 y adultas.** (A) Registros representativos de las corrientes de calcio totales observadas en células beta neonatas, P20 y adultas. Protocolo: rampa de voltaje de -80 a +60 mV, 500 ms de duración y pendiente de 0.5 mV/ms, Em = -80 mV. Las flechas indican la presencia de la corriente tipo T en los registros representativos de cada edad. (B). Cuantificación del porcentaje de células beta con y sin corriente de calcio tipo T en las etapas neonatal (n =76), P20 (n = 78) y adultas (n= 86).

## **Corrientes de calcio LVA y HVA registradas en células beta neonatas, P20 y adultas**

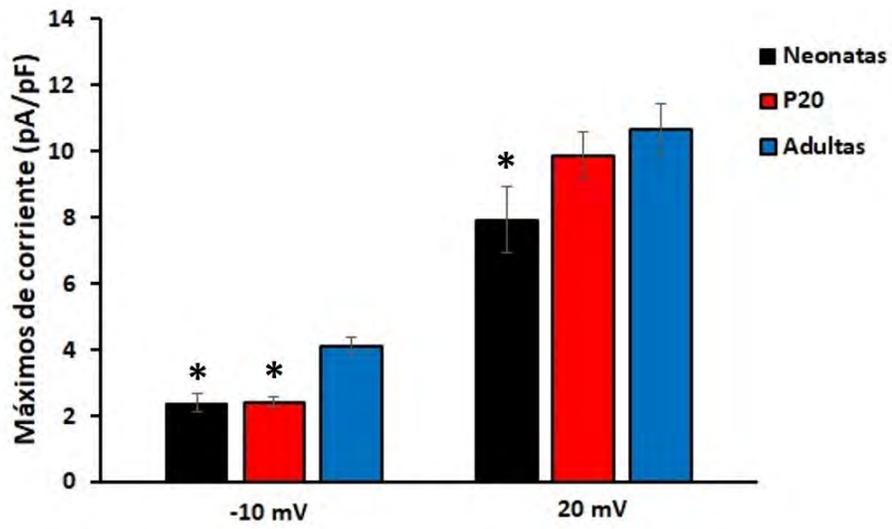
Con el objetivo de determinar las propiedades biofísicas de las corrientes de calcio LVA y HVA en las células beta de las tres edades decidimos analizar solamente las células donde fue detectada la corriente tipo T. La Figura 6.2A muestra la media de la relación corriente-voltaje (I-V) de la  $ICa^{2+}$  en células beta neonatas, P20 y adultas obtenidas al aplicar el protocolo de rampa. En las tres etapas del desarrollo, la I-V muestra dos componentes principales de la corriente de calcio, un componente activado a bajo voltaje (correspondiente a la corriente LVA) con un umbral de activación de alrededor de -40 mV y otro componente activado a alto voltaje (correspondiente a la corriente HVA).

Los máximos de corriente se alcanzaron alrededor de los -10 mV y +20 mV para las corrientes LVA y HVA respectivamente. Las células adultas presentaron los mayores máximos de corriente de calcio LVA y HVA y específicamente la amplitud de la corriente HVA aumentó con la etapa de maduración. Las células beta adultas aumentaron la densidad de corriente de calcio tipo T 1.7 veces comparado con las etapas inmaduras, mientras que la densidad de corriente HVA aumentó 1.4 veces comparado con las células neonatales (Figura 6.2B y Tabla 6.1).

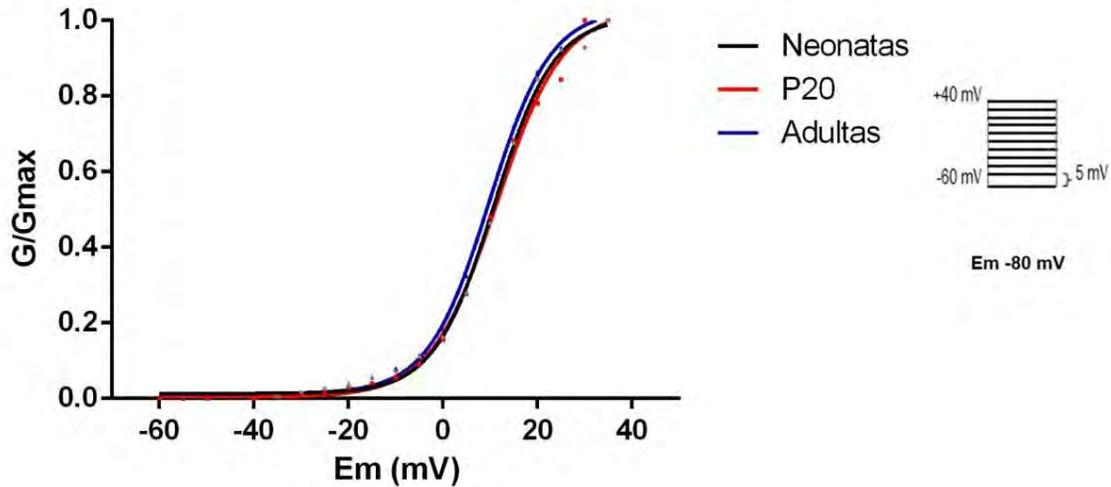
A



B



C



**Figura 6.2. Corrientes de calcio LVA y HVA registradas en células beta neonatas, P20 y adultas.** (A) Densidad de corriente de calcio ( $ICa^{2+}$ , pA/pF) y relación corriente-voltaje (I-V) de células neonatas (línea negra, n = 32), P20 (línea roja, n =48) y adultas (línea azul, n = 72). Protocolo: rampa de voltaje de -80 a +60 mV, 500 ms de duración y pendiente de 0.5 mV/ms,  $E_m = -80$  mV. (B). Media de los máximos de corriente de calcio a -10 mV (corriente LVA) y +20 mV (corriente HVA) en células beta neonatas, P20 y adultas. (C) Curvas de activación de voltaje correspondiente a los canales HVA, las cuales representan el ajuste a la función de Boltzmann de los datos obtenidos de un protocolo de pulsos despolarizantes cuadrados de -60 a +40 mV con incrementos de 5 mV,  $E_m = -80$  mV. \*  $p \leq 0.05$  denota diferencias significativas de las células neonatas y P20 con respecto a las células adultas, prueba de Tukey (ANOVA).

**Tabla 6.1. Valores de capacitancia y máximos de corriente a -10 mV y +20 mV correspondientes a las corrientes LVA y HVA respectivamente, en células beta neonatas, P20 y adultas.**

Los datos son expresados como la media de la densidad de la corriente  $\pm$  EEM, n denota el número de células registradas. \*  $p \leq 0.05$  denota diferencias significativas con respecto a las células adultas, prueba de Tukey (ANOVA).

Grupos	N	Capacitancia (pF)	Máximos de corriente (pA/pF)	
			-10 mV	20 mV
Neonatas	32	$7.0 \pm 0.4$	$-2.4 \pm 0.3^*$	$-7.9 \pm 1.0^*$
P20	48	$6.7 \pm 0.3$	$-2.4 \pm 0.2^*$	$-9.9 \pm 0.7$
Adultas	72	$9.6 \pm 0.4$	$-4.1 \pm 0.3$	$-10.7 \pm 0.8$

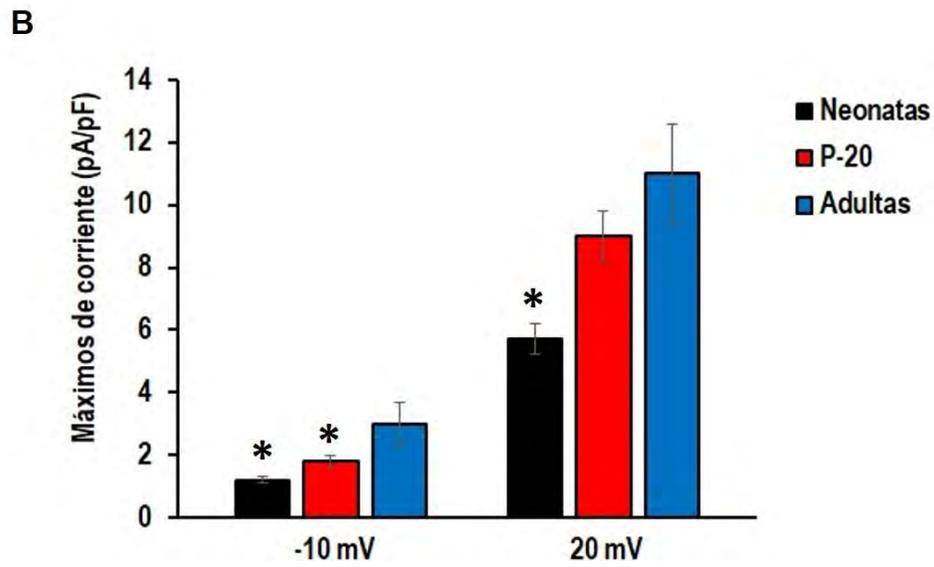
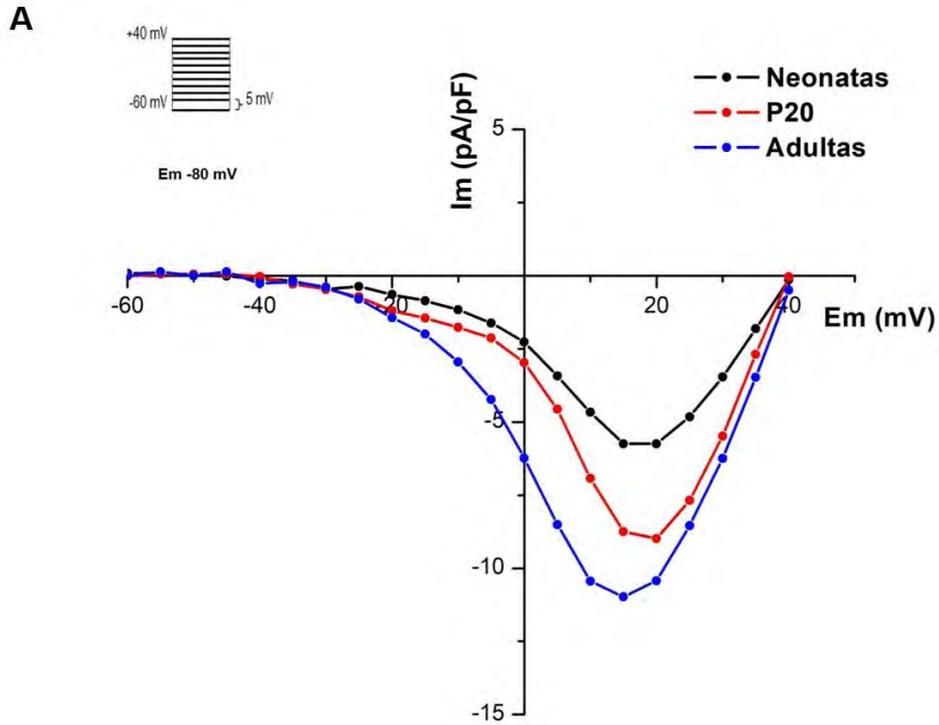
La Figura 6.2C muestra las curvas de dependencia del voltaje para la activación de los canales HVA en las células neonatales, P20 y adultas. Estas curvas representan la fijación a la función de Boltzmann de los datos obtenidos de la aplicación de un protocolo de pulsos despolarizantes cuadrados de -60 a +40 mV con incrementos de 5 mV (Ver Materiales y Métodos). No existen diferencias en los parámetros de Boltzmann, en el voltaje medio de activación máxima ( $V_{a1/2}$ ) ni en la pendiente de las curvas de activación ( $k_a$ ) entre las diferentes etapas de maduración (Tabla 6.2).

**Tabla 6.2. Parámetros de Boltzmann calculados a partir de los valores de conductancia de  $Ca^{2+}$  en células neonatas (n = 9), P20 (n = 15) y adultas (n = 9).**

Parámetros	Neonatas	P20	Adultas
$V_{a1/2}$ (mV)	$10.4 \pm 1.0$	$10.9 \pm 1.5$	$8.0 \pm 1.5$
$k_a$	$5.9 \pm 0.7$	$6.1 \pm 0.6$	$5.5 \pm 0.7$

La Figura 6.3 muestra las relaciones I-V para las tres edades obtenidas con el protocolo de pulsos cuadrados de -40 a +60 mV con intervalos de 5 mV. Al igual que lo observado con el protocolo de rampa, en las tres etapas del desarrollo se observan los dos componentes principales de la corriente de calcio, la corriente mediada por canales LVA y la correspondiente a los canales HVA (Figura 6.3A).

Los máximos de corriente a -10 y +20 mV correspondientes a los canales LVA y HVA respectivamente se muestran en la Figura 6.3B. Con este protocolo de pulsos se obtuvieron resultados similares a los que arrojó el protocolo de rampa. Las células adultas presentaron los mayores máximos de corriente LVA y HVA, aunque las medias de los máximos de corriente son menores a los obtenidos con el protocolo de rampa. Con este protocolo las células beta adultas aumentaron la densidad de corriente de calcio LVA 2.5 veces comparado con las células neonatas, mientras que la densidad de corriente HVA aumentó 1.9 veces comparado con la etapa neonatal (Figura 6.3B).



**Figura 6.3. Corrientes de calcio LVA y HVA registradas en células beta neonatas, P20 y adultas.** (A) Densidad de corriente de calcio ( $I_{Ca^{2+}}$ , pA/pF) y relación corriente-voltaje ( $I-V$ ) de células neonatas (línea negra,  $n = 11$ ), P20 (línea roja,  $n = 34$ ) y adultas (línea azul,  $n = 8$ ). Protocolo de pulsos despolarizantes cuadrados de -60 a +40 mV con incrementos de 5 mV,  $E_m = -80$  mV. (B). Media de los máximos de corriente de calcio a -10 mV (corriente

LVA) y +20 mV (corriente HVA) en células beta neonatas, P20 y adultas. \*  $p \leq 0.05$  denota diferencias significativas con respecto a las células adultas, prueba de Tukey (ANOVA).

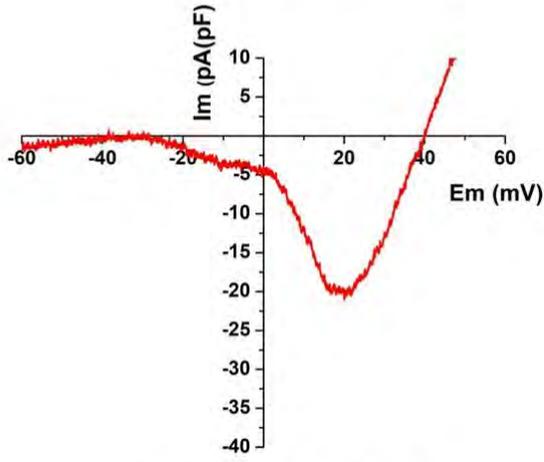
### **Variabilidad de corrientes de calcio HVA en células beta P20**

Debido a la importancia de la etapa de ablactación (P20) en el proceso de maduración de las células beta, donde los estudios previos en nuestro laboratorio han evidenciado la presencia de hiperinsulinemia y resistencia a la insulina fisiológica en estas ratas, se analizó con detenimiento el comportamiento de las corrientes de calcio en esta etapa de maduración. Curiosamente, se observó un comportamiento heterogéneo en las corrientes de calcio (Figura 6.4A).

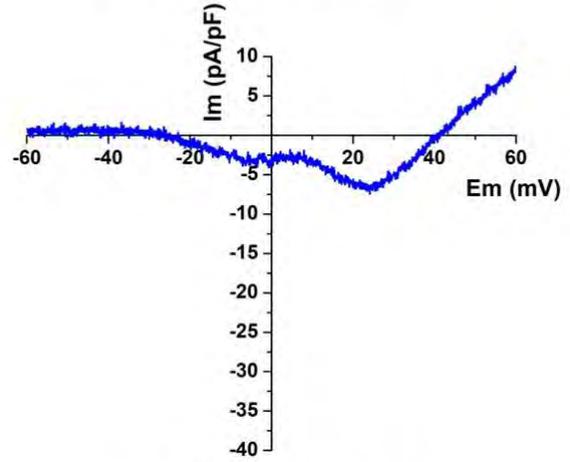
Existen células con corrientes HVA muy superiores a la media de la densidad de corriente HVA de las células adultas. Es importante destacar que la detección de estas hipercorrientes HVA fue independiente de la presencia de la corriente tipo T. Las células con densidades de corriente HVA superiores a los 11 pA/pF (densidad de corriente promedio de las células adultas) representaron casi la mitad (45 %) del total de células analizadas (Figura 6.4B). Además, el 54 % de las células con hipercorrientes de calcio y el 67 % de las que presentaron corrientes en el intervalo promedio de las células de 20 días, presentaron corriente tipo T (Figura 6.4C). Esta heterogeneidad sugiere la existencia de subpoblaciones de células beta en esta etapa del desarrollo, teniendo en cuenta las corrientes de calcio.

**A**

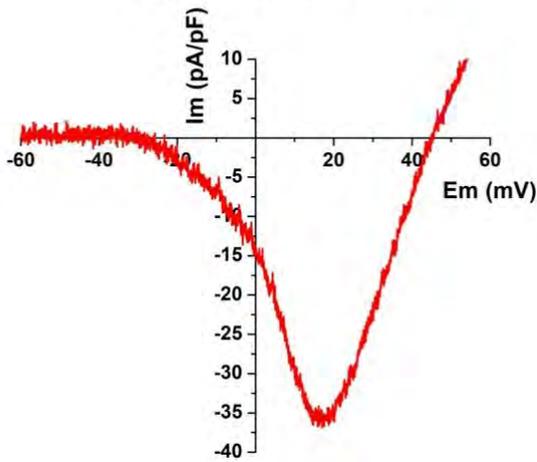
$I_{HVA} > 11 \text{ pA/pF con T}$



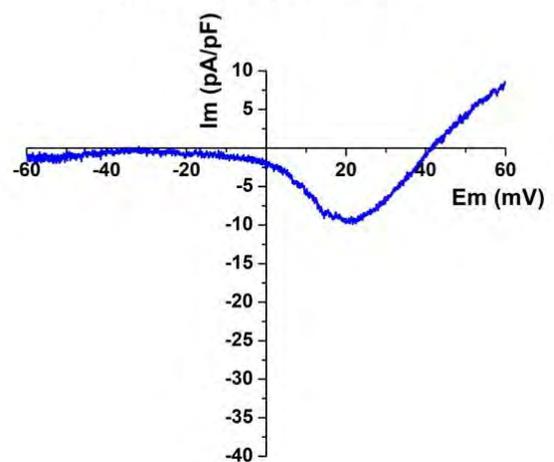
$I_{HVA} < 11 \text{ pA/pF con T}$

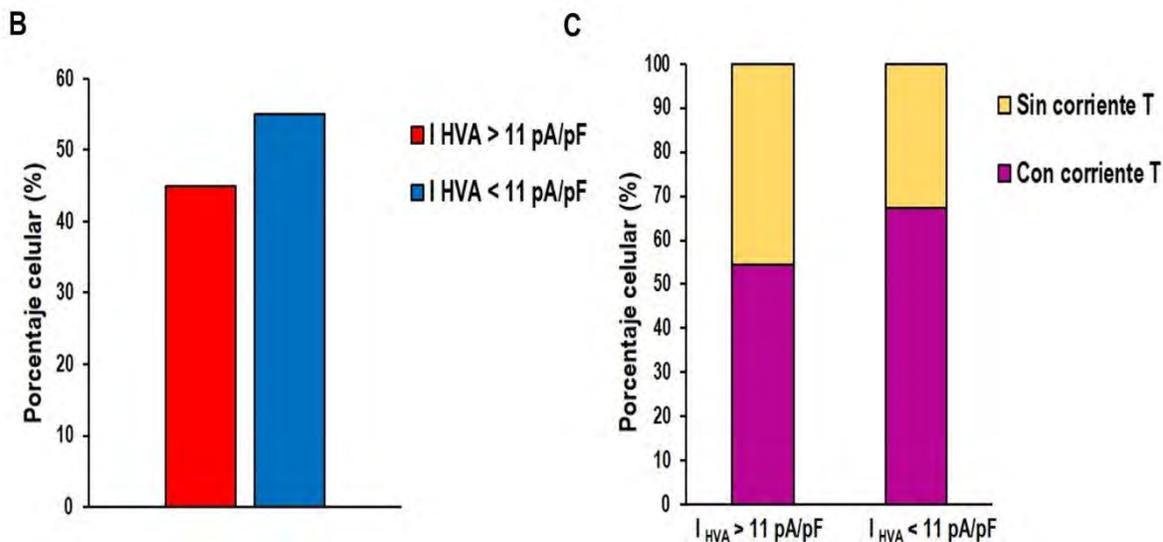


$I_{HVA} > 11 \text{ pA/pF sin T}$



$I_{HVA} < 11 \text{ pA/pF sin T}$





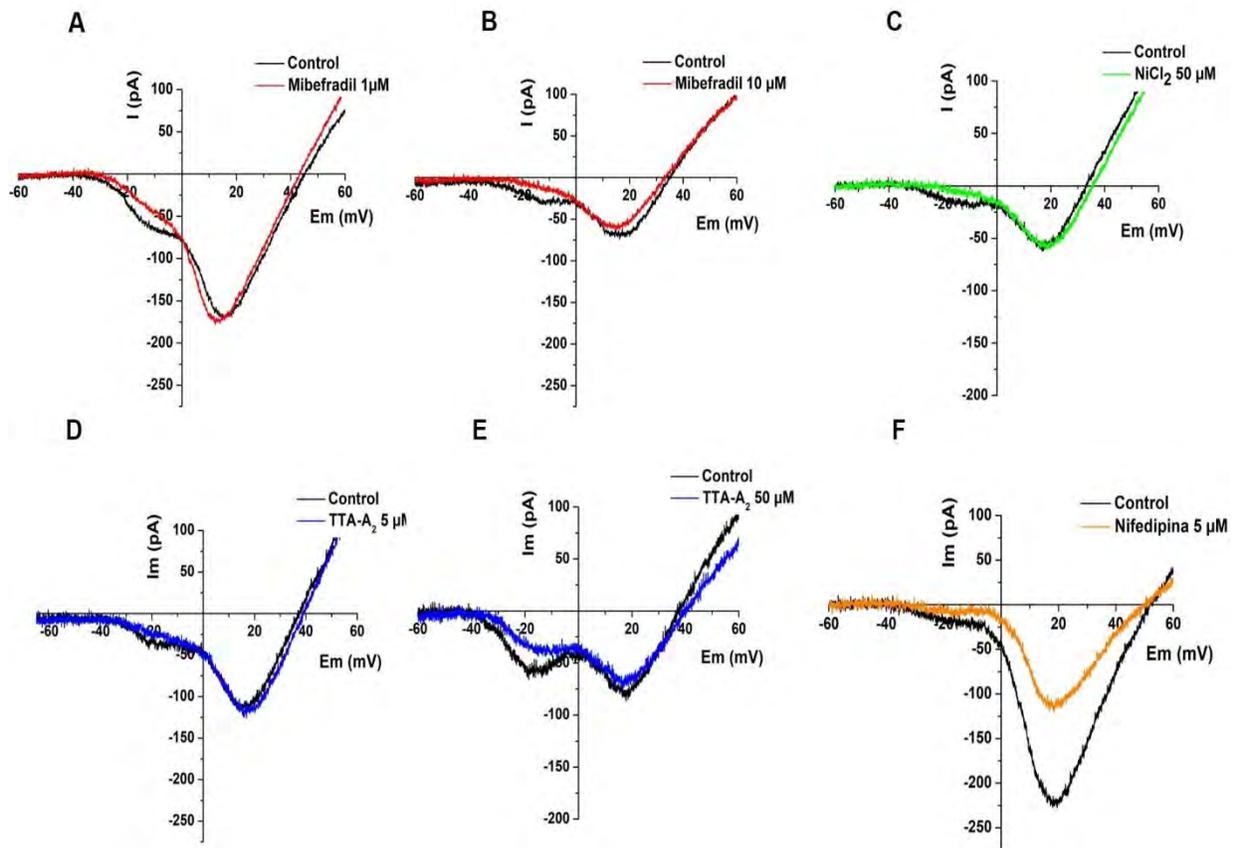
**Figura 6.4. Variabilidad de corrientes de calcio HVA en células beta P20.** (A) Registros representativos de corrientes de calcio totales observadas en células beta P20 con corrientes HVA superiores o inferiores que la media de la corriente HVA de las células beta adultas, con o sin corriente tipo T. Protocolo: rampa de voltaje de -80 a +60 mV, 500 ms de duración y pendiente de 0.5 mV/ms,  $E_m = -80$  mV. (B). Cuantificación del porcentaje de células beta P20 con corrientes HVA superiores ( $n=35$ ) e inferiores ( $n=43$ ) que la media de la corriente HVA de las células beta adultas. (C) Cuantificación del porcentaje de células beta P20 representado en (B) con y sin corriente de calcio tipo T.

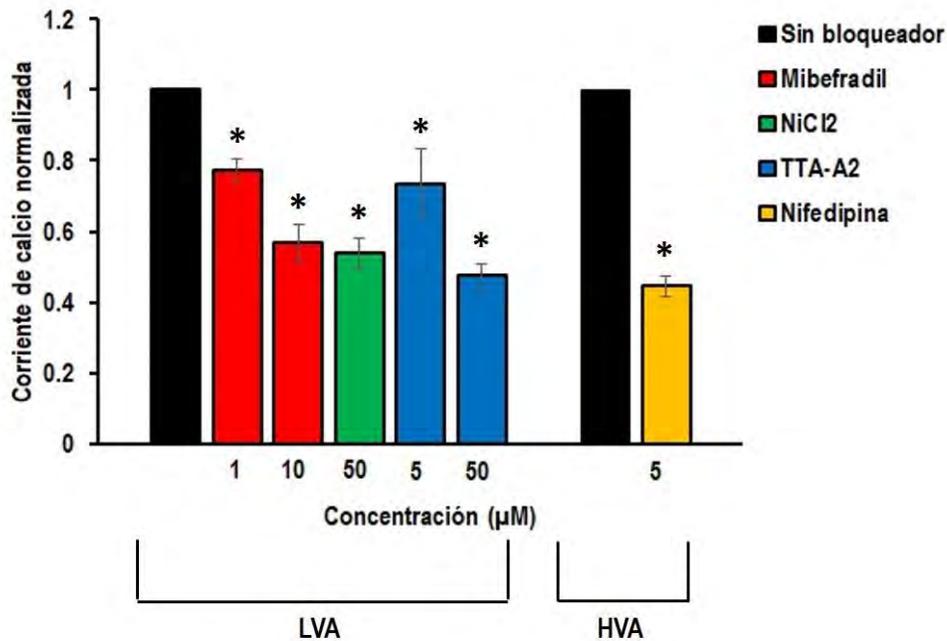
### Efecto de los bloqueadores de canales de calcio sobre las corrientes de calcio LVA y HVA en células beta adultas

Luego de caracterizar las corrientes de calcio LVA y HVA en las células beta, nos propusimos realizar la evaluación farmacológica de estas corrientes. Para ello, estudiamos el efecto de distintos bloqueadores de los canales de calcio sobre las corrientes en células beta adultas. Para el bloqueo de la corriente HVA se utilizó el bloqueador clásico de la familia de las DHP, la nifedipina (5  $\mu$ M) y un grupo de inhibidores con alguna especificidad sobre los canales LVA: mibefradil (1 and 10  $\mu$ M),  $\text{NiCl}_2$  (50  $\mu$ M) and TTA-A<sub>2</sub> (5 and 50  $\mu$ M).

Para determinar si el bloqueo del mibefradil sobre la corriente de bajo umbral es dependiente de la concentración, aplicamos el fármaco a las concentraciones de 1 and 10  $\mu$ M. Las Figuras 6.5A y B muestran trazos de corriente representativos sin y

con mibefradil 1 y 10  $\mu\text{M}$  respectivamente. El bloqueo del mibefradil fue dependiente de la concentración con 23 y 44 % de bloqueo de la corriente tipo T a 1 y 10  $\mu\text{M}$  respectivamente (Figura 6.5G).



**G**

**Figura 6.5. Efecto de los bloqueadores de canales de calcio sobre las corrientes de calcio LVA y HVA en células beta adultas.** (A-F) Registros representativos de las corrientes de calcio totales observadas en células beta adultas antes y después de los bloqueadores de los canales de calcio: mibefradil (1 y 10 µM), NiCl<sub>2</sub> (50 µM), TTA-A<sub>2</sub> (5 y 50 µM) y nifedipina (5 µM) Protocolo: rampa de voltaje de -80 a +60 mV, 500 ms de duración y pendiente de 0.5 mV/ms, Em = -80 mV. (G) Corriente de calcio normalizada después de añadir los bloqueadores de los canales de calcio: 1 µM de mibefradil (n= 5), 10 µM de mibefradil (n= 6), 50 µM de NiCl<sub>2</sub> ((n= 6), 5 µM de TTA-A<sub>2</sub> (n= 5), 50 µM de TTA-A<sub>2</sub> (n= 3) y 5 µM de nifedipina (n=6). \* p<0.05 denota diferencias significativas con respecto a la corriente antes de añadir los bloqueadores, prueba de T pareada.

Por otro lado, se conoce que la sensibilidad al NiCl<sub>2</sub> de las corrientes tipo T y HVA en células de cultivos primarios es variable en neuronas. Sin embargo, está demostrado que αH es la subunidad más sensible y que este bloqueo es en el orden micromolar (Lee et al., 1999). La Figura 5C muestra un registro de corriente representativo sin y con 50 µM de NiCl<sub>2</sub>. El bloqueo por níquel a esta concentración fue selectivo para la corriente tipo T con un 46 % de disminución de la corriente al pico (Figura 6.5G).

El TTA-A<sub>2</sub> también bloqueó selectivamente la corriente LVA y semejante a lo que observamos al aplicar mibefradil, el bloqueo fue dependiente de la concentración (Figura 6.5D y E). Los porcentajes de bloqueo de la corriente fueron 27 y 53 % a 5 y 50  $\mu$ M respectivamente (Figura 6.5G). La nifedipina (5  $\mu$ M) bloqueó la corriente HVA un 56 % (Figuras 6.5F y G).

Nótese que en los registros con NiCl<sub>2</sub> y nifedipina el valor de potencial de membrana al cual la corriente de calcio es cero, correspondiente al potencial de reversión, está desplazado. Este comportamiento no fue observado en la mayoría de los registros con estos bloqueadores. Sin embargo, las curvas mostradas son las que mejor representan el efecto bloqueante sobre las corrientes de calcio.

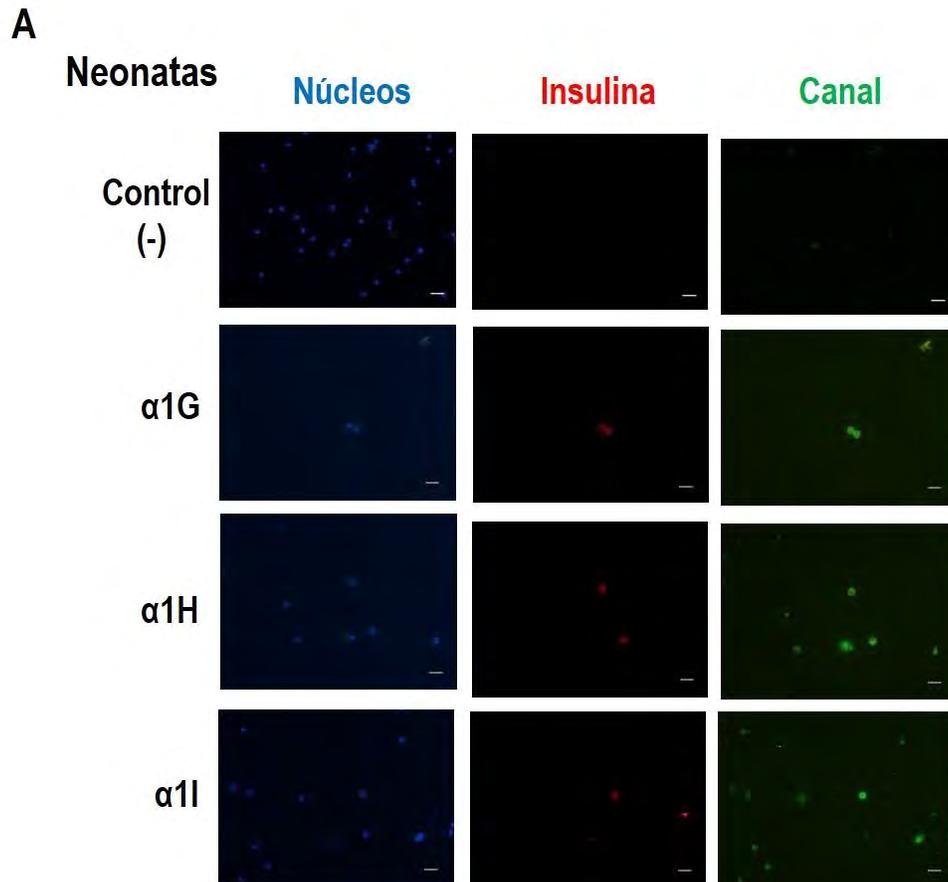
### ***B. Expresión diferencial de las isoformas de los canales de calcio LVA durante el desarrollo posnatal de la célula beta pancreática de rata***

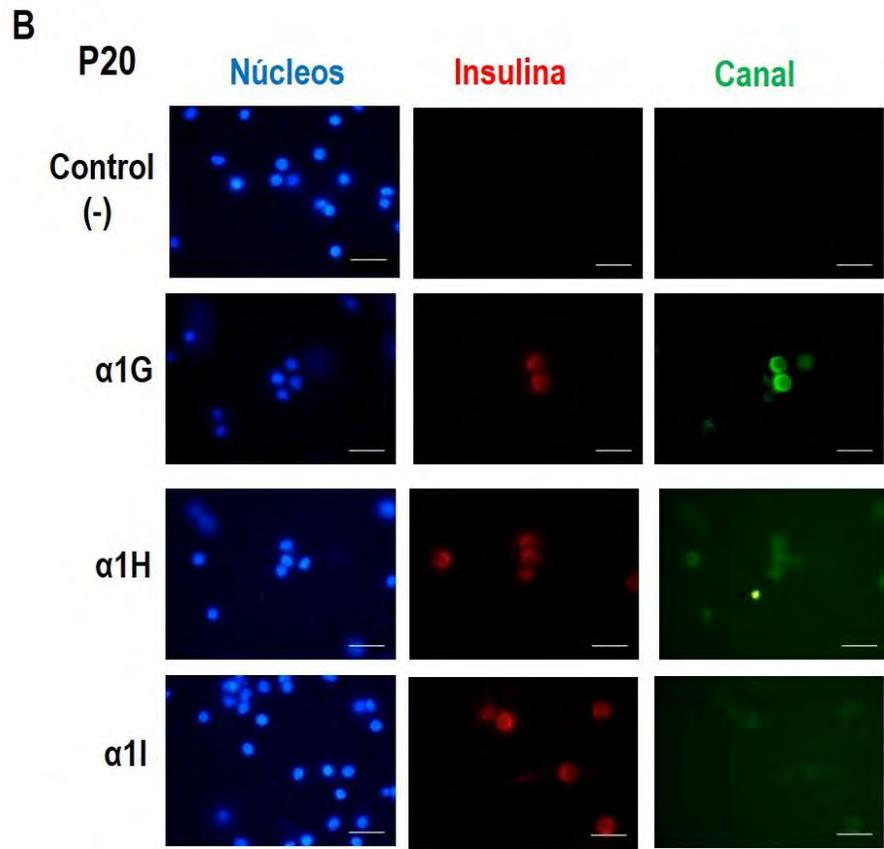
#### **Las células beta neonatas, P20 y adultas expresan las tres isoformas de los canales tipo T**

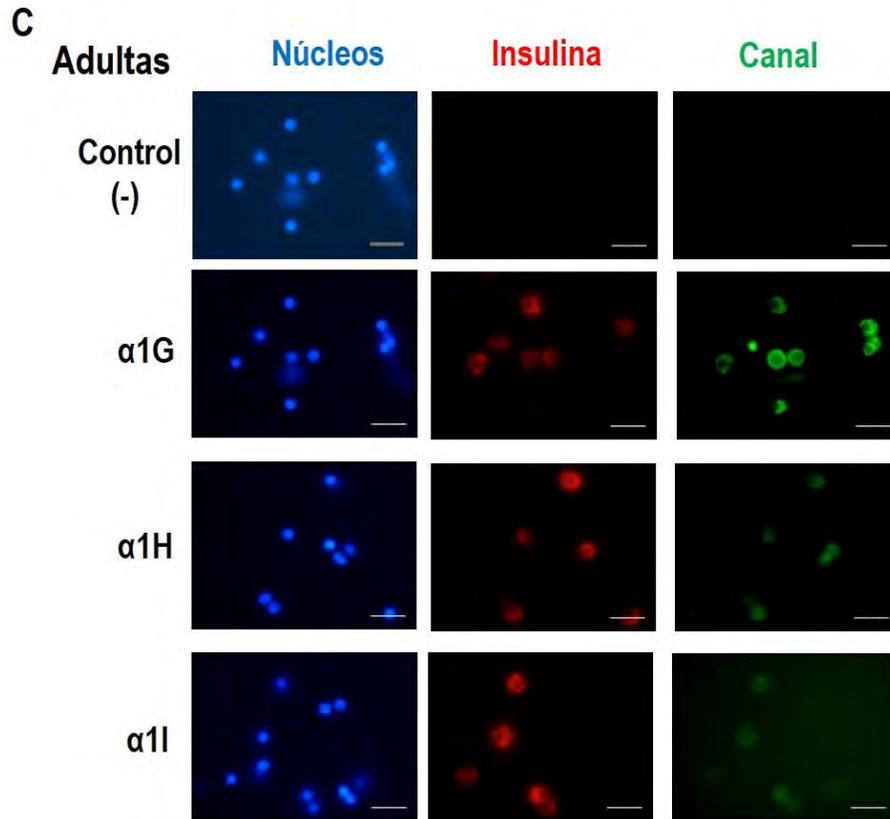
La mayor densidad de corriente de Ca<sup>2+</sup> registrada en las células beta adultas podría resultar de niveles superiores de expresión de los canales de calcio. La expresión de los canales HVA ha sido bien estudiada pero no la expresión de los canales tipo T. Para evaluar esta hipótesis, nosotros determinamos si existe expresión diferencial durante el desarrollo posnatal de la célula beta de las subunidades  $\alpha$ 1G,  $\alpha$ 1H y  $\alpha$ 1I que codifican para las isoformas Cav 3.1, 3.2 y 3.3 de los canales tipo T respectivamente.

Como se muestra en las microfotografías de la Figura 6.6 (A-C), la inmunotinción específica para las subunidades  $\alpha$ 1G,  $\alpha$ 1H y  $\alpha$ 1I está presente en las células beta aisladas de las tres edades en estudio. El análisis de los porcentajes de células beta por etapa del desarrollo en las cuales se detectó la presencia de cada isoforma de los canales T arrojó que la subunidad  $\alpha$ 1G está expresada en todas las células beta analizadas en cada edad. Los porcentajes de detección de la subunidad  $\alpha$ 1H son

98, 96 y 99 % en células beta neonatas, P20 y adultas respectivamente, mientras que  $\alpha 1I$  es la subunidad menos expresada y está presente en el 94 % de las células de las tres edades (Tabla 6.3).







**Figura 6.6. Las células beta neonatas, P20 y adultas expresan las tres isoformas de los canales tipo T.** (A-C) Microfotografías representativas de la expresión de las subunidades  $\alpha 1G$ ,  $\alpha 1H$  y  $\alpha 1I$  de los canales tipo T en células neonatas (A), P20 (B) y adultas (C). Se muestran las diferencias en los niveles de inmunotinción. Magnificación: 20X + Zoom 1.6 (A) and 60X + Zoom 1.6 (B, C). Las barras de escala representan 20  $\mu m$ .

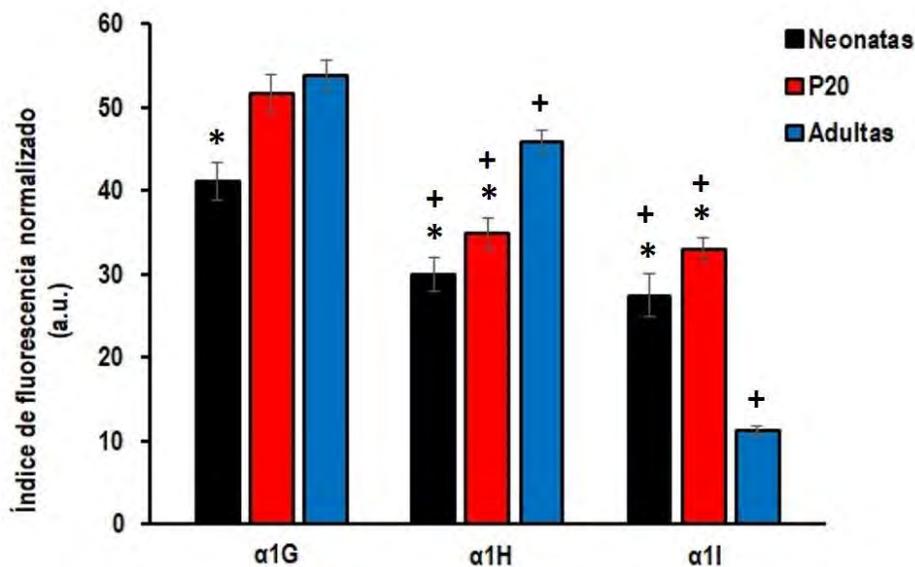
**Tabla 6.3. Porcentaje de células beta neonatas, P20 y adultas que expresan las isoformas de los canales tipo T (n=4 experimentos independientes por cada edad).**

Subunidades	Presencia de las isoformas de los canales T (% celular)		
	Neonatas	P20	Adultas
$\alpha 1G$ (Cav 3.1)	100	100	100
$\alpha 1H$ (Cav 3.2)	98	96	99
$\alpha 1I$ (Cav 3.3)	94	94	94

## Expresión diferencial de las isoformas de los canales tipo T durante el desarrollo posnatal de la célula beta pancreática de rata

La Figura 6.7 muestra los niveles de expresión de las tres isoformas de los canales tipo T durante el desarrollo posnatal de la célula beta pancreática de rata. Los resultados revelan que, independiente de la etapa del desarrollo, la fluorescencia específica para la subunidad  $\alpha 1G$  es más abundante que para las otras subunidades.

Interesantemente, los índice de fluorescencia específica para las subunidades  $\alpha 1G$  y  $\alpha 1H$  es mayor en células beta adultas que en las células inmaduras (neonatales y P20). Sin embargo, la inmunotinción específica para la subunidad  $\alpha 1I$  en las células maduras es menor que en las células inmaduras. Además, es importante destacar que solamente la expresión de la subunidad  $\alpha 1H$  (Cav 3.2) aumenta con la etapa del desarrollo del animal.



**Figura 6.7. Expresión diferencial de las isoformas de los canales tipo T durante el desarrollo posnatal de la célula beta pancreática de rata.** Índice de inmunofluorescencia medido de 150-200 células por cada isoforma y por cada etapa del desarrollo (n=4 experimentos independientes por cada edad). Los símbolos denotan diferencias significativas con respecto a la etapa adulta (\*) y a la subunidad  $\alpha 1G$  a la misma edad (+),  $p \leq 0.05$ , Prueba de Dunnet (ANOVA).

En general, las tres isoformas de los canales de calcio tipo T están expresadas de forma diferencial durante el desarrollo posnatal de la célula beta pancreática de rata.

### ***C. Participación de los canales de calcio LVA y HVA en la secreción de insulina basal y estimulada por glucosa***

#### **Efecto de los bloqueadores de los canales de calcio sobre la secreción de insulina basal y estimulada por glucosa en células beta adultas**

Con el propósito de evaluar la participación de los canales LVA y HVA en la secreción de insulina de células beta individuales, medimos el efecto de los distintos bloqueadores probados en los estudios electrofisiológicos, sobre la secreción de insulina basal y estimulada por glucosa mediante el RHPA.

La Figura 6.8A muestra las imágenes representativas del RHPA en células controles e incubadas con nifedipina (5  $\mu$ M), mibefradil (1  $\mu$ M),  $\text{NiCl}_2$  (50  $\mu$ M), TTA-A<sub>2</sub> (50  $\mu$ M) y la combinación de nifedipina + TTA-A<sub>2</sub>, expuestas a condiciones de glucosa basal (5.6 mM) y estimulantes (15.6 mM). Curiosamente, solamente el mibefradil y el TTA-A<sub>2</sub>, bloqueadores específicos de los canales de calcio tipo T, disminuyeron significativamente el porcentaje de células secretoras de insulina (F) en 5.6 mM de glucosa (Figura 6.8B). En esta misma condición basal, la nifedipina y el TTA-A<sub>2</sub> disminuyeron el área de inmunoplaaca, lo que es indicativo de la cantidad de insulina secretada por las células (Figura 6.8C). Sin embargo, todos los fármacos evaluados disminuyeron el porcentaje de células secretoras de insulina y el área de placas en la condición estimulante de glucosa (15.6 mM). (Figuras 6.8B y C).

**A**

**Glucosa**

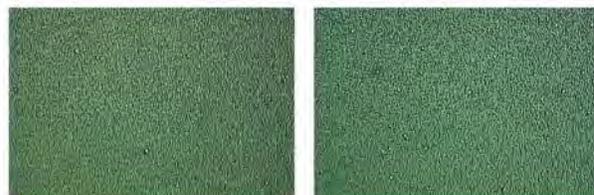
**5.6 mM**

**15.6 mM**

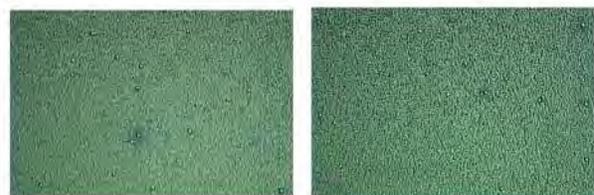
**Control**



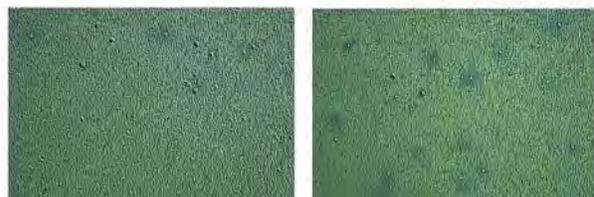
**Nifedipina**



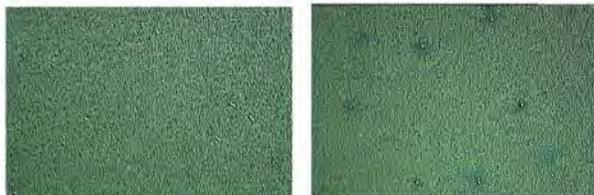
**Mibefradil**



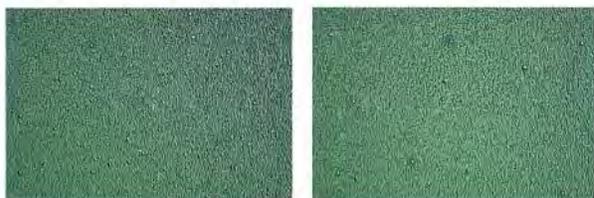
**NiCl2**

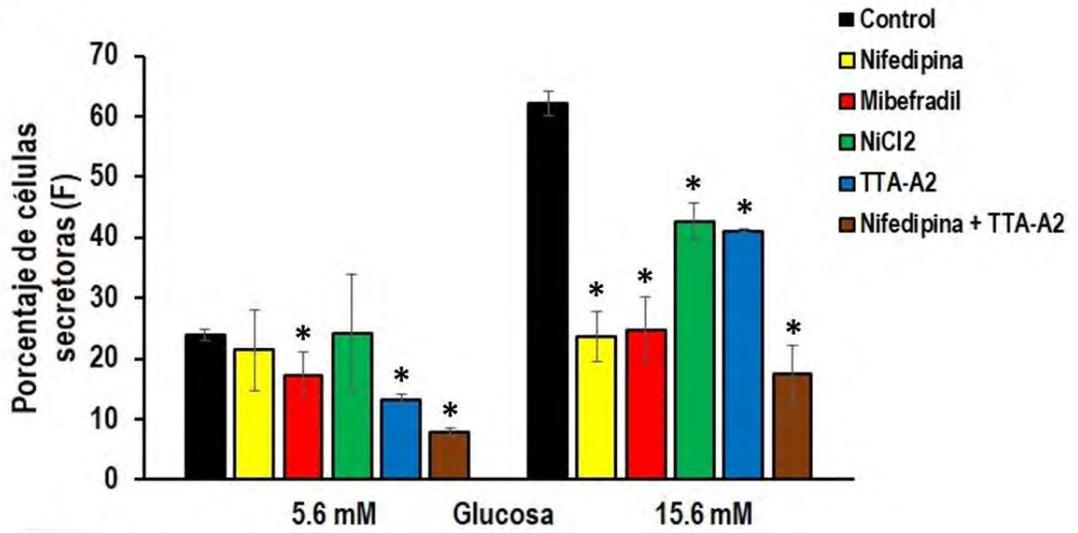
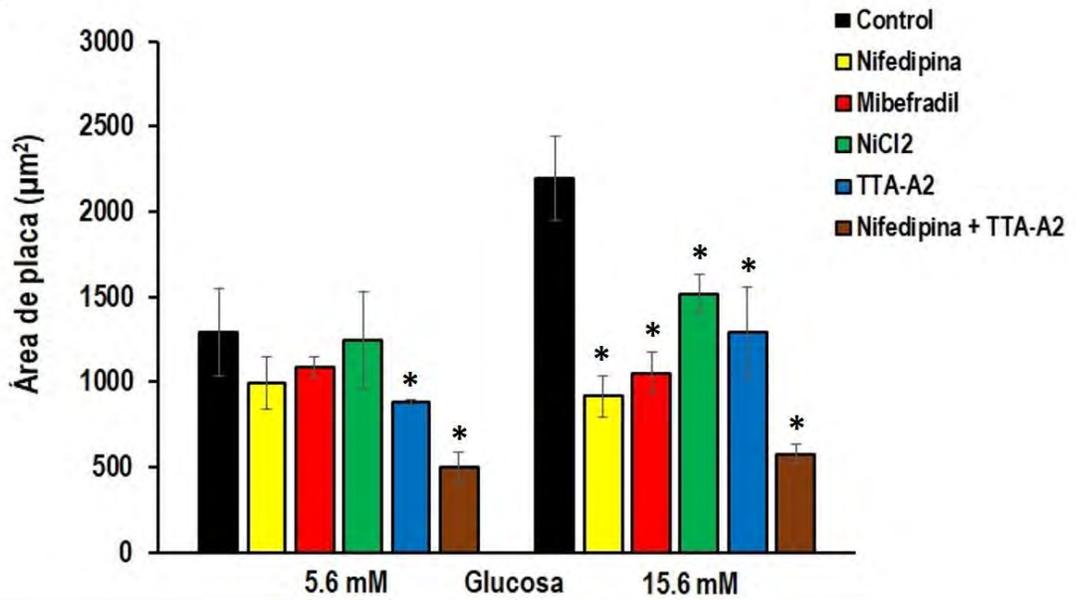


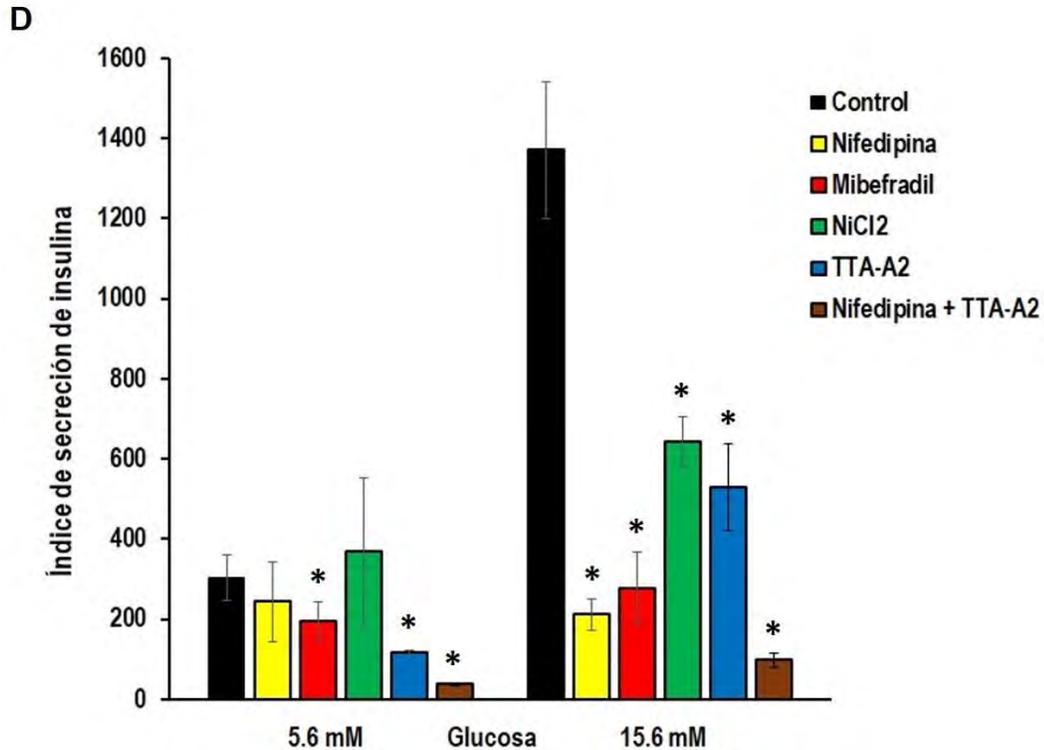
**TTA-A2**



**Nifedipina  
+  
TTA-A2**



**B****C**



**Figura 6.8. Efecto de los bloqueadores de los canales de calcio sobre la secreción de insulina basal y estimulada por glucosa en células beta adultas.** (A) Imágenes representativas del RHPA en cada condición: células beta adultas controles e incubadas con nifedipina (5  $\mu$ M), mibefradil (1  $\mu$ M), NiCl<sub>2</sub> (50  $\mu$ M), TTA-A<sub>2</sub> (50  $\mu$ M) y la combinación de nifedipina + TTA-A<sub>2</sub>, expuestas a condiciones de glucosa basal (5.6 mM) y estimulantes (15.6 mM). (B) Porcentaje de células secretoras de insulina, (C) área de inmunoplasmas y (D) índice de secreción de insulina global en cada condición. Las barras representan la media  $\pm$  EEM de tres experimentos independientes cada uno por duplicado y al menos 100 células por cada condición. \*  $p \leq 0.05$  denota diferencias significativas con respecto a las células controles (sin bloqueador) a 5.6 mM y 15.6 mM de glucosa. Prueba de Dunnet (ANOVA).

La actividad secretora total de las células beta incubadas con cada uno de los fármacos y expresado como índice de secreción de insulina se muestra en la Figura 6.8D. De forma similar al porcentaje de las células formadoras de placas, sólo el mibefradil y el TTA-A<sub>2</sub> disminuyeron el índice de secreción de insulina en condiciones basales de glucosa. TTA-A<sub>2</sub> redujo el índice de secreción más que el mibefradil y la reducción fue cercana al 60 %.

Sin embargo, todos los bloqueadores fueron efectivos en disminuir el índice de secreción de insulina en condiciones de glucosa estimulantes. La nifedipina y el mibefradil fueron los fármacos más efectivos en 15.6 mM de glucosa, con 85 % y 80 % de disminución de la cantidad de insulina secretada respectivamente. Como esperábamos teniendo en cuenta el efecto de los fármacos individuales, la combinación de nifedipina y TTA-A<sub>2</sub> disminuyó drásticamente el porcentaje de células secretoras, el área de inmunoplaaca y el índice de secreción de insulina global tanto en condiciones basales como estimuladas por glucosa (Figura 6.8B, C y D).

Estos resultados confirman que las corrientes mediadas por ambos tipos de canales de calcio contribuyen de manera importante a la secreción de insulina en ambas condiciones basal y estimulada por glucosa. Nuestros datos confirman que los canales de calcio tipo L constituyen la vía principal de entrada de calcio durante la GSIS. Interesantemente, nuestros resultados también sugieren que los canales tipo T juegan un importante papel tanto en la secreción de insulina basal como en la GSIS.

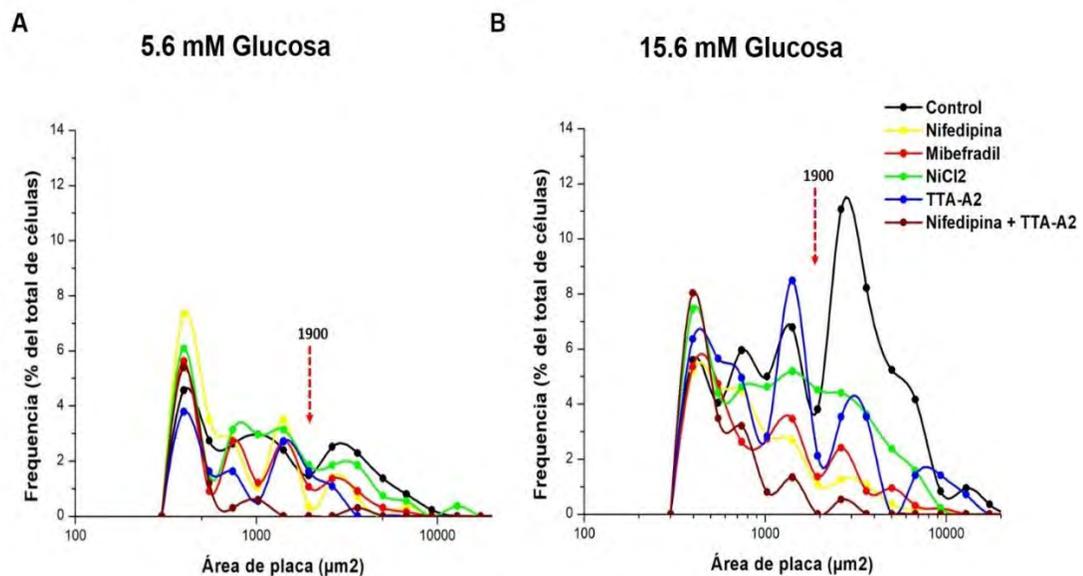
### **Efecto de los bloqueadores de los canales de calcio sobre las subpoblaciones funcionales de células beta adultas**

Es bien conocido que existe heterogeneidad funcional en las poblaciones de células beta pancreáticas (Hiriart et al., 1997; Hiriart and Ramirez-Medeles, 1991; Pipeleers et al., 2017; Van Schravendijk et al., 1992). Existen subpoblaciones funcionales de células beta de ratas adultas, una subpoblación secreta más insulina (células LP del inglés *large plaques*) que las otras (células SP del inglés *small plaques*) y son consideradas áreas de placas grandes las superiores a 1900  $\mu\text{m}^2$ . Precisamente, son las células LP las que tienen la mayor tasa de secreción y son las responsables de cerca del 75 % de la insulina secretada (Hiriart and Ramirez-Medeles, 1991).

Nuestros resultados muestran que todos los tratamientos disminuyeron drásticamente el porcentaje de células LP o formadoras de placas grandes en 15.6 mM de glucosa, lo que representa la subpoblación de células beta más afectada por

los bloqueadores y con la mayor contribución a la secreción total de las células beta en cultivo (Figura 6.9B). Este efecto, aunque también se presentó, fue menos marcado en 5.6 mM de glucosa (Figura 6.9A). La nifedipina disminuyó casi completamente la subpoblación de células LP en condiciones estimulantes, mientras que el TTA-A<sub>2</sub> tuvo un efecto similar en condiciones basales (Figuras 6.9A y B).

La fracción de células formadoras de placas pequeñas (SP), sin embargo, fue similar en todos los grupos experimentales en 15.6 mM de glucosa (Figura 9B). Además, la combinación de nifedipina y TTA-A<sub>2</sub> abolió casi totalmente la subpoblación de células LP tanto en condiciones basales como estimuladas por glucosa (Figuras 6.9A y B).



**Figura 6.9. Efecto de los bloqueadores de los canales de calcio sobre las subpoblaciones funcionales de células beta adultas.** Distribución de frecuencia de las subpoblaciones funcionales de células beta pancreáticas formadoras de placas pequeñas (SP) y de placas grandes (LP) incubadas con nifedipina (5 µM), mibefradil (1 µM), NiCl<sub>2</sub> (50 µM), TTA-A<sub>2</sub> (50 µM) y la combinación de nifedipina + TTA-A<sub>2</sub>, expuestas a 5.6 mM de glucosa (A) y 15.6 mM de glucosa (B). La línea discontinua en rojo representa la división entre las células SP y LP.

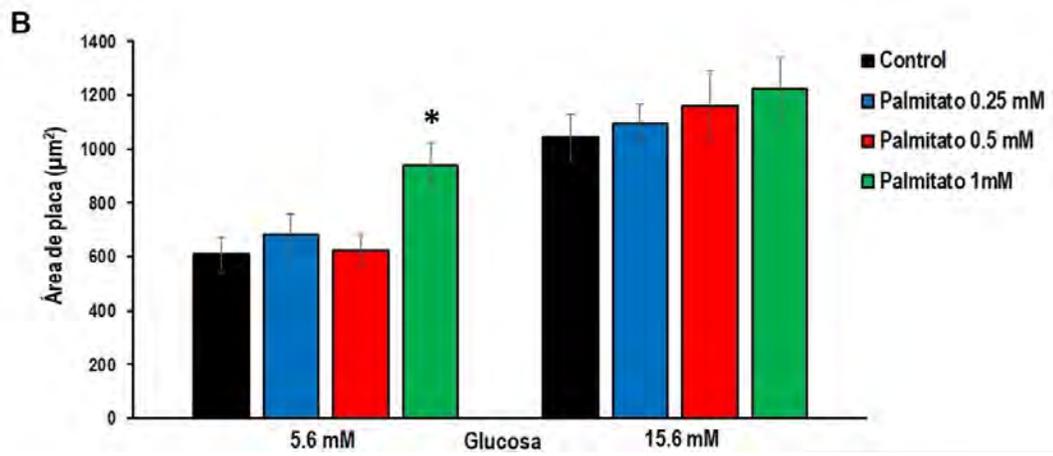
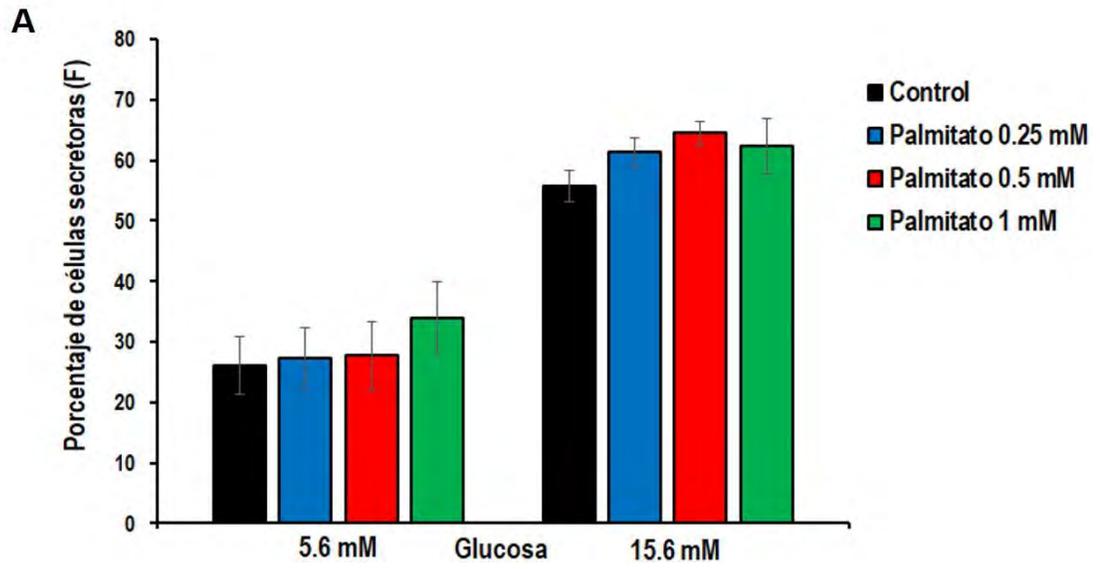
Nuestros resultados indican que una subpoblación de células beta es modulable preferencialmente por bloqueadores de canales de calcio, lo que sugiere que las distintas subpoblaciones celulares pudieran tener densidades de canales de calcio variables y/o variaciones en la maquinaria de secreción de insulina.

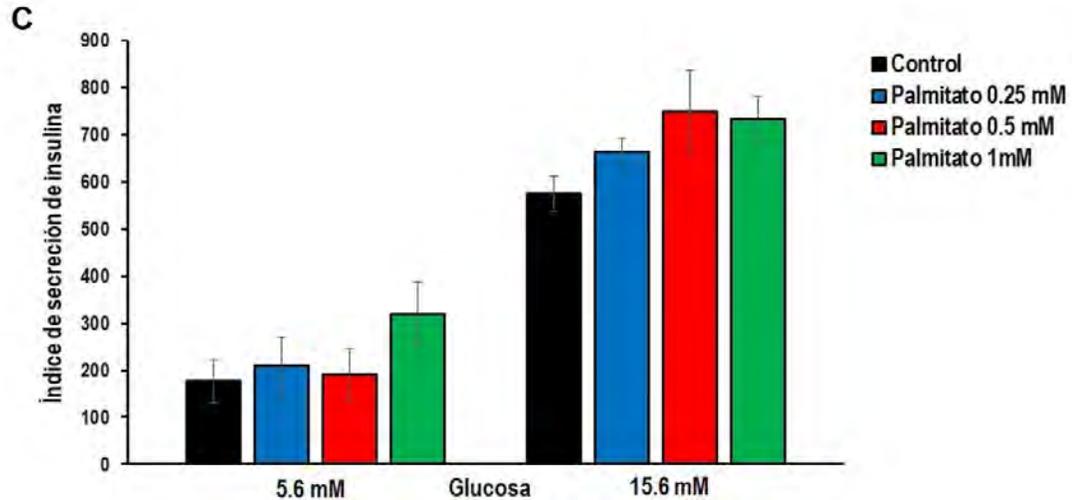
#### ***D. Efecto dual del palmitato sobre la secreción de insulina basal y estimulada por glucosa en células beta adultas***

##### **Efecto agudo (5 min) del palmitato sobre la secreción de insulina**

Estudios previos han mostrado los efectos de algunos AGL sobre la secreción de insulina en cultivos primarios y líneas de insulinoma (Ver Introducción). Estos antecedentes, unido a los efectos del palmitato sobre las corrientes de calcio y la importancia de estos canales en la secreción de insulina encontrados en nuestro estudio, sugieren posibles efectos de este ácido graso sobre la secreción de insulina en células beta adultas de rata. Para comprobarlo, decidimos evaluar los efectos de diferentes concentraciones de palmitato a distintos tiempos de preincubación, sobre la secreción de insulina basal y estimulada por glucosa mediante el RHPA.

La preincubación de las células durante 5 minutos con 0.25, 05 y 1 mM de palmitato no afectó el porcentaje de células secretoras de insulina (Figura 6.10A). Únicamente la concentración más alta del ácido graso (1 mM) aumentó el área de inmunoplasmas y sólo fue en la condición de glucosa basal (Figura 6.10B). El palmitato no tuvo efectos agudos sobre el índice de secreción global de insulina en ninguna de las dos condiciones basal ni estimulada por glucosa (Figura 6.10C).

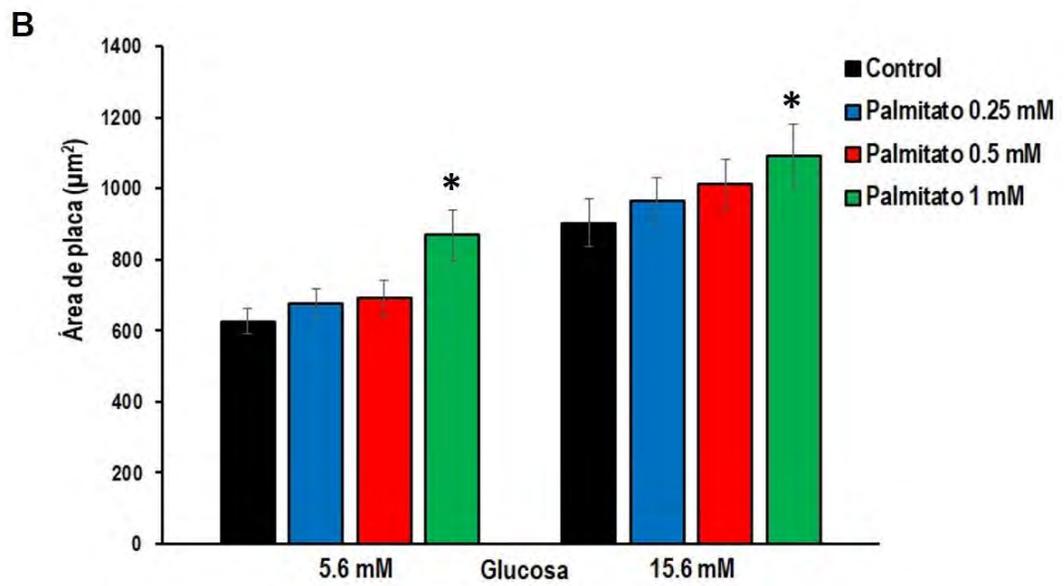
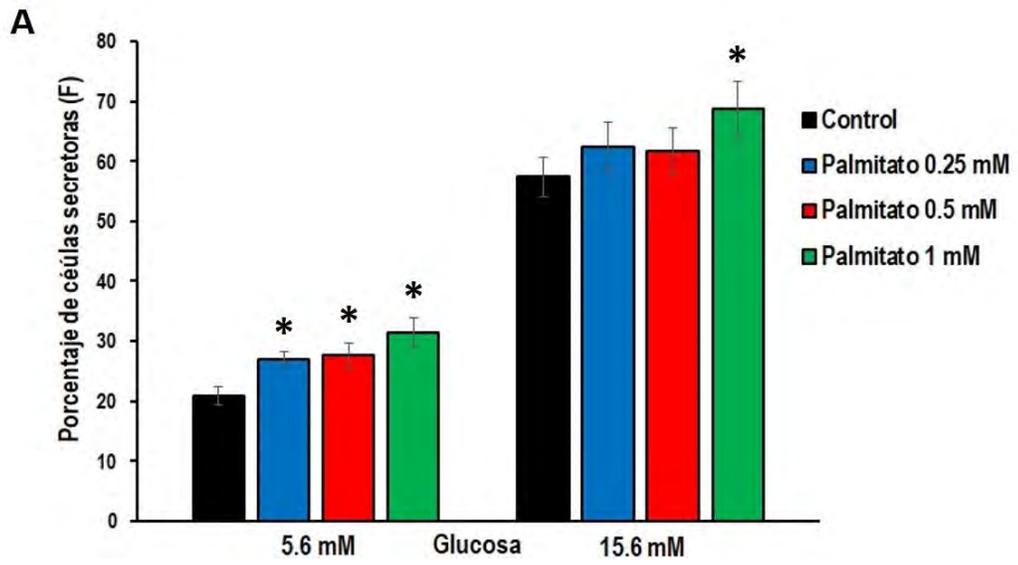


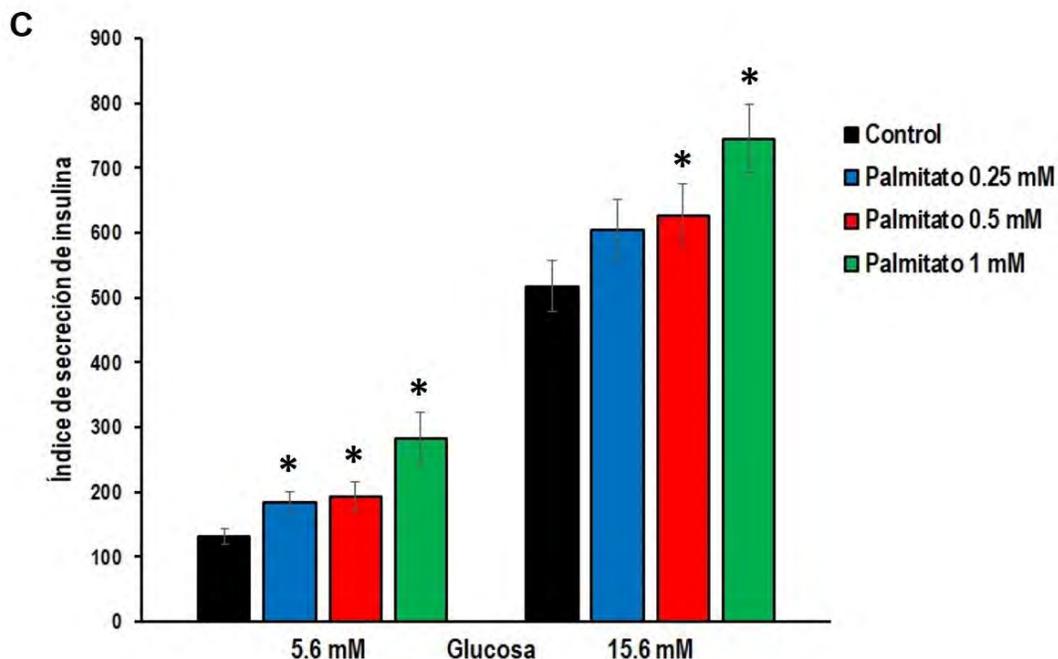


**Figura 6.10. Efecto agudo (5 min) del palmitato sobre la secreción de insulina basal y estimulada por glucosa en células beta adultas.** Porcentaje de células secretoras de insulina (A), área de inmunoplasmas (B) e índice de secreción de insulina global (C) de las células beta adultas incubadas con 0.25, 0.5 y 1 mM de palmitato durante 5 minutos y expuestas a condiciones de glucosa basal (5.6 mM) y estimulantes (15.6 mM). Las barras representan la media  $\pm$  EEM de cuatro experimentos independientes cada uno por duplicado. \*  $p \leq 0.05$  denota diferencias significativas con respecto a las células controles (sin palmitato) a 5.6 mM de glucosa. Prueba de Dunnet (ANOVA).

### Efecto de la preincubación durante 1 h con palmitato sobre la secreción de insulina

Las tres concentraciones de palmitato aumentaron el porcentaje de células secretoras de insulina en 5.6 mM de glucosa, luego de una hora de preincubación con el ácido graso. Sin embargo, sólo 1 mM de palmitato aumentó este porcentaje en la condición estimulada por glucosa (Figura 6.11A). La concentración mayor del AGL aumentó el área de inmunoplasmas tanto en 5.6 como en 15.6 mM de glucosa (Figura 6.11B). El análisis de la secreción global de insulina mostró que las tres concentraciones de palmitato aumentaron el índice de secreción en la condición de glucosa no estimulante, mientras que 0.5 y 1 mM del ácido graso aumentaron el índice de secreción global en 15.6 mM de glucosa (Figura 6.11C).





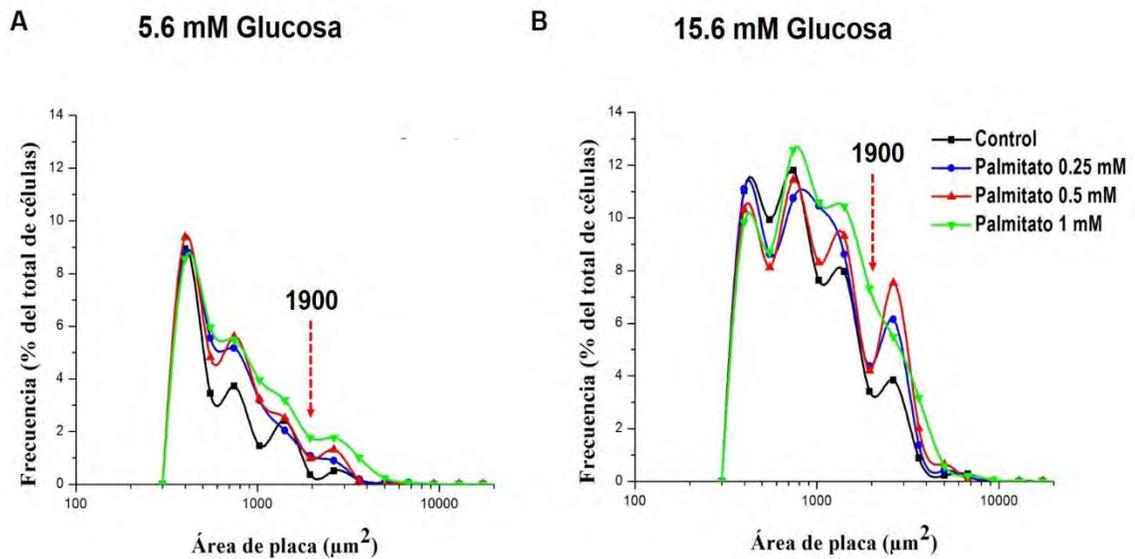
**Figura 6.11. Efecto de la preincubación durante 1 h con palmitato sobre la secreción de insulina basal y estimulada por glucosa en células beta adultas.** Porcentaje de células secretoras de insulina (A), área de inmunoplasmas (B) e índice de secreción de insulina global (C) de las células beta adultas incubadas con 0.25, 0.5 y 1 mM de palmitato durante una hora y expuestas a condiciones de glucosa basal (5.6 mM) y estimulantes (15.6 mM). Las barras representan la media  $\pm$  EEM de cuatro experimentos independientes cada uno por duplicado. \*  $p \leq 0.05$  denota diferencias significativas con respecto a las células controles (sin palmitato) a 5.6 mM y 15.6 mM de glucosa. Prueba de Dunnet (ANOVA).

### **Efecto de la preincubación durante 1 h con palmitato sobre las subpoblaciones funcionales de células beta adultas**

Como ya hemos mencionado, en el páncreas todas las células beta no secretan insulina en la misma proporción y las subpoblaciones funcionales de células beta individuales evidencian la heterogeneidad de este tipo celular.

La Figura 6.12 muestra la distribución de frecuencia relativa de las áreas de inmunoplasmas de las células beta preincubadas con palmitato durante una hora en 5.6 mM y 15.6 mM de glucosa. Como se puede apreciar, la exposición durante 1 h de las células beta a las distintas concentraciones de palmitato, aumentó tanto las

subpoblaciones funcionales de células beta pancreáticas SP como las LP en las condiciones basal y estimulada por glucosa, aunque el efecto fue más marcado sobre las LP en 15.6 mM de glucosa (Figuras 6.12A y B).



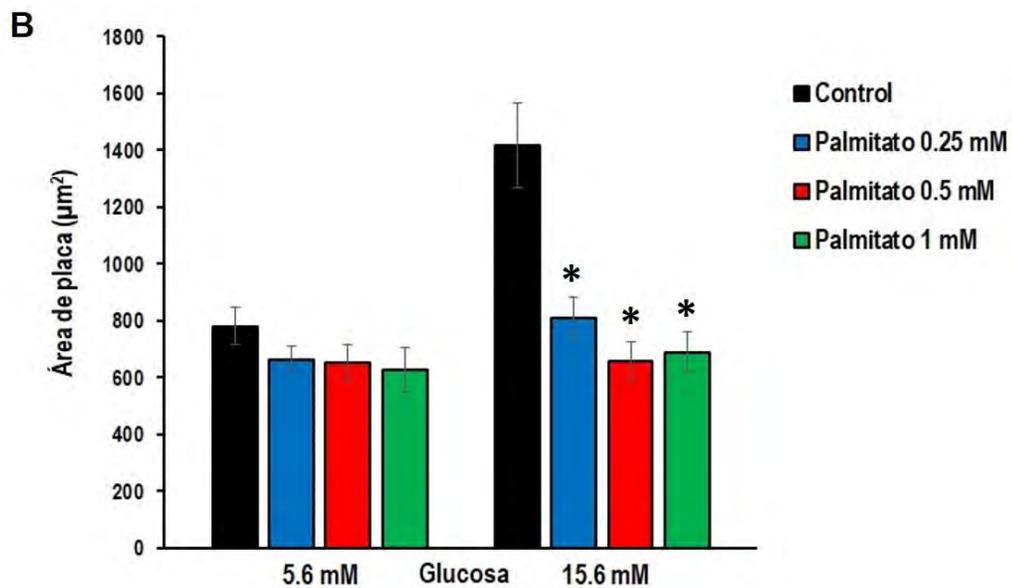
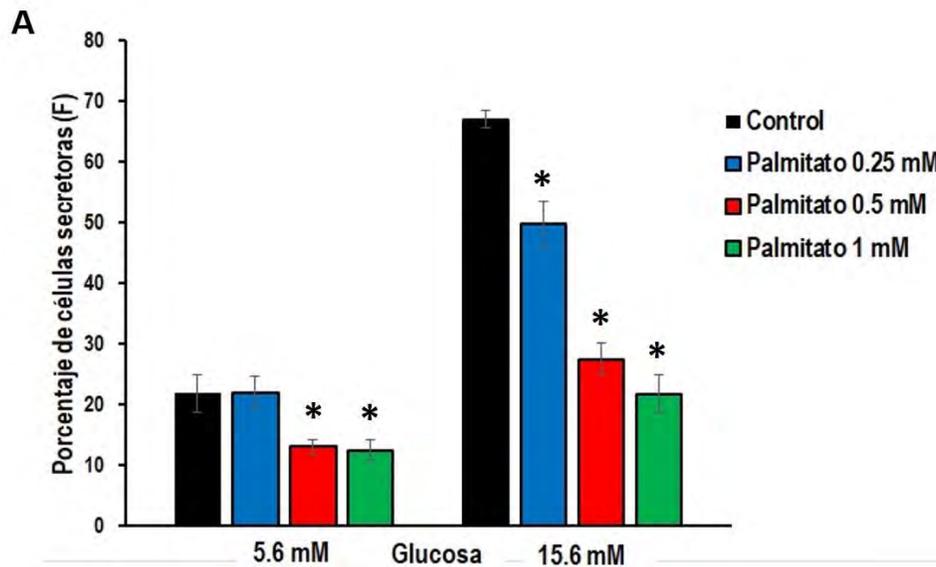
**Figura 6.12. Efecto de de la preincubación durante 1 h con palmitato sobre las subpoblaciones funcionales de células beta adultas.** Distribución de frecuencia de las subpoblaciones funcionales de células beta pancreáticas formadoras de placas pequeñas (SP) y de placas grandes (LP) incubadas con 0.25, 0.5 y 1 mM de palmitato, expuestas a 5.6 mM de glucosa (A) y 15.6 mM de glucosa (B). La línea discontinua en rojo representa la división entre las células SP y LP.

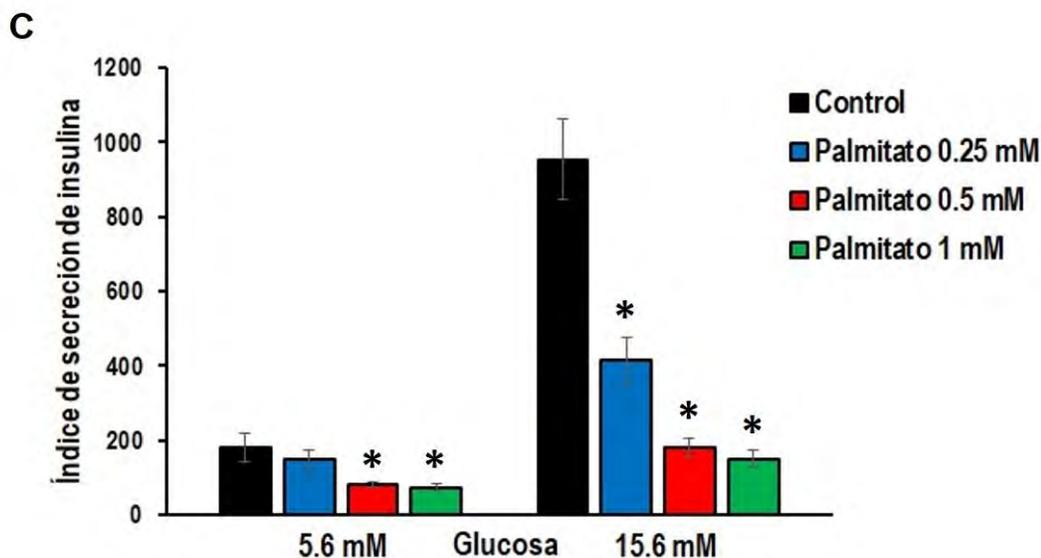
### Efecto crónico (24 h) del palmitato sobre la secreción de insulina

La Figura 6.13 muestra los efectos crónicos de la preincubación de las células beta con palmitato durante 24 h. Tanto en la condición basal como en la estimulada por glucosa, el palmitato disminuyó el porcentaje de células secretoras de insulina, siendo el efecto en 15.6 mM de glucosa dependiente de la concentración del ácido graso (Figura 6.13A). Todas las concentraciones evaluadas redujeron casi un 50 % el área de inmunoplasmas en la condición de glucosa estimulante. Sin embargo, el

AGL no tuvo efecto sobre la cantidad de insulina secretada en la condición de glucosa basal (Figura 6.13B).

Los efectos crónicos del palmitato incluyeron además una reducción significativa en el índice de secreción global tanto en 5.6 como en 15.6 mM de glucosa. La disminución en la secreción global estimulada por glucosa fue severa con 0.5 y 1 mM de palmitato (Figura 6.13C).

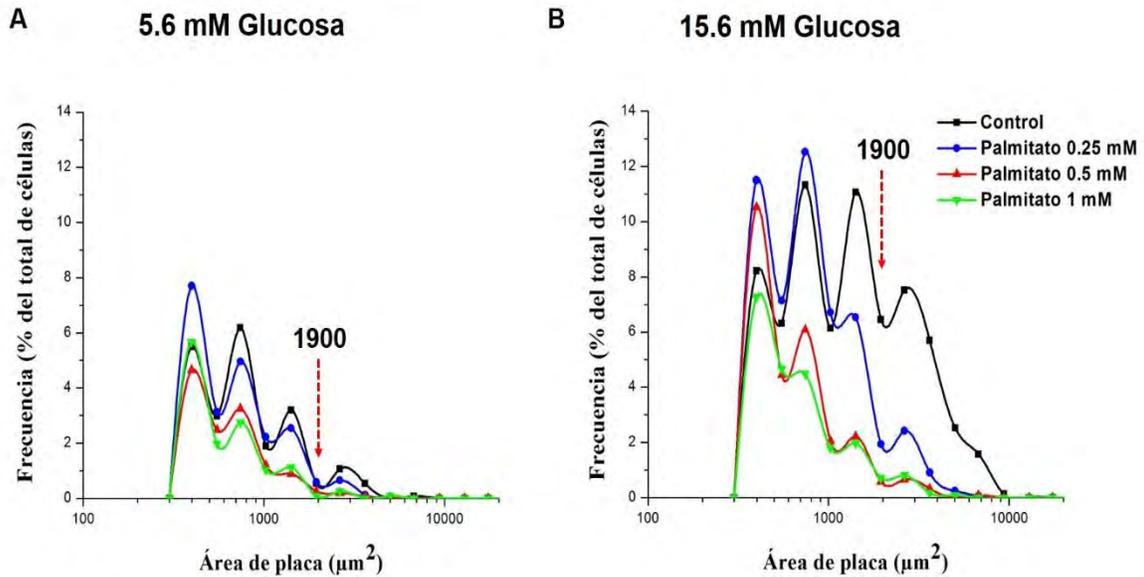




**Figura 6.13. Efecto crónico (24 h) del palmitato sobre la secreción de insulina basal y estimulada por glucosa en células beta adultas.** Porcentaje de células secretoras de insulina (A), área de inmunoplasmas (B) e índice de secreción de insulina global (C) de las células beta adultas incubadas con 0.25, 0.5 y 1 mM de palmitato durante 24 horas y expuestas a condiciones de glucosa basal (5.6 mM) y estimulantes (15.6 mM). Las barras representan la media  $\pm$  EEM de cuatro experimentos independientes cada uno por duplicado. \*  $p \leq 0.05$  denota diferencias significativas con respecto a las células controles (sin palmitato) a 5.6 mM y 15.6 mM de glucosa. Prueba de Dunnet (ANOVA).

### **Efecto crónico (24 h) del palmitato sobre las subpoblaciones funcionales de células beta adultas**

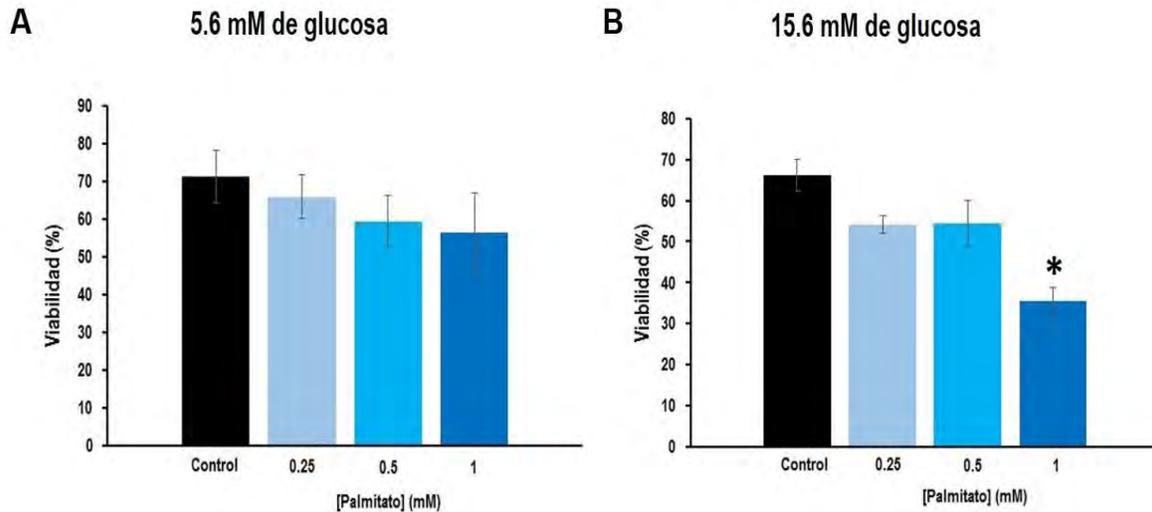
La distribución de las subpoblaciones funcionales también se determinó en las células beta que fueron expuestas a palmitato durante 24 h. El efecto del palmitato crónico sobre las subpoblaciones funcionales de células beta fue opuesto al observado posterior a una hora de exposición al AGL. Todas las concentraciones de palmitato disminuyeron tanto las subpoblaciones de células SP como las LP, efecto en la condición estimula que fue drástico sobre las principales células que contribuyen a la secreción (LP) en ambas condiciones de glucosa (Figuras 6.14A y B).



**Figura 6.14. Efecto crónico (24 h) del palmitato sobre las subpoblaciones funcionales de células beta adultas.** Distribución de frecuencia de las subpoblaciones funcionales de células beta pancreáticas formadoras de placas pequeñas (SP) y de placas grandes (LP) incubadas con 0.25, 0.5 y 1 mM de palmitato, expuestas a 5.6 mM de glucosa (A) y 15.6 mM de glucosa (B). La línea discontinua en rojo representa la división entre las células SP y LP.

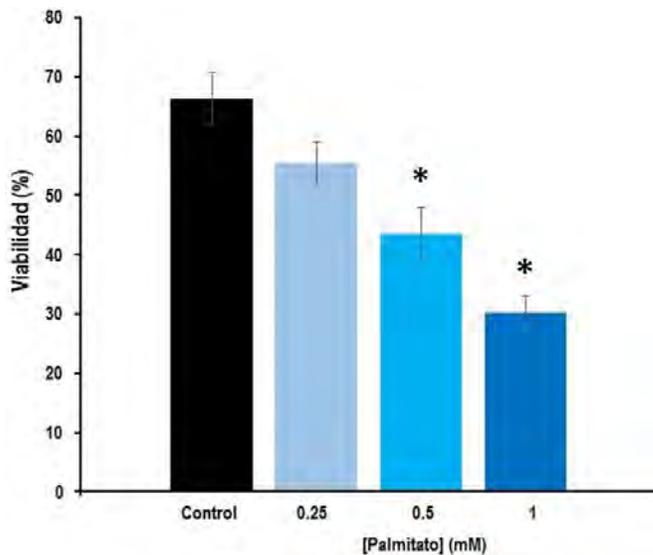
### Evaluación de la viabilidad celular luego de la exposición a palmitato

La viabilidad celular fue evaluada luego de la exposición de las células beta a palmitato durante 1 y 24 horas. Los porcentajes de viabilidad de las células beta expuestas al ácido graso durante 1 hora en las condiciones de glucosa basal y estimulada se muestran en las Figuras 6.15A y B respectivamente. El porcentaje de viabilidad no fue afectado en 5.6 mM de glucosa. Sin embargo, la concentración mayor de palmitato (1 mM) disminuyó la viabilidad celular en 15.6 mM de glucosa.



**Figura 6.15. Viabilidad de células beta expuestas a 0.25, 0.5 y 1 mM de palmitato durante 1 hora.** Porcentaje de viabilidad celular luego de la preincubación durante 1 hora con 0.25, 0.5 y 1mM de palmitato en 5.6 mM (A) y en 15.6 mM (B) de glucosa. Los datos representan la media  $\pm$  EEM de 3 experimentos independientes cada uno por duplicado. \*  $p \leq 0.05$  denota diferencias significativas con respecto al control en su misma condición, (ANOVA, prueba de Dunnett).

El palmitato (0.5 y 1 mM) causó una disminución de la viabilidad celular dependiente de la concentración durante la exposición crónica por 24 horas (Figura 6.16). Varios estudios han sugerido que a estas concentraciones del ácido graso y a tiempos similares de exposición aumentan la apoptosis. Es por ello que estudios posteriores relacionados con este mecanismo de muerte pudieran explicar nuestros resultados de viabilidad.



**Figura 6.16. Viabilidad de células beta expuestas a 0.25, 0.5 y 1 mM de palmitato durante 24 h.** Porcentaje de viabilidad celular luego de la preincubación durante 24 horas con 0.25, 0.5 y 1mM de palmitato. Los datos representan la media  $\pm$  EEM de 3 experimentos independientes cada uno por duplicado. \*  $p \leq 0.05$  denota diferencias significativas con respecto al control en su misma condición, (ANOVA, prueba de Dunnett).

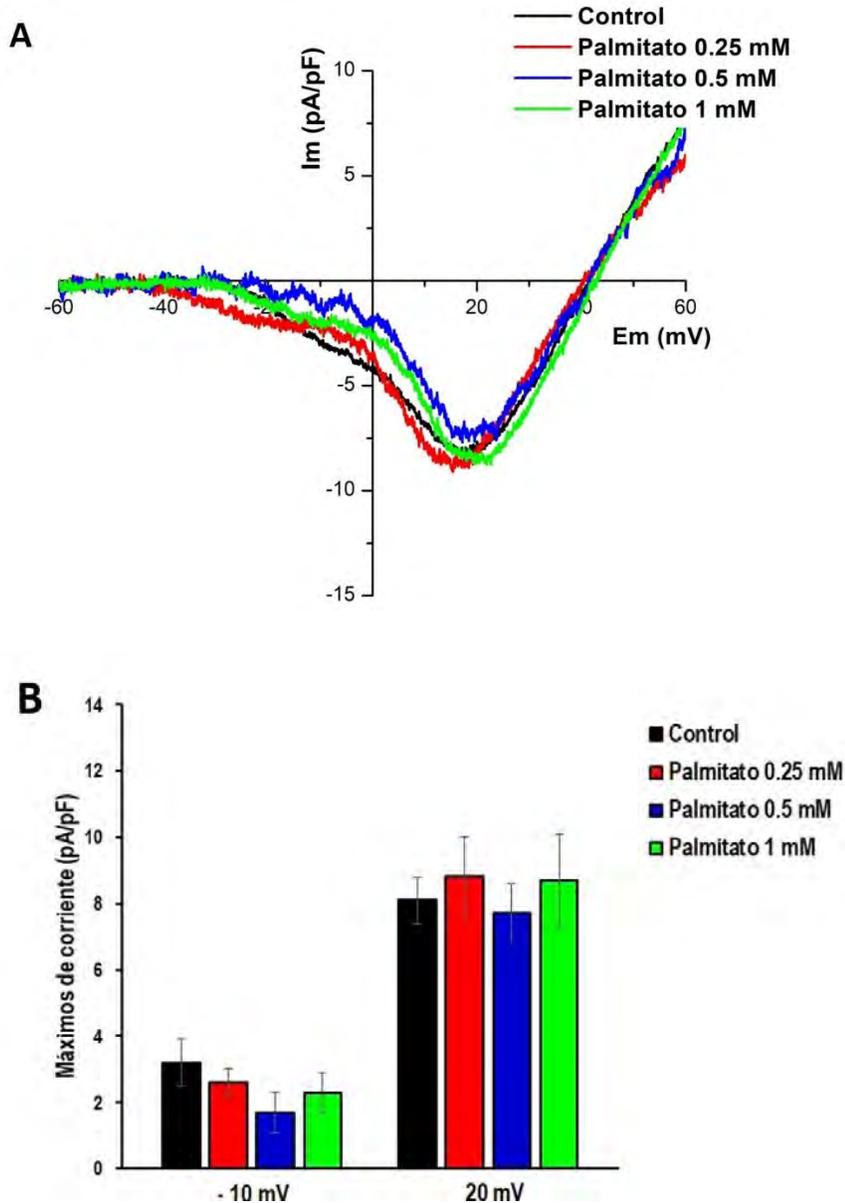
### ***E. Modulación de las corrientes de calcio LVA y HVA por palmitato en células beta adultas***

Los efectos observados del AGL sobre la secreción de insulina basal y estimulada por glucosa, unido a la importancia fisiológica de los canales de calcio en este proceso esencial de la célula beta, sugieren efectos del palmitato sobre las corrientes de calcio. Es por ello que decidimos evaluar los efectos agudos y crónicos del ácido graso sobre los canales LVA y HVA.

#### **Efectos agudos (5 min) del palmitato sobre las corrientes de calcio**

La Figura 6.17 muestra la relación I-V de las células beta expuestas a palmitato durante 5 minutos. Se puede apreciar que el ácido graso no tuvo efectos agudos sobre los canales LVA y HVA (Figura 6.17 A y B). Esto está en concordancia con

los resultados obtenidos en el RHPA ya que a este tiempo de exposición el palmitato no afectó el índice de secreción de insulina.



**Figura 6.17. Efectos agudos (5 min) del palmitato sobre las corrientes de calcio.** (A) Densidad de corriente de calcio ( $I_{Ca^{2+}}$ , pA/pF) y relación corriente-voltaje (I-V) de células controles (n = 7) y preincubadas con 0.25 mM (n=5), 0.5 mM (n= 4) y 1 mM (n= 3) de palmitato durante 5 minutos. Protocolo: rampa de voltaje de -80 a +60 mV, 500 ms de duración y pendiente de 0.5 mV/ms,  $E_m = -80$  mV. (B). Media de los máximos de corriente de calcio a -10 mV (corriente LVA) y +20 mV (corriente HVA) en células beta controles y preincubadas con palmitato.

La Tabla 6.4 muestra los valores de capacitancia y máximos de corriente, observándose que el tratamiento con palmitato no produjo variaciones significativas en los máximos de corriente de calcio a -10 mV y +20 mV, correspondientes a la corriente mediada por canales LVA y HVA respectivamente.

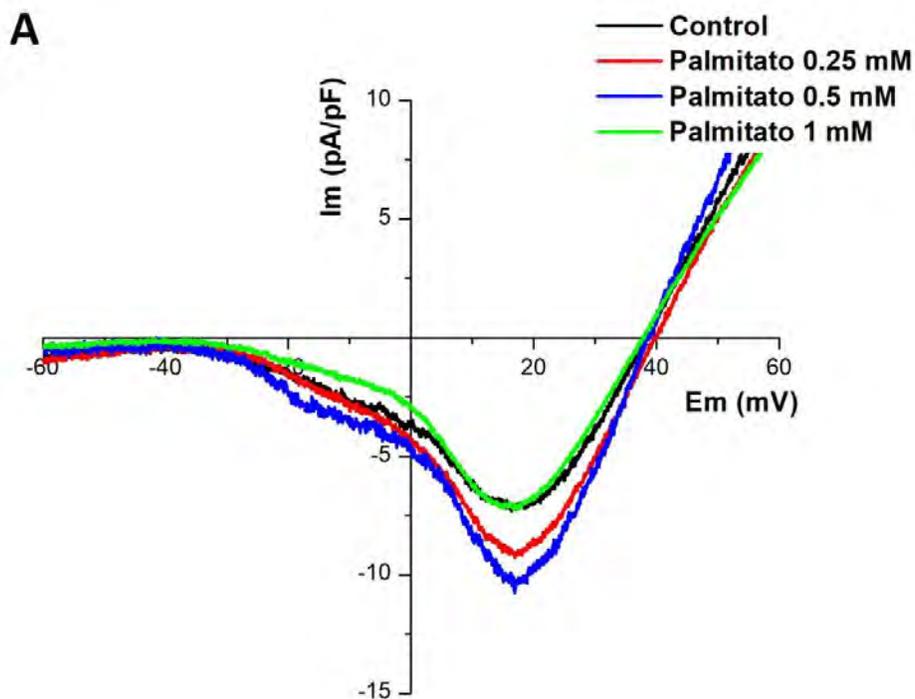
**Tabla 6.4. Valores de capacitancia y máximos de corriente a -10 mV y +20 mV correspondientes a las corrientes LVA y HVA respectivamente, en células beta adultas controles y preincubadas con palmitato (0.25, 0.5 y 1 mM) durante 5 minutos.**

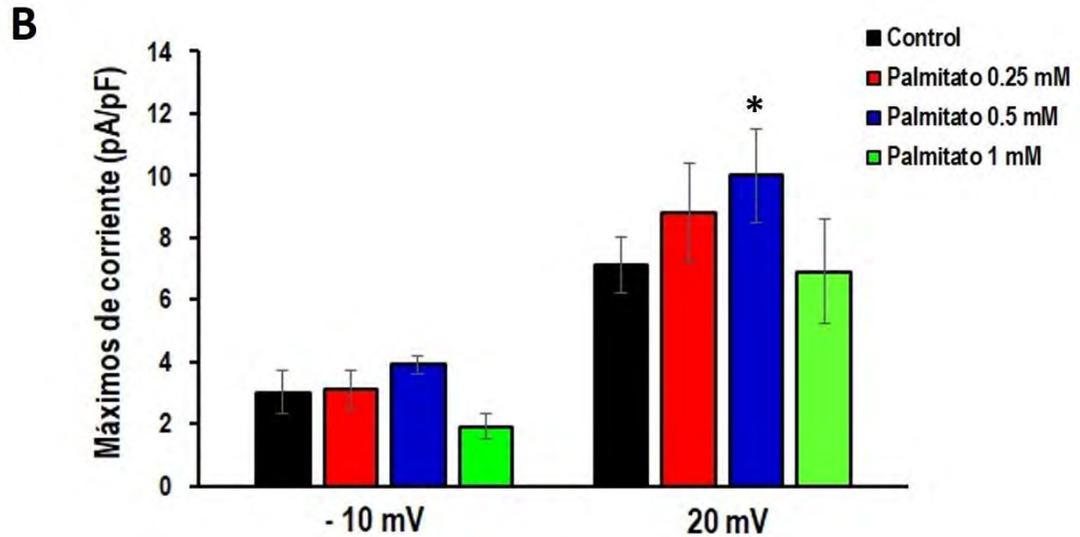
Los datos son expresados como la media de la densidad de la corriente  $\pm$  EEM, n denota el número de células registradas.

Grupos	N	Capacitancia (pF)	Máximos de corriente (pA/pF)	
			-10 mV	20 mV
Control	7	7.4 $\pm$ 0.5	-3.2 $\pm$ 0.7	-8.1 $\pm$ 0.7
Palmitato 0.25 mM	5	7.0 $\pm$ 1.1	-2.6 $\pm$ 0.4	-8.8 $\pm$ 1.2
Palmitato 0.5 mM	4	7.2 $\pm$ 1.4	-1.7 $\pm$ 0.6	-7.7 $\pm$ 0.9
Palmitato 1 mM	3	8.4 $\pm$ 2.2	-2.3 $\pm$ 0.6	-8.7 $\pm$ 1.4

## Efectos de la preincubación durante 1 h con palmitato sobre las corrientes de calcio

La preincubación durante 1 h con el ácido graso a 0.5 mM aumentó la densidad de corriente mediada por canales HVA. Sin embargo, no se observaron efectos del palmitato sobre los canales LVA (Figura 6.18A y B). El hecho de que no veamos un aumento en la corriente de alto umbral a 1 mM puede deberse a la disminución en la viabilidad celular que se observó a esta concentración del ácido graso y a este tiempo de incubación.





**Figura 6.18. Efectos de la preincubación durante 1 h con palmitato sobre las corrientes de calcio.** (A) Densidad de corriente de calcio ( $I_{Ca^{2+}}$ , pA/pF) y relación corriente-voltaje (I-V) de células controles (n = 8) y preincubadas con 0.25 mM (n=10), 0.5 mM (n= 5) y 1 mM (n= 11) de palmitato durante una hora. Protocolo: rampa de voltaje de -80 a +60 mV, 500 ms de duración y pendiente de 0.5 mV/ms,  $E_m = -80$  mV. (B). Media de los máximos de corriente de calcio a -10 mV (corriente LVA) y +20 mV (corriente HVA) en células beta controles y preincubadas con palmitato. \*  $p \leq 0.05$  denota diferencias significativas con respecto a las células controles, prueba de Tukey (ANOVA).

La Tabla 6.5 muestra los valores de capacitancia y máximos de corriente, observándose que el tratamiento con 0.5 mM de palmitato durante una hora aumentó significativamente el máximo de corriente mediada por canales HVA.

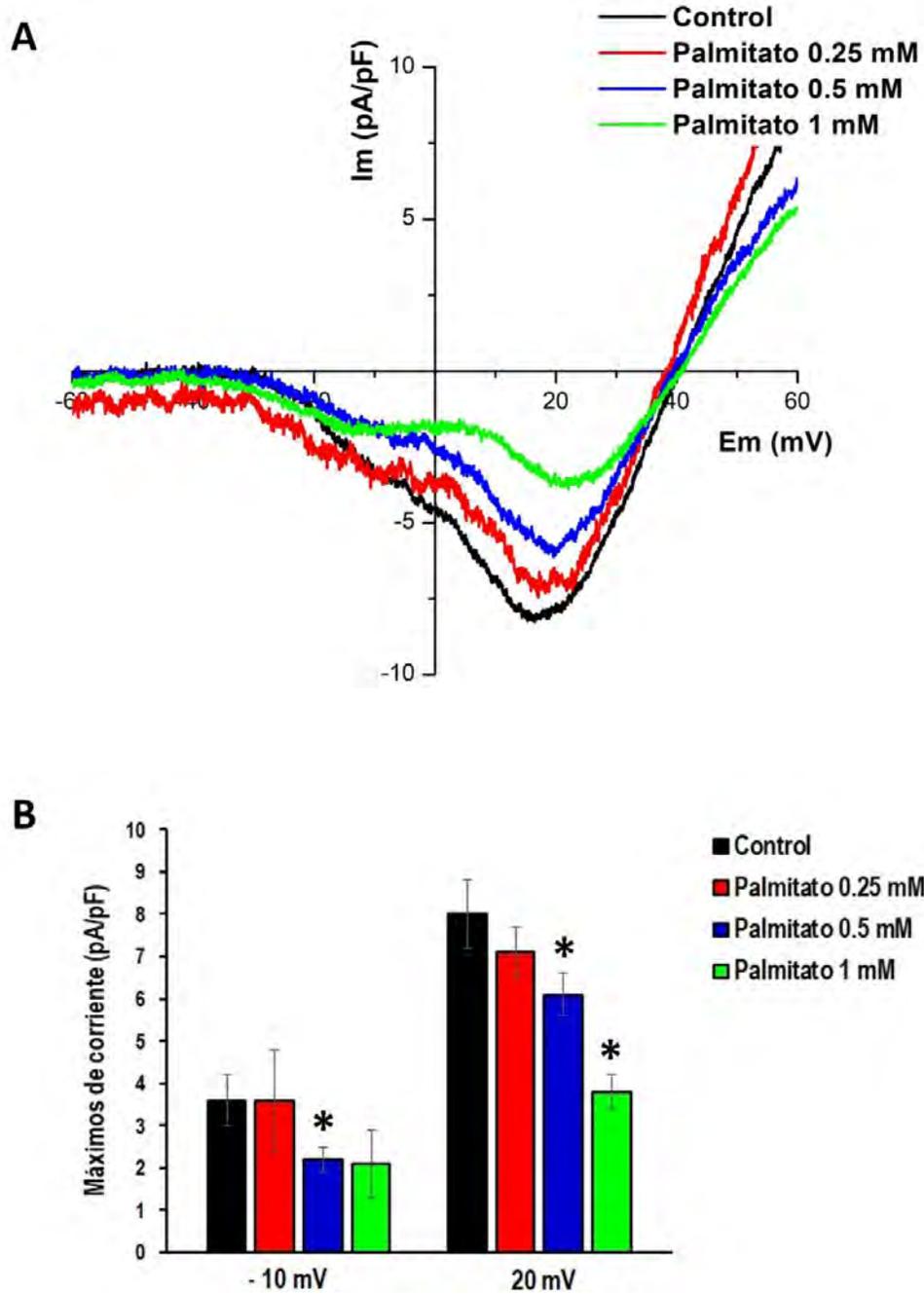
**Tabla 6.5. Valores de capacitancia y máximos de corriente a -10 mV y +20 mV correspondientes a las corrientes LVA y HVA respectivamente, en células beta controles y preincubadas con palmitato (0.25, 0.5 y 1 mM) durante una hora.**

Los datos son expresados como la media de la densidad de la corriente  $\pm$  EEM, n denota el número de células registradas. \*  $p \leq 0.05$  denota diferencias significativas con respecto a las células controles, prueba de Tukey (ANOVA).

Grupos	N	Capacitancia (pF)	Máximos de corriente (pA/pF)	
			-10 mV	20 mV
Control	8	9.0 $\pm$ 1.3	-3 $\pm$ 0.7	-7.1 $\pm$ 0.9
Palmitato 0.25 mM	10	7.7 $\pm$ 0.6	-3.1 $\pm$ 0.6	-8.8 $\pm$ 1.6
Palmitato 0.5 mM	5	8.5 $\pm$ 0.7	-3.9 $\pm$ 0.3	-10 $\pm$ 1.5 *
Palmitato 1 mM	11	9.4 $\pm$ 0.5	-1.9 $\pm$ 0.4	-6.9 $\pm$ 1.7

### **Efectos crónicos (24 h) del palmitato sobre las corrientes de calcio**

La Figura 6.19 muestra la relación I-V y los máximos de corriente de las células beta expuestas a palmitato durante 24 h. A este tiempo de exposición 0.5 mM de palmitato disminuyó las densidades de corrientes LVA y HVA. La disminución en la densidad de corriente mediada por los canales de alto umbral a 1 mM puede deberse a la pérdida de viabilidad celular que se observó a este tiempo de incubación (Figura 6.19A y B).



**Figura 6.19. Efectos crónicos (24 h) del palmitato sobre las corrientes de calcio.** (A) Densidad de corriente de calcio ( $I_{Ca^{2+}}$ , pA/pF) y relación corriente-voltaje (I-V) de células controles ( $n = 9$ ) y preincubadas con 0.25 mM ( $n=5$ ), 0.5 mM ( $n= 8$ ) y 1 mM ( $n= 5$ ) de palmitato durante 24 horas. Protocolo: rampa de voltaje de -80 a +60 mV, 500 ms de duración y pendiente de 0.5 mV/ms,  $E_m = -80$  mV. (B). Media de los máximos de corriente de calcio a -10 mV (corriente LVA) y +20 mV (corriente HVA) en células beta controles y preincubadas con palmitato. \*  $p \leq 0.05$  denota diferencias significativas con respecto a las células controles, prueba de Tukey (ANOVA).

Los máximos de corriente LVA y HVA disminuyeron tras la exposición a palmitato 0.5 mM. Curiosamente se observó un aumento en la capacitancia celular a 0.5 y 1 mM de palmitato (Tabla 6.6).

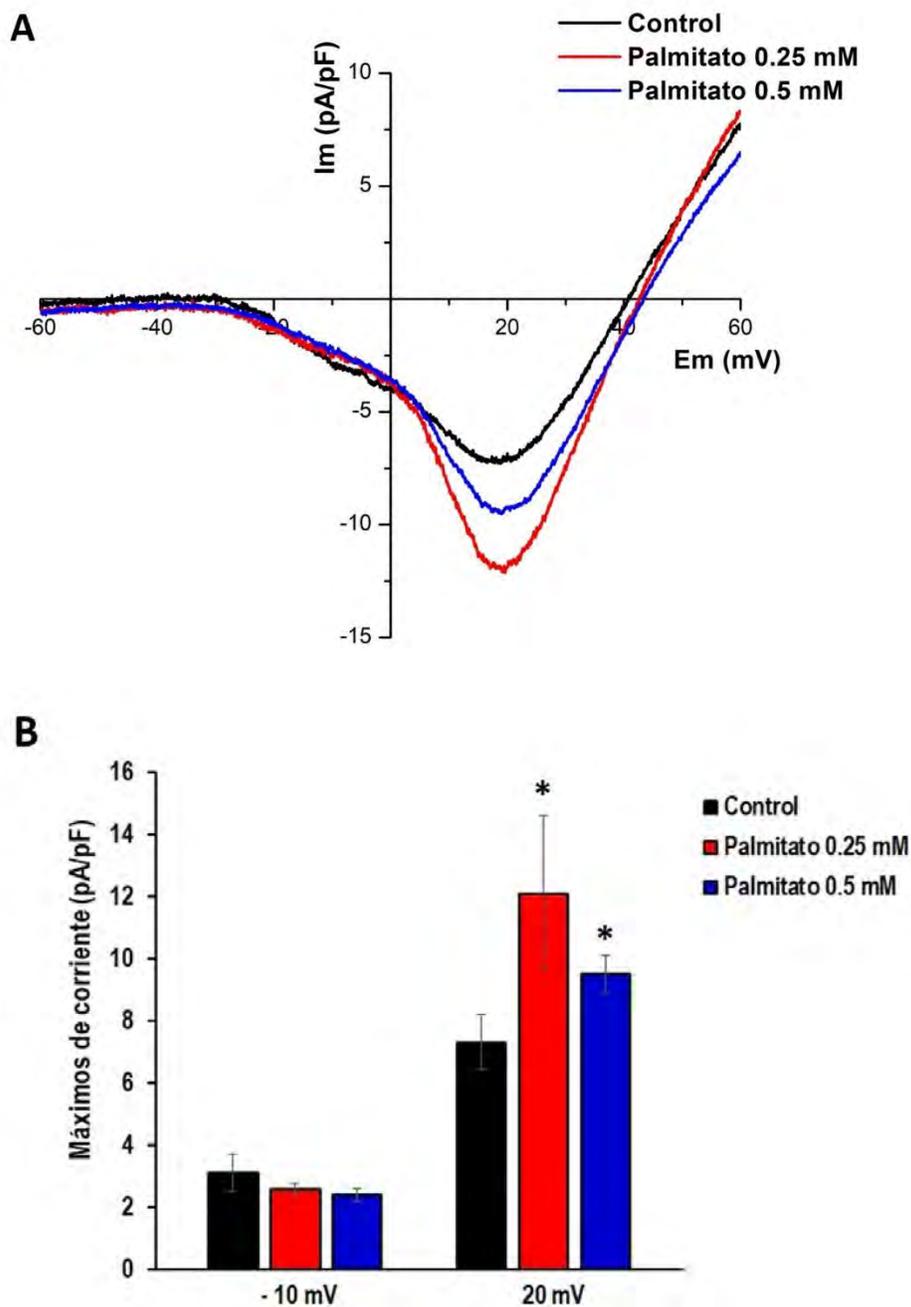
**Tabla 6.6. Valores de capacitancia y máximos de corriente a -10 mV y +20 mV correspondientes a las corrientes LVA y HVA respectivamente, en células beta controles y preincubadas con palmitato (0.25, 0.5 y 1 mM) durante 24 horas.**

Los datos son expresados como la media de la densidad de la corriente  $\pm$  EEM, n denota el número de células registradas. \*  $p \leq 0.05$  denota diferencias significativas con respecto a las células controles, prueba de Tukey (ANOVA)

Grupos	N	Capacitancia (pF)	Máximos de corriente (pA/pF)	
			-10 mV	20 mV
Control	9	7.4 $\pm$ 0.5	-3.6 $\pm$ 0.6	-8.0 $\pm$ 0.8
Palmitato 0.25 mM	5	8.7 $\pm$ 0.7	-3.6 $\pm$ 1.2	-7.1 $\pm$ 0.6
Palmitato 0.5 mM	8	9.0 $\pm$ 0.5 *	-2.2 $\pm$ 0.3 *	-6.1 $\pm$ 0.5 *
Palmitato 1 mM	5	9.4 $\pm$ 0.5 *	-2.1 $\pm$ 0.8	3.8 $\pm$ 0.4 *

### **Efectos crónicos (48-72 h) del palmitato sobre las corrientes de calcio**

La preincubación crónica durante 48-72 h con palmitato aumentó la densidad de corriente de alto umbral. Sin embargo, no se observaron efectos del ácido graso sobre los canales tipo T (Figuras 6.20A y B).



**Figura 6.20. Efectos crónicos (48-72 h) del palmitato sobre las corrientes de calcio.** (A) Densidad de corriente de calcio ( $I_{Ca^{2+}}$ , pA/pF) y relación corriente-voltaje (I-V) de células controles ( $n = 11$ ) y preincubadas con 0.25 mM ( $n=6$ ) y 0.5 mM ( $n= 12$ ) de palmitato durante 48-72 horas. Protocolo: rampa de voltaje de -80 a +60 mV, 500 ms de duración y pendiente de 0.5 mV/ms,  $E_m = -80$  mV. (B). Media de los máximos de corriente de calcio a -10 mV (corriente LVA) y +20 mV (corriente HVA) en células beta controles y preincubadas con palmitato. \*  $p \leq 0.05$  denota diferencias significativas con respecto a las células controles, prueba de Tukey (ANOVA).

El palmitato, a las dos concentraciones evaluadas, aumentó el máximo de corriente HVA sin afectar la corriente tipo T. Las células preincubadas con el AGL aumentaron significativamente su capacitancia (Tabla 6.7).

**Tabla 6.7. Valores de capacitancia y máximos de corriente a -10 mV y +20 mV correspondientes a las corrientes LVA y HVA respectivamente, en células beta controles y preincubadas con palmitato (0.25 y 0.5 mM) durante 48-72 horas.**

Los datos son expresados como la media de la densidad de la corriente  $\pm$  EEM, n denota el número de células registradas. \*  $p \leq 0.05$  denota diferencias significativas con respecto a las células controles, prueba de Tukey (ANOVA).

Grupos	N	Capacitancia (pF)	Máximos de corriente (pA/pF)	
			-10 mV	20 mV
Control	11	7.9 $\pm$ 0.6	-3.1 $\pm$ 0.6	-7.3 $\pm$ 0.9
Palmitato 0.25 mM	6	11.5 $\pm$ 2.1 *	-2.6 $\pm$ 0.2	-12.1 $\pm$ 2.5 *
Palmitato 0.5 mM	12	11.5 $\pm$ 1.3 *	-2.4 $\pm$ 0.2	-9.5 $\pm$ 0.6 *

## 7. DISCUSIÓN

La célula beta pancreática adquiere la madurez funcional durante el primer mes de vida, lo que le permite secretar las cantidades necesarias de insulina en respuesta al aumento en la concentración de glucosa extracelular. En este trabajo analizamos las propiedades biofísicas y el patrón de expresión diferenciales de los canales de calcio LVA y HVA durante el desarrollo posnatal de la célula beta pancreática de rata, así como la caracterización funcional de estos canales en la etapa adulta: su papel en la secreción de insulina y su modulación por palmitato.

### **Caracterización electrofisiológica y expresión de los canales de calcio durante el desarrollo posnatal de la célula beta pancreática de rata y su papel en la secreción de insulina.**

Está bien establecido que los islotes fetales responden pobremente a la secreción de insulina estimulada por glucosa. Un estudio en páncreas perfundidos de ratas de tres días antes del nacimiento, mostró la ausencia de una respuesta bifásica a 16.7 mM de glucosa (Hole et al., 1988). Estos autores atribuyeron esta inmadurez a la falla en el acoplamiento entre el metabolismo de los nutrientes y el canal  $K_{ATP}$ , lo que previene la despolarización de la membrana de las células beta fetales. Otro estudio también mostró la existencia de alteraciones en el metabolismo de la glucosa en células beta fetales de 21 días (Rorsman et al., 1989). La inmadurez fisiológica en este caso fue atribuida a alteraciones en la regulación del canal  $K_{ATP}$  producto de una deficiente función mitocondrial, lo que conduce a una despolarización defectuosa, a que no aumente el calcio intracelular y por tanto no se secrete insulina de forma adecuada. Sin embargo, resulta interesante que otros secretagogos distintos a la glucosa, por ejemplo: leucina, arginina y teofilina, promueven la secreción de insulina, lo que sugiere que al menos una parte de la maquinaria secretora sí está desarrollada en esta etapa (Ammon et al., 1989). Se ha planteado que estas diferencias en los efectos de distintos secretagogos se

deben a que existe una maduración dependiente del tiempo en esta etapa fetal (Weinhaus et al., 2003).

Mientras que, durante la etapa fetal la madre es la responsable de la homeostasia de la glucosa, el nacimiento es considerado una ventana de desarrollo crítica debido a que la nutrición de los organismos se vuelve completamente dependiente de la disponibilidad de alimentos. Las células beta neonatales, al igual que las fetales, son consideradas inmaduras, secretan poca insulina y son incapaces de detectar los cambios en la concentración extracelular de glucosa. Sin embargo, las células beta adultas se consideran maduras porque pueden detectar cambios en la concentración extracelular de glucosa (Navarro-Tableros et al., 2007b). En esta etapa adulta, la secreción de insulina es bifásica, con una primera fase transitoria rápida y una segunda fase de secreción sostenida (Vignali et al., 2006). La necesidad de mantener la glucemia podría ser una fuerza motriz para que las células beta maduren y secreten insulina en respuesta a la concentración de glucosa. Creemos que el cambio en la alimentación animal puede conducir a modificaciones en la maquinaria de respuesta de las células beta, dentro de las que se incluyen los cambios en la actividad de los canales iónicos. Es importante destacar que este cambio en la dieta de las crías es paulatino y no de un día para otro, pues desde el día posnatal 11, además de la leche materna también comienzan a ingerir parte de los pellets de los que se alimentan sus madres.

Hasta donde sabemos, este es el primer trabajo que analiza las propiedades biofísicas y el patrón de expresión de los canales de calcio dependientes del voltaje, comparando tres etapas del desarrollo posnatal de las células beta pancreáticas de rata.

Es bien conocido que los VGCC son muy importantes para la secreción de insulina en las células beta. Entre ellos, es sabido que los HVA, individualmente los canales tipo L, son los principales responsables del aumento en la concentración de calcio intracelular y de la exocitosis de la insulina (Hiriart and Aguilar-Bryan, 2008). Sin embargo, las corrientes mediadas por canales LVA han sido muy poco estudiadas.

Nuestros resultados mostraron que el porcentaje de detección de la corriente de calcio tipo T aumentó con la maduración de las células beta, duplicándose desde las células neonatales hasta las adultas. Curiosamente, otros estudios relacionados con la expresión de canales tipo T durante el desarrollo en diferentes tipos celulares han mostrado un comportamiento inverso. Por ejemplo, los canales de calcio tipo T están expresados en los miocitos ventriculares fetales, pero desaparecen después del nacimiento (Wang et al., 2013). Estos autores observaron que el 35% de los cardiomiocitos expresaron canales funcionales tipo T al nacer, similares a nuestros resultados (42%), sin embargo, este porcentaje disminuye durante los primeros días posteriores al nacimiento y al final de la primera semana donde no hay canales T funcionales. Curiosamente, un estudio sugirió la ausencia de canales tipo T en células beta pancreáticas fetales humanas (Weinhaus et al., 2003).

Un comportamiento similar fue observado en algunas células neuronales y del músculo esquelético, en las que los canales tipo T presentan una elevada expresión en los períodos embrionario y perinatal y desaparecen durante la etapa adulta (Lory et al., 2006). Nuestros hallazgos también difieren a los publicados sobre otras células secretoras de hormonas como las células cromafines, en las cuales las corrientes de  $Ca^{2+}$  de bajo umbral pueden ser apenas detectadas en células adultas de especies de mamíferos, debido a que los canales LVA están ausentes o su expresión no es robusta en estas células (Marcantoni et al., 2008).

En el caso de las células beta se ha detectado la corriente de calcio tipo T en células de ratas adultas y en células beta humanas pero no en células beta de ratón. También los canales tipo T están presentes en las líneas de insulinoma INS-1 y RINm5F (Yang and Berggren, 2005). Nosotros registramos corrientes de calcio mediadas por canales HVA en todas las células y etapas de desarrollo de la célula beta estudiadas. Otros trabajos han indicado que incluso desde la etapa fetal, las células beta tienen canales HVA funcionales (Rorsman et al., 1989; Weinhaus et al., 1995, 2003).

También demostramos por inmunofluorescencia la presencia de las tres isoformas de los canales de calcio de tipo T en células beta neonatales, P20 y adultas de ratas.

Aunque muchos estudios no han reportado la presencia de la subunidad  $\alpha 1I$  (que codifica para el Cav 3.3) en algunos tipos celulares, otros trabajos también han expuesto la expresión de las tres isoformas de los canales LVA, por ejemplo, en células espermatozógenas humanas y de ratón (Treviño et al., 2004). Sin embargo, nosotros observamos que los patrones de expresión de estos canales difieren durante el desarrollo y entre las distintas isoformas a la misma edad.

Nuestros resultados muestran que la subunidad  $\alpha 1G$  (Cav 3.1) es la isoforma más expresada en todas las etapas del desarrollo y su expresión es menor en las células neonatales que en P20 y adultas. Un resultado similar fue observado entre las células beta neonatales y adultas para esta isoforma (Navarro-Tableros et al., 2007a). Los estudios en células neuroendocrinas, particularmente en las células cromafines también han mostrado que Cav 3.1 es la isoforma de los canales tipo T más expresada (revisada por Marcantoni et al., 2008). La isoforma Cav 3.1 ha sido detectada en células beta de ratas y en células INS-1 (Yang and Berggren, 2005).

Nuestros resultados mostraron además que, a diferencia de las otras isoformas, la expresión de Cav3.2 aumentó progresivamente de una etapa de maduración a la otra. Esto confirma y valida otro estudio de nuestro grupo, cuyo análisis mediante microarreglo reveló una mayor expresión en las células beta adultas en comparación con las células P20 de diferentes genes que codifican para canales iónicos, entre ellos el gen *Cacna 1h* que codifica para la subunidad  $\alpha 1H$  (Cav3.2) (Larqué et al., 2016). Las neuronas y los miocitos también exhiben un patrón variable de expresión de canales de calcio tipo L y N durante las diferentes etapas de desarrollo (Liu et al., 2000; Pravettoni et al., 2000; Vance et al., 1998).

La máxima expresión de Cav 3.1 y Cav 3.2 en células beta adultas podría estar relacionada con una mayor densidad de corriente de calcio tipo T en esta etapa en comparación con las etapas inmaduras. Nuestros datos mostraron que la densidad de corriente de calcio tipo T en células beta adultas es mayor que en células neonatales y P20. Estos resultados sugieren que el alto nivel de expresión de las isoformas de los canales de calcio tipo T, particularmente Cav 3.1 y Cav 3.2, puede contribuir a la mayor densidad de corriente que observamos en esta etapa del

desarrollo. Sin embargo, sería interesante realizar más estudios que permitan ratificar esta correlación, debido a que nuestros registros electrofisiológicos no nos permitieron discriminar entre isoformas y así poder analizar la contribución de cada una por separado.

De manera interesante, nuestros datos también muestran que la densidad de corriente de calcio HVA aumenta con la etapa de desarrollo de la célula beta. Hay que señalar, que los registros electrofisiológicos que nos permitieron estudiar ambas corrientes de calcio LVA y HVA se obtuvieron utilizando un protocolo de rampa y fue corroborado mediante un protocolo de pulsos despolarizantes cuadrados (Ver Materiales y Métodos), obteniéndose resultados muy similares con ambos protocolos. De forma similar, un estudio previo en nuestro grupo mostró que en las células neonatales, la densidad de corriente de bario es menor que en las células adultas (Navarro-Tableros et al., 2007a).

Estos resultados sobre el patrón de expresión diferencial de las isoformas de los canales de calcio y las densidades de corriente de calcio variables durante el desarrollo son muy interesantes porque podrían estar relacionados con la maduración funcional de las células beta pancreáticas de rata.

Un momento crucial en el desarrollo es la ablactación (alrededor del día 20 en la rata). Nuestro laboratorio fue el primero en proponer este período de destete como una ventana crítica en la maduración de las células beta. En P20, los animales presentan una resistencia a la insulina fisiológica, que podría deberse al cambio de una dieta rica en lípidos a otra alta en carbohidratos, lo que representa un desafío metabólico y a la vez juega un papel esencial en la GSIS (Aguayo-Mazzucato et al., 2006).

Teniendo en cuenta estas observaciones, nos interesamos en caracterizar las corrientes de calcio en esta etapa del desarrollo. Sorprendentemente, encontramos un comportamiento heterogéneo relacionado con las corrientes de calcio dentro de la población de células beta. Como discutimos anteriormente, la densidad media de la corriente de calcio HVA aumenta con la maduración de la célula beta. Sin embargo, observamos que aproximadamente el 45% de las células beta en P20

tienen densidades de corriente HVA muy superiores a la media de las células adultas. También encontramos que esta hiperactividad en los canales HVA es independiente de la presencia de la corriente de calcio tipo T.

Este estudio representa la primera descripción de las corrientes de calcio en células P20 de ratas. Es interesante resaltar la importancia de este período en el desarrollo pancreático. Nuestros hallazgos pueden contribuir a explicar el estado fisiológico de hiperglucemia e hiperinsulinemia detectado en este período de desarrollo en las ratas (Aguayo-Mazzucato et al., 2006). Sin embargo, se necesitan estudios adicionales que permitan explorar la asociación entre las corrientes de calcio exacerbadas y la hiperinsulinemia observada en esta etapa.

Nuestro estudio también demostró que el 53% de la corriente de calcio mediada por canales LVA y cerca del 60% de la corriente mediada por canales HVA son sensibles a TTA-A<sub>2</sub> y nifedipina respectivamente. Los resultados concuerdan con estudios previos en el laboratorio relacionados con el bloqueo de las corrientes de bario (Navarro-Tableros et al., 2007a; Rosenbaum et al., 2001). Con el fin de explorar la contribución de ambos tipos de canales a la secreción de insulina, decidimos evaluar los efectos de diferentes bloqueadores sobre la secreción de insulina mediante el RHPA.

Una ventaja del RHPA es que las células beta secretoras pueden identificarse inequívocamente. Estudios previos han demostrado que el RHPA es una técnica útil para identificar y estudiar la secreción de células beta pancreáticas individuales (Hiriart, M. and Matteson, 1988). Los resultados mostraron que los bloqueadores de los canales de calcio tipo T y L inhiben parcialmente la secreción de insulina tanto en condiciones basales como estimuladas por glucosa en células beta adultas. Esto corrobora la importancia funcional de los canales de calcio en el acoplamiento entre el estímulo y la secreción en las células beta pancreáticas de rata.

El RHPA mostró que sólo el mibefradil (36%) y el TTA-A<sub>2</sub> (61%) tienen efectos inhibitorios significativos sobre la secreción de insulina a 5.6 mM de glucosa, concentración cercana al umbral necesario para activar la actividad eléctrica (Meissner and Schmelz, 1974). Los resultados apoyan la hipótesis de que los

canales de calcio tipo T tienen un papel importante en la liberación de insulina en condiciones basales de glucosa. Otro estudio también demostró que la inhibición de los canales de calcio tipo T reduce la secreción de insulina en un 60-70% a 6 mM de glucosa en las células beta pancreáticas humanas (Braun et al., 2008). Otros autores han propuesto que los canales de  $Ca^{2+}$  tipo T pueden aumentar la frecuencia de las espigas espontáneas de calcio intracelular, lo que resulta en la liberación prematura de insulina en condiciones de glucosa no estimulantes (Li, 2015).

Los datos mostraron que todos los fármacos inhibieron claramente la secreción de insulina en condiciones estimulantes de glucosa. Entre ellos, la nifedipina (85%) redujo casi por completo el índice de secreción en 15.6 mM de glucosa, sin afectar la secreción basal de insulina. Estos resultados confirman la importancia funcional de los canales de calcio HVA en las células beta, el principal responsable de la exocitosis de la insulina. Los datos concuerdan con otros estudios de nuestro grupo donde previamente observaron que, en las células beta adultas, la nifedipina bloqueó casi totalmente la secreción de insulina estimulada por glucosa sin afectar la secreción basal (Rosenbaum et al., 2001). Otros estudios también han demostrado que el bloqueo de los canales de calcio tipo L inhibe la secreción de insulina estimulada por glucosa en células beta de rata (Navarro-Tableros et al., 2007b) y en células beta humanas (Braun et al., 2008; Davalli et al., 1996).

Los datos mostraron que el bloqueo de los canales de calcio tipo T también inhibe la secreción de insulina en 15.6 mM de glucosa. El efecto de estos fármacos sugiere que los canales LVA también son importantes para la secreción de insulina en condiciones estimulantes. Otro estudio del laboratorio mostró que el pimozida, bloqueador de los canales de calcio tipo T menos selectivo que el mibefradil, inhibió la secreción de insulina un 58% en 15.6 mM de glucosa (Navarro-Tableros et al., 2007b). Otros trabajos también han mostrado que el bloqueo con  $NiCl_2$  disminuye la secreción de insulina en las células INS-1 (Bhattacharjee et al., 1997).

Los bloqueadores de los canales de  $Ca^{2+}$  que empleamos en los estudios disminuyen el índice de secreción de insulina de dos maneras: 1) al disminuir el

porcentaje de células formadoras de placa (células secretoras de insulina), lo que sugiere que los bloqueadores evitan el reclutamiento de células previamente silenciosas a la actividad secretora (Hiriart and Ramirez-Medeles, 1991); y 2) al disminuir el área de inmunoplasmas, que es proporcional a la cantidad de hormona secretada por las células beta individuales.

Es bien conocido que la secreción de insulina por las células beta individuales es heterogénea y se ha demostrado que existen subpoblaciones funcionales de células beta de ratas adultas (Hiriart et al., 1997; Hiriart and Ramirez-Medeles, 1991; Van Schravendijk et al., 1992). Una subpoblación secreta más insulina (células LP) que la otra (células SP), pero las células LP tienen la mayor tasa de secreción y son responsables de casi el 75% de la secreción total (Hiriart and Ramirez-Medeles, 1991). En los estudios mostramos que la subpoblación de células beta más afectada por todos los bloqueadores de los canales de calcio fue la de las células LP, debido a que estas células disminuyeron tanto en la condición basal como en la estimulada por glucosa. Curiosamente, los efectos del TTA-A<sub>2</sub> y la nifedipina fueron los más evidentes a 5.6 mM y 15.6 mM de glucosa respectivamente. Estos resultados indican que una subpoblación de células beta es preferencialmente modulable por los bloqueadores de los canales de calcio, lo que sugiere que diferentes tipos de células beta podrían tener una densidad de canales de calcio y / o maquinaria secretora variables.

### **Efecto dual del palmitato sobre la secreción de insulina basal y los canales de calcio dependientes de voltaje en célula beta adultas**

En este trabajo también evaluamos los efectos agudos y crónicos de la exposición a concentraciones crecientes de palmitato sobre la secreción de insulina, en condiciones basal y estimulante de glucosa en células beta adultas. Observamos un efecto dual del AGL sobre la secreción de insulina dependiendo del tiempo de incubación. El palmitato aumentó el porcentaje de células secretoras, el área de inmunoplasmas y el índice de secreción de insulina global luego de la exposición

durante 1 h, tanto en 5.6 mM como en 15.6 mM de glucosa. Sin embargo, la preincubación crónica de las células con el ácido graso durante 24 h disminuyó severamente la secreción de insulina global, efecto al que contribuyó la reducción en el porcentaje de células secretoras y en el área de placas.

Estos resultados concuerdan con los de otros autores que también han demostrado que posterior a una exposición aguda a los AGL (1-3 h), aumenta la secreción de insulina (Sako and Grill, 1990) y que éstos juegan un papel fundamental en la modulación del efecto estimulante de la glucosa (Warnotte et al., 1994). Los resultados también concuerdan con los obtenidos en otros tipos celulares del islote pancreático, particularmente en las células alfa. Estos autores mostraron que la exposición a 0.5 y 1 mM de palmitato durante un corto período de tiempo estimuló la secreción de glucagón en islotes de ratón (Olofsson et al., 2004). Estos hallazgos en las células alfa tienen implicaciones fisiopatológicas importantes, ya que sugieren la posibilidad de que la hiperlipidemia contribuya a la sobresecreción de glucagón, lo cual agravaría la hiperglicemia.

El efecto dual del palmitato dependiendo del tiempo de exposición que demostramos en este estudio coincide con los estudios de otros autores, los cuales observaron que una elevación transitoria en los AGL estimula la actividad eléctrica de las células beta (Fernandez and Valdeolmillos, 1998) y potencia la GSIS; mientras un aumento a largo plazo desajusta a este proceso (Graciano et al., 2011; Nolan et al., 2006).

Los efectos de los AGL sobre la fisiología de las células beta pancreáticas dependen tanto de la concentración del ácido graso como del tiempo de exposición (Carvalho et al., 2006).

En cuanto a los efectos dependientes de la concentración del AGL, se ha reportado que concentraciones bajas de palmitato promueven la secreción de insulina, mientras que concentraciones altas inhiben la GSIS. La exposición constante de las células beta a ácidos grasos como el palmitato, se ha relacionado con la pérdida de la GSIS y con aumento en la apoptosis (Bollheimer et al., 1998; Maedler et al., 2003; Zhou and Grill, 1994), aunque aún no está completamente entendido el mecanismo

por el cual sucede esto. Curiosamente, el análisis de la viabilidad celular reveló que luego de la preincubación de las células beta con 1 mM de palmitato durante 1 h disminuyó la viabilidad, mientras que un efecto similar fue observado luego de la exposición crónica por 24 h al AGL, pero ya desde la concentración intermedia estudiada (0.5 mM). Es por ello que el análisis de los efectos del ácido graso sobre la secreción de insulina y las corrientes de calcio observados en nuestro estudio sólo son válidos a las concentraciones y tiempos de exposición en los cuales no hay una afectación a la viabilidad celular.

Muchos son los estudios que relacionan los AGL con la fisiopatología de las células beta pancreáticas. Es conocido que los AGL juegan un importante papel en la disfunción de las células  $\beta$  en condiciones patológicas como la obesidad y la DM2. Además la secreción de AGL por los adipocitos aumenta en estados de obesidad (Weyer et al., 1999). Se ha comprobado también que el aumento en las concentraciones de AGL circulantes conlleva a un aumento de la hiperinsulinemia y de la resistencia a la insulina periférica (Yaney and Corkey, 2003), esta última en una manera dependiente de la concentración de AGL, tanto en individuos obesos no diabéticos como en diabéticos tipo 2 (Roden et al., 1996; Santomauro et al., 1999).

Particularmente, la notable reducción en el índice de secreción de insulina tras 24 h de exposición al AGL, pudieran correlacionarse con un estado de obesidad e ingesta prolongada de ácidos grasos saturados. Esto está en concordancia con lo reportado en la literatura sobre la fuerte correlación entre la disminución en la liberación de insulina y la obesidad (Kahn et al., 2006) unido a las concentraciones elevadas de AGL (Boden and Shulman, 2002).

Los resultados también coinciden en parte con otros estudios donde se ha evidenciado que la exposición crónica a los AGL disminuye la GSIS (Zhou and Grill, 1994). Estos autores mostraron que cuando los islotes de rata son expuestos a palmitato durante 48 h aumenta la secreción basal de insulina pero hay una marcada inhibición en la GSIS. Interesantemente, mostramos que, tras 24 h de exposición al palmitato, hay una disminución considerable tanto en el porcentaje de

células secretoras de insulina como en el índice global de secreción. Un estudio en otro tipo celular del islote mostró también que el palmitato inhibió en un 50 % la secreción de somatostatina por las células delta pancreáticas (Olofsson et al., 2004).

Varios son los mecanismos que pueden explicar los efectos patológicos de los AGL en las células beta de roedores, pero, sin dudas, el efecto sobre los canales activados por voltaje, particularmente, sobre los canales de calcio, ha sido uno de los más estudiados. En este sentido, está reportado que los efectos de los AGL sobre los canales de calcio presentes en las células beta pancreáticas también son dependientes del tiempo y de la concentración (Carvalho et al., 2006; Graciano et al., 2011; Nolan et al., 2006).

El análisis electrofisiológico mostró que 0.5 mM de palmitato aumenta la densidad de corriente de calcio mediada por canales HVA tras una exposición al AGL durante 1 h. Curiosamente, el efecto observado fue específico sobre los canales HVA ya que la corriente mediada por los canales tipo T se mantuvo invariable a este tiempo de exposición. Los resultados electrofisiológicos sobre los canales de calcio de alto umbral, principales responsables de la exocitosis de la insulina, pueden correlacionarse fuertemente con el aumento en el porcentaje de células secretoras, el área de inmunoplasmas y el índice de secreción en condiciones de glucosa basal y estimulante que observamos luego de 1 h de exposición al AGL. También el aumento en la corriente HVA a este tiempo de exposición puede explicar el incremento notable en la subpoblación de células LP (principales contribuyentes a la secreción total) en 15.6 mM de glucosa.

Otros autores han mostrado que una exposición a palmitato por un tiempo corto aumenta la concentración de calcio intracelular, potenciando así la secreción de insulina por un mecanismo independiente al del canal  $K_{ATP}$ . El palmitato aumenta la densidad de corriente mediada por canales de calcio tipo L y el número de gránulos de insulina liberados en células  $\beta$  de ratón (Olofsson et al., 2004). Además, otros trabajos en islotes pancreáticos mostraron que este AGL aumenta la concentración intracelular de calcio (Warnotte et al., 1994). De forma interesante, se ha reportado

también que la exposición corta al palmitato, podría incluso modular la actividad de otros tipos de canales (Komatsu et al., 1999; Prentki et al., 2002).

Resultados similares a los que mostramos fueron obtenidos en las células alfa de islotes de ratones. Estos autores también correlacionaron el aumento en la secreción de glucagon, tras una preincubación corta con palmitato, con un incremento de 3-5 veces en el calcio intracelular. Además encontraron un aumento de un 25 % en la corriente total de calcio y un 40 % de estimulación de la exocitosis en estas células bajo estas condiciones experimentales (Olofsson et al., 2004). Curiosamente, también observaron que la modulación de la corriente de calcio por el AGL fue anulada por isradipina, lo que sugiere que el palmitato selectivamente moduló a los canales de calcio tipo L. Esto también concuerda con lo observado luego de la exposición durante 1 h, ya que la modulación por el AGL fue específica también para los canales HVA.

El aumento en el calcio intracelular en las células alfa de ratón provocado por el palmitato (Olofsson et al., 2004), coincide con los resultados de este estudio.

En líneas celulares de insulinoma de rata también se ha estudiado la modulación de las corrientes de calcio por palmitato. Un estudio mostró que el AGL aumenta la concentración de calcio intracelular en células HIT-T15 (Remizov et al., 2003). Estos autores reportaron que esta modulación está dada tanto por la movilización de calcio de las pozas intracelulares como mediante la estimulación del influjo de calcio a través de los canales sensibles a voltaje.

En contraste a lo planteado hasta aquí, un trabajo realizado en células beta de ratas GK (modelo de ratas no obesas con DM2) reveló que no aumentó la concentración intracelular de calcio ante un incremento en los AGL en el plasma. No obstante, estos autores sí encontraron cambios discretos en la exocitosis, lo que se manifestó como una reducción de alrededor de un 50 % en la sensibilidad al calcio (Rose et al., 2007).

Varios hallazgos indican que el aumento de calcio mediado por AGL en células beta comprende dos componentes: la movilización de los almacenes internos como el

RE y el influjo a través de los canales de calcio dependientes de voltaje presentes en la membrana plasmática (Tian et al., 2008). Sin embargo, existe controversia en cuanto a si los efectos de los AGL en estas células son directos o indirectos (Fujiwara et al., 2005).

Nuestro estudio mostró además una radical disminución en la secreción de insulina en 5.6 y 15.6 mM de glucosa, así como una drástica reducción en la subpoblación de células LP, tras la exposición al palmitato durante 24 h.

En este sentido se ha planteado que la exposición crónica de las células beta a AGL provoca la pérdida de la agregación de los canales de calcio en la membrana. Esto podría conllevar a que los gránulos competentes liberados no estén expuestos a las concentraciones excitóticas adecuadas de calcio intracelular durante los potenciales de acción de estas células. Se ha sugerido además, que esta disociación de los complejos gránulos/canales de calcio podría tener consecuencias funcionales críticas, sobre todo teniendo en cuenta que estas células presentan una relativamente baja densidad de canales de calcio comparado con otras células endocrinas como las células cromafines. Se cree que este pudiera ser un mecanismo por el cual las células beta puedan suprimir la secreción de insulina durante condiciones de ayuno/inanición (Rorsman et al., 2012).

Los efectos observados sobre la secreción de insulina correlacionan con el comportamiento electrofisiológico de los canales de calcio luego de la exposición al AGL por 24 h. La concentración intermedia de palmitato (0.5 mM) disminuyó los máximos de ambas corrientes de calcio LVA y HVA, lo que justifica en gran parte la reducción en el porcentaje de células secretoras de insulina, el área de inmunoplasmas y el índice de secreción global.

Sorprendentemente, al explorar el efecto del AGL durante 48-72 h observamos un aumento en la corriente mediada por canales HVA, mientras que la corriente LVA se mantuvo inalterable. Estos resultados luego de una exposición crónica al palmitato más prolongada, son distintos a los que obtuvimos tras 24 h de preincubación. Lamentablemente no pudimos evaluar el efecto del AGL sobre la secreción basal y estimulada por glucosa durante 48-72 h. Sin embargo, estudios

realizados en esta década muestran que el tratamiento con palmitato durante 48 h reduce la GSIS en la línea celular de insulinoma de ratón MIN6, por un mecanismo independiente de la producción de ceramidas. Estos autores reportaron una disminución en la activación de la CaMKII, lo cual sugieren podría estar relacionado con el desacople en la secreción de insulina (Watson et al., 2011).

En general, independiente del mecanismo, el palmitato tiene un efecto dual tanto sobre la secreción de insulina como sobre la corriente de calcio mediada por canales dependientes de voltaje, y que este efecto dual es dependiente del tiempo de exposición y de la concentración del ácido graso.

## 8. CONCLUSIONES

- Las células beta pancreáticas de ratas neonatas, P20 y adultas presentan canales de calcio tipo T. El hecho de que la detección y amplitud de las corrientes de calcio aumenten con la edad indica que estos canales pueden considerarse marcadores de maduración de estas células.
- Las tres isoformas de los canales LVA se expresan diferencialmente durante el desarrollo posnatal de las células beta pancreáticas de rata. La mayor expresión de Cav3.1 y Cav3.2 en células beta adultas correlaciona con la mayor amplitud de corriente de calcio tipo T en esta edad.
- Las corrientes de calcio en células beta de ratas P20 son heterogéneas, lo que sugiere la existencia de subpoblaciones de células beta relacionadas con los canales HVA en esta edad.
- El mibefradil y el TTA-A2, bloqueadores de los canales tipo T, inhiben la secreción de insulina en células beta adultas en 5.6 mM de glucosa, mientras que la nifedipina, bloqueador de los canales tipo L, fue el fármaco más efectivo en 15.6 mM de glucosa. Esto reafirma la importancia de los canales tipo T y tipo L en las secreciones de insulina basal y estimulada por glucosa respectivamente.
- El palmitato modula de forma dual la secreción de insulina y las corrientes de calcio en células beta adultas. Los efectos del ácido graso libre son dependientes de la concentración y del tiempo de exposición.

## 9. PERSPECTIVAS

- Determinar la localización subcelular (razón membrana/citoplasma) de las isoformas de los canales LVA durante el desarrollo de las células beta pancreáticas de rata mediante el empleo de la microscopía confocal.
- Evaluar la apoptosis de las células beta pancreáticas expuestas a palmitato 1 mM durante 1 h y a 0.5 y 1 mM durante 24 h. Estos experimentos ayudarán a explicar la disminución en la viabilidad celular observada a estas concentraciones y tiempos de exposición al AGL.
- Estudiar el posible efecto del palmitato sobre algunos componentes de la vía de señalización de insulina.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguayo-Mazzucato, C., Sanchez-Soto, C., Godinez-Puig, V., Gutiérrez-Ospina, G., and Hiriart, M. (2006). Restructuring of pancreatic islets and insulin secretion in a postnatal critical window. *PLoS One* 1. doi:10.1371/journal.pone.0000035.
- Altierab, C., Dubela, S. J., Barrèrea, C., Jarviscd, S. E., Stotzce, S. C., Spaetgenscf, R. L., et al. (2002). Trafficking of L-type calcium channels mediated by the postsynaptic scaffolding protein AKAP79. *J. Biol. Chem.* 277, 33598–33603. doi:10.1074/jbc.M202476200.
- Ammala, C., Eliasson, L., Bokovist, K., Berggren, P. O., Honkanen, E. R., Sjöholm, A., et al. (1994). Activation of protein kinases and inhibition of protein phosphatases play a central role in the regulation of exocytosis in mouse pancreatic beta cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 4343–4347.
- Ammon, H. P. T., Glocker, C., Waldner, R. G., and Wahl, M. A. (1989). Insulin release from pancreatic islets of fetal rats mediated by leucine b-BCH , tolbutamide , glibenclamide , arginine , potassium chloride , and theophylline does not require stimulation of  $Ca^{2+}$  net uptake. *Cell Calcium* 10, 441–450.
- Antollini, S. S., and Barrantes, F. J. (2016). Fatty Acid Regulation of Voltage- and Ligand-Gated Ion Channel Function. *Front. Physiol.* 7, 1–17. doi:10.3389/fphys.2016.00573.
- Arikkath, J., and Campbell, K. P. (2003). Auxiliary subunits: Essential components of the voltage-gated calcium channel complex. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13, 298–307. doi:10.1016/S0959-4388(03)00066-7.
- Arkhammar, P., Juntti-Berggren, L., Larsson, O., Welsh, M., Nanberg, E., Sjöholm, A., et al. (1994). Protein kinase C modulates the insulin secretory process by maintaining a proper function of the  $\beta$ -cell voltage-activated  $Ca^{2+}$  channels. *J. Biol. Chem.* 269, 2743–2749.
- Ashcroft, F. M., and Rorsman, P. (1989). Electrophysiology of the pancreatic  $\beta$ -cell.

- Prog. Biophys. Mol. Biol.* 54, 87–143. doi:10.1016/0079-6107(89)90013-8.
- Assimacopoulos-Jeannet, F., Thumelin, S., Roche, E., Esser, V., Denis McGarry, J., and Prentki, M. (1997). Fatty acids rapidly induce the carnitine palmitoyltransferase I gene in the pancreatic  $\beta$ -cell line INS-1. *J. Biol. Chem.* 272, 1659–1664. doi:10.1074/jbc.272.3.1659.
- Barbosa, R. M., Silva, A. M., Tomé, A. R., Stamford, J. A., Santos, R. M., and Rosário, L. M. (1998). Control of pulsatile 5-HT/insulin secretion from single mouse pancreatic islets by intracellular calcium dynamics. *J. Physiol.* 510, 135–143. doi:10.1111/j.1469-7793.1998.135bz.x.
- Barg, S., Ma, X., Eliasson, L., Galvanovskis, J., and Göpel, S. (2001). Fast exocytosis with few Ca<sup>2+</sup> channels in insulin-secreting mouse pancreatic B cells. *Biophysical* 81, 3308–3323. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349501759644>.
- Barnett, D. W., Pressel, D. M., and Mislner, S. (1995). Voltage-dependent Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> currents in human pancreatic islet beta-cells: evidence for roles in the generation of action potentials and insulin secretion. *Pflugers Arch.* 431, 272–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9026789>.
- Bean, B. P. (1985). Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. Differences in kinetics, selectivity, and pharmacology. *J. Gen. Physiol.* 86, 1–30. doi:10.1085/jgp.86.1.1.
- Berggren, P. O., Yang, S. N., Murakami, M., Efanov, a M., Uhles, S., Kohler, M., et al. (2004). Removal of Ca<sup>2+</sup> channel beta 3 subunit enhances Ca<sup>2+</sup> oscillation frequency and insulin exocytosis. *Cell* 119, 273–284.
- Bertram, R., and Sherman, A. (2000). Dynamical complexity and temporal plasticity in pancreatic beta-cells. *J. Biosci.* 25, 197–209.
- Bhattacharjee, A., Whitehurst, R. M., Zhang, M., Wang, L., and Li, M. (1997). T-type calcium channels facilitate insulin secretion by enhancing general excitability in the insulin-secreting  $\beta$ -cell line, INS-1. *Endocrinology* 138, 3735–

3740. doi:10.1210/en.138.9.3735.

Boden, G., and Shulman, G. I. (2002). Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *Eur. J. Clin. Invest.* 32, 14–23. doi:10.1046/j.1365-2362.32.s3.3.x.

Bollheimer, L. C., Skelly, R. H., Chester, M. W., McGarry, J. D., and Rhodes, C. J. (1998). Chronic exposure to free fatty acid reduces pancreatic  $\beta$  cell insulin content by increasing basal insulin secretion that is not compensated for by a corresponding increase in proinsulin biosynthesis translation. *J. Clin. Invest.* 101, 1094–1101. doi:10.1172/JCI420.

Braun, M., Ramracheya, R., Bengtsson, M., Zhang, Q., Karanauskaite, J., Partridge, C., et al. (2008). Voltage-Gated Ion Channels in Human Pancreatic B-Cells : Electrophysiological Characterization and Role in Insulin Secretion. *Diabetes* 57, 1618–1628. doi:10.2337/db07-0991.M.B.

Brereton, M. F., Vergari, E., Zhang, Q., and Clark, A. (2015). Alpha-, Delta- and PP-cells: Are They the Architectural Cornerstones of Islet Structure and Coordination? *J. Histochem. Cytochem.* 63, 575–591. doi:10.1369/0022155415583535.

Carbone, E., and Lux, H. D. (1984). A low voltage-activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurones. *Nature* 310, 501. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/310501a0>.

Carvalho, C. R. O., Haber, E. P., Proco, J., Carpinelli, A. R., Newsholme, P., and Curi, R. (2006). New Insights into Fatty Acid Modulation of Pancreatic b-Cell Function. *Int. Rev. Cytol.* 248, 1-41. doi:10.1016/S0074-7696(06)48001-3.

Catterall, W. A. (2000). Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16:521–555.

Catterall, W. A., Striessnig, J., Snutch, T. P., and Perez-Reyes, E. (2003). International Union of Pharmacology. XL. Compendium of voltage-gated ion

channels: calcium channels. *Pharmacol. Rev.* 55, 579–581.

doi:10.1124/pr.55.4.8.and.

Catterall, W. a, Perez-Reyes, E., Snutch, T. P., and Striessnig, J. (2005).

International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol. Rev.* 57, 411–425. doi:10.1124/pr.57.4.5.units.

Caumo, A. ., and Luzi, L. (2004). First-phase insulin secretion: does it exist in real life? Considerations on shape and function. *AJP Endocrinol. Metab.* 287, E371–E385. doi:10.1152/ajpendo.00139.2003.

Choe, W., Messinger, R. B., Leach, E., Eckle, V., Obradovic, A., Salajegheh, R., et al. (2011). TTA-P2 Is a Potent and Selective Blocker of T-Type Calcium Channels in Rat Sensory Neurons and a Novel Antinociceptive Agent. *Mol. Pharmacol.* 80, 900–910. doi:10.1124/mol.111.073205.central.

Cook, D. L., Satin, L. S., and Hopkins, W. F. (1991). Pancreatic B cells are bursting, but how? *Trends Neurosci.* 14, 411–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1720583>.

Corkey, B. E. ., Glennon, M. C. ., Chen, K. S. ., Deeney, J. T., F.M.; M., and Prentki, M. (1989). A role for malonyl-CoA in glucose-stimulated insulin secretion from clonal pancreatic beta-cells. *J. Biol. Chem.* 264, 21608–21612.

Daniel, S., Noda, M., Straub, S. G. ., and Sharp, G. W. G. (1999). Identification of the Docked Granule Pool Responsible for the First Phase of Glucose-Stimulated Insulin Secretion. *Diabetes* 48, 1–5. doi:10.1152/ajpendo.00139.2003.

Davalli, A. M., Biancardi, E., Pollo, A., Socci, C., Pozza, G., Clementi, F., et al. (1996). Dihydropyridine-sensitive and-insensitive voltage-operated calcium channels participate in the control of glucose-induced insulin release from human pancreatic beta cells. *J. Endocrinol.* 150: 195–203.

Dean, B. Y. P. M., and Matthews, E. K. (1970). Glucose-induced electrical activity

- in pancreatic islet cells. *J. Physiol.* 210:255–264.
- Delarue, J., and Magnan, C. (2007). Free fatty acids and insulin resistance. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 10, 142–148.
- Drews, G., Krippeit-drews, P., and Martina, D. (2015). *Islets of Langerhans*. doi:10.1007/978-94-007-6686-0.
- Dubois, M., Kerr-Conte, J., Gmyr, V., Bouckenooghe, T., Muharram, G., D’Herbomez, M., et al. (2004). Non-esterified fatty acids are deleterious for human pancreatic islet function at physiological glucose concentration. *Diabetologia* 47, 463–469. doi:10.1007/s00125-004-1347-1.
- Ertel, E., K, C., Harpold, M., Hofmann, F., Mori, Y., Perez-Reyes, E., et al. (2000). Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 25, 533–5. doi:10.1016/j.nurpra.2012.12.024.
- Fernandez, J., and Valdeolmillos, M. (1998). Increased levels of free fatty acids in fasted mice stimulate in vivo beta-cell electrical activity. *Diabetes* 47, 1707–1712. doi:10.2337/diabetes.47.11.1707.
- Fujiwara, K., Maekawa, F., and Yada, T. (2005). Oleic acid interacts with GPR40 to induce Ca<sup>2+</sup> signaling in rat islet β-cells: mediation by PLC and L-type Ca<sup>2+</sup> channel and link to insulin release. *Am. J. Physiol. Metab.* 289, E670–E677. doi:10.1152/ajpendo.00035.2005.
- Grabsch, H., Pereverzev, A., Weiergräber, M., Schramm, M., Henry, M., Vajna, R., et al. (1999). Immunohistochemical Detection of α1E Voltage-gated Ca<sup>2+</sup> Channel Isoforms in Cerebellum, INS-1 Cells, and Neuroendocrine Cells of the Digestive System. *J. Histochem. Cytochem.* 47, 981–994. doi:10.1177/002215549904700802.
- Graciano, M. F., Valle, M. M., Kowluru, A., Curi, R., and Carpinelli, A. R. (2011). Regulation of insulin secretion and reactive oxygen species production by free fatty acids in pancreatic islets. *Islets* 3, 213–223. doi:10.4161/isl.3.5.15935.
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F. J. (1981).

- Improved patch clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell-free membranes. *Pflügers Arch.* 391, 85–100.  
doi:10.1007/BF00656997.
- Hiriart, M. and Matteson, D. R. (1988). Na channels and two types of Ca channels in rat pancreatic B cells identified with the reverse hemolytic plaque assay. *J. Gen. Physiol.* 91, 617–639. doi:10.1085/jgp.91.5.617.
- Hiriart, M. (1997). El páncreas endócrino. in *Libro del Curso Internacional de Actualización en Fisiología. XL Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. México*, 35.
- Hiriart, M., and Aguilar-Bryan, L. (2008). Channel regulation of glucose sensing in the pancreatic  $\beta$ -cell. *AJP Endocrinol. Metab.* 295, E1298–E1306.  
doi:10.1152/ajpendo.90493.2008.
- Hiriart, M., Martinez, M. T., and Ramírez-Medeles, M. del C. (1997). “Physiological Behavior of Functional Subpopulations of Single Pancreatic  $\beta$ -Cells,” in *Physiology and Pathophysiology of the Islets of Langerhans*, ed. B. Soria (Boston, MA: Springer US), 267–274. doi:10.1007/978-1-4899-1819-2\_37.
- Hiriart, M., and Ramirez-Medeles, M. C. (1991). Functional Subpopulations of Individual Pancreatic B-Cells in Culture. *Endocrinology* 128, 3193–3198.  
doi:10.1210/endo-128-6-3193.
- Hiriart, M., Velasco, M., Diaz-garcia, C. M., Sa, C., Larque, C., Toledo, A., et al. (2015). Islets of Langerhans. 817–844. doi:10.1007/978-94-007-6686-0.
- Hiriart, M., Velasco, M., Larqué, C., and Manlio, C. (2014). Metabolic Syndrome and Ionic Channels in Pancreatic Beta Cells. 95, 87–114.
- Hole, R. L. ., Pian-Smith, M. C. ., and Sharp, G. W. (1988). Development of the biphasic response to glucose in fetal and neonatal rat pancreas. *Am. J. Physiol. Metab.* 254, E167–E174. doi:10.1152/ajpendo.1988.254.2.E167.
- Horváth, A., Szabadkai, G., Várnai, P., Arányi, T., Wollheim, C. B., Spät, A., et al. (1998). Voltage dependent calcium channels in adrenal glomerulosa cells and

in insulin producing cells. *Cell Calcium* 23, 33–42. doi:10.1016/S0143-4160(98)90072-0.

Hullin, R., Singerlahat, D., Freichel, M., Biel, M., Dascal, N., Hofmann, F., et al. (1992). Calcium Channel beta-Subunit Heterogeneity - Functional Expression of Cloned cDNA from Heart, Aorta and Brain. *EMBO J.* 11, 885–890.

Itoh, Y., Kawamata, Y., Harada, M., Kobayashi, M., Fujii, R., Fukusumi, S., et al. (2003). Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic  $\beta$  cells through GPR40. *Nature* 422, 173. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nature01478>.

Iwashima, Y., Abiko, A., Ushikubi, F., Hata, A., Kaku, K., Sano, H., et al. (2001). Downregulation of the voltage-dependent calcium channel (VDCC) beta-subunit mRNAs in pancreatic islets of type 2 diabetic rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280, 923–932. doi:10.1006/bbrc.2000.4122.

Jacqueminet, S., Briaud, I., Rouault, C., Reach, G., and Poitout, V. (2000). Inhibition of insulin gene expression by long-term exposure of pancreatic  $\beta$  cells to palmitate is dependent on the presence of a stimulatory glucose concentration. *Metab. Clin. Exp.* 49, 532–536. doi:10.1016/S0026-0495(00)80021-9.

Jefferson, L. S., Cherrington, A. D. ., and Goodman, H. M. (2001). “The endocrine pancreas and regulation of metabolism,” in *Handbook of Physiology, sección 7. Sistema endocrino. Vol II. Oxford University Press*, 49–78.

Kahn, S. E., Haffner, S. M., Heise, M. A., Herman, W. H., Holman, R. R., Jones, N. P., et al. (2006). Glycemic Durability of Rosiglitazone, Metformin, or Glyburide Monotherapy. *N. Engl. J. Med.* 355, 2427–2443. doi:10.1056/NEJMoa066224.

Kato, S., Ishida, H., Tsuura, Y., Tsuji, K., Nishimura, M., Horie, M., et al. (1996). Alterations in basal and glucose-stimulated voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channel activities in pancreatic  $\beta$  cells of non-insulin-dependent diabetes mellitus GK rats. *J. Clin. Invest.* 97, 2417–2425. doi:10.1172/JCI118688.

- Kharroubi, I., Ladrière, L., Cardozo, A. K., Dogusan, Z., Cnop, M., and Eizirik, D. L. (2004). Free fatty acids and cytokines induce pancreatic  $\beta$ -cell apoptosis by different mechanisms: Role of nuclear factor- $\kappa$ B and endoplasmic reticulum stress. *Endocrinology* 145, 5087–5096. doi:10.1210/en.2004-0478.
- Komatsu, M., Yajima, H., Yamada, S., Kaneko, T., Sato, Y., Hashizume, K., et al. (1999). Augmentation of  $\text{Ca}^{2+}$ -stimulated insulin release by glucose and long-chain fatty acids in rat pancreatic islets: free fatty acids mimic ATP-sensitive  $\text{K}^+$  channel-independent insulinotropic action of glucose. *Diabetes* 48, 1543-1549
- Koyama, K. ., Lee, Y. ., and Unger, R. . (1997). Tissue triglycerides, insulin resistance, and insulin production: implications for hyperinsulinemia of obesity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 273, E708–E713.
- Kulkarni, R. N. (2004). The islet  $\beta$ -cell. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 365–371. doi:https://doi.org/10.1016/j.biocel.2003.08.010.
- Kwan, E. P., Xie, L., Sheu, L., Nolan, C. J., Prentki, M., Betz, A., et al. (2006). Munc13-1 deficiency reduces insulin secretion and causes abnormal glucose tolerance. *Diabetes* 55, 1421–1429. doi:10.2337/db05-1263.
- Larqu e, C., Velasco, M., Barajas-Olmos, F., García-Delgado, N., Ch avez-Maldonado, J. P., García-Morales, J., et al. (2016). Transcriptome landmarks of the functional maturity of rat beta-cells, from lactation to adulthood. *J. Mol. Endocrinol.* 57, 45–59. doi:10.1530/JME-16-0052.
- Latour, M. G., Alquier, T., Oseid, E., Tremblay, C., Thomas, L., Luo, J., et al. (2007). NIH Public Access. 56, 1087–1094.
- Lee, J.-H., Gomora, J. C., Cribbs, L. L., and Perez-Reyes, E. (1999). Nickel Block of Three Cloned T-Type Calcium Channels: Low Concentrations Selectively Block  $\alpha$ 1H. *Biophys. J.* 77, 3034–3042. doi:10.1016/S0006-3495(99)77134-1.
- Li, M. (2015). T-type Calcium Channels in Basic and Clinical Science. Editors: Schaffer, Stephen W., Li, Ming (Eds.), 137–150. doi:10.1007/978-3-7091-1413-

1.

Ligon, B., Boyd, A. E., and Dunlap, K. (1998). Class A calcium channel variants in pancreatic islets and their role in insulin secretion. *J. Biol. Chem.* 273, 13905–13911. doi:10.1074/jbc.273.22.13905.

Linden, D. J., and Routtenberg, A. (1989). The role of protein kinase C in long-term potentiation : a testable model. *Brain Research Reviews* 14, 279–296.

Liu, G., Dilmac, N., Hilliard, N., Hockerman, G. H., Chemistry, M., L, M. P. G., et al. (2003). Ca<sup>v</sup> 1.3 is preferentially coupled to glucose-stimulated insulin secretion in the pancreatic beta-cell line INS-1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 305, 271–278. doi:10.1124/jpet.102.046334.molecule.

Liu, L., O'Hara, D. S., Cala, S. E., Poornima, I., Hines, R. N., and Marsh, J. D. (2000). Developmental regulation of the L-type calcium channel alpha1C subunit expression in heart. *Mol. Cell. Biochem.* 205, 101–109.

Lory, P., Bidaud, I., and Chemin, J. (2006). T-type calcium channels in differentiation and proliferation. *Cell Calcium* 40, 135–146. doi:10.1016/j.ceca.2006.04.017.

Lundbaek, J. A. (1994). Lysophospholipids modulate channel function by altering the mechanical properties of lipid bilayers. *J. Gen. Physiol.* 104, 645–673. doi:10.1085/jgp.104.4.645.

Maedler, K., Bucher, P., Spinass, G. A., and Donath, M. Y. (2003). Monounsaturated fatty acids prevent the deleterious effects of palmitate and high glucose on human pancreatic beta-cell turnover and function. *Diabetes* 52, 726-733. Available at: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Diabetes.+2003+Mar%3B52\(3\)%3A726-33](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Diabetes.+2003+Mar%3B52(3)%3A726-33).

Magnelli, V., Avaltroni, A., and Carbone, E. (1996). A single non-L-, non-N-type Ca<sup>2+</sup> channel in rat insulin-secreting RINm5F cells. *Pflugers Arch.* 431, 341–352.

- Marcantoni, A., Carabelli, V., Comunanza, V., Hoddah, H., and Carbone, E. (2008). Calcium channels in chromaffin cells: Focus on L and T types. *Acta Physiol.* 192, 233–246. doi:10.1111/j.1748-1716.2007.01815.x.
- Matschinsky, F. M. (2002). Regulation of pancreatic beta-cell glucokinase: from basics to therapeutics. *Diabetes* 51, 394-404.
- Matteson, D. R., and Armstrong, C. M. (1986). Properties of two types of calcium channels in clonal pituitary cells. *J. Gen. Physiol.* 87, 161–182. doi:10.1085/jgp.87.1.161.
- Mears, D. (2004). Regulation of Insulin Secretion in Islets of Langerhans by Ca<sup>2+</sup>Channels. *J. Membr. Biol.* 200, 57–66. doi:10.1007/s00232-004-0692-9.
- Meissner, H. P., and Schmelz, H. (1974). Membrane potential of beta cells in pancreatic islets. *Pflugers Arch.* 351,351, 195–206.
- Namkung, Y., Skrypnik, N., Jeong, M. J., Lee, T., Lee, M. S., Kim, H. L., et al. (2001). Requirement for the L-type Ca(2+) channel alpha(1D) subunit in postnatal pancreatic beta cell generation. *Jci* 108, 1015–22. doi:10.1172/JCI13310.
- Navarro-Tableros, V., Fiordeliso-Coll, T., Hernandez-Cruz, A., and Hiriart, M. (2007a). Nerve growth factor promotes development of glucose-induced insulin secretion in rat neonate pancreatic beta cells by modulating calcium channels. *Channels (Austin)*. 1, 408–16. doi:10.4161/chan.1.6.5450.
- Navarro-Tableros, V., Fiordeliso, T., Hernández-Cruz, A., and Hiriart, M. (2007b). Physiological development of insulin secretion, calcium channels, and GLUT2 expression of pancreatic rat beta-cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 292, E1018–E1029. doi:10.1152/ajpendo.00457.2006.
- Navarro-Tableros, V., Sánchez-Soto, M. C., García, S., and Hiriart, M. (2004). Autocrine regulation of single pancreatic  $\beta$ -cell survival. *Diabetes* 53, 2018–2023. doi:10.2337/diabetes.53.8.2018.
- Neill, J. D., and Frawley, L. S. (1983). Detection of hormone release from individual

- cells in mixed populations using a reverse hemolytic plaque assay. *Endocrinology* 112(3), 1135–1137.
- Nolan, C. J., Madiraju, M. S. R., Delghingaro-augusto, V., Peyot, M., and Prentki, M. (2006). Fatty Acid Signaling in the  $\beta$ -Cell and Insulin Secretion. *Diabetes* 55. doi:10.2337/db06-S003.
- Nolan, C. J., and Prentki, M. (2008). The islet  $\beta$ -cell: fuel responsive and vulnerable. *Trends Endocrinol. Metab.* 19, 285–291. doi:10.1016/j.tem.2008.07.006.
- Olofsson, C. S., Salehi, A., Holm, C., and Rorsman, P. (2004). Palmitate increases L-type  $\text{Ca}^{2+}$  currents and the size of the readily releasable granule pool in mouse pancreatic  $\beta$ -cells. *J. Physiol.* 557, 935–948. doi:10.1113/jphysiol.2004.066258.
- Ordway, R. W., Singer, J. J., and Walsh Jr., J. V (1991). Direct regulation of ion channels by fatty acids. *Trends Neurosci.* 14, 96–100.
- Pedersen, M. G. (2010). Insulin Secretory Granules Enter a Highly Calcium-Sensitive State following Palmitate-Induced Dissociation from Calcium Channels: A Theoretical Study. *J. Neuroendocrinol.* 22, 1315–1324. doi:10.1111/j.1365-2826.2010.02056.x.
- Pereverzev, A., Vajna, R., Pfitzer, G., Hescheler, J., Klöckner, U., and Schneider, T. (2002). Reduction of insulin secretion in the insulinoma cell line INS-1 by overexpression of a Cav2.3 ( $\alpha 1E$ ) calcium channel antisense cassette. *Eur. J. Endocrinol.* 146, 881–889. doi:10.1530/eje.0.1460881.
- Pipeleers, D., De Mesmaeker, I., Robert, T., and Van Hulle, F. (2017). Heterogeneity in the Beta-Cell Population: a Guided Search Into Its Significance in Pancreas and in Implants. *Curr. Diab. Rep.* 17, 1–7. doi:10.1007/s11892-017-0925-9.
- Pipeleers, D. et al (1992). *Morphology of the pancreatic  $\beta$ -cell. In Insulin, Molecular Biology to Pathology.*, ed. S. J. H. Ashcroft, F.M. y Ashcroft Oxford

University Press Available at: <https://www.dpag.ox.ac.uk/research/ashcroft-group/textbooks/insulin-molecular-biology-to-pathology>.

- Porte, D. J. ., and Kahn, S. E. (1991). Mechanisms for hyperglycemia in type II diabetes mellitus: Therapeutic implications for sulfonylurea treatment - An update. *Am. J. Med.* 90, 8S–14S. Available at: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed5&NEWS=N&AN=21249886>.
- Pravettoni, E., Bacci, A., Coco, S., Forbicini, P., Matteoli, M., and Verderio, C. (2000). Different Localizations and Functions of L-Type and N-Type Calcium Channels during Development of Hippocampal Neurons. *Dev. Biol.* 227, 581–594. doi:10.1006/dbio.2000.9872.
- Prentki;, M. ., and Corkey, B. E. (1996). Are the beta-cell signaling molecules malonyl- CoA and cystolic long-chain acyl-CoA implicated in multiple tissue defects of obesity and NIDDM? *Diabetes* 45, 273–283.
- Prentki, M., Joly, E., El-assaad, W., and Raphael, R. (2002). Malonyl-CoA Signaling, Lipid Partitioning, and Glucolipototoxicity. *Diabetes*, 405–413.
- Pressel, D. M., and Mislser, S. (1991). Role of voltage-dependent ionic currents in coupling glucose stimulation to insulin secretion in canine pancreatic islet B-Cells. *J. Membr. Biol.* 124, 239–253. doi:10.1007/BF01994357.
- Ramanadham, S., and Turk, J. (1994).  $\omega$ -Conotoxin inhibits glucose- and arachidonic acid-induced rises in intracellular  $[Ca^{2+}]$  in rat pancreatic islet  $\beta$ -cells. *Cell Calcium* 15, 259–264.
- Remizov, O., Jakubov, R., Düfer, M., Krippeit, P., Drews, G., Waring, M., et al. (2003). Palmitate-induced  $Ca^{2+}$ -signaling in pancreatic beta-cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 212, 1–9. doi:10.1016/j.mce.2003.09.026.
- Roden, M., Price, T. B., Perseghin, G., Petersen, K. F., Rothman, D. L., Cline, G. W., et al. (1996). Rapid Publication Mechanism of Free Fatty Acid – induced Insulin Resistance in Humans. *J. Clin. Invest.* 97, 2859–2865.

doi:10.1172/JCI118742.Rapid.

Roduit, R., Nolan, C., Alarcon, C., Moore, P., A, B., Delghingaro-augusto, V., et al. (2004). A role for malonyl-CoA and lipid signaling in the regulation of insulin secretion in response to both fuel and non-fuel stimuli. *Diabetes* 52, A383–A383.

Rorsman, P., Arkhammar, P., Bokvist, K., Hellerström, C., Nilsson, T., Welsh, M., et al. (1989). Failure of glucose to elicit a normal secretory response in fetal pancreatic beta cells results from glucose insensitivity of the ATP-regulated K<sup>+</sup> channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 4505–9.  
doi:10.1073/pnas.86.12.4505.

Rorsman, P., Braun, M., and Zhang, Q. (2012). Regulation of calcium in pancreatic  $\alpha$ - and  $\beta$ -cells in health and disease. *Cell Calcium* 51, 300–308.  
doi:10.1016/j.ceca.2011.11.006.

Rorsman, P., Eliasson, L., Renstrom, E., Gromada, J., Barg, S., and Gopel, S. (2000). The Cell Physiology of Biphasic Insulin Secretion. *News Physiol. Sci. an Int. J. Physiol. Prod. jointly by Int. Union Physiol. Sci. Am. Physiol. Soc.* 15, 72–77. doi:10.1111/j.1469-7793.1998.135bz.x.

Rose, T., Efendic, S., and Rupnik, M. (2007). Ca<sup>2+</sup>– Secretion Coupling Is Impaired in Diabetic Goto Kakizaki rats. *J. Gen. Physiol.* 129, 493–508.  
doi:10.1085/jgp.200609604.

Rosenbaum, T., Sánchez-Soto, M. C., and Hiriart, M. (2001). Nerve Growth Factor Increases Insulin Secretion and Barium Current in Pancreatic  $\beta$ -Cells. *Diabetes* 50, 1755 LP-1762. Available at:  
<http://diabetes.diabetesjournals.org/content/50/8/1755.abstract>.

Rousset, S., Mozo, J., Miroux, B., and Ricquier, D. (2004). The Biology of Mitochondrial Uncoupling Proteins. *Diabetes* 53, 130-135.

Safayhi, H., Haase, H., Kramer, U., Bihlmayer, A., Roenfeldt, M., Ammon, H. P., et al. (1997). L-type calcium channels in insulin-secreting cells: biochemical

- characterization and phosphorylation in RINm5F cells. *Mol. Endocrinol.* 11, 619–629. doi:10.1210/mend.11.5.9922.
- Sako, Y., and Grill, V. E. (1990). A 48-hour lipid infusion in the rat time-dependently inhibits glucose-induced insulin secretion and  $\beta$  cell oxidation through a process likely coupled to fatty acid oxidation. *Endocrinology* 127, 1580–1589. doi:10.1210/endo-127-4-1580.
- Santomauro, A. T. M. G., Boden, G., Silva, M. E. R., Rocha, D. M., Santos, R. F., Ursich, M. J. M., et al. (1999). Overnight Lowering of Free Fatty Acids With Acipimox Improves Insulin Resistance and Glucose Tolerance in Obese Diabetic and Nondiabetic Subjects. *Diabetes* 48, 1836-1841.
- Satin, L. S. (2000). Localized Calcium Influx in Pancreatic  $\beta$ -Cells: its significance for  $Ca^{2+}$ -dependent insulin secretion from the islets of Langerhans. *Endocrine* 13, 251–262.
- Schulla, V., Renstrom, E., Feil, R., Feil, S., Franklin, I., Gjinovci, A., et al. (2003). Impaired insulin secretion and glucose tolerance in  $\beta$  cell-selective  $Ca_v1.2$   $Ca^{2+}$  channel null mice. *Embo J.* 22, 3844–3854. doi:10.1093/emboj/cdg389.
- Seino, S. (1995). CACN4, the major  $\alpha_1$  subunit isoform of voltage-dependent calcium channels in pancreatic  $\beta$ -cells: a minireview of current progress. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 28, S99–S103. doi:10.1016/0168-8227(95)01085-R.
- Seino, S., Chen, L., Seino, M., Blondel, O., Takeda, J., Johnson, J. H., et al. (1992). Cloning of the alpha 1 subunit of a voltage-dependent calcium channel expressed in pancreatic beta cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89, 584–588.
- Sher, E., Giovannini, F., Codignola, A., Passafaro, M., Giorgi-Rossi, P., Volsen, S., et al. (2003). Voltage-Operated Calcium Channel Heterogeneity in Pancreatic  $\beta$  Cells: Physiopathological Implications. *J. Bioenerg. Biomembr.* 35, 687–696. doi:10.1023/B:JOB.0000008032.49504.48.
- Smith, P. A., Rorsman, P., and Ashcroft, F. M. (1989). Modulation of dihydropyridine-sensitive  $Ca^{2+}$  channels by glucose metabolism in mouse

pancreatic  $\beta$  -cells. *Nature* 342, 550. Available at:  
<http://dx.doi.org/10.1038/342550a0>.

Stein, D. T., Stevenson, B. E., Chester, M. W., Basit, M., Daniels, M. B., Turley, S. D., et al. (1997). The Insulinotropic Potency of Fatty Acids Is Influenced Profoundly by Their Chain Length and Degree of Saturation. *J. Clin. Invest.* 100, 398–403.

Talavera, K., and Nilius, B. (2006). Biophysics and structure-function relationship of T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Cell Calcium* 40, 97–114.  
doi:10.1016/j.ceca.2006.04.013.

Thams, P., and Capito, K. (2001). Differential mechanisms of glucose and palmitate in augmentation of insulin secretion in mouse pancreatic islets. *Diabetologia* 44, 738–746. doi:10.1007/s001250051683.

Tian, Y., Corkey, R. F., Yaney, G. C., Goforth, P. B., Satin, L. S., and Vargas, L. M. De (2008). Differential modulation of L-type calcium channel subunits by oleate. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 294:2118, 1178–1186.  
doi:10.1152/ajpendo.90237.2008.

Treviño, C. L., Felix, R., Castellano, L. E., Gutiérrez, C., Rodríguez, D., Pacheco, J., et al. (2004). Expression and differential cell distribution of low-threshold  $\text{Ca}^{2+}$  channels in mammalian male germ cells and sperm. *FEBS Lett.* 563, 87–92. doi:10.1016/S0014-5793(04)00257-1.

Vajna, R., Klöckner, U., Pereverzev, A., Weiergräber, M., Chen, X., Miljanich, G., et al. (2001). Functional coupling between “R-type”  $\text{Ca}^{2+}$  channels and insulin secretion in the insulinoma cell line INS-1. *Eur. J. Biochem.* 268, 1066–1075.  
doi:10.1046/j.1432-1327.2001.01969.x.

Vajna, R., Schramm, M., Pereverzev, A., Arnhold, S., Grabsch, H., Klöckner, U., et al. (1998). New isoform of the neuronal  $\text{Ca}^{2+}$  channel  $\alpha 1\text{E}$  subunit in islets of Langerhans and kidney. *Eur. J. Biochem.* 257, 274–285. doi:10.1046/j.1432-1327.1998.2570274.x.

- Van Schravendijk, C. F., Kiekens, R., and Pipeleers, D. G. (1992). Pancreatic beta cell heterogeneity in glucose-induced insulin secretion. *J. Biol. Chem.* 267, 21344–21348.
- Vance, C. L., Begg, C. M., Lee, W. L., Haase, H., Copeland, T. D., and McEnery, M. W. (1998). Differential expression and association of calcium channel alpha1B and beta subunits during rat brain ontogeny. *J. Biol. Chem.* 273, 14495–14502.
- Viard, P., Butcher, A. J., Halet, G., Davies, A., Nürnberg, B., Heblich, F., et al. (2004). PI3K promotes voltage-dependent calcium channel trafficking to the plasma membrane. *Nat. Neurosci.* 7, 939–946. doi:10.1038/nn1300.
- Vignali, S., Leiss, V., Karl, R., Hofmann, F., and Welling, A. (2006). Characterization of voltage-dependent sodium and calcium channels in mouse pancreatic A- and B-cells. *J. Physiol.* 572, 691–706. doi:10.1113/jphysiol.2005.102368.
- Virmani, A., Pinto, L., Bauermann, O., Zerelli, S., Diedenhofen, A., Binienda, Z. K., et al. (2015). The Carnitine Palmitoyl Transferase (CPT) System and Possible Relevance for Neuropsychiatric and Neurological Conditions. *Mol. Neurobiol.* 52, 826–836. doi:10.1007/s12035-015-9238-7.
- Wang, F., Gao, H., Kubo, H., Fan, X., Zhang, H., Berretta, R., et al. (2013). T-type Ca<sup>2+</sup> channels regulate the exit of cardiac myocytes from the cell cycle after birth. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 62, 122–130. doi:10.1016/j.yjmcc.2013.05.016.T-type.
- Wang, L. ., Bhattacharjee, A. ., Zuo, Z. ., Hu, F. ., Honkanen, R. ., Berggren, P. ., et al. (1999). A Low Voltage-Activated Ca<sup>2+</sup> Current Mediates Cytokine-Induced Pancreatic -Cell Death. *Endocrinology* 140, 1200–1204. doi:10.1210/en.140.3.1200.
- Warnotte, C., Gilon, P., Nenquin, M., and Henquin, J. (1994). Mechanisms of the stimulation of insulin release by saturated fatty acids: a study of palmitate effects in mouse β-cells. *Diabetes*. Available at:

<http://diabetes.diabetesjournals.org/content/43/5/703.short>.

- Watson, M. L., Macrae, K., Marley, A. E., and Hundal, H. S. (2011). Chronic Effects of Palmitate Overload on Nutrient- Induced Insulin Secretion and Autocrine Signalling in Pancreatic MIN6 Beta Cells. *PLoS One* 6. doi:10.1371/journal.pone.0025975.
- Weinhaus, A. J., David, I., and Bernard, E. (1995). Insulin Secretagogues , But Not Glucose , Stimulate an Increase in  $[Ca^{2+}]_i$  in the Fetal Rat beta-Cell. *Diabetes* 44, 1–18.
- Weinhaus, A. J., Tabiin, M. T., Poronnik, P., Palma, C. A., Cook, D. I., and Tuch, B. E. (2003). Insulin secretagogues, but not glucose, stimulate an increase in  $[Ca^{2+}]_i$  in the fetal human and porcine  $\beta$ -cell. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 2753–2759. doi:10.1210/jc.2002-021542.
- Welsh, M., Anneren, C., Lindholm, C., Kriz, V., and Oberg-Welsh, C. (2000). Role of tyrosine kinase signaling for beta-cell replication and survival. *Ups.J Med.Sci.* 105, 7–15. doi:10.1517/03009734000000052.
- Weyer, C., Bogardus, C., Mott, D. M., and Pratley, R. E. (1999). The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* 104, 787–794. doi:10.1172/JCI7231.
- Wiser, O., Trus, M., Hernández, A., Renström, E., Barg, S., Rorsman, P., et al. (1999). The voltage sensitive Lc-type  $Ca^{2+}$  channel is functionally coupled to the exocytotic machinery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 248–253. doi:10.1073/pnas.96.1.248.
- Yamashita, T., Eto, K., Okazaki, Y., Yamashita, S., Yamauchi, T., Sekine, N., et al. (2004). Role of uncoupling protein-2 up-regulation and triglyceride accumulation in impaired glucose-stimulated insulin secretion in a  $\beta$ -cell lipotoxicity model overexpressing sterol regulatory element-binding protein-1c. *Endocrinology* 145, 3566–3577. doi:10.1210/en.2003-1602.
- Yaney, G. C., and Corkey, B. E. (2003). Fatty acid metabolism and insulin

secretion in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 46, 1297–1312.  
doi:10.1007/s00125-003-1207-4.

Yang, S.-N., and Berggren, P.-O. (2005). Beta-cell CaV channel regulation in physiology and pathophysiology. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 288, E16–28. doi:10.1152/ajpendo.00042.2004.

Yang, S.-N., and Berggren, P.-O. (2006). The Role of Voltage-Gated Calcium Channels in Pancreatic  $\beta$ -Cell Physiology and Pathophysiology. *Endocr. Rev.* 27, 621–676. doi:10.1210/er.2005-0888.

Zhang, T., and Li, C. (2013). Mechanisms of amino acid-stimulated insulin secretion in congenital hyperinsulinism. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 45, 36–43. doi:10.1093/abbs/gms107.Advance.

Zhao, Y. F., Feng, D. D., and Chen, C. (2006). Contribution of adipocyte-derived factors to beta-cell dysfunction in diabetes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38, 804–819. doi:10.1016/j.biocel.2005.11.008.

Zhou, Y., and Grill, V. E. (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, 870–876.

Zhuang, H., Bhattacharjee, a, Hu, F., Zhang, M., Goswami, T., Wang, L., et al. (2000). Cloning of a T-type Ca<sup>2+</sup> channel isoform in insulin-secreting cells. *Diabetes* 49, 59–64. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11880513>.

Zraika, S., Dunlop, M. E., Proietto, J., and Andrikopoulos, S. (2004). Elevated SNAP-25 is associated with fatty acid-induced impairment of mouse islet function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 317, 472–477.  
doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.03.067>.

## 11. ANEXOS

Una gran parte de los resultados presentados en este trabajo han sido publicados en el siguiente artículo:

García-Delgado N, Velasco M, Sánchez-Soto C, Díaz-García CM and Hiriart M (2018). Calcium Channels in Postnatal Development of Rat Pancreatic Beta Cells and Their Role in Insulin Secretion. *Front. Endocrinol.* 9:40. doi: 10.3389/fendo.2018.00040